ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

«Ανάπτυξη φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων τους με σκοπό την αντιμετώπιση διαταραχών της εμμηνόπαυσης και την αξιολόγηση της επίδρασής τους στη δραστικότητα του ενζύμου τυροσινάση»

Βοντζαλίδου Αργυρώ
Χημικός

Αθήνα 2018

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

Doctoral Thesis

«Development of natural compounds and synthetic analogues for the treatment of menopausal disorders and their evaluation against tyrosinase activity»

Vontzalidou Argyro
Chemist

Athens 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ (επιβλέπων)

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΦΩΚΙΑΛΑΚΗΣ

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ (επιβλέπων)

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΦΩΚΙΑΛΑΚΗΣ

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΜΗΤΑΚΟΥ

Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α' ΜΙΧΑΗΛ Ν. ΑΛΕΞΗΣ

Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Αθηνών

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΕΡΚΟΣ ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ

Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΖΩΪΔΗΣ

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ: 09/07/2018

Στους αγαπημένους μου γονείς

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο «Ανάπτυξη φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων τους με σκοπό την αντιμετώπιση διαταραχών της εμμηνόπαυσης και την αξιολόγηση της επίδρασής τους στη δραστικότητα του ενζύμου τυροσινάση» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών, στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, στο Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ και στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων “Θ. Γαροφαλλίδης” του Π.Γ.Ν. “ΚΑΤ”.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη, για το ενδιαφέρον τους καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Επιβλέπων της παρούσας διατριβής ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης, τον οποίο ευχαριστώ ολόψυχα για την επιστημονική του καθοδήγηση και την αμέριστη ηθική υποστήριξη, την εμπιστοσύνη του και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη, τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη, την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου, τον Ερευνητή Α' Μιχαήλ Αλέξη, τον Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουνιάν και τον Επίκουρο Καθηγητή Γρηγόρη Ζωΐδη που δέχθηκαν να κρίνουν την παρούσα διατριβή.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, ο οποίος με δέχθηκε στο εργαστήριο αλλά και για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να διευρύνω τους επιστημονικούς ορίζοντές μου μέσω της συμμετοχής μου σε Ευρωπαϊκά Προγράμματα στα οποία υπήρξε επιστημονικός υπεύθυνος και την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Μητάκου Σοφία, η οποία υπήρξε επιστημονική υπεύθυνη του προγράμματος “SERMENCO” με τίτλο «Ανάπτυξη νέων εκλεκτικών ρυθμιστών του υποδοχέα οιστρογόνων για την αντιμετώπιση των συνεπειών της εμμηνόπαυσης», στο πλαίσιο του οποίου πραγματοποιήθηκε ένα σημαντικό μέρος της πειραματικής διαδικασίας, αλλά και για την άριστη συνεργασία μας και το ενδιαφέρον της καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Ερευνητή Α’ Δρ. Μιχαήλ Αλέξη, υπεύθυνο του Εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ, για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπαιδευτώ στην πραγματοποίηση βιολογικών κυτταρικών ελέγχων, για την εμπιστοσύνη του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ’ όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Γρηγόρη Ζωΐδη για την άριστη συνεργασία μας, τη συνεχή καθοδήγησή του και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του τόσο κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, όσο και των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη για τη συλλογή και βοτανική ταυτοποίηση των φυτικών δρογών, την παραχώρηση φωτογραφικού υλικού από το προσωπικό του αρχείο και το ενδιαφέρον του.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Αγγελική Μελίγκοβα για την πολύτιμη συμβολή της στην πραγματοποίηση μέρους των βιολογικών ελέγχων οστεοπροστασίας και οιστρογονικότητας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της και την άριστη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τη Δρ. Μαρία Μακροπούλου επίσης για τη συνεισφορά της στην πραγματοποίηση μέρους των βιολογικών ελέγχων οστεοπροστασίας και οιστρογονικότητας, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας, τη μετάδοση γνώσεων και την αμέριστη στήριξη και υπομονή της.

Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Ελίζα Χάϊτα για την εκπαίδευση και την πραγματοποίηση των βιολογικών δοκιμών έναντι του ενζύμου τυροσινάση, για τη βοήθειά της όποτε αυτή μου χρειάστηκε και την ειλικρινή υποστήριξή της.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρό του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας και ιδιαιτέρως τον Δρ. Λαμπρινίδη Γεώργιο για τη διεξαγωγή όλων των μελετών μοριακής προσομοίωσης, τη βοήθειά του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την άριστη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο, ως υπεύθυνο του Εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής του τμήματος Βιολογίας και ιδιαιτέρως την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Χειμωνίδου για τη διεξαγωγή των βιολογικών δοκιμασιών στις κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ισμήνη Δοντά, ως υπεύθυνη του Εργαστηρίου Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων του Π.Γ.Ν.Α. “ΚΑΤ”, τον υποψήφιο διδάκτορα, Ιατρό Γαλάνη Δημήτριο για την παροχή των αποτελεσμάτων των *in vivo* πειραμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διδακτορικής του διατριβής. Τον Δρ. Παύλο Λελόβα για τη συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του *in vivo* πειράματος και τον Δρ. Αντώνιο Γαλανό για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μουντζούρη Κωνσταντίνο και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Γεώργιο Παπαδομιχελάκη και κ. Ζωΐδη Ευάγγελο από το Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γ.Π.Α. για τη διάθεση του εξοπλισμού και τη βοήθειά τους κατά στην παρασκευή της τροφής των πειραματοζώων.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για την εκπαίδευση και την πολύτιμη βοήθειά της όποτε τη χρειάστηκα στη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Νικόλαο Λεμονάκη για την λήψη των φασμάτων μάζας και την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία τους.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συνεργάτες και μεταπτυχιακούς φοιτητές όλων των εργαστηρίων για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια των περασμένων ετών. Ιδιαιτέρως όμως θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου Αντιγόνη, Βάνα, Γεωργία, Γιώργο, Εύα, Κατερίνα, Κώστα, Μαρία, Νικητία και Σαπφώ, για τις αξέχαστες στιγμές που περάσαμε, την απεριόριστη βοήθεια, την υποστήριξη και την αγάπη τους.

Ευχαριστώ πολύ το Χρήστο μου, που με την αγάπη και τη στήριξή του πάντα κάνει τα δύσκολα λίγο πιο εύκολα και τις αγαπημένες μου φίλες που είναι η δεύτερη οικογένειά μου.

Τέλος, το πιο ουσιαστικό ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Ντίνο και Έφη που με μεγάλωσαν με τόση αγάπη, στοργή και υποστήριξη, πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα. Φυσικά στον αδερφό μου Διαμαντή για την αγάπη του και γιατί με το παράδειγμά του πάντα με εμπνέει και με εμψυχώνει!

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε i) η ανάπτυξη φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων τους με σκοπό την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης ως την κύρια διαταραχή της εμμηνόπαυσης και ii) η αξιολόγηση της επίδρασης των συνθετικών αναλόγων στη δραστικότητα του ενζύμου τυροσινάση. Αρχικά, γνωρίζοντας τις ευεργετικές επιδράσεις της ραλοξιφαίνης και άλλων εκλεκτικών ρυθμιστών των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM, Selective Estrogen Receptor Modulators) στη διατήρηση της οστικής μάζας, πραγματοποιήθηκε *in silico* αξιολόγηση ενός σημαντικού αριθμού ενώσεων της χημειοθήκης του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων (ΕΦΧΦΠ), οι οποίες ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, με σκοπό την ανακάλυψη νέων δομικών σκελετών (scaffolds) ή/και υποκαταστατών που ευνοούν τη σύνδεση με τους προαναφερόμενους υποδοχείς. Τα αποτελέσματα τόσο της *in silico* αξιολόγησης, όσο και προγενέστερων *in vitro* ελέγχων της οιστρογονικής δράσης φυσικών προϊόντων και αναλόγων τους, αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη ελπιδοφόρων παραγώγων επιλεγμένων φυσικών προϊόντων. Παράλληλα, συνδυάζοντας πληροφορίες της παραδοσιακής θεραπευτικής, οι οποίες προέρχονται είτε από κείμενα των αρχαίων Ελλήνων Ιατρών-Συγγραφέων, είτε από σύγχρονες εθνοβοτανικές μελέτες, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα αναφορικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, επιλέχθηκαν ως αντικείμενο μελέτης φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας σε μια προσπάθεια ανάδειξής της ως μια πλούσια πηγή βιοδραστικών παραγόντων.

Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής καταρτίστηκε μία συλλογή από 39 φυτικές δρόγες προερχόμενες από 36 είδη της ελληνικής χλωρίδας, τα οποία σε ένα μεγάλο ποσοστό ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae και με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση θεωρήθηκαν πλούσια πηγή των επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών. Με τη χρήση πράσινων τεχνικών εκχύλισης (ASE, SFE) παρασκευάσθηκαν 75 εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν με σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές (HPLC-DAD, HPTLC, LC-HRMS), ώστε να αξιολογηθεί το χημικό τους φορτίο και να καθοριστεί το φυτοχημικό τους «αποτύπωμα». Στη συνέχεια, με τη χρήση μιας σειράς *in vitro* κυτταρικών ελέγχων, τα προαναφερόμενα παρασκευάσματα αξιολογήθηκαν ως προς την οιστρογόνο (Ishikawa, MCF-7) και οστεοπροστατευτική (MC3T3-E1) δράση τους. Συνυπολογίζοντας τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του φυτοχημικού περιεχομένου και των βιολογικών ιδιοτήτων, επιλέχθηκαν 9 εκχυλίσματα των ειδών *Dorycnium hirsutum, Cytisus villosus, Hippocrepis comosa, Psoralea bituminosa, Lupinus albus, Ceratonia siliqua*, *Rhamnus sibthorpiana*, *Rhamnus lycioides* και *Rhamnus alpinus,* με σκοπό τον εντοπισμό των βιοδραστικών μεταβολιτών τους. Επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους των ειδών *Glycyrrhiza glabra* και οι κονιοποιημένοι καρποί του *Ceratonia siliqua* (χαρουπάλευρο) επιλέχθηκαν για να υποβληθούν σε *in vivo* μελέτη της οστεοπροστατευτικής τους δράσης σε μοντέλο θήλεος ωοθηκεκτομημένου επίμυος. Όλα τα

επιλεγμένα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν και ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση μακροφάγων κυττάρων RAW264.7 σε οστεοκλάστες. Εν συνεχεία, με χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών (CPC, Sephadex LC, Prep-TLC) απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 84 μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενίων, των φαινολοξέων, των φλαβονοειδών (ισοφλαβονών, φλαβονολών, φλαβανολών και φλαβονών), των κουμαρινών, των κουμεστανίων, των πτεροκαρπανών, των ακετοφαινονών, των βενζοφουρανίων και των ανθρακινονών. Αναφορικά με την ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων των επιλεγμένων φυσικών προϊόντων, έλαβε χώρα ο σχεδιασμός και η παρασκευή συνολικά 60 συνθετικών ενώσεων, οι οποίες ανήκουν στις κατηγορίες των δεοξυβενζοϊνών, των διυδροστιλβενίων, των ισοφλαβονών, των χαλκονών, των διαρυλοπροπανίων, των 2,3-διφαινυλοπροπενικών και των 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων. Οι απομονωμένοι φυσικοί μεταβολίτες και τα συνθετικά ανάλογα ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1D και 2D NMR).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των φυσικών και συνθετικών ενώσεων ως προς την πιθανή οιστρογονική και οστεοπροστατευτική δράση τους. Έτσι, 63 από τους απομονωμένους μεταβολίτες και 57 από τις συνθετικές ενώσεις ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τη διαφοροποίηση πρώιμων οστεοβλαστών (προ-οστεοβλαστικά κύτταρα MC3T3-E1) ή / και να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση μακροφάγων κυττάρων σε οστεοκλάστες (μακροφάγα κύτταρα RAW264.7). Επίσης, προσδιορίστηκε η οιστρογονικότητά τους μέσω επαγωγής της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa, καθώς και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενίων, των ισοφλαβονών, των φαινολοξέων, των κουμεστανίων και των ανθρακινών, καθώς και συνθετικά ανάλογα δεοξυβενζοϊνών, ισοφλαβονών, χαλκονών και 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων παρουσίασαν αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες.

Το επόμενο στάδιο της παρούσας διατριβής ήταν η *in vivo* αξιολόγηση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* και του χαρουπάλευρου (καρπός του *Ceratonia siliqua*) σε οστεοπορωτικό μοντέλο θηλυκών αρουραίων. Η χρονική διάρκεια του κάθε πειράματος ήταν έξι μήνες και προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα της αριστερής κνήμης των πειραματοζώων με τη μέθοδο DEXA κατά την έναρξη, τον 3ο και τον 6ο μήνα. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του σωματικού βάρους των επίμυων και κατά την ευθανασία μετρήθηκε το βάρος των ζωτικών τους οργάνων. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν το εκχύλισμα της *Glycyrrhiza glabra* ως σημαντικό οστεοπροστατευτικό παράγοντα, αλλά και το χαρουπάλευρο φάνηκε ικανό να αντισταθμίζει την προκαλούμενη από την ωοθηκεκτομή οστική απώλεια.

Σε δεύτερο επίπεδο, με αφορμή τα αποτελέσματα προγενέστερων ερευνητικών μελετών, διερευνήσαμε την πιθανή επίδραση των συνθετικών ενώσεων έναντι μιας δευτερεύουσας διαταραχής της εμμηνόπαυσης, η οποία σχετίζεται με τη διαταραχή στην παραγωγή μελανίνης και την εμφάνιση καφέχρωων κηλίδων στο δέρμα. Δεδομένου ότι η

τυροσινάση αποτελεί το ένζυμο κλειδί στη διαδικασία της μελανογένεσης, 45 συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν σε *in vitro* ενζυμική δοκιμασία ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να επάγουν τη δράση του ενζύμου κατά την οποία τα διυδροστιλβένια χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικοί παράγοντες αναστολής της ενεργότητάς του. Στη συνέχεια, αντιπροσωπευτικά συνθετικά παράγωγα, ελέγχθηκαν περαιτέρω σε κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων B16F1 και B16F10, ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στην παραγωγή μελανίνης, ενώ πραγματοποιήθηκε και *in silico* μελέτη της πρόσδεσής τους με τον υποδοχέα του ενζύμου της τυροσινάσης. Τα αποτελέσματα του *in vitro* ελέγχου των ενώσεων που αξιολογήθηκαν, επιβεβαίωσαν εκείνα του ελεύθερου κυττάρων ενζυμικού προσδιορισμού και ανέδειξαν τα διυδροστιλβένια που αξιολογήθηκαν ως σημαντικούς παράγοντες αναστολής τόσο της ενεργότητας της τυροσινάσης, όσο και της παραγωγής μελανίνης.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η ανάδειξη ελπιδοφόρων δομικών σκελετών, με βάση τόσο τα αποτελέσματα της *in silico* αξιολόγησης αλλά και την αξιοποίηση τόσο προγενέστερων μελετών οιστρογονικής δράσης, όσο και σύγχρονων εθνοφαρμακολογικών δεδομένων, είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση φυσικών προϊόντων και την ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων με πιθανές ευεργετικές επιδράσεις έναντι κύριων (οστεοπόρωση) αλλά και δευτερευουσών (εμφάνιση καφέχροων κηλίδων στο δέρμα) επιπτώσεων της εμμηνόπαυσης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: οστεοπόρωση, ελληνική χλωρίδα, MC3T3-E1, RAW264.7, τυροσινάση

Abstract

The aim of this doctorate dissertation was the discovery of novel natural products and the development of innovative synthetic analogues for a) the treatment of postmenopausal osteoporosis and b) the evaluation of their tyrosinase inhibitory activity. For the targeted selection of the most promising plant extracts and the design of the synthetic compounds, a rational approach combining *in silico* studies and ethnopharmacological data was planned.

Specifically, the scientific concept involved the design of a prediction / simulation model, based on the estrogenic potential of the Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for which the appropriate *in vitro* tests have already been developed. About 200 scaffolds of isolated compounds belonging to the Laboratory of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry (LPNPC) were *in silico* evaluated for their estrogenic and antiestrogenic activity. Another selection criterion was the assessment of information recorded in folk medicine and manuscripts of Ancient Greek authors-therapists, as well as the study of present bibliographic records for osteoporosis. Combining all the results, 36 plant species belonging in the highly-diverse Greek Flora were selected. Interestingly, the majority of the plant species belonged to the family of Leguminosae, rich in phytoestrogens or related analogues. In total, 75 sample extracts were generated employing environmental friendly extraction techniques (ASE, SFE, MAE), while advanced analytical methods (HPLC, HPTLC, LC-HRMS) were applied for their efficient and rapid fingerprint and chemical composition analysis. In parallel, the plant extracts were evaluated for their estrogenic and osteoprotective activity against Ishikawa / MCF-7 and MC3T3-E1 cell lines, respectively. Accordingly, *Dorycnium hirsutum, Cytisus villosus, Hippocrepis comosa, Psoralea bituminosa, Lupinus. albus, Ceratonia siliqua, Rhamnus sibthorpiana, Rhamnus lycioides* and *Rhamnus alpinus,* were further selected for their phytochemical investigation, while the methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* (roots) and the seeds of *Ceratonia siliqua* were selected for *in vivo* evaluation in an ovariectomized (OVX) rat model for postmenopausal osteoporosis. Furthermore, all the selected extracts were tested for their ability to suppress the differentiation of macrophages cells (RAW264.7) to mature osteoclasts.

Overall, 84 secondary metabolites were isolated using Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC), Sephadex LH-20 column chromatography and preparative TLC. NMR spectroscopy led to the structure elucidation of the compounds and revealed their structural diversity belonging to the classes of terpenes, phenyl acids, flavonoids (isoflavones, flavonols, flavanols, flavones), coumarins, coumestanes, pterocarpans, acetophenones, benzofurans, anthraquinones. Moreover, 60 analogues were synthesized belonging in the class of deoxybenzoins, dihydrostilbenes, isoflavones, chalcones, diarylpropanes, diarylpropenic acids, diarylpropanoic acids. Their chemical structure was verified with 1 & 2D NMR experiments.

Subsequently, 63 secondary metabolites and 57 synthetic compounds were evaluated for their potential osteoprotective properties through their ability to promote differentiation of

primal osteoblasts (MC3T3-E1 cells) and / or suppress the differentiation of macrophages cells (RAW264.7) to mature osteoclasts. Their estrogenic activity was also determined through the enhancement of alkaline phosphatase expression in Ishikawa cells, as well as the proliferation of MCF-7. Secondary metabolites belonging in the class of terpenes, isoflavones, phenyl acids, coumestanes and anthraquinones and synthetic analogues belonging in the class of deoxybenzoins, isoflavones and diarylpropenic acids, were promoted as the most potent osteoprotective agents.

Furthermore, we evaluated *in vivo* the methanolic extract of the roots of *Glycyrrhiza glabra* and the seeds of *Ceratonia siliqua* in an ovariectomized (OVX) rat experimental model of osteoporosis. The *in vivo* experiment lasted for six months and the bone mineral density of the left tibia of the experimental animals was determined through DEXA method, at the beginning as well as at the third and sixth month of the experiment. The body weight of the animals was measured throughout the experimental procedure, as well as the weight of their vital organs at the point of euthanasia.

Moreover, we explored the dual role of synthetic substances against a secondary menopause disorder. The estrogen deficiency, during menopause period, disrupts the production of melanin, resulting in the appearance of brown spots (or signs of aging) on the skin. Considering that tyrosinase is the key enzyme in melanin biosynthesis, 45 synthetic compounds were *in vitro* evaluated for their ability to inhibit / enhance tyrosinase activity. The *in vitro* evaluation revealed dihydrostilbene analogues as potent inhibitors, whereas diarylpropenoic acids seemed to enhance the enzymic activity. Selected synthetic compounds were further evaluated in melanoma cell lines, B16F1 and B16F10, for their ability to moderate tyrosinase activity and affect melanin production. *In silico* evaluation of their binding affinity with the tyrosinase was also conducted.

KEYWORDS: osteoporosis, greek flora, MC3T3-E1, RAW264.7, tyrosinase

Πρόλογος και σκοπός της εργασίας

Η εμμηνόπαυση αποτελεί μια φυσιολογική φάση της ζωής της γυναίκας, η οποία ξεκινά συνήθως μετά από την ηλικία των 40 ετών, ολοκληρώνεται λίγο μετά τα 60 χρόνια της και σηματοδοτεί το τέλος της αναπαραγωγικής ζωής. Είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου νευροενδοκρινολογικών μεταβολών που προκαλούν διαταραχές στην έμμηνο ρύση, αλλά και την εκδήλωση μιας σειράς δυσάρεστων συμπτωμάτων, όπως είναι οι εξάψεις, η εφίδρωση, η γήρανση του δέρματος, η οστεοπόρωση, τα καρδιαγγειακά προβλήματα, κ.ά.

Η οστεοπόρωση αποτελεί ίσως τη συχνότερη συνέπεια της εμμηνόπαυσης και συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές χρόνιες νόσους παγκοσμίως. Η οιστρογονική ένδεια αυξάνει το ρυθμό της οστικής αποδόμησης, με συνέπεια την απώλεια οστικής μάζας και αντοχής. Το γεγονός αυτό συντελεί στην αύξηση της συχνότητας των καταγμάτων ευθραυστότητας, με τα κατάγματα στο ισχίο, τη σπονδυλική στήλη, τον πήχη και τον καρπό να είναι τα πιο κοινά στην περίπτωση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Στις Δυτικές χώρες περίπου το 20% των λευκών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, άνω των 50 ετών, πάσχουν από οστεοπόρωση βάσει των διαγνωστικών κριτηρίων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ενώ ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται συναρτήσει της ηλικίας. Σε παγκόσμιο επίπεδο αναφέρεται πως 1 στις 3 γυναίκες άνω των 50 ετών και 1 στους 5 άνδρες αντίστοιχης ηλικίας θα υποστούν οστεοπορωτικό κάταγμα, ενώ η νόσος της οστεοπόρωσης ευθύνεται για περισσότερα από 8.9 εκατομμύρια κατάγματα ετησίως, γεγονός με τεράστιο κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο. Αξίζει να σημειωθεί πως τουλάχιστον σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η ανικανότητα / αναπηρία που προκαλείται από την οστεοπόρωση είναι μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλείται από τη νόσο του καρκίνου (με εξαίρεση τον καρκίνου του πνεύμονα) και είναι συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη από εκείνη που οφείλεται σε σειρά χρόνιων μη μεταδοτικών ασθενειών, όπως οι καρδιακές παθήσεις εξ' αιτίας υψηλής αρτηριακής πίεσης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το άσθμα. Αρκετά θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, παρά την αποτελεσματικότητά τους έχουν συνδυαστεί με παρενέργειες, με κυριότερη την ανάπτυξη ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, όπως συμβαίνει κατά την θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Για το λόγο αυτό πλήθος επιστημόνων και ασθενών τα τελευταία χρόνια στρέφονται προς εναλλακτικές θεραπείες για την πρόληψη ή / και την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, ενώ παρατηρείται ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη φυτοοιστρογόνων με ιδιότητες εκλεκτικών ρυθμιστών των οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs), πλαίσιο στο οποίο εντάσσεται και η παρούσα διατριβή.

Ως φυτοοιστρογόνα χαρακτηρίζονται φυσικά προϊόντα και συνθετικά τους ανάλογα που προσδένονται στον οιστρογονικό υποδοχέα επηρεάζοντας θετικά τη φυσιολογία διαφόρων συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του σκελετικού ιστού. Στην κινεζική ιατρική δρόγες πλούσιες σε φυτοοιστρογόνα, όπως αυτές που προέρχονται από τα είδη *Astragallus membranaceus, Angelicae sinensis, Trifolium pretense, Pueraria lobata, Epimedium*

brevicornum, Salvia miltorrhiza, Drynariae rhizoma καθώς, και οι συνδυασμοί τους σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές, χορηγούνται χρόνια για την αντιμετώπιση των οστικών παθήσεων. Επίσης, τα τελευταία χρόνια στο Δυτικό κόσμο κυκλοφορούν εμπορικά σκευάσματα (Promensil, Evista) που χορηγούνται για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και περιέχουν δραστικά συστατικά φυσικής προέλευσης. Από την άλλη μεριά, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η παραδοσιακή μας θεραπευτική και τα κείμενα αρχαίων Ελλήνων θεραπευτών (π.χ. Διοσκουρίδης, Ιπποκράτης) αποτελούν πολύτιμες πηγές πληροφοριών αναφορικά με τη χρήση φυτών για την αντιμετώπιση πληθώρας παθήσεων που σχετίζονται με γυναικολογικές διαταραχές. Επομένως, η αξιοποίησή τους μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στην ανεύρεση φυτικών ειδών πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα. Μολονότι η ελληνική χλωρίδα χαρακτηρίζεται από αξιόλογη βιοποικιλότητα, λόγω των ιδιαίτερων κλιματολογικών και γεωγραφικών χαρακτηριστικών της χώρας μας, ελάχιστες είναι οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που συσχετίζουν φυτά της ελληνικής χλωρίδας με την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Για το λόγο αυτό, η χλωρίδα μας αποτέλεσε την αποκλειστική πηγή αναζήτησης των φυτικών ειδών, τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η ανακάλυψη φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων τους με ευεργετική επίδραση στην πρόληψη ή / και τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, ως κύρια συνέπεια της εμμηνόπαυσης. Από την άλλη μεριά, με την εμφάνιση της εμμηνόπαυσης και την επερχόμενη πτώση των επιπέδων των οιστρογόνων στον οργανισμό, διαταράσσεται και η παραγωγή της μελανίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση καφέχροων κηλίδων (ή σημάδια γήρατος) σε σημεία του δέρματος (πρόσωπο, λαιμός, χέρια, μπράτσα και στήθος) που έχουν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία επί σειρά ετών. Επομένως, η ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων, αναστολέων του ενζύμου τυροσινάση που εμπλέκεται στη διαδικασία της μελανογένεσης, για την αντιμετώπιση των προαναφερόμενων δευτερευουσών συνεπειών της εμμηνόπαυσης αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Πιο συγκεκριμένα, οι επιμέρους στόχοι της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας είναι:

- η *in silico* μελέτη μοριακής προσομοίωσης σε μια μεγάλη ποικιλία φυσικών και συνθετικών προϊόντων της χημειοθήκης του ΕΚΠΑ-ΕΦΧΦΠ, ως προς την ικανότητα σύνδεσής τους με τον υποδοχέα οιστρογόνων
- ο σχεδιασμός και η παρασκευή νέων συνθετικών αναλόγων, με βάση την *in silico* μελέτη, για την ανακάλυψη ελπιδοφόρων εκλεκτικών ρυθμιστών των οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs)
- η επιλογή φυτικών ειδών με βάση τα αποτελέσματα τόσο της *in silico* μελέτης, όσο και προγενέστερων ερευνητικών μελετών της ερευνητικής μας ομάδας, αλλά και μέσω της

αξιοποίησης πληροφοριών παραδοσιακής θεραπευτικής και σύγχρονων εθνοφαρμακολογικών δεδομένων

- η αξιοποίηση αυτοματοποιημένων τεχνικών εκχύλισης με σκοπό την παρασκευή μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων με τη μικρότερη κατανάλωση οργανικών διαλυτών και η χρήση σύγχρονων χρωματογραφικών τεχνικών, με σκοπό τον καθορισμό του φυτοχημικού «αποτυπώματος» των παρασκευασμάτων

- ο προκαταρκτικός βιολογικός έλεγχος (screening) της οιστρογόνου και οστεοπροστατευτικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων με τη χρήση διαφόρων κυτταρικών μοντέλων (κύτταρα μαστού και μήτρας, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες)

- η απομόνωση και η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών των επιλεγμένων εκχυλισμάτων

- ο έλεγχος της οιστρογόνου και οστεοπροστατευτικής ικανότητας των απομονωμένων φυσικών προϊόντων, καθώς και των παρασκευασθέντων συνθετικών αναλόγων

- η *in vivo* εκτίμηση της επίδρασης δύο επιλεγμένων φυτικών παρασκευασμάτων στην οστική πυκνότητα των οστών ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων

- η ικανότητα των συνθετικών αναλόγων να επιδρούν στη δραστικότητα του ενζύμου τυροσινάση και στη διαδικασία της μελανογένεσης.

Η εν λόγω διατριβή εντάσσεται στο πλαίσιο μια ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, αναφορικά με τη μελέτη φυτοοιστρογόνων ενώσεων και την ανάπτυξη αποτελεσματικών και καινοτόμων φυσικών προϊόντων με ευεργετική επίδραση στις διαταραχές που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση και ειδικότερα την οστεοπόρωση.

.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες xi
Περίληψη xv
Abstract xix
Πρόλογος και σκοπός της εργασίας xxi
Λίστα Εικονών xxxiii
Λίστα Πινάκων xlv
Συντομογραφίες & Σύμβολα li
Γενικό Μέρος I
1 **Εμμηνόπαυση** 1
1.1 Παθοφυσιολογία και ενδοκρινολογία της εμμηνόπαυσης 1
1.2 Επιπτώσεις της εμμηνόπαυσης 4
1.2.1 Κλιμακτηριακό σύνδρομο 4
1.2.2 Καρδιαγγειακές παθήσεις 6
1.2.3 Νόσος του Alzheimer 6
1.2.4 Οστεοπόρωση 7
1.3 Θεραπεία - Αντιμετώπιση των συνεπειών της εμμηνόπαυσης 8
2 **Δομή και φυσιολογία των οστών** 13
2.1 Δομικά χαρακτηριστικά 13
2.2 Αρχιτεκτονική και μορφολογία των οστών 14
2.3 Οστικά κύτταρα 15
2.3.1 Φυσιολογία-Λειτουργία οστεοβλαστών 17
2.3.2 Φυσιολογία-Λειτουργία οστεοκλαστών 19
2.4 Διεργασίες οστικής (ανα)-κατασκευής 21
2.4.1 Σημασία οστικής αναδιαμόρφωσης 22
2.4.2 Διαδικασία οστικής αναδιαμόρφωσης 23
2.4.3 Παράγοντες που εμπλέκονται στην ανακατασκευή των οστών 25
3 **Οστεοπόρωση** 31
3.1 Ιστορικά στοιχεία - Ορισμός 31
3.2 Σοβαρότητα της νόσου 31
3.3 Είδη οστεοπόρωσης 32
3.4 Αιτιολογία οστεοπόρωσης 33
3.5 Διάγνωση οστεοπόρωσης 34
3.6 Πρόληψη - Θεραπεία οστεοπόρωσης 37
4 **Υπέρχρωση του δέρματος** 41
4.1 Μελανογένεση 42
4.2 Ο ρόλος της τυροσινάσης στη μελανογένεση 44
4.3 Αναστολείς τυροσινάσης 45
4.4 Επαγωγείς τυροσινάσης 48
5 **Φυσικά προϊόντα και συνθετικά ανάλογα** 51

5.1 Φυτοοιστρογόνα και οστεοπόρωση 53
5.2 Συνθετικά ανάλογα 56
5.2.1 Δεοξυβενζοΐνες 56
5.2.2 Διυδροστιλβένια 58
5.2.3 Χαλκόνες 60
5.2.4 Διαρυλοπροπάνια 61
5.2.5 (*E*)-2,3-διφαινυλοπροπενικά οξέα 62
5.2.6 (*E*)-2,3-διφαινυλοπροπανοϊκά οξέα 64
6 Ελληνική χλωρίδα 65
6.1 Περιγραφή μελετώμενων φυτικών ειδών 66
6.1.1 Γένος *Dorycnium* 66
6.1.2 Γένος *Cytisus* 68
6.1.3 Γένος *Hippocrepis* 72
6.1.4 Γένος *Ceratonia* 74
❖ Χαρουπάλευρο 77
6.1.5 Γένος *Psoralea* 78
6.1.6 Γένος *Lupinus* 82
6.1.7 Γένος *Rhamnus* 86
6.1.8 Γένος *Glycyrrhiza* 89
Ειδικό μέρος 93
1 Υλικά και Μέθοδοι 95
1.1 Φυτοχημική επεξεργασία 95
1.1.1 Συλλογή φυτικού υλικού 95
1.1.2 Τεχνικές εκχύλισης 95
1.1.3 Φασματοσκοπικές τεχνικές 103
1.2 Συνθετική επεξεργασία 104
1.3 *In silico* πειραματική διαδικασία 105
1.3.1 Μελέτη σύνδεσης με τους υποδοχείς οιστρογόνων 105
1.4 *In vitro* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της οστεοπροστατευτικής και οιστρογόνου δράσης 108
1.4.1 Υλικά 108
1.4.2 Κυτταρικές σειρές 109
1.5 *In vivo* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της οστεοπροστατευτικής δράσης 114
1.5.1 Μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων 114
1.6 *In vitro* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της λευκαντικής δράσης 117
1.6.1 Ελεύθερη κυττάρων ενζυμική δοκιμασία έναντι του ενζύμου τυροσινάση 117
1.6.2 Προσδιορισμός της λευκαντικής δράσης σε μελανοκύτταρα 118
2 Επιλογή φυτικών ειδών και σχεδιασμός συνθετικών αναλόγων 122
2.1 *In silico* προκαταρτική αξιολόγηση 122
2.2 Επιλογή φυτικών δρογών 125
2.3 Παρασκευή εκχυλισμάτων 133

3 Φυτοχημική και βιολογική αξιολόγηση εκχλισμάτων 138
3.1 Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων 138
3.1.1 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPTLC 138
3.1.2 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPLC 141
3.1.3 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας LC-MS 141
3.2 Προκαταρτική βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων 158
3.2.1 Προκαταρτικός έλεγχος της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων 158
4 Φυτοχημική μελέτη εκχυλισμάτων 184
4.1 Συλλογή φυτικού υλικού 184
4.2 Παρασκευή εκχυλισμάτων 185
4.3 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών 186
4.3.1 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium hirsutum* (DHM) 186
4.3.2 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cytisus villosus* (CVM) 208
4.3.3 Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Hippocrepis comosa* (HCE) 229
4.3.4 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Ceratonia siliqua* (CSM) 246
4.3.5 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (PBM) 284
4.3.6 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (LAM) 307
4.3.7 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM) 319
4.3.8 Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLE) 345
4.3.9 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* (RAM) 357
5 Συνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόντων 368
5.1 Συνθετική παρασκευή αναλόγων δεοξυβενζοϊνών και διυδροστιλβενίων 368
5.1.1 Σύνθεση της 2,4,4'-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC1) 371
5.1.2 Σύνθεση της 4'-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC2) 372
5.1.3 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-νιτρο-δεοξυβενζοΐνης (SC3) 373
5.1.4 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-μεθοξυδεοξυβενζοΐνης (SC4) 374
5.1.5 Σύνθεση της 2,4,4'-τριυδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC5) 376
5.1.6 Σύνθεση της της 2,4,3',4'-τετραυδροξυ-5-χλωρο-δεοξυβενζοΐνης (SC6) 377
5.1.7 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-φθορο-δεοξυβενζοΐνης (SC7) 378
5.1.8 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC8) 379
5.1.9 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-2'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC9) 380
5.1.10 Σύνθεση της 3'-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC10) 381
5.1.11 Σύνθεση της 2,4,4'-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC11) 382

5.1.12 Σύνθεση της 8-πρενυλο-2,4,4'-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC12) και της της 6-*O*-,8-C-διπρενυλο-2,4,4'-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC13)..... 383

5.1.13 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4-*O*-πρενυλο-4'-φθορο -δεοξυβενζοΐνης (SC14) και της 4-*O*-,8-*C*-διπρενυλο-2,4-διυδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνης (SC15) 387

5.1.14 Σύνθεση της 4-*O*-πρενυλο-2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC16) και της 4-*O*-,8-*C*-διπρενυλο-2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC17)..... 389

5.1.15 Σύνθεση του 2,4,4'-τριμεθοξυ-6-υδροξυδιυδροστιλβενίου ή 1-(6-υδροξυ-2,4-διμεθοξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-αιθανίου (SC18) 391

5.1.16 Σύνθεση του 2,4,4'-τριυδροξυ-διυδροστιλβενίου ή {1-(2,4-διυδροξυφαινυλ)-2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθανίου} (SC19) 392

5.1.17 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυδιυδροστιλβενίου ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-φαινυλαιθανίου (SC20)..... 394

5.1.18 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-4'-μεθοξυδιυδροστιλβενίου 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)αιθανίου (SC21) 395

5.1.19 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-4'-φθοροδιυδροστιλβενίου ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανίου (SC22)..... 396

5.1.20 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-2'-χλωροδιυδροστιλβενίου ή {1-(2,4-υδροξυφαι-νυλ)- 2(2-χλρωφαινυλο)αιθανίου (SC23) 397

5.2 Συνθετική παρασκευή ισοφλαβονών..... 398

5.2.1 Σύνθεση της 5,7,4'-τριμεθοξυισοφλαβόνης (SC24) 401

5.2.2 Σύνθεση της 5,7-διμεθοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (SC25) 402

5.2.3 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνης ή προυνετίνης (SC26)..... 402

5.2.4 Σύνθεση της 7,5,4'-τριυδροξυισοφλαβόνης ή γενιστεΐνης (SC27)..... 403

5.2.5 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-4'-*O*-πρενυλοισοφλαβόνης (SC28) 404

5.2.6 Σύνθεση της 5, 4'-*O*-διπρενυλοξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνης (SC29) 405

5.2.7 Σύνθεση της 6-*C*-,4'-*O*-διπρενυλο-5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλα-βόνης (SC30) . 406

5.2.8 Σύνθεση της 8-*C*-,4'-*O*-διπρενυλο-5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλα-βόνης (SC31) . 407

5.2.9 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-5-*O*-πρενυλοισοφλαβόνης (SC32)..... 409

5.2.10 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλοβουτ-3-εν-2-υλο)ισοφλαβόνης (SC33) 410

5.2.11 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλβουτεν-2-υλο) ισοφλαβόνης (SC34) 411

5.3 Συνθετική παρασκευή χαλκονών και διαρυλοπροπανίων..... 412

5.3.1 Σύνθεση της 2',4',6',3,4,5-εξαμεθοξυχαλκόνης (SC35)..... 414

5.3.2 Σύνθεση της 4'-βενζυλοξυ-4-μεθοξυχαλκόνης (SC36)..... 416

5.3.3 Σύνθεση της 4,2',4'-τριυδροξυχαλκόνης (SC37) 417

5.3.4 Σύνθεση της 3,4,5-4'- τετραμεθοξυχαλκόνης (SC38) 418

5.3.5 Σύνθεση του 2',4',6',3'',4'',5''-διαρυλοπροπανίου (SC39)..... 419

5.3.6 Σύνθεση του 3-(4"-μεθοξυφαινυλο)-1-(4'-υδροξυφαινυλο) προπανίου (SC40)..... 421

5.3.7 Σύνθεση του 1-(2',4'-διυδροξυφαινυλο)-3-(4"-υδροξυφαινυλο)προπανίου (SC41) . 422

5.3.8 Σύνθεση του 4',3'',4'',5''-τετραμεθοξυδιαρυλοπροπανίου (SC42)..... 422

5.4 Συνθετική παρασκευή διφαινυλοπροπενικών και διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων 423

5.4.1 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(4'-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC43) 425

5.4.2 Σύνθεση του (*E*)-2-(φαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC44)..... 427
5.4.3 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC45) 428
5.4.4 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυβρωμοφαινυλοφαινυλ)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC46) 429
5.4.5 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-φθοροφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC47) 430
5.4.6 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-χλωροφαινυλο)-3-(4'-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC48) 431
5.4.7 Σύνθεση της 7-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)κουμαρίνης (SC49) 432
5.4.8 Σύνθεση του *(E*)-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC50) 434
5.4.9 Σύνθεση του (*E*)-2-(φαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC51)..... 435
5.4.10 Σύνθεση του (E)-2-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC52) 436
5.4.11 Σύνθεση της 3-φαινυλο-7-μεθοξυ-κουμαρίνης (SC53) 437
5.4.12 Σύνθεση του (*E*)-2-φαινυλο-3-(3-5-διμεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC54) 438
5.4.13 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC55) 439
5.4.14 Σύνθεση του (E)-2-(4-νιτροφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC56) 440
5.4.15 Σύνθεση του 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπανοϊκού οξέος (SC59) 441
5.4.16 Σύνθεση του 2-φαινυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC60)..... 443
5.4.17 Σύνθεση του 2-(4-φθοροφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC61) 445
5.4.18 Σύνθεση του 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC62) 445
6 *In vitro* βιολογική αξιολόγηση φυσικών και συνθετικών ενώσεων 448
6.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση 448
6.1.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση..... 448
6.1.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση..... 459
6.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης 463
6.2.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης..... 463
6.2.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης..... 472
6.3 Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa 475
6.3.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa 475
6.3.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa 480
6.4 Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7 482
6.4.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7 482
6.4.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7 488

7 *In vivo* αξιολόγηση σε μοντέλο αρουραίων 518
7.1 *Glycyrrhiza glabra* 518
7.1.1 Παρασκευή εκχυλίσματος 518
7.1.2 Μέτρηση οστικής πυκνότητας 519
7.1.3 Σωματικά βάρη- Βάρη οργάνων 524
7.2 Χαρούπι (καρποί του είδους *Ceratonia siliqua*) 526
7.2.1 Παρασκευή τροφής 526
7.2.2 Μέτρηση οστικής πυκνότητας 526
7.2.3 Σωματικά βάρη- Βάρη οργάνων 530
8 Αξιολόγηση των συνθετικών ενώσεων στη διαδικασία της μελανογένεσης 532
8.1 Αξιολόγηση των συνθετικών ενώσεων έναντι του ενζύμου τυροσινάση 532
8.2 *In vitro* αξιολόγηση χαρακτηριστικών συνθετικών αναλόγων σε μελανοκύτταρα ... 539
8.2.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές B16F1 και B16F10 539
8.2.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας της τυροσινάσης και της παραγόμενης μελανίνης στα κύτταρα B16F1 και B16F10 541
Συμπεράσματα - Προοπτικές 546
Βιβλιογραφία 556

Λίστα Σχημάτων

Σχήμα 1: Βιοσυνθετικό μονοπάτι μελανογένεσης (Tyr: tyrosinase, DQ: dopaquinone; L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylic acid, DHI: 5,6-dihydroxyindole, ICAQ, indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone, IQ: indole-5,6-quinone, HBTA: 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine). 43
Σχήμα 2: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium hirsutum* (DHM) 187
Σχήμα 3: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cytisus villosus* (CVM). 209
Σχήμα 4: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Hippocrepis comosa* (HCE). 230
Σχήμα 5: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Ceratonia sliqua* (CSM) 248
Σχήμα 6: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (PBM) 285
Σχήμα 7: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (LAM) 308
Σχήμα 8: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM) 321
Σχήμα 9: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLE) 346
Σχήμα 10: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* (RAM).....358
Σχήμα 11: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή αναλόγων δεοξυβενζοϊνών και διυδροστιλβενίων 36968
Σχήμα 12: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή αναλόγων ισοφλαβονών 398
Σχήμα 13: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή χαλκονών και διαρυλοπροπανίων.....412
Σχήμα 14: Συνθετική πορεία για την παρασκευή διαρυλοπροπενικών και διαρυλοπροπανοϊκών οξέων 4243

Λίστα Εικονών

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας έκπτωσης της ωοθηλακικής δραστηριότητας οδηγώντας στην εγκατάσταση της εμμηνόπαυσης. 2
Εικόνα 2: Δικτυωτό και πεταλιώδες οστό. Φωτογραφία από μικροσκόπιο πολωμένου φωτός. (Δ): δικτυωτό οστό (Π): πεταλιώδες οστό 14
Εικόνα 3: Αρχιτεκτονική του οστού-Φλοιώδες και δοκιδώδες οστό. (Φ): φλοιώδες οστό, (Δ): δοκιδώδες οστό, (Μ): μυελός 14
Εικόνα 4: Μορφολογία οστών....15
Εικόνα 5: Δομή ενός μακρού οστού 15
Εικόνα 6: Οστικά κύτταρα....17
Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής των οστεοβλαστών 18
Εικόνα 8: Διαφοροποίηση και λειτουργία οστεοκλαστών....20
Εικόνα 9: Στάδια οστικής ανακατεσκευής....25
Εικόνα 10: *Dorycnim hirsutum*....68
Εικόνα 11: *Cytisus villosus*....71
Εικόνα 12: *Hippocrepis comoa*....73
Εικόνα 13: *Ceratonia siliqua*....74
Εικόνα 14: *Psoralea bituminosa* 80
Εικόνα 15: *Lupinus albus* 84
Εικόνα 16: *Rhamnus lycioides*....87
Εικόνα 17: *Rhamnus sibthorpiana*....88
Εικόνα 18: *Rhamnus alpinus*....89
Εικόνα 19: *Glycyrrhiza glabra*....91
Εικόνα 20: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με οιστραδιόλη και EZT 105
Εικόνα 21: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με 4-OH-ταμοξιφαίνη και ραλοξιφαίνη 106
Εικόνα 22: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με γενιστεΐνη και χωρίς πρόσδεμα .106
Εικόνα 23: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα επιλεγμένων δρογών σε συστήματα ανάπτυξης DCM/MeOH 95/5 και 99/1. Απορροφήσεις στα 254 και 366nm καθώς και στο ορατό....138
Εικόνα 24: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων επιλεγμένων δρογών σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN 60/40. Απορροφήσεις στα 254 και 366nm καθώς και στο ορατό 139
Εικόνα 25: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του εκδόχου. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 158
Εικόνα 26: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί του εκδόχου κατά την $1^η$ ημέρα επώασης. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 163
Εικόνα 27: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (1 μg/ml) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι

τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων 167
Εικόνα 28: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....167
Εικόνα 29: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς, είτε υλικού διαφοροποίησης (50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των ενώσεων αναφοράς για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού αναφοράς. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων 170
Εικόνα 30: Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (10 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....171
Εικόνα 31: Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (1 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....173
Εικόνα 32: Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (0.1 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....174
Εικόνα 33: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο δειγμάτων (10 μg/ml). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 180
Εικόνα 34: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του DHM σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (80/20) 186
Εικόνα 35: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του DHM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (75/25+1%F.A.) 187
Εικόνα 36: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM3 190
Εικόνα 37: Φάσμα^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης DHM4 193
Εικόνα 38: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM5 1954

Εικόνα 39: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης DHM7 197
Εικόνα 40: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM8 199
Εικόνα 41: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM9 201
Εικόνα 42: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης DHM10 202
Εικόνα 43: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM11 204
Εικόνα 44: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM12 206
Εικόνα 45: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του CVM σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (80/20). 208
Εικόνα 46: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του CVM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30) 208
Εικόνα 47: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM1 210
Εικόνα 48: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM2 212
Εικόνα 49: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM3 214
Εικόνα 50: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM4 215
Εικόνα 51: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM5 και CVM6 217
Εικόνα 52: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM8 219
Εικόνα 53: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBCτης ένωσης CVM9 220
Εικόνα 54: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM10 222
Εικόνα 55: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM11 223
Εικόνα 56: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του HCE σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (95/5). 229
Εικόνα 57: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του HCE σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30). 229
Εικόνα 58: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE1 231
Εικόνα 59: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE2 233
Εικόνα 60: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE5 236
Εικόνα 61: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC του μεταβολίτη HCE5 236
Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη HCE6 238
Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης HCE8 240
Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης HCE9 242
Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη HCE10 244
Εικόνα 66: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων της CSM σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H_2O/FA 52/5/9/1 247
Εικόνα 67: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων της CSM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30). 247
Εικόνα 68: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης CSM1 249
Εικόνα 69: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CSM3 2521
Εικόνα 70: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης CSM4 253
Εικόνα 71: Φάσμα HMBC της ένωσης CSM4 2554
Εικόνα 72: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CSM5 255
Εικόνα 73: Φάαμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM7 258
Εικόνα 74: Φάσμα COSY του μεταβολίτη CSM7 259
Εικόνα 75: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CSM8 261
Εικόνα 76: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM9 263
Εικόνα 77: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης CSM10 265
Εικόνα 78: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM11 267
Εικόνα 79: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC του μεταβολίτη CSM11 268
Εικόνα 80: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM12 270
Εικόνα 81: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC του μεταβολίτη CSM12 270
Εικόνα 82: Φάσμα ^{1}H-NMR και COSY του μεταβολίτη CSM12 271

Εικόνα 83 :Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CSM13 273
Εικόνα 84: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM14 275
Εικόνα 85: Φάσμα ^{1}H-NMR των μεταβολιτών CSM15 και CSM16.....277
Εικόνα 86: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT των μεταβολιτών CSM15 και CSM16 277
Εικόνα 87: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CSM17 279
Εικόνα 88: Φάσμα ^{1}H-NMR και COSY του μεταβολίτη CSM17.....280
Εικόνα 89: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM17.....280
Εικόνα 90: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CSM18 282
Εικόνα 91: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του PBM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20) 284
Εικόνα 92: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του PBM σε σύστημα ανάπτυξης E/M/$H_2$0/FA (50/10/7/1) 284
Εικόνα 93: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM1.....286
Εικόνα 94: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM2.....288
Εικόνα 95: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM3.....289
Εικόνα 96: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM5.....290
Εικόνα 97: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC του μίγματος των ενώσεων PBM6_A και PBM6_B...292
Εικόνα 98: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης PBM8.....293
Εικόνα 99: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης PBM9.....295
Εικόνα 100: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM11.....297
Εικόνα 101: Φάσμα ^{1}H-NMR -των ενώσεων PBM12 και PBM13.....298
Εικόνα 102: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης PBM14 300
Εικόνα 103: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης PBM15.....3032
Εικόνα 104: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης PBM15.....3054
Εικόνα 105: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του LAM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20) 307
Εικόνα 106: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης LAM3.....309
Εικόνα 107: Φάσμα ^{1}H-NMR των ενώσεων LAM5 και LAM6.....3121
Εικόνα 108: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης LAM7.....314
Εικόνα 109: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης LAM8.....3165
Εικόνα 110: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης LAM9.....317
Εικόνα 111: Χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων του RSM σε (A): κανονική πλάκα σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20) και (B): σε αντίστροφη πλάκα σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30).....320
Εικόνα 112: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM3 322
Εικόνα 113: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM4 324
Εικόνα 114: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM5 325
Εικόνα 115: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM6 327
Εικόνα 116: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης RSM6 328
Εικόνα 117: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM7 330
Εικόνα 118: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM8 332
Εικόνα 119: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM9.....333
Εικόνα 120: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM10.....336
Εικόνα 121: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RSM11.....33938
Εικόνα 122: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT του μίγματος των ενώσεων RSM12 και RSM13.....3421
Εικόνα 123: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του RLE σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (90/10) 345
Εικόνα 124: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RLE1.....347
Εικόνα 125: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RLE2.....349

Εικόνα 126: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RLE4.....351
Εικόνα 127: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης RLE4 3521
Εικόνα 128: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RLE5.....354
Εικόνα 129: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του RAM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (95/5) 357
Εικόνα 130: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του RAM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (90/10) 357
Εικόνα 131: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RAM1.....359
Εικόνα 132: Φάσμα ^{1} H-NMR και HMBC της ένωσης RAM2 361
Εικόνα 133: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης RAM4 364
Εικόνα 134: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης SC12 383
Εικόνα 135: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC13 3865
Εικόνα 136: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC19 3932
Εικόνα 137:Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC35 414
Εικόνα 138: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC39 419
Εικόνα 139: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC43 425
Εικόνα 140: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC45.....428
Εικόνα 141: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης SC49 432
Εικόνα 142: Φάσμα^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης SC59.....441
Εικόνα 143: Φάσμα^{1}H-NMR και HSQC-DEPT της ένωσης SC60.....443
Εικόνα 144: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Dorycnium hirsutum* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 448
Εικόνα 145: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Cytisus villosus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....449
Εικόνα 146: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Hippocrepis comosa* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....450
Εικόνα 147: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από τη *Ceratonia siliqua* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού

διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 452
Εικόνα 148: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από την *Psoralea bituminosa* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 453
Εικόνα 149: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Lupinus albus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....454
Εικόνα 150: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus sibthorpiana* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων 455
Εικόνα 151: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus lycioides* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 456
Εικόνα 152: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus alpinus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 457
Εικόνα 153: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα δεοξυβενζοϊνών (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....458

Εικόνα 154: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 460
Εικόνα 155: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα κουμαρινών, στιλβενικών και δυδροστιλβενικών οξέων (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 461
Εικόνα 156: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 463
Εικόνα 157: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Cytisus villosus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). . 464
Εικόνα 158: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Hippocrepis comosa* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 465
Εικόνα 159: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων της *Ceratonia siliqua* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 466
Εικόνα 160: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων της *Psoralea bituminosa* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού

διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 467
Εικόνα 161: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Lupinus albus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 468
Εικόνα 162: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 469
Εικόνα 163: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus lycioides* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 469
Εικόνα 164: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus alpinus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 470
Εικόνα 165: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών δεοξυβενζοϊνικών παραγώγων(10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής) 471
Εικόνα 166: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....4732
Εικόνα 167: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών αναλόγων κουμαρινών, στιλβενικών και διυδροστιλβενικών οξέων (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και

η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....473
Εικόνα 168: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....474
Εικόνα 169: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Cytisus villosus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 475
Εικόνα 170: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Hippocrepis comosa* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....476
Εικόνα 171: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων της *Ceratonia siliqua* (1μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....476
Εικόνα 172: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων της *Psoralea bituminosa* (1μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....477
Εικόνα 173: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Lupinus albus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 477
Εικόνα 174: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....478
Εικόνα 175: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus lycioides* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....478
Εικόνα 176: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus alpinus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....479
Εικόνα 177: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών δεοξυβενζοϊνικών αναλόγων (1 μM) για 72 ώρες και η

έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....479
Εικόνα 178: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 480
Εικόνα 179: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικων αναλόγων κουμαρινών και στιλβενοειδών (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 480
Εικόνα 180: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 481
Εικόνα 181: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Cytisus villosus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....482
Εικόνα 182: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Hippocrepis comosa* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 483
Εικόνα 183: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων της *Ceratonia siliqua* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....483
Εικόνα 184: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων της *Psoralea bituminosa* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 484
Εικόνα 185: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων της *Lupinus albus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....485

Εικόνα 186: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 485
Εικόνα 187: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus lycioides* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 486
Εικόνα 188: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus alpinus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 487
Εικόνα 189: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων δεοξυβενζοϊνών για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 488
Εικόνα 190: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 489
Εικόνα 191: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων κουμαρινών και στιλβενοειδών για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 489
Εικόνα 192: Διάγραμμα ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας της εγγύς μετάφυσης της κνήμης: * $p<0.005$ σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής. 521
Εικόνα 193: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: * $p<0.05$ σε σχέση με το Control και $^{+}p<0.005$ σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....522
Εικόνα 194: Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του αριστερού νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λίπους και της μήτρας των πειραματοζώων που ελήφθησαν κατά την νεκροψία. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, *$p<0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, $^{+}p<0.05$ σε σχέση με την ομάδα OVX 524

Εικόνα 195: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της οστικής πυκνότητας της εγγύς μετάφυσης της κνήμης: * p<0.05 σε σχέση με το Control και $^{+}$p<0.005 σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....528
Εικόνα 196: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής. * p<0.05 σε σχέση με το Control και $^{+}$p<0.05 σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 197: Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του αριστερού νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λίπους και της μήτρας των πειραματοζώων που ελήφθησαν κατά την νεκροψία. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, *p<0.05 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, $^{+}$p<0.05 σε σχέση με την ομάδα OVX 530
Εικόνα 198: Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της δραστικότητας της τυροσινάσης. Τα συνθετικά ανάλογα και το κοζικό οξύ (ΚΑ) αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 100 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η επί της % αναστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 5332
Εικόνα 199: Σχηματική αναπαράσταση των δύο πιθανών τρόπων δέσμευσης της ένωσης SC19 όπως προέρχεται από εικονική διαλογή, που απεικονίζει πιθανή αλληλεπίδραση με την ασπαραγίνη (Asn26).....533
Εικόνα 200: Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου σε σύμπλοκο με το tropolone (κόκκινο) και το ανάλογο SC19 (γκρι). Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται με κίτρινες λεπτές γραμμές 533
Εικόνα 201: Σχηματική αναπαράσταση των δύο πιθανών τρόπων δέσμευσης της ένωσης SC41 όπως προέρχεται από εικονική διαλογή, που απεικονίζει πιθανή αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα του ενζύμου 534
Εικόνα 202: Ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων SC44 (πορτοκαλί χρώμα), SC51 (κόκκινο χρώμα), SC60 (μπλε χρώμα) χρησιμοποιώντας την κρυσταλλική δομή της τυροσινάσης (PDY 2Y9X) απουσία (σχήμα 4Α) ή την παρουσία (σχήμα 4Β) του κρυσταλλογραφικού συνδέτη..535
Εικόνα 203: Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των μελανοκυττάρων B16F1. Κύτταρα B16F1 επωάστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (ΚΑ) για 48 ώρες. Ο σχετικός αριθμός ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο MTT και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL).....539
Εικόνα 204: Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των μελανοκυττάρων B16F10. Κύτταρα B16F10 επωάστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (Kojic acid) για 48 ώρες. Ο σχετικός αριθμός ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο MTT και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL).....540
Εικόνα 205: Ενεργότητα τυροσινάσης στα κύτταρα B16F1 και B16F10. Τα κύτταρα B16F1 και B16F10 επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (ΚΑ: Kojic acid) για 48 ώρες. Η ενεργότητα της τυροσινάσης προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. 541
Εικόνα 206: Περιεχόμενη μελανίνη στα κύτταρα B16F1 και B16F10 .Τα κύτταρα B16F1 και B16F10 αντίστοιχα, επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (ΚΑ: Kojic acid) για 48 ώρες. Η περιεχόμενη μελανίνη προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων στην περίπτωση των B16F10 και ενός στην περίπτωση των B16F1. 542
Εικόνα 207: Φωτογραφική απεικόνιση του ιζήματος των κυττάρων B16F1 και B16F10. Κύτταρα B16F1 (Α) και B16F10 (Β) επωάστηκαν παρουσία όνο του εκδόχου (CTRL), των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (ΚΑ: Kojic acid) για 48 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρησή τους για την παραλαβή του ιζήματος (pellet).....542

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1: Κριτήρια για την κλινική διάγνωση της οστεοπόρωσης 35
Πίνακας 2:Ενδεικτικά φυτά πλούσια σε φυτοοιστρογόνες ενώσεις..... 54
Πίνακας 3: Παραδοσιακά και φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης..... 55
Πίνακας 4: Ταξινομική κατάταξη του *Dorycnium hirsutum* 68
Πίνακας 5: Ταξινομική κατάταξη του *Cytisus villosus* 71
Πίνακας 6: Ταξινομική κατάταξη του *Hippocrepis comosa*..... 73
Πίνακας 7: Ταξινομική κατάταξη της *Ceratonia siliqua* 74
Πίνακας 8: Ταξινομική κατάταξη της *Psoralea bituminosa*..... 80
Πίνακας 9: Ταξινομική κατάταξη του *Lupinus albus*..... 84
Πίνακας 10: Ταξινομική κατάταξη του *Rhamnus lycioides*..... 87
Πίνακας 11: Ταξινομική κατάταξη του *Rhamnus sibthorpiana* 88
Πίνακας 12: Ταξινομική κατάταξη του *Rhamnus alpinus* 89
Πίνακας 13: Ταξινομική κατάταξη της *Glycyrrhiza glabra* 91
Πίνακας 14: Ελπιδοφόρες δομικές κατηγορίες για εκδήλωση φυτοοιστρογονικότητας.....1243
Πίνακας 15: Συλλογή μελετούμενων φυτικών ειδών.....1321
Πίνακας 16:Συνθήκες εκχύλισης τεχνικής A,S,E,.....1343
Πίνακας 17: Συνθήκες υπερκρίσιμης εκχύλισης 1343
Πίνακας 18: Συγκεντρωτικός πίνακας παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων 1343
Πίνακας 19: Συστήματα ανάπτυξης χρωματογραφημάτων TLC για τα εστερικά και μεθανολικά εκχυλίσματα σε πλάκες TLC κανονικής και αντίστροφης φάσης.....1387
Πίνακας 20: Πρωτόκολλο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....1410
Πίνακας 21: Δράση εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae ως αγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν της E2 σε συγκέντρωση 1 nM (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής).....16059
Πίνακας 22: Δράση εκχυλισμάτων της οικ. Lamiacea, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae ως αγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν της E_2 σε συγκέντρωση 1 nM (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής). 161
Πίνακας 23: Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Ο σχετικός αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Crystal violet. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν την E_2 σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....1654
Πίνακας 24: Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικ. Lamiacea, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Ο σχετικός αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Crystal violet. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν την E_2 σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....1665
Πίνακας 25: Συνοπτικός πίνακας των εκχυλισμάτων με σημαντική οιστρογόνο δράση στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός ως προς την οιστραδιόλη E_2 (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής)..... 169

Πίνακας 26: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae κατά την διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....1754
Πίνακας 27: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Lamiaceae, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae κατά την διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....1765
Πίνακας 28: Επαγωγή της έκφρασης Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae στα κύτταρα RAW264.7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....1810
Πίνακας 29: Συνοπτικός πίνακας των επιλεγμένων δραστικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα MC3T3, στα κύτταρα Ishikawa, MCF-7 και RAW264.7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 1832
Πίνακας 30: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος *Dorycnium hirsutum*.....1876
Πίνακας 31: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM1.....18988
Πίνακας 32: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM2.....1910
Πίνακας 33: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM3.....1921
Πίνακας 34: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM4.....1943
Πίνακας 35: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM5.....1965
Πίνακας 36: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM6.....1976
Πίνακας 37: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM7.....1987
Πίνακας 38:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM8..... 199
Πίνακας 39: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM9.....2021
Πίνακας 40: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM10.....2043
Πίνακας 41: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM11.....2054
Πίνακας 42: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM12.....2076
ίνακας 43: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος CVM 20908
Πίνακας 44: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM1.....2121
Πίνακας 45: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM2.....2143
Πίνακας 46: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM3.....2154
Πίνακας 47: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM4.....2176
Πίνακας 48: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CVM5 και CVM6 2187
Πίνακας 49: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσηCVM9.....22019
Πίνακας 50: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM9.....2221
Πίνακας 51: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM10.....2232
Πίνακας 52: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσηCVM11.....2254
Πίνακας 53: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM12.....2265
Πίνακας 54: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης.....2287
Πίνακας 55: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα 23029
Πίνακας 56: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE1 2332
Πίνακας 57: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE2 2354
Πίνακας 58: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE5 2387
Πίνακας 59: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE6 24039

Πίνακας 60: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE8 2410
Πίνακας 61: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE9 2432
Πίνακας 62: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE10.....2454
Πίνακας 63:Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση.....2476
Πίνακας 64: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM1 2510
Πίνακας 65: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM3 2532
Πίνακας 66: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM4 256
Πίνακας 67: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM5 257
Πίνακας 68: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM7 261
Πίνακας 69: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM8 262
Πίνακας 70: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM9 264
Πίνακας 71: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM10 266
Πίνακας 72: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM11 27069
Πίνακας 73: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM12 272
Πίνακας 74: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM13 274
Πίνακας 75: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM14 276
Πίνακας 76: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CSM15 και CSM16.....27978
Πίνακας 77: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM17 2821
Πίνακας 78: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CSM17 και CSM18.....2832
Πίνακας 79: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος PBM.....2854
Πίνακας 80: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM1 2887
Πίνακας 81: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM2 289
Πίνακας 82: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM3 290
Πίνακας 83: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM5 2921
Πίνακας 84:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων PBM6 και PBM7 2932
Πίνακας 85: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM8 2954
Πίνακας 86: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM9 2976
Πίνακας 87:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM11 2987
Πίνακας 88 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων PBM12 και PBM13 299
Πίνακας 89: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM14 3021
Πίνακας 90: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM15 3054
Πίνακας 91:Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος LAM.....3087
Πίνακας 92: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM3.....3110
Πίνακας 93: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM5..... 313
Πίνακας 94: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM6..... 313
Πίνακας 95: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM7..... 315
Πίνακας 96: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM8..... 317
Πίνακας 97: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM9..... 318
Πίνακας 98: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RSM 320
Πίνακας 99: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM3 324
Πίνακας 100: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM4 326
Πίνακας 101: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM5 327
Πίνακας 102: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM6 330

Πίνακας 103: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM7 332
Πίνακας 104: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM8 333
Πίνακας 105: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM9 336
Πίνακας 106: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM10 338
Πίνακας 107: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM11 340
Πίνακας 108: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM12 342
Πίνακας 109: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM13 344
Πίνακας 110: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RLE 346
Πίνακας 112: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE1 348
Πίνακας 113: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE2 350
Πίνακας 114: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE4 353
Πίνακας 115: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE5 355
Πίνακας 116: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RAM 358
Πίνακας 119: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM1 360
Πίνακας 121: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM2 363
Πίνακας 122: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM4 365
Πίνακας 123: Δομές των δεοξυβενζών και διυδροστιλβενίων που συντέθηκαν 369
Πίνακας 124: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC1 371
Πίνακας 125: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC2 373
Πίνακας 126: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC3 374
Πίνακας 127: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC4 375
Πίνακας 128: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC5 376
Πίνακας 129: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC6 377
Πίνακας 130: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC7 378
Πίνακας 131 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC8 379
Πίνακας 132 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC9 381
Πίνακας 133:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC10 382
Πίνακας 134:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC11 383
Πίνακας 135 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC12 385
Πίνακας 136: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC13 386
Πίνακας 137: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC14 388
Πίνακας 138: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC15 389
Πίνακας 139: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC16 390
Πίνακας 140: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC17 391
Πίνακας 141: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC18 392
Πίνακας 142 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC19 394
Πίνακας 143: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC20 395
Πίνακας 144: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC21 396
Πίνακας 145: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC22 397
Πίνακας 146: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC23 398
Πίνακας 147: Δομές των ισοφλαβονών που συντέθηκαν 399
Πίνακας 148: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC24 401
Πίνακας 149: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC25 402
Πίνακας 150: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC26 403
Πίνακας 151: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC27 404
Πίνακας 152: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC28 405
Πίνακας 153: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC29 405
Πίνακας 154: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC30 406

Πίνακας 155: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC31 408
Πίνακας 156: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC32 409
Πίνακας 157: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC33 410
Πίνακας 158: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC34 411
Πίνακας 159: Δομές των χαλκονών και διαρυλοπροπανίων 413
Πίνακας 160: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC35 415
Πίνακας 161: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC36 416
Πίνακας 162: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC37 418
Πίνακας 163: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC38 419
Πίνακας 164 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC39 420
Πίνακας 165 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC40 421
Πίνακας 166 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC41 422
Πίνακας 167 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC42 423
Πίνακας 168 Συνθετικά παράγωγα διφαινυλ-προπενικών και διφαινυλ-προπανικών οξέων.. 424
Πίνακας 169: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC43 426
Πίνακας 170 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC44 427
Πίνακας 171 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC45 428
Πίνακας 172 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC46 429
Πίνακας 173: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC47 431
Πίνακας 174 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC48 432
Πίνακας 175: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC49 434
Πίνακας 176 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC50 435
Πίνακας 177 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC51 435
Πίνακας 178: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC52 437
Πίνακας 179: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC53 438
Πίνακας 180 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC54 439
Πίνακας 181 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC55 440
Πίνακας 182 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC56 441
Πίνακας 183 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC59 443
Πίνακας 184 Φατοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC60 444
Πίνακας 185: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC61 445
Πίνακας 186 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC62 446
Πίνακας 187: Συνοπτικός πίνακας της δραστικότητας των φυσικών ενώσεων στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 500
Πίνακας 188: Συνοπτικός πίνακας της δραστικότητας όλων των συνθετικών αναλόγων στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής). 512
Πίνακας 189: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * $p<0.05$ σε σχέση με το Control. 520
Πίνακας 190: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * $p<0.05$ σε σχέση με το Control, $^{+}$ $p<0.05$ σε σχέση με το OVX..... 520
Πίνακας 191: Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... 521
Πίνακας 192: Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών της οστικής πυκνότητας..... 522
Πίνακας 193: Σωματικά βάρη των επίμυων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας, στην έναρξη του πειράματος καθώς και οι ποσοστιαίες

μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής. 524
Πίνακας 194: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... 527
Πίνακας 195: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... 527
Πίνακας 196: Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... 528
Πίνακας 197: Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών της οστικής πυκνότητας..... 528
Πίνακας 198: Σωματικά βάρη των επίμυων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής..... 530
Πίνακας 199: Αναστολή της δραστικότητας του ενζύμου της τυροσινάσης. Τα συνθετικά ανάλογα αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 100 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η επί της % αναστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων 537
Πίνακας 200: Τιμές IC50 των συνθετικών αναλόγων και του κοζικού οξέος (Kojic acid) στις κυτταρικές σειρές B16F1 και B16F10 με τη μέθοδο MTT..... 541

Συντομογραφίες & Σύμβολα

^{1}H-NMR: Φάσμα πρωτονίου
Akt: Protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση Β
AlkP: Alkaline phosphate, Αλκαλική φωσφατάση
a-MEM: alpha Modification Minimum Essential Media, α-τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υλικό
ARS: Alizarin Red Staining, χρώση αλιζαρίνης
ASE: Accelerated Solvent Extraction, Τεχνική επιταχυνόμενης εκχύλισης
BGP: Bone gla protein, osteocalcin, μη κολλαγονική πρωτεΐνη Οστεοκαλσίνη
BMD: Bone Mineral Density, οστική πυκνότητα
BMPs: Bone Morphogenetic Proteins, μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού
BMUs: Bone Multicellular Units, Βασικές Πολυκυτταρικές Μονάδες
CD_3OD: δευτεριωμένη μεθανόλη
$CDCl_3$: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH_2Cl_2: διχλωρομεθάνιο
cHex: κυκλοεξάνιο
COSY: Correlation Spectroscopy, Ομοπυρηνικό φάσμα συσχέτισης πρωτονίων
DCC: dextran coated charcoal, άνθρακας επικαλυμμένος με δεξτράνη
DCC-FBS: Dextran Coated Charcoal-FBS, ορός έμβρυου βοός, επεξεργασμένος με ενεργό άνθρακα για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών
DEXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry, απορροφησιομετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium, Dulbecco-τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υλικό
DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ελεύθερη ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικριλυδραζυλικής ρίζα
E_2: 17β-οιστραδιόλη
ERα: estrogen receptor-α, υποδοχέας οιστρογόνων-α
ERβ: estrogen receptor-β, υποδοχέας οιστρογόνων-β
EtOAc: οξικός αιθυλεστέρας
EtOH: αιθανόλη
F: full, ισχυρός ή πλήρης αγωνισμός/ανταγωνισμός υποδοχέων οιστρογόνων
FBS: fetal bovine serum, ορός έμβρυου βοός
FCPC: Fast Centrifugal Partition Chromatography, Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση
FGF-2: fibroblast growth factor-2, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών-2
GBC: άλας του 2-methyl-4-([2-methylphenyl]azo)benzenediazonium
HI-FBS: Heat Inactivated FBS, θερμικά κατεργασμένος ορός έμβρυου βοός
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation, Ετεροπυρηνικό φάσμα συσχετισμού άνθρακα με τα πρωτόνια των γειτονικών ανθράκων
HSQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, Ετεροπυρηνικό φάσμα συσχετισμού άνθρακα με τα πρωτόνιά του
HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ενωμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων
HPTLC: High Performance Preparative Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης
HRT: Hormone Replacement Therapy, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης
ICI: ICI-182.780, fulvestrant, φουλβεστράνη

IGF: Insulin-like Growth Factor, αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης
J: σταθερά σύζευξης
LC: Liquid Chromatography, Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση
LC-MS: Liquid chromatography – Mass spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας
M: marginal, μηδαμινός αγωνισμός/ανταγωνισμός υποδοχέων οιστρογόνων
MCSF: macrophage colony-stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
MEM: Minimum Essential Media (Eagle's medium), ελάχιστο θρεπτικό υλικό
MeOH: μεθανόλη
MRI: Magnetic Resonance Imaging, Μαγνητική Τομογραφία
NC: natural compound, φυσικό προϊόν
NF-κB: Nuclear factor-κB, πυρηνικός παράγοντας- κΒ
NMR: Nuclear Magnetic Resonance, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
OD: optical density, οπτική απορρόφηση
OHP: hydroxyproline, υδροξυπρολίνη
OPG: osteoprotegerin, οστεοπροτεγερίνη
OVX: ovariectomy, ωοθηκεκτομή
P: partial, μέτριος ή μερικός αγωνισμός/ανταγωνισμός υποδοχέων οιστρογόνων
PBS: Phosphate-buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PICP: collagen I carboxy-terminal propeptide καρβοξυτελικό πεπτίδιο προ-κολλαγόνου τύπου I
PINP: collagen I amino-terminal propeptide, αμινοτελικό πεπτίδιο προ-κολλαγόνου τύπου I
pNPP: p-nitrophenyl phosphate, φωσφορική p-νιτροφαινόλη
pQCT: Peripheral Quantitative Computerized Tomography, Περιφερική Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία
Preparative TLC: Preparative Thin Layer Chromatography, Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
PTH: Parathyroid hormone, παραθυρεοειδής ορμόνη
QCT: Quantitative Computerized Tomography, Ποσοτική Αξονική Τομογραφία
QUS: Quantitative UltraSound, Ποσοτική Οστική Υπερηχομετρία
Ral: raloxifene, ραλοξιφαίνη
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B, υποδοχέας του ενεργοποιητή του NF-κB
RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand, προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του NF-Kβ
Sephadex LH-20: γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης
SERMs: Selective estrogen receptor modulators, εκλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων των οιστρογόνων
SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase, κινάση της τυροσίνης
TGF-β2: Transforming growth factor-beta 2, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β2
TLC: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase, όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό
W.H.O.: World Health Organization, παγκόσμιος οργανισμός υγείας
W: weak, ασθενής ή μικρός αγωνισμός/ανταγωνισμός υποδοχέων οιστρογόνων
XAD-4: macroporous resin, μακρόπορη ρητίνη
Δ.Π.: διαφοροποιητικοί παράγοντες
δ: χημική μετατόπιση
Μ.Τ.: μοριακός τύπος
MMP-1: Matrix metalloproteinase-1, κολλαγενάση
Σ.Β.: σωματικά βάρη επίμυων

Γενικό Μέρος

1 Εμμηνόπαυση

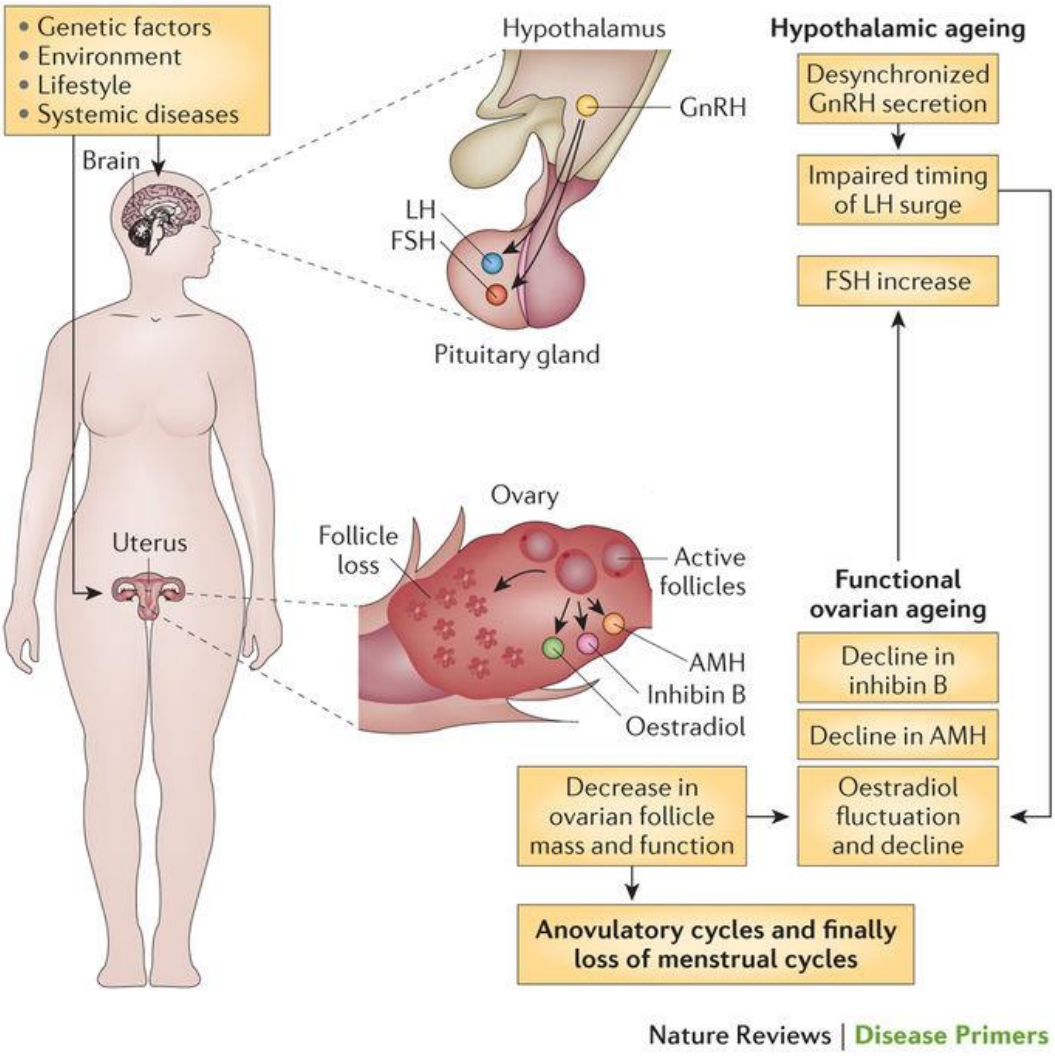
Η εμμηνόπαυση αποτελεί μια φυσιολογική φάση της κλιμακτηρικής περιόδου της γυναίκας, η οποία ξεκινά συνήθως μετά από την ηλικία των 40 ετών και ολοκληρώνεται λίγο μετά τα 60. Σηματοδοτεί το τέλος της αναπαραγωγικής ζωής, καθώς τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στο αίμα μειώνονται και επέρχεται παύση της εμμήνου ρύσεως. Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO: World Health Organization), ως εμμηνόπαυση ορίζεται η μόνιμη διακοπή της εμμήνου ρύσεως που προκύπτει από την έκπτωση της ωοθηκικής δραστηριότητας (WHO, 1996).

Προάγγελος της εμμηνόπαυσης είναι μια μεταβατική περίοδος ενδοκρινολογικών μεταβολών, η περιεμμηνόπαυση. Εντοπίζεται από τη στιγμή που αρχίζουν να εκδηλώνονται τα πρώτα βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά της εμμηνόπαυσης (άστατος κύκλος, αραιομηνόρροια, αιμορραγίες κτλ.), έως έναν χρόνο μετά την εμφάνιση της τελευταίας εμμήνου ρύσεως της γυναίκας. Η φάση της περιεμμηνόπαυσης εμφανίζεται περίπου στην ηλικία των 45 με 47 ετών και διαρκεί κατά μέσο όρο 4 χρόνια. Το τέλος της περιεμμηνόπαυσης ακολουθεί η εμμηνόπαυση, περίπου σε ηλικία 51 ετών και φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τη φυλή και τα φυσικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε γυναίκας. Αντιθέτως, παράγοντες όπως το κάπνισμα, η διάρκεια του κύκλου της γυναίκας καθώς και ο αριθμός των τέκνων, επηρεάζουν σε μικρό βαθμό την ηλικία εμφάνισής της. Πιο συγκεκριμένα, σε πολύτοκες γυναίκες η εμμηνόπαυση εμφανίζεται ένα χρόνο αργότερα συγκριτικά με τις άτοκες, γυναίκες με μικρό εμμηνορυσιακό κύκλο (<26 μέρες) συνήθως εμφανίζουν νωρίτερα εμμηνόπαυση όπως και οι καπνίστριες. Σε ελάχιστες περιπτώσεις γυναικών μικρότερων των 40 ετών παρατηρείται «πρώιμη εμμηνόπαυση» λόγω διαταραχών, ή προκαλούμενη εμμηνόπαυση έπειτα από χειρουργική επέμβαση. Η περίοδος της μετεμμηνόπαυσης αποτελεί την τελευταία φάση της κλιμακτηρικής περιόδου, η οποία ξεκινά από την εμμηνόπαυση και τελειώνει περίπου στο 65ο έτος της γυναίκας (Treloar, 1981) (Burger, *et al.*, 2002) (McKinlay, *et al.,* 1992).

1.1 Παθοφυσιολογία και ενδοκρινολογία της εμμηνόπαυσης

Οι κλινικές εκδηλώσεις της εμμηνόπαυσης είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου νευροενδοκρινολογικών αλληλεπιδράσεων και αλλαγών στον αναπαραγωγικό ενδοκρινικό άξονα που διέπει τη λειτουργία των ωοθηκών. Η λειτουργική διάρκεια ζωής των ωοθηκών της γυναίκας καθορίζεται από ένα πολύπλοκο και σε μεγάλο βαθμό άγνωστο σύνολο γενετικών, επιγενετικών, ορμονικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καταλήγοντας στην ανάπτυξη της εμμηνόπαυσης (Εικόνα 1). Ακόμη και σήμερα, δεν είναι σαφές για ποιο λόγο οι ωοθήκες αρχίζουν τη λειτουργία τους στην εφηβεία και σταματούν στην εμμηνόπαυση, υπογραμμίζοντας πως η κατανόηση των μηχανισμών αυτού του φαινομένου θα φέρει νέες

προοπτικές στην αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με την αναπαραγωγή και την αντιμετώπιση των συνεπειών της εμμηνόπαυσης (Davis, *et al.,* 2015).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας έκπτωσης της ωοθηλακικής δραστηριότητας οδηγώντας στην εγκατάσταση της εμμηνόπαυσης.

Το βιολογικό υπόστρωμα της εμμηνόπαυσης αφορά τόσο νευροενδοκρινικές μεταβολές στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών, όσο και δομικές αλλαγές στις ωοθήκες με κυριότερη τη δραστική μείωση του αριθμού των ωοθυλακίων. Οι βασικότεροι δείκτες «γήρανσης» των ωοθηκών είναι η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSH (Follicle-Stimulating Hormone), η οιστραδιόλη, η ινχιμπίνη Β και η αντι-μυλλέριος ορμόνη AMH (Anti-Mullerian Hormone). Κατά την περιεμμηνόπαυση οι εμμηνορυσιακοί κύκλοι αρχίζουν να γίνονται ανωοθυλακιορρηκτικοί και παρατηρείται αύξηση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH (δείκτης ωοθυλακικής δραστηριότητας) λόγω της μείωσης της ινχιμπίνης Β, μιας πρωτεΐνης που παράγεται από τα κύτταρα των πρωτογενών ωοθυλακίων. Η FSH εκκρίνεται από την υπόφυση και ρυθμίζεται αντιστρόφως ανάλογα από την ινχιμπίνη Β και την οιστραδιόλη. Έτσι, η σταδιακή μείωση των επιπέδων της ινχιμπίνης Β οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα FSH. Η AMH, όπως και η ινχιμπίνη Β, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τα πρώιμα ωοθυλάκια. Συνεπώς, η έκπτωση της δραστηριότητας των ωοθηκών επιφέρει μείωση των επιπέδων της

πρωτεΐνης ΑΜΗ. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμφανίζει μέγιστα επίπεδα την περίοδο της εφηβείας και αρχίζει να φθίνει σταδιακά μέχρι την εμφάνιση της περιεμμηνόπαυσης. Σημειώνεται μάλιστα, πως η μείωση των επιπέδων της ΑΜΗ παρατηρείται πριν ακόμα από την αύξηση της FSH, γεγονός που οδηγεί τους ερευνητές στο συμπέρασμα πως αποτελεί πρώϊμο βιοχημικό δείκτη της περιεμμηνόπαυσης. Η οιστραδιόλη, διατηρεί υψηλά επίπεδα ακόμη και μέχρι αρκετά αργά στην περιεμμηνοπαυσιακή περίοδο και αυτό οφείλεται στα πολύ υψηλά επίπεδα FSH, τα οποία «μαστιγώνουν» τα εναπομείναντα ωοθυλάκια να ανταπεξέλθουν στην ανάγκη για οιστρογονική έκκριση. Ένα με δύο χρόνια πριν την τελευταία έμμηνο ρύση, οι ωοθήκες αδυνατούν πλέον να παράγουν οιστρογόνα, παρά τα υψηλά επίπεδα FSH και έτσι τα επίπεδα της οιστραδιόλης αρχίζουν να μειώνονται. Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται συνήθως από συνεχώς επιδεινούμενη αραιομηνόρροια, μέχρι την οριστική διακοπή της εμμήνου ρύσεως.

Κατά την εμμηνόπαυση παρατηρούνται επίσης αλλαγές και στο ανδρογονικό προφίλ. Σημειώνεται μείωση των ανδρογόνων Δ4-ανδροστενδιόνης (Δ4Α) και της τεστοστερόνης, η οποία ξεκινά πριν από την έναρξη των περιεμμηνοπαυσιακών διαταραχών του κύκλου και συνεχίζει να μειώνεται μετά την εμμηνόπαυση, με αποτέλεσμα η συμμετοχή των επινεφριδίων στα κυκλοφορούντα ανδρογόνα να καθίσταται πιο σημαντική μετεμμηνοπαυσιακά. Με την πλήρη εγκατάσταση της εμμηνόπαυσης η προέλευση της χαμηλής έστω οιστραδιόλης είναι εξω-ωοθηκική, κυρίως από τα επινεφρίδια και την περιφερική (κυρίως στο λιπώδη ιστό) αρωματοποίηση των ανδρογόνων που συνεχίζει να παράγει το στρώμα των ωοθηκών. Η δράση αυτή του λιπώδους ιστού είναι εξαιρετικά σημαντική για την αντιμετώπιση της οιστρογονοπενίας και μέσω του μηχανισμού αυτού εξηγείται σε σημαντικό βαθμό η μειωμένη ένταση των εμμηνοπαυσιακών φαινομένων (πχ. αγγειοκινητικές διαταραχές, οστεοπόρωση, ατροφία γεννητικών οργάνων) στις παχύσαρκες γυναίκες. Η περιφερική οιστρογονοποίηση της ανδροστενδιόνης, που προέρχεται από τα επινεφρίδια, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην παραγωγή της οιστρόνης, δηλαδή του κύριου κλάσματος των οιστρογόνων μετεμμηνοπαυσιακώς (Egnatios, *et al.,* 2010) (Riss, *et al.,* 2011) (DeVet, *et al.*, 2002) (Cook, *et al.,* 2000).

Συνοψίζοντας, από ενδοκρινολογικής πλευράς κατά την περιεμμηνοπαυσιακή περίοδο σημειώνεται αύξηση των επιπέδων της FSH και μείωση των επιπέδων των ΑΜΗ, της ινχιμπίνης Β και της οιστραδιόλης, ενώ πρώιμος εμμηνοπαυσιακός δείκτης φαίνεται να είναι η ΑΜΗ, καθώς η μεταβολή της είναι η πρώτη που ανιχνεύεται. Παρ' όλα αυτά οι συγκεκριμένοι ορμονικοί δείκτες δεν μπορούν να προσδιορίσουν ούτε τη χρονική διάρκεια της περιεμμηνοπαυσιακής περιόδου, ούτε και την τελευταία έμμηνο ρύση. Επομένως, για τη διάγνωση της εμμηνόπαυσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν ενδείξεις και κλινικά συμπτώματα και όχι μεμονωμένη ορμονική αξιολόγηση (Su, *et al.*, 2009).

1.2 Επιπτώσεις της εμμηνόπαυσης

1.2.1 Κλιμακτηριακό σύνδρομο

Οι ορμονικές μεταβολές, και κυρίως η έκπτωση των ωοθηκικών οιστρογόνων που υφίστανται οι γυναίκες στη φάση της (περι)-εμμηνόπαυσης έχουν ως άμεση συνέπεια την εμφάνιση διαφόρων σωματικών, ψυχικών και αγγειοκινητικών συμπτωμάτων που συνοψίζονται στον όρο «κλιμακτηριακό σύνδρομο». Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι η αίσθηση ζέστης, η αυξημένη εφίδρωση, η κούραση, ο πονοκέφαλος, η ζαλάδα, τα μουδιάσματα και τα πρησμένα άκρα, η αδυναμία συγκέντρωσης, το άγχος και η νευρικότητα, η αυπνία, οι έντονες εναλλαγές διάθεσης καθώς και σημάδια κατάθλιψης (Kakkar, *et al.*, 2007).

- **Εξάψεις και εφίδρωση**

Οι συγκεκριμένες αγγειοκινητικές διαταραχές αποτελούν ίσως το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της εμμηνόπαυσης που βιώνεται από την πλειοψηφία των γυναικών στη φάση της (περι)-εμμηνόπαυσης, με διάρκεια ένα έως δύο χρόνια, με εξαίρεση ένα ποσοστό (μέχρι και 25%) όπου μπορεί τα συμπτώματα να διαρκέσουν έως και πέντε χρόνια. Η συχνότητα των επεισοδίων κυμαίνεται από λίγα επεισόδια εβδομαδιαίως έως αρκετά ανά ώρα, συνήθως είναι συχνότερα τη νύχτα, ενώ μπορεί να συνοδεύονται από ταχυπαλμία, κεφαλαλγία, αδυναμία, λιποθυμική τάση και ίλιγγο, σε βαθμό μάλιστα που μπορεί να παρεμποδίζουν τις καθημερινές δραστηριότητες των γυναικών (McKinlay, *et al.,* 1992). Μελέτες έδειξαν πως γυναίκες Ασιατικής καταγωγής εμφάνισαν εξάψεις σε ποσοστό πολύ μικρότερο ποσοστό (μόλις 3%) έναντι της λευκής φυλής (Lock, 1994), γεγονός που πιθανότητα οφείλεται στις διατροφικές τους συνήθειες (κυρίως στην κατανάλωση σόγιας που είναι πλούσια σε φυτοοιστρογόνα) και ίσως στην πολιτιστική διαφορά τους ως προς την αντιμετώπιση των σωματικών ενοχλήσεων (Murkies, *et al.*, 1995) (Boulet, *et al.,* 1994). Οι αγγειοκινητικές διαταραχές συνδέονται με την μείωση των οιστρογόνων και τις απότομες διακυμάνσεις των επιπέδων τους στο αίμα, και όχι απλά με την έλλειψή τους. Συνέπεια της διακύμανσής τους είναι η διαταραχή του αυτόνομου συμπαθητικού συστήματος στα αγγεία του δέρματος και η επίδρασή της στο θερμορρυθμιστικό κέντρο του υποθαλάμου (Charkoudian, 2003) (Rees, *et al.*, 1988). Η διαπίστωση πως για την εκδήλωση των εν λόγω διαταραχών ευθύνεται η διακύμανση των επιπέδων των οιστρογόνων και όχι η έλλειψή τους, ενισχύεται από το γεγονός πως τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται και σε άνδρες που διέκοψαν την οιστρογονική θεραπεία που λάμβαναν λόγω καρκίνου του προστάτη, όπως επίσης και ότι δεν εμφανίζονται σε νέες γυναίκες πριν την ήβη.

- **Ψυχοκοινωνικές διαταραχές**

Η εμμηνόπαυση χαρακτηρίζεται από ψυχικές διαταραχές που συνοψίζονται σε ευερεθιστότητα, δυσθυμία, νευρικότητα, άγχος, εξασθένηση μνήμης, δυσκολία συγκέντρωσης και αδυναμία απόδοσης στα καθημερινά καθήκοντα. Εκτιμάται ότι ένα 25-50%

των γυναικών βιώνουν τα παραπάνω συμπτώματα, ως συνέπεια της ψυχικής επιβάρυνσής τους από τις εξάψεις και την κακή ποιότητα του ύπνου. Οι εξάψεις κατά τις νυκτερινές ώρες διαταράσσουν τη φυσιολογική εναλλαγή REM / non REM ύπνου (Rapid Eye Movement), υποβαθμίζοντας την ποιότητά του (Oldenhave, *et al.,* 1993). Η κακή ψυχική διάθεση των γυναικών και οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης, πέρα από την αυπνία και την κόπωση, οφείλονται και στις μεταβολές των επιπέδων της σεροτονίνης στον εγκέφαλο, που συνδέονται με την μείωση των οιστρογόνων, μηχανισμός παρόμοιος με την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (Short, 2003). Ίσως στην ψυχική επιβάρυνση να συμβάλλει και η απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας της γυναίκας, καθώς επίσης και οι οικογενειακές και κοινωνικές αλλαγές που σημειώνονται εκείνη την περίοδο της ζωής της (συναταξιοδότηση, προβλήματα υγείας κλπ.). Τέλος, παρατηρείται έκπτωση της σεξουαλικής επιθυμίας (libido), όχι τόσο στην περιεμμηνόπαυση, αλλά κυρίως με την οριστική διακοπή της εμμήνου ρύσεως, που παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα σε όλες τις ηλικιακές ομάδες (Barentsen, *et al.,* 2001).

- **Ουρογεννητικό σύστημα**

Τόσο το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα όσο και ο κόλπος της γυναίκας είναι οιστρογονοεξαρτώμενοι ιστοί. Κατά την εμμηνόπαυση, η πτώση των οιστρογόνων οδηγεί σε ατροφία των γεννητικών οργάνων και πιο συγκεκριμένα σε λέπτυνση του κολπικού επιθηλίου και σε ελάττωση της ελαστικότητας και της αγγείωσης του κολπικού τοιχώματος. Επιπλέον, μεταβάλλεται και η μικροβιακή χλωρίδα, με αποτέλεσμα την αυξημένη εμφάνιση λοιμώξεων και φλεγμονών. Η συνύπαρξη όλων των παραπάνω προκαλεί δυσπαρεύνια και γενικότερη ενόχληση στη γυναίκα, ενισχύοντας την έκπτωση της σεξουαλικής της επιθυμίας. Όσον αφορά το ουροποιητικό σύστημα, η υποοιστρογοναιμία προκαλεί συχνοουρία, δυσουρία και αύξηση της έπειξης προς ούρηση (Hendrix, 2003), διαταραχές που πιθανώς οφείλονται σε μεταβολές στο επιθήλιο και τη μείωση του κολλαγόνου της ουρήθρας και σε μεταβολές της ευαισθησίας των αδρενεργικών υποδοχέων (Robinson, *et al.*, 2003_A_B).

- **Διαταραχές από άλλα συστήματα**

Η οιστρογονική ένδεια, που σημειώνεται κατά την εμμηνόπαυση επιφέρει και άλλες επιπτώσεις, όπως αύξηση της τριχόπτωσης, ξηρότητα και ατροφία των μαστών (Raine-Fenning, *et al.*, 2003) ενώ σημειώνονται αλλοιώσεις στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, στον επιπεφυκότα ακόμα και στον κερατοειδή (Vavilis, *et al.*, 1995). Ανάμεσα στις σημαντικές επιπτώσεις που απασχολεί την πλειοψηφία των γυναικών συγκαταλέγεται και η γήρανση του δέρματος, καθώς παρατηρείται λέπτυνσή του, αυξημένη ξηρότητα, απώλεια του κολλαγόνου, εμφάνιση ρυτίδων, καθώς και καφέχροων κηλίδων (Thornton, 2013). Δεδομένου ότι τα οιστρογόνα εμπλέκονται στη διαδικασία παραγωγής της μελανίνης (Natale, *et al.*, 2016), με την εμφάνιση της εμμηνόπαυσης και την επερχόμενη πτώση των επιπέδων τους στον οργανισμό, διαταράσσεται και η παραγωγή της μελανίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση καφέ

κηλίδων στα σημεία του δέρματος που έχουν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία κατά τη διάρκεια προηγούμενων ετών, όπως το πρόσωπο, ο λαιμός, τα χέρια, τα μπράτσα και το στήθος (Skoczyńska, *et al.,* 2017). Αναλυτικά η διαδικασία σχηματισμού τους περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Στην παρούσα διατριβή, ασχοληθήκαμε και με την ανεύρεση λευκαντικών παραγόντων με σκοπό την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου ως μια δευτερεύουσα διαταραχή της εμμηνόπαυσης.

1.2.2 Καρδιαγγειακές παθήσεις

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες τρίτης ηλικίας. Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου είναι εξαιρετικά μικρή, ακόμη και στις ομάδες υψηλού κινδύνου (Gurr, 1992) συγκριτικά με τους άνδρες αντίστοιχης ηλικίας (Barrett-Connor, *et al.*, 1991). Η αύξηση της εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων (στεφανιαία νόσος, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια) που παρατηρήθηκε στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, οδήγησε στην απόδοση και καρδιοπροστατευτικής δράσης στα οιστρογόνα (Mikkola, *et al.*, 2002). Σημειώνεται μάλιστα πως ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων μετά τη φυσική εμμηνόπαυση υπερτριπλασιάζεται συγκριτικά με εκείνον της αναπαραγωγικής ηλικίας (Beale, *et al.,* 1996). Πολλοί παράμετροι όπως η αρτηριακή πίεση, η ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, το ινωδογόνο, η α-λιποπρωτεΐνη εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου αποτελώντας ανεξάρτητο ή μη ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου (Carr, 2003). Εφόσον τα οιστρογόνα εμπλέκονται στην παραγωγή και τη σύνθεση των παραπάνω παραγόντων και ασκούν αγγειοχάλαση, κατά συνέπεια η υποοιστρογοναιμία προκαλεί αύξηση των αγγειακών αντιστάσεων (Volterrani, *et al.,* 1995), ενώ η καρδιοπροστατευτική δράση των ενδογενών οιστρογόνων τεκμηριώνεται από πλήθος μελετών (Gordon, *et al.,* 1976) (Mathiesen, *et al.*, 2000) (Van der Schouw, et al., 1996) (Jacobsen, *et al.*, 1997) (Du, *et al.,* 1999).

1.2.3 Νόσος του Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια και ευθύνεται για πάνω από το 50% όλων των τύπων άνοιας (Plassman, *et al.*, 2007). Η μεγάλη αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης έχει καταστήσει τη συγκεκριμένη νόσο ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα διεθνώς, με τον αριθμό των ατόμων που προσβάλλονται να αυξάνεται ταχύτατα συναρτήσει της ηλικίας. Η συχνότητα εμφάνισής της στις γυναίκες είναι δύο φορές μεγαλύτερη, γεγονός που οφείλεται στη αυξημένη μακροβιότητα και στη διαφορά στο μέγεθος του εγκεφάλου λόγω φύλου (Zandi, *et al.*, 2002). Σημειώνεται μάλιστα πως το 44-45% των γυναικών στην εμμηνοπαυσιακή μετάβαση εκδηλώνει διαταραχές μνήμης, ενώ μετεμμηνοπαυσιακά το ποσοστό είναι της τάξης του 42% (Woods, *et al.,* 2005). Η νευροτροφική επίδραση των οιστρογόνων σε περιοχές εμπλεκόμενες με τη μνήμη και τη γνώση, καθιστά εύλογη τη

συσχέτιση της εμμηνόπαυσης με μεταβολές στις γνωσιακές λειτουργίες (Henderson, 2006) (Sherwin, 2003). Η προστατευτική δράση που φαίνεται να ασκούν τα οιστρογόνα στα εγκεφαλικά κύτταρα (Polo-Kandola, 2003), επιτυγχάνεται μέσω αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Συνεπώς, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν από ότι οι άντρες αντίστοιχης ηλικίας. Επιπλέον, η ελάττωση των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση οδηγεί σε αύξηση της πρωτεΐνης Tau και της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς που σχετίζονται άμεσα με την νόσο του Alzheimer (Gandy, 2003). Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν, χωρίς όμως να οδηγεί σε ξεκάθαρα αποτελέσματα και φέροντας πάντα τον κίνδυνο παρενεργειών, όπως θρομβώσεις και εκδήλωση ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων. Παρόλα ταυτά, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν πως θεραπείες βασισμένες στη χορήγηση 17-β-οιστραδιόλης εξασφαλίζουν την καλύτερη δυνατή νευροπροστασία (Joffe, *et al.*, 2006) εμποδίζοντας την εμφάνιση της νόσου, αρκεί να χορηγούνται εγκαίρως μετά την εμμηνόπαυση με διάρκεια έως και 5 χρόνια (Nayer, *et al.*, 2014).

1.2.4 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές χρόνιες νόσους του πλανήτη μας και είναι ίσως η συχνότερη συνέπεια της εμμηνόπαυσης. Η συγκεκριμένη νόσος χαρακτηρίζεται από την απώλεια οστικής μάζας και αντοχής, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση των καταγμάτων λόγω ευθραυστότητας. Τα πιο κλασικά κατάγματα λόγω μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης είναι τα κατάγματα στο ισχίο, στη σπονδυλική στήλη, στον πήχη και στον καρπό. Στις Δυτικές χώρες περίπου το 20% των λευκών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών άνω των 50 ετών πάσχουν από οστεοπόρωση βάσει των διαγνωστικών κριτηρίων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται συναρτήσει της ηλικίας: στις γυναίκες 50-59 ετών υπολογίζεται στο 4%, σε αντίθεση με τις γυναίκες 80 ετών, όπου αγγίζει το ποσοστό του 52% (Looker, *et al.,* 1995). Ο κίνδυνος που διατρέχει μια λευκή γυναίκα να υποστεί οστεοπορωτικό κάταγμα μετά τα 50 της χρόνια φτάνει το 40%, ενώ το 65% των οστεοπορωτικών καταγμάτων συμβαίνουν σε ηλικίες μεγαλύτερες των 75 ετών (Melton, *et al.*, 2005). Τα κατάγματα του ισχίου έχουν θνητότητα 20% τον πρώτο χρόνο, 25% των επιζώντων καταγματιών αποκτά μόνιμο σοβαρό κινητικό πρόβλημα και ένα 50% εκδηλώνει κάποιας μορφής κινητική επιβάρυνση (Bendich*, et al.,* 1999). Σε κυτταρικό επίπεδο, τα πλέον σημαντικά κύτταρα του οστού είναι οι οστεοβλάστες, που συνθέτουν το οστό και οι οστεοκλάστες που το αποδομούν. Η ισορροπημένη λειτουργία τους εξασφαλίζει τη διατήρηση της οστικής μάζας. Στην περίπτωση όμως της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, η οιστρογονική ένδεια που παρατηρείται έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη αύξηση του ρυθμού της οστικής αποδόμησης, η οποία οδηγεί σε ταχεία απώλεια οστικής μάζας (NIH, 1994). Στην αρχή της εμμηνόπαυσης η απώλεια της οστικής μάζας υπολογίζεται στο 2-2.5% ανά έτος, ενώ μετέπειτα πέφτει στο 0.7% (Seeman, 2003), με αποτέλεσμα η γυναίκα να

χάνει συνολικά περίπου το 30% της οστικής της μάζας από την εμμηνόπαυση μέχρι τα 80 της χρόνια (US Congress, 1994).

Η απότομη μείωση της ωοθηκικής λειτουργίας επιφέρει ταχεία μείωση της 17-β-οιστραδιόλης, η οποία επηρεάζει την παραγωγή συγκεκριμένων κυτταροκινών που ενεργοποιούν την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Παρατηρείται υπερέκφραση των ιντερλευκινών IL-1 (Interleukin 1) και IL-6 (Interleukin 6) και του οστεοκλαστικού παράγοντα M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), που οδηγεί σε αυξημένη οστεοκλαστογένεση και λειτουργία (Cenci, *et al.*, 2000) (Inzerillo, *et al.*, 2002). Επιπλέον, απουσία οιστρογόνων δεν παρεμποδίζεται η υπερπαραγωγή του διαφοροποιητικού παράγοντα RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) με αποτέλεσμα την αυξημένη οστεοκλαστική διαφοροποίηση και οστική απορρόφηση (Shevde, *et al.*, 2000). Τέλος, τα οιστρογόνα συνδέονται με τους οστεοβλάστες προκαλώντας ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής προ-κολλαγόνου και της αυξημένης έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP: Alkaline phosphate) (Lin, *et al.*, 1991). Συνεπώς, η έλλειψη οιστρογόνων παίζει καθοριστικό ρόλο στην οστική απώλεια των γυναικών μετά την εμμηνόπαυση (Prestwood, *et al.*, 1994).

Δεδομένου ότι η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στην μελέτη και την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης ως μια από τη σημαντικότερες διαταραχές της εμμηνόπαυσης, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει μια πιο εκτενής αναφορά στη σύσταση και την οργάνωση των οστών καθώς και στην παθοφυσιολογία της οστεοπόρωσης στα κεφάλαια 2 και 3 αντίστοιχα, με σκοπό την καλύτερη κατανόησή της.

1.3 Θεραπεία – Αντιμετώπιση των συνεπειών της εμμηνόπαυσης

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της εμμηνόπαυσης στηρίζεται τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία των άμεσων και έμμεσων συνεπειών της.

- **Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης**

Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης αποτελεί σημαντικό όπλο για την αντιμετώπιση του κλιμακτηριακού συνδρόμου και κυρίως των αγγειοκινητικών συμπτωμάτων και των επιπτώσεων στο ουρογεννητικό σύστημα. Επίσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην ενίσχυση της αυτοεκτίμησης των γυναικών, καθώς αποκαθιστά την ελαστικότητα του δέρματος και τη libido της γυναίκας. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν αποτελεί θεραπεία πρώτης επιλογής για τη νόσο του Alzheimer, την πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων (όπου μάλιστα αντιθέτως εμφανίζει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα), καθώς και για τη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, παρά τη θετική επίδρασή της στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας. Αυτό οφείλεται στη σύνδεση της θεραπείας με την εμφάνιση ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων και τον

αυξημένο κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων, καθώς και στο γεγονός ότι η διακοπή της συνοδεύεται από ταχεία απώλεια των θετικών αποτελεσμάτων. Τέλος, στις ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης συγκαταλέγονται τα οιδήματα, η ναυτία, οι κεφαλαλγίες, ο εμετός, η κολπική αιμορραγία, η κατακράτηση υγρών κ.ά. (O'Neill, *et al.*, 2017) (Schmidt, *et a*l., 2006) (Sammartino, *et al.*, 2005) (Shumaker, *et al.*, 2003).

- **Τιβολόνη**

Η τιβολόνη είναι ένα συνθετικό στεροειδές με πολύ θετικά αποτελέσματα ως προς την αντιμετώπιση του κλιμακτηριακού συνδρόμου. Ελαττώνει την ένταση και τη συχνότητα των εξάψεων, των νυχτερινών εφιδρώσεων, των διαταραχών του ύπνου και των εναλλαγών της διάθεσης. Η τιβολόνη ασκεί και ανδρογονική και οιστρογονική δράση, κάτι που την καθιστά σε θέση υπεροχής έναντι της ορμονικής θεραπείας όσον αφορά τα συμπτώματα σεξουαλικής δυσλειτουργίας. Αναφορικά με την αντιμετώπιση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης αυξάνει την οστική πυκνότητα στο ισχίο και τη σπονδυλική στήλη, ενώ δεν διεγείρει το ενδομήτριο ελαττώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Επίσης, δεν επηρεάζει την μαστογραφική πυκνότητα, όπως τα οιστρογόνα, ενώ μειώνει τα τριγλυκερίδια και την HDL-χοληστερίνη. Η επίδρασή της στους καρδιαγγειακούς δείκτες μπορεί να θεωρηθεί ευνοϊκή, αλλά ο τομέας αυτός χρειάζεται ακόμη διερεύνηση (Modelska, *et al.*, 2002) (Van Gorp, *et al.*, 2002).

- **Εκλεκτικοί τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM's)**

Οι ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, αποτελούν μια πολύ σημαντική εναλλακτική θεραπεία για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τη δράση των υποδοχέων με τους οποίους συνδέονται και να ασκούν εκλεκτική δράση αγωνιστική ή ανταγωνιστική στους ιστούς-στόχους των οιστρογόνων. Χρησιμοποιούνται κυρίως η ταμοξιφαίνη για την πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου του μαστού, η τορεμιφαίνη για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού και η ραλοξιφαίνη για τη πρόληψη και θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης ενώ φαίνεται να επιτείνει τα αγγειοκινητικά συμπτώματα. Επίσης, η ραλοξιφαίνη συνδέεται με ελάττωση του κινδύνου διηθητικού καρκίνου του μαστού, μείωση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης, δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης υπερπλασίας ή καρκίνου του ενδομητρίου, αλλά συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων (Morello, 2003) (Jordan, 2003) (Jolly, *et al.*, 2003) (Grady, *et al.*, 2004).

- **Εναλλακτικές θεραπείες**

  i. **Φυτοοιστρογόνα**

Έχουν παρόμοια δράση με τα στεροειδή οιστρογόνα που παράγονται στο ανθρώπινο σώμα γεγονός που εξηγεί το πλήθος των ευεργετικών δράσεων τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κυριότερες κατηγορίες φυτοοιστρογόνων είναι οι ισοφλαβόνες, τα λιγνάνια και τα κουμεστάνια. Φαίνεται πως ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης μιας και μετριάζουν τις εξάψεις και τις νυχτερινές εφιδρώσεις, βελτιώνουν τη μνήμη ενώ βοηθούν στη βελτίωση της διάθεσης και σταθεροποιούν τον ύπνο. Επίσης, μειώνουν τον κίνδυνο για οστεοπόρωση, ενώ μπορεί να αποδειχθούν αποτελεσματικά και στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου καθώς μεταβάλουν το λιπιδικό προφίλ μειώνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και αυξάνοντας εκείνα της HDL χοληστερόλης (Glazier, *et al.*, 2001) (Kass-Annese, 2000) (Speroff, 2005). Αυξημένη πρόσληψη φυτοοιστρογόνων μέσω διατροφής έχει συνδυαστεί με χαμηλή εμφάνιση ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων (στήθους, ωοθηκών, ενδομητρίου, προστάτη) στους Ασιατικούς λαούς σε σύγκριση με τον υπόλοιπο Δυτικό πληθυσμό (Yamamoto, *et al.*, 2003).

  ii. **Βοτανοθεραπεία**

Τα τελευταία χρόνια η χρήση βοτάνων κερδίζει ολοένα και παραπάνω έδαφος στην προτίμηση των γυναικών για την ανακούφισή τους, κυρίως από τις ανεπιθύμητες ενέργειες του κλιμακτηρικού συνδρόμου. Με τον όρο βότανα ορίζονται τα μερικώς κατέργαστα φάρμακα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ασθενειών ή για τη διατήρηση της καλής υγείας και συμπεριλαμβάνουν βάμματα, εκχυλίσματα και ανάλογα παρασκευάσματα φαρμακευτικών φυτών. Η δράση τους είναι συνεργιστική και σε συνδυασμό με μια φαρμακευτική αγωγή μπορούν να μειώσουν το άγχος, το αίσθημα παλμών και την κατάθλιψη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και να αυξήσουν τη σεξουαλική επιθυμία ενισχύοντας την αυτοεκτίμησή τους (Handy, 2000). Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερα αποτελεσματική έχει αποδειχθεί η χρήση του lemon balm (φύλλα της *Melissa officinalis*) για την αντιμετώπιση του άγχους και των νευρικών διαταραχών της εμμηνόπαυσης καθώς και το σκεύασμα black cohosh (ρίζες του φυτού *Cimicifuga racemosa*) που χορηγείται για την αντιμετώπιση της δυσμηνόρροιας, του προεμμηνορυσιακού συνδρόμου και των νευρικών διαταραχών που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση. Η χορήγηση των καρπών του *Vitex-agnus-castus*, Chaste tree, ή Chasteberry, είναι πολύ διαδεδομένη στην Ευρώπη για την αντιμετώπιση του προεμμηνορυσιακού συνδρόμου και για την ανακούφιση εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων όπως οι εξάψεις, οι αιμορραγίες και οι εναλλαγές της διάθεσης. Ιδιαίτερα πλούσια σε δραστικά συστατικά είναι τα φύλλα του *Ginkgo biloba* που περιέχουν φλαβονοειδή, φαινολικά συστατικά,

λακτόνες και διτερπένια, στα οποία οφείλει τη βιολογική του ιδιαιτερότητα. Οι κύριες ενδείξεις για τη χορήγησή του είναι εγκεφαλικές δυσλειτουργίες όπως απώλεια μνήμης, γνωσιακές διαταραχές, άνοια, ίλιγγος, πονοκέφαλος, καθώς και αγγειακές διαταραχές λόγω της αγγειοδιασταλτικής δράσης του. Το Ginseng που προέρχεται από τις ρίζες του *Panax ginseng* και του *Panax quinquefolius* χρησιμοποιείται για χιλιάδες χρόνια ως αφροδισιακό και τονωτικό ενώ πλέον συνίσταται για ενίσχυση της μνήμης, αύξηση της ικανότητας συγκέντρωσης και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Το Passion flower (*Passiflora incarnata*) χορηγείται ως χαλαρωτικό, καταστέλλει το άγχος, ανακουφίζει από τους πονοκεφάλους ενώ εκδηλώνει ήπια υπναγωγό δράση. Γνωστό για την αντικαταθλιπτική και αγχολυτική του δράση είναι το St John's Wort (*Hypericum perforatum*) και μελέτες του αποδίδουν επιπλέον και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ το Valerian (*Valeriana officinalis*) χορηγείται για την αντιμετώπιση του άγχους, ως κατασταλτικό και υπναγωγό (Warren, *et al.*, 2002).

iii. Βιταμίνες – ιχνοστοιχεία

Η βιταμίνη Ε, οι βιταμίνες Β6 και Β12, το φυλικό οξύ, το μαγνήσιο και το ασβέστιο συμβάλλουν στην καλύτερη αντιμετώπιση των συμπτωμάτων τόσο περιεμμηνοπαυσιακά όσο και μετεμμηνοπαυσιακά (Burton, *et al.*, 1998) (Rude, *et al.*, 1996).

iv. Ομοιοπαθητική

Κάποια ομοιοπαθητικά φάρμακα μειώνουν τα αγγειοκινητικά συμπτώματα και το στρες, την αγχώδη συνδρομή και το αίσθημα παλμών (Ullman, 1998).

v. Σωματική άσκηση - Διατροφή

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η σωματική άσκηση συμβάλλει στη βελτίωση της γενικής κατάστασης των γυναικών, τόσο στον οργανικό όσο και στον ψυχικό τομέα, καθώς βελτιώνει τη μνήμη και την πνευματική διαύγεια. Σημειώνεται μάλιστα πως 30-60 λεπτά αεροβικής άσκησης τις περισσότερες ημέρες της εβδομάδας κρίνονται αναγκαίες για την ανακούφιση των προβλημάτων της εμμηνόπαυσης (Ivarson, *et al.*, 1998) (Dounchi, *et al.*, 2003). Μπορεί να βελτιώσει τις εξάψεις και την αϋπνία, το άγχος και την ένταση, το λιπιδικό προφίλ και τη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος και να μειώσει την απώλεια οστικής μάζας. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και η ακολουθία ενός κατάλληλου διαιτολογίου πλούσιου σε κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, αποφυγή καφέ και αλκοόλ και περιορισμός της κατανάλωσης λιπών και άλατος.

2 Δομή και φυσιολογία των οστών

Ο οστίτης ιστός, είναι ένας συνδετικός ιστός που εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση, χαρακτηρίζεται από ακαμψία και ιδιαίτερα σκληρή σύσταση και εξελίσσεται συνεχώς με σκοπό να ανταπεξέρχεται στις απαιτούμενες ανάγκες του οργανισμού με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Τα οστά παρέχουν δύναμη και ανθεκτικότητα ενάντια στις εξωτερικές δυνάμεις συμπίεσης ελαχιστοποιώντας το πρόσθετο βάρος (Martin, 1989). Οι κυριότερες λειτουργίες του οστίτη ιστού είναι να παρέχει μηχανική στήριξη (π.χ. πλευρές), να επιτρέπει την κίνηση ή μετακίνηση του σώματος (π.χ. μακρά οστά), να προστατεύει ευαίσθητα όργανα (π.χ. κρανίο) και να δρα ως μεταβολική αποθήκη για τα άλατα (π.χ. ασβέστιο) (Stevens, *et al.*, 1993).

2.1 Δομικά χαρακτηριστικά

Τα οστά αποτελούνται από **στηρικτικά κύτταρα** (οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα), **κύτταρα αποδόμησης** του οστού (οστεοκλάστες) και μια στερεή οργανική εξωκυττάρια ουσία (**οστεοειδές**) όπου εναποτίθενται ανόργανα άλατα.

Κατά μέσο όρο τα συμπαγή οστά αποτελούνται 30% κατά βάρος από οργανική ουσία και 70% από ανόργανα άλατα. Παρ' όλα αυτά στα νεοσχηματιζόμενα οστά είναι δυνατό να περιέχεται σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό οργανική ουσία συγκριτικά με τα ανόργανα άλατα. Τα **ανόργανα** συστατικά που εναποτίθενται στο οστεοειδές, αποτελούνται κυρίως από φωσφορικό ασβέστιο που βρίσκεται με τη μορφή των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, καθώς και από ιόντα μαγνησίου, καλλίου, νατρίου και ανθρακικά ιόντα (Guyton, 1992) (Freemont, 1993).

Το **οστεοειδές** αποτελείται κατά 90 - 95% από ίνες κολλαγόνου, στις οποίες οφείλεται η μεγάλη αντοχή των οστών, ενώ το υπόλοιπο συνίσταται σε ομοιογενές μέσο που ονομάζεται θεμέλια ουσία. Η θεμέλια ουσία αποτελείται από εξωκυττάριο υγρό, πρωτεογλυκάνες και ιδιαίτερα από φωσφορική χονδροϊτίνη και υαλουρονικό οξύ, τα οποία πιθανώς συμβάλλουν στην εναπόθεση των αλάτων ασβεστίου.

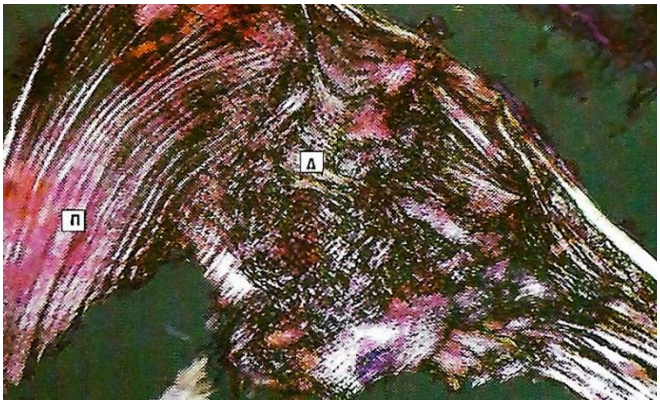
Κάθε ίνα κολλαγόνου αποτελείται από επαναλαμβανόμενα περιοδικά τμήματα σε όλο το μήκος της και οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη συνδέονται στενά με κάθε τμήμα αυτής της ίνας. Οι ίνες κολλαγόνου στα οστά, όπως και στους τένοντες εξασφαλίζουν μεγάλη αντοχή στη διάταση, ενώ τα άλατα ασβεστίου, που έχουν παρόμοιες φυσικές ιδιότητες με το μάρμαρο, μεγάλη αντοχή στη συμπίεση. Έτσι, με τη σύνδεση των ινών κολλαγόνου και των κρυστάλλων, δημιουργείται μια οστική δομή η οποία εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη αντοχή, τόσο στην έλξη, όσο και στη συμπίεση (Guyton, 1992). Ανάλογα με τον τρόπο που διατάσσονται οι ίνες κολλαγόνου για να σχηματίσουν το οστεοειδές, μικροσκοπικά διακρίνονται δύο τύποι οστίτη ιστού.

Η **δικτυωτή μορφή,** η οποία χαρακτηρίζεται από τυχαία διάταξη των ινών κολλαγόνου με αποτέλεσμα την μειωμένη μηχανική αντοχή. Η μορφή αυτή συναντάται στα οστά του εμβρύου,

ενώ στους ενήλικες στην περίπτωση κατάγματος όπου προοδευτικά αντικαθίσταται από την πεταλιώδη μορφή, καθώς και στην περίπτωση της νόσου Paget.

Η **πεταλιώδης μορφή** χαρακτηρίζεται από κανονική παράλληλη διάταξη του κολλαγόνου σε λεπτότατες δεσμίδες (οστεΐνα πετάλια) που προσδίδει στο οστό μηχανική ισχύ. Σε υγιείς περιπτώσεις όλος ο οστίτης ιστός απαντάται με αυτή τη μορφή.

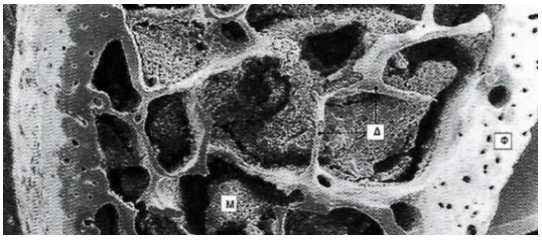
Στην εικόνα 2 απεικονίζεται ένα αναγεννημένο οστό όπου διακρίνεται η παρουσία τόσο του νεοσχηματιζόμενου δικτυωτού οστού (τυχαία διάταξη των ινών κολλαγόνου), όσο και του πεταλιώδους (παράλληλη διάταξη των ινών) (Stevens, *et al.*, 1993). Μηχανική διέγερση μπορεί να προκαλέσει ταχεία παραγωγή δικτυωτού οστού, το οποίο τελικά αναδιαμορφώνεται σε πυκνό, πεταλιώδες οστό, υποδεικνύοντας ότι η άμεση παραγωγή δικτυωτού οστού είναι η στρατηγική των οστών για την ταχεία απόκριση στις μεταβολές της λειτουργικής τους δραστηριότητας (Rubin, *et al.*, 1995).



Εικόνα 2: Δικτυωτό και πεταλιώδες οστό. Φωτογραφία από μικροσκόπιο πολωμένου φωτός. (Δ): δικτυωτό οστό (Π): πεταλιώδες οστό

2.2 Αρχιτεκτονική και μορφολογία των οστών

Ο οστίτης ιστός ανάλογα με τη θέση των κυττάρων και της βασικής οστικής ουσίας του εμφανίζει δύο διαφορετικές μορφές. Τα περισσότερα οστά έχουν μια βασική δομή που αποτελείται από μια εξωτερική φλοιώδη ή συμπαγή ζώνη το **φλοιώδες οστό** και μια εσωτερική δοκιδώδη ή σπογγώδη ζώνη το **δοκιδώδες οστό**.

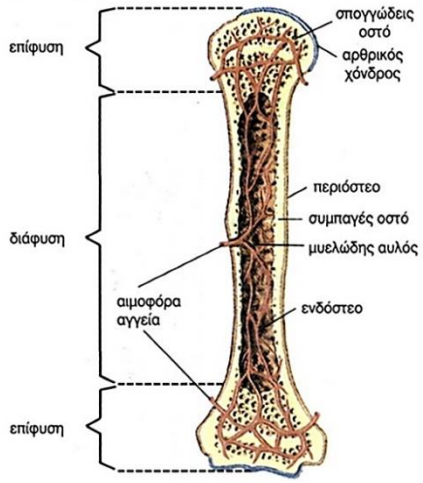


Εικόνα 3: Αρχιτεκτονική του οστού-Φλοιώδες και δοκιδώδες οστό. (Φ): φλοιώδες οστό, (Δ): δοκιδώδες οστό, (Μ): μυελός

Το φλοιώδες οστό είναι πυκνό και σχηματίζει ένα άκαμπτο περίβλημα το οποίο αντιστέκεται στις δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ η εσωτερική δοκιδώδης ζώνη, ουσιαστικά κάνει το οστό πιο ισχυρό λειτουργώντας σαν ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών στηριγμάτων. Οι χώροι ανάμεσα στις οστικές δοκίδες καταλαμβάνονται από τον μυελό των οστών (Εικόνα 3). Το 80% περίπου του σκελετού αποτελείται από φλοιώδες οστό και το υπόλοιπο 20% από δοκιδώδες. Στα οστά που είναι υπεύθυνα για τη στήριξη του βάρους του σώματος, οι οστικές δοκίδες διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχουν τη μέγιστη δυνατή αντίσταση στη φυσική καταπόνηση στην οποία υπόκεινται. Τα εξειδικευμένα στηρικτικά κύτταρα των οστών απαντώνται είτε σε επιφανειακές θέσεις είτε μέσα σε μικρούς σκαφοειδείς χώρους του σχηματισμένου οστού που ονομάζονται βοθρία.

Τα οστά ανάλογα με τη μορφολογία τους χωρίζονται σε μακριά (επιμήκη), πλατιά και μικρά (βραχέα) όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 4. Τα **μακριά οστά** (Εικόνα 5) έχουν δύο άκρα τις επιφύσεις και μεταξύ αυτών, το σώμα που ονομάζεται διάφυση. Μέσα στη διάφυση περικλείεται σωληνωτή κοιλότητα, ο αυλός ή μυελικός σωλήνας, που περιέχει τον μυελό των οστών. Η διάφυση επενδύεται, τόσο στην εξωτερική, όσο και στην εσωτερική της επιφάνεια με πυκνό συνδετικό ιστό, που ονομάζεται περιόστεο και ενδόστεο αντίστοιχα. Το περιόστεο και το ενδόστεο περιέχουν μεγάλο αριθμό οστεοβλαστών, που παίζουν ρόλο στην κατά πάχος αύξηση του οστού και στην αναγέννησή του στην περίπτωση κατάγματος. Μακριά οστά είναι αυτά των άκρων όπως το μηριαίο και το βραχιόνιο. Τα **πλατιά οστά** παρουσιάζουν δύο επιφάνειες, χείλη και γωνίες όπως είναι τα οστά του κρανίου και της ωμοπλάτης. Καλύπτονται από περιόστεο και αποτελούνται από δύο πλάκες συμπαγούς οστίτη ιστού, μεταξύ των οποίων υπάρχει σπογγώδης ιστός.Τα **βραχέα οστά** έχουν περίπου ίσες και τις τρεις διαστάσεις τους, καλύπτονται από περιόστεο και έχουν κεντρικό τμήμα με σπογγώδη οστίτη ιστό που περιβάλλεται από συμπαγή οστίτη ιστό. Χαρακτηριστικά βραχέα οστά είναι τα οστά του καρπού και οι σπόνδυλοι.

Εικόνα 4: Μορφολογία οστών



Εικόνα 5: Δομή ενός μακρού οστού

2.3 Οστικά κύτταρα

Τα κύτταρα που εμπλέκονται και ευθύνονται για τις διαδικασίες παραγωγής, διατήρησης και ανακατασκευής του οστού είναι τα οστεοπρογονικά κύτταρα, οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τα επενδυτικά κύτταρα και οι οστεοκλάστες (Stevens, *et al.*, 1993) (Guyton, 1992).

- **Οστεοπρογονικά κύτταρα**

Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και αποτελούν ένα σύνολο αδιαφοροποίητων κυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, ινοβλάστες, μυοβλάστες αλλά και σε οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα. Στην περίπτωση ενός αναπτυσσόμενου οστού, όπως το οστό ενός εμβρύου ή ενός ενήλικα που βρίσκεται σε οστεογενετική φάση, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται, αυξάνουν σε μέγεθος και μετατρέπονται σε ενεργούς οστεοβλάστες. Στην περίπτωση όμως ενός ώριμου οστού που δεν είναι σε φάση οστικής ανακατασκευής και δεν υπάρχει ενεργός σχηματισμός νέου οστού, τα οστεοπρογονικά κύτταρα γίνονται αποπλατυσμένα, ατρακτόμορφα και εντοπίζονται πλέον

κοντά στην οστική επιφάνεια (Owen, 1988) (Aubin, 1998) (Pittenger, *et al.*, 1999) (Guyton, 1992).

- **Οστεοβλάστες**

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα που υπό την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα, έπειτα σε προ-οστεοβλάστες και στη συνέχεια σε ώριμους οστεοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά ευθύνονται κυρίως για την παραγωγή του οστεοειδούς μέσω πρωτεϊνικής σύνθεσης, καθώς και για την παραγωγή ορισμένων υποδοχέων ορμονών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων επηρεάζοντας την παραγωγή και την απορρόφηση του οστού (Aubin, 1998). Οι οστεοβλάστες βρίσκονται στις έξω επιφάνειες των οστών, αλλά και στις οστικές κοιλότητες (βοθρία). Όταν είναι ενεργοί, η μορφή τους είναι κυβοειδής ή πολυγωνική. Μια μικρή οστεοβλαστική δραστηριότητα παρατηρείται συνεχώς σε όλα τα ζωντανά οστά στο 4% όλων των οστικών επιφανειών (Guyton, 1992).

- **Οστεοκύτταρα**

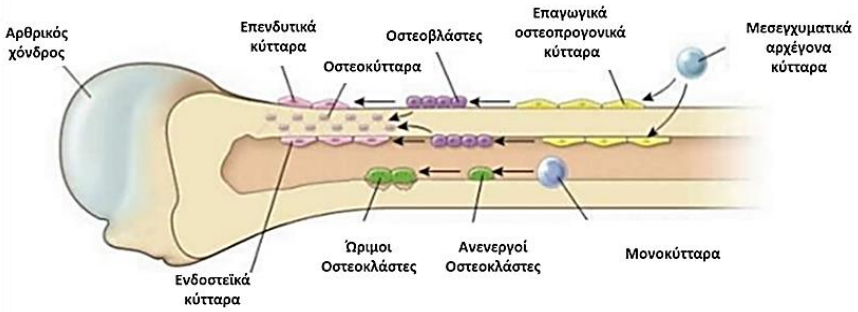
Τα οστεοκύτταρα είναι κύτταρα οστεοβλαστών που κατά το σχηματισμό του οστεοειδούς εγκλωβίστηκαν μέσα στις οστικές κοιλότητες-βοθρία και περιβλήθηκαν από οστεοποιημένη εξωκυττάρια ουσία. Σε μεγάλο ποσοστό έχουν χάσει τα κυτταρικά τους οργανίδια και την ικανότητα παραγωγής της θεμέλιας ουσίας. Τα οστεοκύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους αλλά και με τα επενδυτικά κύτταρα στην επιφάνεια του οστού μέσω κυτταροπλασματικών αποφυάδων, αναπτύσσοντας ένα δίκτυο επικοινωνίας, λαμβάνοντας με τον τρόπο αυτό τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωσή τους και εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα στο οστό την ικανότητα να ανταποκριθεί σε περιπτώσεις τραυματισμού ή ανάγκης αυξημένης μηχανικής στήριξης (Sommerfeldt, *et al.*, 2001). Σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται κίνηση ρευστού γύρω από τα οστεοκύτταρα και τις κυτταρικές προεκτάσεις, στέλνοντας σήματα στα κύτταρα της επιφάνειας των οστών για να μεταβάλλουν τη δράση τους.

- **Επενδυτικά κύτταρα**

Τα επενδυτικά οστικά κύτταρα (lining cells) προέρχονται από οστεοβλάστες που έπαψαν να είναι ενεργοί και που όμως δεν εγκλωβίστηκαν στο οστεοειδές (νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία που δεν έχει ασβεστοποιηθεί) για να μετατραπούν σε οστεοκύτταρα. Τα επενδυτικά οστικά κύτταρα είναι αποπλατυσμένα στη μορφολογία τους, ενώ διαθέτουν μειωμένο αριθμό κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Καλύπτουν μεγάλη έκταση των οστικών επιφανειών, προστατεύοντάς τες έτσι από την αποικοδομητική δράση των οστεοκλαστών (Junqueira *et al*, 1991).

- **Οστεοκλάστες**

Πρόκειται για μεγάλα κύτταρα που φέρουν πολλαπλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα και προέρχονται από μονοκύτταρα που παράγονται στο μυελό των οστών. Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην ελεύθερη οστική επιφάνεια σε θέσεις ενεργής απορρόφησης του οστού συχνά μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα που ονομάζονται κοιλότητες απορρόφησης ή βοθρία του Howship. Οι οστεοκλάστες φυσιολογικά εμφανίζουν δραστηριότητα σε ποσοστό μικρότερο από 1% της ολικής οστικής επιφάνειας και ευθύνονται για την απορρόφηση του οστού. Η υπερβολική οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες είναι μια σημαντική αιτία της ευθραυστότητας των οστών όχι μόνο στην περίπτωση της οστεοπόρωσης, αλλά και σε άλλες ασθένειες όπως ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η νόσος του Paget και η ινώδης δυσπλασία.



Εικόνα 6: Οστικά κύτταρα

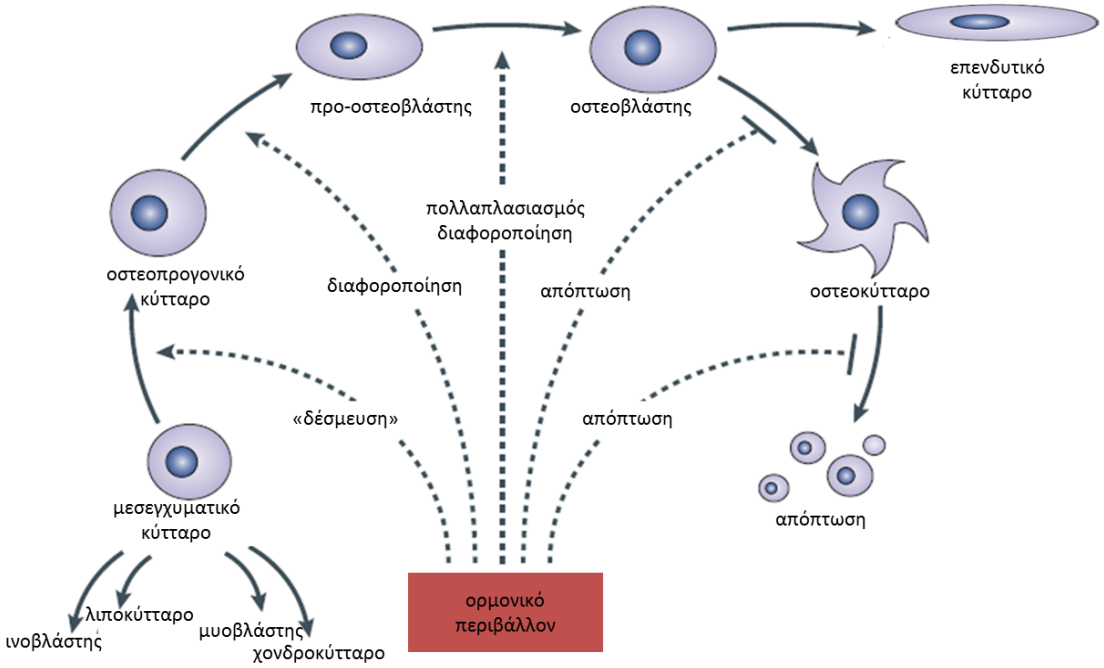
Στην εικόνα 6 απεικονίζονται τα είδη και η διάταξη των κυττάρων που εντοπίζονται στον οστίτη ιστό. Σημειώνεται πως τα πιο σημαντικά και ενεργά κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες, τα κύτταρα που ευθύνονται για την παραγωγή και την απορρόφηση του οστού αντίστοιχα και για τον λόγο αυτό αναλύονται διεξοδικά στη συνέχεια.

2.3.1 Φυσιολογία-Λειτουργία οστεοβλαστών

Λειτουργικά, οι οστεοβλάστες είναι τα κύτταρα στο εσωτερικό των οστών που ευθύνονται για την παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ρυθμίζουν την εναπόθεση ανόργανων συστατικών στο οστό. Μορφολογικά, αυτά τα κύτταρα έχουν κυβοειδές σχήμα και βρίσκονται στην επιφάνεια του οστού μαζί με τα πρόδρομα κύτταρά τους, αποτελώντας ένα σφιχτό στρώμα κυττάρων. Η διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας και η ανταπόκριση τους σε μεταβολικά και μηχανικά ερεθίσματα εξασφαλίζεται χάρης στην ικανότητά τους να επικοινωνούν με τα υπόλοιπα κύτταρα και τη θεμέλια ουσία, μέσω μιας ποικιλίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και ειδικών υποδοχέων που εντοπίζονται στην κυτταρική τους μεμβράνη (Sommerfeldt, *et al.*, 2001).

Όπως έχει προαναφερθεί, οι οστεοβλάστες προέρχονται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα, έπειτα σε προ-οστεοβλάστες και στη συνέχεια σε ώριμους οστεοβλάστες (Aubin, 2001) (Pittenger, *et al.*, 1999). Το πρώτο στάδιο είναι ο σχηματισμός των οστεοπρογονικών κυττάρων, τα οποία αποτελούν ένα σύνολο

αδιαφοροποίητων κυττάρων που όμως παρουσία κατάλληλων παραγόντων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προ-οστεοβλάστες. Τα προ-οστεοβλαστικά κύτταρα έχουν ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης και είναι προκαθορισμένα να διαφοροποιηθούν σε ώριμους οστεοβλάστες, οι οποίοι χάνουν την ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης (Ducy, *et al.*, 1998) (Goltzman, 2002). Οι προ-οστεοβλάστες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην οστική επαναρρόφηση, καθώς λαμβάνουν σήματα από επαγωγείς επαναρρόφησης (παραθυρεοειδής ορμόνη, κυτταροκίνες, προσταγλανδίνες) και σε απόκριση αυτών των σημάτων ελευθερώνουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες (όπως ο παράγοντας RANKL) ενεργοποιώντας τον κύκλο επαναρρόφησης του οστού (Goltzman, 2002). Τελικό στάδιο της διαφοροποίησης είναι ο σχηματισμός των ώριμων οστεοβλαστών που ευθύνονται για το σχηματισμό του οστού. Πρώιμοι δείκτες διαφοροποίησης είναι η αλκαλική φωσφατάση και το κολλαγόνο τύπου Ι, ενώ η οστεοκαλσίνη, η οστική σιαλοπρωτεΐνη, καθώς και η επιμετάλλωση της εξωκυττάριας ουσίας είναι τελικοί δείκτες διαφοροποίησης (Nakashima, *et al.*, 2003).



Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής των οστεοβλαστών (Goltzman, 2002)

Ο κύκλος ζωής ενός οστεοβλάστη (Εικόνα 7) στον άνθρωπο διαρκεί μέχρι 8 εβδομάδες και τελικά ένας αριθμός κυττάρων παγιδεύονται στην οστική κοιλότητα-θεμέλια ουσία και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Οι ανενεργοί οστεοβλάστες που βρίσκονται στην οστική επιφάνεια ονομάζονται επενδυτικά κύτταρα. Τα διάφορα είδη οστεοβλαστών δεν αντιπροσωπεύουν διαφορετικά εξελικτικά στάδια, αλλά αποτελούν μία σειρά από κύτταρα που υποβοηθούν διακριτές και επιλεκτικές λειτουργίες στην ομοιόσταση των οστών (Sommerfeldt, *et al.*, 2001) (Mosley, 2000) (Goltzman, 2002).

Η πρώτη βασική λειτουργία των οστεοβλαστών αφορά την παραγωγή των δομικών συστατικών του οστού με βασικότερη την παραγωγή και την εναπόθεση της πρωτεΐνης κολλαγόνο τύπου Ι, που αποτελεί το κύριο συστατικό του οστεοειδούς. Επίσης, παράγουν και

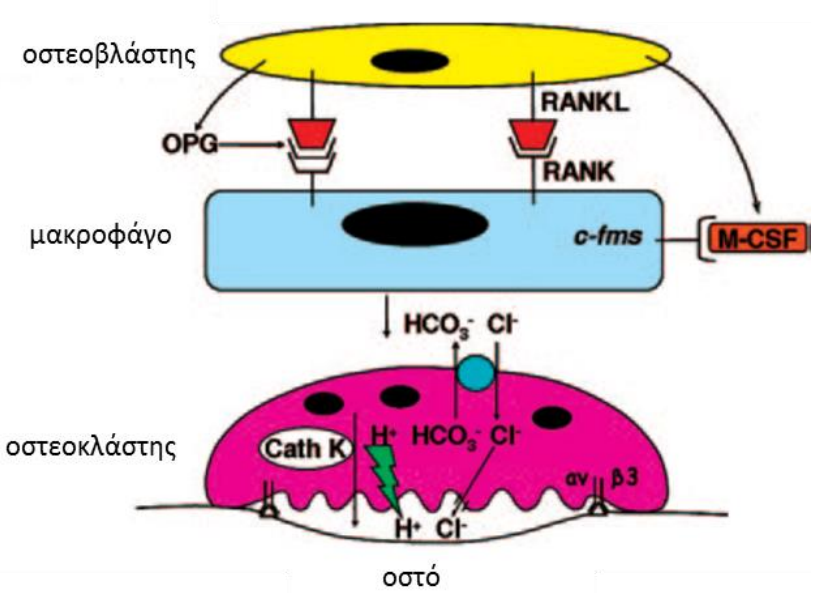
μη κολλαγονικές πρωτεΐνες όπως η οστεοποντίνη, που απομονώθηκε αρχικά από την εξωκυτταρική μήτρα του οστού, η οποία όμως δεν εκφράζεται μόνο από κύτταρα του σκελετικού ιστού, σε αντίθεση με την οστική σιαλοπρωτεΐνη (BSP: Bone Sialoprotein), η οποία εμφανίζει δομικά χαρακτηριστικά ανάλογα με της οστεοποντίνης και παράγεται σχεδόν αποκλειστικά από κύτταρα του σκελετικού ιστού. Η οστεοκαλσίνη, η οποία παράγεται και εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες κατά τη φάση ασβεστοποίησης του οστού είναι η πιο σημαντική μη κολλαγονούχα πρωτεΐνη των οστών. Επίσης, οι οστεοβλάστες μέσω της αύξησης της έκφρασης του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης συμμετέχουν στη διαδικασία ασβεστοποίησης του οστού. Το συγκεκριμένο ένζυμο βρίσκεται στην εξωκυτταρική μεμβράνη των οστεοβλαστών και εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού του οστίτη ιστού, καθώς και στη διαμεμβρανική σηματοδότηση (Aubin, 1998) (Aubin, 2001).

Η δεύτερη κατηγορία λειτουργιών των οστεοβλαστών σχετίζεται με την παραγωγή και την απέκκριση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και ενζύμων, απαραίτητων για το σχηματισμό και την απορρόφηση του οστού. Οι οστεοβλάστες παράγουν αυξητικούς παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης (IGF: Insulin-like growth factor), ο παράγοντας μετασχηματισμού (TGF: Transforming growth factor) και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF: fibroblast growth factor), οι οποίοι δεσμεύονται στη θεμέλια ουσία του οστού και αργότερα απελευθερώνονται λόγω της δράσης των οστεοκλαστών, ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των οστεοπρογονικών κυττάρων και επάγοντας τη διαφοροποίησή τους σε οστεοβλάστες (Aubin, 2001) (Goltzman, 2002). Μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τους οστεοβλάστες ενεργοποιούνται οι οστεοκλάστες και κατ' επέκταση η διαδικασία της οστικής απορρόφησης, γεγονός που επιβεβαιώνει την αλληλένδετη δράση των δύο κυτταρικών τύπων.

2.3.2 Φυσιολογία-Λειτουργία οστεοκλαστών

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, όπως και τα μακροφάγα, και είναι κύτταρα άκρως μεταναστευτικά, πολυπύρηνα και πολυγωνικά που φέρουν ένα οπλοστάσιο από λυσοσωμικά ένζυμα (Teitelbaum, 2000). Αρχικά, τα κύτταρα του μυελού των οστών πολλαπλασιάζονται παρουσία συγκεκριμένων παραγόντων και μετατρέπονται σε μονοπύρηνους προ-οστεοκλάστες, οι οποίοι προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια και τελικά διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες (Roodman, 1999). Πιο συγκεκριμένα, η οστεοκλαστογένεση ρυθμίζεται από μια σειρά μοριακών βημάτων, όπου σε πρώτη φάση ο μεταγραφικός παράγοντας c-Fos «εξαναγκάζει» τη διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων σε οστεοκλάστες αντί ώριμων μακροφάγων. Έπειτα, ο παράγοντας M-CSF, που παράγεται από τους (προ)-οστεοβλάστες και είναι απαραίτητος για την ωρίμανση των μακροφάγων, προσδένεται στον υποδοχέα του στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών εκφράζοντας σήματα απαραίτητα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Καθοριστικός για τη διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε οστεοκλάστες είναι ο παράγοντας RANK-L, ο οποίος μέσω της κινάσης του, ενεργοποιεί το σύμπλοκο NF-kB

(Nuclear factor-Kb) (Teitelbaum, 2000) (Roodman, 1999). Η σπουδαιότητα των παραγόντων RANK-L και M-CSF στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, οι οποίοι εκκρίνονται από τους οστεοβλάστες, υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο των οστεοβλαστών στην οστεοκλαστογένεση. Στην πραγματικότητα, οι περισσότεροι οστεοκλαστικοί παράγοντες προκαλούν την οστεοκλαστογένεση μέσω της σύνδεσής τους με τα οστεοβλαστικά κύτταρα, ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση των προαναφερόμενων παραγόντων. Ανάμεσα στους παράγοντες που ευνοούν την οστεοκλαστογένεση συγκαταλέγονται: η παραθυροειδής ορμόνη και η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D_3, που δρούν μέσω της αύξησης της έκφρασης του παράγοντα RANK-L, η κυτταροκίνη TNF που μέσω των οστεοβλαστών ενεργοποιούν την έκφραση των παραγόντων RANK-L και M-CSF και η ιντερλευκίνη που ενεργοποιεί την έκφραση του παράγοντα M-CSF, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει στην περίπτωση της εμμηνόπαυσης, κατά την οποία η έλλειψη οιστρογόνων ευνοεί αυτή την επίδραση (Rodan*, et al.*, 2000). Ανασταλτικός παράγοντας της οστεκλαστογένεσης είναι η οστεοπροτεγερίνη (OPG: Osteoprotegerin) που παράγεται από τους οστεοβλάστες και φαίνεται να δρα μπλοκάροντας την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και όχι τον πολλαπλασιασμό τους (Roodman, 1999), καθώς ανταγωνίζεται ως «δόλωμα» τον υποδοχέα RANK δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που αναχαιτίζει την οστεοκλαστογένεση (Yasuda, *et al.,* 1998; Simonet, *et al.*, 1997). Στην Εικόνα 8 απεικονίζεται συνοπτικά η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, καθώς και η λειτουργία τους, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 8: Διαφοροποίηση και λειτουργία οστεοκλαστών (Teitelbaum, 2007)

Οι οστεοκλάστες βρίσκονται μέσα στην οστική επιφάνεια και η κυριότερη λειτουργία τους είναι η οστική απορρόφηση μέσω της κυτταρικής πόλωσης. Ένας ενεργός οστεοκλάστης είναι σε θέση να απορροφά 200.000 μm^3 / ημέρα, δηλαδή μια ποσότητα οστού που σχηματίζεται από επτά έως δέκα γενιές οστεοβλαστών με μέση διάρκεια ζωής 15-20 ημερών (Albright, *et al.*, 1987). Είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα κύτταρα ως προς την εκπλήρωση της αποστολής τους και διαθέτουν αξιοσημείωτα λειτουργικά χαρακτηριστικά, όπως πλειομορφικά

μιτοχόνδρια, κενοτόπια και λυσοσώματα, που τους επιτρέπουν να αναγνωρίζουν και να αποδομούν το οστό.

Οι οστεοκλάστες απορροφούν το οστό εκκρίνοντας πρωτεάσες που διαλύουν τη μήτρα και οξύ, το οποίο απελευθερώνει τα ανόργανα συστατικά του οστού. Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας είναι η προσκόλληση του οστεοκλάστη στο οστό, που επιτυγχάνεται δια μέσου διαμεμβρανικών ετεροδιμερών πρωτεϊνών, των ιντεγκρινών. Η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ εκφράζεται από τους ώριμους οστεοκλάστες και λειτουργικά είναι πολύ σημαντική, καθώς ευθύνεται για την προσκόλλησή τους στην οστική επιφάνεια, μέσω αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες βιτρονεκτίνη, οστεοποντίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη (Ross, *et al.*, 1993) (Hynes, 1992) και για την μετάδοση μοριακών σημάτων για την έναρξη της οστικής απορρόφησης. Στη συνέχεια, δημιουργείται ένα απομονωμένο εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον μεταξύ του κυττάρου και της επιφανείας του οστού, μέσω σχηματισμού μιας πτυχωτής μεμβράνης (πόλωση του οστού) και ενός δακτυλίου ακτίνης. Η αποδόμηση του οστού ξεκινά με την παραγωγή και τη μεταφορά ιόντων H^+ μέσω της καρβονικής ανυδράσης και της αντλίας πρωτονίων υπεύθυνης για την μεταφορά τους, ενώ η ανανταλλαγή ιόντων HCO_3^- με Cl^- οδηγεί εν τέλει στο σχηματισμό HCl οξέος και ισχυρά όξινου περιβάλλοντος (4,5 pH). Η ιδιαίτερα αυξημένη οξύτητα του περιβάλλοντος κινητοποιεί την ανόργανη φάση του οστού και οδηγεί στην σταδιακή αποδόμηση της οργανικής ουσίας του με τη βοήθεια της καθεψίνης K^+ και μεταλλοπρωτεϊνασών, ενώ παράλληλα με τη δράση των κολλαγενασών ελευθερώνεται κολλαγόνο τύπου Ι και άλλες μη κολλαγονικές πρωτεΐνες. Όλα τα προϊόντα αποδόμησης του οστού μεταφέρονται από τους οστεοκλάστες μέσω ενδοκύττωσης στην κυτταρική επιφάνεια (Teitelbaum, 2000) (Teitelbaum, 2007) (Duong, *et al.*, 2001).

2.4 Διεργασίες οστικής (ανα)-κατασκευής

Κατά τη διάρκεια της ζωής, το μέγεθος, το σχήμα και η θέση των οστών μεταβάλλονται και οι διαδικασίες που κατευθύνουν αυτές τις αλλαγές είναι η κατασκευή (modeling) και η ανακατασκευή των οστών (remodeling).

Η φάση της **οστικής κατασκευής** εντοπίζεται από την αρχή της ανάπτυξης του σκελετού κατά την εμβρυϊκή ηλικία και διαρκεί ως και το τέλος της δεύτερης δεκαετίας, όπου η διαμήκης ανάπτυξη του σκελετού έχει ολοκληρωθεί. Στην φάση κατασκευής επιτυγχάνεται ταχεία οστική ανάπτυξη, όπου χαρακτηριστικά σε ένα σημείο του οστού σχηματίζεται νέο οστό, ενώ σε κάποιο άλλο σημείο του απορροφάται. Το γεγονός ότι η οστική απορρόφηση και παραγωγή δεν παρατηρούνται στο ίδιο σημείο έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του σχήματος και της θέσης των οστών, επιτρέποντάς τους να μεγαλώνουν σε μέγεθος (Seeman, 2003). Έτσι, κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας τα οστά μεγαλώνουν, γιατί η απορρόφηση του οστού συμβαίνει εσωτερικά (ενδόστεο), ενώ η παραγωγή παρατηρείται στην εξωτερική επιφάνεια (περιόστεο). Αντίθετα, στην εφηβεία αυξάνεται η οστική πυκνότητα, καθώς η αναδόμηση του οστού παρατηρείται και στην εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια του οστού. Στο τέλος της

φάσης κατασκευής, τα οστά λαμβάνουν το βέλτιστο σχήμα και μέγεθος για τη λειτουργία τους, ώστε να αντέχουν σε καταστάσεις μηχανικής καταπόνησης, όπως η συμπίεση και η έλξη (Office of the Surgeon General, 2004).

Η φάση της **οστικής ανακατασκευής** λαμβάνει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, όπου ένα μικρό ποσοστό από την επιφάνεια του οστού απομακρύνεται και μετά αντικαθίσταται. Στην περίπτωση αυτή η απορρόφηση και η αναδόμηση του οστού (μέσω της δράσης των οστεοκλαστών και οστεοβλαστών αντίστοιχα) πραγματοποιούνται στο ίδιο σημείο αποτελώντας μια συνεχή διαδικασία, χωρίς να παρατηρείται καμία μεταβολή στο μέγεθος, στο σχήμα ή στη θέση των οστών.

Στον ενήλικο σκελετό τα οστά υφίστανται συνεχή αναδιαμόρφωση, η οποία χρησιμεύει στη διατήρηση της σκελετικής δύναμης, μέσω της αντικατάστασης των παλαιών, εύθραυστων οστών με νέα, μηχανικά πιο ανθεκτικά οστά, ενώ παρέχει επίσης ένα σημαντικό μηχανισμό για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου (Compston, 1990). Η οστική αναδιαμόρφωση λαμβάνει χώρα σε μικρές περιοχές στην επιφάνεια του φλοιώδους και του δοκιδώδους οστού, γνωστές ως βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (BMU: Basic Multicellular Unit), όπου στην περίπτωση του δοκιδώδους οστού καταλαμβάνουν περίπου το 5-25% της επιφάνειάς του. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι διαδικασίες απορρόφησης και εναπόθεσης οστού βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία, με αποτέλεσμα η συνολική οστική μάζα να παραμένει σταθερή (Parfitt, 1982) (Guyton, 1992). Υπολογίζεται πως περίπου το 10% των οστών αντικαθίσταται κάθε χρόνο, ενώ κάθε 10 χρόνια παρατηρείται πλήρης ανανέωση του σκελετού (Cohen, 2006). Ενώ η διαδικασία της ανακατασκευής κυριαρχεί από την αρχή της εφηβείας και έπειτα, παρ' όλα αυτά η οστική κατασκευή μπορεί να πραγματοποιηθεί με σκοπό την «αφύπνιση» του οστού. Έτσι, στη φάση της γήρανσης και σε περιπτώσεις που παρατηρείται υπερβολική απώλεια οστικής μάζας από το εσωτερικό των οστών, μικρά νέα οστά μπορεί και να δημιουργηθούν με σκοπό τη διατήρηση της μηχανικής αντοχής του σκελετού (Office of the Surgeon, 2004).

2.4.1 Σημασία οστικής αναδιαμόρφωσης

Η συνεχής αναδιαμόρφωση, δηλαδή η εναπόθεση και απορρόφηση του οστού, δεν μεταβάλλει το σχήμα του, αλλά είναι απαραίτητη για την οστική υγεία εξυπηρετώντας ορισμένες ιδιαίτερα σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες:

- Εξασφαλίζει την αναπροσαρμογή του οστού ανάλογα με το βαθμό της μηχανικής επιβάρυνσής του, συνεπώς με αύξηση μηχανικής φόρτισης τα οστά καθίστανται παχύτερα.
- Επιδιορθώνει τη φθορά του σκελετού που έχει προέλθει από επαναλαμβανόμενες καταπονήσεις, αντικαθιστώντας μικρές ρωγμές ή παραμορφώσεις στις περιοχές της βλάβης των κυττάρων.

- Εμποδίζει τη συσσώρευση παλαιού οστού, που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια αντοχής και αύξηση ευθραυστότητας, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη φυσιολογική ανθεκτικότητα του οστού.
- Είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία του σκελετού ως τράπεζα ασβεστίου και φωσφόρου. Η επαναρρόφηση στην επιφάνεια του δοκιδώδους οστού, μπορεί να παρέχει στον οργανισμό τις απαιτούμενες ποσότητες ασβεστίου και φωσφόρου σε περιπτώσεις διατροφικής ανεπάρκειας ή για την κάλυψη ανάγκης σε ασβέστιο του εμβρύου ή του βρέφους, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή της γαλουχίας αντίστοιχα. Όταν οι προμήθειες του οργανισμού σε ασβέστιο και φώσφορο είναι άφθονες, τότε κατά τη φάση της αναδόμησης αυτά αποθηκεύονται στα οστά (Guyton, 1992) (Office of the Surgeon, 2004).

2.4.2 Διαδικασία οστικής αναδιαμόρφωσης

Η φυσιολογική διαδικασία της αναδιαμόρφωσής του σκελετού στηρίζεται στην ισορροπία της δράσης των οστεοκλαστών και οστεοβλαστών, καθώς αυτή εξασφαλίζει τη διατήρηση της οστικής μάζας και της μηχανικής αντοχής των οστών (Parfitt, 2000). Η ισορροπία των δράσεων εξασφαλίζεται μέσα από τη σύζευξη της απορρόφησης και αναδόμησης του οστού, μέσω αλληλοσηματοδοτούμενων μηχανισμών. Για την ανακατασκευή των οστών απαιτείται η συντονισμένη δράση των επενδυτικών κυττάρων, των οστεοκυττάρων, των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών και μπορεί να διακριθεί σε πέντε βασικά στάδια, ενώ η διάρκεια του κύκλου υπολογίζεται από 3-7 μήνες (Feng, *et al.*, 2011) (Compston, 1990).

- **Φάση ηρεμίας (Quiescent phase)**

Στη φάση αυτή βρίσκεται το μεγαλύτερο μέρος του οστίτη ιστού, όπου καλύπτεται από ανενεργά επενδυτικά κύτταρα.

- **Φάση ενεργοποίησης (Activation phase)**

Πριν από τη διαδικασία απορρόφησης λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της οστικής επιφάνειας. Πιστεύεται πως όταν τα οστεοκύτταρα αντιληφθούν οποιαδήποτε παραμόρφωση του οστού που έχει προκληθεί από μηχανική φόρτιση ή ανιχνεύουν κάποια μικροβλάβη στο παλαιό οστό, μεταδίδουν μοριακά σήματα με σκοπό την συγκέντρωση προδρόμων οστεοκλαστών στην συγκεκριμένη θέση του οστού (Parfitt, 2002). Ως απόκριση στα παραπάνω σήματα, τα επενδυτικά κύτταρα απομακρύνονται από την οστική επιφάνεια σχηματίζοντας ένα θόλο, δημιουργώντας έτσι ένα κλειστό σύστημα όπου θα λάβει χώρα η οστική αναδιαμόρφωση (BRC: Bone-remodeling compartment) (Parfitt, 2001). Επίσης, εκκρίνουν παράγοντες που προσελκύουν τα πρόδρομα μόρια οστεοκλαστών, τα οποία προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια και παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων M-CSF και RANKL διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες (Sims, *et al.*, 2014).

❖ **Φάση αποικοδόμησης (Resorption phase)**

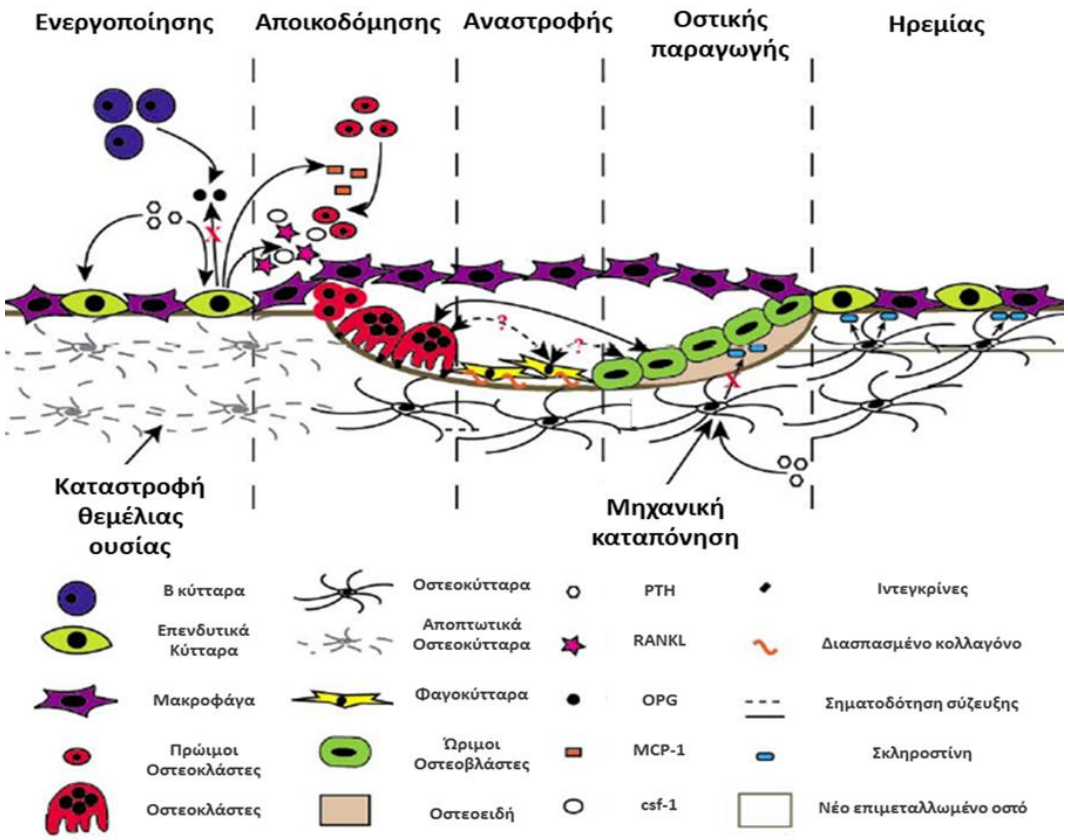
Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η απορρόφηση του οστού από τους οστεοκλάστες, οι οποίοι προσκολλώνται πάνω στην οστική επιφάνεια σχηματίζοντας μια πτυχωτή παρυφή και με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων και οξέων διαλύουν την οργανική ουσία του οστού και ελευθερώνουν τα άλατά του (§2.3.2).

❖ **Φάση αναστροφής (Reversal phase)**

Η φάση αναστροφής είναι το ενδιάμεσο στάδιο ανάμεσα στη φάση της αποικοδόμησης και τη φάση της οστικής παραγωγής όπου ένας τύπος κυττάρων οστεοβλαστικής καταγωγής, τα λεγόμενα «κύτταρα αναστροφής» προετοιμάζουν την οστική επιφάνεια για την εναπόθεση νέου οστού και λαμβάνουν ή παράγουν μοριακά σήματα για την έναρξη της οστικής παραγωγής (Raggatt, *et al.*, 2010). Πρακτικά στο στάδιο αυτό αποκολλώνται οι οστεοκλάστες από την επιφάνεια του οστού και αντικαθίστανται από τους οστεοβλάστες. Κατά την αποικοδόμηση του οστού απελευθερώνονται συγκεκριμένοι παράγοντες (όπως ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης IGF I και II, ο παράγοντας μεταμόρφωσης TGF-β2, μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs: Bone Morphogenetic Proteins)), που προσελκύουν τα προ-οστεοβλαστικά κύτταρα και ευνοούν τη διαφοροποίησή τους, τόσο από τη θεμέλια ουσία του οστού, όσο και από τα ίδια τα κύτταρα των οστεοκλαστών (Tang, *et al.*, 2009) (Martin, *et al.*, 2009).

❖ **Φάση οστικής παραγωγής (Formation-Mineralization phase)**

Εφόσον τα πρόδρομα μόρια των οστεοβλαστών έχουν συγκεντρωθεί στις οστικές κοιλότητες και διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες, ξεκινά η περίοδος της οστικής παραγωγής, η οποία διαρκεί από 3 έως 4 μήνες. Σε πρώτη φάση παράγονται και εναποθέτονται ινίδια κολλαγόνου τύπου Ι, που είναι και το κυρίαρχο συστατικό της θεμέλιας ουσίας. Κατά τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών εκκρίνεται μεγάλο ποσοστό αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία πιστεύεται πως αυξάνει την τοπική συγκέντρωση ανόργανων φωσφορικών αλάτων ή ενεργοποιεί τις ίνες κολλαγόνου, ώστε να προκαλείται καθίζηση των αλάτων ασβεστίου. Η φάση επιμετάλλωσης του οστού είναι και η τελευταία του κύκλου, όπου με την εναπόθεση κρυστάλλων υδρόξυαπατίτη στο οστεοειδές ολοκληρώνεται και η διαδικασία της δημιουργίας ισχυρών οστών και διαρκεί από 90 έως 130 μέρες (Raggatt, *et al.*, 2010; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, *et al.*, 2006). Τέλος, το οστό επιστρέφει στη φάση ηρεμίας, μέχρι να ενεργοποιηθεί ο επόμενος κύκλος οστικής αναδιαμόρφωσης.



Εικόνα 9: Στάδια οστικής ανακατεσκευής (Raggatt, *et al.*, 2010)

Οποιοδήποτε σφάλμα κατά τη διάρκεια αυτής της πολύπλοκης διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε κάποια μορφή ασθένειας ή πάθησης των οστών. Εφόσον η οστική αναδιαμόρφωση εξυπηρετεί τις δομικές, αλλά και τις μεταβολικές λειτουργίες του σκελετού, μπορεί να ενεργοποιηθεί τόσο από τις ορμόνες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των οστών, όσο και από παράγοντες που σχετίζονται με μηχανικά φορτία ή πιθανές βλάβες.

2.4.3 Παράγοντες που εμπλέκονται στην ανακατασκευή των οστών

Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του οστικού σχηματισμού και της οστικής απορρόφησης εξαρτάται από διάφορους αλληλοσύνδετους παράγοντες. Η ανάπτυξη του σκελετού, η απόκρισή του στις μηχανικές δυνάμεις και ο ρόλος του ως αποθήκη αλάτων εξαρτώνται από την ορθή λειτουργία ορμονών που παράγονται έξω από το σκελετό και λειτουργούν σε συνεννόηση με τους τοπικούς ρυθμιστικούς παράγοντες. Οι σημαντικότερες ορμόνες για την φυσιολογία των οστών είναι οι ακόλουθες:

- **Θυρεοειδικές ορμόνες**

Οι θυρεοειδικές ορμόνες επηρεάζουν και τις δύο διαδικασίες κατασκευής και απορρόφησης των οστών. Στην πρώτη περίπτωση, ενεργοποιούν τη σύνθεση του οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες και την επιμετάλλωσή του μέσω της αυξημένης παραγωγής του IGF-

Ι, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ευνοούν την οστική απορρόφηση μέσω αύξησης του αριθμού και της δραστηριότητας των οστεοκλαστών. Έτσι, ανεπάρκεια της θυρεοειδούς ορμόνης (υποθυρεοειδισμός) μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη στα παιδιά, ενώ η υπερπαραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών (υπερθυρεοειδισμός) μπορεί να προκαλέσει υπερβολική οστική επαναρρόφηση και να αποδυναμώσει το σκελετό (Jódar Gimeno, *et al.*, 1997) (Vestergaard, *et al.*, 2002).

❖ **Παραθυρορμόνη (PTH)**

Η παραθυρορμόνη (PTH: Parathyroid hormone) παράγεται από τέσσερις μικρούς γειτονικούς αδένες στο θυρεοειδή αδένα, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι σε μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση ασβεστίου με αποτέλεσμα όταν αυτό μειώνεται έστω και λίγο να αυξάνεται η έκκριση της PTH. Η παραθυρορμόνη κατέχει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου, αυξάνει την απορρόφησή του από τα οστά, μειώνει την απέκκριση του από τα νεφρά και ενισχύει την παραγωγή καλσιτριόλης. Επίσης, ενεργοποιεί την οστική απορρόφηση με σκοπό την απελευθέρωση του ασβεστίου από τα οστά στο αίμα. Υπερβολική παραγωγή της PTH, συνήθως οφείλεται σε όγκο των παραθυρεοειδών αδένων (υπερπαραθυρεοειδισμός) και μπορεί να οδηγήσει σε οστική απώλεια. Επίσης, στην τρίτη ηλικία η παραθυρορμόνη είναι αυξημένη με συνέπεια να ευνοείται η δράση των οστεοκλαστών και η απορρόφηση του οστού και να δημιουργείται οστεοπόρωση τύπου ΙΙ. Η PTH επιδρά τόσο στην στην απορρόφηση, όσο και στην αναδόμηση του οστού μέσω της παραγωγής των παραγόντων TGF-β και IGF-I. Όταν μικρές ποσότητες ενίονται κατά διαστήματα, κυριαρχεί η οστική αναδόμηση αποτελώντας βάση για μια νέα θεραπεία για την οστεοπόρωση (Rubin, *et al.*, 2002). Επίσης, μια δεύτερη ορμόνη που σχετίζεται με την παραθυρορμόνη, η PTHrP (Parathyroid hormone-related protein), ρυθμίζει την ανάπτυξη χόνδρων και οστών στο έμβρυο, αλλά μπορεί να υπερπαράγεται από άτομα που έχουν ορισμένα είδη καρκίνου. Η PTHrP λειτουργεί σαν την PTH, προκαλώντας υπερβολική αποδόμηση των οστών, απελευθερώνοντας ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα ασβεστίου στο αίμα και προκαλώντας κακοήθη υπερασβεστιαιμία (Stewart, 2002; Canalis, *et al.*, 1989).

❖ **Η καλσιτριόλη**

Είναι η ορμόνη που παράγεται από τη βιταμίνη D, από ένζυμα στο ήπαρ και τους νεφρούς και ονομάζεται επίσης 1,25-διϋδροξυ βιταμίνη D (Norman, *et al.*, 2002). Η καλσιτριόλη επιδρά σε διάφορους ιστούς, αλλά η πιο σημαντική δράση της είναι να αυξάνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου, παρέχοντας έτσι τα απαραίτητα μέταλλα για το σκελετό. Θεωρείται απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του σκελετού, καθώς ανεπάρκεια της βιταμίνης D προκαλεί ραχίτιδα στα παιδιά, οστεομαλακία στους ενήλικες και παίζει καθοριστικό ρόλο ως ρυθμιστικός παράγοντας στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Raisz, 1993).

❖ **Η καλσιτονίνη**

Η καλσιτονίνη είναι η τρίτη ορμόνη ρύθμισης ασβεστίου, η οποία παράγεται από κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα, διαφορετικά όμως από εκείνα που παράγουν τις θυρεοειδικές ορμόνες (Sexton, *et al.*, 1999). Η καλσιτονίνη μπορεί να εμποδίσει την αποικοδόμηση των οστών αδρανοποιώντας τους οστεοκλάστες, αλλά αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να είναι σχετικά παροδικό στους ενήλικες. Η καλσιτονίνη μπορεί να είναι πιο σημαντική για τη διατήρηση των οστών και την ανάπτυξη και φυσιολογικών επιπέδων ασβεστίου στο αίμα στα πρώτα χρόνια της ζωής, καθώς έχει παρατηρηθεί πως έλλειψη ή αυξημένη συγκέντρωση της καλσιτονίνης σε ενήλικες δεν προκαλεί προβλήματα στη διατήρηση του ασβεστίου στο αίμα ή στη δύναμη του οστού.

❖ **Οιστρογόνα**

Τα οιστρογόνα που παράγονται κατά την παιδική ηλικία και μέχρι την αρχή της εφηβείας, κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη των οστών. Τα οιστρογόνα επιδρούν τόσο στους οστεοκλάστες, όσο και στους οστεοβλάστες αναστέλλοντας τη διάσπαση των οστών. Μελέτες θέλουν τα οιστρογόνα να αυξάνουν τα επίπεδα της οστεοπροτεγερίνης, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες και αναστέλλει την αποικοδόμηση του οστού (Hofbauer, *et al.*, 1999). Για το λόγο αυτό η σημαντική μείωση των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση σχετίζεται άμεσα με την ταχεία απώλεια οστικής μάζας.

❖ **Ανδρογόνα**

Τα ανδρογόνα ασκούν αναβολική επίδραση στα οστά, μέσω ενεργοποίησης των οστεοβλαστικών υποδοχέων. Η ανεπάρκεια ανδρογόνων σχετίζεται με χαμηλή οστική πυκνότητα και χορήγηση τεστοστερόνης σε νεαρά άτομα έχει επιφέρει αύξηση της οστικής πυκνότητας. Η τεστοστερόνη είναι σημαντική για την ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος, αλλά και του σκελετού, καθώς η αυξημένη μυϊκή μάζα ωθεί την οστική ανάπτυξη. Η τεστοστερόνη είναι επίσης μια πηγή οιστρογόνων στον οργανισμό, καθώς μετατρέπεται σε οιστρογόνο στα λιποκύτταρα, σημαντικό για τα οστά τόσο των ανδρών, όσο και των γυναικών (Hernández, *et al.*, 2004).

❖ **Προγεστερόνη**

Επίσης, ασκεί αναβολική επίδραση στα οστά είτε άμεσα μέσω πρόσδεσής της στους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνειά των οστεοβλαστών, είτε έμμεσα ανταγωνιζόμενη τα γλυκορτικοειδή (Hernández, *et al.*, 2004).

❖ **Γλυκορτικοειδή**

Σε υψηλές δόσεις εκδηλώνουν καταβολική δράση στα οστά, αφού αναστέλλουν τη σύνθεση του IGF-I από τους οστεοβλάστες και καταστέλλουν τους παράγοντες οστεοβλαστογένεσης BMP-2 και Cbfa1. Παρ' όλα αυτά μελέτες υποστηρίζουν πως σε

φυσιολογικές δόσεις εκδηλώνουν οστεογενετική ικανότητα ενισχύοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Manolagas, 2000), (Lukert, *et al.*, 1996).

❖ **Αυξητική ορμόνη**

Η αυξητική ορμόνη που παράγεται στην υπόφυση είναι ένας ακόμη σημαντικός ρυθμιστής της σκελετικής ανάπτυξης με άμεση και έμμεση δράση. Επιδρά απ' ευθείας στους οστεοβλάστες μέσω ορμονικών υποδοχέων διεγείροντας τη δραστηριότητά τους, με συνέπεια την αύξηση παραγωγής κολλαγόνου, οστεοκαλσίνης και αλκαλικής φωσφατάσης. Επίσης δρα διεγείροντας την παραγωγή των αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης (IGF-I και II), οι οποίοι αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό και ευνοούν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η αυξητική ορμόνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και επιταχύνει τη σκελετική ανάπτυξη κατά την εφηβεία. Μείωση της παραγωγής της αυξητικής ορμόνης και του IGF-I με την πάροδο της ηλικίας μπορεί να ευθύνεται για την αδυναμία των ηλικιωμένων ατόμων να σχηματίσουν οστό γρήγορα ή να αντικαταστήσουν αυτό που χάνεται από την επαναρρόφηση (Yakar, *et al.*, 2003) (Harvey, *et al.*, 1998).

❖ **Κορτιζόλη**

Η κορτιζόλη, η κύρια ορμόνη των επινεφριδίων, είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής του μεταβολισμού και είναι πολύ σημαντική για την ικανότητα απόκρισης του οργανισμού στο στρες και στους τραυματισμούς. Επιδρά με ιδιαίτερο τρόπο επί του σκελετού (Canalis, *et al.*, 2002). Μικρές ποσότητες είναι απαραίτητες για την κανονική ανάπτυξη των οστών, αλλά μεγάλες ποσότητες την παρεμποδίζουν. Συνθετικές μορφές της κορτιζόλης, που ονομάζονται γλυκοκορτικοειδή, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως το άσθμα και η αρθρίτιδα. Μπορούν να προκαλέσουν απώλεια οστικής μάζας, η οποία οφείλεται τόσο στον μειωμένο σχηματισμό των οστών, όσο και σε αυξημένη οστική απορρόφηση (Kanis, *et al.*, 2004).

❖ **Ινσουλίνη**

Είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη των οστών, καθώς αυξάνει τη σύνθεση του παράγοντα IGF-I στο ήπαρ, ενώ έχει παρατηρηθεί μειωμένη ικανότητα απόκρισης του οργανισμού διαβητικών ασθενών σε άλλους παράγοντες που ενεργοποιούν την οστική ανάπτυξη (Lu, *et al.*, 2003) (Suzuki, *et al.*, 2003). Επίσης, έχει αναφερθεί πως η λεπτίνη, μια ορμόνη που προέρχεται από τα λιποκύτταρα, επιδρά στα οστά (Elefteriou, *et al.*, 2004), (Cornish, *et al.*, 2002).

Η οστική αναδόμηση επηρεάζεται και από διάφορους παράγοντες ανάπτυξης όπως τα πολυπεπτίδια που παράγονται από τα οστικά κύτταρα και ρυθμίζουν πλήθος οργανικών λειτουργιών.

❖ **Παράγοντας ανάπτυξης ινσουλίνης IGF-I και II**

Είναι πολυπεπτίδια παρόμοια με την ινσουλίνη, παράγονται στο συκώτι από τους οστεοβλάστες και βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο οστεοειδές. Η παραγωγή τους ελέγχεται από ορμόνες και τοπικούς παράγοντες και πιο συγκεκριμένα, η αυξητική ορμόνη, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη αυξάνουν την παραγωγή τους, ενώ τα γλυκορτικοειδή την αναστέλλουν. Η δράση τους σχετίζεται με την ικανότητά τους να αυξάνουν τον αριθμό και τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών ενεργοποιώντας τη σύνθεση κολλαγόνου (Cohick, *et al.*, 1993) (Hill, *et al.*, 1995) (Mohan, *et al.*, 1991).

- **Παράγοντας μεταμόρφωσης-β (TGF-β)**

Είναι ενεργοποιητής της οστικής παραγωγής, ευνοώντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και την παραγωγή οστεοειδούς και αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεασών. Ο παράγοντας TGF-β εμποδίζει την οστική απορρόφηση μειώνοντας το σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, καθώς και ενεργοποιώντας την απόπτωσή τους (Baylink, *et al.*, 1993).

- **Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP)**

Ανήκουν στην οικογένεια των TGF-β και έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το συνδετικό ιστό σε οστίτη ιστό. Οι BMP δρουν ενεργοποιώντας τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς διάφορες κυτταρικές σειρές και κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης συμμετέχουν στο σχηματισμό των οστών και των χόνδρων. Θεωρούνται οι πιο ισχυροί παράγοντες στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ μελέτες υποστηρίζουν πως μπορούν να αναστέλλουν και την οστεοκλαστογένεση (Yamaguchi, *et al.*, 2000).

Επίσης, οι αυξητικοί παράγοντες αιμοπεταλίων (PDGF: Platelet-Derived Growth Factor) και ινοβλαστών (FGF: Fibroblastic Growth Factor) έχουν αναβολική επίδραση στα οστά, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF: Epidermal Growth Factor) πιθανότητα εμπλέκεται και στη διαδικασία της αναμόρφωσης και απορρόφησης του οστού, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) έχει αγγειογενετική επίδραση και ευνοεί τον αγγειακό ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, ο παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (GM-CSF: Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor) παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεοκλαστογένεση. Ο παράγοντας διέγερσης μακροφάγων (M-CSF), που παράγεται από τους οστεοβλάστες, παίζει καθοριστικό ρόλο στα πρώτα στάδια της οστεοκλαστογένεσης, χωρίς να επιδρά στην οστεοκλαστική δραστηριότητα και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF: Tumor Necrosis Factor) *in vitro* ενεργοποιεί την οστική απορρόφηση και έχει συνδεθεί με την οστική απώλεια σε περιπτώσεις αρθρίτιδας και περιοδοντίτιδας (Hernández, *et al.*, 2004).

Οι πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (Matrix Proteins) πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως δρουν ως ρυθμιστικοί παράγοντες ανάπτυξης και μπορούν να ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως επίσης και να συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων εντός της θεμέλιας ουσίας. Για παράδειγμα, το κολλαγόνο τύπου Ι είναι ένας πρώιμος δείκτης που

ρυθμίζει τα οστεοπρογονικά κύτταρα και η αλκαλική φωσφατάση συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των οστεοβλαστικών κυττάρων (Young, 2003) (Horowitz, 2003).

Τέλος οι κυτταροκίνες που συντίθενται στα λεμφοκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στην απόκριση του ανοσολογικού συστήματος, στη φλεγμονή και την αιματοποίηση, παρουσιάζοντας αυτοκρινή και παρακρινή δράση.

- **Ιντερλευκίνη 1 (IL-1)**

Απευθείας ενεργοποιεί την οστεοκλαστική αναρρόφηση αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών, καθώς και την οστεοβλαστική δραστηριότητα και επίσης αναστέλλοντας την απόπτωση των οστεοκλαστών (Compston, 2001).

- **Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)**

Ενεργοποιεί την οστική απορρόφηση, πιστεύεται ότι εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της οστεοκλαστογένεσης και παράγεται σε απόκριση της PTH, IL-1 και της $1.25(OH)_2D_3$ (Roodman, *et al.*, 1992).

- **Η ιντερλευκίνη 11 (IL-11)** που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα, θεωρείται πως προκαλεί την οστεοκλαστογένεση και οι προσταγλανδίνες ενεργοποιούν την οστική απορρόφηση *in vitro* (Hernández, *et al.*, 2004).

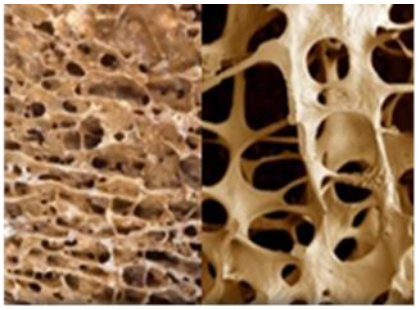
3 Οστεοπόρωση

3.1 Ιστορικά στοιχεία - Ορισμός

Η οστεοπόρωση, αποτελεί ίσως την πιο γνωστή πάθηση των οστών. Παρ' όλο που πιθανότητα υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας, τις τελευταίες δεκαετίες έχει μετατραπεί σε ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα, λόγω της επιμήκυνσης του ορίου της ανθρώπινης ζωής.

Στις αρχές του 19ου αιώνα ο Astley Cooper, διακεκριμένος Άγγλος χειρουργός, ήταν ο πρώτος που σημείωσε πως με την πάροδο του χρόνου τα οστά καθίστανται πιο μαλακά και ελαφριά γεγονός που ευνοούσε τη δημιουργία καταγμάτων (Cooper, *et al.*, 1822). Το 1830 ο παθολόγος Jean Georges Chretien Frederic Martin Lobstein παρατήρησε ότι τα οστά ορισμένων ασθενών του ήταν γεμάτα με τρύπες, επινοώντας τον όρο οστεοπόρωση (πορώδη οστά) για να περιγράψει τη συγκεκριμένη πάθηση, ενώ πιθανώς αναφερόταν στον σημερινό όρο της ατελούς οστεογένεσης (Schapira, *et al.*, 1992). Στη δεκαετία του 1930, ο Fuller Albright, γιατρός του Γενικού Νοσοκομείου της Μασαχουσέτης, ασχολήθηκε με την αιτία των ιδιαίτερα ευαίσθητων και αδύναμων οστών στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και είναι ο πρώτος που αναφέρεται στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση (Albright, *et al.*, 1940). Συνεπώς, διαμορφώθηκε η αντίληψη πως υπάρχουν δύο τύποι οστεοπόρωσης, όπου ο ένας σχετίζεται με την έλλειψη οιστρογόνων κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης και ο άλλος με την έλλειψη ασβεστίου και τη γήρανση του σκελετού (Riggs, *et al.*, 1982).

Το 1993 η οστεοπόρωση αναγνωρίστηκε ως μια από τις κυριότερες μεταβολικές νόσους των οστών, η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια της οστικής μάζας και αλλοίωση της μικροαρχιτεκτονικής των οστών, οδηγώντας σε αύξηση της ευθραυστότητάς τους και συνεπώς στην αύξηση κινδύνου πρόκλησης καταγμάτων (Christiansen *et* al, 1991). Ένας πιο πρόσφατος ορισμός από το ινστιτούτο υγείας (NIH) ορίζει την οστεοπόρωση ως μια σκελετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τη διακινδύνευση της οστικής δύναμης προδιαθέτοντας το άτομο σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος (NIH, 2000).



Φυσιολογικό οστό - Οστεοπορωτικό οστό

3.2 Σοβαρότητα της νόσου

Η οστεοπόρωση, αποτελεί τη συχνότερη πάθηση των οστών στους ενήλικες και ιδιαίτερα στη γεροντική ηλικία. Η απώλεια της οστικής μάζας συμβαίνει αθόρυβα και σταδιακά, ενώ συχνά δεν υπάρχουν ξεκάθαρα συμπτώματα με συνέπεια πολλοί άνθρωποι να αγνοούν ότι

πάσχουν από οστεοπόρωση μέχρι να υποστούν το πρώτο κάταγμα, γι' αυτό το λόγο ονομάζεται και «η σιωπηλή νόσος».

Ο οστικός πόνος κυρίως στη ράχη είναι το πιο συχνό σύμπτωμα όπως και η ελάχιστη απώλεια ύψους, ενώ οι συχνότερες επιπλοκές είναι τα κατάγματα της σπονδυλικής στήλης (κυρίως του αυχένα), του μηριαίου οστού και των καρπών. Η πιθανότητα εμφάνισης των καταγμάτων ιδιαίτερα στο ισχίο και στη σπονδυλική στήλη αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας και στα δύο φύλα, με τους ηλικιωμένους να αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών κοστίζοντας σημαντικά στις υπηρεσίες υγείας, λόγω της μακροχρόνιας και δύσκολης ανάρρωσής τους (Stevens, *et al.*, 1998). Στις χειρότερες περιπτώσεις τα κατάγματα οδηγούν σε μια καθοδική πορεία της υγείας, ανάγοντας την οστεοπόρωση σε σημαντικό αίτιο νοσηρότητας ακόμη και θνησιμότητας. Οι συνέπειες αυτές μπορούν να αποφευχθούν αν τα άτομα που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου σχετιζόμενες με ασθένειες των οστών αναγνωρίζονταν και λάμβαναν εγκαίρως τα κατάλληλα μέτρα προφύλαξης και θεραπείας (Office of the Surgeon, 2004).

Σε παγκόσμιο επίπεδο αναφέρεται πως 1 στις 3 γυναίκες άνω των 50 ετών και 1 στους 5 άνδρες αντίστοιχης ηλικίας θα υποστούν οστεοπορωτικό κάταγμα (Melton, *et al.*, 1998; Melton, *et al.*, 1992). Η νόσος της οστεοπόρωσης ευθύνεται για περισσότερα από 8.9 εκατομμύρια κατάγματα ετησίως, δηλαδή ένα κάταγμα κάθε 3 δευτερόλεπτα (Johnell, *et al.*, 2006), γεγονός με τεράστιο κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση ο ετήσιος αριθμός καταγμάτων αναμένεται να αυξηθεί από 3.5 εκατομμύρια το 2010 σε 4.5 εκατομμύρια το 2025, που αντιστοιχεί σε αύξηση της τάξης του 28% (Hernlund, *et al.*, 2013). Αξίζει να σημειωθεί πως τουλάχιστον σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η ανικανότητα/αναπηρία που προκαλείται από την οστεοπόρωση είναι μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλείται από τη νόσο του καρκίνου (με εξαίρεση τον καρκίνου του πνεύμονα) και είναι συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη από εκείνη που οφείλεται σε σειρά χρόνιων μη μεταδοτικών ασθενειών, όπως οι καρδιακές παθήσεις εξ' αιτίας υψηλής αρτηριακής πίεσης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το άσθμα (Johnell, *et al.*, 2006).

3.3 Είδη οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που ανάλογα με το αίτιο που την προκαλεί διαχωρίζεται σε **πρωτογενή**ς και **δευτερογενής**, ενώ ανάλογα με την εντόπισή της στο σκελετό σε εντοπισμένη και γενικευμένη.

Η **πρωτογενής οστεοπόρωση** πλήττει και τα δύο φύλλα σε όλες τις ηλικίες, αλλά εμφανίζεται συχνότερα μετά την εμμηνόπαυση στις γυναίκες. Διαχωρίζεται σε μετεμμηνοπαυσιακή (τύπου Ι) και γεροντική οστεοπόρωση (τύπου ΙΙ). Στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση η οστική απώλεια παρατηρείται κυρίως στο δοκιδώδες οστό, ενώ οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις είναι τα σπονδυλικά κατάγματα και τα κατάγματα του κάτω πέρατος της κερκίδας. Το κύριο παθολογικό αίτιο στην περίπτωση αυτή είναι η ανεπάρκεια οιστρογόνων. Στην γεροντική οστεοπόρωση, παρατηρείται απώλεια του φλοιώδους και δοκιδώδους οστού

και κλινικά χαρακτηρίζεται από κατάγματα στο ισχίο, στον κεντρικό βραχίονα και τη σπονδυλική στήλη. Εμφανίζεται και στα δύο φύλα, ενώ εμφανίζει υψηλότερη αναλογία ανδρών-γυναικών. Στην περίπτωση αυτή ευθύνεται η ανεπάρκεια βιταμίνης D, λόγω της μειωμένης σύνθεσης της 1,25-διυδρόξυβιταμίνης D, με επακόλουθο την εκδήλωση δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού (Riggs, 1983), ενώ συσχετίζεται και με την ελαττωμένη πρόσληψη ασβεστίου.

Η **δευτερογενής οστεοπόρωση**, συνήθως είναι απόρροια ύπαρξης κάποιων ασθενειών ή φαρμακευτικής αγωγής που παρεμποδίζουν την επίτευξη της μέγιστης οστικής μάζας και μπορεί να προκαλέσουν την απώλειά της. Ανάμεσα στις ασθένειες που ενοχοποιούνται για την εκδήλωση δευτερογενούς οστεοπόρωσης είναι γενετικές διαταραχές (ατελής οστεογένεση, σύνδρομο Turner, σύνδρομο Klienefelter, δρεπανοκυτταρική αναιμία κ.α.), ρευματοειδή και αυτοάνοσα νοσήματα (αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα), ενδοκρινολογικές και αιματολογικές διαταραχές (σύνδρομο Gushing, υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός, σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι, αιμοφιλία, θαλασσαιμία), καθώς και καταστάσεις υπογοναδισμού. Εξ' ίσου ενοχοποιητικοί παράγοντες είναι και οι διατροφικές ελλείψεις, η νευρογενής ανορεξία, το κάπνισμα και η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Η πιο κοινή μορφή οστεοπόρωσης που οφείλεται σε φαρμακευτική χορήγηση είναι αυτή που επάγεται έπειτα από χορήγηση γλυκορτικοειδών. Τα γλυκορτικοειδή χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία κυρίως φλεγμονωδών καταστάσεων (ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα, χρόνια πνευμονοπάθεια), προκαλούν σημαντική μείωση στο σχηματισμό των οστών και ως ένα βαθμό αυξάνουν την οστική απορρόφηση (Saag, 2003) οδηγώντας σε λέπτυνση του σπογγώδους οστού στη σπονδυλική στήλη και στο γοφό, κυρίως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και στους ηλικιωμένους άνδρες. Η χορήγηση επίσης κυκλοσπορίνης Α, αντιεπιληπτικών φαρμάκων καθώς και η υπερβολική πρόσληψη βιταμίνης Α μπορεί να συνδέονταιμε την εμφάνιση δευτερογενούς οστεοπόρωσης (Χατζηπαύλου, 2006) (Office of the Surgeon, 2004).

3.4 Αιτιολογία οστεοπόρωσης

Στα πρώτα στάδια της ζωής στην εφηβεία και στα πρώτα χρόνια της ενηλικίωσης η οστική μάζα αυξάνεται συνεχώς. Κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής παρατηρείται η μέγιστη οστική πυκνότητα και ακολουθείται από μια περίοδο σχετικής σταθερότητας έως ότου ξεκινήσει η οστική απώλεια λόγω ηλικίας κατά την τέταρτη ή πέμπτη δεκαετία της ζωής. Τέλος, σημειώνεται επιτάχυνση της οστικής απώλειας 5-10 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση στις γυναίκες.

Η μέγιστη οστική πυκνότητα είναι καθοριστικός παράγοντας της αντοχής των οστών (Hayes, 1985) και είναι αντιστρόφως ανάλογη του κινδύνου κατάγματος (Jenseng, *et al.*, 1983) αναδεικνύοντας έτσι τη σπουδαιότητά της για την εμφάνιση οστεοπόρωσης (Melton, *et al.*, 1988). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως μπορεί να επηρεαστεί από γενετικούς, μηχανικούς, διατροφικούς και ορμονικούς παράγοντες (Compston, 1990).

Οστεοπόρωση μπορεί να εμφανιστεί όταν η οστική πυκνότητα την περίοδο που φθάνει τη μέγιστη τιμή της είναι χαμηλή ή/και όταν παρατηρείται υπερβολική οστική απορρόφηση ή ακόμα και ανεπαρκής οστική αναδημιουργία στη φάση της οστικής ανακατασκευής. Έτσι, κατά την προληπτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης συνίσταται η μεγιστοποίηση της κορυφαίας οστικής μάζας και η ελαχιστοποίηση της οστικής απώλειας.

Πλήθος γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων επηρεάζουν την επίτευξη της μέγιστης οστικής πυκνότητας. Μελέτες υποστηρίζουν πως οι γενετικοί παράγοντες, όπως είναι το φύλο και η φυλή είναι υπεύθυνοι για το 75% της οστικής μάζας. Η μέγιστη οστική πυκνότητα τείνει να είναι υψηλότερη στους άνδρες απ' ότι στις γυναίκες, καθώς μετά την εφηβεία αυξάνεται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τις γυναίκες. Οι γυναίκες Αφροαμερικάνικης καταγωγής παρουσιάζουν μεγαλύτερη οστική πυκνότητα σε σχέση με τις Καυκάσιες, ενώ οι Ασιάτες συγκριτικά με του Καυκάσιους εμφανίζουν χαμηλότερη οστική μάζα.

Όπως έχει αναφερθεί τα οιστρογόνα παίζουν καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις γυναίκες που αποκτούν έμμηνο ρύση σε μικρή ηλικία συχνά να εμφανίζουν αυξημένη οστική πυκνότητα και αντιθέτως γυναίκες στις οποίες διακόπτεται η έμμηνος ρύση εξ' αιτίας έντονης άσκησης ή χαμηλού σωματικού βάρους, να χάνουν σημαντικό ποσοστό της οστικής τους πυκνότητας. Σημαντικό ρόλο παίζει και η διατροφή και συγκεκριμένα η πρόσληψη ασβεστίου που είναι απαραίτητη για την υγεία των οστών, ενώ η κατανάλωση καφέ, αλκοόλ και το κάπνισμα συνδέονται με χαμηλά επίπεδα οστικής μάζας. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η σωματική άσκηση (τρέξιμο, περπάτημα) συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας, ενώ η μηχανική φόρτιση του σκελετού μπορεί και να συνεισφέρει στην αύξησή της (NIH, 2015).

Συνεπώς, στην ανάπτυξη της οστεοπόρωσης καθοριστικό ρόλο παίζουν πολλοί παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι διακρίνονται σε αυτούς που μπορούν και αυτούς που δεν μπορούν να τροποποιηθούν. Στην κατηγορία των παραγόντων που μπορούν να τροποποιηθούν ανήκουν η χαμηλή αθλητική δραστηριότητα, η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου, το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση πρωτεϊνών, η ανεπάρκεια βιταμίνης D, το χαμηλό σωματικό βάρος και η ανεπάρκεια οιστρογόνων. Αντιθέτως, οι παράγοντες που δεν μπορούν να ελεγχθούν είναι η φυλή, το φύλο, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, το ανοιχτόχρωμο δέρμα, η σκολίωση, προηγούμενα κατάγματα και διάφορες παθήσεις. Παρόλα αυτά, η αξιολόγηση από μόνη της των παραγόντων κινδύνου δεν επαρκεί για την πρόβλεψη της οστεοπόρωσης, καθώς απαιτείται και μέτρηση της οστικής πυκνότητας.

3.5 Διάγνωση οστεοπόρωσης

Όπως εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η κλινική διάγνωση της οστεοπόρωσης βασίζεται στην μέτρηση της οστικής πυκνότητας (BMD) και στην παρουσία καταγμάτων (Kanis, *et al.*, 1994). Στα συγκεκριμένα διαγνωστικά κριτήρια, η οστική πυκνότητα

μετατρέπεται σε ένα T-score, το οποίο αντανακλά τον αριθμό των τυπικών αποκλίσεων (SD) πάνω ή κάτω από το μέσο όρο σε υγιείς νέους ενήλικες. Τα κατώτατα όρια για κάθε κατηγορία των οστών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Κριτήρια για την κλινική διάγνωση της οστεοπόρωσης

BMD T-score	Διάγνωση
T-score ≥ -	Φυσιολογικό
-1 > T-score > -2.5	Χαμηλή οστική μάζα
T-score ≤ -2.5	Οστεοπόρωση
T-score ≤ -2.5 και ύπαρξη κατάγματος	Σοβαρή οστεοπόρωση

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης μπορεί να γίνει κλινικά, με ραδιογραφικές και πυκνομετρικές μεθόδους, ενώ υπάρχει και πλήθος βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιπρόσθετο διαγνωστικό μέσο.

Η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος είναι η απορροφησιομετρία διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων- Χ (DEXA: Dual Energy X-Ray Absorptiometry). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της ενέργειας από δύο δέσμες φωτονίων διαφορετικών ενεργειών στην προς εξέταση περιοχή, που εκπέμπονται από μια πηγή ακτίνων Χ. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στο ισχίου, είναι ικανή να ανιχνεύσει αρκετά μικρά ποσοστά οστικής απώλειας, ενώ εκθέτει τους ασθενείς σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ακτινοβολίας (Lewis, *et al.*, 1994). Μετρήσεις της οστικής πυκνότητας στο ισχίο αποτελούν τον πιο αξιόπιστο δείκτη εκτίμησης κινδύνου εμφάνισης καταγμάτων του ισχίου, ενώ η σπονδυλική στήλη λόγω του σπογγώδους τμήματος των σπονδύλων όπου είναι μεταβολικά ενεργό, θεωρείται ως η καταλληλότερη περιοχή για την παρακολούθηση της απόκρισης στην ακολουθούμενη θεραπευτική αγωγή (Cummings, *et al.*, 1993.).

Στη μέθοδο της ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας (QCT: Quantitative computed tomography,) η πηγή ακτίνων Χ και ο ανιχνευτής περιστρέφονται συγχρονισμένα γύρω από το υπό εξέταση σημείο, καθώς οι ακτίνες Χ διέρχονται μέσω του σώματος. Με τη μέθοδο αυτή, σε αντίθεση με τη μέθοδο DEXA, η μέτρηση της οστικής πυκνότητας είναι ανεξάρτητη του μεγέθους των οστών και μετράται χωριστά το φλοιώδες και σπογγώδες τμήμα του οστού (Szulc). Οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας QCT έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των σπονδυλικών και μηριαίων γεωμετρικών διαφορών που σχετίζονται με το φύλο, την ηλικία και την εθνικότητα, παρέχοντας νέες εικόνες για την ανάπτυξη της ευθραυστότητας του σκελετού (Riggs, *et al.*, 2004) (Sigurdsson, *et al.*, 2006). Το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος εξοπλισμού και της καθαυτού μέτρησης.

Η Περιφερική Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (pQCT: Peripheral Quantitative Computerized Tomography) είναι τεχνική ίδιας τεχνολογίας, πιο ακριβή αλλά ευκολότερη στη χρήση, και επιτρέπει τη μέτρηση παραμέτρων των οστών του περιφερικού σκελετού. Με την τεχνική αυτή γίνονται μετρήσεις στα άκρα του σκελετού, όπως στον πήχη. Παρέχει χαμηλότερη ακτινοβολία, ενώ επιτρέπει τον υπολογισμό του όγκου των οστών. Επιπλέον, με

τη χρήση pQCT, οι παράμετροι του δοκιδωτού και του φλοιώδους οστού μπορούν να αναλυθούν χωριστά, επιτρέποντας έτσι την εξέταση της κατανομής των οστών, της αρχιτεκτονικής και της γεωμετρίας σε περιοχές του οστού επιρρεπείς σε κατάγματα (Stagi, *et al.*, 2016).

Η Ποσοτική Οστική Υπερηχομετρία (QUS: Quantitative UltraSound) αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο για την αξιολόγηση της σκελετικής ακεραιότητας, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας της φτέρνας, της επιγονατίδας, της κνήμης και των δακτύλων (Genant, *et al.*, 1996) (Kaufman, *et al.*, 1993). Η μέτρηση της οστικής μάζας αξιολογείται από δύο βασικές παραμέτρους μετάδοσης, την ταχύτητα του ήχου και την εξασθένηση ευρυζωνικών υπερηχογραφημάτων (Krieg, *et al.*, 2008). Η φτέρνα είναι πολύ ευαίσθητη σε διαταραχές του κύκλου εργασιών των οστών, καθώς περιέχει κατά 90% σπογγώδες οστό, που είναι μεταβολικά πολύ ενεργό. Η μέθοδος μέτρησης QUS υποστηρίζεται πως αντανακλά όχι μόνο την ποσότητα των οστών, αλλά και την μικροαρχιτεκτονική του δοκιδώδους οστού, καθώς και ιδιότητες του οστού, όπως η ελαστικότητα και η ακαμψία. Ωστόσο, λίγα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τον ισχυρισμό αυτό (Nicholson, *et al.*, 2001). Η μέθοδος QUS δεν έχει αποδειχθεί τόσο ακριβής συγκριτικά με τη DEXA, ως προς την ανίχνευση χαμηλής οστικής μάζας στο γοφό και στη σπονδυλική στήλη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω και το γεγονός ότι εμφανίζει χαμηλή επαναληψιμότητα, θα ήταν καλύτερα η συγκεκριμένη τεχνική να χρησιμοποιείται σαν εργαλείο ελέγχου ομάδων πληθυσμού για την οστεοπόρωση (Njeh, *et al.*, 1997; Cheng, *et al.*, 1997).

Στις υπόλοιπες διαγνωστικές μεθόδους συγκαταλέγονται η απεικόνιση Μαγνητικού συντονισμού (MR: Magnetic Resonance) που προσφέρει μια μη ιονίζουσα μέθοδο για την αξιολόγηση της μικροαρχιτεκτονικής των οστών και η Μικροϋπολογιστική Τομογραφία (μCT: micro-Computerized Tomography). Με τις παραπάνω τεχνικές απεικονίζεται η πραγματική μορφολογία του οστού, μέσω ψηφιακής εικόνας ως ένα μέτρο εκτίμησης της ποιότητας του οστού (Damilakis, *et al.*, 2007).

Εκτός από τις απεικονιστικές μεθόδους αξιολόγησης της κατάστασης του οστού, υπάρχουν και οι βιοχημικές εξετάσεις δεικτών που αντανακλούν τον οστικό μεταβολισμό, αλλά δεν μπορούν να θεωρηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία (Riggs, 2000). Οι δείκτες αυτοί μπορεί να είναι παράγωγα των οστεοβλαστών ή των οστεοκλαστών ή προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου. Οι δείκτες οστικής απορρόφησης θεωρούνται πιο ευαίσθητοι από τους δείκτες οστικής παραγωγής, αφού μπορούν να εντοπίσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια μεταβολές στον οστικό μεταβολισμό μόλις 3 με 6 μήνες μετά τη έναρξη της θεραπείας, ενώ οι δείκτες οστεοπαραγωγής απαιτούν τουλάχιστον διπλάσιο χρόνο αντίδρασης (Delmas, *et al.*, 2000)

Οι βιοχημικοί δείκτες οστικής παραγωγής περιλαμβάνουν την οστική αλκαλική φωσφατάση (BAP: Bone-specific alkaline phosphatase), την οστεοκαλσίνη και τα πεπτίδια προ-κολλαγόνου. Οι δείκτες οστικής απορρόφησης αναφέρονται κυρίως στα προϊόντα που

παράγονται από τη συστηματική αποδόμηση του οστού. Το κολλαγόνο σταθεροποιείται με τη δημιουργία μορίων διασύνδεσης, όπως είναι η πυριδινολίνη (PYD: pyridinoline) και η δεοξυπυριδινολίνη (DPD: Deoxypyridinoline), τα οποία αποδεσμέυονται στα ούρα και στο αίμα με την αποικοδόμηση του κολλαγόνου. επίσης, δείκτες οστικής καταστροφής είναι το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου Ι, η υδροξυπρολίνη (OHP: hydroxyproline) καθώς και τα ένζυμα όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό και καθεψίνη K (Swamminathan, 2001) (Fink, *et al.*, 2000).

3.6 Πρόληψη - Θεραπεία οστεοπόρωσης

Ανάμεσα στα θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης συμπεριλαμβάνονται και κάποιες μη φαρμακευτικές πρακτικές προληπτικού χαρακτήρα με σκοπό τη διατήρηση και την αύξηση της οστικής μάζας, καθώς και την πρόληψη των καταγμάτων. Στο πλαίσιο αυτό, προτείνεται η εφαρμογή μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής με επαρκή ημερήσια διαιτητική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D. Σημειώνεται πως ημερήσια πρόσληψη 1200mg ασβεστίου (συνιστώμενη πρόσληψη 1500mg στην εμμηνοπαυσιακή ηλικία), 400-600 IU/d βιταμίνης D και 1 g πρωτεΐνης / kg σωματικού βάρους συνιστώνται για τη διατήρηση της μυοσκελετικής υγείας και τη μείωση εμφάνισης κινδύνου κατάγματος σε ασθενείς με οστεοπόρωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χορηγηθούν και συμπληρώματα ασβεστίου, τα οποία μειώνουν το ρυθμό οστικής απώλειας, βιταμίνη D, καθώς και φθοριούχα συμπληρώματα. Το φθοριούχο νάτριο φαίνεται να δρα μέσω αύξησης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας, αν και μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δίνουν αποτελέσματα αντικρουόμενα μεταξύ τους. Κατά την χορήγηση φθοριούχων φαίνεται να παρέχεται κάποια οστεοπροστασία, όμως η αύξηση της οστικής μάζας δεν συμπορεύεται σε όλες τις περιπτώσεις και με αύξηση της αντοχής των οστών (Briancon, *et al.*, 1981) (Pak, *et al.*, 1994). Εξίσου σημαντική είναι και η καθημερινή σωματική άσκηση, η αποφυγή υπερκατανάλωσης αλκοόλ και η διακοπή του καπνίσματος.

Οι φαρμακευτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της οστεοπόρωσης, όπως είναι αναμενόμενο, επιδρούν στη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής. Οι θεραπευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: εκείνους που αναστέλλουν την οστική απορρόφηση (αντιαπορροφητικούς) και εκείνους που ενισχύουν την οστική δημιουργία (αναβολικούς).

- **Οιστρογόνα – Θεραπεία οιστρογονικής υποκατάστασης**

Η χορήγηση οιστρογόνων αποτελεί θεραπεία που δρα μέσω αναστολής της οστικής απορρόφησης, ελαττώνοντας έτσι το ρυθμό της οστικής απώλειας, ενώ ανακουφίζει από τα δυσάρεστα συμπτώματα της εμμηνοπαυσιακού συνδρόμου και ασκεί ευεργετική επίδραση και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Παρ' όλα τα ευεργετικά αποτελέσματα, τα τελευταία χρόνια δεν αποτελεί την πρώτη επιλογή για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, καθώς έχει

ενοχοποιηθεί για αύξηση κινδύνου εμφάνισης ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων (Chlebowski, *et al.*, 2010) καθώς και πνευμονικής εμβολής. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως μια προσεκτική και εξατομικευμένη θεραπεία μπορεί να μειώσει σημαντική τον κίνδυνο.

❖ **SERM's**

Πρόκειται για μια σχετικά νέα ομάδα ουσιών, τους εκλεκτικούς τροποποιητές των υποδοχέων οιστρογόνων, που επιδρούν στην οστική απορρόφηση με κυριότερους εκπροσώπους την ταμοξιφαίνη και τη ραλοξιφαίνη. Η ραλοξιφαίνη χρησιμοποιείται κυρίως ως αντιοστεοπορωτικό φάρμακο (Evista®), τελευταία χορηγείται όλο και περισσότερο ως προληπτική αγωγή ενάντια στον καρκίνο του μαστού, ενώ βάση μελετών φαίνεται να προφυλάσσει και από την εκδήλωση στεφανιαίας νόσου (Barrett-Connor, *et al.*, 2006) (Delmas, *et al.*, 1997). Η ταμοξιφαίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Fisher, *et al.*, 1998), ενώ παρουσιάζει και ευεργετικές επιδράσεις στην οστική πυκνότητα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Ramaswamy, *et al.*, 2003).

❖ **Διφωσφονικά**

Τα διφωσφονικά φάρμακα δρουν επίσης μέσω αναστολής της δράσης των οστεοκλαστών, ενώ αποτελούν πρώτη θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπισης της οστεοπόρωσης από κορτικοειδή, καθώς αυξάνουν την οστική μάζα σε όλες τις περιοχές, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καταγμάτων. Τα διφωσφονικά εναποτίθενται στο σκελετό για μεγάλο χρονικό διάστημα διατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη δραστικότητά τους ακόμα και μετά το τέλος της θεραπείας. Επιδρούν στους οστεοκλάστες μειώνοντας την ενεργότητά τους, αυξάνοντας την απόπτωσή τους και αναστέλλοντας τις κυτταρικές λειτουργίες τους (Jobke, *et al.*, 2014). Κυριότεροι εκπρόσωποι είναι η αλενδρονάτη, η ετιδρονάτη, η παμιδρονάτη, η ρισεδρονάτη και το ζολενδρονικό οξύ (Russell, *et al.*, 2008) (Drake, *et al.*, 2008). Σημειώνεται πως η χρήση των διφωσφονικών έχει συνδεθεί με οστεονέκρωση των γνάθων (Ruggiero, 2004). Φαρμακευτική αντιμετώπιση με χορήγηση αλεδρονάτης (Fosamax®) ελαττώνει τον κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων κατά 50%, αλλά συνοδεύεται από παρενέργειες, όπως οισοφαγίτιδα και έλκη του πεπτικού (Black, *et al.*, 2000). Χορήγηση ριζεδρονάτης (Actonel®), προκαλεί ανάλογα αποτελέσματα, χωρίς όμως την εκδήλωση τόσο έντονων παρενεργειών (Mellstrom, *et al.*, 2004).

❖ **Καλσιτονίνη**

Η καλσιτονίνη μειώνει τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα και παρεμποδίζει την οστική απορρόφηση, κυρίως αναστέλλοντας τη δράση των οστεοκλαστών, μέσω πρόσδεσής της στην επιφάνειά τους. Μελέτες υποστηρίζουν πως ενδορρινικός ψεκασμός 200IU καλσιτονίνης σολωμού κάθε μέρα μειώνει κατά 36% τον κίνδυνο καταγμάτων που οφείλονται σε μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Συνίσταται για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που βρίσκονται ήδη 5 χρόνια στη φάση της εμμηνόπαυσης και δεν ανέχονται τη θεραπεία με διφωσφονικά, ενώ μελέτες υποστηρίζουν πως μπορεί να χορηγηθεί και για αύξηση της οστικής μάζας σε γυναίκες με χαμηλό δείκτη οστικής μάζας (Binkley, *et al.*, 2014). Έχει συνδυαστεί με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ενώ παρατεταμένη χρήση της λόγω ανοχής μπορεί να επιφέρει ελάττωση της θεραπευτικής της δράσης (Chesnut, *et al.*, 2000) (Prestwood, *et al.*, 1995).

❖ **Δενοσουμάμπη**

Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του RANKL (Denosumab, Prolia®), που έχει εγκριθεί σχετικά πρόσφατα από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Η δενοσουμάμπη προσκολλάται στην κυτταροκίνη RANKL, παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση του υποδοχέα της στην επιφάνεια των οστεοκλαστών. Αυτό οδηγεί στην αναστολή του σχηματισμού, της λειτουργίας και της επιβίωσης των οστεοκλαστών και συνεπώς της οστικής απορρόφησης. Μάλιστα, σε σύγκριση με τα διφωσφονικά που αναστέλλουν τη δράση των ώριμων οστεοκλαστών, η δενοσουμάμπη ουσιαστικά καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση (Lewiecki, 2010) (Gerstenfeld, *et al.*, 2009). Χορηγείται υποδόρια για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε άνδρες που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του προστάτη, ενώ έχει παρατηρηθεί μόνο πόνος στα άνω και κάτω άκρα, κυτταρίτιδα και υπασβεστιαιμία κατά την χορήγησή της (Cummings, *et al.*, 2009) (Smith, *et al.*, 2009).

❖ **Παραθορμόνη**

Η συγκεκριμένη αντιμετώπιση συγκαταλέγεται στις αναβολικές θεραπείες του οστού, ικανή να διεγείρει την οστεοβλαστική δραστηριότητα. Μελέτη έχει ανέδειξε πως η χορήγηση ενός ανασυνδυασμένου παραγώγου της παραθορμόνης PTH(1-34) ή αλλιώς τεριπαρατίδη (Forsteo®), με καθημερινή ένεση για 2-3 χρόνια επέφερε αύξηση της οστικής πυκνότητας κατά 15%, ενώ ελάττωσε τον κίνδυνο σπονδυλικού κατάγματος κατά 69% και μη σπονδυλικού κατά 54% (Bilezikian, *et al.*, 2005) (Rubin, *et al.*, 2005). Η θεραπεία με τεριπαρατίδη ενδείκνυται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ είναι σημαντικό, μετά το τέλος της θεραπείας, να χορηγηθεί ένα αντιαπορροφητικό φάρμακο, με σκοπό την αποφυγή της απώλειας οστικής μάζας που αποκτήθηκε κατά τη θεραπεία (Suzuki, *et al.*, 2008). Επίσης, διερευνάται το παράγωγο PTH(1-84) για την αναβολική του επίδραση στα οστά (Grimaldi, *et al.*, 2012).

❖ **Ρανελικό στρόντιο**

Θεωρείται ιδανικό για την αντιμετώπιση της εγκατεστημένης οστεοπόρωσης και συγκαταλέγεται επίσης στις αναβολικές θεραπείες, ενώ φαίνεται να δρα και αντιαπορροφητικά, στοχεύοντας στην αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών και στην απόπτωσή τους. Η αναβολική του δράση είναι πιο αμφιλεγόμενη, ενώ πιστεύεται ότι δρα μέσω ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της ενεργοποίησης των προ-οστεοβλαστών (Habermann, *et al.*, 2010). Καθώς αποτελείται από δύο άτομα στροντίου συζευγμένα με το ρανελικό οξύ, έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στα οστά και να αντικαθιστά άτομα ασβεστίου με στρόντιο, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της BMD (Sibai, *et al.*, 2011). Βελτιώνει επίσης την ποιότητα των οστών, αυξάνοντας τον ρυθμό εναπόθεσης των αλάτων, βελτιώνοντας την μικροαρχιτεκτονική του δοκιδώδους οστού και ενισχύοντας το πάχος του φλοιώδους (Arlot, *et al.*, 2008). Πλήθος κλινικών δοκιμών επιβεβαιώνει τα ευεργετικά του αποτελέσματα, ενώ συνήθως τους 3 πρώτους μήνες της χορήγησής του προκαλεί διάρροια ως ανεπιθύμητη ενέργεια. Αν και εγκρίθηκε στην Ευρώπη από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), το ρανελικό στρόντιο δεν υποβλήθηκε ποτέ για έγκριση στην Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων στις ΗΠΑ (FDA) για τη θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης (Hegde, *et al.*, 2016).

Νεότερα αντιαπορροφητικά φάρμακα βρίσκονται υπό έρευνα, όπως αναστολείς της καθεψίνης K (πρωτεάση που αποικοδομεί το κολλαγόνο των οστών) και ανάλογα της οστεοπροτεγερίνης (Drake, *et al.*, 2017). Οι στατίνες, που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της υπερχοληστεριναιμίας, αποδείχθηκε ότι ασκούν και αναβολική επίδραση στα οστά και ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης (Wang, *et al.*, 2016).

4 Υπέρχρωση του δέρματος

Τα προβλήματα υπέρχρωσης του δέρματος πλήττουν ένα ευρύ φάσμα του πληθυσμού και τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνουν ολοένα και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον (Ortonne, *et al.*, 2008). Κύρια αιτία είναι η υπερπαραγωγή της μελανίνης και η ανώμαλη συσσώρευσή της στο δέρμα, που μπορεί να οδηγήσει σε αισθητικά προβλήματα και δερματικές διαταραχές όπως το μελάνωμα, το φλεγμονώδες μελανόδερμα, οι φακίδες, οι πανάδες και οι κηλίδες του γήρατος (Ahn, *et al.*, 2006) (Iozumi, *et al.*, 1993) (Li, *et al.*, 2003) (Unver, *et al.*, 2006). Κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης μάλιστα, η εμφάνιση καφέχρωων κηλίδων αποτελεί μια από τις πιο κοινές επιπτώσεις στο δέρμα των γυναικών που οφείλεται στην μείωση των οιστρογόνων (Natale, *et al.*, 2016).

Η διερεύνηση της επίδρασης των οιστρογόνων στη μελανογένεση ξεκίνησε έπειτα από την παρατήρηση πως άτομα με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων (όπως σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης, ή χορήγησης αντισυληπτικών χαπιών) συχνά παρουσίαζαν υπέρχρωση του δέρματος σε περιοχές των γεννητικών οργάνων, της κοιλιακής χώρας, των μαστικών αδένων και του προσώπου (Beas, *et al.*, 1969). Μετέπειτα μελέτες επιβεβαίωσαν την επίδρασή τους στη μελανογένεση και στο σχηματισμό των μελανοκυττάρων (McLeod, *et al.*, 1994)(Maeda, *et al.*, 1996) (Poletini, *et al.*, 2016). Η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη φάνηκε πως ρυθμίζουν αμοιβαία τη σύνθεση μελανίνης, ενώ ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, καθώς υποστηρίζεται πως δρουν είτε ενεργοποιώντας μια συγκεκριμένη ομάδα πρωτεϊνών (Natale, *et al.*, 2016), είτε μέσω πρόσδεσής τους στους οιστρογονοϋποδοχείς που εντοπίζονται στην επιφάνεια των μελανοκυττάρων (Im, *et al.*, 2002). Επομένως, οι ορμονικές διαταραχές που σημειώνονται την περίοδο της εμμηνόπαυσης διαταράσσουν την παραγωγή μελανίνης ευνοώντας το σχηματισμό καφέ κηλίδων (Skoczyńska, *et al.*, 2017).

Η μελανίνη, παίζει πρωταρχικό ρόλο στην προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Brenner, *et al.*, 2008). Επίσης, η παραγωγή της μελανίνης καθορίζει το χρώμα του δέρματος, καθώς και διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα μαλλιών και ματιών.

Η μελανίνη συντίθεται στα μελανοκύτταρα ως απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία Β (UVB), μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται μελανογένεση (Bonaventure, *et al.*, 2013). Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα μελανοβλαστών, που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία κατά την εμβρυογένεση και διανέμονται ανάλογα κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Lei, *et al.*, 2002) (Sviderskaya, *et al.*, 2001). Τα μεταναστευτικά μονοπάτια που ακολουθούν τα μελανοκύτταρα είναι υπό αυστηρό γενετικό έλεγχο και οδηγούν σε πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα, εάν η τελική τους κατανομή στο δέρμα δεν είναι ομοιόμορφη. Τα χαρακτηριστικά μοτίβα του δέρματος των ζεβρών, των καμηλοπαρδάλων και των ζώων που

φέρουν στο δέρμα τους χρωματισμένα σημεία γενικότερα, είναι αποτέλεσμα της άνισης κατανομής των μελανοκυττάρων (Hearing, 1991). Κάθε μελανοκύτταρο περιβάλλεται περίπου από 36 κερατινοκύτταρα σε αναλογία 1:36 στην επιδερμίδα (Costin, *et al.*, 2007). Μελανοκύτταρα επίσης έχουν εντοπιστεί και σε άλλους ιστούς, όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο καρδιαγγειακό σύστημα, στο πρόσθιο τμήμα της ίριδας του ματιού, στον κοχλία, ακόμη και στο λιπώδη ιστό (Bastian, 2014) (Plonka, et al., 2009). Κατά την παραγωγή της η μελανίνη αποθηκεύεται στο εσωτερικό των μελανοκυττάρων, σε εξειδικευμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια τα μελανοσώματα (Seiberg, 2001) (Ito, *et al.*, 2008). Μετά την ολοκλήρωση της μελανοσύνθεσης, τα ώριμα πια μελανοσώματα γίνονται φορείς που μεταφέρονται από διάφορους μοριακούς κινητήρες (Coudrier, 2007) (X. Wu, 2000), μέσω δενδριτών στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας.

Όπως προαναφέρθηκε, διαταραχές κατά την παραγωγή της μελανίνης προκαλούν δερματικά προβλήματα, ενώ η συνεχής έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, γονιδιακή μετάλλαξη, ανάπτυξη καρκίνου και εξασθένιση του ανοσοποιητικού συστήματος ή φωτογήρανση. Επιπλέον, έρευνες υποδηλώνουν ότι διαταραχές κατά τη μελανογένεση σε αρκετές περιπτώσεις συνδέονται με την εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νόσων του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington (Cavalieri, *et al.*, 2002) (Hasegawa, 2010) (Tessari, *et al.*, 2008) (Greggio, *et al.*, 2005). Ως εκ τούτου, η ρύθμιση της μελανογένεσης είναι καθοριστική για τη θεραπεία πλήθους διαταραχών. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμοι αντιμελανογενείς παράγοντες που στοχεύουν στη δραστικότητα ή/και στη σταθερότητα της τυροσινάσης, στην ωρίμανση, στη μεταφορά και τη διακίνηση των μελανοσωμάτων ή σε μονοπάτια σηματοδότησης σχετικά με τη μελανογένεση.

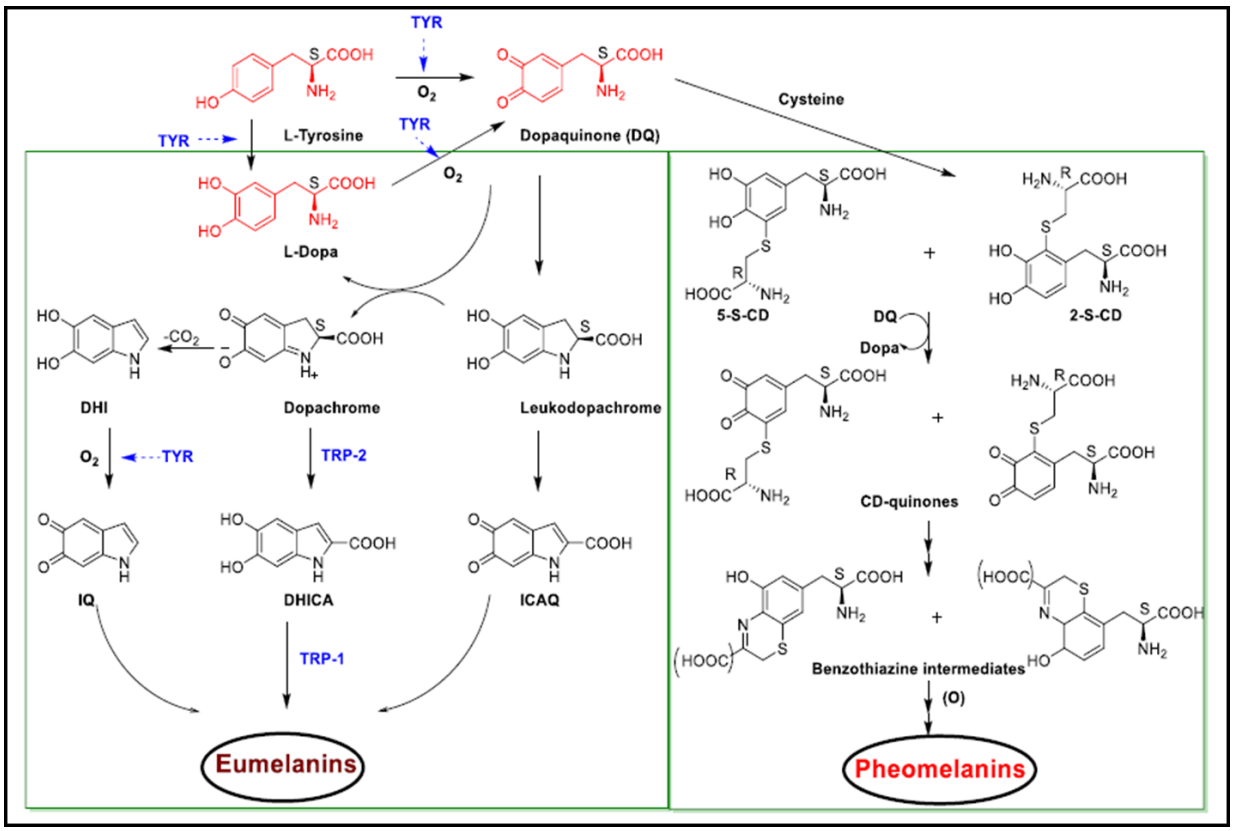
4.1 Μελανογένεση

Τα μελανοσώματα, τα οποία εντοπίζονται στα μελανοκύτταρα, παράγουν δύο τύπους μελανίνης: την ευμελανίνη - eumelanin (μαύρο ή σκούρο αδιάλυτο πολυμερές), η οποία απαντάται στο σκούρο δέρμα και στα σκούρα μαλλιά και την φαιομελανίνη - pheomelanin (ερυθροκίτρινο διαλυτό πολυμερές), η οποία σχετίζεται με τα κόκκινα μαλλιά σε συνδυασμό με την ύπαρξη φακίδων στο δέρμα.

Η βιοσύνθεση της μελανογένεσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει συνδυασμό ενζυματικών και χημικών αντιδράσεων, ενώ οι πρώτοι που την περιέγραψαν ήταν οι Raper και Masson (Raper, 1928) (Masson, 1948). Τρία ένζυμα (TYR: Tyrosine, TRP-1: Human tyrosinase related protein-1, TRP-2: Human tyrosinase related protein-1) εμπλέκονται κυρίως στη διαδικασία της μελανογένεσης, με την τυροσινάση να κατέχει πρωτεύοντα ρόλο.

Η σύνθεση μελανίνης αρχίζει με την οξείδωση της L-τυροσίνης σε ντοπακινόνη (DQ: Dopaquinone) ή / και σε L-διϋδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine) και σε επόμενο στάδιο σε ντοπακινόνη. Η DQ που προκύπτει, αποτελεί υπόστρωμα τόσο για τη

σύνθεση της ευμελανίνης (eumelanin), όσο και της φαιομελανίνης (pheomelanin). Μετά το σχηματισμό της, η ντοπακινόνη υφίσταται ενδομοριακή κυκλοποίηση προς "λευκοντοπαχρώμ" (leukodopachrome - cyclodopa). Η οξειδοαναγωγική ανταλλαγή μεταξύ του "λευκοντοπαχρώμ" και της ντοπακινόνης οδηγεί στη συνέχεια σε ντοπαχρώμ (dopachrom) και σε διϋδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA), η οποία αποτελεί επίσης υπόστρωμα του ενζύμου τυροσινάσης και οξειδώνεται ξανά σε ντοπακινόνη (DQ) από το ένζυμο. Το ντοπαχρώμ σταδιακά αποσυντίθεται προς διυδροξυϊνδόλη (DHI) και 5,6-διυδροξυϊνδολο-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA). Αυτή η διαδικασία καταλύεται από το ένζυμο TRP-2 (γνωστή και ως DCT: Dopachrome tautomerase). Τέλος, αυτές οι διυδροξυινδόλες (DHI και DHICA) οξειδώνονται προς την ευμελανίνη. Το ένζυμο TRP-1 πιστεύεται πως καταλύει την οξείδωση της DHICA σε ευμελανίνη. Παράλληλα, η DQ μετατρέπεται σε 5-S-κυστεϊνυλο-ντόπα ή γλουθοθειονυλο-ντόπα παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης. Επακόλουθη οξείδωση δίνει ενδιάμεσα παράγωγα βενζοθειαζίνης, όπου τελικά παράγεται η φαιομελανίνη (Ito, 2003) (Pillaiyar (a), *et al.*, 2017) (Pillaiyar (b), *et al.*, 2015).



Σχήμα 1 Βιοσυνθετικό μονοπάτι μελανογένεσης (Tyr: tyrosinase, DQ: dopaquinone; L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylic acid, DHI: 5,6-dihydroxyindole, ICAQ, indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone, IQ: indole-5,6-quinone, HBTA: 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine)(Pillaiyar, et al., 2017).

Αν και η μελανογένεση είναι σημαντική για την προστασία του ανθρώπινου δέρματος, όπως προαναφέραμε, η ανώμαλη συσσώρευσή της μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές δερματικές διαταραχές με αποτέλεσμα πολλές ερευνητικές προσπάθειες να επικεντρώνονται στην ανεύρεση αντιμελανογενετικών παραγόντων (λευκαντικών παραγόντων). Συναντώνται ποικίλοι τύποι αναστολέων της μελανογένεσης, δεδομένου ότι η ρύθμισή της είναι μια

ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία, η οποία ελέγχεται από μια ποικιλία παραγόντων. Αρχικά, μπορεί να ελεγχθεί γονιδιακά, καθώς τουλάχιστον 25 γονίδια εμπλέκονται είτε στη διαδικασία παραγωγής μελανίνης, είτε στη λειτουργία των μελανοσωμάτων. επίσης, μπορεί να ελεγχθεί σε κυτταρικό επίπεδο μέσω του σχηματισμού των μελανοσωμάτων και τέλος ενζυμικά, καθώς η γονιδιακή έκφραση για την παραγωγή μελανίνης κωδικοποιείται από μελανογόνα ένζυμα (TYR, TRP-1 και TRP-2), με την τυροσινάση να αποτελεί τον πιο κοινό στόχο στην ανεύρεση λευκαντικών παραγόντων (Pillaiyar, *et al.*, 2017).

4.2 Ο ρόλος της τυροσινάσης στη μελανογένεση

Το ένζυμο της τυροσινάσης είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων, των ανώτερων φυτών (με ιδιαίτερα υψηλές ποσότητες στα μανιτάρια, τις μπανάνες, τα μήλα) και των ζώων (Mayer, 2006).

Πρόκειται για μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη τύπου-3, η οποία περιέχει χαλκό και εντοπίζεται στην μεμβράνη των μελανωσωμάτων (Sanchez-Ferrer, *et al.*, 1995). Η τυροσινάση παράγεται μόνο από μελανοκύτταρα και μετά τη σύνθεσή της και την επακόλουθη επεξεργασία της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο Golgi, μεταφέρεται στα μελανοσώματα, όπου παράγεται η μελανίνη (Matoba, *et al.*, 2006).

Από δομικής πλευράς, το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης αποτελείται από ένα διπυρηνικό σύμπλεγμα χαλκού στο οποίο το κάθε άτομο χαλκού περιβάλλεται από τρεις ιστιδίνες και είναι υπεύθυνο για την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα του χαλκού συμμετέχουν:

α) στην υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (στην υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-DOPA) και

β) στην οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (οξείδωση της L-DOPA σε DQ) προάγοντας την μελανογένεση (Decker, *et al.*, 2000) (Jiménez-Atiénzar, *et al.*, 2005) (βλ.§4.1).

Η τυροσινάση καταλύει επίσης τη διαδικασία παραγωγής νευρομελανίνης, κατά την οποία η οξείδωση της ντοπαμίνης παράγει ντοπακινόνες. Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ντοπακινών έχει ως αποτέλεσμα νευρικές βλάβες και κυτταρικό θάνατο. Αυτό συνδέει την τυροσινάση με πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως οι νόσοι του Parkinson και του Huntington (Greggio, *et al.*, 2005) (Hasegawa, 2010) (Tessari, *et al.*, 2008).

Η τυροσινάση συνδέεται επίσης και με την οξειδωτική αμαύρωση των φρούτων και λαχανικών στη φάση αμέσως μετά τη συγκομιδή (Friedman, 1996). Η ενζυματική αμαύρωση λαμβάνει χώρα παρουσία οξυγόνου όταν η τυροσινάση και τα πολυφαινολικά υποστρώματά της αναμειγνύονται μετά το βούρτσισμα, το ξεφλούδισμα και τη σύνθλιψη, που οδηγούν σε ρήξη της κυτταρικής δομής (Hurrel, *et al.*, 1984.) Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της βιομηχανίας τροφίμων ειδικότερα για τα φρούτα, τα λαχανικά και τα θαλασσινά προϊόντα. Για την αποφυγή του προαναφερόμενου προβλήματος έχει αναγνωριστεί

η χρήση προσθετικών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των αναγωγικών παραγόντων και των αναστολέων ενζύμων.

Με γνώμονα λοιπόν την ιδιαίτερα πλούσια βιολογικά εφαρμοζόμενη ισχύ τους, οι αναστολείς αλλά και οι ενεργοποιητές του ενζύμου της τυροσινάσης έχουν γίνει ολοένα και πιο σημαντικοί στη γεωργία, τη βιομηχανία τροφίμων και κυρίως στη χρήση τους σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα.

4.3 Αναστολείς τυροσινάσης

Οι διαταραχές από την υπερπαραγωγή και συσσώρευση της μελανίνης οδηγούν στην ανάγκη εύρεσης πιθανών παραγόντων που θα δρουν ως αναστολείς στη λειτουργία του ενζύμου της τυροσινάσης. Σημειώνεται μάλιστα πως η πλειοψηφία των λευκαντικών παραγόντων που συναντώνται δρουν μέσω αναστολής του συγκεκριμένου ενζύμου, ενώ με βάση το είδος αναστολής που προκαλούν κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες:

1. *Ανταγωνιστικούς αναστολείς (competitive inhibitors).* Είναι ουσίες που συνδέονται με το ελεύθερο ένζυμο με τέτοιο τρόπο που εμποδίζουν την ένωση του ενζύμου με τον υπόστρωμα.

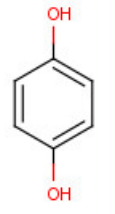
2. *Συναγωνιστικούς αναστολείς (uncompetitive inhibitors).* Είναι ουσίες που συνδέονται με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος είτε μέσω υποστρώματος, είτε απ' ευθείας με το ένζυμο.

3. *Μικτούς αναστολείς (competitive/uncompetitive inhibitors).* Είναι ουσίες που συνδέονται είτε με το ελεύθερο ένζυμο, είτε με το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος και ο αναστολέας δεν επιδρά μόνο στο ένζυμο αλλά και στο υπόστρωμα.

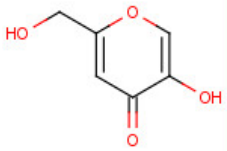
4. *Μη ανταγωνιστικούς αναστολείς (non competitive inhibitors).* Είναι ουσίες που δεν επηρεάζουν την τάση σύνδεση ενζύμου υποστρώματος, αλλά απενεργοποιούν μέρος του ενζύμου ή ολόκληρο το ένζυμο για κάποιο χρονικό διάστημα.

Η υδροκινόνη είναι γνωστός αναστολέας της τυροσινάσης, αλλά παρ' όλα αυτά η χρήση της για την παρασκευή καλλυντικών έχει απαγορευθεί στην Ευρώπη, καθώς τα προϊόντα οξείδωσής της πιστεύεται ότι προκαλούν οξειδωτική βλάβη στις μεμβράνες των λιπιδίων και στις πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης και της τυροσινάσης και επιπλέον μειώνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (Bolognia, 1995) (Briganti, 2003). Συγκριτικά με την υδροκινόνη, η αρβουτίνη ο αντίστοιχος 4-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της που απαντάται στη φύση, χρησιμοποιείται στην παραγωγή καλλυντικών, καθώς όπως είναι γνωστό εκδηλώνει λευκαντική δράση σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (Sugai, 1992) (Chakraborty, 1998). Το γκεντισικό οξύ και ο μεθυλεστέρας του, ένα φυσικό προϊόν που έχει απομονωθεί από τις ρίζες ειδών του γένους

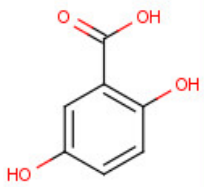
Gentiana, έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει τη σύνθεση της μελανίνης στα μελανοκύτταρα (Dooley, 1994).



υδροκινόνη



κοζικό οξύ



γκεντισικό οξύ

Το κοζικό οξύ είναι ένα αντιβιοτικό που παράγεται από πολλά είδη του *Aspergillus* και του *Penicillium* και εκδηλώνει αξιόλογη λευκαντική δράση, ενώ συχνά χρησιμοποιείται ως πρότυπο στη μελέτη της δραστικότητας άγνωστων μορίων. Η δραστικότητά του οφείλεται στην ικανότητά του να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα (στο ενεργό κέντρο του ενζύμου) και στην ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση των κερατινοκυττάρων ενεργοποιώντας τον παράγοντα NF-κB (Battaini G, 2000) (Moon, et al., 2001). Επίσης, η 4-n-βουτυλρεσορκινόλη εκδηλώνει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της τυροσινάσης (Kim, *et al.*, 2005), ενώ το π-κουμαρικό οξύ φάνηκε να καταστέλλει την παραγωγή μελανίνης σε κυτταρικό επίπεδο, και χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου έναντι του υποστρώματος τυροσίνη (Park, *et al.*, 2008).

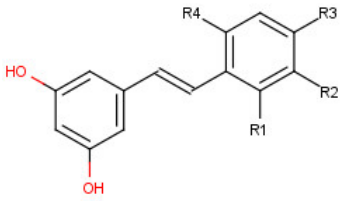
Οι πολυφαινόλες είναι ένα σύνολο χημικών μορίων, τα οποία συναντώνται διάσπαρτα στη φύση και μέχρι τώρα αποτελούν το μεγαλύτερο σύνολο αναστολέων τυροσινάσης που έχει μελετηθεί. Συναντώνται στους καρπούς, στα φύλλα και στις ρίζες των φυτών, όπως και σε φρούτα και λαχανικά (Kim, 2007), ενώ τόσο ο βασικός σκελετός, όσο και το είδος της υποκατάστασής του φαίνεται να καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την εκδήλωση δραστικότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι ισοφλαβόνες και τα πρενυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών φέρονται ως ισχυροί αναστολείς, με σημαντική αναστολή κατά της μονοφαινολάσης ή της δράσης της διφαινολάσης της τυροσινάσης (Son, 2003) (Chang, 2007).

Οι φλαβονόλες συνήθως δρουν σαν ανταγωνιστικοί αναστολείς κατά την οξείδωση της L-DOPA από την τυροσινάση και ο σκελετός τους (3-υδρόξυ-4-κέτο) έχει ρόλο κλειδί στη δημιουργία συμπλόκου με τον χαλκό στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σε επίπεδο αναστολής, η κερκετίνη φέρεται ισχυρότερη με τα γλυκοσιδικά της παράγωγα να εμφανίζονται πιο αδρανή (Kubo, 2007).

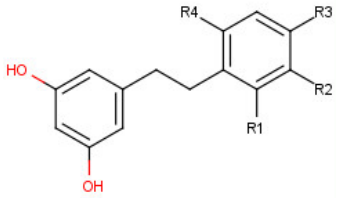
Παράγωγα του γαλλικού οξέος όπως οι γαλλικοί εστέρες της επικατεχίνης και της γαλλοκατεχίνης, φαίνεται να είναι δραστικότερα από το γαλλικό οξύ και την κατεχίνη, ενώ η σύνδεση του σκελετού της φλαβονο-3-όλης με τη χαρακτηριστική ομάδα του γαλλικού οξέος θεωρείται απαραίτητη για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης (No, 1999) (Solano, 2006).

Δομικά ανάλογα των υδροξυστιλβενίων ανήκουν στις πιο δραστικές κατηγορίες, λόγω της υψηλής συγγένειας τους με την τυροσινάση. Το στιλβένιο ρεσβερατρόλη έχει

χαρακτηριστεί ως ικανός αναστολέας του ενζύμου (Bernard, *et al.*, 2000), η οξυρεσβερατρόλη που απομονώθηκε από το *Morus alba* επέδειξε 32 φορές ισχυρότερη δράση συγκρινόμενη με το κοζικό οξύ (Kim, *et al.*, 2002), ενώ το 4-γερανυλ-3,5,2′,4′-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο, που απομονώθηκε από το φυτό *Chlorophora excelsa* φάνηκε 14 φορές δραστικότερο (Kuniyoshi, *et al.*, 2003). Η γνετόλη (2,6,3′,5′-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο), η οποία απομονώθηκε από το φυτό *Gnetum gnemon*, έδειξε 30 φορές ισχυρότερη δράση από τον πρότυπο αναστολέα (κοζικό οξύ) (Ohguchi, *et al.*, 2003), ενώ ισχυρή αναστολή επέδειξε και το 3,5,3′,4′-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο, που υπάρχει στα σταφύλια και στο κόκκινο κρασί (Yokozawa, *et al.*, 2007). Αναγωγή του διπλού δεσμού της ενδιάμεση αλυσίδας των στιλβενίων οδηγεί στην παραλαβή αντίστοιχων διβενζυλικών παραγώγων, των διυδροστιλβενίων, τα οποία επίσης επιδρούν στη δραστικότητα του ενζύμου τυροσινάσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διυδροοξυρεσβερατρόλη, η οποία φέρεται 8 φορές ισχυρότερος αναστολέας, συγκρινόμενη με την οξυρεσβερατρόλη (Likhitwitayawuid, *et al.*, 2006). Επιπλέον μελέτες αναδεικνύουν την ισχυρή ανασταλτική δράση παράγωγων διυδροστιλβενίων υποστηρίζοντας πως πιθανώς η ύπαρξη απλού δεσμού διευκολύνει την αλληλεπίδραση των μορίων με τον υποδοχέα της τυροσινάσης (Oozeki, *et al.*, 2008) (Vielhaber, *et al.*, 2007).

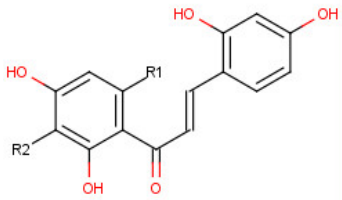


ρεσβερατρόλη R1=R2=R4=H, R3=OH
οξυρεσβερατρόλη R1=R3=OH, R2=R4=H
γνετόλη R1=R4=OH, R2=R3=H

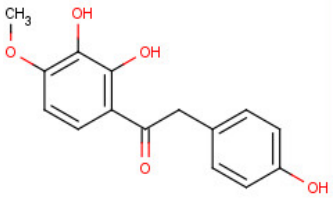


διυδροοξυρεσβερατρόλη R1=R3=OH, R2=R4=H
2,4,3',5'-τετραυδροξυδιυδροστιλβένιο
R1=R3=H, R2=R4=OH

Οι χαλκόνες επίσης αποτελούν μια πλούσια πηγή αναστολέων της τυροσινάσης και της μελανογένεσης γενικότερα. Πρενυλιωμένα και όχι μόνο παράγωγά τους από πλήθος φυτικών πηγών και ιδιαιτέρως από είδη του γένους *Glycyrrhiza* (Fu, *et al.*, 2005), *Morus* (Zhang, *et al.*, 2009) και *Sophora* (Kim, et al., 2003) (Hyun, et al., 2008) έχουν αναδειχθεί ιδιαίτερα ικανοί αναστολείς και σε πολλές περιπτώσεις ισχυρότεροι του κοζικού οξέος. Η δομική αναλογία των δεοξυβενζοϊνών με τους προαναφερόμενους σκελετούς (χαλκόνες, στιλβένια, διυσδοστιλβένια) οδήγησε στη μελέτη των παραπάνω ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου με την 2,3,4'-τριυδροξυ-4-μεθοξυ-δεοξυβενζοΐνη να επιδεικνύει την ισχυρότερη δράση (Ng, *et al.*, 2009).



2,4,2',4' - τετραυδροξυχαλκόνη R1=R2=H
2,4,6,2',4' - πενταυδροξυχαλκόνη R1=OH, R2=H
2,4,2′,4′-τετραυδροξυ-3-(3-μεθυλ-2-βουτενυλ)-χαλκόνη
R1= H, R2=3-(3-μεθυλ-2-βουτενυλ)



2,3,4'-τριυδροξυ-4-μεθοξυ-δεοξυβενζοΐνη

Επίσης, παράγωγα υδροξυλιωμένων κουμαρινών, όπως η εσκουλετίνη φαίνεται να είναι αποτελεσματικά για την αναστολή της μελανογένεσης, καθώς φαίνεται να αλληλεπιδρούν άμεσα με την τυροσινάση (Masamoto, 2004). Ικανός αναστολέας εμφανίζεται και το γλυκοσιδικό παράγωγο αλοεσίνη που έχει απομονωθεί από την *Aloe vera* και χρησιμοποιείται σε καλλυντικά για λεύκανση του δέρματος (Jones, *et al.*, 2002).

Μεγάλος αριθμός αλδεϋδών και βενζοϊκών παραγώγων έχουν χαρακτηριστεί ως αναστολείς της τυροσινάσης. Ο μηχανισμός αναστολής στην περίπτωση των αλδεϋδών προέρχεται προφανώς από την ικανότητά τους να σχηματίζουν μια βάση του Schiff με μια πρωτοταγή αμινομάδα στο ένζυμο (Likhitwitayawuid, 2008), ενώ στην περίπτωση των παραγώγων οξέων ο μηχανισμός περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός συμπλόκου οξέος-χαλκού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έχουν σημειώσει οι θουγιαπλικίνες (α-, β- και γ-), οι οποίες σημείωσαν τιμές IC_{50} χαμηλότερες και από εκείνη του πρότυπου αναστολέα κοζικό οξύ (Yoshimori, *et al.*, 2014). Αποτελεσματικοί λευκαντικοί παράγοντες αναδείχθηκαν δύο φυσικά προϊόντα, το λιντερανολίδιο Β και σουμπαμολίδιο Α, οι οποίοι *in vitro* και *in vivo* σε μοντέλο zembrafish, σημείωσαν αναστολή της τάξεως 50% (Wang, 2011).

Εκτός του μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν αξιολογηθεί στον συγκεκριμένο βιολογικό στόχο, σημαντικός αριθμός φυτικών εκχυλισμάτων έχει μελετηθεί ως προς την πιθανή αντι-μελανογόνο δράση τους (Solano, 2006) σε κυτταρικό και μη επίπεδο, παρουσιάζοντας ελπιδοφόρες προοπτικές (Hwang, 2007) (Adhikari, 2008).

4.4 Επαγωγείς τυροσινάσης

Εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι παράγοντες που δρουν ενεργοποιώντας το ένζυμο της τυροσινάσης, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την προστασία του δέρματος από τη UV ακτινοβολία, είτε σε παθήσεις αποχρωματισμού του ενεργοποιώντας τη σύνθεση της μελανίνης, είτε τέλος για την ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων με σκοπό την αντιμετώπιση ασθενειών που συνδέονται με τη δράση του ενζύμου, όπως η νόσος του Parkinson. Μέχρι στιγμής το συγκεκριμένο πεδίο δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς, παρ' όλα αυτά φαίνεται να συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον η ανεύρεση νέων παραγόντων που θα επάγουν τη δραστικότητα της τυροσινάσης.

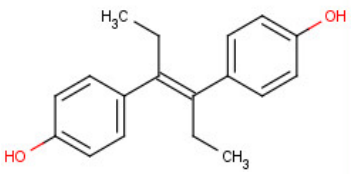
Ερευνητικές μελέτες έχουν αναδείξει πως το 5-μεθοξυψωραλένιο και το 8-μεθοξυψωραλένιο μπορεί να ενεργοποιήσουν τη μελανογένεση απουσία UV ακτινοβολίας, αυξάνοντας την παραγωγή αλλά και τη δραστικότητα του ενζύμου της τυροσινάσης σε κυτταρικό επίπεδο (Lei, *et al.*, 2002) (Mengeaud, *et al.*, 1994) (Marwan, *et al.*, 1990).

Οι 3-/4-αμινοακετοφαινόνες σε αξιολόγησή τους έναντι στη δραστικότητα του ενζύμου, αναδείχθηκαν ως πολύ ικανοί επαγωγείς, υποδεικνύοντας πως η υποκατάσταση της αμινομάδας παίζει καθοριστικό ρόλο για την εκδήλωση ενισχυτικής δράσης (You, *et al.*, 2015). Ερευνητική *in vitro* μελέτη σε ανθρώπινα επιδερμικά μελανοκύτταρα ανέδειξε την ενισχυτική δράση της αφζελίνης στη μελανογένεση. Το αποτέλεσμα αυτό επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών, καθώς και μέσω ενεργοποίησης της δράσης του ενζύμου της τυροσινάσης σε κυτταρικό επίπεδο (Jung, *et al.*, 2016). Παρόμοια αποτελέσματα ισχύουν και για τις φλαβόνες ισοσακουρανετίνη (Drira, *et al.*, 2015), εσπεριτίνη (Huang, *et al.*, 2012) και απιγενίνη (Ye, *et al.*, 2010).

Αλογονωμένα παράγωγα χαλκονών (κυρίως φθοριωμένα), όπως και παράγωγα με $N(CH_3)_2$ υποκαταστάτες (Chao, *et al.*, 2017) επέδειξαν ικανότητα ενεργοποίησης της δράσης του ενζύμου της τυροσινάσης (Chaves, *et al.*, 2017) αντιστρέφοντας την κύρια δράση των χαλκονών ως αναστολείς του ενζύμου (Khatib, *et al.*, 2005) (Akhtar, *et al.*, 2015) και υπογραμμίζοντας έτσι τον καθοριστικό ρόλο των υποκαταστατών στην εκδήλωση δραστικότητας.

Επίσης, συνθετικά παράγωγα ξανθενοδιονών αναδείχθηκαν ως ισχυροί ενεργοποιητές (Ferreira, *et al.*, 2015), όπως επίσης αξιολόγηση της δραστικότητας λιπαρών οξέων παρουσίασε αντίστοιχα αποτελέσματα, με το παλμιτικό οξύ να χαρακτηρίζεται ως ο ικανότερος επαγωγέας (Shabani, *et al.*, 2010).

Ενισχυτική δράση ως προς τη σύνθεση μελανίνης εμφανίζει η διαιθυλοστιλβεστρόλη, βάση *in vitro* ελέγχου σε μελανοκύτταρα, η οποία δρα μέσω διαφόρων μηχανισμών μεταξύ των οποίων και της επαγωγής της έκφρασης και της δράσης του ενζύμου της τυροσινάσης (Jian, *et al.*, 2011). Ανάλογη δραστικότητα επέδειξαν και τα φυσικά προϊόντα ναριγενίνη και ο 7-*O*-γλυκοσίδης της απιγενίνης (Bouzaiene, *et al.*, 2016). Εστερικά συνθετικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος αναδείχθηκαν ισχυρότεροι ενεργοποιητές της τυροσινάσης *in vitro*, έναντι του καφεϊκού οξέος, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο (Zheng, *et al.,* 2017).



διαιθυλστιλβεστρόλη

Τέλος, γλυκοζυλιωμένο παράγωγο του 2,3,5,4’ τετραυδροξυστιλβενίου φάνηκε να αυξάνει τη δραστικότητα του ενζύμου σε κυτταρικό επίπεδο και να προωθεί τη μελανογένεση μέσω ενεργοποίησης μελανογενετικών παραγόντων αλλά και άλλων μηχανισμών (Jiang, *et al.*, 2009).

5 Φυσικά προϊόντα και συνθετικά ανάλογα

Ως φυσικό προϊόν ορίζουμε μια φαρμακολογικά ή βιολογικά ενεργή ουσία ή χημική ένωση, η οποία βρίσκεται στη φύση και παράγεται από χερσαίους και θαλάσσιους ζωντανούς οργανισμούς. Πηγή φυσικών προϊόντων μπορεί να είναι φυτά, μύκητες, βακτήρια, πρωτόζωα, έντομα ακόμα και ο ίδιος ο άνθρωπος. Ο ορισμός περιλαμβάνει και τις αντίστοιχες ουσίες που μπορούν να παρασκευαστούν και μέσω συνθετικών οδών, ακόμα και στην περίπτωση που μπορούν να παρασκευαστούν εξολοκλήρου συνθετικά. Γενικότερα, ο όρος φυσικό προϊόν θεωρείται συνώνυμος με τον όρο δευτερογενής μεταβολίτης (Schmidt, *et al.*, 2008) (Koehn, *et al.*, 2005) (Natural, 2016).

Τα φυσικά προϊόντα είναι συνήθως μικρά μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος<3,000 Daltons με ιδιαίτερη δομική ποικιλότητα (Kinghorn, *et al.,* 2009). Οι κατηγορίες των προϊόντων όπου τα φυσικά προϊόντα μπορούν να εντοπιστούν ως δραστικά συστατικά, είναι τα συνταγογραφούμενα και μη συνταγογραφούμενα φάρμακα (pharmaceuticals), τα καλλυντικά (cosmeceuticals) και τα συμπληρώματα διατροφής ή προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας (nutriceuticals) (Chernyak, 2012).

Οι ουσίες που προέρχονται από τη φύση, ιστορικά αποτελούν την πιο παραγωγική και πλούσια πηγή ανεύρεσης βιοδραστικών ουσιών και σκελετών για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Harvey, *et al.*, 2010). Ανάμεσα στις πρώτες πηγές των φυσικών προϊόντων είναι τα αιθέρια έλαια των φυτών *Cedrus sp.*, *Cupressus sempevirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* sp. και *Papaver somniferum* (Cragg, 2001), τα οποία χρησίμευαν για την παρασκευή αρωμάτων για το παλάτι της Μεσοποταμίας (Levey, 1956). Στα πρώιμα φυσικά προϊόντα συγκαταλέγεται επίσης ένα αντιβιοτικό υλικό από το μουχλιασμένο πηγμένο γάλα σόγιας, που χρησιμοποιούταν από τους Κινέζους για την καταπολέμηση των λοιμώξεων, καθώς και τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης που παράγονται από το *Streptomyces* που υπάρχει στην μπύρα και καταναλωνόταν από Σουδανούς (Moellering, 1995) (Armelagos, 2001). Οι αναλγητικές ιδιότητες του οπίου ήταν ήδη γνωστές όταν απομονώθηκε το 1804 το δραστικό συστατικό μορφίνη από τους σπόρους της παπαρούνας (Schiff, 2002). Ήταν το πρώτο αλκαλοειδές που απομονώθηκε από τον Friedrich Wilhelm Sertürner και ονόμασε τους κρυστάλλους του '*das schlafmachende Prinzip*', ο υπναγωγός παράγοντας (Schmitz, 1983). Μέσα στα επόμενα χρόνια πολλοί ερευνητές απομόνωσαν πλήθος δραστικών αλκαλοειδών (όπως η ναρκοτίνη, η εμετίνη (Robiquet, 1817), η στρυχνίνη, η μπρουκίνη, η κιννίνη, η κινχινικίνη, η καφεΐνη και η ατροπίνη που αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία των πρώτων φαρμάκων (Grabley, *et al.*, 2000). Παρομοίως, οι θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού *Digitalis lanata* αξιοποιούνταν από τις αρχές του 16ου αιώνα για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών προβλημάτων, ενώ το δραστικό συστατικό διγοξίνη απομονώθηκε μόλις το 1930 (Gerwick, 2007). Ο φλοιός της ιτιάς και των ειδών του γένους *Cinchona* χορηγούταν για την αντιμετώπιση του πυρετού, ενώ εκχυλίσματα της παπαρούνας χορηγούνταν για την

αποτελεσματική αντιμετώπιση της δυσεντερίας (Beutler, 2010). Το 1829 οι επιστήμονες ανακάλυψαν πως η σαλικίνη, η οποία απομονώθηκε από την ιτιά ευθύνεται για την ανακούφιση από τον πόνο, και το 1838 απομονώθηκε το σαλικιλικό οξύ. Το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα συντέθηκε το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, το οποίο ήταν καλύτερα ανεκτό στο στομάχι και εμφάνιζε την ίδια δραστικότητα (Jeffreys, 2004). Συνολικά, πλήθος φυτών αποτέλεσαν πηγή για την ανεύρεση φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα για θεραπευτικούς σκοπούς (Schwartsmann, 2011). Ιδιαίτερα σημαντική ανακάλυψη για τη χρήση των φυσικών προϊόντων ήταν αυτή της πενικιλλίνης το 1928 από τον Ian Fleming (Fleming, 1929), η οποία ενεργοποίησε τη συστηματική έρευνα αντιμικροβιακών παραγόντων με συνέπεια την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης, της χλωραμφαινικόλης, της χλωροτετρακυκλίνης, της κεφαλοσπορίνης και της ερυθρομυκίνης (Urdang, 1951) (Alder, 1970) (Selwyn, 1982). Σχετικά πιο πρόσφατα παραδείγματα είναι το αντικαρκινικό φάρμακο “Paclitaxel” (Taxol ®) που προέρχεται από το δέντρο Yew και ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1970, αλλά λόγω δυσκολίας στην απόκτηση εμπορικών ποσοτήτων βγήκε στην αγορά στα τέλη του 1992 (Goodman, 2001) (Wani, *et al.*, 1971), επίσης η αρτεμισινίνη έναντι της ελονοσίας από την *Artemisia annua* (Maude, *et al.*, 2010), καθώς και η σιλιμαρίνη για την αντιμετώπιση ηπατικών παθήσεων από τους καρπούς του *Silybum marianum* (Reddy, 2007). Ειδικά την τελευταία εικοσαετία έχουν εγκριθεί φάρμακα φυσικής προέλευσης όπως το “Artemotial”, ημισυνθετικό ανάλογο της αρτεμισινίνης, το οποίο χορηγείται στην ελονοσία, το “Nitisinone”, ανάλογο του φυσικού προϊόντος λεπτοσπερμόνη leptospermone (*Callistemon citrinus*) και χρησιμοποιείται στη θεραπεία της αντιτυροσιναιμίας, η γαλανταμίνη, η οποία είναι φυσικό αλκαλοειδές από το φυτό *Galanthus nivalis* και χορηγείται για το Alzheimer, η απομορφίνη ημισυνθετικό ανάλογο της μορφίνης (*Papaver somniferum*) που χρησιμοποιείται στη νόσο του Parkinson, το Tiotropium bromide, παράγωγο της ατροπίνης από την *Atropa belladonna* που χορηγείται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το “Dronabinol” και η κανναβιδιόλη που προέρχονται από το φυτό *Cannabis sativa*, καθώς η δραστική ένωση καψαϊκίνη από *Capsicum annuum* που χορηγούνται ως ισχυρά αναλγητικά (Veeresham, 2012).

Τα φυσικά προϊόντα συνεχίζουν να παρέχουν μια πολύτιμη και πλούσια πηγή για την ανακάλυψη υποψήφιων φαρμάκων, καθώς η χημική καινοτομία που τα χαρακτηρίζει είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη ενώσεων από οποιασδήποτε άλλη πηγή. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός πως είναι κατάλληλα για περαιτέρω βελτιστοποίηση με χρήση συνθετικών μέσων. Η εμπειρική γνώση των ευεργετικών, καθώς και των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων που σχετίζονται με οποιαδήποτε φαρμακευτική δρόγη, σημειώθηκε από πολλούς αρχαίους συγγραφείς στα βιβλία βοτανικής και στις φαρμακοποιίες, υπογραμμίζοντας το σπουδαίο ρόλο που κατείχαν τα φαρμακευτικά φυτά διαμέσου της ιστορίας. Ειδικότερα φυτά με εθνοφαρμακολογικές χρήσεις, αποτελούσαν πάντα πρωτογενείς πηγές για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη των Fabricant και Farnsworth έδειξε ότι το 80% των φαρμάκων που έχουν προέλθει από φυτά σχετίζονται με τις εθνοφαρμακολογικές αναφορές τους (Fabricant,

et al., 2001). Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως μέχρι τη δεκαετία του '90, το 60% του πληθυσμού στρεφόταν σχεδόν αποκλειστικά σε μη "δυτικές" ιατρικές πρακτικές, ενώ το ποσοστό των ασθενών στις εκβιομηχανοποιημένες χώρες που εμπιστεύονται τη χρήση φυτικών προϊόντων για τη θεραπεία ασθενειών ή ως διατροφικών συμπληρωμάτων, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο τις τελευταίες δεκαετίες (Farnsworth, 1994) (De Smet, 2005).

Κατά τη διάρκεια του 2000-2005, εικοσι τρία νέα φάρμακα προερχόμενα από φυσικές πηγές διατέθηκαν στην αγορά και αφορούσαν στη θεραπεία του καρκίνου, σε νευρολογικές και μολυσματικές ασθένειες, σε καρδιαγγειακά και μεταβολικά νοσήματα, σε φλεγμονώδεις και ανοσοποιητικές παθήσεις, καθώς και σε γενετικές ανωμαλίες, οι οποίες αποτελούν πολλές από τις κοινές ανθρώπινες ασθένειες (Chin, *et al.*, 2006). Επιπλέον κατά το διάστημα 2005-2010, συνολικά δεκαεννέα φυσικά προϊόντα (φυσικά, ημισυνθετικά, συνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόντων) κυκλοφόρησαν ως φάρμακα. Αξίζει να προστεθεί πως μόνο το 5% ως 15% των χερσαίων φυτών υπολογίζεται πως έχει διερευνηθεί φυτοχημικά και φαρμακολογικά με συστηματικό τρόπο. Σε περίπου 10.000 εώς 15.000 φυτά έχει αποδοθεί φαρμακευτική χρήση και 150-200 δρόγες έχουν ενσωματωθεί στη δυτική ιατρική (Birari, 2007) υποδηλώνοντας πως παρά την επιτυχή ανάπτυξη και την εμπορία των συνθετικών φαρμακευτικών ουσιών, τα φυσικά προϊόντα βρήκαν τον τρόπο να ενταχθούν στη σύγχρονη ιατρική του 20ου αιώνα.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η δυναμική των φυσικών προϊόντων είναι άπειρη λόγω της συντριπτικής σκελετικής και βιολογικής ποικιλότητας των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Επομένως, η καλύτερη στρατηγική εκμετάλλευσής τους περιλαμβάνει το συνδυασμό όλων των πληροφοριών που προέρχονται από την παραδοσιακή ιατρική, την ιστορία, τη φυτοχημεία, τη φαρμακολογία, τη χημειοταξονομία και τους βιολογικούς ελέγχους των φυσικών προϊόντων. Έτσι, η φύση θα διαμορφωθεί σε μια πηγή ανάδειξης νέων φαρμάκων με όπλο πάντα την εφαρμογή συνδυαστικών τεχνικών και διεπιστημονικών προσεγγίσεων (Rollinger, *et al.*, 2006).

5.1 Φυτοοιστρογόνα και οστεοπόρωση

Τα φυτοοιστρογόνα είναι μη στερεοειδικές ενώσεις φυσικής προέλευσης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα και να επηρεάζουν τη φυσιολογία πολλών οργανικών συστημάτων. Ασκούν οιστρογονική δράση στο σκελετό, επηρεάζουν θετικά την καρδιαγγειακή λειτουργία, τα μετεμμηνοπαυσιακά συμπτώματα, δρουν βοηθητικά στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης, ενώ εμφανίζουν αντιοιστρογονική δράση στους ιστούς του μαστού και του προστάτη. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση πως τα μόρια αυτά μπορούν να δράσουν σαν εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων και να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά για την πρόληψη διαφόρων ασθενειών, όπως του καρκίνου του προστάτη και του μαστού, την αντιμετώπιση των μετεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη επίδρασης των φυτοοιστρογόνων στην υγεία των οστών, ενώ μελετάται η δράση τους ως εναλλακτική θεραπεία αντικατάστασης των

οιστρογόνων για την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, πλαίσιο στο οποίο εντάσσεται και η παρούσα διατριβή (Zhang, *et al.,* 2016) (Putnam, *et al.*, 2007).

Ως φυτοοιστρογόνα χαρακτηρίζονται πολλές κατηγορίες ενώσεων μεταξύ των οποίων οι ισοφλαβόνες, τα λιγνάνια, τα στιλβενοειδή, οι κουμεστάνες και οι λακτόνες ρεσορκυλικού οξέος, οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως οιστρογόνα μυκήτων εξαιτίας της παραγωγής τους από τη μούχλα που βρέθηκε σε καλλιέργειες σιτηρών. Στον Πίνακας 2 παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα φυτών πλούσια σε φυτοοιστρογόνες ενώσεις (Al-Anazi, *et al.*, 2011).

Πίνακας 2:Ενδεικτικά φυτά πλούσια σε φυτοοιστρογόνες ενώσεις

Φυτικό είδος	Συστατικά	Οικογένεια
Glycine max, soya bean	Isoflavones (genistein, daidzein)	Fabaceae
Kadsura interior	Plant phenol (lignans)	Schisandraceae
Sophora japonica	Coumestanes	Fabaceae
Vitis vinifera	Stilbenes	Vitaceae
Asparagus racemosus	Kaempherol	Asparagaceae
Cimifuga racemosa (black cohosh)	Cimifugoside	Rananculaceae
Glycyrrhiza glabra (licorice)	Glycyrrhizin	Papilionaceae
Rubus idaeus (red raspberry)	Pectin, citric acid and malic acid	Rosaceae
Trifolium pratense (red clover)	Phenolic glycossides	Fabaceae
Pueraria lobata (kudzu)	Flavonoids, isoflavonoids, daidzein	Fabaceae
Radix astragali (astragallus root)	Polysaccharides	Fabaceae
Angelicae sinensis (dong quai)	Ligustilide, n-butylidene phthalide, palmitic acid, bet-sitosterol	Apiaceae
Humulus lupulus (hops)	Sesquiterpene	Cannabaceae
Polygonum multiflorum (fo-ti root)	Anthraquinones	Liliaceae
Vitex agnus (chaste tree berry)	Flavonoids, glycosides, terpenoids	Verbenaceae
Camellia sinensis (green tea)	Polyphenols	Theaceae

Το φαρμακευτικό σκεύασμα Danggui Buxue Tang, που περιέχει ρίζες του φυτού *Angelicae sinensis*, όπως επίσης και οι ρίζες του *Astragallus* χρησιμοποιούνται χρόνια στην κινεζική ιατρική και έχει αποδειχθεί πως ενεργοποιούν την οστεβλαστική παραγωγή και εκδηλώνουν οιστρογόνο δράση (Dong, *et al.*, 2006). Σημειώνεται επίσης, πως το είδος *Astragalus membranaceus*, που είναι πλούσιο σε ισοφλαβονοειδή, έχει αποδειχτεί ότι εμποδίζει την ελάττωση της οστικής μάζας σε οστεοπορωτικό μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων (Kim, *et al.*, 2003). Το *Trifolium pretense* συμβάλλει στη βελτίωση της υγείας των οστών την περίοδο της εμμηνόπαυσης, ενώ έχει συνδυαστεί με την αρτηριακή αποσυμφόρηση, μειώνοντας τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης (Booth, *et al.*, 2006). Οι Whelan *et al.* (Whelan, *et al.*, 2006) σε μια συγκεντρωτική μελέτη ανέδειξαν το σημαντικό αριθμό των φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, ενώ οι Das *et al* (Das, *et al.*, 2005) έδειξαν πως χορήγηση της *Camellia sinensis* μείωσε σημαντικά την οστική απώλεια. Η ρίζα της *Pueraria lobate* είναι από τα πρώτα και τα σημαντικότερα βότανα της κινεζικής ιατρικής. *In vivo* πειράματα σε ευνουχισμένα αρσενικά ποντίκια που λάμβαναν το

σκεύασμα ανέκτησαν την οστική μάζα που χάθηκε λόγω της επαγόμενης οστεοπόρωσης. Χρήση του *Epimedium brevicornum* επίσης είναι ευρέως διαδεδομένη στην κινεζική ιατρική για τη θεραπεία αποκατάστασης των οστών, με πλήθος μελετών να επιβεβαιώνει την ευεργετική του επίδραση στην οστική υγεία, κυρίως μέσω αύξησης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας (Meng, *et al.*, 2005) (Liu, *et al.*, 2005) (Chen, *et al.*, 2005). Το *Sambucus williamsii* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική για την αποκατάσταση καταγμάτων των οστών και προβλημάτων των αρθρώσεων. *In vitro* έλεγχος έδειξε ότι εκχύλισμα του *Sambucus williamsii* αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση μέσω ρύθμισης των παραγόντων της οστεοπροτογερίνης και του RANKL, ενώ *in vivo* πειράματα απέδειξαν την αύξηση της οστικής μάζας στην κνήμη ωοθηκεκτομηθέντων πειραματοζώων (Fang, *et al.*, 2005). Οι ρίζες του φυτού *Salvia miltorrhiza* είναι γνωστό πως αναστέλλουν την οστική απορρόφηση, δράση που οφείλεται στα παράγωγα τανσινονών που χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο είδος (Lee, *et al.*, 2005). Το *Drynariae rhizoma* είναι ένα από τα κυρίαρχα σκευάσματα για την αντιμετώπιση των καταγμάτων στην κινεζική ιατρική. Μελέτη ανέδειξε πως τόσο το αιθανολικό, όσο και το υδατικό του εκχύλισμα είναι ισχυροί αναστολείς των καθεψινών K και L, οι οποίες μετουσιώνουν το κολλαγόνο, ενώ επίσης αυξάνει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων οστεοπρογονικών κυττάρων (Jeong, *et al.*, 2005) (Jeong, *et al.*, 2004). Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Onobrychis ebenoides*, το οποίο είναι πλούσιο σε βενζοφουράνια και ισοφλαβονοειδή, φάνηκε ικανό να εμποδίζει την απώλεια οστικής μάζας σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες (Dontas, *et al.*, 2006).

Στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική συναντάμε τη χρήση σκευασμάτων που αποτελούνται από αρκετά βότανα, υπογραμμίζοντας τη σημασία της συνεργιστικής δράσης με σκοπό τη βελτίωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας ή την εξομάλυνση των ανεπιθύμητων παρενεργειών μεμονωμένων βοτάνων (Gao, *et al.*, 2013). Ενδεικτικά παρουσιάζονται στον Πίνακας 3 τα πιο κοινά κινεζικά συνδυαστικά σκευάσματα για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης (Zhang, *et al.*, 2016), καθώς και κάποια εμπορικά σκευάσματα φυτοοιστρογόνων (Button, *et al.*, 2004).

Πίνακας 3: Παραδοσιακά και φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης

Κινεζικά σκευάσματα	Συστατικά
Qing E Wan	*Eucommia ulmoides* Oliv.(Bark,480g), *Cullen corylifolium* (Linnaeus) Medikus(Fruit,240g), Ju-glans regia L.(Seed, 150g), *Allium sativum* L.(Bulb, 120g) 1/time, 2times/ day Er ZhiWanYiFangJiJie
Er Zhi Wan	*Ligustrum lucidum* Ait.(Fruit,500g), *Eclipta prostrata* (L.) L.(Herb,500g)
Zuo Gui Wan	*Rehmannia glutinosa* Libosch (Root,200g), *Dioscorea opposite* Thunb.(Rhizome, 120g), *Lycium barbarum* L. (Fruit,120g), *Cornus officinalis* Sieb. etZucc.(Fruit,120g), *Cyathula* officinalis Kuan (Root,90g), *Cuscuta chinensis* Lam.(Seed, 120g), *Cervus elaphus* Linnaeus (Cornu,120g), *Chinemys reevesii* (Gray) (Carapaceandplastron,120g
Liu Wei Di Huang Wan	*Rehmannia glutinosa* Libosch (Root,160g), *Paeonia suffruticosa* Andr.(Cortex,60g), *Dioscorea opposita* Thunb. (Rhizome,80g), *Poria cocos* (Schw.)Wolf(Sclerotium,60g), *Alisma orientale* (Sam.) Juz.(Tuber,60g), *Cornus officinalis* Sieb. etZucc.(Fruit,80g).
You Gui Wan	*Rehmannia glutinosa* Libosch (Root,240g), *Aconitum carmichaeli* Debx.(Root,60g), *Cinnamomum cassia* Presl (Bark,60g), *Dioscorea opposita* Thunb. (Rhizome,120g), *Cornus officinalis* Sieb. et

	Zucc.(Fruit,90g), *Cuscuta chinensis* Lam.(Seed, 120g), *Cervus elaphus* Linnaeus (Cornu,120g), Lyciumbarbarum L. (Fruit,120g), *Angelica sinensis* (Oliv.)Diels(Root,90g), *Eucommia ulmoides* Oliv.(Bark,120g)
Εμπορικά σκευάσματα	**Συστατικά**
Promensil (παράγεται από το red clover)	Isoflavones Formononetin, Daidzein, Biochanin A, Genistein
Rimostil (παράγεται από το red clover)	Isoflavones Formononetin, Daidzein, Biochanin A, Genistein
Femarelle/Tofupill	Formononetin,Puerarin, Coumersol, Daidzin, Eguol, Daidzein,Genistein, Biochanin

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης και εκχυλίσματα θαλάσσιων οργανισμών που επιδρούν στο οστό μέσω της ενίσχυσης του σχηματισμού και της καταστολής της απορρόφησής του, πιθανότατα μέσω αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών μηχανισμών. Γνωστό για τη δράση του είναι το εκχύλισμα του *Padina Pavonica*, με κύριο συστατικό τη δικτυόλη, το οποίο περιλαμβάνεται σε συμπληρώματα διατροφής κατά της οστεοπόρωσης, αυξάνοντας την πρόσληψη και τη διατήρηση του ασβεστίου. Άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί με αναβολική επίδραση στα οστά είναι οι *Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida, Sargassum horneri, Eiseniabicyclis, Cryptonemia scmitziana, Gelidium amansii* και *Ulva per-tusa Kjellman* (Senthilkumara, *et al.*, 2014).

Η χορήγηση φυτοοιστρογόνων, σε σχέση με την κλασική θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης, εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες, ωστόσο ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Heidari, *et al.*, 2014). Υπάρχει έλλειψη αναλυτικών προδιαγραφών χορήγησης των φυτοοιστρογόνων και ανεπαρκείς μεθόδοι για τη μέτρηση των επιπέδων τους στα τρόφιμα, ενώ ένα ακόμη πρόβλημα είναι η ατομική μεταβλητότητα του μεταβολισμού των πρόδρομων ουσιών που εισάγονται με τη διατροφή (Al-Anazi, *et al.*, 2011). Μελέτες υπογραμμίζουν πως η παρατεταμένη χορήγηση ή η λήψη σημαντικής ποσότητας μπορεί να επηρεάσει την αύξηση του στήθους και τη γαλουχία (McLachlan, *et al.*, 2006).

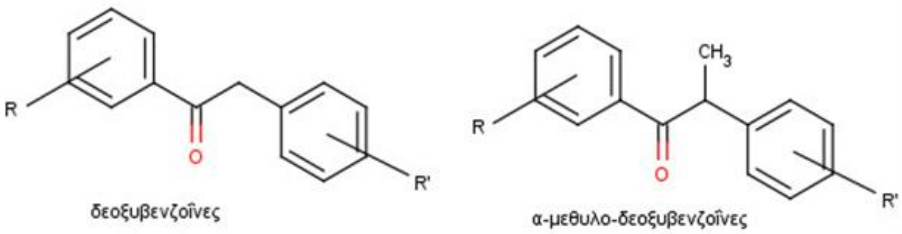
5.2 Συνθετικά ανάλογα

Στην ευρύτερη κατηγορία των φυτοοιστρογόνων ουσιών ανήκουν και οι χημικές κατηγορίες των συνθετικών αναλόγων που παρασκευάστηκαν στο πλαί σιο της παρούσας διατριβής.

5.2.1 Δεοξυβενζοϊνες

❖ **Φυτικές πηγές - Βιολογικές δράσεις**

Οι συγκεκριμένες ενώσεις αποτελούν ενδιάμεσα μόρια στη σύνθεση των ισοφλαβονών και εντοπίζονται σε φυτικά είδη όπως *Deduelia hatschbachii*, *Trifolium subterraneum* και *Ononis spinosa*, σε είδη του γένους *Glycyrrhiza*, ενώ έχουν απομονωθεί και από θαλάσσιους οργανισμούς (Kiuchi, *et al.*, 1990) (Niwa, *et al.*, 1999) (Wahala, *et al.*, 1991) (Magalhaes, *et al.,* 2001) (Magalhaes, *et al.*, 2006).



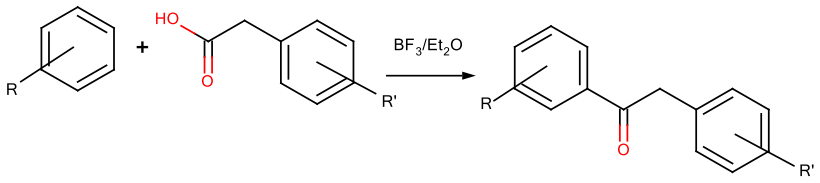
Από το φυτό *Pterocarpus angolensis* και το *P. marsupium* (Barend, *et al.*, 1986) έχουν απομονωθεί α-μεθυλ-δεοξυβενζοΐνες, μαζί με ισοφλανοειδή και διυδροχαλκόνες, γεγονός που ενισχύει τη βιοσυνθετική συσχέτιση αυτών των ομάδων μορίων. Σημειώνεται πως α-μεθυλ-δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα έχουν απομονωθεί και από ούρα ανθρώπων που κατανάλωναν σόγια και Red clover (*Trifolium pratense*) (Satu-Maarit, 2006).

Αρκετά συνθετικά δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα έχουν εκδηλώσει έντονη αντιβακτηριδιακή δράση, με κάποια διμερή να θεωρούνται ως πιθανοί αντιβιωτικοί παράγοντες. Επίσης, πολυδροξυλιωμένα παράγωγα δεοξυβενζοϊνών εμφάνισαν ικανοποιητική δράση κατά του βακτηρίου *Helicobacter pylori* αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου ουρεάση (Xiao, *et al.*, 2007). Μελέτες αναδεικνύουν τις δεοξυβενζοΐνες ως ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες στην πλειοψηφία τους (Xue, *et al.*, 2014), σε συνδυασμό με την εκδήλωση καρδιοπροστασίας. Συγκεκριμένα, η 2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνη και η 2,3,4-τριυδροξυδεοβενζοΐνη έδειξαν την καλύτερη δράση ως προς την επαγωγή αρτηριακής χαλάρωσης, καλύτερη και από τη ρεσβερατρόλη. Η δομική αναλογία των δεοξυβενζοϊνών με τη ρεσβερατρόλη, που είναι μεταξύ άλλων και ένας πολύ αποτελεσματικός αναστολέας της τυροσινάσης, οδήγησε στη μελέτη των παραπάνω ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Μελέτες ανέδειξαν μέτρια ικανότητα αναστολής, με τη 2,4-διυδρόξυ-υποκατάσταση να αποτελεί κριτήριο για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης. Η γνωστή φυτοοιστρογονική δράση των ισοφλαβονών και το γεγονός ότι οι δεοξυβενζοΐνες αποτελούν το ενδιάμεσο στάδιο στη σύνθεσή τους, οδήγησε στη μελέτη της φυτοοιστρογονικής δράσης των ανωτέρω με πολύ θετικά αποτελέσματα. Μελέτες σχέσης δομής-δράσης έδειξαν πως η σχετική χημική συγγένεια της 2,4,4'-τριυδροξυ-δεοξυβενζοΐνης με τον υποδοχέα ERβ είναι 15 φορές μεγαλύτερη της ντανζεΐνης, ενώ των 2,4 -διυδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνης, 2,4-διυδροξυ-4'-νιτροδεοξυβενζοΐνης, 2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης και της 2,4-διυδροξυ-4'-βρωμοδεοξυβενζοΐνης είναι σχετικά μέτρια (Fokialakis, *et al.*, 2004). Πιο συγκεκριμένα η 2,4-διυδροξυ-4'-βρωμοδεοξυβενζοΐνη έδειξε αντιοιστρογονική δράση σε καρκινικά κύτταρα μαστού και οιστρογονική δράση σε οστεοβλάστες, χωρίς όμως να προκαλεί ενεργοποίηση των κυττάρων του ενδομητρίου (Papoutsi, *et al.*, 2007) και αναδεικνύοντας τη σε πιθανό αντιοστεοπορωτικό παράγοντα.

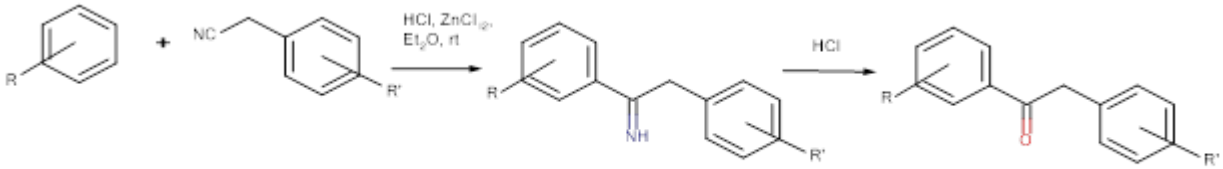
❖ Συνθετικές παρασκευές

Η συνθετική παρασκευή των δεοξυβενζοϊνών στηρίζεται σε μια κλασική αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης ανάμεσα σε:

- ✓ **μια φαινόλη και ένα φαινυλοξικό οξύ (ακυλίωση Friedel-Crafts)**



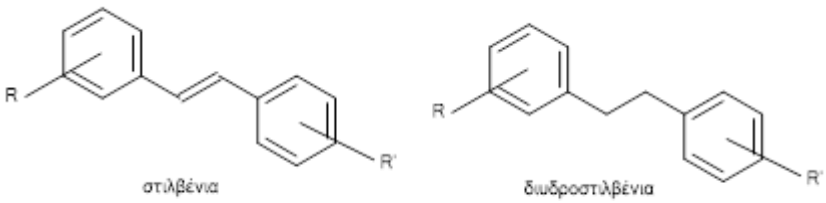
- ✓ **μια φαινόλη και ένα φαινυλονιτρίλιο (Houben-Hoesch reaction).**



Για τη σύνθεση των δεοξυβενζοϊνικών παραγώγων χρησιμοποιείται κυρίως η αντίδραση ακυλίωσης Friedel-Crafts (Ng, *et al.*, 2009) (Wahala, *et al.*, 1991) (Fokialakis, *et al.*, 2004) (Goto, *et al.*, 2009) και το οξύ κατά Lewis BF_3-Et_2O χρησιμοποιείται και σαν διαλύτης της αντίδρασης. Η Friedel-Crafts συναντάται συχνότερα στη βιβλιογραφία σαν παρασκευαστική μέθοδος των δεοξυβενζοϊνών και φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευκολία σε σχέση με την Houben-Hoesch. Αξίζει να σημειωθεί πως σε περιπτώσεις που η απόδοση της αντίδρασης δεν είναι ιδιαιτέρως υψηλή ή η αντίδραση ακυλίωσης δεν οδηγεί στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος, συνήθως λόγω ύπαρξης πολλών υδροξυλομάδων ως υποκαταστάτες, εφαρμόζεται η αντίδραση Houben-Hoesch με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα (Balasubramanian, *et al.*, 2000) (Ng, *et al.*, 2009).

5.2.2 Διυδροστιλβένια

Τα διυδροστιλβένια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται με δύο άτομα άνθρακα που συνδέονται με απλό δεσμό μεταξύ τους. Αποτελούν δομικά ανάλογα των στιλβενίων, καθώς προκύπτουν από τα τελευταία με μια απλή αντίδραση αναγωγής.

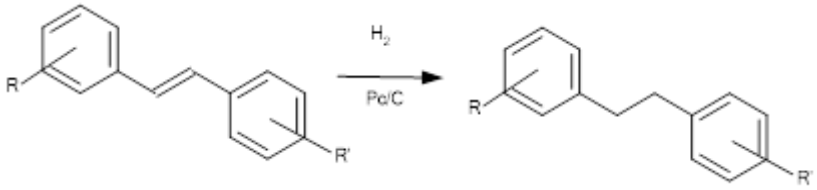


❖ **Φυσικές πηγές - Βιολογικές δράσεις**

Παράγωγα διυδροστιλβενίων συναντάμε σε πλήθος φυσικών πηγών, στα βρυόφυτα, στα πτεριδόφυτα και στα ανώτερα φυτά. Τα φύλλα του φυτού *Glycyrrhiza glabra* είναι ιδιαίτερα πλούσια σε διυδροστιλβένια και πρενυλιωμένα ανάλογά τους, όπως και αρκετά είδη του γένους *Dendrobium*, που χρησιμοποιούνται μακροχρόνια στην κινεζική ιατρική, κυρίως για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Το *Pholidota chinesis* (Orchidaceae) χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της χρόνιας βρογχίτιδας, του πονόδοντου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και για την αντιμετώπιση του έλκους, δράσεις που οφείλονται στην αντιφλεγμονώδη ιδιότητα των διυδροστιλβενίων του φυτού (Wang, *et al.*, 2006). Τα εν λόγω παράγωγα αποτελούν μια σημαντική κατηγορία φυτοαλεξινών, ουσίες που παράγουν τα φυτά όταν αυτά προσβληθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς (μύκητες), με σκοπό την προστασία τους από τον «εισβολέα». Τα είδη του γένος *Stemona* είναι ιδιαίτερα πλούσια σε στιλβενοειδή και κυρίως διυδροστιλβένια, στα οποία αποδίδεται κατά κύριο λόγο η αντιμυκητησιακή, αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση του φυτού. Παρόμοιες δράσεις επίσης παρουσιάζουν το λουνουλαρικό οξύ από τη *Lunularia cruciata* (Hashomoto, *et al.*, 1988) και τα διμερή διυδροστιλβενίων από τη *Marchantia.* Συνθετικά διυδροστιλβενικά παράγωγα επέδειξαν ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του *Helicobacter pylori* (Xiao, *et al.*, 2010). Η δομική αναλογία του ισονοθολαενικού οξέος και συνθετικών παραγώγων του με τις κομπρεταστατίνες, που χρησιμοποιούνται ως αντιπαρασιτικά και θεωρούνται ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες, οδήγησε στη μελέτη της αντιπαρασιτικής τους δράσης. Η διαιθυλοστιλβεστρόλη (DES) είναι από τα πιο γνωστά συνθετικά ανάλογα στιλβενίων, καθώς χρησιμοποιούταν ως φάρμακο για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και του στήθους μέχρι που ενοχοποιήθηκε για την πρόκληση άλλων μορφών καρκίνου (Metzler, *et al,* 1984). Μελέτες έδειξαν πως το 4,4,'-διυδροξυ-στιλβένιο, το 4,4'-διυδροξυ-α-μεθυλ-στιλβένιο και η DES εκδηλώνουν ισχυρή οιστρογονική δράση, το 4-υδροξυ-στιλβένιο, το 4-αμινο-στιλβένιο και το 4-υδροξυ-4'νιτρο-στιλβένιο μέτρια, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζει αντιοιστρογονική δράση. Αξίζει να σημειωθεί πως το α-μεθυλ-στιλβένιο, το 4,4'-διμεθοξυ-στιλβένιο, το 4-υδροξυ-α-μεθυλ-στιλβένιο και κάποια διβενζύλια, ενώ αρχικά δεν εμφάνισαν οιστρογονική δράση, μέσω μεταβολικών διεργασιών παρουσία ενζύμων μετατράπηκαν σε πιο δραστικές μορφές, σημειώνοντας αξιοσημείωτη οιστρογονική δράση. Η ρεσβερατρόλη είναι ίσως το πιο μελετημένο στιλβένιο ως προς την δραστικότητάς του. Αποτελεί βασικό συστατικό των σταφυλιών, του κρασιού, των καρπών, των φρούτων και των λαχανικών, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν χημειοπροστατευτικός και καρδιοαγγειοπροστατευτικός παράγοντας (Saiko, *et al.*, 2008). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα στιλβένια και κάποια διυδροστιλβένια αποτελούν πολύ ισχυρούς παράγοντες αναστολής του ενζύμου τυροσινάσης.

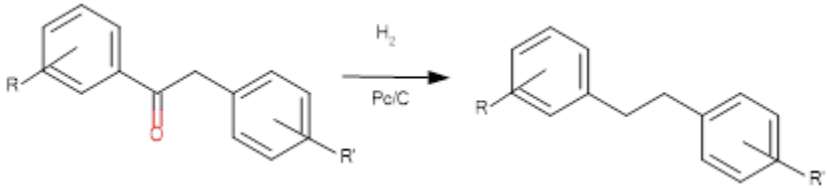
❖ **Συνθετικές παρασκευές**

Τα διυδροστιλβένια παράγονται συνθετικά από τα στιλβένια με μια αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού, μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης (Cushman, *et al.*, 1991).



Αποτελεί ένα εναλλακτικό τρόπο συνθετικής παρασκευής διυδροστιλβενίων μέσω των δεόξυβενζοινών, ο οποίος στηρίζεται στην αναγωγή της κετονομάδας σε αλκάνιο ($R_2C=0 \rightarrow R_2CH_2$). Βιβλιογραφικά, η αναγωγή της κετονομάδας σε αλκάνιο μπορεί να γίνει μέσω τριών τρόπων :

- ✓ Μέσω της αντίδρασης αναγωγής Wolff-Kishner (με χρήση H_2NNH_2-υδραζίνης σε DMSO)
- ✓ Μέσω της αντίδρασης αναγωγής Clemmensen (με χρήση αμαλγάματος ψευδαργύρου, Zn-Hg, σε όξινο περιβάλλον)
- ✓ **Μέσω της αντίδρασης αναγωγής καταλυτικής υδρογόνωσης, μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διυδροστιλβενικών παραγώγων που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.**



5.2.3 Χαλκόνες

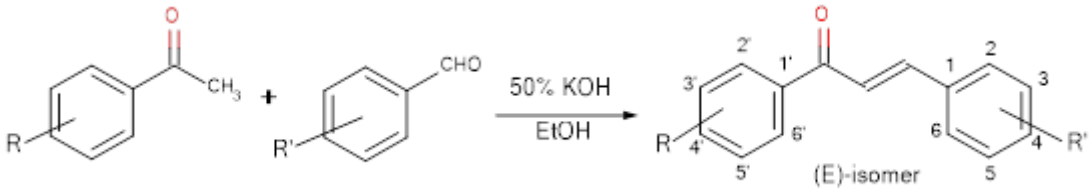
Οι χαλκόνες είναι αρωματικές ενώσεις με μία ακόρεστη πλευρική αλυσίδα και μια κετονομάδα, βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και θεωρούνται πρόδρομα μόρια των φλαβονοειδών και ισοφλαβονοειδών. Αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία χαλκονών έχει διαπιστωθεί σε πολλά φυτικά είδη που χρησιμοποιούνται σε λαικές και παραδοσιακές θεραπευτικές για την αντιμετώπιση πλήθους παθήσεων.

❖ **Φυσικές πηγές - Βιολογικές δράσεις**

Αρκετές χαλκόνες έχουν απομονωθεί από είδη του γένους *Glyryrrhiza* και *Desmodium*, με τα πρενυλιωμένα παράγωγά τους να εκδηλώνουν ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση (Rees, *et al.*, 2015) (Chen, *et al.*, 2014). Επίσης χαλκόνες έχουν απομονωθεί από το είδος *Anthyllis hermanniae* και το *Humulus lupulus* με τη ξανθοχουμόλη, αντιπροσωπευτική του είδους, να εκδηλώνει αντιπλασμωδική δράση. Από είδη του γένους *Crotalaria* έχουν απομονωθεί παράγωγα χαλκονών με αντιμυκητιασική δράση και δράση κατά της ελονοσίας (Nowakowska,

2007). Η ισολικουιτιριγενίνη, κυρίαρχο συστατικό της *Glycyrrhiza uralensis*, επέδειξε νευροπροστατευτική (Hwang, *et al.*, 2012) και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (Honda, *et al.*, 2017). Επίσης πρενυλιωμένα παράγωγα υδροξυλιωμένων χαλκονών που απομονώθηκαν από τις ρίζες του φυτού *Angelica keiskei* χαρακτηρίστηκαν ικανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, μέσω της αντιαγγειογενετικής δράσης τους (Sumiyoshi, *et al.*, 2015). Φυσικά αλλά και συνθετικά παράγωγα χαλκονών έχουν αναδειχθεί ως ικανοί παράγοντες για την αντιμετώπισης της λεϊσμανίασης, που προκαλείται από το παράσιτο *Leishmania*, *in vitro* αλλά και *in vivo* (Tajuddeen, *et al.*, 2017). Γενικότερα, στα παράγωγα χαλκονοειδών έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Kim, *et al.*, 2007) (Sogawa, *et al.*, 1993) και ισχυρή αντιική δράση (Xu, *et al.*, 2000), ενώ έχουν χαρακτηριστεί ως ικανοί καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες (Mahapatra, *et al.*, 2016). Επίσης, χαλκόνες έχουν απομονωθεί από τα φύλλα του είδους *Maclura tinctoria* της οικογένειας Moraceae, από τα είδη *Uvaria dulcis*, *Rhus pyroides*, *Artocarpus incisus*, από το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Zuccagnia punctate* και από τους καρπούς των ειδών *Malotus philippinensis, Broussonetia papyrifera* της οικογένειας Moraceae (Lee, 2001) (Nowakowska, 2007).

- **Συνθετικές παρασκευές**
  - ✓ **Αλδολική συμπύκνωση Claisen Schmidt**



Πρόκειται για μια βασικά καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ μιας ακετοφαινόνης και μιας βενζαλδεΰδης, οι οποίες είναι κατάλληλα υποκατεστημένες και αντιδρούν σε ισομοριακές ποσότητες παρουσία αλκοόλης. Η αντίδραση οδηγεί στην παραλαβή προϊόντων με *trans*-διαμόρφωση του διπλού δεσμού (Bhat, *et al.*, 2005).

5.2.4 Διαρυλοπροπάνια

Τα διαρυλοπροπάνια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μια κορεσμένη ενδιάμεση αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των χαλκονοειδών.

- **Φυσικές πηγές - Βιολογικές δράσεις**

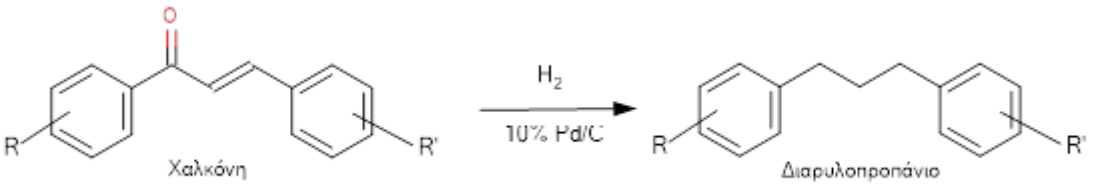
Πηγές διαρυλοπροπανίων αποτελούν διάφορα φυτικά είδη με κυριότερους εκπροσώπους πολλά είδη του γένους *Iryanthera* της οικογένειας Myristicaceae (Filho, *et al.*, 1980) (Conserva, *et al.*, 1990). Σχεδόν από όλα τα είδη *Virola* έχει απομονωθεί το βιρολάνιο, ενώ από τα είδη *Virola minutiflora και V. elongate* οι διαρυλοπροπανόλες βιρολανόλη, βιρολανόλη Β και βιρολανόλη C. Από το είδος *Combretum griffithii* έχουν απομονωθεί τα διαρυλοπροπάνια

γκριφιθάνιο A, γκριφιθάνιο B και γκριφιθάνιο C, τα οποία έδειξαν αξιόλογη κυτταροτοξική δράση (Moosophon, *et al.*, 2011). επίσης, διαρυλοπροπάνια έχουν απομονωθεί από τα είδη *Horsfieldia tetratepala* (Du, *et al.*, 2017) και *Dioscorea composita* (Yang, *et al.*, 2005). Συνθετικά παράγωγα διαρυλοπροπανίων έχουν χαρακτηριστεί ως ικανοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Vijaya Bhaskar Reddy, *et al.*, 2017) (Jang, *et al.*, 2016) αναστέλλοντας την παραγωγή νιτρικών στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7. Αμινοαλκυλιωμένα παράγωγα διαρυλοπροπανίων επέδειξαν δράση έναντι της μαλάριας (Gibhard, *et al.*, 2016), ενώ πρενυλιωμένα υδροξυλιωμένα παράγωγα διαρυλοπροπανίων, που απομονώθηκαν από το είδος *Broussonetia kazinoki* εμφανίζονται ως αξιόλογοι αναστολείς του ενζύμου τυροσινάση (Baek, *et al.*, 2009). Η πρόπολη είναι ένα ρητινώδες μίγμα, το οποίο συλλέγουν οι μέλισσες από τα άνθη των φυτών. Είναι γνωστή για πληθώρα ευεργετικών βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή, αντι-ιική, αντιμυκητιασική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική. Από την κόκκινη μεξικάνικη πρόπολη έχει απομονωθεί το 1-(2'-μεθοξυ-3',4'-διυδροξυφαινυλο)-3-φαινυλοπροπάνιο (Lotti, *et al.*, 2010).

❖ **Συνθετικές παρασκευές**

✓ **Αντίδραση αναγωγής καταλυτικής υδρογόνωσης**

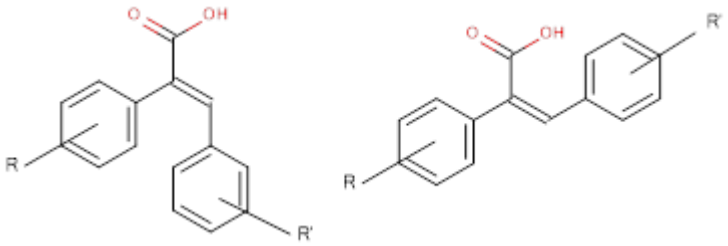
Το συνθετικό μονοπάτι για την παραλαβή των 1,3-διαρυλοπροπανίων περιλαμβάνει μια αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού της καρβονυλομάδας των χαλκονών με αντίδραση καταλυτικής υδρογόνωσης παρουσία Pd/C (10%) (Almeida, *et al.,* 1999). Σημειώνεται πως στην περίπτωση που οι χαλκόνες που περιέχουν απροστάτευτη 2-υδροξυλομάδα στο μόριο τους, με καταλυτική υδρογόνωση παρουσία Pd/C (10%), δίνουν ως τελικό προϊόν μίγμα των αντίστοιχων διυδροχαλκονών και διαρυλοπροπανίων, πιθανώς λόγω του δεσμού υδρογόνου που δημιουργείται ανάμεσα στην υδροξυλομάδα και την κετονομάδα. Αντιθέτως, η καταλυτική υδρογόνωση χαλκονών που δεν περιέχουν κάποια απροστάτευτη υδροξυλομάδα στο μόριό τους, οδηγεί στην απευθείας παρασκευή των επιθυμητών διαρυλοπροπανίων.



5.2.5 (*E*)-2,3-διφαινυλοπροπενικά οξέα

Τα συγκεκριμένα παράγωγα απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά ως συνθετικά παράγωγα και αποτελούν δομικά ανάλογα των στιλβενίων, καθώς διαφέρουν από τα τελευταία μόνο στην ύπαρξη μιας καρβοξυλομάδας στην ενδιάμεση αλυσίδα. Κατά κύριο λόγο αποτελούν ενδιάμεσα συνθετικά παράγωγα για τη σύνθεση στιλβενίων μέσω αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης, καθώς

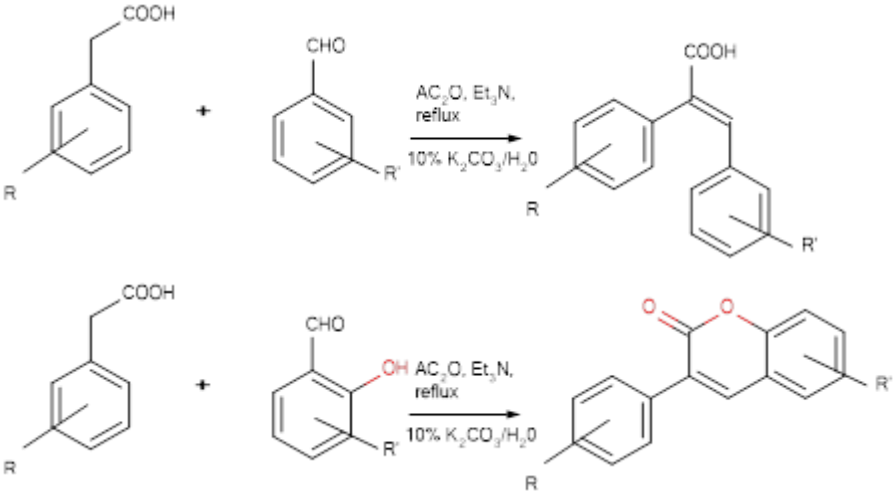
προσφέρουν ποικιλία υποκατάστασης, στερεοεκλεκτικότητα ως προς τη σύνθεση των στιλβενικών παραγώγων και ικανοποιητικές τελικές αποδόσεις.



(*E*)-2,3-διφαινυλοπροπενικά οξέα (*Z*)-2,3-διφαινυλοπροπενοϊκά οξέα

❖ **Συνθετικές παρασκευές**

✓ **Αντίδραση συμπύκνωσης Perkin's ανάμεσα σε μια βενζαλδεΰδη και ένα φαινυλοξικό οξύ (Gaukroger, *et al.*, 2001)**



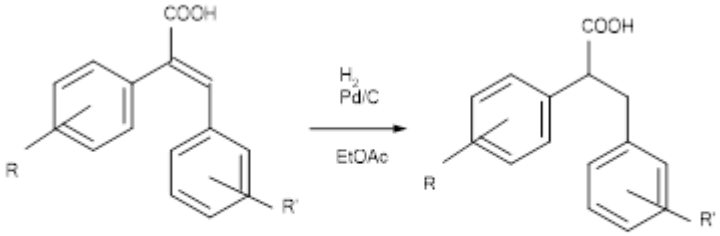
Υπογραμμίζεται πως η υποκατάσταση των αντιδρώντων βενζαλδευδών και φαινυλοξικών οξέων παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την πορεία της αντίδρασης, καθώς μπορεί να καθορίσει την ισομέρεια των παραγόμενων προϊόντων ή ακόμα και την κατηγορία τους. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση είναι εκλεκτική ως προς την παρασκευή *cis*-2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων, ενώ στην περίπτωση 2-OH-αλδευδών, η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό 3-αρυλοκουμαρινών (Xiao, *et al.*, 2012). Η διάκριση της στερεοχημείας των προϊόντων επιτυγχάνεται με χρήση της τεχνικής NMR. Η εν λόγω αντίδραση χρήζει ευρείας εφαρμογής, καθώς οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων με υψηλές αποδόσεις και δεν απαιτεί προστασία ή αποπροστασία των υδροξυλομάδων των αντιδρώντων. Το γεγονός αυτό καθιστά τη μέθοδο Perkins μια εναλλακτική αποτελεσματική οδό για τη συνθετική παρασκευή υδροξυλιωμένων στιλβενίων, έπειτα από αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης της ενδιάμεσης αλυσίδας, καθώς παρέχεται και η δυνατότητα παραλαβής *cis* ή/και *trans* παραγώγων, ανάλογα με την υποκατάσταση (Sun, *et al.*, 2010).

5.2.6 (*E*)-2,3-διφαινυλοπροπανοϊκά οξέα

Τα εν λόγω παράγωγα αποτελούν ανηγμένα ανάλογα των 2,3-διαφαινυλοπροπενικών οξέων και αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους και μια κορεσμένη ενδιάμεση αλυσίδα με υποκατάσταση καρβοξυλομάδας. επίσης, απαντώνται ως συνθετικά παράγωγα χωρίς να έχει μελετηθεί ιδιαιτέρως η βιολογική τους δραστικότητα.

- **Συνθετικές παρασκευές**
  - ✓ **Αντίδραση αναγωγής του ενδιάμεσου διπλού δεσμού**
    - ✓ **Μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης**

Η στερεοεκλεκτική υδρογόνωση των (*E*)-2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων υπό τη συνύπαρξη συγκεκριμένων υποκαταστατών, έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά με χρήση καταλυτικής υδρογόνωσης με καταλύτη Pd/Al_2O_3, τροποποιημένο με κινχονιδίνη (Szollosi, 2012).



6 Ελληνική χλωρίδα

Η Ελλάδα, λόγω της γεωγραφικής της θέσης και των έντονων γεωλογικών και κλιματολογικών αντιθέσεων που παρουσιάζει θεωρείται, δεδομένης της έκτασής της που αγγίζει τα 132.000 km^2, πως εμφανίζει αξιοσημείωτη ποικιλότητα ειδών, οικοσυστημάτων και τοπίων.

Ο ελλαδικός χώρος διαθέτει από τις πλουσιότερες χλωρίδες αναλογικά με την έκτασή του, απαριθμώντας τον μεγαλύτερο αριθμό φυτικών ειδών και τα περισσότερα ενδημικά είδη στην Ευρώπη (6.000 είδη από τα οποία 950 εξαπλώνονται μόνο στη χώρα μας). Σε κάθε χίλια τετραγωνικά χιλιόμετρα αναλογούν 42 είδη, ενώ σε αντίστοιχες περιοχές με μεσογειακό κλίμα, όπως στην Καλιφόρνια και στη Ν.Δ. Αυστραλία αντιστοιχούν περίπου 12 είδη, παρότι εκτείνονται σε τριπλάσια και τετραπλάσια επιφάνεια αντίστοιχα. Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει συνολικά 5752 είδη φυτών και 1893 υποείδη (ιθαγενή και επιγενή), 6600 taxa, 1072 γένη και 185 οικογένειες και ο πλούτος της μπορεί να συγκριθεί μόνο με αυτόν της χλωρίδας του Ακρωτηρίου της Νότιας Αφρικής, μιας περιοχής που χαρακτηρίζεται από τη χλωριδική της ποικιλότητα (67 είδη ανά 1000 km^2). Πιο συγκεκριμένα στον ελλαδικό χώρο φύονται πτεριδόφυτα, γυμνόσπερμα, αγγειόσπερμα, με πιο πλούσια τα τελευταία που περιλαμβάνουν 165 οικογένειες, 1036 γένη, 5653 είδη, 1870 υποείδη και 6492 taxa.

Ο μεγάλος αριθμός ειδών της ελληνικής χλωρίδας οφείλεται αρχικά στο γεγονός ότι κατά την περίοδο των παγετώνων οι χερσόνησοι της Ν. Ευρώπης λειτούργησαν σαν καταφύγιο για τα φυτά, λόγω του σχετικά σταθερού κλίματος που διέθεταν. Αντιθέτως, η Β. Ευρώπη αποικήθηκε από φυτά μετά το τέλος της παγετωνικής περιόδου, επομένως δεν υπήρξε ο απαραίτητος χρόνος για την εξέλιξη των φυτών. Συνεπώς στην ελλαδική χλωρίδα συναντάμε «αρχαϊκά είδη», δηλαδή είδη που διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα για εκατομμύρια χρόνια, όπως το *Asyneuma giganteum* στη Ρόδο και την Κάρπαθο. Επίσης, συναντάμε πολλά είδη λόγω διαδικασιών φυσιολογικής διασποράς από άλλες περιοχές, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την *Centaurea pumilla* που φύεται στην Κρήτη, αλλά συναντάται στην Ασία και την Αφρική. Οι γεωλογικές μεταβολές, έπαιξαν εξίσου καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία νέων φυτικών ειδών. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία οροσειρών ή ακόμα και νησιών, τα οποία κατά διαστήματα ήταν ενωμένα με την ξηρά ή και μεταξύ τους, σε συνδυασμό με ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες, επέτρεψαν την εξάπλωση των φυτικών ειδών στον ελλαδικό χώρο. Αντίστοιχα, χρονικοί περίοδοι απομόνωσης των νησιών και κατά συνέπεια δημιουργίας γεωγραφικών εμποδίων, οδήγησαν στην απομόνωσή των φυτικών οργανισμών για μεγάλα χρονικά διαστήματα ευνοώντας την διαφοροποίηση και τη δημιουργία νέων ειδών. Η *Campanula reiseri* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της συγκεκριμένης φυσικής διαδικασίας στα νησιά του Αιγαίου.

Οι περιοχές στις οποίες χωρίζεται γεωργαφικά ο ελληνικός χώρος και οι οποίες διαφοροποιούνται φυτοχημικά είναι τα νησιά του Ιονίου, η Βόρεια και νότια Πίνδος, η

Πελοπόννησος, η Στερεά Ελλάδα, η Ανατολική Κεντρική Ελλάδα, η Βόρεια Κεντρική Ελλάδα, η Βορειοανατολική Ελλάδα, τα νησιά του Βορείου Αιγαίου, τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου, οι Κυκλάδες, η Κρήτη, η Κάρπαθος και τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου. Περισσότερα φυτά φύονται στη Βορειοανατολική Ελλάδα και λιγότερα αριθμητικά στις Κυκλάδες. Συνοψίζοντας, οι πιο πλούσιες περιοχές είναι οι ηπειρωτικές, συγκρινόμενες με τις νησιωτικές.

Λόγω του ορεινού χαρακτήρα της χώρας και των πολλών νησιών, δημιουργούνται συνθήκες απομόνωσης και ενδημισμού, με αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό των ειδών και των υποειδών να είναι ενδημικό. Η ενδημική χλωρίδα περιλαμβάνει 1462 taxa, 1278 ενδημικά είδη και 452 ενδημικά υποείδη. Ενδημικές οικογένειες φυτών δεν υπάρχουν, αλλά υπάρχουν 8 ενδημικά γένη και πιο συγκεκριμένα τα γένη *Hymenonema Cass*. (Asteraceae), *Jankaea Boiss* (Gesneriaceae), *Leptoplax O.E. Schulz* (Brassicaceae), *Lutzia Gand* (Brassicaceae), *Petromarula R.Hedw* (Campanulaceae), *Phitosia Kamari & Greuter* (Asteraceae) και *Thamnosciadium Hartvig* (Apiaceae). Τα περισσότερα ενδημικά είδη, υποείδη και taxa φύονται κατά φθίνουσα σειρά στην Πελοπόννησο, την Κρήτη και τη Στερεά Ελλάδα, ενώ τα λιγότερα εντοπίζονται στα νησιά του Βορείου Αιγαίου. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι η Κρήτη φιλοξενεί τον μεγαλύτερο αριθμό τοπικών ενδημικών ειδών, δηλαδή ειδών που φύονται αποκλειστικά στα όριά της.

Η πιο πλούσια οικογένεια φυτών είναι η οικογένεια Asteraceae, η οποία περιλαμβάνει 113 γένη και 749 είδη και αποτελεί το 13% όλων των ελληνικών φυτικών ειδών. Η δεύτερη πιο πλούσια οικογένεια είναι η Poaceae (7,6%) και ακολουθούν οι Fabaceae, Caryophylaceae, Brassicaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Rosaceae, Boraginaceae, Rubiaceae. Σε μερικές μάλιστα οικογένειες ο αριθμός των ειδών είναι πάρα πολύ μεγάλος. Για παράδειγμα η οικογένεια Leguminosae, η οποία περιλαμβάνει σημαντικό αριθμό δρογών με οιστρογονική δράση, έχει 540 εκπροσώπους στην ελληνική χλωρίδα (Dimopoulos P.;*et al*, 2016, Μιτάκης; 2014).

Παρ' ότι λοιπόν η Ελλάδα αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα κέντρα πλούσιας χλωριδικής ποικιλότητας, γεγονός που την κατατάσσει στις θερμές περιοχές βιοποικιλότητας του πλανήτη ('biodiversity hotspots'), ελάχιστες είναι οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που συσχετίζουν φυτά της ελληνικής χλωρίδας με την οστεοπόρωση. Για το λόγο αυτό, αποτέλεσε αποκλειστική πηγή αναζήτησης των φυτοχημικών ειδών που μελετώνται στην παρούσα διατριβή.

6.1 Περιγραφή μελετώμενων φυτικών ειδών

6.1.1 Γένος *Dorycnium*

Το γένος *Dorycnium* (canary clovers) περιλαμβάνει φυτά, που κυμαίνονται σε μορφή ανάπτυξης από πολυετείς πόες ως θάμνους, και συχνά αναφέρονται ως «ημιξυλώδη» (Allen,

et al., 1981). Βιβλιογραφικές αναφορές, βάση φυλογενετικών μελετών, υποστηρίζουν πως τα γένη *Dorycnium* και *Tetragonolobus* δεν μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το *Lotus* (Degtjareva, *et al.*, 2006). Αποτελείται από 12 είδη, ανήκει στην οικογένεια Leguminosae και εκτείνεται από τη Μεσόγειο έως και τα Κανάρια Νησιά. Ανάμεσα στο γένος *Dorycnium* εντοπίζονται τα είδη *D. axilliflorum*, *D broussonetii*, *D eriophthalmum*, *D fulgurans*, *D graecum*, *D herbaceum, D sanguineum*, *D spectabile*, *D strictum*, ενώ τα πιο διαδεδομένα είδη είναι τα *D. hirsutum*, *D. rectum* και *D. pentaphyllum* που απαντώνται στη μεσογειακή πλευρά της Ευρώπης, στη Βόρειο Αφρική και στη Δυτική Ασία. Τα φυτά του γένους *Dorycnium* βρίσκονται συνήθως σε περιοχές με χαμηλή γονιμότητα εδάφους, ιδιαίτερα σε αμμώδη εδάφη (Allen, *et al.*, 1981), ενώ πιο συγκεκριμένα τα συναντάμε σε βραχώδεις περιοχές, στέπες, μακία (μεσογειακή θαμνώνες), φυλλοβόλα δάση, κωνοφόρα δάση, λιβάδια ή βοσκότοπους, ακρογιαλιές και σε μέρη κατά την περίοδο της αγρανάπαυσης. Συχνά βρίσκονται σε υψόμετρο άνω των 1000 m πάνω από τη στάθμη της θάλασσας με εξαίρεση τα *D. hirsutum* (222 m) και *D. rectum* (100 m) που εμφανίζονται πιο συχνά σε χαμηλότερα υψόμετρα (Woodgate, et al., 1999).

Θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την καλλιέργεια βοσκοτόπων με σκοπό να παρέχουν άλλα οφέλη για τα συστήματα ζωικής παραγωγής. Η ικανότητα των ειδών του γένους *Dorycnium* να σταθεροποιούν τα επίπεδα αζώτου στο έδαφος είναι ένας μηχανισμός που δεν έχει παρατηρηθεί από κάποιο άλλο γένος και μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της γονιμότητας του εδάφους (Bell, *et al.*, 2008).

Όσον αφορά στη βιολογική τους δράση, αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση επέδειξαν κλάσματα πλούσια σε προανθοκυανιδίνες προερχόμενα από εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium rectum* (Sivakumaran, *et al.*, 2004), το οποίο επίσης χρησιμοποιείται για την αναζωογόνηση των βοσκοτόπων και τη διατήρηση των πόρων σε άνυδρα περιβάλλοντα (Wills, *et al.*, 1989), αλλά και ως εναλλακτική λύση σαν ζωοτροφή σε περιοχές με έντονη ξηρασία (Davies, *et al.*, 2003). *In vitro* μελέτες απέδωσαν ανθελμινθική δράση στο εκχύλισμα του *Dorycnium rectum*, η οποία οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του φυτού σε ταννίνες (Waghorn, *et al.*, 2001). Το *Dorycnium pentaphyllum* χρησιμοποιείται στην λαϊκή θεραπευτική της Μεσογείου με σκοπό την αντιμετώπιση των αιμορροΐδων (Rigata, *et al.*, 2007). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης μιας σείρας φυτών, που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση παθήσεων που συσχετίζονται με φλεγμονή, ανέδειξε το *Dorycnium pentaphyllum* ως ικανό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Bremnera, *et al.*, 2009).

6.1.1.1 *Dorycnium hirsutum*

Το *Dorycnium hirsutum* (hairy canary clover) είναι μια πολυετής πόα με λευκά/ροζ λουλούδια σε μασχαλιαία κεφάλια. Διανέμεται ευρέως στη Βόρειο Αφρική, τη Μέση Ανατολή

και κυρίως στη Μεσόγειο, ενώ στην Ιταλία είναι γνωστό ως «Erba Veglia" ή "Stringiamore" (Pistelli, *et al.*, 2006). Η ταξινομική του κατάταξη απεικονίζεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Ταξινομική κατάταξη του *Dorycnium hirsutum*

Εικόνα 10: ***Dorycnim hirsutum***

Βασίλειο	Plantae
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Tracheophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Υποοικογένεια	Faboideae
Φυλή	Loteae
Γένος	*Dorycnium* Mill.
Είδος	*Dorycnium hirsutum* (L.) Ser.

Μελέτες έχουν αναδείξει ότι το *Dorycnium hirsutum*, λόγω της ανθεκτικότητας του στην ξηρασία, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως τροφή για τα ζώα, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για συμπληρωματική σίτιση, όταν άλλες πηγές βοσκοτόπων δεν είναι διαθέσιμες (Waghorn, *et al.*, 1998) (Davies, *et al.*, 2003). Έχει τόσο βαθιές ρίζες, που του επιτρέπουν να εξάγει νερό από το βάθος του εδάφους κατά τη διάρκεια των περιόδων ανυδρίας και μπορεί να διατηρεί το πράσινο χρώμα των φύλλων του σε περιόδους σοβαρής ξηρασίας (Bell, *et al.*, 2006). Μελέτη των Wanjiku *et al.* έδειξε ότι το *D. hirsutum* μπορεί να εναποθέσει πολύ μεγάλο ποσοστό αζώτου στο έδαφος προσλαμβάνοντας το 98% της ποσότητας αυτού από την ατμόσφαιρα (Wanjiku, *et al.*, 1997).

Από τα υπέργεια τμήματα του φυτού έχουν απομονωθεί διάφορα γλυκοσιδικά παράγωγα της καιμπφερόλης και της κερκετίνης, ενώ εμφανίζει αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς λόγω των περιεχόμενων φλαβονολών (Pistelli, *et al.*, 2006)

6.1.2 Γένος *Cytisus*

Το γένος *Cytisus* ανήκει στην οικογένεια Leguminosae, στην υποοικογένεια των ψυχανθών και απαριθμεί περίπου 60 είδη ανθοφόρων φυτών, με πιο χαρακτηριστικά τα *Cytisus scoparius, Cytisus multiflorus, Cytisus striatus*, *Cytisus supranubius*, *Cytisus pseudoprocumbens*, *Cytisus villosus* και *Cytisus aeolicus*. Αποτελεί ένα από τα διάφορα γένη της φυλής Genisteae που συνήθως αποκαλούνται brooms (“σκούπες”). Είναι ξυλώδεις θάμνοι ή κοντά δέντρα που παράγουν λαμπερά πολύχρωμα άνθη, συχνά πολύ αρωματικά και απαντώνται στην Ευρώπη, τη Δυτική Ασία και τη Βόρεια Αφρική με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών να συναντάται γύρω από τη Μεσογειακή θάλασσα. Τα είδη *Cytisus scoparius* (scotch

broom) και *Cytisus multiflorus* (white spanish broom) έχουν χαρακτηριστεί ως επεκτατικά φυτά και λόγω της εύκολης εξάπλωσής τους απειλούν τη μείωση της φυσικής βιοποικιλότητας και επηρεάζουν την αισθητική του τοπίου. Στην περίπτωση του *Cytisus scoparius* οι επιπτώσεις είναι πιο σοβαρές, καθώς η εξάπλωσή του παρεμποδίζει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία της αναδάσωσης, παρασιτεί σε ιθαγενείς περιοχές βλάστησης αποτελώντας μια τεράστια απειλή για τις αλπικές και υποαλπικές περιοχές βλάστησης στην Αυστραλία, ενώ οι πυκνές συστάδες που δημιουργεί παρεμποδίζουν τη βοσκή των ζώων. Έτσι, η επέκτασή τους προσπαθεί να ελεγχθεί με διάφορους τρόπους (Weeds, 2016_α), (Weeds, 2016_b).

Συχνά, ως συνώνυμα του γένους αναφέρονται τα γένη *Lembotropis, Chamaecytisus, Spartocytisus*. Στην πραγματικότητα, φυλογενετικές μελέτες αποκαλύπτουν πως τα γένη *Lembotropis, Chamaecytisus, Spartocytisus* και *Calicotome* ουσιαστικά έχουν προέλθει από το γένος *Cytisus*, επομένως ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα του γένους. Αντίστοιχα είναι τα ευρήματα και για τα γένη *Genista, Teline* και *Chamaespartium*, τα οποία φαίνεται να ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα του γένους *Genista*, η οποία παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με εκείνη του *Cytisus* (Käss, *et al.*, 1997; Cristofolini, *et al.*, 2006).

Τα γένη *Cytisus* και *Genista* αναφέρεται πως είναι πλούσια σε αλκαλοειδή της κινολιζιδίνης, φλαβονοειδή (Chcd, 1994; Ken-ichi Nihei, 2002) και φαινολικά συστατικά (Luis, 2009). Πιο συγκεκριμένα, από το είδος *Cytisus multiflorus* έχουν απομονωθεί η χρυσίνη, η οριεντίνη, γλυκοσίδες της λουτεολίνης και της απιγενίνης (Pereira, *et al.*, 2012), ενώ από το *Cytisus scoparius* η φλαβόνη 6''-Ο-ακέτυλο-σκοπαρίνη, οι φλαβονόλες καιμπφερόλη, ρουτίνη, κερκετίνη, ισοραμνετίνη και οι ισοφλαβόνες γενιστεΐνη και το γλυκοσιδικό της παράγωγο σαροθναμοσίδης. Στα εκχυλίσματα των φυτών *Cytisus nigrians* και *Cytisus albus* εντοπίστηκαν οι ισοφλαβόνες γενιστεΐνη και ονονίνη (Hanganu, *et al.*, 2010a; Hanganu, *et al.*, 2010b; Raja, *et al.*, 2007), ενώ από *Cytisus pinnays* έχουν απομονωθεί παράγωγα ισοφλαβονών, φλαβονολών και φουρανοβλαβονολών (Koysomboon, *et al.*, 2006).

Αιθανολικά εκχυλίσματα του *Cytisus multiflorus* έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (Pereira, *et al.*, 2013), ενώ εκχυλίσματα του *Cytisus scoparius* επέδειξαν εξίσου ικανοποιητική δράση (Raja, *et al.*, 2007; Sundararajan, *et al.*, 2006). Ποικίλες δράσεις έχουν αποδοθεί σε διάφορα είδη του γένους, με πιο χαρακτηριστικές τη διουρητική, την αγχολυτική, την υπνωτική (Nirmal, *et al.*, 2008), την αντιπαρασιτική (Di Giorgio, *et al.*, 2008), την αντιμυκητιασική (Koysomboon, *et al.*, 2006), καθώς και την αντιδιαβητική δράση (Castro, 2001). Το μεθανολικό εκχύλισμα του *C. aeolicus* έδειξε αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου 5-LOX (Prieto, *et al.*, 2005). Αξίζει να σημειωθεί πως χρήση των ειδών του γένους αναφέρεται στην παραδοσιακή ιατρική διαφόρων λαών. Για παράδειγμα, το φυτό *Cytisus multiflorus* χρησιμοποιείται για χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική της Πορτογαλίας ως διουρητικός, αντιφλεγμονώδης, αντιυπερτασικός και αντιδιαβητικός παράγοντας (Gião, *et al.*, 2007), ενώ γενικότερες χρήσεις, με τη μορφή εγχύματος ή αφεψήματος, αναφέρονται με σκοπό την αντιμετώπιση του μεταβολικού και

ενδοκρινολογικού συνδρόμου, της υπερέντασης, των ρευματισμών, καθώς και των πονοκεφάλων (Barros, *et al.*, 2012). Επίσης, το *Cytisus scoparius* χορηγείται παραδοσιακά ως καρδιοτονωτικός, αγγειοδιασταλτικός παράγοντας αλλά και ως καθαρτικό (Kumarasamy, *et al.*, 2007). Τέλος, σημειώνεται πως στην περίπτωση του *Cytisus proliferus* (tagasaste) αναφέρεται η χρήση του στη γεωργία, για την αποκατάσταση των επιπέδων του άνθρακα στα καλλιεργούμενα εδάφη, ενώ τα εδώδιμα φύλλα του αποτελούν πηγή συμπληρωματικής ζωοτροφές για μηρυκαστικά (Wochesländer, *et al.*, 2016).

6.1.2.1 *Cytisus villosus*

Το *Cytisus villosus* Pourr (hairybroom) είναι γνωστό ως "Ilougui" και είναι το πιο διαδεμένο είδος μεταξύ των 8 ειδών που αναπτύσσονται φυσικά σε όλη την βόρεια πλευρά της Αλγερίας. Σαν συνώνυμά του εμφανίζονται τα *Cytisus triflorus* L'Hér και *Genista triflora* Rouy, ενώ η κοινή του ονομασία είναι χαμαικύτισος ο τριανθής (triflorus). Σημειώνεται ότι στο Διοσκουρίδη, με το όνομα κύτισος περιγράφονται αρκετά είδη ψυχανθών (greekflora.gr). Μια άλλη ετυμολογική προσέγγιση θέλει το λατινικό όνομα *Cytisus* να προέρχεται πάλι από την ελληνική λέξη κύτισος, προερχόμενη από την Μ. Ασία, με αβέβαιη ετυμολογική προσέγγιση. Τέλος, σύμφωνα με άλλες ετυμολογίες, το *Cytisus* εξακολουθεί να προέρχεται από την ελληνική λέξη κύτος, που σημαίνει κοιλότητα, ενώ το όνομα του είδους (*villosus*) αναφέρεται στην τριχωτή εμφάνισή του (BotanicalNames, 2016) (wikipedia). Η επιστημονική ονομασία του φυτού προτάθηκε για πρώτη φορά από το Γάλλο βοτανολόγο Pierre André Pourret (1754-1818) το 1788 (Tropicos, 2016). Το είδος *Cytisus villosus* ανήκει στην οικογένεια Leguminosae και στην υποοικογένεια των ψυχανθών και η ταξινομική του κατάταξη απεικονίζεται στον πίνακα 5 (Database, 2016).

Πίνακας 5: Ταξινομική κατάταξη του *Cytisus villosus*

Εικόνα 11: *Cytisus villosus*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Υποκλάση	Rosidae
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Υποοικογένεια	Faboideae
Φυλή	Genisteae
Γένος	*Cytisus* Desf.
Είδος	*Cytisus villosus* Pourr.

Το συγκεκριμένο είδος φύεται σε βραχώδη εδάφη, ξέφωτα δασών, λιβάδια, πλαγιές, πρανή δρόμων και αναπτύσσεται σε υψόμετρο από 400 έως 2200 μ. Είναι ένας όρθιος αιωνόβιος ξυλώδης στη βάση θάμνος ύψους 1-2 m, χωρίς αγκάθια. Το χρώμα του φλοιού φέρει το πράσινο χρώμα της ελιάς και τα νεαρά κλαδιά είναι λευκά με μεταξένια υφή σχηματίζοντας μορφή πενταγώνου (περισσότερο ή λιγότερο κυλινδρικό) με αμβλείες γωνίες. Κατά τη χειμερινή περίοδο, τα ποώδη τμήματα του φυτού ξηραίνονται και μαυρίζουν, ενώ ζωντανά παραμένουν μόνο τα υπόγεια ξυλώδη τμήματα. Τα φύλλα του είναι λεία, με μίσχο μακρύ 2-8 mm, είναι τοποθετημένα σε τριάδες, με πυκνές μεταξένιες τρίχες, τα μεσαία φύλλα είναι σχεδόν δύο φορές μακρύτερα από τα πλαϊνά και το χρώμα τους σκουραίνει όσο πλησιάζει τον άξονα, ενώ όσο απομακρύνεται είναι πιο άσπρο-μεταξένιο. Τα φυλλάρια είναι επιμήκη και ωοειδή χωρίς παράφυλλα. Τα λουλούδια έχουν μήκος 5-10 mm και συγκεντρώνονται σε επιμήκεις συστάδες, σε αριθμούς 1-3 σε κάθε μασχάλη των ανώτερων φύλλων, με πέταλα κίτρινου χρώματος. Ο καρπός είναι πεπλατυσμένος χέδρωψ (Ait-KaciAourahoun, *et al.*, 2015), (greekflora.gr) (USDA, 2016).

Γεωγραφικά εξαπλώνεται στη Βόρεια Αφρική (Αλγερία, Μαρόκο, Τυνησία) και στη Νοτιοανατολική Νοτιοδυτική Ευρώπη (Αλβανία, Ελλάδα, Ιταλία, Πρώην Γιουγκοσλαβία και Γαλλία, Ισπανία). Πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα, το συναντάμε στη Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, Βόρεια Κεντρική Ελλάδα, Βόρεια Πίνδος, Νότια Πίνδος, Ανατολική Κεντρική Ελλάδα, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησος, Νησιά Ιονίου, Κυκλάδες, Ανατολικό Αιγαίο, Δυτικό Αιγαίο, στον Πάρνωνα και στο Πήλιο (greekflora.gr).

Δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές ως προς τη φυτοχημική ανάλυση του *Cytisus villosus.* Ανάλυση του αιθερίου ελαίου ανέδειξε τη λιναλοόλη, την α-τερπινεόλη, τη γερανιόλη και την ευγενόλη ως τα κύρια συστατικά του (Aourahoum, *et al.*, 2013). Ένας

πρωταρχικός φυτοχημικός έλεγχος ανέδειξε την παρουσία τερπενίων, ταννινών, φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων, αλκαλοειδών και κουμαρινών στο φυτό (Ait-KaciAourahoun, *et al.*, 2015), ενώ πρόσφατη μελέτη εντόπισε στο είδος ένα νέο ισοφλαβάνιο την (*3S, 4S*)-2′,4′-διυδροξυ-3′-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυισοφλαβαν-4-όλη και ένα μονοτερπένιο (Larit, *et al.,* 2018).

Επίσης, υδατοαιθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων του φυτού εκδήλωσαν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, που πιθανότητα συνδέεται με το πλούσιο φαινολικό τους φορτίο. Στην περιοχή της Μεσογείου δεν αναφέρονται χρήσεις του φυτού στην παραδοσιακή θεραπευτική, σε αντίθεση με τη Νότια Αλγερία όπου η χρήση του είναι πολύ διαδεδομένη για την αντιμετώπιση των κοιλιακών πόνων και για την επούλωση πληγών, ενώ χρησιμοποιείται και ως αιμοστατικός και αντιμυκητιασικός παράγοντας. Επίσης, τα φύλλα του χρησιμοποιούνται και ως χρωστική / χένα για τη θεραπεία και τη βαφή των μαλλιών (Ait-KaciAourahoun, *et al.*, 2015)

6.1.3 Γένος *Hippocrepis*

Το γένος *Hippocrepis* L., είναι μέρος ενός ευρύτερου φυσικού συνόλου που αποτελείται από περισσότερα από 100 φυτικά γένη στο Βόρειο Ημισφαίριο (Heywood, 1971). Αποτελείται από περίπου 25 είδη, τα οποία κατατάσσονται στις κατηγορίες των ξυλωδών taxa, που απαντώνται στην Ιβηρική χερσόνησο, τα νησιά των Βαλεαρίδων και τη Βόρειο Αφρική και σε ετήσια φυτά που απαντώνται στις Δυτικές Μεσογειακές χώρες. (Dominquez, 1976). Τα πιο χαρακτηριστκά είδη του γένους είναι τα *Hippocrepis valentina*, *Hippocrepis comosa*, *Hippocrepis balearica*, *Hippocrepis atlantica* και *Hippocrepis areolata* (Plantlist, 2016).

Τα είδη του γένους *Hippocrepis* έχουν ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, όπως ως δευτερεύουσες καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένης της κατανάλωσης ως ζωοτροφές, ως κτηνοτροφικά και για τη σταθεροποίηση της γης. Σε μια προσπάθεια αξιολόγησης ενδεχόμενης κτηνοτροφικής αξίας ενός αριθμού φυτών, το *Hippocrepis balearica* αποδείχθηκε πως θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμη εναλλακτική πηγή ζωοτροφής, αν και η υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη θα μπορούσε να περιορίσει την θρεπτική αξία του, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (González Andrés, *et al.*, 1998). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως δεν παρουσιάζονται βιβλιογραφικές μελέτες που να αφορούν στη φυτοχημική μελέτη ή τη βιολογική αξιολόγηση φυτικών ειδών του γένους *Hippocrepis.*

6.1.3.1 *Hippocrepis comosa*

Το *Hippocrepis comosa* χαρακτηρίζεται ως μακρόβια πολυετής πόα, με κλαδιά και ξυλώδη βάση. Η ξυλώδης ρίζα του έχει τη μορφή βρύσης, καθώς εκτείνεται προς τα κάτω σε ένα βάθος 90 cm και μπορεί να εμφανίζει έντονες διακλαδώσεις. Οι βλαστοί του και ένα μεγάλο μέρος των φύλλων του διατηρούνται όλη τη χειμερινή περίοδο. Η περίοδος άνθισης διαρκεί

περίπου δύο εβδομάδες και μπορεί να ξεκινήσει από τις αρχές Μαΐου και να κρατήσει μέχρι και τις αρχές Ιουνίου. Τα άνθη συγκεντρώνονται σε αριθμούς 4-12, με μίσχο 5-10 cm. Οι λοβοί έχουν μήκος 10-30 mm, καλύπτονται από λεπτές θηλές και χωρίζονται σε 3-6 πεταλλοειδή τμήματα, από τα οποία πήρε και το όνομά του το είδος (horseshoe vetch). Το χρώμα των λουλουδιών είναι κίτρινο και μερικές φορές πορτοκαλο-κόκκινο. Τα λουλούδια συχνά στην αρχή έχουν πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα και στη συνέχεια γίνονται πιο κίτρινα καθώς ωριμάζουν, ενώ οι σπόροι του είναι μεγέθους 2.6-4.2 mm και βάρους 1.5-4.0 mg. Τρεις μήνες περίπου μετά την περίοδο άνθισης, σπόροι ή τμήματα καρπών διασκορπίζονται. Ανήκει στην οικογένεια Leguminosae, ενώ η ταξινομική του κατάταξη απεικονίζεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Ταξινομική κατάταξη του ***Hippocrepis comosa***

Εικόνα 12: *Hippocrepis comoa*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Υποκλάση	Rosidae
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Υποοικογένεια	Faboideae
Φυλή	Loteae
Γένος	*Hippocrepis* L.
Είδος	*Hippocrepis comosa* L. - horseshoe vetch

Το *Hippocrepis comosa* συναντάται σε ξηρά και ασβεστολιθικά εδάφη, κυρίως σε βοσκοτόπους, καθώς και σε βράχους σε υψόμετρο 60-200 m. Η διανομή του περιορίζεται αποκλειστικά στην Ευρώπη, και μάλιστα στη Νοτιοδυτική της πλευρά και εκτείνεται από την Ισπανία, τη Σαρδηνία και την Ελλάδα ως και τη Βόρεια Γερμανία και την Αγγλία. Είναι η αποκλειστική τροφή για τις κάμπιες *Chalkhill Blue* και *Adonis Blue* και έχει μια συμβιωτική σχέση με ορισμένα βακτήρια του εδάφους, τα οποία σχηματίζουν οζίδια στις ρίζες του φυτού, με σκοπό να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο. Σε μερικές περιπτώσεις το άζωτο χρησιμοποιείται από το αναπτυσσόμενο φυτό, αλλά και από γειτονικά αναπτυσσόμενα φυτά. Μια από τις λειτουργίες του είναι να σταθεροποιούν τα επίπεδα αζώτου γι' αυτό και συναντάται σε εδάφη ελλιπή σε άζωτο (Fearn, 1973)

Σε μια μελέτη που αφορούσε τη διερεύνηση της ύπαρξης νιτροαλειφατικών ουσιών σε κάποια είδη της οικογένειας Leguminosae που φύονται στην Ευρώπη, στο εκχύλισμα του *Hippocrepis comosa* καθώς και στο *Hippocrepis balearica* εντοπίστηκε το 3-νιτροπροπιονικό οξύ (3NPA) μια ουσία που έχει χαρακτηριστεί τοξική και ίσως γι αυτό δεν καταναλώνεται από

άλλα είδη ζώων. Επίσης, από το εκχύλισμα του *Hippocrepis comosa* απομονώθηκαν και γλυκοσιδικά παράγωγα της νιτροπροπανόλης (Salem, *et al.*, 1995).

6.1.4 Γένος *Ceratonia*

Το γένος *Ceratonia* ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών (Fabaceae) της τάξης Rosales. Η χαρουπιά γενικά τοποθετείται στη φυλή Cassieae της υποοικογένειας Caesalpinioideae ωστόσο, αρκετοί συγγραφείς αμφισβητούν τη θέση του γένους *Ceratonia* στη φυλή Cassieae (Goldblatt, 1981). Το γένος *Ceratonia* θεωρείται ως ένα από τα πιο αρχαϊκά της οικογένειας των ψυχανθών, ενώ ταξινομικά είναι εντελώς απομονωμένο από όλα τα άλλα γένη της οικογένειας του (Hillcoat, *et al.*, 1980) (Tucker, 1992). Για πολύ καιρό το γένος θεωρούταν μονοτυπικό, μέχρι που το 1980 περιεγράφηκε ένα δεύτερο είδος η *Ceratonia oreothauma* και δύο υποείδη της, το υποείδος*oreothaumal,* ιθαγενές του Ομάν της Αραβίας και το υποείδος *somalensis* από τη Βόρειο Σομαλία. Μορφολογικά η *Ceratonia oreothauma* διαφέρει αρκετά από τη *Ceratonia siliqua*, ενώ αναφέρεται και πιθανώς ως η αρχαία πρόγονός της (Hillcoat, *et al.*, 1980).

6.1.4.1 *Ceratonia siliqua*

Το χαρούπι (ή χαρουπιά) είναι ένας αειθαλής θάμνος ή δέντρο ιθαγενές στην περιοχή της Μεσογείου και πιο συγκεκριμένα συναντάται στην Ισπανία, το Μαρόκο, την Ιταλία, την Πορτογαλία, την Ελλάδα, την Αλγερία και την Τυνησία, όπου καλλιεργείται κυρίως σε φτωχά ασβεστολιθικά εδάφη. Το επιστημονικό του όνομα *Ceratonia siliqua* L. προέρχεται από την ελληνική λέξη “κέρας” που σημαίνει, κέρατο και τη λατινική λέξη “siliqua”, υποδηλώνοντας τη σκληρότητα και το σχήμα του φλοιού. Η κοινή του ονομασία χαρούπι, προέρχεται από την εβραϊκή λέξη “kharuv”. Το χαρούπι είναι επίσης γνωστό ως St. John’s bread, σε σχέση με την εικαζόμενη χρήση του από τον Άγιο Ιωάννη τον Βαπτιστή ως τροφή. Ανήκει στην υποοικογένεια Caesalpinaceae, και στην ευρύτερη οικογένεια Leguminoseae (Fabaceae) και στον πίνακα 7 περιγράφεται η ταξινομική του κατάταξη.

Πίνακας 7: Ταξινομική κατάταξη της ***Ceratonia*** *siliqua*

Εικόνα 13: *Ceratonia siliqua*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Superdivision	Embryophyta
Διαίρεση	Magnoliophyta

Κλάση	Magnoliopsida
Υποκλάση	Spermatophytina
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Υποοικογένεια	Caesalpinaceae
Φυλή	Cassieae
Γένος	*Ceratonia* L.
Είδος	*Ceratonia siliqua* L. - St. John's bread, carob

Το χαρουπόδεντρο φθάνει τα 10 έως 15 m ύψος, φέρει ένα ευρύ ημισφαιρικό στέμμα, έχει παχύ κορμό με καφέ τραχύ φλοιό και ανθεκτικά κλαδιά. Τα φύλλα του έχουν μήκος 10-20 εκατοστά, είναι πτεροειδή, σε μορφή εν αλλάξ, με ή χωρίς ένα τερματικό φύλλο. Τα φυλλάρια έχουν μήκος 3-7 cm, έχουν σχήμα ωοειδές έως ελλειπτικό, με 4-10 κανονικά απέναντι ζεύγη, είναι δερματώδη, σκουροπράσινα και γυαλιστερά, από την πάνω πλευρά και ανοιχτό πράσινο από την κάτω. Το χαρούπι δεν ρίχνει τα φύλλα του το φθινόπωρο, αλλά μόνο τον Ιούλιο κάθε δεύτερου έτους, και ανανεώνει μόνο εν μέρει τα φύλλα του την άνοιξη (Απρίλιο και τον Μάιο) (Diamantoglou, 1981). Τα άνθη είναι μικρά και πολυάριθμα, μήκους 6-12 mm, σπειροειδώς διατεταγμένα κατά μήκος του άξονα της ταξιανθίας, με χρώμα πράσινο-κόκκινο. Ο καρπός είναι επιμήκης, με αδιάρρηκτο περίβλημα, ευθύς ή καμπυλωτός μήκους 10-30 cm, με 1/5 έως 3/5 cm πλάτος και περίπου 1 cm πάχος με αμβλεία ή υποξεία κορυφή. Ο φλοιός είναι χρώματος καφέ με ζαρωμένη επιφάνεια και δερματώδη υφή κατά την ωρίμανση (Grau, *et al.*, 1997). Έχει μεγάλη αγρονομική και εμπορική αξία, καθώς χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς, όπως για την πρόληψη της διάβρωσης του εδάφους και την αναδάσωση, στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικός παράγοντας ή ως υποκατάστατο σοκολάτας για την παρασκευή τροφίμων (γλυκά, μπισκότα, τσίχλες), στην παραγωγή αλκοόλης, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του καρπού του σε σάκχαρα, ως καλλωπιστικό φυτό, αλλά και στην ανθρώπινη διατροφή και τη διατροφή των ζώων (Tous, *et al.*, 2009) (Khair, *et al.*, 2001). Το πλέον διαδεδομένο προϊόν του χαρουπιού που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από το ενδοσπέρμιο του καρπού (galactomannan). Ο πολυσακχαρίτης αυτός ή αλλιώς «Tragasol», χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εμπορικών προϊόντων ως πυκνωτικό, σταθεροποιητής, συνεκτικός και πηκτικός παράγοντας ή ως μέσο διασποράς, βρίσκοντας εφαρμογή πέρα από τη βιομηχανία τροφίμων και στην κοσμετολογία, φαρμακευτική κ.α. (Graus, *et al.*, 1997).

Βάση μελετών, ο καρπός του χαρουπιού περιέχει υψηλά επίπεδα υδατανθράκων, αξιόλογες ποσότητες πρωτεΐνης, χαμηλά επίπεδα λίπους, αμινοξέα, σάκχαρα, οργανικά οξέα, καθώς επίσης και υψηλά επίπεδα πολυφαινολών και ταννίνες (προανθοκυανιδίνες και γαλλοταννίνες και ελλαγιταννίνες) (Avallone, *et al.*, 1997) (Ayaz, *et al.*, 2007). Στον καρπό και ιδιαίτερα στα νεαρά φύλλα του φυτού έχουν εντοπιστεί ουσίες που δείχνουν να έχουν την ικανότητα να συνδέονται στους κεντρικούς και περιφερικούς βενζοδιαζεπινικούς υποδοχείς αναδεικνύοντας πιθανή χρήση του φυτού για την ανάπτυξη αγχολυτικών και ηρεμιστικών παραγόντων (Avallone, *et al.*, 2002).

Τα εκχυλίσματα από τους καρπούς και τα φύλλα του χαρουπιού ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του ήπατος ποντικού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού αποδείχθηκε πιο δραστικό στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T1 κυττάρων, γεγονός που πιθανώς συσχετίζεται με την αυξημένη περιεκτικότητά τους σε γαλλικό οξύ και ανάλογά του, καθώς και στην ύπαρξη άλλων φλαβονοειδών, συγκρινόμενο με το εκχύλισμα των καρπών (Corsi, *et al.*, 2002). Σε άλλη μελέτη εκχυλίσματα των καρπών του φυτού επέδειξαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (Kumazwa, *et al.*, 2002).

Ένα προϊόν του χαρουπιού (carbon fibre) που παράγεται έπειτα από μια ειδική επεξεργασία του καρπού του (Requejo Marco, *et al.*, 1994) και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε αδιάλυτες φυτικές ίνες (ίνες χαρουπιού) έδειξε αξιόλογη αντιυπερχολεστερολεμική δράση σε μοντέλο πειραματοζώων (Perez-Olleros, *et al.*, 1999) (Perez-Olleros, *et al.*, 1999), καθώς και σε δύο κλινικές δοκιμές (Zunft, *et al.*, 2001) (Zunft, *et al.*, 2003). Ουσιαστικά το carbon fibre παράγεται από υδατική εκχύλιση της πούλπας του καρπού του χαρουπιού, με σκοπό την απομάκρυνση των διαλυτών υδατανθράκων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το περιεχόμενο των διαιτητικών ινών από 30% σε 40% (Haber, 2002).

Φυτοχημική μελέτη του carob fibre έδειξε να περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό γαλλικό οξύ (42%), το γαλλικός μεθυλεστέρα του (1%) και τρεις γαλλοταννίνες (29%). Από τα φαινολικά συστατικά, το κιναμμωμικό οξύ φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (1%), ενώ από την κατηγορία των φλαβονοειδών, οι ραμνοσίδες της μυρικετίνης και της κερκετίνης φάνηκε να είναι τα κυρίαρχα συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί αρκετά φαινολικά οξέα (π-κουμαρικό, φερουλικό, συριγκικό) φλαβόνες (απιγενίνη, χρυσοεριόλη, τρισετίνη), φλαβονόλες (κερκετίνη, ισοραμνετίνη, μυρικετίνη, καιμπφερόλη) και τα σακχαριδικά τους παράγωγα, η ναριγενίνη και η γενιστεΐνη, καθώς και αρκετά παράγωγα γαλλοταννινών (Owen, *et al.*, 2003) (Rakib, *et al.*, 2010).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια συγκριτική μελέτη, ως προς το φυτοχημικό περιεχόμενο, που πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα των καρπών της *Ceratonia siliqua* και διαφόρων προϊόντων που προκύπτουν από την επεξεργασία των καρπών, όπως το carob fibre-εμπλουτισμένο με αδιάλυτες φυτικές ίνες, το αλεύρι χαρουπιού καβουρδισμένο και μη και το σιρόπι. Σε πρώτο επίπεδο, το εκχύλισμα των καρπών φάνηκε να είναι το πλουσιότερο σε φαινολικό περιεχόμενο, αποτελούμενο κυρίως από γαλλικό οξύ, ταννίνες, γλυκοσίδες φλαβονολών και ίχνη ισοφλαβονών. Από τα σκευάσματα που αναλύθηκαν το carob fibre εμφανίζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκοσίδες φλαβονολών και υδρολυόμενες ταννίνες, ενώ τα ψημένα προϊόντα περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό γαλλικού οξέος (Papagiannopoulos, *et al.,* 2004).

Από το βουτανολικό εκχύλισμα από τις κοτυληδόνες, δηλαδή τους σπόρους του φυτού, έχουν απομονωθεί *C*- και *O*- γλυκοσίδες φλαβονοειδών (Batista, *et al.*, 1993) (Gohar, *et al.*, 2009), ενώ στους σπόρους του φυτού επίσης έχουν εντοπιστεί λιπαρά οξέα (λινολεϊκό, ολεϊκό,

παλμιτικό, στεαρικό), τοκοφερόλες και φυτοστερόλες (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη, 7-αβεναστερόλη, 7-στιγμαστερόλη και χοληστερόλη) (Matthaus, *et al.*, 2011).

Οι κυριότεροι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στο εκχύλισμα του κορμού του φυτού είναι το γκεντισικό οξύ, η (-) επικατεχίνη και το γαλλικό οξύ, στις οποίες οφείλονται και η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, ενώ η αντικαρκινική δράση που εκδήλωσε σε καρκινικές σειρές στήθους και εντέρου οφείλεται κατά κύριο λόγω στην επικατεχίνη και το γκεντισικό οξύ (Custódio, *et al.*, 2013). Μελέτη των Balaban *et al.* κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το ξύλο είναι πλούσιο σε υδρολυόμενες ταννίνες, στις οποίες το γαλλικό οξύ συνδυάζεται με γλυκόζη ή άλλα σάκχαρα και σκελετούς, ενώ γενικότερα το ξύλο του φυτού χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε γαλλοτανίνες και προκυανθυανιδίνες (Balaban, 2004).

Από τα φύλλα της *Ceratonia siliqua* έχουν απομονωθεί γαλλικό οξύ, ισοκερκετίνη, αφζελίνη, κερσιτρίνη, καιμπφερόλη, κερκετίνη, καθώς και παράγωγα γαλλοτανινών (Eldahshan, 2011). Επίσης, μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων της *Ceratonia siliqua* έδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, ενώ από τους περιεχόμενους μεταβολίτες, οι ουσίες μυρισιτρίνη, γαλλικό οξύ, ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και η ισοκερκετίνη φάνηκαν να εκδηλώνουν τη μεγαλύτερη δραστικότητα (Aissani, *et al.*, 2012).

Το χαρούπι χρησιμοποιείται σε πολλές αραβικές χώρες για την παρασκευή ενός δημοφιλούς ποτού που καταναλώνεται κυρίως κατά το μήνα του Ραμαζανιού, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την προετοιμασία παραδοσιακών Αραβικών ειδών ζαχαροπλαστικής (Mhaisen, 1991). Ο φλοιός και τα φύλλα του δέντρου χρησιμοποιούνται στην τουρκική λαϊκή θεραπευτική ως αντιδιαρροϊκοί και διουρητικοί παράγοντες (Baytop, 1984), οι καρποί του στην περιοχή της Ιταλίας χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αντιβηχικό (Amico, *et al.*, 1997), ενώ αποχρεμπτικές ιδιότητες έχει και το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού (Rood, 2013). Επίσης, μελέτες έχουν αποδώσει αντιοξειδωτική ικανότητα στους καρπούς, η οποία οφείλεται στην παρουσία πολυφαινολών, κυρίως συμπυκνωμένων ταννινών. Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων των φύλλων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η *Ceratonia* μπορεί να δρα σαν χημειοπροστατευτικός παράγοντας, προσφέροντας αποτελεσματική προστασία από τις ελεύθερες ρίζες και είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (Hajaji, *et al.*, 2010).

❖ Χαρουπάλευρο

Το χαρουπάλευρο προέρχεται από τον καρπό του φυτού έπειτα από την απομάκρυνση των σπόρων του. Έτσι, τα προκύπτοντα δείγματα κόβονται σε μικρότερα κομμάτια, ψήνονται και τελικά αλέθονται σε μια λεπτή σκόνη που ονομάζεται αλεύρι. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κατά τη διαδικασία καβουρδίσματος θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σταθερότητα των περιεχόμενων πολυφαινολών, προκαλώντας μείωση των υδρολύσιμων

ταννινών, και αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα σε απλές φαινολικές ενώσεις (Ortega, *et al.*, 2009).

Φυτοχημική μελέτη του χαρουπάλευρου έχει αναδείξει την ύπαρξη μετάλλων, βιταμινών, λιπαρών οξεών και κυρίως φαινολικών ουσιών (γαλλικό οξύ, πυρογαλλόλη, πρωτοκατεχικό οξυ, χλωρογενικό οξύ, κατεχίνη, κατεχόλη, κιναμμωμικό οξυ, καφεΐνη, βανιλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, κουμαρίνη), γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση (Kamal, *et al.*, 2013). Ουσιαστικά έχουν εντοπιστεί τρείς διαφορετικές ομάδες φαινολικών ομάδων, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Το κυρίαρχο προϊόν είναι το. γαλλικό οξύ, του οποίου η ποσότητα διαφέρει ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες, πιθανώς λόγω μικροδιαφορών κατά το καβούρδισμα (θερμοκρασία και έκθεση στον αέρα). Από τα φλαβονοειδή σε μεγαλύτερη ποσότητα εντοπίστηκε η μυρικετίνη και η λουτεολίνη, ενώ από τους γλυκοσίδες ο ραμνοσίδης της μυρικετίνης. Επίσης, ανιχνεύτηκαν και δύο αλκαλοειδή, η καφεΐνη και η θεοβρωμίνη σε πολύ μικρή ποσότητα, γεγονός που στρέφει ακόμη περισσότερο το ενδιαφέρον ως προς τη χρήση του ως υποκατάστατο του κακάο (Ortega, *et al.*, 2009).

6.1.5 Γένος *Psoralea*

Το γένος *Psoralea* (γαλ. Psorallier ή αγγλ. Scurfy pea) (ή Bituminaria) περιλαμβάνει φυτά τα οποία είναι δικότυλα και ανήκουν στην υποοικογένεια των Ψυχανθών ή Παπιλιονιδών (Papilionaceae) της οικογένειας των Χεδρωπών (Leguminosae). Το όνομά του προέρχεται από την ελληνική λέξη «ψωραλέος», που σημαίνει αυτός που έχει επηρεαστεί με φαγούρα ή λέπρα (Chopra, *et a*l., 2013). Αποτελείται περίπου από 130 είδη που φύονται κυρίως στη Νότια Αφρική, στην Αμερική, στην Αυστραλία, Ευρώπη και ορισμένα από αυτά είναι η *P. aphylla, P. arborea, P. bituminosa, P. corylifolia, P. drupacea, P. esculenta, P. pinnata,* και *P. morisiana.* Στην ευρωπαϊκή χλωρίδα συναντάμε μόνο δύο είδη την *P.bituminosa* και την *P. americana* (Tutin, *et al.*, 1972).

Τα φυτά αυτά είναι πόες, φρύγανα ή θάμνοι με άφθονα μαλακά ή διαφανή στίγματα από ρητινοφόρους αδενώδεις θύλακες βαρειάς συνήθως οσμής. Τα φύλλα είναι αζύγως πτεροσχιδή ή τρίφυλλα και σπάνια είναι απλά. Τα άνθη τους είναι κυανά, πορφυροιώδη ή λευκά και οργανωμένα κατά μασχαλιαίους βότρυς, στάχυς ή κεφάλια. Τα είδη του γένους χρησιμοποιούνται σαν διακοσμητικά και κτηνοτροφικά. Τα μονοετή ή διετή πολλαπλασιάζονται με σπορά, ενώ τα θαμνώδη φυτά με μοσχεύματα από ημιώριμο ξύλο. Επίσης, φύονται σε οποιοδήποτε έδαφος, εκτός από τα Νοτιοαφρικανικά είδη που απαιτούν πορώδη, καλά στραγγιζόμενα, αμμοαργιλώδη γόνιμα εδάφη (Καββαδά).

Στο γένος *Psoralea* εντοπίζονται διάφορες κατηγορίες ουσιών που οι περισσότερες εμπίπτουν στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων. Αρχικά, από την κατηγορία των φλαβονοειδών, σε υδατικά-αιθανολικά εκχυλίσματα φύλλων διαφόρων ειδών του γένους, έχουν εντοπιστεί ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονών, καθώς επίσης *O*-γλυκοσιδικά

και *C*-γλυκοσιδικά παράγωγά τους. Οι πιο συχνά απαντώμενοι μεταβολίτες είναι η οριεντίνη, η ισοοριεντίνη, *O*- και *C*-γλυκοσίδες της λουτεολίνης και χρυσοεριόλης. Αρκετές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των χαλκονών έχουν επίσης απομονωθεί και σημειώνεται πως η μπαβαχαλκόνη, που αρχικά απομονώθηκε από τους καρπούς του είδους *Psoralea corylifolia,* επιδρά στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Park, *et al.*, 2008). Από ακετονικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των *P. morisiana* και *P. bituminosa* απομονώθηκαν ισοφλαβονοειδή και διάφορα πρενυλιωμένα παράγωγά τους, όπως 8-πρενυλονταντζεΐνη, γενιστεΐνη, φορμονονετίνη (Boardley, *et al.*, 1986), πτεροκαρπάνες η μπιτουκαρπίνη A και B, η πρενυλιωμένη πτεροκαρπάνη εριμπραεδίνη C, ενώ σε μικρότερα ποσοστά απομονώθηκε το 5'-διπρενυλδιμεθυλ παράγωγό της. Χαρακτηριστικό του γένους είναι και η ύπαρξη κουμαρινών, με το ψωραλένιο και ισοψωραλένιο και τα παράγωγά τους να είναι οι κυριότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας, ενώ από είδη του γένους *Psoralea* έχει απομονωθεί και μια ακόμη κατηγορία φλαβονοειδών που ονομάζονται κουμεστάνια (Pistelli, *et al.*, 2003). Επιπροσθέτως, ύστερα από ανάλυση υδρολυόμενων εκχυλισμάτων των φύλλων ανιχνεύθηκαν οι προανθοκυανιδίνες προδελφινιδίνη, δελφινιδίνη και γλυκοσίδες της πετουνιδίνης. Κατά την ανάλυση αιθανολικών εκχυλισμάτων των ξηρών καρπών της *P. corylifolia* απομονώθηκαν τα ενεργά μεροτερπένια ψωρακορυλιφόλη F, A και μπακουχιόλη συστατικά με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Xiao, *et al.*, 2012).

Διάφορα είδη του γένους *Psoralea* είναι γνωστά στην παραδοσιακή θεραπευτική για την ανθελμινθική, αντιπυρετική, αναλγητική, αντιφλεγμονώδη, διουρητική και εφιδρωτική δράση τους και χρησιμοποιούνται σε ορισμένες ασθένειες του δέρματος, για διαταραχές της εμμήνου ρύσεως και στην περίπτωση γαστρεντερικών λοιμώξεων (Bertoli, *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα, η *P. coryfolia* χρησιμοποιείται στην εναλλακτική ιατρική σαν αφροδισιακός και τονωτικός παράγοντας, καθώς και για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών, φλεγμονωδών και δερματικών παθήσεων (Chopra, *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα το εκχύλισμα των καρπών της *P. coryfolia* (Fructus psoraleae) χρησιμοποιείται ευρέως στην κινεζική ιατρική σαν θεραπεία για τα κατάγματα, την οστεομαλακία και την οστεοπόρωση (Lim, *et al.*, 2008) (Wang, *et al.*, 2001), υποδηλώνοντας την ύπαρξη φυτοοιστρογόνων ενώσεων.

6.1.5.1 *Psoralea bituminosa*

Η *Psoralea bituminosa* (*Bituminaria bituminosa*) ή αλλιώς ασφάλτοσμος φύεται στην παραλιακή περιοχή της Μεσογείου και είναι ένα πολυετές, ποώδες φυτό, με βλαστό ύψους 50 cm, ο οποίος είναι αδενώδης, χνουδωτός, όρθιος με ισχυρή οσμή ασφάλτου. Φέρει τρίφυλλα, μακρόμισχα, με φυλλάρια ελλειψοειδή ή λογχοειδή, ακέραια με αδενώδη στίγματα. Τα παράφυλλα είναι γραμμοειδώς λογχοειδή και ελεύθερα. Επιπλέον, τα άνθη είναι κυανωπά, ανά 10-20 κατά μασχαλιαία υποσφαιρικά κεφάλια, με περίβλημα πυκνών βρακτείων και ποδίσκο 2-4 φορές μακρύτερο από το αντίστοιχο φύλλο. Οι κάλυκες είναι τριχωτοί κωδωνοειδείς με 5 ανισομήκεις, γραμμοειδώς λογχοειδείς οδόντες. Ακόμα, ο πέτασος στο συγκεκριμένο είδος

είναι προμήκης μακρύτερος των πτερύγων και της τρόπιδος. Τέλος, ο καρπός είναι έγκλειστος, ωοειδής, πεπλατυσμένος με ράμφος δύο φορές μακρύτερο. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η ταξινομική κατάταξη του φυτού.

Πίνακας 8: Ταξινομική κατάταξη της ***Psoralea bituminosa***

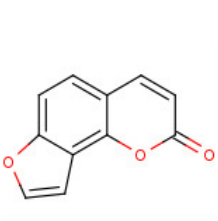
Εικόνα 14: *Psoralea bituminosa*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Tracheobionta-Vascular plants
Superdivision	Embryophyta
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Υποκλάση	Spermatophytina
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Υποοικογένεια	Caesalpinaceae
Γένος	*Bituminaria* Heist. *ex Fabr. - bituminaria*
Είδος	*Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. - Arabian pea

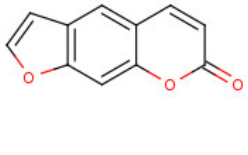
Το είδος αυτό φύεται σε ξηρά και χέρσα εδάφη σ' όλη την Ελλάδα, ενώ είναι γνωστό ως αμμουδέτης στη Βόρεια Ελλάδα. Η *Psoralea bituminosa* είναι γνωστή και με τα ονόματα τρίφυλλον, αγριοτριφύλλι, αμμουδόχορτο, βρωμούσα, βρωμόχορτο, πικροτσούκι, σίγουρο, σουφριτόχορτο, χαμοσκίδι. Άλλες περιοχές στις οποίες φύεται είναι η Μεσημβρινή Ευρώπη, η Δυτική Ασία και η Βόρειος Αφρική (Καββαδά) (Press, 2001). Η *Psoralea bituminosa* είναι το φυτό ξενιστής για ένα λεπιδόπτερο που ονομάζεται *Bembecia Psoralea*, ένα έντομο που συναντάται κυρίως στη Γαλλία και στην Ισπανία. Χαρακτηριστική είναι η ασφαλτώδης έντονη μυρωδιά που αναδίδει. Όταν το φύλλωμα τριφτεί ανάμεσα στα δάκτυλα, εκπέμπει μια χαρακτηριστική ισχυρή οσμή ναφθαλίνης, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο συνδυασμό των περιεχόμενων σεσκιτερπενίων, φαινολικών και θειούχων ενώσεων και πιθανώς υδρογονανθράκων βραχείας αλυσίδας (Tava, *et al.*, 2007). Είναι πολύ ανθεκτική σε συνθήκες ξηρασίας, έχει την ιδιότητα να σταθεροποιεί την ποσότητα μετάλλων σε μολυσμένα ή υποβαθμισμένα εδάφη (Martínez-Fernández, *et al.*, 2012) (Martínez-Fernández, *et al.*, 2011), ενώ μια από τις κυριότερες χρήσεις της είναι ως κτηνοτροφή (Sternberg, *et al.*, 2006).

Φυτοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη φουρανοκουμαρινών (ψωραλένιο, 8 και 5-μεθοξυ ψωραλένιο, αγγελικίνη), πτεροκαρπανών (μπιτουκαρπίνη Α, μπιτουκαρπίνη Β, εριμπραεδίνη C) και φλαβονοειδών (νταντζεΐνη και ισοοριεντίνη). Από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού διαπιστώθηκε η παρουσία σε μεγάλο ποσοστό

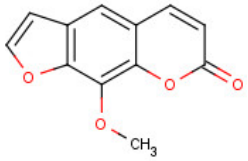
φλαβονοειδών και γλυκοζυλιωμένων παραγώγων τους. Επίσης έχουν απομονωθεί από το είδος φαινολικά οξέα (καφεϊκό και κουμαρικό οξύ), σαπωνίνες και σαπωγενίνες (μπαγιογενίνη, σογιασαπογενόλη A, B και E) (Llorent-Martínez, *et al.*, 2015) (Pistelli L., 2003) (Zobel, 1991).



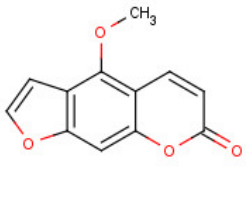
αγγελικίνη



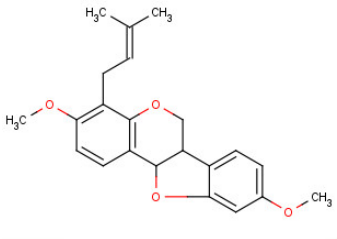
ψωραλένιο



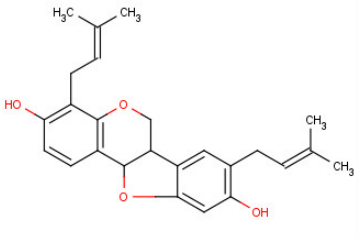
8-μεθοξυ-ψωραλένιο



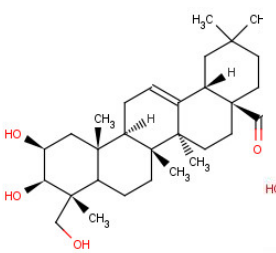
5-μεθοξυ-ψωραλένιο



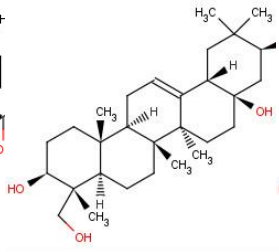
μπιτουκαρπίνη A



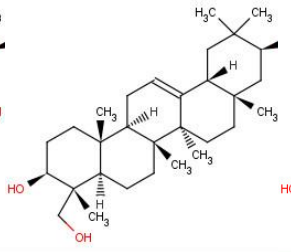
εριμπραεδίνη C



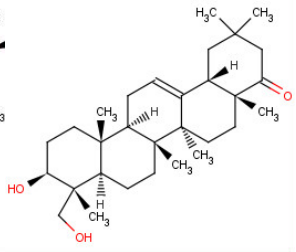
μπαγιογενινη



σογιασαπογενόλη A



σογιασαπογενόλη B



σογιασαπογενόλη E

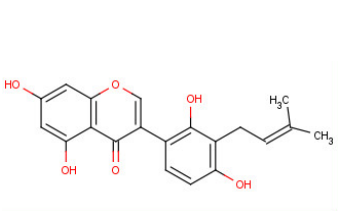
Οι δράσεις και οι χρήσεις της *Psoralea bituminosa* ήταν γνωστές από την αρχαιότητα. Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνταν είναι οι καρποί, τα φύλλα, άνθη και οι ρίζες. Συγκεκριμένα η *P. bituminosa* χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά στη θεραπεία κατά των σπασμών, της επιληψίας και του πυρετού (Azzouzi, *et al.*, 2014) για την αντιμετώπιση της λεύκης του δέρματος, ως στομαχικό, ανθελμινθικό και διουρητικό στην Αγιουβερδική ιατρική (Bertoli, *et al.*, 2004). Παραδοσιακά οι βικογιατροί συνιστούσαν το αγριοτριφύλλι για την καταπολέμηση της ψωρίασης, της λεύκης και της φαλάκρας, δράση που οφείλεται πιθανότατα στις περιεχόμενες φουρανοκουμαρίνες.

Στην εθνοφαρμακολογία του νησιού της Μαδέρας, τα φύλλα της *Psoralea bituminosa* χρησιμοποιούνται ως αφέψημα εξωτερικής χρήσης, μαζί με ιώδιο και αλκοόλη για την αποκατάσταση των μαλλιών (Rivera, *et al.*, 1995) (Freitas, *et al.*, 2013). Επίσης, οι περιεχόμενες σαπωνίνες, λόγω της αντιμικροβιακής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους απαλύνουν το δέρμα της κεφαλής κατά τη χρήση (Llorent-Martínez, *et al.*, 2015) και προστατεύουν από την απώλεια μαλλιών προκαλούμενης από μύκητες και βακτήρια. Στην ιταλική λαϊκή θεραπευτική τα φύλλα του φυτού θεωρούνται πολύ χρήσιμα ως αιμοστατικά και απολυμαντικά, καθώς και σε επουλωτικές θεραπείες (Bertoli, *et al.*, 2004).

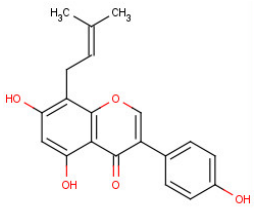
6.1.6 Γένος *Lupinus*

Το γένος *Lupinus* διαθέτει ποώδη και μερικώς ξυλώδη φυτά της οικογένειας Fabaceae. Τα λούπινα είναι ευρέως διαδεδομένα στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ μεγάλος αριθμός τους βρίσκεται στη Δυτική και Βόρεια Αμερική. Περίπου 200 είδη είναι γνωστά και ανάμεσα σε αυτά συγκαταλλέγονται τα *L. albus*,. *L. arcticus, L. luteus, L.villosus, L. nutallii, L.perennis, L. affinis* και *L. abramsii*. Πολλά είδη καλλιεργούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες σαν καλλωπιστικά και μερικά χρησιμεύουν σαν κτηνοτροφικά φυτά. Τα ποώδη λούπινα φτάνουν σε ύψος 1.25 μ και φέρουν κατώτερα παλαμοειδή φύλλα. Μέσα από υβριδισμό έχουν αναπτυχθεί κάποιες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως διακοσμητικές, (Kachlicki, *et al.*, 2005), ενώ ιδιαίτερα δημοφιλή στους κήπους είναι τα υβρίδια Russel, που έχουν ύψος περίπου ένα μέτρο και τα άνθη τους είναι πολύχρωμα. Στην Ευρώπη τα είδη του λούπινου έχουν μεγάλο ύψος (π.χ. το white lupine, ή wolf bean, *Lupinus albus*) και καλλιεργούνται για την εξασφάλιση αζώτου σε άλλα συγκαλλιεργούμενα φυτά κατά τη χειμερινή περίοδο. Ο όρος λούπινο από το λατινικό “wolf”, προέρχεται από την εσφαλμένη πεποίθηση ότι τα φυτά απορροφούν στοιχεία από το έδαφος. Στην πραγματικότητα ισχύει το αντίθετο, καθώς τα λούπινα ενισχύουν τη γονιμότητα του εδάφους με το να μετατρέπουν το άζωτο της ατμόσφαιρας σε τέτοια μορφή ώστε να είναι χρήσιμο για τα φυτά.

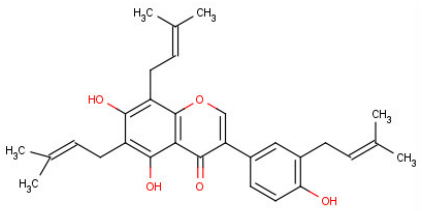
Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα τριών ειδών του γένους *Lupinus* και πιο συγκεκριμένα των καρπών του *L. albus*, των φύλλων του *L. angustifolius* και των φύλλων του *L. luteus* ταυτοποιήθηκαν φλαβονοειδή και γλυκοσίδες φλαβονοειδών (Kachlicki, *et al.*, 2005), με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη λικοϊσοφλαβόνη Α τη γενιστεΐνη, τη λουτεόνη, τη λουπιβιγτεόνη, τη λουπαλμπιγενίνη και τη λουπινισοφαλβόνη Β.



λικοϊσοφλαβόνη Α



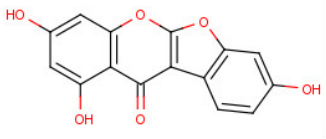
λουπιβιγτεόνη



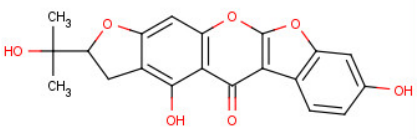
λουπαλμπιγενίνη

Από μεθανολικά εκχυλίσματα της ρίζας του κίτρινου λούπινου (*Lupinus luteus)* έχουν απομονωθεί παράγωγα φλαβανονών, όπως οι λονχοκαρπόλες Α, C, D, λουπινιόλες Α, Β, η λουπινενόλη, καθώς και πρενυλιωμένες φλαβανόνες, όπως η 6-φαινυλοναριγενίνη, η 8-πρενυλοναριγενίνη και η 8,3’-διπρενυλοναριγενίνη. Τέλος, από το αιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus hartwegii* (mexicanus), απομονώθηκαν *C*-γλυκοσιδικά παράγωγα της απιγενίνης (Tahara, *et al.*, 1994). Κατά την επεξεργασία εκχυλισμάτων από σπόρους των *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* εντοπίστηκαν αρκετά φαινολικά οξέα (πρωτοκατεχικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκο οξύ, χλωρογενικό οξύ, βανιλλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ), ενώ σε εκχυλίσματα των ριζών του *L. albus* και του κίτρινου λούπινου

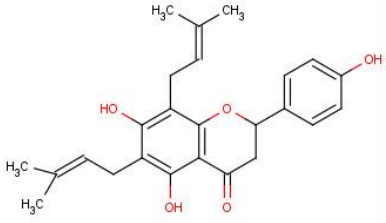
εντοπίστηκαν ποικίλες κουμαρινοχρωμόνες, όπως οι λουπιναλμπίνες H, A, C και η λουπιλουτίνη, η οποία φέρει μια αλυσίδα 2,3-διυδρο-3-υδροξυπρενυλίου στον C-8 (Kamel, 2003). Από το *L. hartwegii* (*L. mexicanus*) απομονώθηκαν οι λουπιναλμπίνες A, C και E (Tahara, *et al.*, 1994).



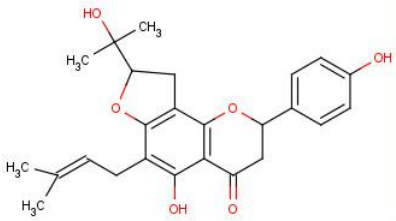
λουπιναλμπίνη A



λουπιναλμπίνη C



λονχοκαρπόλη A



λονχοκαρπόλη C

λονχοκαρπόλη D

Στο γένος έχουν εντοπιστεί αλκαλοειδή κινολιζιδίνης (Wink, *et al.*, 1994), σπαρτεΐνη, α-ισολουπανίνη, ανγκουστιφολίνη, τετραυδρορομπιφολίνη (Przybylak, *et al.*, 2005), (-)-μουλτιφλορίνη, (+)-επιλουπανίνη, αλκαλοειδή κινολιζιδίνης με σκελετό α-πυριδόνης και αλκαλοειδή πιπεριδίνης (αμμοδενδρίνη, N-μεθυλαμμοδενδρίνη, N-ακετυλοιστρίνη, αναβασίνη και N-μεθυλαναβασίνη) (Molyneux, *et al.*, 2007). Τέλος, στους καρπούς διάφορων ειδών του γένους έχουν εντοπιστεί πρωτεΐνες, α-γαλακτοσίδες, αμινοξέα, λιπίδια και φυτικές ίνες, λιπαρά οξέα βιταμίνες, μονο και πολυσακχαρίτες.

6.1.6.1 *Lupinus albus*

Κοινά ονόματα του *Lupinus albus* είναι το γλυκό λούπινο (sweet lupin) ή το άσπρο λούπινο (white lupin), ενώ συνώνυμα είναι τα *Lupinus graecus Boiss (Spru), Lupinus jugoslavicus (Kazim & Now)* και *Lupinus termis (Forsk)*. Το λευκό λούπινο είναι ένα μη ενδημικό, ετήσιο ψυχανθές, το οποίο φθάνει σε ύψος μέχρι και 47 ίντσες. Οι ρίζες του διεισδύουν στο έδαφος πάνω από 2 πόδια. Τα φύλλα του αποτελούνται από 5 με 9 φυλλάρια, τα οποία είναι σχεδόν λεία από πάνω και τριχωτά από κάτω. Τα άνθη είναι λευκά έως ιώδη με το πάνω χείλος να είναι ολόκληρο και το κάτω χείλος να είναι ολόκληρο ή ελαφρώς οδοντωτό. Μολονότι πιστεύεται ότι έχει τις ρίζες του στη Νοτιοανατολική Ευρώπη και τη Δυτική Ασία, η Χιλή είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα στον κόσμο. Στον πίνακα 9 παρουσιάζεται η ταξινομική κατάταξη του είδους.

Πίνακας 9: Ταξινομική κατάταξη του ***Lupinus albus***

Εικόνα 15: *Lupinus albus*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Υποκλάση	Rosidae
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae/Leguminosae
Γένος	*Lupinus L.*
Είδος	*Lupinus albus* L.- white lupin

Πρόκειται για φυτά, τα οποία είναι κοινώς γνωστά με τα ονόματα λούπινα, λούμπινα, λουμπούνια, λούμπουνα, λουμπίνοι (Κρήτη), λουπινάρια, πικροκουκιά, λυμπούσι, αγριολούπινα κλπ.. Στη Μάνη, περιοχή ορεινή και ιδιαίτερα άγονη, μέχρι πρόσφατα τα λουπίνια χρησιμοποιούνταν ως τροφή των ανθρώπων και των ζώων. Στην Κρήτη, το 'Αγιο Όρος, τα Δωδεκάνησα και σε άλλες περιοχές της Ελλάδος τα λούπινα χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα ως τροφή των ανθρώπων, ιδίως κατά τις περιόδους των νηστειών του χριστιανικού Εορτολογίου. Προηγουμένως τίθενται μέσα στο νερό (ενυδάτωση), ξεπικρίζονται, μαλακώνουν και στη συνέχεια προσφέρονται ως τροφή (rodiaki, 2013).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τη φυτοχημική ανάλυση όλων των τμημάτων του είδους αυτού (υπέργεια τμήματα, καρποί, ρίζες). Μία ιδιαίτερη κατηγορία ισοφλαβονοειδών που απαντάται σε μεγάλο βαθμό στο *Lupinus albus,* αλλά και σε άλλα εδώδιμα φυτά, είναι οι 2'-υδροξυισοφλαβόνες, που έχουν απομονωθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του φυτού (Katagiri, *et al.*, 2005). Η ύπαρξη των ανωτέρω ενώσεων δικαιολογεί και τον εντοπισμό κουμαρονοχρομωνών στο *Lupinus albus*, καθώς όπως φαίνεται οι 2'-υδροξυισοφλαβόνες αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις τους (Tahara, et al., 1986). Άλλα παράγωγα φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από το είδος *Lupinus albus* είναι φλαβανόλες (π.χ. καιμπφερόλη και ισοραμνετίνη καθώς και γλυκοσιδικά τους παράγωγα). Από την ανάλυση καρπών του *Lupinus albus* απομονώθηκαν μια ποικιλία πρωτεϊνών που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των γλομπουλινών. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, όχι μόνο εξαιτίας του θρεπτικού τους ρόλου, αλλά και εξαιτίας του ρόλου τους στη μείωση της υπερλιπιδαιμίας, του σακχαρώδη διαβήτη, της υπέρτασης, της παχυσαρκίας και την αντικαρκινική τους δράσης, γεγονός που επεξηγεί την πληθώρα εθνοφαρμακολογικών αναφορών στη χρήση του λούπινου για την αντιμετώπιση του

σακχαρώδη διαβήτη και για τις πέτρες στα νεφρά. Πιο συγκεκριμένα έχουν απομονωθεί οι πρωτείνες κονγκλουτίνη-α και β, κονγκλουτίνη γ και δ, οι οποίες είναι πλούσια σε θείο (Duranti, *et al.*, 2008) (Scarafoni, *et al.*, 2013). Από την ανάλυση εκχυλισμάτων καρπών του *L. albus* βρέθηκαν μονοσακχαρίτες, βιταμίνες του συμπλέγματος Β, όπως η νιασίνη, η ριβοφλαβίνη, και η θειαμίνη (Erbas, *et al.*, 2005), καθώς και κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Οι άνθρωποι από την αρχαιότητα γνώριζαν το λούπινο, το οποίον ονόμαζαν «Θέρμον», καθώς επίσης και τις φαρμακευτικές ιδιότητες και χρήσεις του. Οι καλλιέργειες του λευκού λούπινου ήταν πολύ σημαντικές για τους λαούς της Μεσογείου. Οι μεγάλοι σπόροι του λούπινου φαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκαν κατά τους ρωμαϊκούς χρόνους σαν χρήματα. Ακόμα έχει αναφερθεί σ' αυτούς ο ποιητής Βιργίλιος στα 70 π.Χ., καθώς και πολλοί άλλοι θεατρικοί συγγραφείς στα 1500 π.Χ. Η ιστορία της καλλιέργειας του λούπινου στον Παλαιό Κόσμο είναι συνδεδεμένη με τον αρχαίο αιγυπτιακό πολιτισμό. Είναι πιο πιθανό ότι το λευκό λούπινο καλλιεργήθηκε αρχικά στην αρχαία Ελλάδα, όπου υπάρχει η μεγαλύτερη βιοποικιλότητα και άγρια είδη λούπινου έχουν διασωθεί μέχρι σήμερα (USDA, 2015). Ο Διοσκουρίδης στο έργο του "*De materia* medica" αναφέρεται στο *Lupinus albus* ως "θέρμος ο ήμερος", όπου ανάμεσα σε πλήθος δράσεων και χρήσεων υπογραμμίζει την εμμηναγωγό και εκτρωτική δράση του φυτού. Επίσης παραδοσιακά στο Λίβανο, οι καρποί του φυτού *L. albus* χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία της αρθρίτιδας είτε με τη μορφή αφεψήματος, είτε χορηγούταν τοπικά σαν κατάπλασμα (Marc, *et al.*, 2008). Σύμφωνα με μελέτη, το εκχύλισμα των καρπών του *L. albus* θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό παράγοντα κατά της περιοδοντίτιδας (Gaultier, *et al.*, 2005). Το *L. albus* συγκαταλέγεται ανάμεσα στα φυτά που κατείχαν ανθελμινθική δράση, με βάση την παραδοσιακή Ιταλική λαϊκή θεραπευτική. Έτριβαν αφέψημα από *L. albus* στο δέρμα κατοικίδιων που είχαν προσβληθεί από ψώρα, ενώ έπλεναν τα γουρούνια που είχαν προσβληθεί από παράσιτα με πικρά λούπινα, καθώς πιθανότατα το αλκαλοειδές lupanine που περιέχεται στο λούπινο ήταν η κύρια ουσία για την εκδήλωση αντιπαρασιτική δράση (Guarrera, 1999) (Viegi, *et al.*, 2003). Επιπλέον, μελετάται η χρήση του εναλλακτικά ως λίπασμα και ζιζανιοκτόνο, δράση η οποία αποδίδεται στα αλκαλοειδή που περιέχει. Επίσης, σύμφωνα με την παραδοσιακή Ιταλική λαϊκή θεραπευτική, αφέψημα από τους καρπούς του *L. albus* χρησιμοποιούνταν για να μαλακώσουν τους κάλους και ως αντισηπτικός παράγοντας (Larhsini, *et al.*, 2001). Λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας του λούπινου, τάιζαν νεογέννητα αρνιά με ψημένους σπόρους για να μεγαλώσουν πιο γρήγορα (Guarrera, *et al.*, 2005). Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το λούπινο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν τροφή για τα ζώα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Το λευκό λούπινο, είναι κατάλληλο και για τη διατροφή του ανθρώπου. Οι σπόροι του γλυκού λούπινου περιέχουν λιγότερο από 0,02% αλκαλοειδή, ενώ το αλεύρι από σπόρους λούπινου είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες και αποτελεί μια καλή πηγή θρεπτικών συστατικών, πρωτεϊνών, λιπών, υδατανθράκων, ανόργανων αλάτων και βιταμινών. Χρησιμοποιείται για να εμπλουτίσει τα ζυμαρικά, τα μίγματα από κέικ, τα δημητριακά, καθώς επίσης προστίθεται στη γαλακτοματοποίηση του κρέατος και των

προϊόντων του για να αυξήσει τη θρεπτική τους αξία, το άρωμά τους και να τροποποιήσει την υφή τους. Συχνά χρησιμοποιείται ως τροφή για ψάρια.

6.1.7 Γένος *Rhamnus*

Το γένος *Rhamnus* ανήκει στην οικογένεια Rhamnaceae και αποτελείται περίπου από 100 είδη. Τα φυτά είναι ξυλώδεις θάμνοι ή μικρά δέντρα ύψους 1-10 m, επίσης γνωστά ως "buckthorns". Τα συναντάμε σε όλο το εύκρατο και υποτροπικό Βόρειο Ημισφαίριο, καθώς και πιο τοπικά, στο υποτροπικό Νότιο Ημισφαίριο σε περιοχές της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής. Πολλά είδη του γένους χρησιμοποιούνται και ως διακοσμητικά φυτά, ενώ το ξύλο του *Rhamnus* παλιά χρησιμοποιούταν για την παρασκευή κάρβουνου και σε όπλα πριν από την ανάπτυξη των σύγχρονων προωθητικών. Ορισμένα είδη *Rhamnus* έδειξαν εντομοκτόνο δράση, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών. Πολλά είδη του γένους *Rhamnus* χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικά φυτά στην παραδοσιακή ιατρική, ενώ τα πιο γνωστά είδη είναι τα *Rhamnus cathartica*, *Rhamnus frangula, Rhamnus purshianus* και *Rhamnus saxatilis* (Locatelli, *et al.*, 2009), τα οποία είναι ισχυρά καθαρτικά (Bruneton, 2001), δράση την οποία οφείλουν στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε ανθρακινόνες.

Η πιο χαρακτηριστική ανθρακινόνη του γένους που απαντάται σχεδόν σε όλα τα είδη είναι η εμοδίνη, η οποία εμφανίζει πλήθος βιολογικών δράσεων, ανάμεσα σε αυτές και η οστεοπροστατευτική, επάγωντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Lee, *et al.*, 2008) (Chen, *et al.*, 2017) και καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση (Kim, et al., 2014). Επίσης, τα είδη του γένους χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες, ειδικά σε φλαβονοειδή, ανθρακινόνες, και ταννίνες (Coskun, 1992) (Ammar, 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα κυριότερα φλαβονοειδή που εντοπίζονται στο γένος είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη, η ισοραμνετίνη, η αρομαδενδρίνη, η ταξιφολίνη, η ραμνοσιτρίνη και η ραμναζίνη (Cuoco, *et al.*, 2014), (Sakushima, *et al.*, 1983). Εχουν εντοπιστεί φαινολικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό, το φερουλικό και το γαλλικό (Moussi, *et al.*, 2015), όπως επίσης έχουν απομονωθεί και ανθρακινόνες, ναφθόλες, ανθρόνες, τριτερπένια και οι αντίστοιχοι γλυκοσίδες τους (Lu, *et al.*, 2016) (Sharp, *et al.*, 2001). Μάλιστα ο 3-*O*-*β*-ισοραμνινοσίδης της ραμνισιτρίνης και της καιμπφερόλης που απομονώθηκαν από τα φύλλα του *Rhamnus alaternus* έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιγενοτοξική δράση (Bhouri, *et al.*, 2012).

Το είδος *Rhamnus alaternus* L. χορηγείται στην παραδοσιακή ιατρική της Μεσογείου με πλήθος ενδείξεων, ενώ πρόσφατες *in vivo* μελέτες ανέδειξαν την αντιηπατοτοξική / ηπατοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος (Benchiha, *et al.*, 2017) (Berroukche, *et al.*, 2015). Τα μεθανολικά και χλωροφορμικά εκχυλίσματα του *Rhamnus prinoides,* που επίσης χορηγείται στην παραδοσιακή Αφρικανική ιατρική για την αντιμετώπιση πλήθους διαφορετικών παθήσεων, επέδειξαν σημαντική *in vitro* αντιβακτηριδιακή δράση (Molla, *et al.*, 2016). Σημειώνεται επίσης, πως είδη του γένους έχουν δείξει αξιόλογη αντικαρκινική δράση. Πιο

συγκεκριμένα, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστερα των καρπών του *Rhamnus nepalensis* εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι του καρκίνου του στόματος (Mai, *et al.*, 2001). Επιπλέον, το είδος *R. davurica* εκδήλωσε ικανότητα καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γεγονός που αποδώθηκε στο μεγάλο ποσοστό φλαβονοειδών που περιέχει (Chen, *et al.*, 2016), όπως επίσης και εμπλουτισμένα εκχυλίσματα του είδους *Rhamnus alaternus* (Ammar, *et al.*, 2008).

6.1.7.1 *Rhamnus lycioides*

Το *Rhamnus lycioides* ή black hawthorn, ή European buckthorn, ή Mediterranean buckthorn, είναι ένας θάμνος ύψους περίπου ενός μέτρου και ανήκει στην οικογένεια Rhamnaceae και η ταξινομική του κατάταξη αποτυπώνεται στον .

Πίνακας 10: Ταξινομική κατάταξη του ***Rhamnus lycioides***

Εικόνα 16: *Rhamnus lycioides*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Angiosperma
Κλάση	Dicotylidoneae
Υποκλάση	Spermatophytina
Τάξη	Rosales
Οικογένεια	Rhamnaceae
Γένος	*Rhamnus*
Είδος	*Rhamnus lycioides*

Βρίσκεται στην περιοχή της Μεσογείου, στη νότια Ευρώπη και στη Βόρεια Αφρική, ενώ η ονομασία του είδους *lycioides* αναφέρεται στην ομοιότητά του με το βοτανικό γένος *Lycium*. Το *Rhamnus lycioides* είναι ένας θάμνος αργής ανάπτυξης, προσαρμοσμένος στο ξηρό μεσογειακό κλίμα, φυλλοβόλος ή αειθαλής θάμνος, ύψους 1.5-3 μέτρων με μια μπερδεμένη, ακανθώδη και πολύ διακλαδισμένη μορφή. Ο φλοιός είναι γκρίζος, τα φύλλα ανοιχτό πράσινο με μήκος 0,5 έως 3,5 εκατοστά και πλάτος 0,3 έως 1 ίντσας, γραμμικά με υφή λεία, στενά και επιμήκη, μερικές φορές ελαφρώς διευρυνόμενα προς την κορυφή. Τα λουλούδια είναι πολύ μικρά, μοναχικά ή σε μικρές δέσμες στις μασχάλες των φύλλων, με κίτρινο χρώμα και εμφανίζονται το χειμώνα. Ο κάλυκας δείχνει τέσσερις αιχμηρές γωνίες. Ο καρπός είναι ωοειδής, 4-6 χιλιοστά μεγάλος, κιτρινωπός που μαυρίζει κατά την ωρίμανση. Έχει καθαρτικές ιδιότητες και σε μεγάλες ποσότητες είναι τοξικός για τον άνθρωπο.

Το συγκεκριμένο είδος χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση υπερτασικών διαταραχών στην περιοχή της Βαλένθια στην Ισπανία. Παραδοσιακά λαμβάνεται ως έγχυμα των υπέργειων τμημάτων του φυτικού υλικού με νερό. Μελέτες αποδίδουν την ύπαρξη φλαβονοειδών, τριτερπενίων, ταννινών και σακχάρων, όχι όμως ανθρακινονών που είναι χαρακτηριστικές του γένους (Villar, 1986a) (Villar, 1986b). Η δράση αυτή του εκχυλίσματος επιβεβαιώθηκε σε *in vivo* μοντέλο πειραματοζώων, καθώς επίσης και από τη βιολογική αξιολόγηση ενός γλυκοσίδη προκυανιδίνης που απομονώθηκε από το αντίστοιχο μεθανολικό εκχύλισμα (Terencio, e*t al.*, 1990).

6.1.7.2 *Rhamnus sibthorpiana*

Το *Rhamnus sibthorpiana* ή *Rhamnus sibthorpianus* είναι ενδημικό της νοτίου Ελλάδας με γεωγραφική εξάπλωση στη Στερεά Ελλάδα, την Πελοπόννησο, τα Βαρδούσια όρη, την Γκιώνα, τη Ζήρεια (Κυλλήνη), το όρος Μαίναλο, τα όρη Ανατολικής Λακωνίας, τον Ταΰγετο και τον Χελμό.

Πίνακας 11: Ταξινομική κατάταξη του ***Rhamnus sibthorpiana***

Εικόνα 17: *Rhamnus sibthorpiana*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Angiosperma
Κλάση	Dicotylidoneae
Υποκλάση	Spermatophytina
Τάξη	Rosales
Οικογένει	Rhamnaceae
Γένος	*Rhamnus*
Είδος	*Rhamnus sibthorpiana*

Το συναντάμε σε βράχους και υψόμετρο 1000-2450 μ., ενώ η κοινή ονομασία του είναι ράμνος του Σίμπθορπ. Ως προηγούμενες ονομασίες του είδους αναφέρονται τα *Rhamnus pubescens* και *Rhamnus guicciardii*, που πιθανότατα αποτελούν υβρίδιά του (Flora, 2011) (Strid, 1986) (Φιλότης, 1994). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως δεν συναντάμε αναφορές ως προς τη φυτοχημική μελέτη του εν λόγω είδους, ούτε ως προς τη βιολογική του αξιολόγηση, ενώ από το *Rhamnus pubescens* έχουν απομονωθεί τοκοφερόλες (Demo, 1998), η ανθρακινόνη εμοδίνη και η συρινγκαλδεΰδη (Sharp, *et al.*, 2001).

6.1.7.3 *Rhamnus alpinus*

Το *Rhamnus alpinus*, γνωστό και ως alpine buckthorn, είναι ένας δίοικος πλατύφυλλος θάμνος που αναπτύσσεται μέχρι και τέσσερα μέτρα σε βραχώδεις ασβεστολιθικές πλαγιές, στα βουνά της Νότιας και Νοτιοκεντρικής Ευρώπης και τη Βόρεια Αφρική. Η ταξινομική του κατάταξη αποτυπώνεται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Ταξινομική κατάταξη του ***Rhamnus alpinus***

Εικόνα 18: *Rhamnus alpinus*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Superdivision	Spermatophyta
Διαίρεση	Angiosperma
Κλάση	Dicotylidoneae
Υποκλάση	Spermatophytina
Τάξη	Rosales
Οικογένεια	Rhamnaceae
Γένος	*Rhamnus*
Είδος	*Rhamnus lycioides*

Όλα τα μέρη αυτού του φυτού έχουν αναφερθεί ότι περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανθρακινονών και αντίστοιχων γλυκοσιδών τους, καθώς και κυκλιτόλες (Longo, 1965) (Corona, *et al.*, 1963) (Plouvier, 1962). Η φυτοχημική μελέτη του είδους περιορίζεται στον εντοπισμό των ανθρακινονών αλοε-εμοδίνης, ρεΐνης, εμοδίνης, χρυσοφανόλης και φυσιόνης, στο μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού του. Οι ανθρακινόνες εμφανίζουν πλήθος βιολογικών δράσεων, όπως αντιμυκητιασική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και αντιϊκή. Επίσης, το εκχύλισμα των φύλλων του *Rhamnus alpinus*, χαρακτηρίστηκε ως ικανός αντιφλεγμονώδης παράγοντας αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κB, αναδεικνύοντάς το σε πιθανό θεραπευτικό μέσο για την αντιμετώπιση της περιοδοντίτιδας. Πιθανότατα η αντιφλεγμονώδης δάση του εκχυλίσματος να οφείλεται στο πλούσιο φαινολικό του περιεχόμενο (Chiavaroli, e*t al.*, 2008). Τέλος, αναφέρεται και η παραδοσιακή χρήση του *Rhamnus alpinus* σαν χρωστική (Pieroni, *et al.*, 2005).

6.1.8 Γένος *Glycyrrhiza*

Το γένος *Glycyrrhiza* ή γλυκύρριζα ανήκει στην οικογένεια Leguminosae και απαριθμεί περίπου 20 είδη ανάμεσα στα οποία είναι τα *G. acanthocarpa*, *G. aspera, G. eglandulosa, G.*

foetida, G. glabra, G. inflata, G. korshinskyi, G. lepidota, G. squamulosa, G. uralensis, G. yunnanensis. Τα είδη του γένους διανέμονται σε Ασία, Αυστραλία, Ευρώπη και Αμερική και είναι αυτοφυή, τα συναντάμε σε χαμηλό υψόμετρο και χέρσα εδάφη και απαιτούν υγρό έδαφος για την ανάπτυξή τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι 6 από τα είδη του γένους, *G. eurycarpa, G. inflate, G. pallidiflora, G. triphylla, G. uralensis, Gl yunnanensis* εντοπίζονται μόνο στην Ασία και σε καμιά άλλη ήπειρο (List, 2010).

Φυτοχημικά, τα είδη του γένους *Glycyrrhiza* χωρίζονται σε δύο ομάδες με βάση την ύπαρξη του γλυκυριζικού οξέος ή άλλων τριτερπενικών οξέων, οι οποίες είναι η ομάδα «true licorices» (*G. glabra*, *G. uralensis, G. korshinskyi, G. inflata, G. aspera*) και η ομάδα «false licorices», (*G. echinata, G. macedonica, G. foetidissima, G. pallidiflora, G. foetida, G. lepidota, G. squamulosa, G. acantacarpa*, *G. astragalina, G. yunnanensis, G. eurycarpa*) (Litvinenko, 2007). Πλέον, πολλά από τα είδη καλλιεργούνται ευρέως σε όλη την Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και την Ασία με σκοπό την παραλαβή της γλυκιάς ρίζας τους, με πιο διαδεδομένο το είδος *G. glabra*, απ' όπου κατεξοχήν παράγεται η γλυκύρριζα (Blumenthal, *et al.*, 2000).

Οι ρίζες της γλυκύρριζας χρησιμοποιούνταν ανέκαθεν ως φυσικό γλυκαντικό και στη λαϊκή θεραπευτική για την αντιμετώπιση πεπτικών διαταραχών, του έλκους, για την θεραπεία της ηπατίτιδας, αναπνευστικών και δερματικών διαταραχών, ενώ σύγχρονες μελέτες της έχουν αποδώσει αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση, αντιϊκη, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, ηπατοπροστατευτική και καρδιοπροστατευτική (Nesar, *et al.*, 2016).

Η φυτοχημική μελέτη των ειδών του γένος *Glycyrrhiza* είναι εκτεταμένη και γενικότερα χαρακτηρίζεται από την παρουσία φαινολικών παραγώγων και τερπενοειδών, με κυριότερο εκπρόσωπο την τριτερπενική σαπωνίνη γλυκυριζικό οξύ (Yang, e*t al.*, 2018), στην οποία αποδίδεται πλήθος βιολογικών δράσεων. Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή του γένους είναι οι χαλκόνες και η ισολικουιτιριγενίνη (Yin, *et al.*, 2018), καθώς και οι αντίστοιχοι γλυκοσίδες τους, ενώ από τα παράγωγα φλαβανονών χαρακτηριστικές είναι λικουιτιριγενίνη (Huang, *et al.*, 2017), γκλαμπρανίνη (Biondi, *et al.*, 2005), ισογκλαμπρανίνη (Zhou, et al., 2015), ουραλενίνη (Jia, 1990) και η γκανκαονίνη Ε. Συναντώνται επίσης, πλήθος παραγώγων φλαβονών και φλαβονολών και οι αντίστοιχοι *C*- κυρίως γλυκοσίδες τους, ενώ χαρακτηριστικές του γένους είναι οι ισοφλαβάνες και τα πρενυλιωμένα ανάλογά τους. Στο γένος επίσης εντοπίζονται ισοφλαβόνες (Shakeri, *et al.*, 2018) (Li, *et al.*, 2015), 3-αρυλο κουμαρινικά παράγωγα (Wang, *et al.*, 2015), κουμεστάνια (Xu, *et al.*, 2014) (Ryu, *et al.*, 2010), καθώς και διυδροστιλβένια (Siracusa, *et al.*, 2011) .

6.1.8.1 *Glycyrrhiza glabra*

Η *Glycyrrhiza glabra* ονομάζεται αλλιώς και liquorice, kanzoh, ή γλυκιά ρίζα. Ανήκει στην οικογένεια Leguminosae και την υποοικογένεια των ψυχανθών, ενώ η ταξινομική της κατάταξη αποτυπώνεται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Ταξινομική κατάταξη της ***Glycyrrhiza glabra***

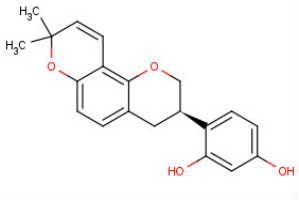
Εικόνα19: *Glycyrrhiza glabra*

Βασίλειο	Plantae
Superdivision	Embryophyta
Διαίρεση	Angiosperma
Κλάση	Dicotylidoneae
Υποκλάση	Rosidae
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Leguminosae
Φυλή	Galegae
Γένος	*Glycyrrhiza*
Είδος	*Glycyrrhiza glabra*

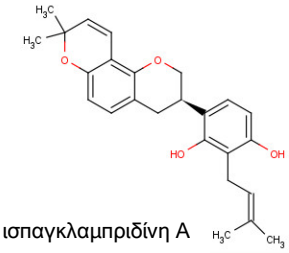
Η *Glycyrrhiza glabra* είναι πολυετής πόα με φύλλα πράσινα, σε ζεύγη με ωοειδές-ελλειπτικό σχήμα, που φέρουν ελαιώδεις αδένες και αποτελούνται από 9-17 ζεύγη φυλλαρίων. Τα άνθη του φυτού είναι διατεταγμένα σε βότρυς, έχουν συνήθως χρώμα κυανό ή βιολετί και εμφανίζονται στις αρχές του καλοκαιριού, ενώ έχει λευκά άνθη στο τέλος της άνοιξης. Ο καρπός είναι χέδρωψ. Οι ρίζες του φυτού είναι κυλινδρικές, μακριές, εύκαμπτες και διακλαδιζόμενες και μπορεί να φτάσουν τα 1-2 μέτρα. Επιπλέον, έχουν παχύ ρίζωμα με μαύρο κοκκινοκαφέ χρώμα εξωτερικά, ενώ εσωτερικά είναι κιτρινωπό. Η δρόγη είναι η ρίζα, η οποία μετά από 3-4 χρόνια έχει φτάσει στο κατάλληλο στάδιο για τη συλλογή της (Database, 2012) (Nomura T, 2002) (Botanical.com).

Η *Glycyrrhiza glabra* θεωρείται φυτό με μεγάλη εθνοφαρμακολογική σημασία, λόγω της διαδεδομένης χρήσης της στην παραδοσιακή ιατρική με σκοπό την αντιμετώπιση πληθώρας παθήσεων, όπως ο πυρετός, γαστρικά έλκη, φλεγμονές, σπασμοί, άσθμα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, καρκίνο και δυσμηνόρροια (Tanaka, 2003). Το εκχύλισμα της γλυκύρριζας σε συνδυασμό με άλλα φυτικά εκχυλίσματα χορηγείται ως φάρμακο στην κινεζική ιατρική για τη θεραπεία της χαμηλής οστικής μάζας, της οστικής απώλειας, των καταγμάτων, της οστεομαλακίας, της ατελούς οστεογένεσης, των ασθενειών των οστών και της περιοδοντίτιδας (Choi, 2005). Το εν λόγω φυτικό είδος έχει ιδιαίτερα πλούσιο φυτοχημικό προφίλ, ενώ συναντάμε αρκετές μελέτες αναφορικά με το φυτοχημικό του περιεχόμενο. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ισοφλαβανών με κυριότερους εκπροσώπους τις γκλαμπριδίνη, μεθυλγκλαμπριδίνη, ισπαγκλαμπριδίνη Α, ισπαγκλαμπριδίνη Β (Vayaa, *et al.*, 1997), χαλκονών και πρενυλιωμένων αναλόγων τους (Birari, *et al.*, 2011) με αξιόλογη δράση κατά της παχυσαρκίας, καθώς και την ισολικουιριτρίνη, η οποία εκδηλώνει σημαντική χημειοπροστατευτική δράση (Kaur, e*t al.*, 2009), κουμαρίνες με την ουμπελιφερόνη να χαρακτηρίζεται από αντιμεταλλαξιογόνο, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Kaur, *et*

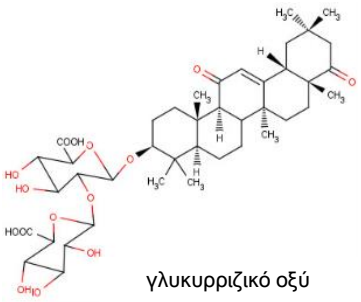
al., 2012). Χαρακτηριστικός μεταβολίτης του είδους είναι ο τριτερπενοειδής γλυκοσίδης γλυκυρριζικό οξύ (Hiroyuki, *et al.*, 2002), που έχει χαρακτηριστεί ως ικανός αντιθρομβωτικός παράγοντας (Mendes-Silva, *et al.*, 2003) και με δράση κατά της μαλάριας (Kalani, *et al.*, 2013).



γκλαμπριδίνη



ισπαγκλαμπριδίνη Α



γλυκυρριζικό οξύ

Επίσης, έχουν απομονωθεί και ισοφλαβονικά παράγωγα, όπως η γκλαμπρόνη, η λικοισοφλαβανόνη Α, οι γλυκυρριζισοφλαβανόνες Α, Β, C, καθώς και γλυκοσυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών. Χαρακτηριστικές φλαβονόλες του είδους είναι οι ισοκερκιτρίνη, μερατίνη και γλυφοσίδης (Ammosov, *et al.*, 2007).

Ειδικό μέρος

1 Υλικά και Μέθοδοι

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφονται συνοπτικά τα υλικά, οι μέθοδοι και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

1.1 Φυτοχημική επεξεργασία

1.1.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Η πλειοψηφία των φυτικών ειδών που μελετήθηκαν υπήρχε ήδη στη βοτανική συλλογή του εργαστηρίου, ενώ για τα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκε προσεκτική συλλογή του φυτικού υλικού, ξήρανση σε σκιερό, καλά αεριζόμενο χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου και κονιοποίηση.

1.1.2 Τεχνικές εκχύλισης

1.1.2.1 Επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE 300)

Συσκευή ASE-300

Η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE: Accelerated Solvent Extraction), αποτελεί ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα εκχύλισης, το οποίο επιτρέπει την παρασκευή ενός μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αποτελεί μια στερεή-υγρή μέθοδο εκχύλισης σε αυξημένη θερμοκρασία, συνήθως ανάμεσα στους 50 έως 200 ^{o}C και σε πιέσεις μεταξύ 10 και 15 MPa. Στην επιταχυνόμενη εκχύλιση χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία διαλυτών (εκτός από αιθέρες) και είναι δυνατή η παραλαβή της πλειονότητας των περιεχόμενων συστατικών σε συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και η εφαρμογή πίεσης συντελεί στην επιτάχυνση της διαδικασίας παραλαβής των ουσιών. Η πίεση ασκείται στο δοχείο εκχύλισης του δείγματος για να διατηρήσει τον θερμαινόμενο διαλύτη στην υγρή του φάση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον, η ασκούμενη πίεση επιτρέπει την ταχύτερη πλήρωση του θαλάμου εκχύλισης και βοηθά το διαλύτη να εισχωρήσει αποτελεσματικότερα στους ιστούς του δείγματος. Οι αυξημένες θερμοκρασίες ενισχύουν την ικανότητα διάχυσης του διαλύτη με αποτέλεσμα την καλύτερη κινητική της εκχύλισης. Μετά τη παραμονή του για ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα σε σταθερή θερμοκρασία, το εκχύλισμα εκρέει από το δοχείο εκχύλισης στο δοχείο συλλογής και είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση.

Τα κύρια λειτουργικά μέρη της συσκευής ASE-300 είναι τα ακόλουθα:

- Σύστημα τεσσάρων δοχείων διαλυτών

- Αντλία διοχέτευσης διαλυτών στο προς εκχύλιση δείγμα με δυνατότητα ανάμιξής τους σε διάφορες αναλογίες
- Δίσκος υποδοχής θαλάμων-κελιών εκχύλισης (100 και 33 ml) όπου τοποθετούνται τα προς εκχύλιση δείγματα
- Δίσκος φιαλών συλλογής των παραγόμενων εκχυλισμάτων και οι εν λόγω φιάλες
- Κλίβανος για τη ρύθμιση θερμοκρασίας
- Μηχανισμός βελόνας για τη διοχέτευση του παραγόμενου εκχυλίσματος εντός των δοχείων συλλογής

Η τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE 300 πλεονεκτεί έναντι κλασικών τεχνικών κυρίως στη δυνατότητα εκχύλισης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα, αλλά και στην εξασφάλιση σταθερής ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης των παραγόμενων εκχυλισμάτων με χρήση σταθερών συνθηκών εκχύλισης και ίδιου φυτικού υλικού. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης μίγματος μέχρι και τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών για τις εκχυλίσεις, με την προϋπόθεση να αναμιγνύονται μεταξύ τους, αλλά και η εναλλαγή διαλυτών ανάμεσα στις εκχυλίσεις, με αποτέλεσμα την ταχεία διαδοχική εκχύλιση ενός ή περισσοτέρων δειγμάτων με διαφορετικούς διαλύτες. Τέλος χαρακτηρίζεται ως «πράσινη» τεχνική μιας και είναι γρήγορη και κατά την εκχύλιση καταναλώνονται μικρές ποσότητες διαλυτών επιβλαβών για το περιβάλλον.

1.1.2.2 Υπερκρίσιμη εκχύλιση (S.F.E.)

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE: Supercritical Fluid Extraction) αποτελεί μια αρκετά δημοφιλή τεχνική στις φαρμακευτικές βιομηχανίες, αλλά και τις βιομηχανίες τροφίμων εξαιτίας του γρήγορου και χωρίς επιμολύνσεις τρόπου εκχύλισης των δειγμάτων. Ως τεχνική υπερτερεί και αυτή έναντι των κλασικών μεθόδων εκχύλισης και χαρακτηρίζεται ως “πράσινη τεχνική”, λόγω της ταχύτητάς της και της μη κατανάλωσης τοξικών διαλυτών, επιβλαβών για το περιβάλλον. Ωστόσο, σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές αποτελεί το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται ρευστά σε υπερκρίσιμες συνθήκες, δηλαδή ο διαλύτης δεν είναι ούτε υγρό ούτε αέριο, αλλά βρίσκεται σε μια ενδιάμεση φάση (υπερκρίσιμη κατάσταση). Το διαλυτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι το CO_2, του οποίου οι υπερκρίσιμες συνθήκες είναι πίεση μεγαλύτερη από 73 bar και θερμοκρασία πάνω από 31 ^oC. Το CO_2 είναι μη τοξικό και μη αναφλέξιμο και μπορεί εύκολα να ανακυκλωθεί σε μια κλειστή διαδικασία, όπως η συγκεκριμένη. Το κόστος του είναι χαμηλότερο, συγκρινόμενο με αυτό των κλασικών οργανικών διαλυτών και σε συνθήκες περιβάλλοντος μετατρέπεται σε αέριο και δεν αφήνει κατάλοιπα στο παραγόμενο εκχύλισμα. Αξίζει να σημειωθεί πως αποτελεί έναν άπολο διαλύτη και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται για την παραλαβή κυρίως άπολων συστατικών, ενώ για την εκχύλιση πιο πολικών ουσιών

Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE

χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν πιο πολικό συνδιαλύτη, όπως η αιθανόλη (EtOH). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή πιλοτικής κλίμακας SFE-1-2 No 4218 (SEPAREX F 54250 CHAMPIGNEULLES), η οποία παρέχει μεγάλο εύρος μεταβολής συνθηκών (θερμοκρασίες μέχρι 200 ^{o}C και πίεση μέχρι 400 bar) και επίσης, διαθέτει δύο δοχεία εκχύλισης συνολικής χωρητικότητας 1500 ml (1000, 500 ml), τρεις διαχωριστήρες για τη συλλογή του δείγματος και αντλία για τη διοχέτευση του συνδιαλύτη με ροή μέχρι 10 ml/min.

1.1.2.3 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Συσκευή Elma S 100H Elmasonic

Στην συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης, το φυτικό υλικό υπό τη μορφή αδρομερούς κόνεως αναμιγνύεται με το διαλύτη και στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων (Elma S 100H Elmasonic) στην επιθυμητή θερμοκρασία (συνήθως 30^{o} C) για μισή ώρα. Τέλος, το εκχύλισμα διαχωρίζεται από το φυτικό υλικό με διήθηση υπό κενό. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται τουλάχιστον 2 κύκλους Η εκχύλιση με υπέρηχους, η οποία συγκαταλέγεται στις πράσινες τεχνικές εκχύλισης, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους. Είναι μία απλή διαδικασία κατάλληλη για θερμοευαίσθητα συστατικά, αφού έχουμε τη δυνατότητα να ρυθμίσουμε τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον, είναι μια γρήγορη διαδικασία φιλική προς το περιβάλλον, καθώς δεν καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες διαλυτών.

1.1.2.4 Χρωματογραφικές τεχνικές

Με σκοπό τον έλεγχο του χημικού φορτίου των φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και για την απομόνωση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών του, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες χρωματογραφικές τεχνικές:

1.1.2.5 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφική αυτή τεχνική (Analytical TLC: Analytical Thin Layer Chromatography) παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικού κυρίως ελέγχου του χημικού περιεχομένου ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους. Χρησιμοποιούνται αλουμινένιες και γυάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου (silica gel 60 F-254 Merck), η οποία αποτελεί την στατική φάση και πιο συγκεκριμένα:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχους στιβάδας 0,1 mm (αναλυτική TLC κανονικής φάσεως)
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18 F254S) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχος στιβάδας 0,25mm (αναλυτική TLC αντιστρόφου φάσεως)

Οι πλάκες μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, μεταφέρονται σε γυάλινους θαλάμους κορεσμένους με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) και πραγματοποιείται η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων. Ακολουθεί παρατήρηση των χρωματογραφημάτων στο ορατό και στο υπεριώδες φως και σε μήκη κύματος 254 και 366nm και τέλος εμφάνισή τους με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βαννιλίνης και θέρμανση. Το μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βαννιλίνης παρασκευάζεται με την ανάμειξη ίσων όγκων διαλύματος 5% βαννιλίνη σε μεθανόλη και 5% π.H_2SO_4 σε μεθανόλη. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη ανάπτυξης με τα μόρια του υπό εξέταση δείγματος. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό της διαλυμένης ουσίας και της κινητής φάσης για τη δέσμευση των θέσεων στην στατική φάση (Reich E 2006).

1.1.2.6 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Preparative-TLC)

Με την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Preparative TLC: Preparative Thin Layer Chromatography) είναι δυνατή η ποσοτική παραλαβή ενός ή περισσοτέρων δευτερογενών μεταβολιτών από ένα απλό μίγμα. Χρησιμοποιούνται κυρίως γυάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου και πιο συγκεκριμένα:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC)
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18) με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 10 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).

Η αρχή της μεθόδου και η διαδικασία είναι όμοιες με την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με τη διαφορά ότι μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος απομακρύνεται η ζώνη που αντιστοιχεί στον μεταβολίτη που μας ενδιαφέρει ο οποίος και εκχυλίζεται από το οξείδιο του πυριτίου με κατάλληλο διαλύτη.

1.1.2.7 Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας Υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC: High Performance Preparative Thin Layer Chromatography)) αποτελεί μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική η οποία υπερτερεί έναντι της κλασικής TLC στην μελέτη της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης πολύπλοκων δειγμάτων και μειονεκτεί στο γεγονός ότι απαιτεί μεγαλύτερο και ακριβότερο εξοπλισμό. Είναι αρκετά απλή στο χειρισμό της, επιτρέπει την ανάλυση πολλών δειγμάτων, είναι σύντομη, επαναλήψιμη ενώ είναι δυνατή και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη

χρήση πυκνομετρίας. Τέλος, εφαρμόζεται σε βιολογικές αναλύσεις και ελέγχους μέσω της ανάπτυξης βιο-αυτογραφικών μεθόδων, κυρίως για την ανίχνευση ουσιών με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Στην εν λόγω εργασία η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί καλύτερα το φυτοχημικό περιεχόμενο των δειγμάτων, καθώς και για την πραγματοποίηση των παρασκευαστικών TLC. Η συσκευή (CAMAG) που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού (παρέχει ακρίβεια και επαναληψιμότητα)

CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

CAMAG TLC Scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και την λήψη φασμάτων απορρόφησης

1.1.2.8 Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (LC)

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (LC: Liquid Chromatography) χρησιμοποιείται ανοιχτή γυάλινη στήλη με εφαρμογή χαμηλής πίεσης (περίπου 300 mbar). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε διοξείδιο του πυριτίου (silica gel, 40-60 μm) κανονικής φάσης, ενώ ως κινητή φάση μίγματα οργανικών διαλυτών σταδιακά αυξανόμενης πολικότητας. Στη συνεχεία και για λόγους συντομίας η παραπάνω τεχνική διαχωρισμού αποκαλείται χρωματογραφία “flash”. Με την συγκεκριμένη τεχνική οι ουσίες ενός δείγματος διαχωρίζονται με βάση την πολικότητά τους.

1.1.2.9 Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού

Και σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιείται ανοιχτή γυάλινη στήλη, αλλά δεν εφαρμόζεται καθόλου πίεση. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης (Sephadex LH-20) με μέγεθος κόκκων 25-100 μ.. Πριν από τη χρήση αφήνεται να διογκωθεί η

δεξτράνη με το διαλύτη έκλουσης και ακολούθως, φέρεται στη στήλη και εκπλύνεται με τον ίδιο διαλύτη (αντενδείκνυται η μηχανική και κυρίως η μαγνητική ανάδευση, διότι καταστρέφονται οι κόκκοι). Με αυτή την τεχνική πραγματοποιείται διαχωρισμός των ουσιών του δείγματος με βάση το μέγεθος των ουσιών και το μοριακό τους βάρος.

1.1.2.10 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και με πολλαπλές εφαρμογές χρωματογραφική τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό δειγμάτων, αλλά και τον διαχωρισμό φυσικών προϊόντων από πολύπλοκα μείγματα. Τα φυσικά προϊόντα και ειδικότερα τα ολικά εκχυλίσματα, λόγω της πολυπλοκότητάς τους καθιστούν δυσκολότερη την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των περιεχομένων μεταβολιτών και η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής HPLC είναι καθοριστική για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

Υπάρχει πλήθος διαφορετικών τεχνικών και μεθοδολογιών HPLC, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην ανάλυση φυσικών προϊόντων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού σειράς φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD ή Photo Diode-Array Detector, PDA). Στους ανιχνευτές αυτούς, εφαρμόζεται πηγή φωτός ευρείας εκπομπής με λυχνίες δευτερίου ή ξένου για το εγγύς υπεριώδες φως και αλογόνου ή βολφραμίου για το ορατό φως και λειτουργούν ικανοποιητικά σε συγκεντρώσεις που φτάνουν μέχρι 10^{-7}g/ml.

Η ακτινοβολία όλων των μηκών κύματος διέρχεται από κυψελίδα και στη συνέχεια σκεδάζεται μέσω των φωτοδιόδων και γίνεται ταυτόχρονη καταγραφή της απορρόφησης του προς εξέταση δείγματος σε όλα τα μήκη κύματος (200-700nm) (Scott, 2003). Έτσι, μεταβολίτες οι οποίοι φέρουν χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ανιχνευθούν με αυτή την τεχνική και να προκύψει ένα πλήρες και αξιόπιστο φυτοχημικό προφίλ του δείγματος. Επιπλέον, πλεονέκτημα του ανιχνευτή φωτοδιόδων είναι η δυνατότητα προσδιορισμού της καθαρότητας της κάθε κορυφής (peak purity) (Colegate, 2008), αλλά και η δημιουργία βιβλιοθηκών φασμάτων για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε πολύπλοκα μείγματα.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι της Thermo Finnigan και αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα:

- Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών
- Απαερωτής (degasser) SpectraSystem 1000
- Αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000
- Ανιχνευτής φωτοδιόδων (PDA) SpectraSystem UV6000LP.

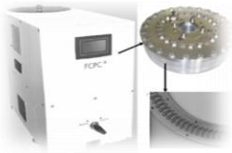
Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων ήταν η Supelco RPHS C18 διαστάσεων 250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm (Discovery). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Chromquest 4.1.

1.1.2.11 Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (FCPC: Fast Centrifugal Partition Chromatography) είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μια παραμένει στατική, ενώ η άλλη αποτελεί την κινητή φάση. Η όλη διαδικασία επιτελείται μέσα σε στήλη, η οποία αποτελείται από πολλά, μικρά κελιά και είναι πληρωμένη με την στατική φάση (όπου είναι διαλυμένο το προς ανάλυση μίγμα), ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος με βάση τους συντελεστές κατανομής τους στις δύο υγρές φάσεις. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, παρασύρει τα συστατικά του μίγματος με διαφορετική ταχύτητα το καθένα και ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής τους, κάνοντας έτσι δυνατό τον διαχωρισμό και την απομόνωση τους.

Οργανολογία



Συσκευή FCPC

Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι συσκευών για την εκτέλεση διαχωρισμών FCPC, τα βασικά μέρη τα οποία απαντώνται στις περισσότερες από αυτές είναι η αντλία για τη διοχέτευση του διαλύτη, ένα απλό σύστημα εισαγωγής, ένας ανιχνευτής, ένας καταγραφέας και μία περιστρεφόμενη στήλη. Η τελευταία αποτελεί το κύριο μέρος της συσκευής.Η στήλη συνήθως είναι φτιαγμένη από έναν ελικοειδή σωλήνα, ο οποίος είναι τοποθετημένος κυλινδρικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα, σχηματίζοντας πολλαπλές στοιβάδες από σπείρες. Ο σωλήνας περιστρέφεται, τόσο γύρω από τον κεντρικό άξονα, όσο και γύρω από τον άξονά του. Η κίνηση αυτή προκαλεί έντονη ανάδευση των δύο φάσεων και μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία διαδοχικής ανάμειξης και εξισορρόπησης, η οποία συμβαίνει 13 φορές / λεπτό. Οι σπείρες μπορούν να χαρακτηριστούν σαν να έχουν “κεφαλή” και “ουρά”. Ως “κεφαλή” ορίζεται το άκρο στο οποίο θα κινηθεί μία σταγόνα, όταν η σπείρα περιστρέφεται. Όταν αλλάζει η κατεύθυνση περιστροφής οι θέσεις “κεφαλή” και “ουρά” αντιστρέφονται. Αύξηση του αριθμού των μονάδων κατανομής επιτυγχάνεται με αύξηση του αριθμού των σπειρών, μείωση της εσωτερικής διαμέτρου της σπειροειδούς στήλης και μείωση της διαμέτρου της έλικας.

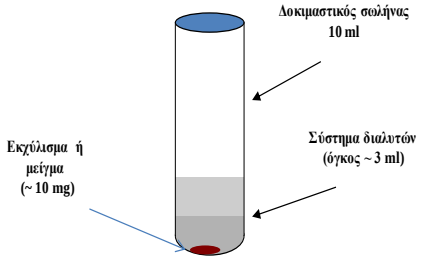
Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (FCPC) προσφέρει διακριτά πλεονεκτήματα για το διαχωρισμό, απομόνωση και καθαρισμό των ουσιών ενός μίγματος, συγκρινόμενο με παραδοσιακές υγρές-στερεές μεθόδους διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως. Τα πλεονεκτήματα συνοψίζονται παρακάτω:

- Υψηλή απόδοση και εκλεκτικότητα, μιας και προσφέρει τη δυνατότητα απομόνωσης ουσιών υψηλής καθαρότητας επιλέγοντας τον κατάλληλο συντελεστή κατανομής τους στις δύο φάσεις μιας πληθώρας διαλυτών
- Πλήρης ανάκτηση του δείγματος, μιας και δεν γίνεται χρήση στερεού υλικού στη στήλη ως στατική φάση, οπότε αποφεύγονται τυχόν προσροφήσεις, αλλά και επιμολύνσεις από πρότερες αναλύσεις
- Κλιμάκωση, μιας και με την ίδια συσκευή και διαφορετικές στήλες μπορούν να αναλυθούν από χιλιόγραμμα μέχρι γραμμάρια
- Χαμηλότερο κόστος, στο οποίο περιλαμβάνονται οι διαλύτες που είναι κατά 10-50% λιγότεροι από ότι στην υγρή χρωματογραφία
- Ασφαλής χειρισμός, μιας και η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε στεγανοποιημένη ατσάλινη διάταξη, μειώνοντας τις πιθανότητες ατυχημάτων και απώλειας διαλυτών.

Επιλογή και Έλεγχος Διφασικών Συστημάτων

Η επιλογή συστήματος διαλυτών αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο στη διαδικασία διαχωρισμού. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η πολικότητα των συστατικών του μίγματος και η διαλυτότητά τους. Οι διαλύτες που θα συνδυασθούν θα πρέπει να σχηματίζουν διφασικό σύστημα, να διαθέτουν μικρό χρόνο εξισορρόπησης (μικρότερο των 30 sec), οι όγκοι των δύο φάσεων να είναι περίπου ίσοι, να διαλύουν πλήρως το δείγμα και οι τιμές των συντελεστών κατανομής των ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0.2 και 5.0 (ιδανική τιμή 1.0).

Τα επιλεγμένα συστήματα πρέπει να ελεγχθούν ως προς την ικανότητά του να διαλύουν επιτυχώς το δείγμα, την ταχύτητα διαχωρισμού των δύο φάσεων και την αναλογία τους. Για το σκοπό αυτό περίπου 15 mg δείγματος τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται οι διαλύτες του κάθε συστήματος στις κατάλληλες αναλογίες, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 4 ml. Το κάθε δείγμα ανακινείται έντονα και αφήνεται να ηρεμήσει. Οι βασικές προϋποθέσεις για να θεωρηθεί ένα σύστημα αποδεκτό είναι η πλήρης διάλυση του δείγματος, ο σχηματισμός και διαχωρισμός των δύο φάσεων σε χρόνο μικρότερο του ενός λεπτού και η λήψη περίπου ίσων όγκων και στις δύο φάσεις. Ακολουθεί η αξιολόγηση ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος. Για να θεωρηθεί ένα σύστημα ικανό να διαχωρίσει τα συστατικά ενός εκχυλίσματος θα πρέπει οι περισσότερες ουσίες του εκχυλίσματος να είναι κατάλληλα κατανεμημένες στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος. Μέτρο της κατανομή των ουσιών σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών αποτελεί ο συντελεστής κατανομής, ο οποίος ισούται με το λόγο των συγκεντρώσεων της ουσίας στις δύο φάσεις του συστήματος.



Σχηματική παράσταση προετοιμασία δείγματος

$$K_x = \frac{C_x\ \alpha}{C_x\ \beta} = \frac{E_x\ \alpha}{E_x\ \beta}$$

K_x = Συντελεστής Κατανομής της ουσίας X
C_x = Συγκέντρωση της ουσίας X
E_x = Επιφάνεια Κορυφής της ουσίας X
α , β = Οι δύο φάσεις του διφασικού συστήματος

Με βάση τους συντελεστές κατανομής μπορούμε να προβλέψουμε εάν κάποιο διφασικό σύστημα είναι ικανό να διαχωρίσει τις ουσίες ενός μίγματος ή μέρος αυτών. Επίσης, μπορούμε να προβλέψουμε τόσο την σειρά έκλουσης των ουσιών, όσο και τον όγκο της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλουση κάποιας ουσίας. Με τη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), μπορούμε να απορρίψουμε τα συστήματα εκείνα, στα οποία οι περισσότερες ουσίες είναι κατανεμημένες εξ' ολοκλήρου στη μία από τις δύο φάσεις.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ενωμένη με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (HPLC-DAD), ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά η Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (LC-MS), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Ανιχνευτή Σκέδασης Φωτός ακόμη και η Αέριος Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) για άπολα ή πτητικά συστατικά.

1.1.3 Φασματοσκοπικές τεχνικές

1.1.3.1 Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR)

Για την ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε κυρίως η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR: Nuclear Magnetic Resonance). Οι προς ταυτοποίηση ουσίες διαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες ανάλογα με την πολικότητά τους και πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας (1D-NMR) και δύο διαστάσεων (2D-NMR):

- ^{1}H-NMR
- COSY (Correlation Spectroscop),
- HSQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Η λήψη των φασμάτων έγινε σε φασματογράφο Bruker Advance III 600 MHz, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με ανιχνευτή 5mm broadband inverse detection probe (BBI) και ένα ρομποτικό δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60), ενώ το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TopSpin™. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), br*s* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *m* (πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD), η δευτεριωμένη ακετόνη (Me_2CO-d^6), το δευτεριωμένο ύδωρ (D_2O) και το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl3).

Από τη μελέτη των ληφθέντων φασμάτων προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων ενώσεων και καταλήξαμε στην ταυτοποίησή τους. Ακολούθησε σύγκριση των πειραματικών τιμών με δεδομένα της βιβλιογραφίας.

1.1.3.2 Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Η Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (LC-MS: Liquid chromatography – mass spectrometry) είναι μια αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τις διαχωριστικές δυνατότητες της υγρής χρωματογραφίας, με τις αναλυτικές δυνατότητες που προσφέρει η φασματομετρία μάζας. Η μέθοδος περιέχει συνοπτικά τα εξής βήματα: (α) η κινητή φάση που ρέει μέσω μιας χρωματογραφικής στήλης και απαερώνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού΄ πεδίου και την υποβοήθηση ροής αεριού (συνηθώς N2), (β) τα ιόντα που έχουν προσχηματισθεί στο διάλυμα που ενίεται, περνούν με τη διαδικασία αυτή στην αέρια φάση και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας που απαιτεί υψηλό κενό.

Οργανολογία

Τα μέρη της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για την LC-MS είναι:

- Σύστημα υγροχρωματογραφίας UPLC, Accela (Pump, Autosampler, PDA Detector)
- Υβριδικό φασματόμετρο LTQ Orbitrap, Thermo Fisher Scientific [με συνδυασμό αναλυτών μάζας: LTQ (γραμμική παγίδα ίοντων) και OrbiTrap (τροχιακή παγίδα ιόντων)]

Για τον χειρισμό των μηχανημάτων και για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε λογισμικό Xcalibur 2.07.

1.2 Συνθετική επεξεργασία

- **Αντιδραστήρια**

Όλα τα αντιδραστήρια και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για τις συνθετικές παρασκευές προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Chemical Co.

- **Συνθήκες αντιδράσεων**

Όλα τα υαλικά στα οποία έλαβαν μέρος οι αντιδράσεις ξηράνθηκαν σε φούρνο πρινίν αποαπό κάθε χρήση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω αποαπό άνυδρες συνθήκες, σε κορεσμένη ατμόσφαιρα και με συνεχή παροχή αργού. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άνυδροι και επιπλέον εξαερώθηκαν πριν από πρίν απο κάθε χρήση με παροχή αργού. Στην περίπτωση των διαλυτών που δεν είχαν αποθηκευθεί υπό άνυδρες συνθήκες, τακολουθήθηκε διαδικασία απομάκρυνσης της υγρασίας, με χρήση μοριακών κοσκίνων 4Å.

- **Συσκευή υδρογόνωσης**

Οι αντιδράσεις υδρογόνωσης πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Parr,υπό πίεση

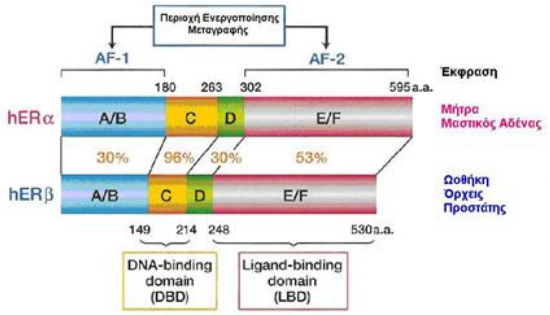
- **Χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές**

Για το διαχωρισμό των προϊόντων εφαρμόστηκαν τόσο υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης υπό χαμηλή πίεση (300 bar), όσο και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ενώ για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού.

1.3 *In silico* πειραματική διαδικασία

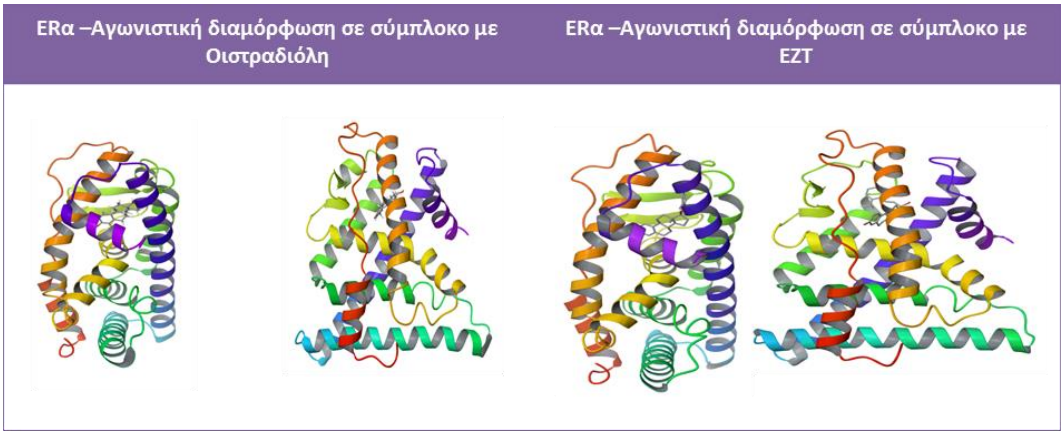
1.3.1 Μελέτη σύνδεσης με τους υποδοχείς οιστρογόνων

Υποδοχέας Οιστρογόνων - Δυναμικό μοντέλο



Ο Υποδοχέας οιστρογόνων (ER) εμφανίζεται με δύο τύπους τον ERα και τον ERβ οι οποίοι έχουν 53% ομολογία στο ενεργό τους κέντρο. (Muramatsu, et al., 2000). Όταν ένα μόριο-πρόσδεμα (ligand) συνδεθεί στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, γίνονται ορισμένες διεργασίες που εξαναγκάζουν την έλικα H-12 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο, να λάβει διαμόρφωση που είτε θα επιτρέψει είτε θα παρεμποδίσει την σύγκλιση και πρόσδεση συγκεκριμένων συμπαραγόντων ώστε να ακολουθήσει η μεταγραφή στον πυρήνα του κυττάρου. Μέχρι σήμερα έχουν αποδοθεί οι κρυσταλλογραφικές δομές για 6 διακριτές διαμορφώσεις του υποδοχέα οιστρογόνων σε σχέση με τη θέση των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο και τη θέση της έλικας H-12.

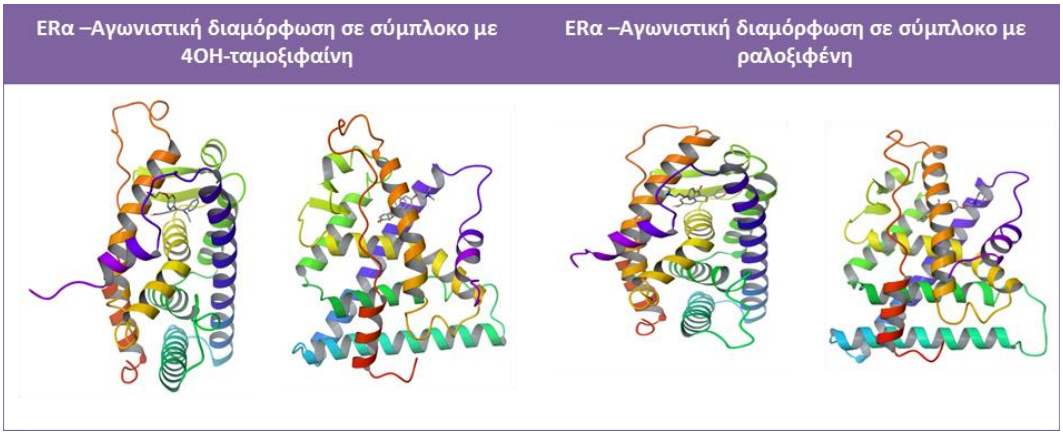
1. Αγωνιστική διαμόρφωση (ERα) με πρόσδεμα την οιστραδιόλη ή την διαίθυλο στιλβιστρόλη (PDB κωδικοί 1ERE και 3ERD αντίστοιχα). ((Brzozowski, 1997) (Shiau, 1998).
2. Αγωνιστική διαμόρφωση (ERα) με διευρυμένο το ενεργό κέντρο με πρόσδεμα το τριφθοροπαράγωγο της οιστραδιόλης (EZT) ((17beta)-17-{(E)-2-[2-(trifluoromethyl) phenyl]vinyl}estra-1(10),2,4-triene-3,17-diol). (PDB κωδικός 2P15) (Nettles K.W., 2007).



Εικόνα 20: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με οιστραδιόλη και EZT

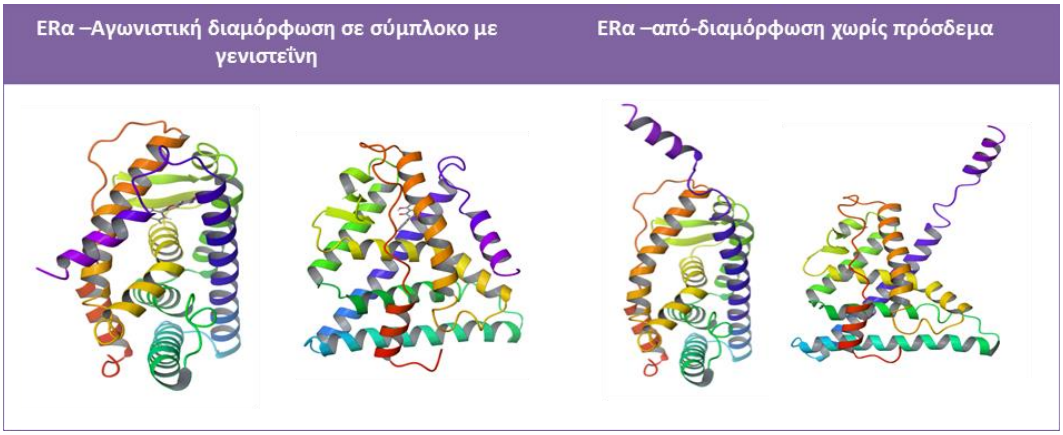
3. Ανταγωνιστική διαμόρφωση με πρόσδεμα την 4OH-ταμοξιφαίνη (ERα). (PDB κωδικός 3ERT) (Shiau, 1998)

4. Ανταγωνιστική διαμόρφωση με πρόσδεμα την ραλοξιφαίνη (ERβ). (PDB κωδικός 1QKN) (Pike, 1999)
5. Μερικώς αγωνιστική διαμόρφωση με πρόσδεμα την γενιστεΐνη (ERβ). (PDB κωδικός 1QKM) (Pike, 1999)



Εικόνα 21: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με 4-OH-ταμοξιφαίνη και ραλοξιφαίνη

6. Από - μορφή (ERα) με πρόσδεμα την οιστραδιόλη. (PDB κωδικός 1A52) (Tanenbaum, 1998).



Εικόνα 22: Αγωνιστική διαμόρφωση ERα σε σύμπλοκο με γενιστεΐνη και χωρίς πρόσδεμα

Στις αναπαραστάσεις των δομών που απεικονίζονται παραπάνω, για κάθε σύμπλοκο δίνονται δύο αναπαραστάσεις ώστε να φαίνεται η μετακίνηση της έλικας 12 που έχει χρωματιστεί με μωβ χρώμα. Για την από-μορφή έχει αφαιρεθεί το πρόσδεμα.

Η έλικα Η-12 όπως έχει ήδη αναφερθεί παίζει σημαντικό ρόλο στην δράση του υποδοχέα οιστρογόνων και η θέση της καθορίζει την μεταγραφική του ικανότητα. Πιστεύεται ότι ο τρόπος δράσης των πυρηνικών υποδοχέων είναι κοινός, και επικρατεί μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις διάφορες μορφές του υποδοχέα, οι οποίες όμως εξαρτώνται από την θέση της έλικας Η-12. Η τεταρτοταγής δομή του υποδοχέα παρουσιάζει ποικιλία διαμορφώσεων οι οποίες όμως ενεργειακά δεν διαφέρουν σημαντικά. Λαμβάνουν χώρα παροδικά και στιγμιαία διαμορφώσεις με την έλικα Η-12 στην αγωνιστική ή την ανταγωνιστική θέση, όπως παρουσιάζονται από την κρυσταλλογραφία. Εντούτοις οι δομές αυτές δεν είναι σταθερές απουσία προσδέματος. Ένα μόριο αγωνιστής σταθεροποιεί την διαμόρφωση που ευνοεί την

γονιδιακή μεταγραφή, η οποία με την σειρά της επιτρέπει την σύμπλεξη με διάφορους συμπαράγοντες. Ένα μόριο ανταγωνιστής σταθεροποιεί την διαμόρφωση που δεν ευνοεί την γονιδιακή μεταγραφή. Τα μόρια που εμφανίζονται ως μερικοί αγωνιστές (π.χ. φυτοοιστρογόνα) δεν ευνοούν μια από τις δύο διαμορφώσεις αλλά υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στις δύο διαμορφώσεις. Όταν ο υποδοχέας βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον, χωρίς πρόσδεμα, λαμβάνει διαμορφώσεις όπου η έλικα 12 είτε έχει διαμόρφωση που καλύπτει την είσοδο του ενεργού κέντρου είτε έχει διαμόρφωση που αποκαλύπτει το ενεργό κέντρο. (Steinmetz, 2001).

Προετοιμασία Πρωτεϊνών

Οι κρυσταλλογραφικές δομές που αναφέραμε έχουν αρκετές ελλείψεις, ιδιαίτερα σε περιοχές που φέρουν ευκίνητα αμινοξέα και ως εκ τούτου δεν ήταν εύκολη η χρήση τους για τους θεωρητικούς υπολογισμούς μας. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τις 6 αυτές κρυσταλλογραφικές διαμορφώσεις δημιουργήσαμε τις αντίστοιχες 6 διαμορφώσεις για τον ERα και 6 για τον ERβ με πλήρη αλληλουχία της περιοχής Ligand Binding Domain (LBD) ώστε να έχουμε μια πληρέστερη εικόνα της δυναμικής του υποδοχέα. Ακολούθως χρησιμοποιήσαμε την διαδικασία Protein Preparation Wizard όπως εφαρμόζεται από το λογισμικό Maestro της εταιρείας Schrodinger Inc για την ορθή πρωτονίωση των πολικών αμινοξέων (Λυσίνη, Αργινίνη, Γλουταμικό οξύ και Ασπαρτικό οξύ, Ισταμίνη), τη βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα αμινοξέα και την διευθέτηση των αμιδικών δεσμών των πλευρικών αλυσίδων σε κάθε υπόλοιπο Γλουταμίνης και Ασπαραγίνης.

Προετοιμασία Μορίων

Για τους υπολογισμούς πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν 200 φυσικά και συνθετικά προϊόντα, για τα οποία ήταν γνωστή η *in vitro* οιστρογόνος / αντιοιστρογόνος δράση τους. Όλα τα υπό μελέτη μόρια, σχεδιάστηκαν στο λογισμικό Maestro, και μέσω της ρουτίνας ligprep δημιουργήθηκαν όλες οι δυνατές μορφές ιονισμού σε pH 7.0 ± 2 και έλαβαν τρισδιάστατη δομή χαμηλής ενέργειας. Επίσης για όσα μόρια δεν ήταν γνωστή η ακριβής απόδοση των χειρόμορφων κέντρων σχεδιάστηκαν όλα τα πιθανά διαμορφωμερή.

Υπολογισμοί Πρόσδεσης

Χρησιμοποιώντας τις 6 διακριτές διαμορφώσεις του ERα και του ERβ έγιναν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations) με το λογισμικό Glide της εταιρείας Schrodinger Inc και χρήση της εξίσωσης κατάταξης (scoring function) GlideScore που υπολογίζει την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης σε τιμές kcal/mol. Όλες οι ενώσεις που συνδέθηκαν στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα έλαβαν μια εμπειρική τιμή ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης (GlideScore). Για κάθε ένωση υπολογίστηκε η μέση τιμή του της Ελεύθερης Ενέργειας σύνδεσης σε όλες τις διαμορφώσεις του υποδοχέα.

1.4 *In vitro* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της οστεοπροστατευτικής και οιστρογόνου δράσης

Η *in vitro* πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκ ρινολογίας (ΕΜΕ) του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (ΙΒ ΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) και υπό την εποπτεία του υπεύθυνου του εργαστ ηρίου.

Το Διοικητικό Συμβούλιο του ΕΙΕ αποδέχτηκε το αίτημα του υπευθύνου του ΕΜΕ και χο ρήγησε άδεια για τη χρήση των εγκαταστάσεων του για την πραγματοποίηση των *in vitro* πε ιραμάτων που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2 και στο κεφάλαιο 6.

1.4.1 Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, όπως και το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και τα υλικά της κυτταροκαλλιέργειας (MEM: Minimum Essential Media, D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium , L-γλουταμίνη, πενικιλλίνη, στρεπτομυκίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, τρυψίνη και όξινο ανθρακικό νάτριο) προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich (Germany). Επίσης, από την ίδια εταιρεία προμηθεύτηκαν το υπόστρωμα p-NPP: p-nitrophenyl phosphate, το β-glycerophosphate, η χρωστική αλιζαρίνης και το kit ανίχνευσης TRAP [Acid phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit, 387A].

Το θρεπτικό υλικό a-MEM (alpha Modification Minimum Essential Media), το ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: Phosphate-buffered saline) και ο ορός έμβρυου βοός FBS (fetal bovine serum) προμηθεύτηκαν από την Gibco (Invitrogen, USA), ενώ ο ορός έμβρυου βοός (FBS) με χαμηλά επίπεδα ενδοτοξινών, από την εταιρεία Biosera. Η οιστραδιόλη από την Steraloids (USA), το ICI182,780 από την Tocris Bioscience (USA), η ινσουλίνη από την Biochrom και η κυτταροκίνη RANKL από την εταιρεία R&D.

1.4.1.1 Ειδικές επεξεργασίες υλικών

- **Επεξεργασία ορού έμβρυου βοός (FBS) για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών**

Για τους ελέγχους οιστρογονικότητας ήταν απαραίτητη η ύπαρξη συνθηκών καλλιέργειας ελεύθερης στεροειδών. Για το λόγο αυτό έπρεπε να γίνει επεξεργασία του ορού,

με τον οποίο εμπλουτιζόταν το θρεπτικό υλικό, για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών, με χρήση ενεργού άνθρακα και δεξτράνης (DCC-FBS: Dextran Coated Charcoal FBS). Πιο συγκεκριμένα, ο ορός επωάστηκε με το ίζημα διαλύματος ενεργού άνθρακα (2.5% ενεργός άνθρακας και 0.25% δεξτράνη σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) και σε αναλογία 1/5 του όγκου του ορού, για 30 min στους 56 °C, υπό ανάδευση και το προκύπτουν εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 10 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε στο υπερκείμενο διάλυμα άλλες δύο φορές και ακολούθησε αποστείρωση του τελικού διαλύματος με φίλτρο Sartorius, μεγέθους πόρων 0.22 μm.

❖ **Θερμική κατεργασία ορού έμβρυου βοός (FBS)**

Για τη διεξαγωγή πειραμάτων που απαιτούνταν συνθήκες απουσίας αυξητικών παραγόντων, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με ορό που είχε πρότινος υποστεί θερμική κατεργασία (HI-FBS: Heat Inactivated FBS). Πιο συγκεκριμένα, ο ορός επωάστηκε για 30 min στους 56 ^{o}C, όπως περιγράφεται από την GE Healthcare HyClone™.

1.4.2 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων ήταν οι ακόλουθες:

- **MCF-7**: ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού, ικανά να πολλαπλασιάζονται μόνο υπό την επίδραση οιστρογόνων (ATCC, American Tissue Culture Collection).
- **Ishikawa**: ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου, ικανά να παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση υπό την επίδραση οιστρογόνων (ECACC, European Collection of Animal Cell Cultures).
- **MC3T3-E1 υποκλώνος 4**: προ-οστεοβλαστικά κύτταρα προερχόμενα από το θόλου του κρανίου ποντικού, με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ώριμους οστεοβλάστες (ATCC® CRL-2593, mouse preosteoblasts).
- **RAW 264.7**: μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά από ασκιτικό όγκο που προκλήθηκε σε άρρενες ποντικούς από τον ιό της λευχαιμίας Abelson, με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ώριμους οστεοκλάστες (ATCC® TIB-71TM).

1.4.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες, ενώ στείρα ήταν επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε πλαστικά τρυβλία Petri ή/και σε πλαστικές φλάσκες, σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας με σταθερή θερμοκρασία 37 °C και παροχή αέριου CO_2 5%. Στη συνέχεια, περιγράφονται τα ακριβή υλικά και οι συνθήκες καλλιέργειας της κάθε κυτταρικής σειράς.

Κυτταρική σειρά MCF-7: Τα κύτταρα MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης, συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βόος (FBS, Fetal Bovine Serum), 1 mg/lt ινσουλίνη και 0.1 nM οιστραδιόλη. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πυκνότητα περίπου 75% (κάθε 3-4 ημέρες), πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειά τους, μέσω αποκόλλησής τους με διάλυμα θρυψίνης 0.25%.

Κυτταρική σειρά Ishikawa: Τα κύτταρα Ishikawa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης, συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 5% FBS. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πυκνότητα περίπου 75% (κάθε 2-3 ημέρες), πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειά τους, μέσω αποκόλλησής τους με διάλυμα θρυψίνης 0.25%.

Κυτταρική σειρά MC3T3-E1: Τα κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό alpha-MEM ελεύθερο ασκορβικού οξέος, συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% FBS. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πυκνότητα περίπου 70% (κάθε 2-3 ημέρες), πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειά τους, μέσω αποκόλλησής τους με διάλυμα θρυψίνης 0.25%.

Κυτταρική σειρά RAW 264.7: Τα κύτταρα RAW 264.7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό alpha-MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης, συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% FBS με χαμηλά ποσοστά ενδοτοξινών που έχει υποστεί θερμική κατεργασία (HI-FBS), όπως περιγράφεται στην § 1.4.1.1. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πυκνότητα περίπου 70% (κάθε 2-3 ημέρες), πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειά τους, μέσω μηχανικής αποκόλλησής τους (scraping).

1.4.2.2 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7

Προκειμένου να προσδιοριστεί η οιστρογόνος δράση των δειγμάτων, αξιολογήθηκε η ικανότητά τους επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ορμονοεξαρτώμενων κυττάρων μαστού MCF-7.

Αρχή της μεθόδου

Η αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκε μέσω προσδιορισμού των ζώντων κυττάρων με χρήση του χρωμογόνου κρυσταλλικού ιώδους (Crystal Violet). Το κρυσταλλικό ιώδες ή Tris[4-(dimethylamino)phenyl]methylium chloride δεσμεύεται στο DNA των κυττάρων και η ένταση της χρώσης του είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων.

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των δειγμάτων στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των MCF-7 χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης, εμπλουτισμένο με 5% ορό ελεύθερο στεροειδών DCC-FBS. Αναλυτικότερα, επιστρώθηκαν $4x10^3$ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επωάστηκαν για 24 ώρες στο προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό, προκειμένου να υπολογιστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός την 1η ημέρα (DAY-1) και να χρησιμοποιηθεί ως αριθμός αναφοράς (control). Παράλληλα, σε δεύτερη πλάκα επιστρώθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων και την 1η ημέρα έγινε η προσθήκη των υπό εξέταση δειγμάτων, διαλυμένων σε 0.1% DMSO. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα υπό εξέταση δείγματα για 6 ημέρες, ενώ το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 72 ώρες. Μετά το πέρας των 6 ημερών απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη 100 μl μεθανόλης ανά θέση και επώαση 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε απομάκρυνση της μεθανόλης και προσθήκη 50 μl διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους (0.25%) ανά θέση και επώαση υπό ανακίνηση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους, πραγματοποιήθηκαν 4 εκπλύσεις με νερό βρύσης, προσθήκη 100 μl διαλύματος οξικού οξέος (33%) ανά θέση και επώαση υπό ανακίνηση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτική απορρόφηση στο τέλος της διαδικασίας μετρήθηκε στα 595 nm, σε συσκευή φωτομέτρησης Safire II (TECAN).

1.4.2.3 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa

Προκειμένου να αξιολογηθεί η οιστρογόνος δράση των δειγμάτων στα κύτταρα ενδομητρίου (Ishikawa) προσδιορίστηκε η επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP).

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της έκφρασης της AlkP βασίζεται στην αλληλεπίδραση των φωσφατασών με την φωσφορική π-νιτροφαινόλη (pNPP: p-nitrophenyl phosphate) ως υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας και την παραγωγή της π-νιτροφαινόλης. Η π-νιτροφαινόλη αποπρωτονιώνεται σε αλκαλικές συνθήκες δίνοντας το αντίστοιχο ανιόν (χρωμογόνο), το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 405 nm (Littlefield B.A., 1990) (Markiewicz L., 1993).

Πειραματική διαδικασία

Τα πειράματα επαγωγής της έκφρασης AlkP πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης και εμπλουτισμένο με 5% DCC-FBS. Συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν $12x10^3$ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και

επωάσθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη των υπό εξέταση δειγμάτων και επώαση για 72 ώρες. Στο τέλος των 72 ωρών επώασης απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιήθηκαν δύο εκπλύσεις των κυττάρων με διάλυμα PBS (100 μl ανά θέση) και τοποθέτηση των πλακών στους -20 °C, έτσι ώστε να προκληθεί λύση των κυττάρων. Για τη διαδικασία προσδιορισμού της έκφρασης AlkP, η πλάκα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στον πάγο προκειμένου να προστεθεί το διάλυμα του υποστρώματος και να αρχίσει η αντίδραση ταυτόχρονα σε όλες τις θέσεις της πλάκας. Σε κάθε θέση προστέθηκαν 50 μl διαλύματος υποστρώματος (4 ^{o}C), το οποίο περιείχε 5 mM φωσφορικό εστέρα της π-νιτροφαινόλης (pNPP), 0.24 mM $MgCl_2$ και 1 M διαιθανολαμίνης (pH 9.8). Στην περίπτωση προσδιορισμού της οιστρογόνου δράσης των δειγμάτων, τα κύτταρα που επωάσθηκαν μόνο με διαλύτη (0.1% DMSO) αποτέλεσαν το δείγμα αναφοράς (C), ενώ τα κύτταρα που επωάσθηκαν με 1 nM οιστραδιόλης (E2) αποτέλεσαν το θετικό δείγμα αναφοράς. Η απορρόφηση του κίτρινου χρώματος της αντίδρασης μετρούταν κάθε 15 min στα 405 nm χρησιμοποιώντας συσκευή φωτομέτρησης Safire II (TECAN). Η τελική απορρόφηση των δειγμάτων προσδιορίστηκε κατά τη χρονική στιγμή όπου το θετικό δείγμα αναφοράς (E2) έδωσε απορρόφηση της τάξης του “1.2”.

1.4.2.4 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα MC3T3-E1

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των δειγμάτων να προάγουν τη διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης, προσδιορίστηκε η έκφραση της AlkP των κυττάρων MC3T3-E1, ως πρώιμος δείκτης διαφοροποίησής τους. Τα κύτταρα MC3T3-E1 είναι προ-οστεοβλάστες, των οποίων η διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες πιστοποιείται μέσω επαγωγής του συγκεκριμένου ενζύμου.

<u>Αρχή της μεθόδου</u>

Η αρχή της μεθόδου που οδηγεί στον προσδιορισμό της έκφραση της AlkP έχει περιγραφεί στην § 1.4.2.3.

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Κατά την πειραματική διαδικασία $3.3x10^3$ κύτταρα MC3T3-E1 επιστρώθηκαν σε κάθε θέση της πλάκας μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων παρουσία πλήρους υλικού καλλιέργειας (alpha-MEM ελεύθερο ασκορβικού οξέος και εμπλουτισμένο με 10% FBS) και επωάσθηκαν για 24 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες με το υλικό του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και εμπλουτισμένο με 3% FBS, το οποίο αποτέλεσε το υλικό αναφοράς (C) και δεν ήταν ικανό να επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Το προαναφερόμενο υλικό εμπλουτίστηκε με τους απαραίτητους παράγοντες διαφοροποίησης και πιο συγκεκριμένα, 10 mM β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο και 50 μg/ml

ασκορβικό οξύ (C + Δ.Π.), προκειμένου να προαχθεί η διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα υπό εξέταση δείγματα αξιολογήθηκαν στο υλικό διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) διαλυμένα σε 0.1% DMSO. Τα θρεπτικά υλικά ανανεωνόταν κάθε τρεις ημέρες και στο τέλος των έξι ημερών προσδιορίστηκε η έκφραση της AlkP όπως περιγράφεται στην § 1.4.2.3.

1.4.2.5 Προσδιορισμός της δραστικότητας οστεοκλαστών μέσω της έκφρασης της όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό (TRAP)

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των ενώσεων να παρεμβαίνουν στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μελετήθηκε η επαγωγή της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό οξύ (TRAP: Tartrate Resistant Acid Phosphatase), που είναι βιοχημικός δείκτης διαφοροποίησης των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7 σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες.

Αρχή της μεθόδου

Η TRAP εκκρίνεται από τους ώριμους οστεοκλάστες και διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες όξινες φωσφατάσες, μιας και είναι η μόνη που παρουσιάζει αντοχή στο τρυγικό οξύ. Για τον προσδιορισμό της απαιτείται όξινο περιβάλλον τρυγικού οξέος και φυσικά το υπόστρωμα πάνω στο οποίο θα δράσει, το οποίο και σε αυτή την περίπτωση είναι ο φωσφορικός εστέρας της π-νιτροφαινόλης (pNPP). Η αντίδραση της TRAP με το pNPP που θα οδηγήσει στην παραγωγή του χρωμογόνου παραγώγου είναι ίδια με εκείνη της αλκαλικής φωσφατάσης, όπως περιγράφηκε στην § 1.4.2.3

Πειραματική πορεία

Τα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Πιο συγκεκριμένα, $9.6x10^3$ κύτταρα RAW264.7 επιστρώθηκαν σε κάθε θέση της πλάκας και παρέμειναν σε θρεπτικό υλικό a-MEM εμπλουτισμένο με 10% θερμικά κατεργασμένο ορό (HI-FBS), παρουσία ή απουσία των υπό εξέταση δειγμάτων για 4 ώρες. Με το πέρας των τεσσάρων ωρών, προκειμένου να αρχίσει η διαδικασία της διαφοροποίησης των μακροφάγων σε ώριμους οστεοκλάστες, έγινε προσθήκη του παράγοντα διαφοροποίησης (Δ.Π.) RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) σε συγκέντρωση 50 ng/ml και περαιτέρω επώαση των κυττάρων, παρουσία ή απουσία του RANKL για τρεις ημέρες. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία τόσο φαρμακευτικών παρεμβάσεων, όσο και RANKL αποτελούν το δείγμα αναφοράς (C) (παρέμειναν μακροφάγα), ενώ εκείνα που καλλιεργήθηκαν απουσία παρέμβασης και παρουσία RANKL, διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκλάστες (C + Δ.Π.). Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν στο υλικό διαφοροποίηση (C + Δ.Π.) διαλυμένα σε 0.1% DMSO.

Μετά το πέρας της επώασης έγινε έκπλυση των κυττάρων με PBS και προσθήκη 25 μl διαλύματος λύσης (0.4 M NaCl, 25 mM Hepes pH 7.7, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA και 1% NP40), ανά θέση και επώαση για 5 min στον πάγο. Ακολούθησε προσθήκη 25 μl διαλύματος

που περιείχε 125 mM οξικό νάτριο pH 5.2, 100 mM pNPP και 1 mM L(+) - τρυγικό νάτριο, ανά θέση και επώαση στους 37 ^{o}C για 10 min προκειμένου να παραχθεί το χρωμογόνο παράγωγο. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 405 nm και σε κύκλους των 10 min, χρησιμοποιώντας συσκευή φωτομέτρησης Safire II (TECAN).

1.5 *In vivo* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της οστεοπροστατευτικής δράσης

Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής Νομαρχίας Αθηνών, σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, σε συμμόρφωση με την οδηγία 609/1986 των Ευρωπαϊκών Οικονομικών Κοινοτήτων, και του νόμου 2015/1992, σύμφωνα με την «Ευρωπαϊκή συνθήκη για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, 123/1986»). Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ.Γαροφαλλίδης» της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο Νοσοκομείου «ΚΑΤ» υπό την εποπτεία του υπεύθυνου του εργαστηρίου. Το εργαστήριο πληρεί όλες τις απαιτούμενες από το νόμο προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση πειραμάτων σε ζώα και η Επιτροπή Έρευνας του Νοσοκομείου ΚΑΤ και η Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΕΚΠΑ αποδεχτήκαν το αίτημα για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού πρωτοκόλλου.

1.5.1 Μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων

Για την διενέργεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 60 θηλυκοί ενήλικοι επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 10 μηνών και με σωματικό βάρος με μικρή απόκλιση από το μέσο όρο (300 ±50 g), από τον ίδιο εκτροφέα (καταχωρημένη μονάδα αναπαραγωγής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών), των οποίων τα χαρακτηριστικά παρέμειναν σχετικά σταθερά στην πάροδο του χρόνου. Κατά την έναρξη του πειράματος, τα ζώα στεγάστηκαν ανά τέσσερα σε διαφανείς κλωβούς (45 x 30 x 20 cm) κάτω από πρότυπες εργαστηριακές συνθήκες και υπό την εποπτεία του αρμόδιου κτηνιάτρου. Τα πειραματόζωα παρέμειναν στο χώρο φύλαξης των ζώων Εργαστηρίου, όπου πραγματοποιούταν 12ώροι κύκλοι ημέρας/νύκτας, από 6^{ης} πρωινής έως 6^{ης} απογευματινής και 15 πλήρεις εναλλαγές αέρα/ώρα, διατηρούταν ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ 19 ^{o}C και 22 ^{o}C και σχετική υγρασία μεταξύ 55% και 65%. Μετά από επτά ημέρες εγκλιματισμού έγινε μέτρηση των σωματικών βαρών και οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα σε ομάδες. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της χορήγησης του εκχυλίσματος της Γλυκύρριζας, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες.

- ομάδα ελέγχου (CONTROL), αποτελούμενη από 10 επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε εικονική παρέμβαση και δεν λάμβαναν φαρμακευτική παρέμβαση

Οι υπόλοιποι επίμυες ωοθηκεκτομήθηκαν υπό γενική αναισθησία και άσηπτες συνθήκες και χωρίστηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων χωρίς θεραπευτική παρέμβαση (OVX), των 10 πειραματοζώων
- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων, στους οποίους χορηγούνταν το εκχύλισμα της γλυκύρριζας στο πόσιμο νερό (OVX+GG).

Με αντίστοιχο τρόπο διαμοιράστηκαν τα πειραματόζωα και στην περίπτωση της χορήγησης του χαρουπάλευρου.

- ομάδα ελέγχου (CONTROL), αποτελούμενη από 10 επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε εικονική παρέμβαση και δεν λάμβαναν φαρμακευτική παρέμβαση

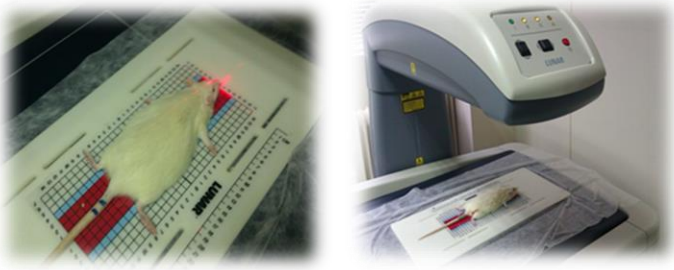
Οι υπόλοιποι επίμυες ωοθηκεκτομήθηκαν υπό γενική αναισθησία και άσηπτες συνθήκες και χωρίστηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων χωρίς θεραπευτική παρέμβαση (OVX), των 10 πειραματοζώων
- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων, στους οποίους χορηγούνταν το χαρουπάλευρο στην τροφή (OVX+CHA), αποτελούμενη από 10 επίμυες.

Μετρήσεις των σωματικών τους βαρών πραγματοποιούνταν κάθε δεύτερη εβδομάδα, ενώ η κατανάλωση τροφής και νερού καταμετρούνταν δύο φορές την εβδομάδα.

1.5.1.1 Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Σε όλα τα πειραματόζωα προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα (BMD) με απορροφησιομετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ (Dual Energy X-ray Absorptiometry/DEXA) κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε τον 3ο μήνα και πριν την ευθανασία (6ο μήνα), πάντοτε υπό ήπια νάρκωση με 80 mg/kg κεταμίνης και 3 mg/kg ξυλαζίνης, ώστε να επιτευχθεί η ακινητοποίηση των επίμυων στην τράπεζα της συσκευής.



Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμυος στην τράπεζα της συσκευής DEXA στο Ε.Ε.Π.Μ.Σ

Οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή GE Lunar Prodigy Densitometer με το ειδικό λογισμικό για μικρά θηλαστικά. Για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας (BMD) του σπογγώδους οστού, επιλέχθηκε η άπω μετάφυση της κνήμης (ως αντιπροσωπευτικό δείγμα ταχείας οστικής εναλλαγής του σκελετού του επίμυος), με την

τοποθέτηση της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI) 2 mm x 2 mm, 3 mm περιφερικά της κνημιαίας αρθρικής επιφάνειας. Επίσης, προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα όλης της κνήμης (φλοιώδους και σπογγώδους οστού), με την τοποθέτηση της περιοχής ενδιαφέροντος σε όλη την κνήμη. Η ακρίβεια της μεθόδου *in vitro* είναι 0.5%.

1.5.1.2 Ωοθηκεκτομή

Για την πραγματοποίηση της ωοθηκεκτομής τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε αναισθησία με ενδομυϊκή χορήγηση 5 mg/kg ξυλαζίνης και 100 mg/kg κεταμίνης και υπό άσηπτες συνθήκες πραγματοποιήθηκε αφαίρεση και των δύο ωοθηκών. Αναλυτικότερα, μετά τη χορήγηση γενικής αναισθησίας και την προετοιμασία του εγχειρητικού πεδίου, πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος στη μέση γραμμή και σε μήκος ίσο με το μισό της απόστασης από τον ομφαλό ως την ηβοισχιακή σύμφυση. Με κυρτό ψαλίδι αποχωρίστηκε ο υποδόριος ιστός και αποκαλύφθηκε η λευκή γραμμή. Ακολούθησε τομή της λευκής γραμμής και είσοδος στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Μετά την ανεύρεση της αριστερής ωοθήκης διαχωριστεί ο πλατύς σύνδεσμος σε περιοχή όπου δεν υπάρχουν αγγεία. Στη συνέχεια και με απορροφήσιμο ράμμα 4-0 πραγματοποιήθηκαν δύο απολινώσεις. Η πρώτη στο ύψος του ιδίου συνδέσμου της ωοθήκης και η δεύτερη κεφαλικώς της ωοθήκης στον κρεμαστήρα σύνδεσμο. Επανελήφθηκε η ίδια διαδικασία και για τη δεξιά ωοθήκη. Η σύγκλειση των κοιλιακών τοιχωμάτων επιτευχθεί με απλές χωριστές ραφές και απορροφήσιμο ράμμα 4-0. Στο δέρμα χρησιμοποιήθηκε μη απορροφήσιμο ράμμα και η σύγκλειση της χειρουργικής τομής διενεργήθηκε με Π οριζόντιες ραφές.

1.5.1.3 Χορήγηση φαρμακευτικής παρέμβασης

Την επόμενη ημέρα της ωοθηκεκτομής άρχισε η χορήγηση των φυτικών παρασκευασμάτων, τα οποία στην περίπτωση της γλυκύρριζας (GG) ήταν διαλυμένο στο πόσιμο νερό της ομάδας παρέμβασης, ενώ στην περίπτωση του χαρουπιού (CHA) ήταν ενσωματωμένο στην τροφή της αντίστοιχης ομάδας. Το εκχύλισμα της γλυκύρριζας ήταν διαλυμένο στο νερό σε συγκέντρωση 2 mg/ml, προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση χορήγησης 200 mg/kg/ημέρα και δεδομένου ότι οι επίμυες καταναλώνουν περίπου 30 ml νερού την ημέρα. Στην περίπτωση του χαρουπιού, η τελική συγκέντρωση χορήγησης ήταν 3 g/kg/ημέρα, δεδομένου ότι οι επίμυες τρέφονται με 20 g τροφής/ημέρα περίπου.

1.5.1.4 Ευθανασία συλλογή οργάνων

Η ευθανασία των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση ενδομυϊκής αναισθησίας μίγματος 5 mg/kg ξυλαζίνης και 100 mg/kg κεταμίνης και ακολούθησε αφαίμαξη από την οπίσθια κοίλη φλέβα και το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους -80 ^{o}C. Κατά την νεκροψία ελέγχθηκαν τυχόν κακοήθειες ή άλλες παθολογικές καταστάσεις και δόθηκε ιδιαίτερη

προσοχή στις ωοθήκες έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η επιτυχία της ωοθηκεκτομής, με την απουσία ωοθηκικού ιστού και την παρατήρηση σημαντικής ατροφίας των κεράτων της μήτρας. Στην συνέχεια συλλέχθηκαν οι μήτρες και ζυγίσθηκαν σε μικροζυγό ακριβείας, αλλά και το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο γαστροκνήμιος μυς, η καρδιά, ο αριστερός νεφρός, το ενδοκοιλιακό λίπος, η αορτή και ο μαστός και αποθηκευτήκαν στους -80 ^{o}C και κάποιοι από αυτούς και σε διάλυμα φορμόλης για πιθανή μελλοντική περαιτέρω επεξεργασία επεξεργασία.

1.6 *In vitro* πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της λευκαντικής δράσης

Ο προσδιορισμός της λευκαντικής δράσης των υπό εξέταση ενώσεων πραγματοποιήθηκε αρχικά μέσω *in vitro* ελεύθερης κυττάρων ενζυμικής δοκιμασίας και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων.

Η *in vitro* πειραματική διαδικασία σε μελανοκύτταρα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, υπό την εποπτεία του υπεύθυνου του εργαστηρίου.

Υλικά

Τα κοινά χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, το χρωμογόνο MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] και το ένζυμο τυροσινάση (EC Number 1.14.18.1) προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Τέλος, τα υλικά της κυτταροκαλλιέργειας D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium, γλουταμίνη, πενικιλλίνη, στρεπτομυκίνη και ο ορός έμβρυου βοός (FBS: fetal bovine serum) προμηθεύτηκαν από την Gibco (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

1.6.1 Ελεύθερη κυττάρων ενζυμική δοκιμασία έναντι του ενζύμου τυροσινάση

Αρχή της μεθόδου

Για τον έλεγχο της δραστικότητας των ουσιών έναντι του ενζύμου τυροσινάση ελέγχθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση του υποστρώματος 3,4-διυδροξυφαινυλανανίνης (L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine) σε ντοπακινόνη (DQ) και κατ' επέκταση την ποσότητα της παραγόμενης καφέ χρωστικής (dopachrome) παρουσία του ενζύμου, εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο των Masuda *et al.* με πολύ μικρές διαφοροποιήσεις (Masuda, *et al.*, 2008).

Πειραματική πορεία

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml, διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1/15 M (NaH_2PO4/Na_2HPO4) με pH 6.8, στο οποίο η περιεκτικότητα του συνδιαλύτη DMSO δεν υπερέβαινε το 1%. Σε πλάκες 96 θέσεων προστέθηκαν 80 μl

ρυθμιστικού διαλύματος 1/15 M (NaH_2PO4/Na_2HPO4), pH 6.8, 40 μl δείγματος και 40 μl τυροσινάσης από μανιτάρι (mushroom tyrosinase - 92 Units/ml) διαλυμένη στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στους 25^{o}C, και στη συνέχεια προστέθηκαν 40 μl υποστρώματος L-DOPA (2.5 mM) διαλυμένης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 25^{0}C και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 475 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τυφλά για κάθε δείγμα, τα οποία δεν περιείχαν το ένζυμο τυροσινάση. Ως πρότυπος αναστολέας της ενεργότητας του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το κοζικό οξύ (kojic acid). Το ποσοστό της αναστολής της τυροσινάσης υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

$$\%=(A-B)-(C-D)]/(A-B)\ x100$$

όπου A: Control (χωρίς δείγμα), B: τυφλό (χωρίς δείγμα και χωρίς τυροσινάση), C: δείγμα, D: τυφλό του δείγματος (χωρίς τυροσινάση).

1.6.2 Προσδιορισμός της λευκαντικής δράσης σε μελανοκύτταρα

Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων ήταν οι ακόλουθες:

- **B16F1**: κύτταρα μελανώματος δέρματος ποντικού, ικανά να εκφράζουν το ένζυμο τυροσινάση και να παράγουν μελανίνη (ATCC, American Tissue Culture Collection).
- **B16F10**: κύτταρα μελανώματος δέρματος ποντικού, ικανά να εκφράζουν το ένζυμο τυροσινάση και να παράγουν μελανίνη (ATCC, American Tissue Culture Collection).

Όπως αναφέρθηκε, και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι ικανές να συνθέτουν μελανίνη ενδοκυττάρια και να την απεκκρίνουν στο εξωκυττάριο χώρο, με τα κύτταρα B16F10 να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες μελανίνης και να έχουν υψηλότερη μεταστατική ικανότητα.

Καλλιέργεια κυττάρων

Τόσο τα κύτταρα B16F1, όσο και τα B16F10 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βόος (FBS, Fetal Bovine Serum) και 2 mM γλουταμίνη, σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας με σταθερή θερμοκρασία 37 °C και παροχή αέριου CO_2 5%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούταν κάθε 2-3 ημέρες, μέσω αποκόλλησής τους με διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.25%.

1.6.2.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

Αρχή της μεθόδου

Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω προσδιορισμού των ζώντων κυττάρων με τη μέθοδο MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Η μέθοδος βασίζεται στην μετατροπή των διαλυτών κίτρινων αλάτων τετραζολίου σε αδιάλυτα μπλε-μωβ μόρια φορμαζάνης. Αναλυτικότερα, τα άλατα τετραζολίου οξειδώνονται από τις μεταβολικώς ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες και παράγονται κρύσταλλοι φορμαζάνης, ο αριθμός των οποίων είναι ευθέως ανάλογος του αριθμού των ζώντων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλύεται σε ισοπροπαλόλη και το παραγόμενο χρώμα έχει μέγιστο απορρόφησης στα 570 nm

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων B16F1 και B16F10 χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS και 2 mM γλουταμίνη. Αναλυτικότερα, επιστρώθηκαν $5x10^3$ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επωάστηκαν για 24 ώρες στο προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επωάστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό στο οποίο ήταν διαλυμένες οι υπό εξέταση ενώσεις. Μετά από επώαση 48 ωρών, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε η χρωστική MTT, διαλυμένη σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε θρεπτικό υλικό DMEM ελεύθερο φαινόλης και FBS για 3-4 ώρες. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύματος MTT και προσθήκη ισοπροπανόλη με σκοπό τη διάλυση των κρυστάλλων φορμαζανίου που είχαν δημιουργηθεί. Με το πέρας της διαδικασία μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 570 nm σε συσκευή φωτομέτρησης (EZ Read 400 ELISA microplate reader, Biochrom, Cambridge, UK). Ως 100% ορίστηκε η απορρόφηση των κυττάρων που επωάστηκαν μόνο με το έκδοχο.

1.6.2.2 Προσδιορισμός της δραστικότητας της τυροσινάσης σε μελανοκύτταρα

Αρχή της μεθόδου

Για τον έλεγχο της δραστικότητας των ουσιών έναντι του ενζύμου τυροσινάση ελέγχθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση του υποστρώματος 3,4-διυδροξυφαινυλανανίνης (L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine), εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο των Chaita *et al* (Chaita, et al., 2017).

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της τυροσινάσης των κυττάρων B16F1 και B16F10 χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS και 2 mM γλουταμίνη. Αναλυτικότερα, επιστρώθηκαν $25x10^3$ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επωάστηκαν για 24 ώρες στο προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό.

Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επωάστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό στο οποίο ήταν διαλυμένες οι υπό εξέταση ενώσεις σε συγκέντρωση που αντιστοιχούσε στο IC_{50} της καθεμίας στην εκάστοτε κυτταρική σειρά. Μετά από επώαση 48 ωρών, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων με κρύο διάλυμα φωσφορικών (PBS) και λύση τους με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6.8) που περιείχε 1% Triton X-100(90 μl/θέση). Στη συνέχεια, τα κύτταρα ψύχθηκαν στους -80°C για 30 λεπτά και μετά την απόψυξή τους προστέθηκαν 100 μl L-DOPA (0.1%) σε κάθε θέση και επωάστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 492 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN.

1.6.2.3 Προσδιορισμός της περιεχόμενης μελανίνης σε μελανοκύτταρα

<u>Αρχή της μεθόδου</u>

Όπως προαναφέρθηκε τα μελανοκύτταρα B16F1 και B16F10 είναι ικανά να συνθέτουν μελανίνη υπό την επίδραση ενώσεων ικανών να ενεργοποιούν συγκεκριμένα μελανογόνα ένζυμα, μεταξύ των οποίων και την τυροσινάση. Η παραγόμενη μελανίνη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω μερικής αποικοδόμησης και διαλυτοποίησης της παρουσία διαλύματος NaOH σε υψηλή θερμοκρασία, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο των Chaita *et al* (Chaita, *et al.*, 2017).

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης μελανίνης των κυττάρων B16F1 και B16F10 χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες καλλιέργειας και κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS και 2 mM γλουταμίνη. Αναλυτικότερα, επιστρώθηκαν $5x10^5$ κύτταρα ανά φλάσκα και επωάστηκαν για 24 ώρες στο προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επωάστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό στο οποίο ήταν διαλυμένες οι υπό εξέταση ενώσεις σε συγκέντρωση που αντιστοιχούσε στο IC_{50} της καθεμίας στην εκάστοτε κυτταρική σειρά. Μετά από επώαση 48 ωρών, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα φωσφορικών (PBS), αποκόλληση με διάλυμα θρυψίνης-EDTA και φυγοκέντρησή τους για την παραλαβή pellet (ιζήματος) κυττάρων. Ακολούθησε φωτογράφηση του pellet που σχηματίστηκαν με σκοπό την αποτύπωση τυχόν λεύκανση των κυττάρων (ορατή κυρίως στα κύτταρα B16F10). Στη συνέχεια το pellet διαλυτοποιήθηκε με 200 μL NaOH (1 N) και αφέθηκαν στους 95°C για 1 ώρα. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 405 nm σε συσκευή φωτομέτρησης (EZ Read 400 ELISA microplate reader, Biochrom, Cambridge, UK). Ως 100% ορίστηκε η απορρόφηση των κυττάρων που επωάστηκαν μόνο με το έκδοχο.

2 Επιλογή φυτικών ειδών και σχεδιασμός συνθετικών αναλόγων

Ο κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανακάλυψη φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων τους με ευεργετική επίδραση στην οστεοπόρωση, τα οποία επιδιώκαμε ιδανικά να δρουν ως εκλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). Το πρώτο και βασικότερο στάδιο, ήταν ο εντοπισμός των πιθανώς δραστικών χημικών δομών - σκελετών (scaffolds), οι θα αποτελούσαν στη συνέχεια αφενός το κύριο κριτήριο επιλογής των υπό μελέτη φυτικών ειδών και αφετέρου τη βάση σχεδιασμού νέων συνθετικών ενώσεων με βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες. Με σκοπό την επίτευξη του προαναφερόμενου στόχου, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής προσομοίωσης στις οποίες αξιολογήθηκε η ικανότητα σύνδεσης με τους υποδοχείς των οιστρογόνων μιας μεγάλης ποικιλίας φυσικών και συνθετικών προϊόντων που ανήκουν στη χημειοθήκη του ΕΚΠΑ-ΕΧΦΠΦΧ.

2.1 *In silico* προκαταρτική αξιολόγηση

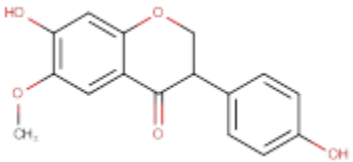
Τα τελευταία χρόνια, η μεθοδολογία εικονικής αξιολόγησης (virtual screening) των βιολογικών ιδιοτήτων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη φαρμακευτικά δραστικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, με βάση ένα επιλεγμένο βασικό σκελετό (scaffold) γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού των σημαντικών υποκαταστατών/ομάδων (functional groups) που είναι υπεύθυνα ή/και απαραίτητα για την εκδήλωση της υπό μελέτη βιολογικής δράσης και έπειτα ακολουθεί βελτιστοποίηση της δραστικότητας βάσει χημικών μετατροπών του βασικού σκελετού. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν τη συμβολή των οιστρογόνων και αντιοιστρογόνων τύπου SERMs στη διατήρηση της οστικής μάζας, προχωρήσαμε σε μια *in silico* αξιολόγηση μεγάλου αριθμού ενώσεων ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων με σκοπό την ανάδειξη των πιο ελπιδοφόρων σκελετών. Με σκοπό τη δημιουργία ενός θεωρητικού μοντέλου πρόβλεψης οιστρογονικότητας, επιλέχθηκαν 200 φυσικά και συνθετικά προϊόντα από τη χημειοθήκη του ΕΚΠΑ-ΕΧΦΠΦΧ, που έχουν ελεγχθεί *in vitro* σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου για την οιστρογονική/αντιοιστρογονική τους δράση. Όλες οι προαναφερόμενες χημικές δομές εξετάστηκαν με την εφαρμογή μεθόδων εικονικής αξιολόγησης και χημειομετρικών μεθόδων με στόχο τη βελτιστοποίηση της δραστικότητας μέσω των κατάλληλων τροποποιήσεων των επιλεγμένων σκελετών (βλέπε § 1.3.1).

Χρησιμοποιώντας τις 6 διακριτές διαμορφώσεις του ERα και του ERβ, έγιναν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations) για κάθε ένωση και υπολογίστηκε η μέση τιμή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσής τους σε όλες τις διαμορφώσεις του υποδοχέα. Επειδή τα πειραματικά δεδομένα ήταν ετερογενή όσον αφορά τις μετρήσεις, έγινε μια εμπειρική

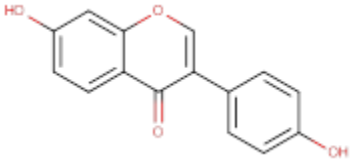
προσέγγιση. Για κάθε ένωση υπολογίστηκε η μέση τιμή ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης και ορίστηκε ως όριο για την πιθανή εμφάνιση οιστρογονική/αντιοιστρογονικής δράσης η τιμή -7 kcal/mol δεδομένου ότι η χαμηλότερη θεωρητική τιμή ήταν -13 kcal/mol για ενώσεις με αποδεδειγμένη οιστρογονική δράση όπως είναι η οιστραδιόλη, η ραλοξιφαίνη και η 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Από τα 200 μόρια που έχουν ήδη ελεγχθεί *in vitro,* μόνο για 13 μόρια η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης προβλέφθηκε υψηλότερα από το όριο των -7 kcal/mol (Ψευδώς Αρνητικά). Απ' αυτά τα 6 ήταν γλυκοσίδες φυσικών προϊόντων τα οποία είχαν δώσει τιμή χαμηλότερη από το όριο των -7 kcal/mol. Τελικά το ποσοστό επιτυχίας πρόβλεψης ήταν 97%. Αυτή η παρατήρηση μας δίνει την δυνατότητα να θεωρήσουμε ότι οι υπολογισμοί που έγιναν στο σύνολο των πρωτεϊνών μπορούν να αξιοποιηθούν για τον τρόπο σύνδεσης των φυσικών προϊόντων και να μας δώσουν αξιόπιστα συμπεράσματα για το σχεδιασμό συνθετικών αναλόγων τους.

Δεδομένου ότι επιτεύχθηκε καλή συσχέτιση θεωρητικών και πειραματικών τιμών της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς ERα και ERβ, αξιοποιήθηκε το σύνολο των δομών τους ώστε να συλλέξουμε στοιχεία για τις ενώσεις ο οποίες εμφάνισαν αξιόλογες αλληλεπιδράσεις και έδωσαν καλές τιμές GlideScore. Η διαδικασία αυτή κρίθηκε ως σημαντική και για ενώσεις οι οποίες δεν έδειξαν ικανοποιητικές τιμές στις βιοδοκιμασίες, ώστε να αξιοποιηθούν ως ενώσεις οδηγοί για τη δημιουργία συνθετικών αναλόγων με βελτιωμένη δράση. Έτσι, με βάση τα προαναφερόμενα επικεντρωθήκαμε στις παρακάτω ενώσεις.

- Οι ενώσεις ONC4 και ONC6, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονοειδών, έδειξαν αξιόλογη δράση στους κυτταρικούς ελέγχους και καλές τιμές αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Έτσι, ο δομικός σκελετός τους χρησιμοποιήθηκε ως βάση τόσο για την επιλογή φυτικών ειδών όσο και για το σχεδιασμό και την παρασκευή συνθετικών αναλόγων.

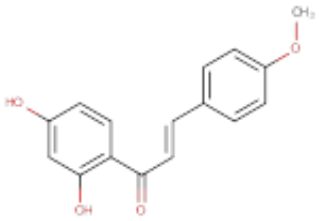


ONC4

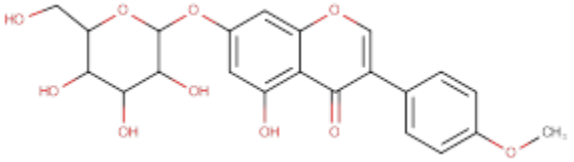


ONC6

- Λαμβάνοντας υπόψη τη δράση των προαναφερόμενων ενώσεων και των μεταβολιτών ONC72 και ONC82 καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία σακχαριδικής μονάδας δεν ευνοεί την αύξηση της δραστικότητας, ενώ η διάνοιξη του δακτυλίου φαίνεται να έχει αντίθετα αποτελέσματα. Έτσι, αποφασίσθηκε ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη συνθετικών παραγώγων της κατηγορίας των χαλκονοειδών.

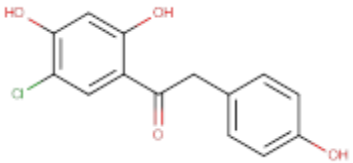


ONC72



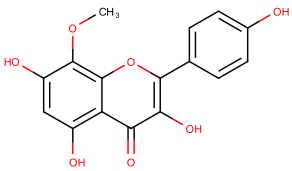
ONC82

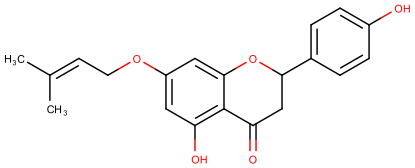
- Η ένωση OSC75 αν και δεν επέδειξε κάποια αξιοσημείωτη δράση στις *in vitro* δοκιμασίες, παρουσίασε αξιόλογη αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Συνυπολογίζοντας ότι οι δεοξυβενζοϊνες αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντας της συνθετικής παρασκευής των ισοφλαβονών, οι οποίες θεωρούνται ότι αποτελούν την κυριότερη κατηγορία φυτοοιστρογόνων, αποφασίσθηκε η ανάπτυξη τόσο αναλόγων του OSC75 όσο και διυδροστιλβενικών και στιλβενικών παραγώγων..



OSC75

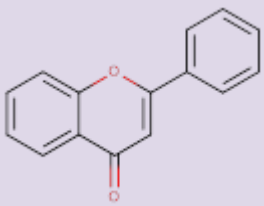
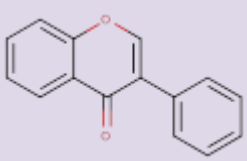
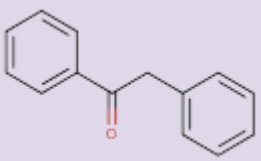
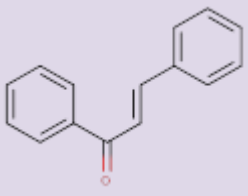
- Επίσης, παράγωγα φλαβονών και φλαβονολών σημείωσαν ικανοποιητική δράση και καλές αλληλεπιδράσεις και ως εκ τούτου η περιεκτικότητά τους σε διάφορα φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας, αποτέλεσε ένα από τα κριτήρια επιλογής τους.





Από τη προαναφερόμενη μελέτη εξήχθησαν βασικοί χημικοί σκελετοί (scaffolds) (πίνακας 14), με πιθανή φυτοοιστρογόνο δράση, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την επιλογή φυτών πλούσιων σε αντίστοιχους μεταβολίτες (βλέπε § 2.2) και για το σχεδιασμό και τη συνθετική παρασκευή νέων αναλόγων (βλέπε κεφάλαιο 5) με απώτερο σκοπό την ανεύρεση οστεοπροστατευτικών παραγόντων φυσικής προέλευσης.

Πίνακας 14: Ελπιδοφόρες δομικές κατηγορίες για εκδήλωση φυτοοιστρογονικότητας.

φλαβόνες	ισοφλαβόνες	δεόξυβενζοΐνες	χαλκόνες
			

2.2 Επιλογή φυτικών δρογών

Στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων καταβάλλεται μια συστηματική προσπάθεια ανάδειξης της ελληνικής χλωρίδας ως μία αξιοσημείωτη πηγή βιοδραστικών δυσικών προϊόντων. Σε αυτό το πλαίσιο και με βάση το γεγονός ότι τα αποτελέσματα του *in silico* ελέγχου ανέδειξαν μεταξύ των ελπιδοφόρων κατηγοριών φυσικών προϊόντων τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις δεοξυβενζοϊνες και τις χαλκόνες, αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν στη μελέτη είδη της οικογένειας Legominosae (Fabaceae). Η οικογένεια αυτή αποτελεί ίσως την πλουσιότερη πηγή φυτικών ειδών, στην πλειοψηφία τους εδώδιμα, πλούσια στους προαναφερόμενους μεταβολίτες και γνωστά για τη φυτοοιστρογόνο δράση τους. Κατά συνέπεια, το μεγαλύτερο ποσοστό των μελετώμενων φυτικών ειδών αντλήθηκε από τη συγκεκριμένη οικογένεια. Η τελική επιλογή των υπό μελέτη φυτικών ειδών βασίστηκε:

- ✓ στα αποτελέσματα του *in silico* προκαταρτικού ελέγχου μεγάλου αριθμού ενώσεων της χημειοθήκης του ΕΚΠΑ-ΕΧΦΠΦΧ, αναφορικά με την συγγένεια σύνδεσής τους με τους *α*- και *β*-οιστρογονικούς υποδοχείς
- ✓ σε αποτελέσματα προγενέστερων μελετών σχετικά με την αντι- ή/και οιστρογονική δράση φυτικών εκχυλισμάτων και απομονωμένων ουσιών, τα οποία προέρχονται από φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας και ιδιαίτερα της Μεσογειακής διατροφής και
- ✓ σε πληροφορίες προερχόμενες από τη παραδοσιακή θεραπευτική, κείμενα Ελλήνων Ιατρών-Θεραπευτών της Αρχαιότητας και σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με την χρήση δρογών για την αντιμετώπιση διάφορων γυναικολογικών δυσλειτουργιών καιθεραπεία της οστεοπόρωσης.

Πιο συγκεκριμένα, το γένος ***Cytisus*** δεν έχει συνδυαστεί με οστεοπροστατευτική δράση, ούτε υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την εκδήλωση οιστρογονικότητας από εκχυλίσματα ειδών του γένους. Παρ' όλα αυτά, προγενέστερες φυτοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει ως κύριους μεταβολίτες του γένους ανάλογα ισοφλαβονών, φαινολικών οξέων, κουμαρινών και φουρανοφλαβονολών, δηλαδή χημικών κατηγορίιών που σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα είναι πολύ πιθανό να διαθέτουν τις επιθυμητές βιολογικές ιδιότητες (Pereira, *et al.*, 2012) (Hanganu, *et al.*, 2010a; Hanganu, *et al.*, 2010b; Raja, *et al.*, 2007) (Koysomboon, *et al.*, 2006). Έτσι, επιλέχθηκε το ***Cytisus villosus,*** το οποίο έχει μελετηθεί ελάχιστα φυτοχημικά, ώστε να εντοπισθούν και να απομονωθούν δευτερογενείς μεταβολίτες των προαναφερόμενων κατηγοριών.

Φυλογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα γένη ***Chamaecytisus*** και ***Lempbotropis*** είναι συνώνυμα του ***Cytisus*** (Käss, *et al.*, 1997; Cristofolini, *et al.*, 2006) και πιθανότατα χαρακτηρίζονται από παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψιν ότι δεν συναντάμε καμία βιβλιογραφική αναφορά ως προς την φυτοχημική τους ανάλυση, έγινε

επιλογή για περαιτέρω μελτη των ειδών ***Chamaecytisus austriacus, Chamaecytisus triflorus*** (***Ch. hirsutus***) και ***Lembotropis nigracans***.

Το γένος ***Calicotome*** επίσης θεωρείται συγγενές προς το ***Cytisus***. Μολονότι δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη χρήση του στην παραδοσιακή ιατρική, το είδος ***Calicotome villosa*** συμπεριελήφθηκε στην παρούσα μελέτη λόγω του εντοπισμού δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στις κατηγορίες των φλαβονών (Pistelli, *et al.*, 2003), των φλαβονολών (Antri, *et al.,* 2010) και των αλκαλοειδών (Antri, *et al.*, 2004), ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν μελέτες σχετικές με την αξιολόγηση της πιθανής οιστρογονικής ή/και οστεοπροστατευτικής δράσης.

Το γένος ***Genista*** καθώς και το γένος ***Teline,*** με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα φυλογενετικών μελετών, πιθανότατα αποτελούν ενιαίο γένος το οποίο είναι γνωστό ως ***Genista*** (Cristofolini, et al., 2006). Αξιοσημείωτο είναι το γεγον'ός ότι τα είδη *Teline monspessulana* και *Genista monspesuulana* αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως συνώνυμα. Παρ' όλο που κανένα από τα δύο γένη δεν έχει συνδεθεί με οστεοπροστατευτική δράση, το γένος *Genista* χαρακτηρίζεται από την παρουσία ισοφλαβονών, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε αποτελεί την κυριότερη κατηγορία φυτοοιστρογόνων (Kiss B., 2012) με οστεοπροστατευτική δράση. Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι είναι οι ισοφλαβόνες νταϊντζεΐνη, γενιστεΐνη και φορμονονετίνη, οι οποίες επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση *in vitro* και έχουν ευεργετική επίδραση στη φυσιολογία των οστών, όπως έδειξαν *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες (Kaczmarczyk-Sedlak, et al., 2013) (Sugimoto, et al., 2000), (Niu, et al., 2010), (Sugimoto, et al., 2000). Για το λόγο αυτό, τα είδη ***Teline monspessulana*** και ***Genista hassertiana*** επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

Το είδος ***Lathyrus clymenum*** ανήκει στην κατηγορία των εδώδιμων ειδών (φάβα) και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φλαβονοειδή (καιμφερόλη, κερκετίνη, λουτεολίνη κ.ά.) και γλυκοσυλιωμένα παράγωγά τους (Ranabahu, *et al.*, 1993), προανθοκυανιδίνες (Jin, *et al.*, 2012,) σαπωνίνες (Khan, 2011) και άλλες κατηγορίες με ιδιαίτερες βιολογικές δράσεις. Εκτός από το πλούσιο φυτοχημικό του περιεχόμενο, το συγκεκριμένο είδος επιλέχθηκε καθώς ανήκει στην ομάδα των οσπρίων και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η σύνδεση της κατανάλωσής τους με ευεργετικές επιδράσεις στα οστά (Lee, *et al.*, 2011).

Στο γένος ***Melilotus*** έχει αναφερθεί η παρουσία τριτερπενίων, σαπωνινών, κουμαρινών, κουμεστανίων (Macıas, *et al.*, 1999) και γενικά φυσικών προϊόντων τα οποία ανήκουν στις κατηγορίες των φυτοοιστρογόνων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με τη βιολογική δράση και το φυτοχημικό περιεχόμενο του είδους ***Melilotus graecus***, ήταν καθοριστικά για την επιλογή του για περαιτέρω μελέτη.

Το είδος ***Cercis siliquastrum*** δεν έχει μελετηθεί ως προς το χημικό περιεχόμενο και τις βιολογικές του ιδιότητες. Όμως σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές σε άλλα είδη του γένους έχουν εντοπισθεί στιλβενια και φαινολικές ενώσεις, ενώ υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν δείξει εκχυλίσματα διαφόρων ειδών του γένους. Αξιοσημείωτο όμωε είναι και

το γεονός ότι στην κινεζική ιατρική χρησιμοποιείται ο φλοιός και το ξύλο του *C. chinensis* έναντι διαφόρων παθήσεων καθώς και για την αποκατάσταση της εμμήνου ρύσεως (οιστρογονικότητα), ενώ τα άνθη του του χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του βήχα και ρευματικών πόνων (αντιφλεγμονώδης δράση) (Yuan, *et al.*, 2005). Έτσι, επιλέχθηκε το παραπάνω είδος για περαιτέρω μελέτη και διερεύνηση της πιθανής οστεοπροστατευτικής του δράσης.

Το είδος ***Galega officinalis*** είναι γνωστό στην Ευρώπη από το Μεσαίωνα για την αντιδιαβητική του δράση, ενώ μελέτη έδειξε πως ευνοεί την παραγωγή γάλακτος στα πρόβατα κατά 16.9% όταν χορηγηθούν 2g / kg βάρους για 30-60 μέρες μετά τον τοκετό (González-Andrés, *et al.*, 2004). Η λακτογόνος δράση που παρουσιάζει το συγκεκριμένο είδος οφείλεται στην παρουσία φυτοοιστρογόνων (καιμφερόλη, κερκετίνη, τριγλυκοσίδες φλαβονόλης), τα οποία πιθανότατα δρουν μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (Champavier, *et al.*, 2000). Λαμβάνοντας υπόψιν τη συμβολή των οιστρογόνων στην εκδήλωση πιθανής οστεοπροστατευτικής δράσης (Fiorelli, *et al.*, 1999), ενσωματώθηκε το συγκεκριμένο είδος στην παρούσα μελέτη.

Το είδος ***Anagyris foedida*** αναφέρεται στο Διοσκουρίδη για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του, αλλά και ως εκρωτικό και εμμηναγωγό, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή οιστρογονική δράση δράση. Μάλιστα, με σκοπό να δοθεί έμφαση στην ισχυρή δράση του φυτού, χαρακτηριστικά αναφέρεται πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φυλαχτό σε περίπτωση δυστοκίας, αλλά μετά την ολοκλήρωση του τοκετού πρέπει να απομακρύνεται από τη γυναίκα. Σύγχρονες επιστημονικές μελέτες του είδους ανέδειξαν την παρουσία αλκαλοειδών και φλαβονοειδών με κυτταροτοξική δράση (Innocenti, *et al.*, 2006).

Στο γένος ***Anthyllis*** έχουν εντοπιστεί φλαβονόλες (Halabalaki, *et al.*, 2011) ισοφλαβόνες, καθώς και παράγωγα χαλκονών (Pistelli, *et al.*, 1996). Παρά την ύπαρξη φυτοοιστρογόνων στο γένος, μέχρι στιγμής κανένα είδος του δεν έχει αξιολογηθεί για πιθανή οστεοπροστατευτική δράση. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το είδος ***Anthyllis montana***, το οποίο επιπρόσθετα δεν έχει διερευνηθεί φυτοχημικά.

Αρκετά είδη του γένους ***Indigofera*** χρησιμοποιούνται στην Αφρικανική παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών καταστάσεων, ενώ από διάφορα είδη του γένους έχουν απομονωθεί φλαβονοειδή, διυδροστιλβένια, πτεροκαρπάνες και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν συνδυαστεί με την εκδήλωση οστεοπροστατευτικής δράσης. Επιλέχθηκε λοιπόν το είδος ***Indigofera secundiflora*** για περαιτέρω μελέτη καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει αξιολογηθεί βιολογικά, ενώ σε μια μόνο φυτοχημική μελέτη έχει αναφερθεί η ύπαρξη κερκετίνης και παραγώγων της (Ahmadu, *et al.*, 2011).

Ερευνητικές μελέτες έχουν αναδείξει το ***Dorycnium pentaphyllum*** ως ικανό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Bremnera, *et al.*, 2009), ενώ δεν έχει σημειωθεί καμία ερευνητική προσπάθεια διερεύνησης τόσο της οιστρογονικής, όσο και της πιθανής οστεοπροστατευτικής δράσης του γένους. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το είδος ***Dorycnium hirsutum***, καθώς

από τα υπέργεια τμήματα του φυτού έχουν απομονωθεί διάφορα γλυκοσιδικά πράγωγα της καιμφερόλης και της κερκετίνης με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (Pistelli, *et al.*, 2006).

Αναφορικά με το γένος ***Hippocrepis***, αξιοσημείωτο είναι πως δεν παρουσιάζονται βιβλιογραφικές μελέτες που να αφορούν στη φυτοχημική μελέτη ή τη βιολογική αξιολόγηση φυτικών ειδών του γένους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, τα οποία παραπέμπουν στα γένη *Genista, Cytisus* και *Teline* της οικογένειας Leguminosae, αλλά και το γεγονός ότι χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό διατροφικό μέσο στην κτηνοτροφία (Ceresuela, *et al.*, 1998) αποφασίστηκε η ενταξή του είδους ***Hippocrepis comosa*** στην παρούσα μελέτη.

Το εκχύλισμα των καρπών της ***Psoralea coryfolia*** (Fructus psoraleae) χρησιμοποιείται ευρέως στην κινεζική θεραπευτική για την θεραπεία καταγμάτων, την οστεομαλακία και την οστεοπόρωση (Lim, *et al.*, 2008) (Wang, *et al.*, 2001), ενώ *in vivo* μελέτες σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες επιβεβαιώνουν την οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος (Tsai, *et al.,* 2007) (Cai, *et al.*, 2009). Προγενέστερη ερευνητική μελέτη ανέδειξε ως κύρια συστατικά του εκχυλίσματος τις κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή και τερπένια, τα οποία ευθύνονται για τη δράση του. Το γεγονός ότι αντίστοιχοι δευτερογενείς μεταβολίτες εντοπίζονται και στο είδος *Psoralea bituminosa*, δικαιολογεί την ένταξη του τελευταίου στην παρούσα μελέτη.

Το γένος ***Lupinus*** χαρακτηρίζεται από την παρουσία ισοφλαβονών, φλαβονών και πρενυλιωμένων παραγώγων τους, ουσίες που εντάσσονται στις κατηγορίες των φυτοοιστρογόνων. Το είδος ***Lupinus albus*** αναφέρεται για την εμμηναγωγό και εκτρωτική δράση του στο έργο *Materia Medica* του Διοσκουρίδη. Επίσης, παραδοσιακές χρήσεις του φυτού για τη θεραπεία της αρθρίτιδας και της περιοδοντίτιδας (Gaultier, *et al.,* 2005) (Marc, *et al.*, 2008) υποδηλώνουν την αντιφλεγμονώδη δράση του, η οποία επιβεβαιώνεται και από σύγχρονες μελέτες (Millán-Linares, *et al.*, 2014) (Millán-Linares, *et al.*, 2015). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα επιστημονικά δεδομένα τα οποία να αναδεικνύουν την οστεοπροστατευτική δράση του ***Lupinus albus*** και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

Το επόμενο φυτικό είδος που επιλέχθηκε ήταν η ***Ceratonia siliqua*** καθώς είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα, κυρίως γαλλικό οξύ και παράγωγα γαλλοταννινών, όπως επίσης και σε παράγωγα φλαβονοειδών (Owen, *et al.*, 2003) (Rakib, *et al.*, 2010). Οι προαναφερόμενες ουσίες ή παράγωγά τους έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν οιστρογονική ή/και οστεοπροστατευτική δράση.

Το εκχύλισμα της γλυκύρριζας (***Glycyrrhiza uralensis***), σε συνδυασμό με άλλα φυτικά εκχυλίσματα, χορηγείται ως φάρμακο στην κινεζική θεραπευτική για τη θεραπεία της χαμηλής οστικής μάζας, της οστικής απώλειας, των καταγμάτων, της οστεομαλακίας, της ατελούς οστεογένεσης, διαφόρων ασθενειών των οστών και της περιοδοντίτιδας (Choi, 2005). Η *Glycyrrhiza glabra* είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ισοφλαβόνες (Vayaa, *et al.*, 1997), χαλκόνες,

πρενυλιωμένα ανάλογά τους (Birari, *et al.*, 2011) και κουμαρίνες (Kaur, et al., 2012), ουσίες που αποτελούν πιθανούς οστεοπροστατευτικούς παράγοντες και επομένως κρίθηκε σκόπιμη η παρουσία της στην παρούσα μελέτη.

Πολλά είδη του γένους ***Rhamnus*** (οικογένεια **Rhamnaceae**) χρησιμοποιούνται για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες στην παραδοσιακή ιατρική (Locatelli, *et al.,* 2009) και είναι πλούσια σε φαινολικές ουσίες, ειδικά σε φλαβονοειδή, ανθρακινόνες και ταννίνες. Μεταξύ των βιολογικών δράσεων, η αντιφλεγμονώδης είναι η πλέον τεκμηριωμένη (Chiavaroli, *et al.*, 2008) και έχει συσχετιστεί με το υψηλό φσαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων τους. Αξιοσημείωτο είαι το γεγονός ότι η εμοδίνη, χαρακτηριστική ανθρακινόνη του γένους, εμφανίζει οστεοπροστατευτική δράση επάγοντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Lee, *et al.*, 2008) (Chen, *et al.*, 2017) και καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση (Kim, *et al.,* 2014). Με βάση τα προαναφερόμενα δεδομένα αποφασίστηκε η επιλογή των ειδών ***R. sibthorpiana, R. lycioides*** και ***R. alpinus*** για περαιτέρω μελέτη.

Από το γένος ***Sideritis*** (οικογένεια **Lamiaceae**) πολλά είδη χρησιμοποιούνται σε πολλές χώρες για την παρασκευή αφεψημάτων τα οποία είναι γνωστά ως τσάι του βουνού. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει πως το υδατικό εκχύλισμα του είδους ***Sideritis euboea*** αυξάνει την οστεοβλαστική δραστηριότητα, ενώ παράλληλα εμφανίζει αντιοιστρογόνο δράση σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Kassi, *et al.*, 2004). Επίσης, χορήγησή του σε ομάδες ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων ανέδειξε την ευεργετική του επίδραση στη διατήρηση της οστικής τους πυκνότητας (Dontas, *et al.*, 2011). Έτσι, προχωρήσαμε στην επιλογή των ειδών ***S. raeseri*** **subsp.** ***raeseri*** και ***S.scardica*** με σκοπό την αξιολόγησή τους.

Το είδος *Origanum vulgare* (οικογένεια **Lamiaceae**) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα εδώδιμα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, για το οποίο έχει καταγραφεί ένα σημαντικό πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων και φαρμακολογικών δράσεων. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά την αρχαιότητα, αλλά και στην λαϊκή θεραπευτική χρησιμοποιείται για την ανακούφιση από τη δυσπεψία, τον πόνο στομάχου καθώς και ως αντιικό. Μελέτες ακόμα και σε *in vivo* μοντέλα επιβεβαιώνουν την αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του (Yoshimo, *et al.*, 2006), η οποία οφείλεται στους περιεχόμενους μεταβολίτες του και κατά κύριο λόγο στα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή (Tada, 2000). Καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η πιθανή οστεοπροστατευτική δράση του συγκεκριμένου είδους, αλλά και άλλων ειδών του γένους *Origanum*, κρίθηκε σκόπιμο να επιλέξουμε το *Origanum vulgare* για περαιτέρω μελέτη.

Στην κινεζική θεραπευτική το φάρμακο 'Jia-Wei-Xiao-Yao-San (JWXYS)', το οποίο αποτελεί μίγμα δρογών και περιέχει μεταξύ άλλων ένα είδος του γένους ***Mentha*** (οικογένεια **Lamiaceae**) ως ένα από τα συστατικά του, χρησιμοποιείται για την ανακούφιση των γυναικών από τα μετεμμηνοπαυσιακά συμπτώματα (Makino, *et al.*, 2005), καθώς και για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού (Lai, *et al.*, 2012). Πρόσφατες *in vivo* μελέτες σε ωοθηκεκτομυθέντες επίμυες ανέδειξαν το προαναφερόμενο σκεύασμα ως εναλλακτικό παράγοντα πρόληψης της απώλειας οστικής μάζας (Lee, *et al.*, 2005), καθώς και της αθηροσκλήρωσης (Lee, *et al.,* 2004).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως η μενθόλη, η οποία αποτελεί βασικό πτητικό συστατικό ειδών *Mentha*, έχει αποδειχθεί ως ικανός αναστολέας της οστικής επαναρρόφησης (Mühlbauer, *et al.*, 2003). Είναι γνωστό πως στη λαϊκή θεραπευτική η *Mentha* συνίσταται για την αντιμετώπιση της δυσμηνόρροιας, ενώ κατά το Διοσκουρίδη η *Mentha pulegium* παρουσιάζει εμμηναγωγό δράση και εκτρωτικές ιδιότητες (Dioscourides). Στηριζόμενοι στα παραπάνω αποφασίσαμε να συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας τα είδη ***M. aquatica***, ***M. longifolia*** και ***M. pulegium***.

Οι ρίζες του είδους ***Salvia miltiorrhiza*** (οικογένεια **Lamiaceae**) χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στη κινεζική ιατρική σε περιπτώσεις εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου (Tang, *et al.*, 1992) και είναι το πιο κοινό βότανο που χορηγείται με σκοπό την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με άλλες δρόγες (Chen, *et al.*, 2011). Οι πιο χαρακτηριστικοί μεταβολίτες του φυτού ανήκουν στην κατηγορία των διτερπενίων τύπου τανσινόνης, με την τανσινόνη IIA να καταστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και την οστική επαναρρόφηση καθιστώντας την ικανό οστεοπροστατευτικό παράγοντα (Kim, *et al.*, 2004). Πολυάριθμες *in vivo* μελέτες σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες επιβεβαιώνουν την οστεοπροστατευτική δράση του φυτού (Chae, *et al.,* 2004), (Cui, *et al.*, 2004) (Zhang, *et al.,* 2008), ενώ έχουν πραγματοποιηθεί και κλινικές δοκιμές με ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε οστεοπορωτικές γυναίκες χορηγώντας τους μόνο *Salvia miltiorrhiza* (Li, *et al.,* 1996) ή συνδυασμό της με παραδοσιακά κινεζικά φάρμακα φυσικής προέλευσης έναντι της οστεοπόρωσης (Liu, *et al.*, 2014). Έτσι αποφασίσαμε να διερευνήσουμε πιθανή οστεοπροστατευτική δράση των φυτικών ειδών ***Salvia fruticosa*** και ***Salvia officinalis***, η οποία μάλιστα κατά το Διοσκουρίδη εμφανίζει εμμηναγωγό δράση και σε υψηλές δόσεις είναι ισχυρό εκτρωτικό.

Οστεοπροστατευτικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί και σε είδη του γένους ***Allium*** (οικογένεια **Liliaceae**), κυρίως λόγω των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών τους (κερκετίνη, ρουτίνη, καιμφερόλη). Επίσης, η οστεοπροστατευτική δράση ειδών του γένους ***Allium*** έχει αποδειχτεί τόσο σε *in vitro* (Rassi, *et al.*, 2005) (Wattel, *et al.*, 2003), όσο και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης (Tsuji, *et al.*, 2009), (Horcajada, *et al.*, 2000). Το ***Allium sativum*** συγχορηγείται με άλλες δρόγες στην κινεζική θεραπευτική για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης (Zhang, et al., 2016), ενώ μελέτες επιβεβαίωσαν τις οστεοπροστατευτικές του ιδιότητες σε επίμυες, όπου παρατηρήθηκε αύξηση την οστική πυκνότητα κυρίως μέσω μηχανισμού μεταφοράς ασβεστίου (Mukherjee, *et al.*, 2004), (Mukherjee, *et al.*, 2006). Επίσης, χορήγηση αλκοολικού εκχυλίσματος του είδους ***Allium ampeloprasum*** var. ***porrum*** σε αρσενικούς αρουραίους οδήγησε σε αύξηση της οστικής πυκνότητας πάλι μέσω μεταφοράς ασβεστίου (El-Shenawy, *et al.*, 2013), ενώ στο Διοσκουρίδη αναφέρεται και η εμμηναγωγός δράση του φυτού. Επιπρόσθετα, το ***Allium cepa*** φάνηκε ικανό να αναστέλλει την διαφοροποίηση και την ενεργότητα των οστεοκλαστών (Oliveira, *et al.*, 2015) (Wetli, *et al.*, 2005). Έτσι, το ***Allium ampeloprasum*** επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι χορήγηση κροκίνης σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό την οστική μάζα αλλά και την αντοχή των οστών, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις εκδήλωσε οστεοπροστατευτική δράση ανάλογη της οιστραδιόλης. Η υψηλή ικανότητα προστασίας από το οξειδωτικό stress, την οποία έδειξε η κροκίνη στο πλάσμα και στα οστά, υποδεικνύει πως πιθανώς η οστεοπροστατευτική δράση που παρουσιάζει οφείλεται στην υψηλή αντιοξειδωτική της ικανότητα (Cao, *et al.,* 2014). Ο κρόκος χρησιμοποιείται στην κινεζική θεραπευτική για την τόνωση της κυκλοφορίας του αίματος, την απομάκρυνση των τοξινών, ενώ χορηγείται και σε διάφορες μορφές καρκίνου. Υπάρχει μια αναφορά σχετική με την οστεοπροστατευτική δράση του *Crocus sativus* (οικογένεια **Iridaceae**), καθώς έπειτα από χορήγηση σε μοντέλα οστεοπόρωσης φάνηκε να παρεμποδίζει την απώλεια οστικής μάζας και να αυξάνει τη μηχανική αντοχή των οστών (Chong, 2011).

Το είδος *Rosa damascena* (οικογένεια **Rosaceae**) αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά φυτά της οικογένειας **Rosaceae** και πέραν την καλλωπιστικής του σημασίας, εμφανίζει σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Στην παραδοσιακή θεραπευτική, ανάμεσα σε άλλες, αναφέρεται η χρήση του φυτού για την αντιμετώπιση του πόνου και διαφόρων διαταραχών κατά την έμμηνο ρύση καθώς και για την αντιμετώπιση φλεγμονών (Buckle, *et al.*, 1993). Επίσης, παρουσιάζει και αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφείλεται στην παρουσία φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών (Baydar, *et al.*, 2013). Η αντιφλεγμονώδης δράση του φυτού *Rosa canina* αποδίδεται κατά κύριο λόγο στα μη υποκατεστημένα λιπαρά και τριτερπενικά οξέα που περιέχει (Larsen, *et al.*, 2003), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και από *in vivo* μελέτες (Winther, *et al.*, 2005). Δεδομένου ότι η εκδήλωση οστεοπραστασίας συνδέεται με την εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης, αποφασίσαμε να εντάξουμε στη μελέτη μας και το φυτικό είδος *Rosa damascena*.

Το είδος *Vitis vinifera* (οικογένεια **Vitaceae**) αποτελεί ίσως το πιο κοινό είδος οινοποιητικών σταφυλιών. Όπως είναι γνωστό τα σταφύλια είναι πολύ πλούσια σε πολυφαινόλες και φλαβονοειδή (Xu, *et al.*, 2011), μεταβολίτες που έχουν συνδεθεί με την υγεία των οστών. Πρόσληψη φλαβονολών και κατεχινών από μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει συνδεθεί με αύξηση της οστικής πυκνότητας του μηριαίου οστού (Hardcastle, *et al.,* 2011), ενώ *in vivo* πειράματα σε ωοθηκεκτομυθένες επίμυες έχουν αναδείξει την οστεοπροστατευτική δράση τόσο φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη (Siddiqui, *et al.*, 2011), η καιμφερόλη (Trivedi, *et al.*, 2008), η ρεσβερατρόλη (Liu, *et al.*, 2005), αλλά και των κατεχινών (Shen, *et al.*, 2008). Προγενέστερς ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι η διατροφή εμπλουτισμένη με σταφύλια δρα ευεργετικά στον μεταβολισμό του ασβεστίου διατηρώντας την οστική υγεία (Hohman, *et al.,* 2015). Στην Αυστραλία, κατανάλωση από ομάδα ανδρών κόκκινου κρασιού για πάνω από δύο χρόνια συσχετίστηκε με μεταβολή στην οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης (Yin, *et al.*, 2011), ενώ ο Mulbauer και οι συνεργάτες του έδειξαν πως χορήγηση κρασιού μετά την απομάκρυνση του οινοπνεύματος μείωσε σημαντικά την απορρόφηση των οστών (Muhlbauer, *et al.,* 2003).

Εκχύλισμα των καρπών του ***Citrus paradise*** (οικογένεια **Rutaceae**) φαίνεται να διατηρεί τα επίπεδα ασβεστίου στα οστά και να εκδηλώνει αντιοξειδωτική προστασία (Mandadi, *et al.*, 2009). Επίσης, εκχυλίσματα των *C. aurantifolia* και *C.sinensis* έδειξαν αξιόλογη αντιοστεοπορωτική δράση σε οστεοπορωτικά μοντέλα ποντικών, η οποία οφείλεται στους περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες τους και κυρίως στα φλαβονοειδή και τις κουμαρίνες (Shalaby, *et al.*, 2011). Βασιζόμενοι στις προαναφερόμενες πληροφορίες προχωρήσαμε στην επιλογή του είδους ***C. aurantium*** για διερεύνηση της ενδεχόμενης οστεοπροστατευτικής του δράσης.

Έτσι, με σκοπό την στοχευμένη απομόνωση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, τα οποία να διαθέτουν πιθανή οστεοπροστατευτική δράση και ιδανικά SERM ιδιότητες, συνολικά συγκεντρώθηκαν 39 δρόγες, προερχόμενες από 36 φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας, τα οποία στην πλειονότητά τους είναι εδώδιμα. Οι επιλεγμένες δρόγες παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Συλλογή μελετούμενων φυτικών ειδών

Οικογένεια Leguminosae		
A/A	**Φυτικό είδος**	**Τμήμα φυτού**
1	*Lathyrus clymenum*	Περισπέρμιο
2	*Dorycnium hirsutum*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί
3	*Chamaecytisus austriacus*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί
4	*Chamaecytisus triflorus (Ch. hirsutus)*	Υπέργεια τμήματα
5	*Cytisus villosus (C. triflorus)*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
6	*Melilotus graecus*	Όλο το φυτό (ρίζες και καρποί)
7	*Teline monspessulana*	Υπέργεια τμήματα
8	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
9	*Cercis siliquastrum*	Υπέργεια τμήματα και καρποί
10	*Galega officinalis*	Υπέργεια τμήματα
11	*Hippocrepis comosa*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
12	*Anagyris foedida*	Καρποί και σπόροι
13	*Calicotome villosa*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
14	*Anthyllis montana*	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)
15	*Indigofera secundiflora*	Υπέργεια τμήματα
16	*Glycyrrhiza glabra*	Ρίζες
17	*Glycyrrhiza glabra*	Υπέργεια τμήματα
18	*Genista hassertiana*	Υπέργεια τμήματα
19	*Psoralea bituminosa*	Υπέργεια τμήματα
20	*Lupinus albus*	Υπέργεια τμήματα
21	*Lupinus albus*	Καρποί
22	*Ceratonia siliqua*	Φύλλα και κλαδιά
23	*Ceratonia siliqua*	Καρποί
Οικογένεια Lamiaceae		
24	*Salvia fruticosa*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
25	*Salvia officinalis*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
26	*Sideritis raeseri ssp. raeseri*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
27	*Sideritis scardica*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
28	*Origanum vulgare ssp. hirtum*	Υπέργεια τμήματα
29	*Mentha aquatica*	Υπέργεια τμήματα

30	*Mentha pulegium*	Υπέργεια τμήματα
31	*Mentha longifolia*	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα
	Οικογένεια Rhamnaceae	
32	*Rhamnus alpinus*	Υπέργεια τμήματα
33	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus*	Υπέργεια τμήματα
34	*Rhamnus sibthorpiana*	Υπέργεια τμήματα
	Οικογένεια Rosaceae	
35	*Rosa damascena*	Άνθη
	Οικογένεια Iridaceae	
36	*Crocus sativus*	Άνθη
	Οικογένεια Rutaceae	
37	*Citrus aurantium*	Φλούδα
	Οικογένεια Vitaceae	
38	*Vitis vinifera*	Κρασί, ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου
	Οικογένεια Liliaceae	
39	*Allium ampeloprasum*	Φύλλα

2.3 Παρασκευή εκχυλισμάτων

Με σκοπό την προετοιμασία των επιθυμητών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο η τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (Accelerated Solvent Extraction) ώστε να εξασφαλιστεί η ταχεία και οικονομική παραλαβή του σημαντικότερου μέρους των δευτερογενών μεταβολιτών. Η συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης περιγράφεται αναλυτικά στην § 1.1.2.1.

Το πρωτόκολλο εκχύλισης που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τη χρήση 20 g του εκάστοτε ξηρού φυτικού υλικού, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κελιά όγκου 100 ml με σκοπό την ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης οργανικών διαλυτών. Για κάθε δρόγη πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες εκχυλίσεις, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και μεθανόλη (MeOH) για την παρασκευή ενός σχετικά άπολου και ενός πιο πολικού εκχυλίσματος αντίστοιχα, με σκοπό την παραλαβή της πλειονότητας των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών της κάθε δρόγης. Οι ακριβείς συνθήκες των εκχυλίσεων φαίνονται στον πίνακα 16. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκαταστάθηκε αδρανής ατμόσφαιρα χρησιμοποιώντας αέριο N_2, ώστε να αποφευχθεί η οξειδωτική αλλοίωση των περιεχόμενων μεταβολιτών. Τέλος, τα παραγόμενα υγρά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) και ζυγίστηκαν τα τελικώς παραγόμενα ξηρά εκχυλίσματα, προκειμένου να προσδιοριστεί η απόδοση της κάθε εκχύλισης.

Πίνακας 16:Συνθήκες εκχύλισης τεχνικής A,S,E,

Θερμοκρασία	70 °C
Πίεση	1500 psi (104 bar)
Χρόνος προθέρμανσης	5min
Χρόνος στατικής εκχύλισης	5 min
Κύκλοι εκχύλισης	2
Όγκος έκπλυσης	20 ml
Χρόνος εξώθησης εκχυλίσματος	2 min

Στην περίπτωση του είδους *Citrus aurantium* πραγματοποιήθηκε εκχύλιση χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμα ρευστά (CO_2)-SFE, λόγω της προσομοίωσης σχετικής συνταγής και της περιεκτικότητας σε ουσίες ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες. Η περιγραφή της συγκεκριμένης τεχνικής αναφέρεται στην § 1.1.2.2.

Σε δοχείο εκχύλισης όγκου 1 L τοποθετήθηκαν 300 g από το εξωτερικό τμήμα του εξωκαρπίου του είδους *Citrus aurantium*. Η ροή του διαλυτικού μέσου ρυθμίστηκε στα 5 kg/h και η αρχική πίεση και θερμοκρασία στο δοχείο ήταν 100 bar και 70 °C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία και η πίεση στους διαχωριστήρες ρυθμίστηκαν στα 60 bar και στους 40 °C, αντίστοιχα. Μετά την πάροδο 4 ωρών αυξήθηκε η πίεση του CO_2 στα 250 bar και συνεχίστηκε η εκχύλιση για τις επόμενες 4 ώρες. Σε κάθε περίπτωση τα παρασκευάσματα διαχωρίστηκαν στα δύο μέρη τους, το υδατικό και το ελαιώδες, καθώς στο διαχωριστήρα παραλήφθηκαν διφασικά εκχυλίσματα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Συνθήκες υπερκρίσιμης εκχύλισης

Κλάσματα	**Θερμοκρασία εκχυλιστήρα (°C)**	**Πίεση εκχυλιστήρα (bar)**	% EtOH (συνδιαλύτης)
CA2_100	70	100	0
CA2_250	70	250	0

Στην περίπτωση του εκχυλίσματος του *Vitis vinifera* (Μοσχάτο Αμβούργου), ο οίνος επεξεργάστηκε σε ανοιχτή στήλη πληρωμένη με μακρόπορη ρητίνη XAD-4 και το φαινολικό φορτίο αποδεσμεύτηκε με χρήση αιθανόλης. Τελικά, το αιθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) μέχρι ξηρού.

Πίνακας 18: Συγκεντρωτικός πίνακας παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΔΡΟΓΗ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)
TH1	*Sideritis raeseri ssp. raeseri*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.3
TH2	*Sideritis raeseri ssp. raeseri*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	13.3
TH3	*Sideritis scardica*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	4.8
TH4	*Sideritis scardica*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOH	12.8
TH5	*Origanum vulgare ssp. hirtum*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.3
TH6	*Origanum vulgare ssp. hirtum*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	14.9
TH7	*Mentha aquatica*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.4
TH8	*Mentha aquatica*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	15.3
TH9	*Mentha pulegium*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	12.6

TH10	*Mentha longifolia*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	8.1
TH11	*Rosa damascena*	Rosaceae	Άνθη	H_2O	12.0
TH12	*Crocus sativus*	Iridaceae	Άνθη	H_2O/EtOH	31.3
TH13	*Salvia officinalis*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	15.0
TH14	*Salvia fruticosa*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	6.9
TH15	*Lathyrus clymenum*	Leguminosae	Περισπέρμιο	EtOAc	4.8
TH16	*Lathyrus clymenum*	Leguminosae	Περισπέρμιο	MeOH	3.5
TH17	*Dorycnium hirsutum*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	MeOH	12.3
TH18	*Chamaecytisus austriacus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	MeOH	16.3
TH19	*Chamaecytisus triflorus (=Ch.hirsutus)*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	3.9
TH20	*Cytisus villosus (= C. triflorus)*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	17.1
TH21	*Mentha pulegium*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.0
TH22	*Salvia officinalis*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	10.0
TH23	*Salvia fruticosa*	Lamiaceae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	15.1
TH24	*Melilotus graecus*	Leguminosae	Όλο το φυτό (ρίζες και καρποί)	EtOAc	8.7
TH25	*Melilotus graecus*	Leguminosae	Όλο το φυτό (ρίζες και καρποί)	MeOH	19
TH26	*Teline monspessulana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	6.0
TH27	*Teline monspessulana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	15.8
TH28	*Cytisus villosus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.8
TH29	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	6.1
TH30	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	18.9
TH31	*Cercis siliquastrum*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα και καρποί	EtOAc	2.4
TH32	*Cercis siliquastrum*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα και καρποί	MeOH	12.3
TH33	*Galega officinalis*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	9.1
TH34	*Galega officinalis*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	21.0
TH35	*Hippocrepis comosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	4.6
TH36	*Hippocrepis comosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	16.2
TH37	*Chamaecytisus triflorus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	9.0
TH38	*Anagyris foedida*	Leguminosae	Καρποί και σπόροι	EtOAc	10.6
TH39	*Anagyris foedida*	Leguminosae	Καρποί και σπόροι	MeOH	22.3
TH40	*Calicotome villosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	7.8
TH41	*Calicotome villosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	17.6

TH42	*Anthyllis montana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	EtOAc	6.4
TH43	*Anthyllis montana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	MeOH	11.3
TH44	*Indigofera secundiflora*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	4.1
TH45	*Indigofera secundiflora*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	9.7
TH46	*Chamaecytisus austriacus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	EtOAc	5.8
TH47	*Dorycnium hirsutum*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	EtOAc	7.1
TH48	*Citrus aurantium*	Rutaceae	Φλούδα	CA2_100 $CO_{2_}$(oil)	0.6
TH49	*Citrus aurantium*	Rutaceae	Φλούδα	CA2_100 CO_2 (H_2O)	1.2
TH50	*Citrus aurantium*	Rutaceae	Φλούδα	CA2_250 CO_2 (oil)	0.5
TH51	*Citrus aurantium*	Rutaceae	Φλούδα	CA2_250 CO_2 (H_2O)	1.4
TH53	*Citrus aurantium*	Rutaceae	Φλούδα	EtOAc	3.8
TH54	*Vitis vinifera*	Vitaceae	Καρποί		9.0
TH55	*Glycyrrhiza glabra*	Leguminosae	Ρίζες	EtOAc	9.4
TH56	*Glycyrrhiza glabra*	Leguminosae	Ρίζες	MeOH	13.1
TH57	*Genista hassertiana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	15.3
TH58	*Genista hassertiana*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.9
TH59	*Rhamnus alpinus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	5.2
TH60	*Rhamnus alpinus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	19.2
TH61	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	10.0
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.0
TH63	*Rhamnus sibthorpiana*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	18.1
TH64	*Rhamnus sibthorpiana*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	6.3
TH65	*Psoralea bituminosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	16.5
TH66	*Lupinus albus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	25.5
TH67	*Lupinus albus*	Leguminosae	Καρποί	EtOAc	5.4
TH68	*Lupinus albus*	Leguminosae	Καρποί	MeOH	14.0
TH69	*Glycyrrhiza glabra*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	4.8
TH70	*Glycyrrhiza glabra*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	16.1
TH71	*Allium ampeloprasum*	Liliaceae	Φύλλα	EtOAc	1.3
TH72	*Allium ampeloprasum*	Liliaceae	Φύλλα	MeOH	18.8
TH73	*Ceratonia siliqua*	Leguminosae	Φύλλα και κλαδιά	EtOAc	8.0
TH74	*Ceratonia siliqua*	Leguminosae	Φύλλα και κλαδιά	MeOH	31.1
TH75	*Ceratonia siliqua*	Leguminosae	Καρποί	MeOH	12.4
TH76	*Ceratonia siliqua*	Leguminosae	Χαρουπάλευρο	MeOH	11.1

3 Φυτοχημική και βιολογική αξιολόγηση εκχλισμάτων

3.1 Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων

Με σκοπό την επιλογή των εκχυλισμάτων τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο περαιτέρω φυτοχημικής μελέτης, τα 75 παρασκευάσματα (Πίνακας 18) υποβλήθηκαν σε μία σειρά χρωματογραφικών αναλύσεων για να αξιολογηθεί το χημικό τους φορτίο και να καθοριστεί το «φυτοχημικό τους αποτύπωμα». Πιο συγκεκριμένα, για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης "HPLC", η οποία ήταν συζευγμένη με ανιχνευτή UV-Diode Array, η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), καθώς και η συζευγμένη τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματοσκοπίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (LC-HRMS). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής σε συνδυασμό με τα δεδομένα της βιολογικής αξιολόγησής τους, μας οδήγησαν στην επιλογή των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν περαιτέρω.

3.1.1 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPTLC

Για τη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) χρησιμοποιήθηκε διάταξη CAMAG, η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα μέρη:

- **CAMAG Linomat 5,** για την εφαρμογή του δείγματος
- **CAMAG TLC Scanner 3,** για την πυκνομετρική επεξεργασίας του χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας, τη μετατροπή του σε χρωματογράφημα χρόνου-απορρόφησης και τη λήψη φασμάτων απορρόφησης
- **CAMAG TLC Visualizer,** για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

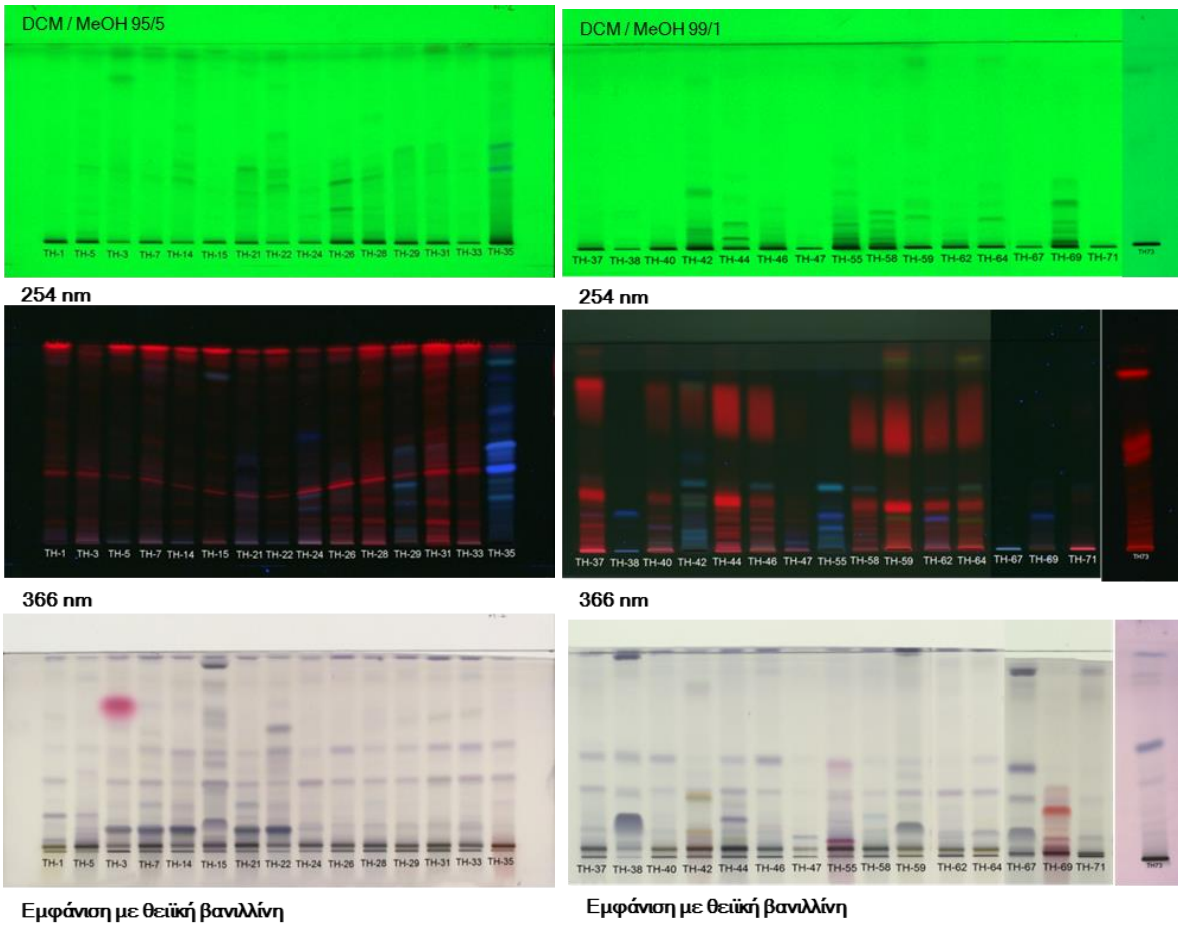
Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη οξειδίου του πυριτίου κανονικής (Kieselgel 60 F_{254}) και αντίστροφης φάσης (RP-18F_{254s}), επιστρωμένη σε φύλλα αλουμινίου. Ως συστήματα ανάπτυξης των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα

Πίνακας 19: Συστήματα ανάπτυξης χρωματογραφημάτων TLC για τα εστερικά και μεθανολικά εκχυλίσματα σε πλάκες TLC κανονικής και αντίστροφης φάσης

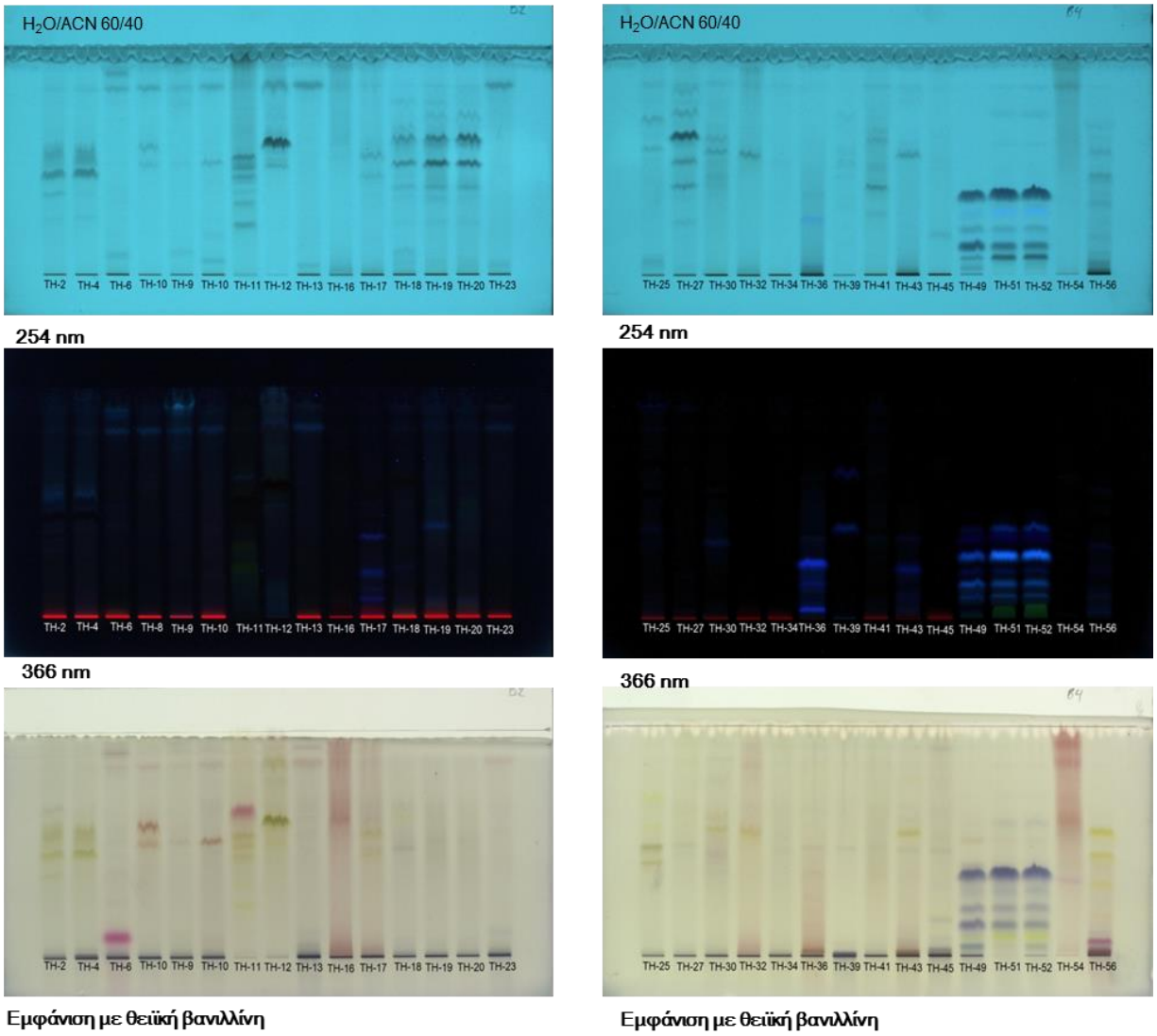
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ (EtOAc)	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ (MeOH)	
ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΑΣΗ
Διχλωρομεθάνιο/Μεθανόλη (DCM / MeOH)	Διχλωρομεθάνιο/ Μεθανόλη (DCM / MeOH)	Νερό/Ακετονιτρίλιο (H_2O / ACN)
99/1 και 95/5	75/25	60/40

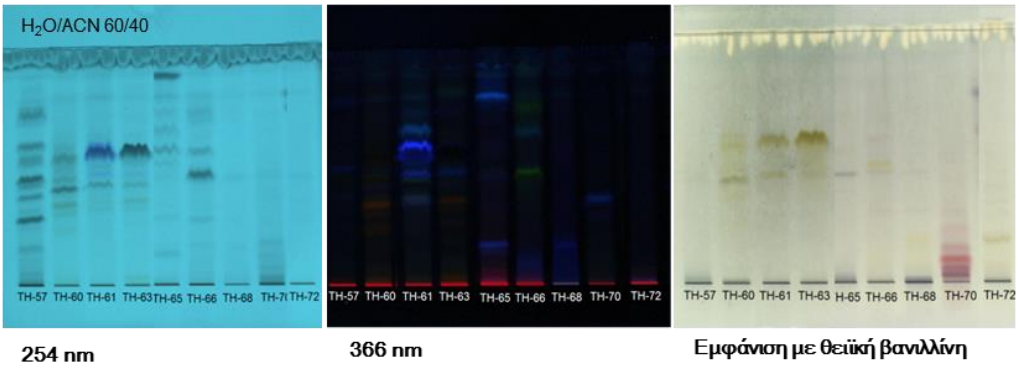
Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τον προαναφερόμενο πίνακα, τα εκχυλίσματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση το διαλύτη εκχύλισης, ενώ στις εικόνες 23 και 24

παρουσιάζονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα HPTLC των εκχυλισμάτων του οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης σε πλάκες TLC κανονικής και αντίστροφης φάσης και σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, αποτυπώνεται η απορρόφηση των ουσιών των εκχυλισμάτων στα 254 και 366 nm, καθώς και η χρώση τους μετά από την εμφάνιση με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης.



Εικόνα 23: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα επιλεγμένων δρογών σε συστήματα ανάπτυξης DCM/MeOH 95/5 και 99/1. Απορροφήσεις στα 254 και 366nm καθώς και στο ορατό.





Εικόνα 24: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων επιλεγμένων δρογών σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN 60/40. Απορροφήσεις στα 254 και 366nm καθώς και στο ορατό

3.1.2 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPLC

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan, το οποίο αποτελείται από: αντλία SpectraSystem P4000, με ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών σε οποιαδήποτε αναλογία, απαερωτής (degasser) SpectraSystem 1000, αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000 και ανιχνευτής φωτοδιόδων (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC, ενώ η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων ήταν η Supelco RPHS C18 διαστάσεων 250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm (Discovery). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου (ACN) - νερού (H_2O) και η ταχύτητα ροής επιλέχθηκε να είναι 1.0 ml/min. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης μελετήθηκαν και πάλι σε δύο ομάδες (οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης) και δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι βαθμιδωτής έκλουσης, ενώ τελικά επιλέχθηκαν τα πρωτόκολα Α και Β, αντίστοιχα όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20: Πρωτόκολλο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

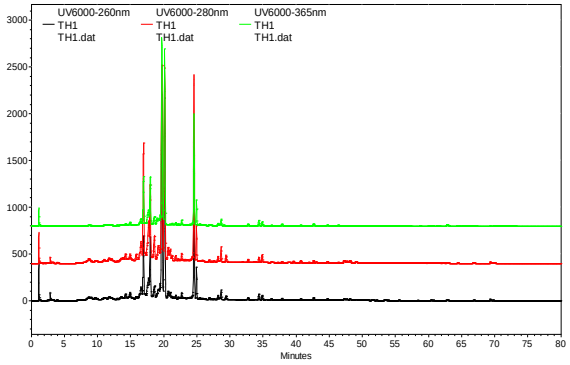
ΜΕΘΟΔΟΣ Α (EtOAc)			**ΜΕΘΟΔΟΣ Β (MeOH)**		
	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ			**ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ**	
Χρόνος (min)	Νερό	Ακετονιτρίλιο	Χρόνος (min)	Νερό	Ακετονιτρίλιο
0	100	0	0	95	5
60	0	100	60	70	30
70	100	0	70	40	60
80	100	0	80	100	0
			90	100	0

3.1.3 Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας LC-MS

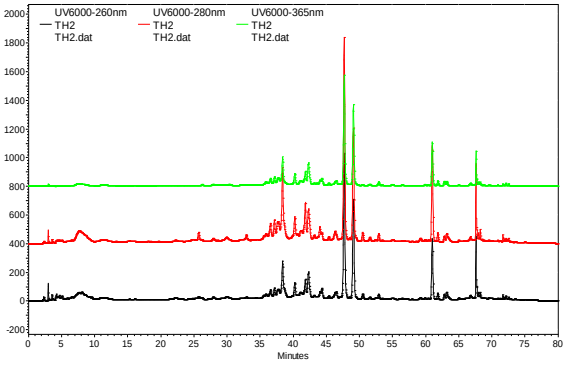
Για την ανάλυση με την τεχνική LC-MS χρησιμοποιήθηκε συσκευή που αποτελείται από σύστημα υγρής χρωματογραφίας UPLC 'Accela' (Pump, Autosampler, PDA Detector), υβριδικό φασματόμετρο LTQ Orbitrap 'Thermo Fisher Scientific' [με συνδυασμό αναλυτών μάζας: LTQ (γραμμική παγίδα ιόντων) και OrbiTrap (τροχιακή παγίδα ιόντων)]. Για τον χειρισμό των μηχανημάτων και για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε λογισμικό Xcalibur 2.07.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα χρωματογραφήματα HPLC και LC-MS των επιλεγμένων εκχυλισμάτων. Στην περίπτωση της τεχνικής HPLC παρατίθενται τα χρωματογραφήματα στα 365 nm (πράσινο χρωματογράφημα), στα 260 nm (μαύρο χρωματογράφημα) και στα 280 nm (κόκκινο χρωματογράφημα), ενώ τα χρωματογραφήματα μάζας αποτυπώνονται σε θετικό και αρνητικό ιονισμό.

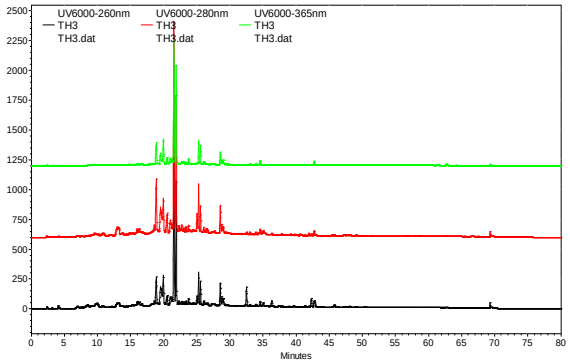
Ο χρωματογραφικός έλεγχος των εκχυλισμάτων των ειδών *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* και *Sideritis scardica* κατέδειξε την παρουσία τερπενοειδών (από παρατήρηση της TLC) και φαινολικών παραγώγων. Τα δύο είδη φαίνεται να έχουν παραπλήσιο χημικό φορτίο, με τα μεθανολικά εκχυλίσματα να εμφανίζονται σαφώς πλουσιότερα σε φλαβονοειδή.



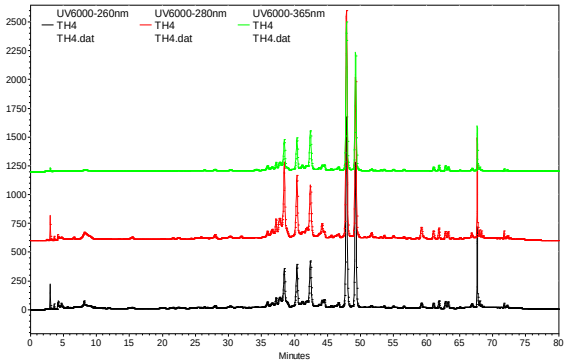
TH1 *Sideritis raeseri ssp aeseri* (EtOAc)



TH2 *Sideritis raeseri ssp aeseri* (MeOH)

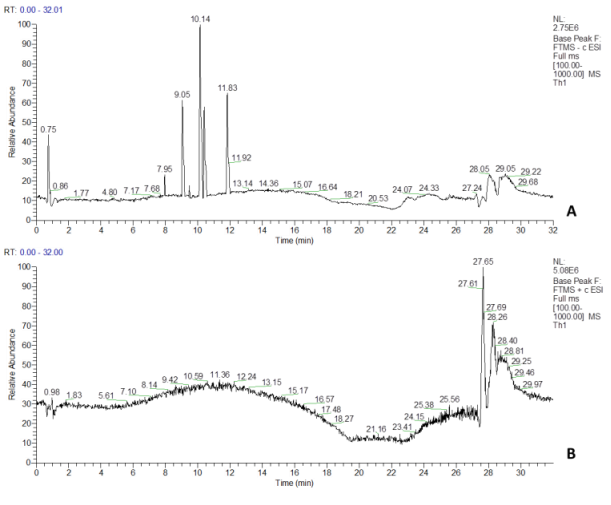


TH3 *Sideritis scardica* (EtOAc)

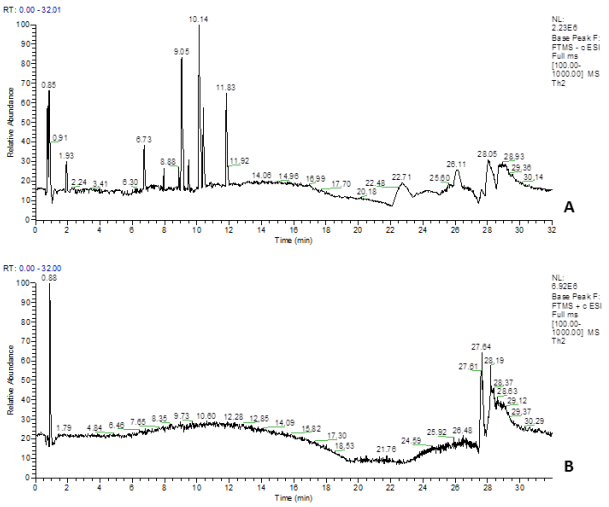


TH4 *Sideritis scardica* (EtOH)

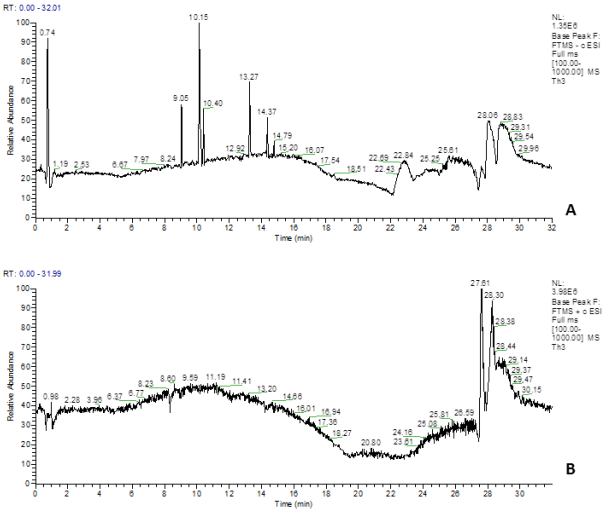
Από τα φάσματα μάζας, διαπιστώνονται πολύ μεγάλες ομοιότητες ανάμεσα στο εκχύλισμα οξικού αιθυλετσέρα **TH1** και το μεθανολικό εκχύλισμα **TH2** του *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri*, ενώ μικρές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων του είδους *Sideritis scardica* **TH3** και **TH4**. Συνολικά και τα δύο είδη του γένους *Sideritis* εμφανίζουν κοινούς τους κύριους μεταβολίτες, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* να εμφανίζεται ελαφρώς πλουσιότερο.



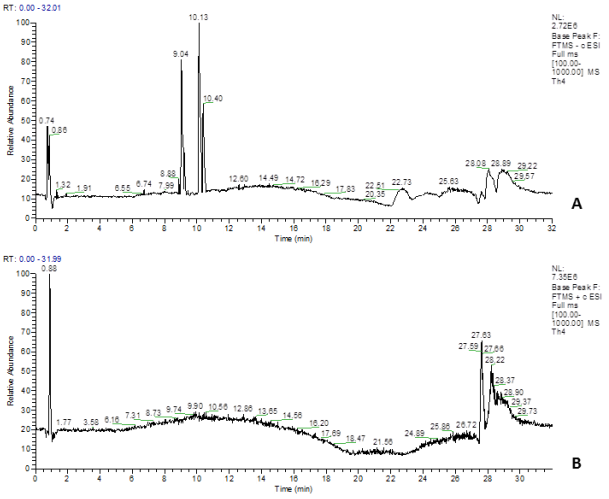
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH1** *Sideritis raeseri* ssp *aeseri* (EtOAc), συγκέντρωσης 100 μg /ml.



Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH2** *Sideritis raeseri* ssp *aeseri* (MeOH), συγκέντρωσης 100 μg /ml.

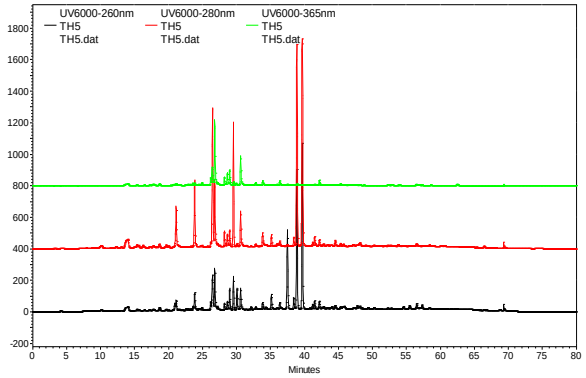


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH3** *Sideritis scardica* (EtOAc), συγκέντρωσης 100 μg /ml.

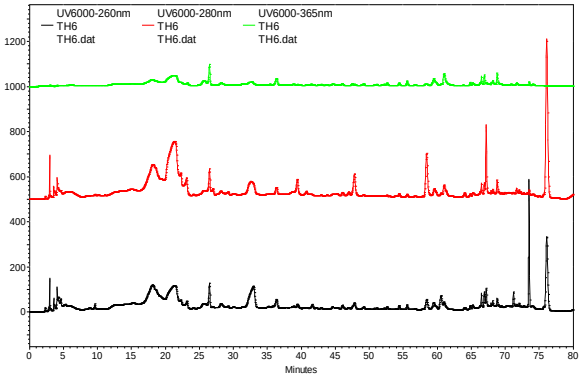


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH4** *Sideritis scardica* (EtOH), συγκέντρωσης 100 μg /ml.

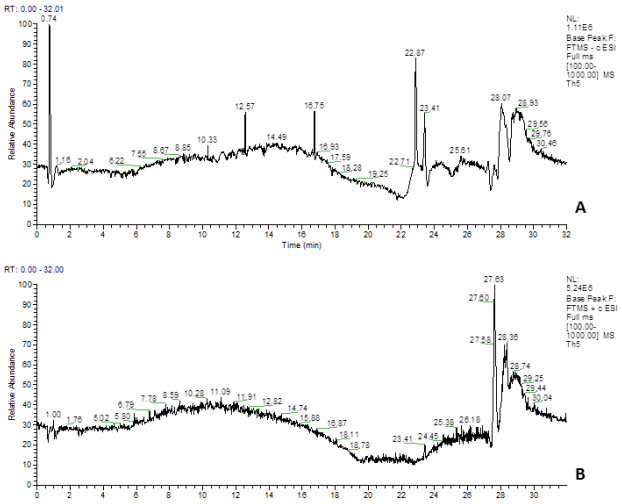
Τα εκχυλίσματα του *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* στο χρωματογράφημα TLC δεν χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταβολιτών με ιδιαίτερη απορρόφηση στα 254 και 366 nm, με εξαίρεση το ροσμαρινικό οξύ το οποίο απορροφά ισχυρά και εμφανίζεται και στα δύο εκχυλίσματα. Αντιθέτως, παρατηρούμε αρκετούς μεταβολίτες που δεν εμφανίζουν απορρόφηση αλλά έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θεϊκής βανιλλίνης παρουσιάζουν μπλε χρώση, η οποία είναι χαρακτηριστική των τερπενοειδών. Το συγκεκριμένο είδος άλλωστε χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τερπενίων, φαινολικών οξέων και άλλων φαινολικών παραγώγων, ουσίες στις οποίες οφείλει ένα σημαντικό μέρος της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους ικανότητάς του.



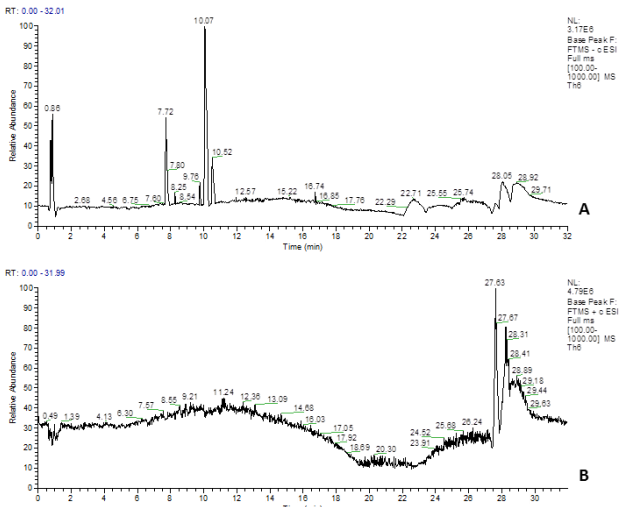
TH5 *Origanum vulgare ssp. hirtum* (EtOAc)



TH6 *Origanum vulgare ssp. hirtum* (MeOH)

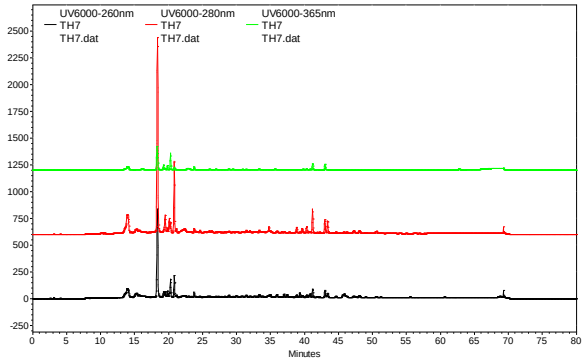


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH5** *Origanum vulgare ssp. hirtum* (EtOAc), συγκέντρωσης 100 μg /ml.

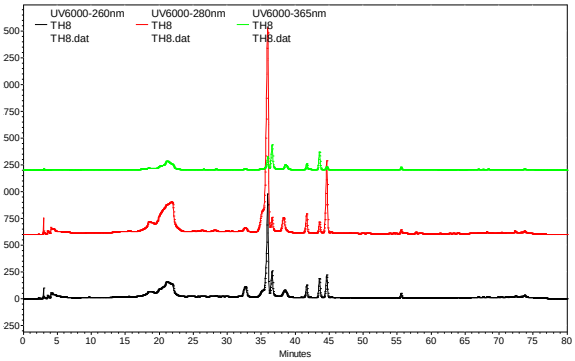


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH6** *Origanum vulgare ssp. hirtum* (MeOH)), συγκέντρωσης 100 μg /ml.

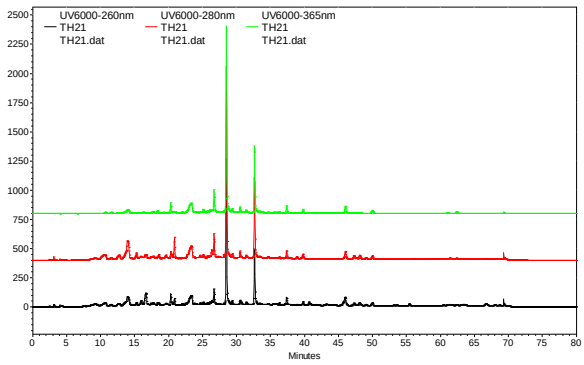
Όπως προαναφέρθηκε, προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι είδη του γένους *Mentha* εμφανίζουν αξιόλογες οιστρογονικές ιδιότητες. Ο συνδυασμένος χρωματογραφικός έλεγχος ανέδειξε σαφώς την παρουσία τερπενίων, καθώς και φαινολικών παραγώγων στα μελετούμενα εκχυλίσματα. Από τη μελέτη των χρωματογραφικών δεδομένων προέκυψε ότι μεγαλύτερο φυτοχημικό ενδιαφέρον παρουσίασαν το μεθανολικό εκχύλισμα **TH8** της *Mentha aquatica* και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα της *Mentha pulegium* **TH21**.



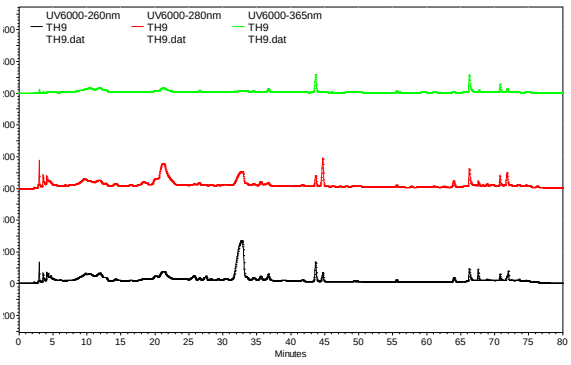
TH7 *Mentha aquatica* (EtOAc)



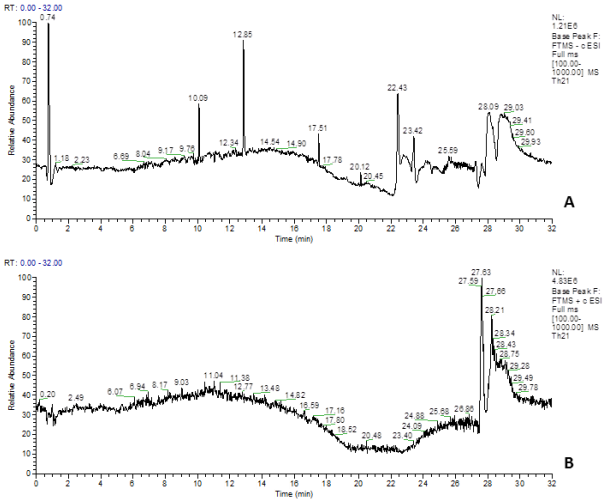
TH8 *Mentha aquatica* (MeOH)



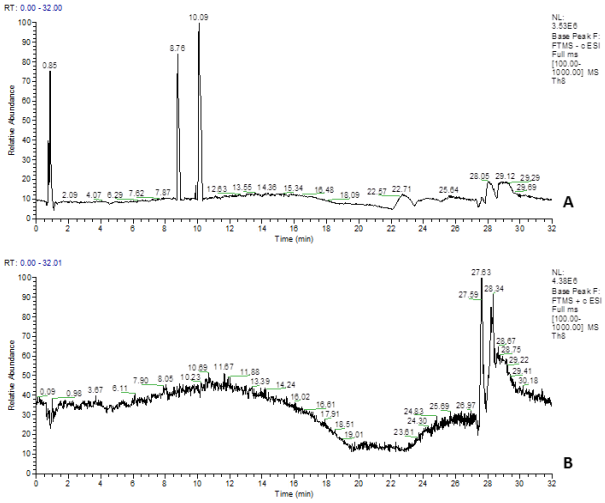
TH21 *Mentha pulegium* (EtOAc)



TH9 *Mentha pulegium* (MeOH)

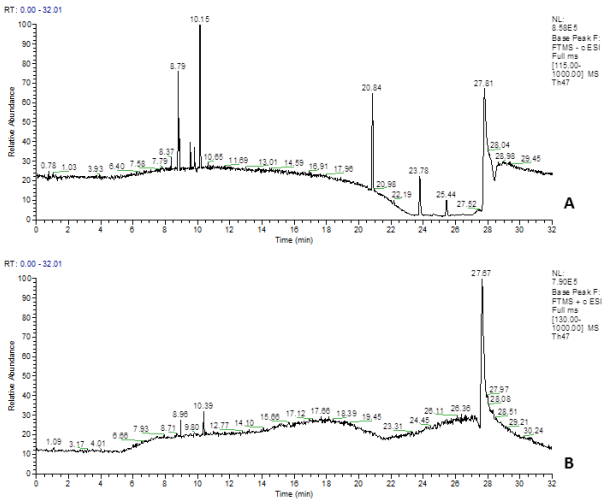


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH21** *Mentha pulegium* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

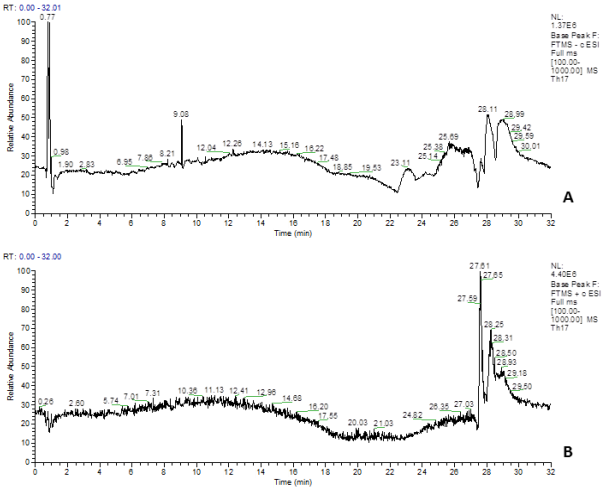


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH8** *Mentha aquatica* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

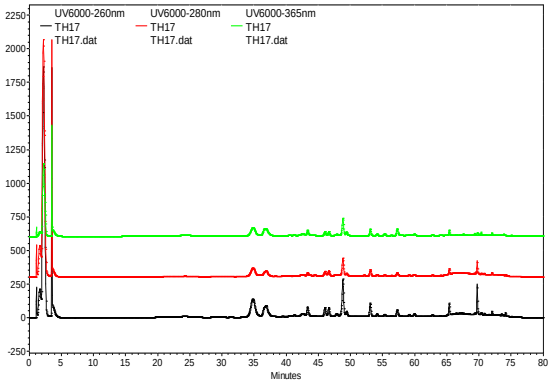
Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του *Dorycnium hirsutum* **TH47** και **TH17** (οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης, αντίστοιχα), μολονότι κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλούσιο χημικό περιεχόμενο, το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φλαβονοειδών, δηλαδή μεταβολιτών που αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης.



Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH47**, συγκέντρωσης 100 μg /ml.



Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH17**, συγκέντρωσης 100 μg /ml.

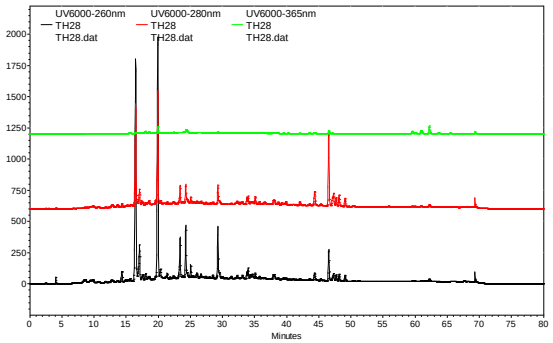


TH17 *Dorycnium hirsutum* (MeOH)

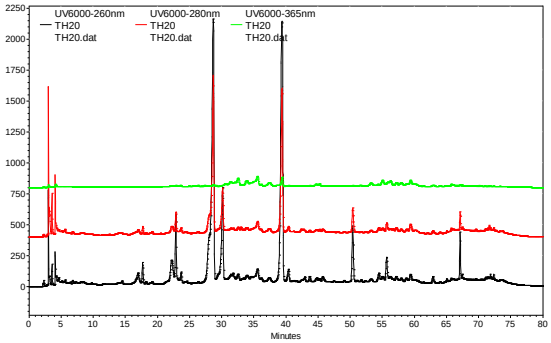
Παρακάτω, θα εξεταστούν ομάδες φυτικών ειδών τα οποία παρουσιάζουν μορφολογικές και φυλογενετικές ομοιότητες, ενώ κάποια από αυτά αναφέρονται και ως συνώνυμα είδη ή γένη. Συνεπώς θα εξετάσουμε το φυτοχημικό τους προφίλ συγκριτικά, καθώς αναμένουμε να περιέχουν παρόμοιες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών.

Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 6.1.2 τα γένη *Chamaecytisus*, *Lempotropis* και *Calicotome* εμφανίζονται ως συνώνυμα του γένους *Cytisus*, επομένως είναι πολύ πιθανό να φέρουν κάποια κοινά φυτοχημικά χαρακτηριστικά και κατ' επέκταση ανάλογο μεταβολικό περιεχόμενο. Ανήκοντας στην οικογένεια Leguminosae αναμένουμε την ύπαρξη φαινολικών ουσιών, φλαβονοειδών και ιδιαιτέρως ισοφλαβονών. Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC σε πρώτο στάδιο ανέδειξε την ύπαρξη φλαβονοειδών μέτριας και υψηλής πολικότητας (ουσίες που απορροφούν στα 254nm και παρουσιάζουν κίτρινη έως καφέ χρώση έπειτα από την εμφάνιση με θεϊκή βανιλλίνη) και πιθανώς γλυκοσιδικών παραγώγων τους.

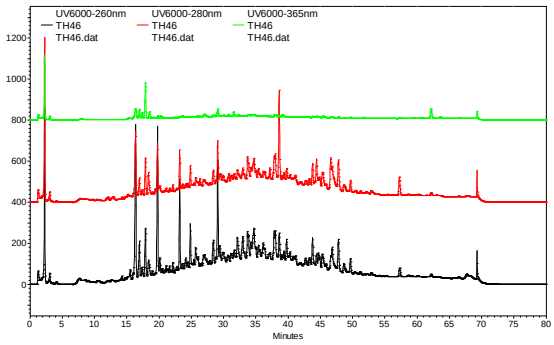
Παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα HPLC των εκχυλισμάτων των ειδών *Cytisus villosus, Chamaecytisus austriacus* και *Chamaecytisus triflorus* διακρίνουμε ιδιαίτερα μεγάλη ομοιότητα και στην ποιοτική αλλά και στην ποσοτική σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του οξικού αιθυλεστέρα **TH28** και **TH37** διαπιστώνουμε πως είναι σχεδόν πανομοιότυπα με πάρα πολύ μικρές ποσοτικές διαφορές, όπως και το εκχύλισμα **TH46** το οποίο εμφανίζεται ελαφρώς πλουσιότερο..



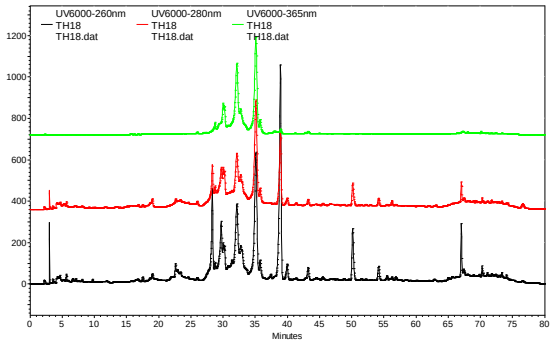
TH28 *Cytisus villosus* (EtOAc)



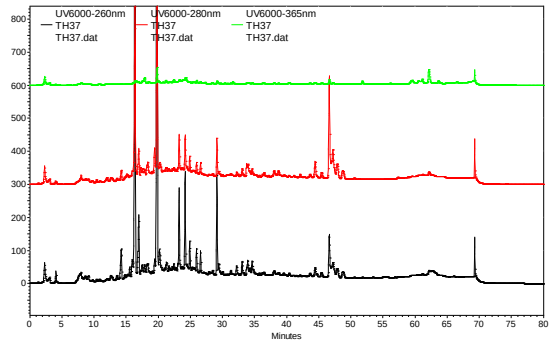
TH20 *Cytisus villosus* (MeOH)



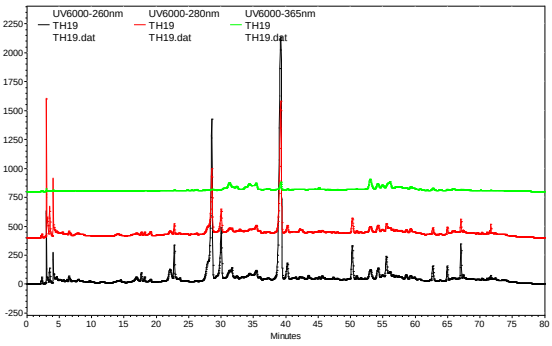
TH46 *Chamaecytisus austriacus* (EtOAc)



TH18 *Chamaecytisus austriacus* (MeOH)

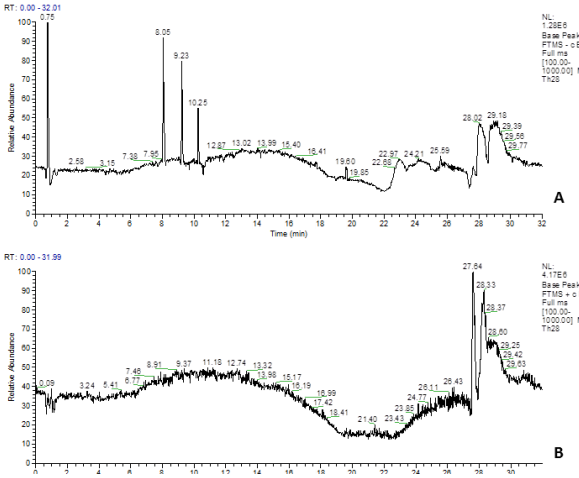


TH37 *Chamaecytisus triflorus* (EtOAc)

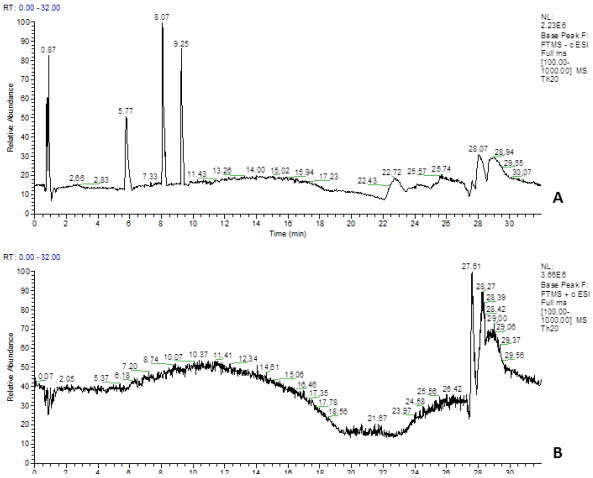


TH19 *Chamaecytisus triflorus* (MeOH)

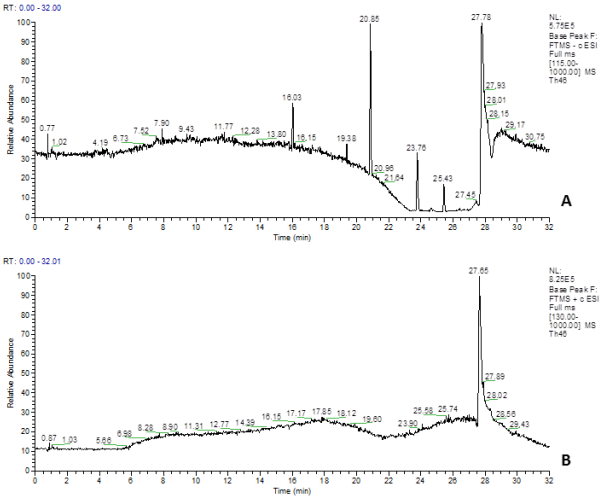
Στην περίπτωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων **TH20** και **TH19** τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με LC-MS σχεδόν ταυτίζονται, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του *Chamaecytisus austriacus* **TH18** διαφοροποιείται ελαφρώς.



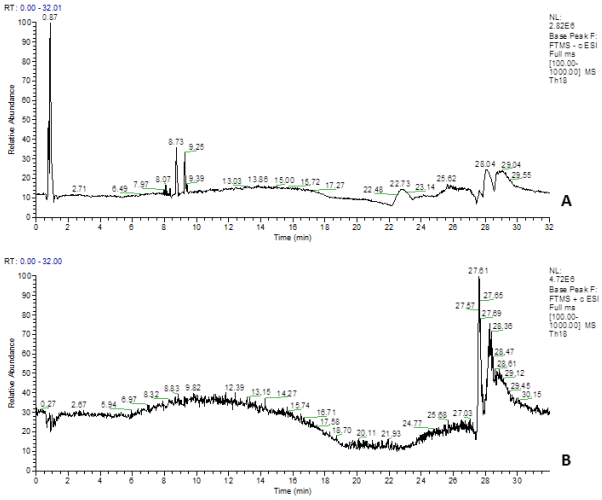
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH28** *Cytisus villosus* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



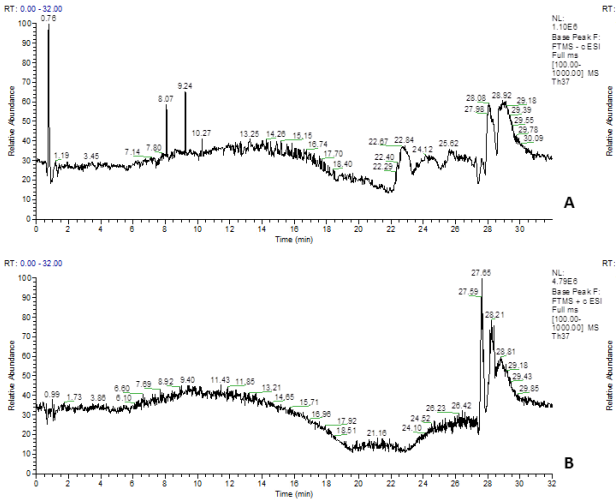
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH20** *Cytisus villosus* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



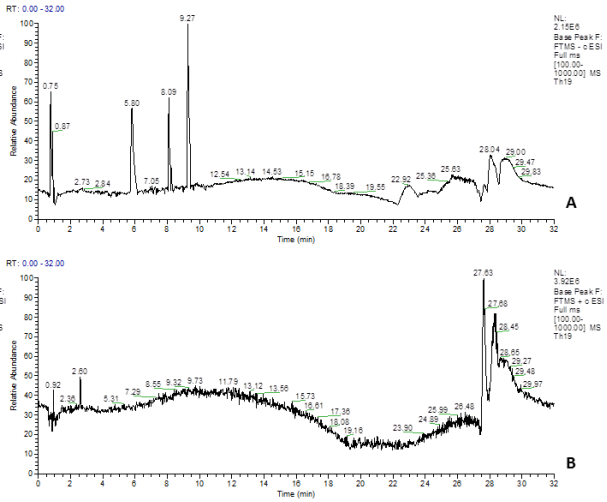
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH18** *Chamaecytisus austriacus* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH18** *Chamaecytisus austriacus* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

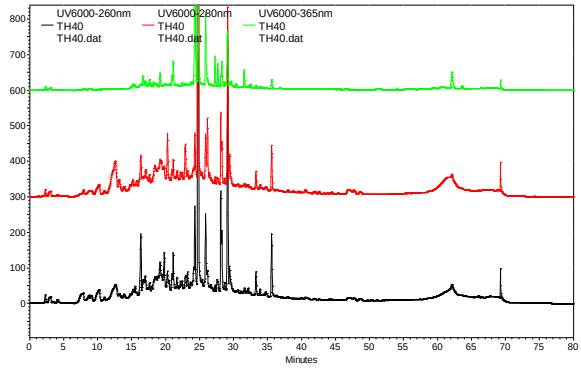


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH37** *Chamaecytisus triflorus* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

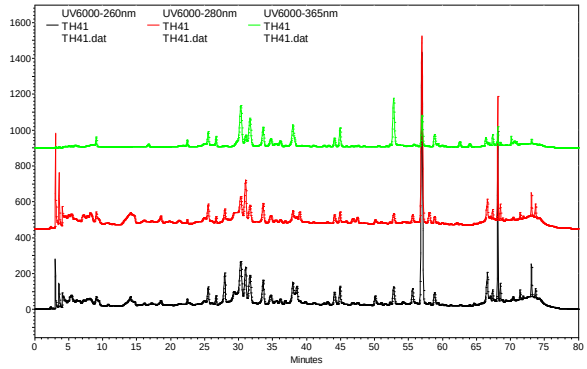


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH19** *Chamaecytisus triflorus* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

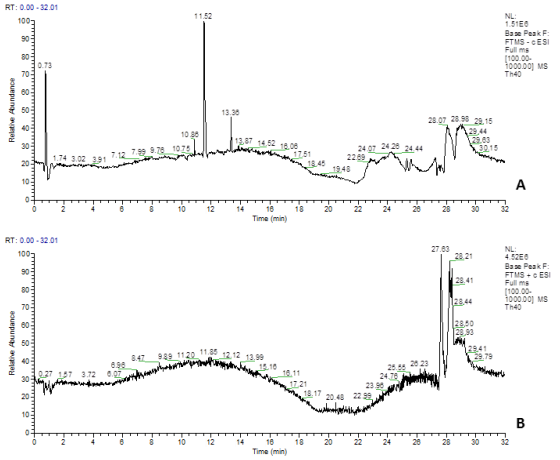
Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα και το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Calicotome villosa* (**TH40** και **TH41,** αντίστοιχα) εμφανίζουν αρκετές διαφορές, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά σε σχέση με τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα. Στην περίπτωση του **TH41** εντοπίζεται η ύπαρξη κοινών ουσιών με τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα, αλλά δεν είναι οι κύριοι μετσβολίτες του εκχυλίσματος.



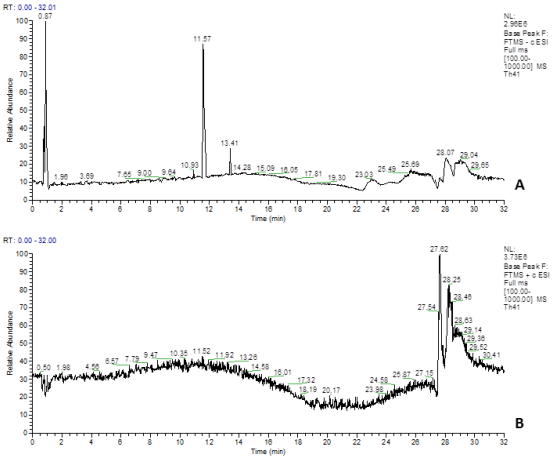
TH40 *Calicotome villosa* (EtOAc)



TH41 *Calicotome villosa* (MeOH)



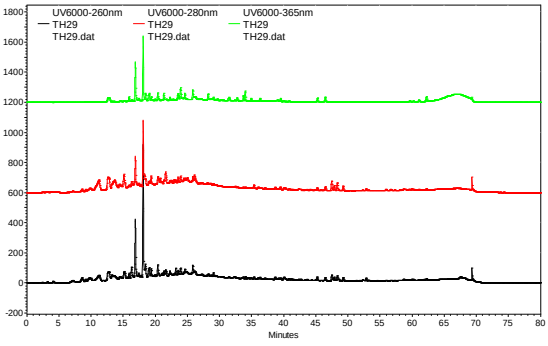
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH40** *Calicotome villosa* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



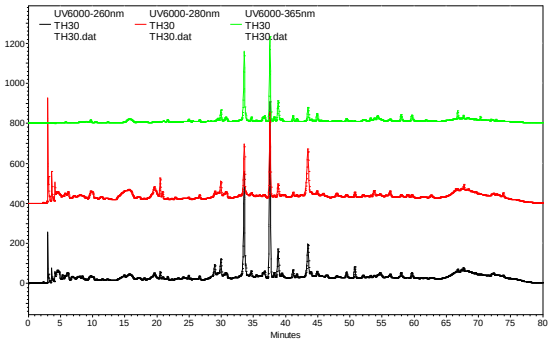
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-) ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH41** *Calicotome villosa* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

Στην περίπτωση του είδους *Lembotropis nigricans* ssp. *nigricans* τα εκχυλίσματα φαίνεται να περιέχουν κοινούς μεταβολίτες με τα γένη *Cytisus* και *Chamaecytisus*, αλλά εμφανίζονται συγκριτικά φτωχότερα.

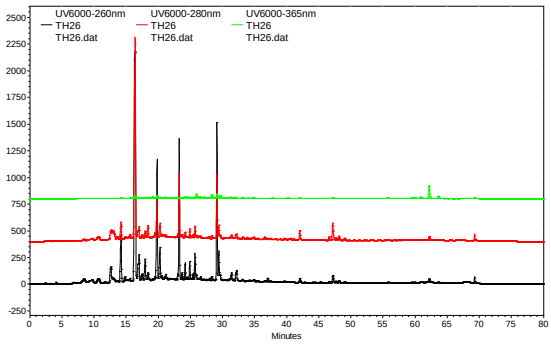
.



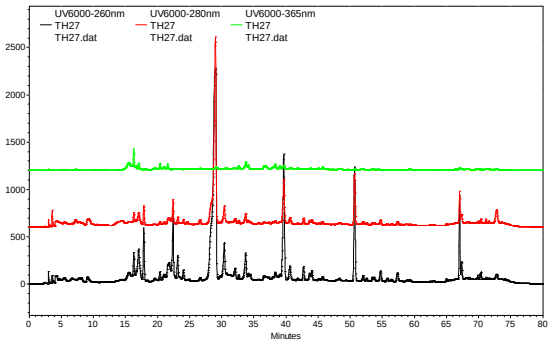
TH29 *Lembotropis nigricans ssp. nigricans* (EtOAc)



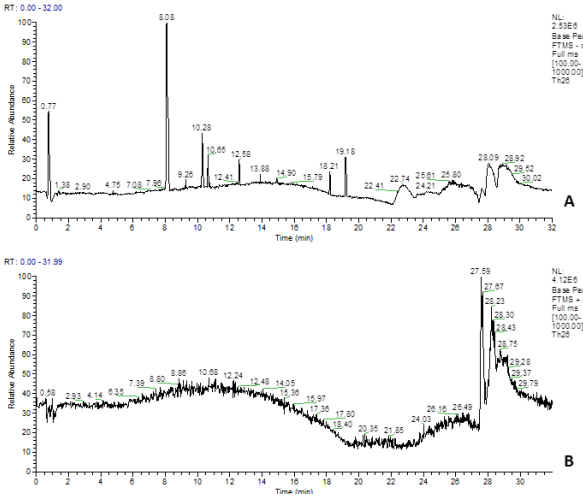
TH30 *Lembotropis nigricans ssp. nigricans* (MeOH)



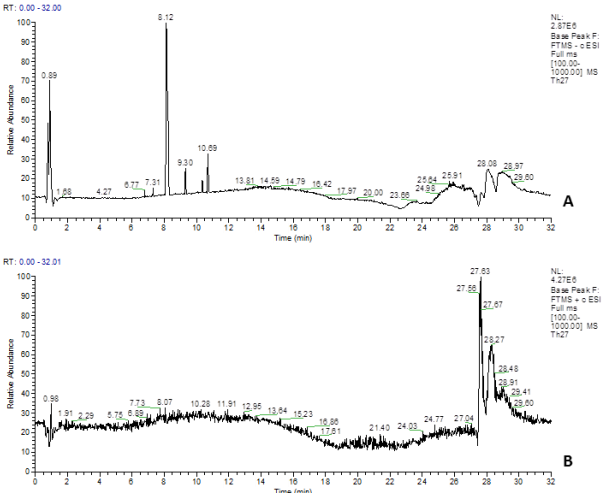
TH26 *Teline monspessulana* (EtOAc)



TH27 *Teline monspessulana* (MeOH)

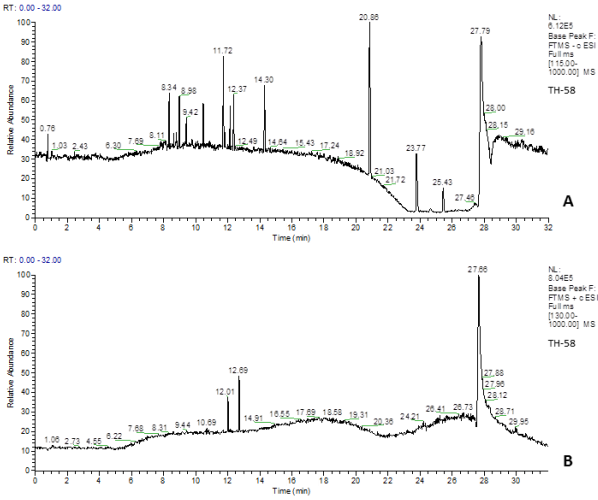


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH26** *Teline monspessulana* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

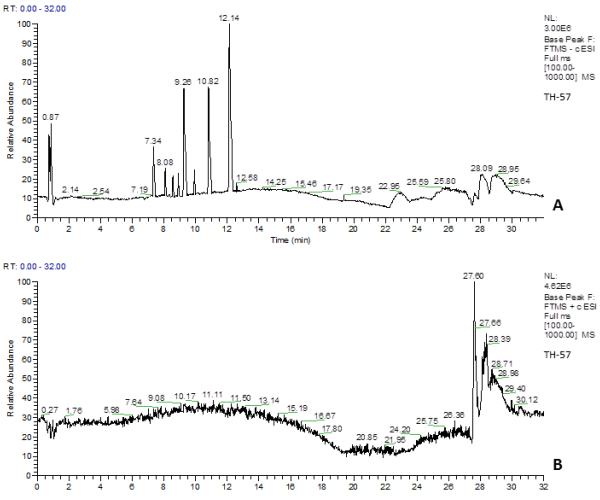


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH27** *Teline monspessulana* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

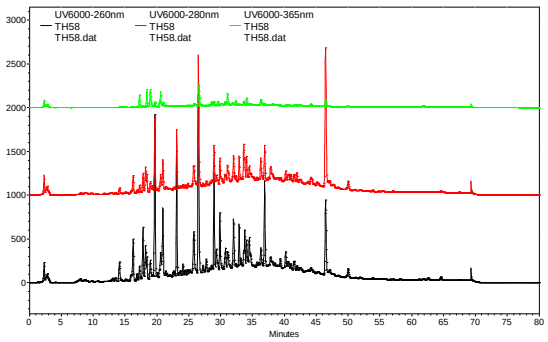
Το γένος *Teline*, όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 2.2, είναι συγγενές με το γένος *Genista*, ενώ συχνά αναφέρεται και ως συνώνυμό του. Μετά από τον έλεγχο του φυτοχημικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τις τεχνικές HPLC και LC-MS, φάνηκε να περιέχουν κάποιους κοινούς μεταβολίτες με τα είδη *Genista*, αλλά και τα δύο εκχυλίσματα της *Genista hassertiana* χαρακτηρίστηκαν εμφανώς πλουσιότερα συγκριτικά με εκείνα του *Teline monspessulana*. Συνεκτιμώντας και τον χρωματογραφικό έλεγχο με HPTLC φαίνεται πως και τα δύο εκχυλίσματα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φλαβονοειδή και κυρίως παράγωγα ισοφλαβονών.



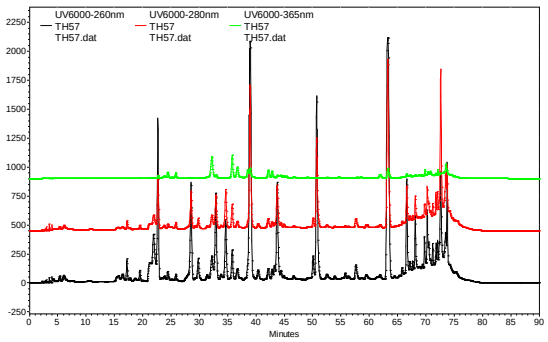
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH58** *Genista hassertiana* (EtOAc)συγκέντρωσης 100 μg /ml.



Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH57** *Genista hassertiana* (MeOH)συγκέντρωσης 100 μg /ml.

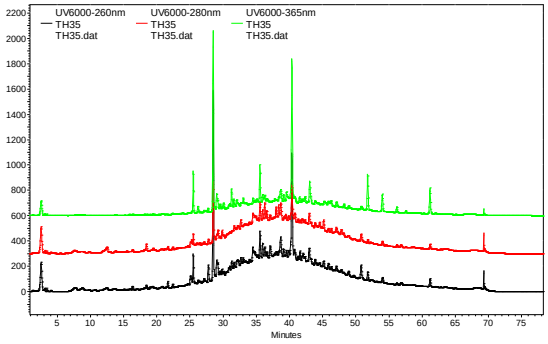


TH58 *Genista hassertiana* (EtOAc)

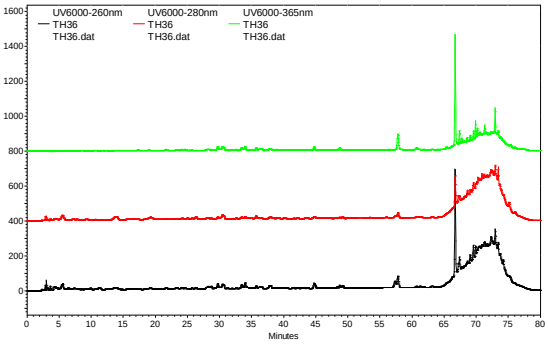


TH57 *Genista hassertiana* (MeOH)

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με HPTLC των εκχυλισμάτων του *Hippocrepis comosa* ανέδειξε την ύπαρξη φλαβονοειδών, τα οποία ανήκουν πιθανότατα στην κατηγορία των κουμαρινών/κουμεστανίων (μπλε απορρόφηση στα 254 nm) και είναι γνωστά για τη φυτοοιστρογόνο δράση τους.

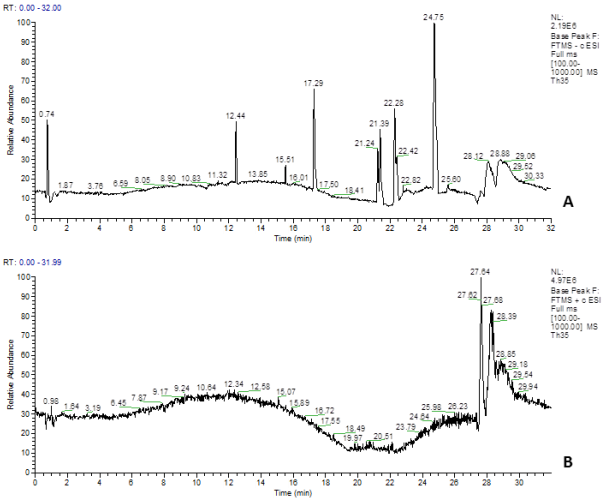


TH35 *Hippocrepis comosa* (EtOAc)

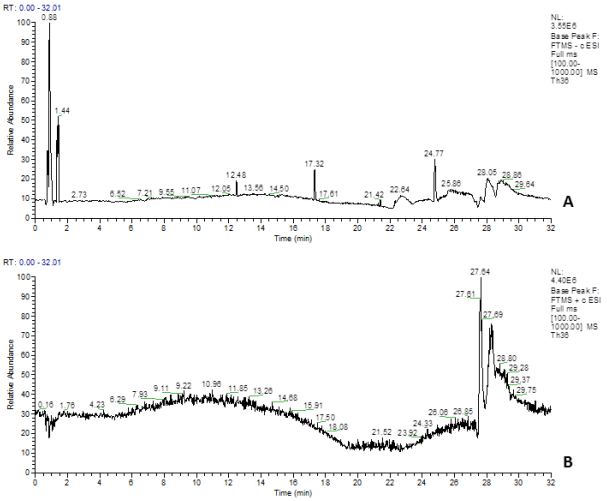


TH36 *Hippocrepis comosa* (MeOH)

Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται και στα χρωματογραφήματα το μεγαλύτερο φυτοχημικό ενδιαφέρον φαίνεται να εμφανίζει το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα **TH35.**

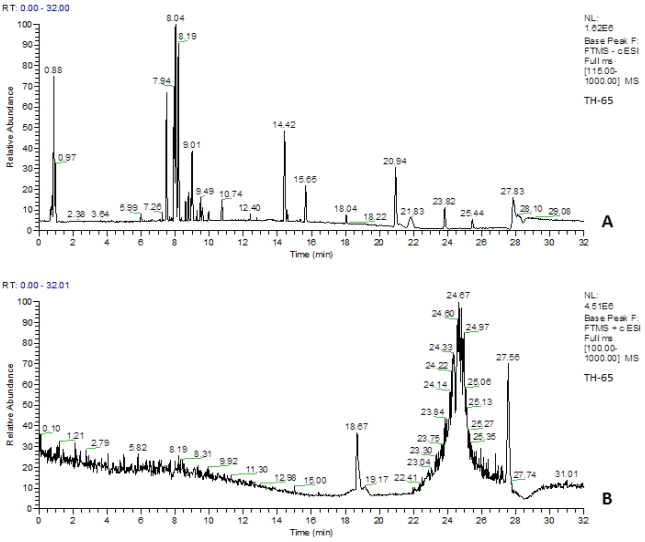


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH35** *Hippocrepis comosa* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

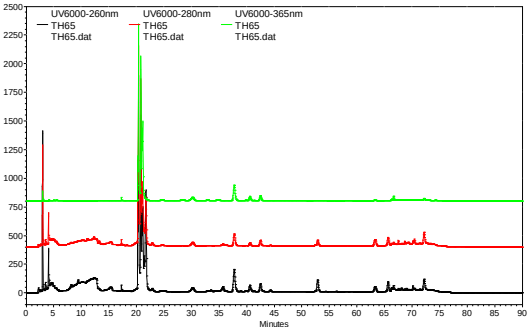


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], του **TH36** *Hippocrepis comosa* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Psoralea bituminosa,* όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα HPLC και ευκρινέστερα στο χρωματογράφημα LC-MS, χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα πλούσιο σε μεταβολίτες μέτριας και υψηλής πολικότητας, οι οποίοι ανήκουν πιθανώς στις κατηγορίες των φλαβονοειδών και κουμαρινών και χαρακτηρίζουν το γένος.

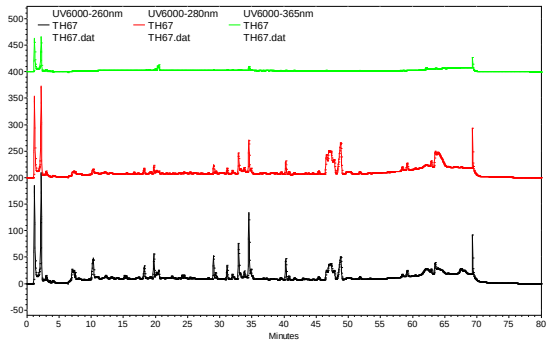


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH65** *Psoralea bituminosa* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

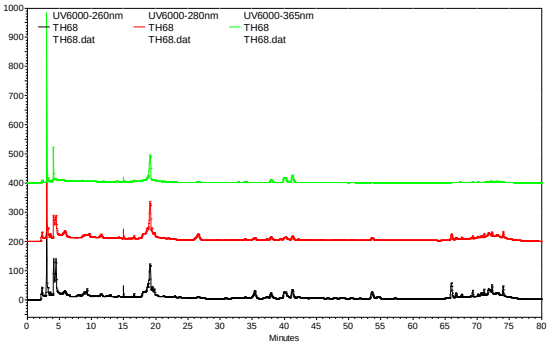


TH65 *Psoralea bituminosa* (MeOH)

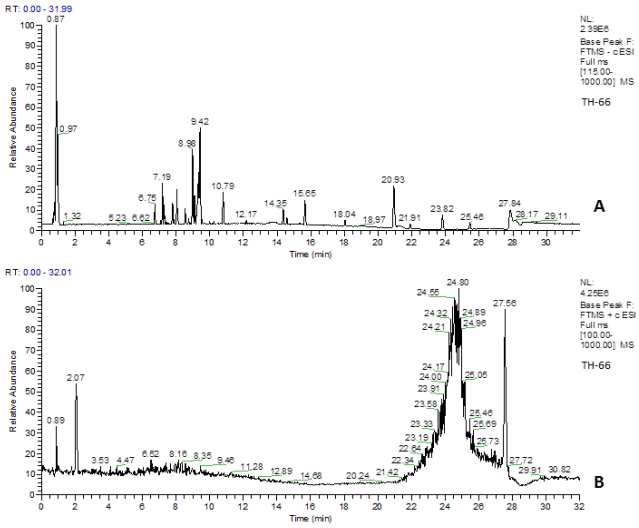
Ο χρωματογραφικός έλεγχος με HPTLC έδειξε πως το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των καρπών του *Lupinus albus* (**TH67**) είναι ιδιαίτερο πλούσιο σε λιπαρά οξέα, σε αντίθεση με το μεθανολικό εκχύλισμά τους (**TH68**). Η προαναφερόμενη παρατήρηση είναι αναμενόμενη με βάση την πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης και το είδος της δρόγης. Ωστόσο το χρωματογράφημα HPLC αποκάλυψε την ύπαρξη πλήθους φαινολικών συστατικών και στα δύο εκχυλίσματα. Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού (**TH66**), στο σύνολο των χρωματογραφικών ελέγχων, παρουσίασε την πλουσιότερη εικόνα σε περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες.

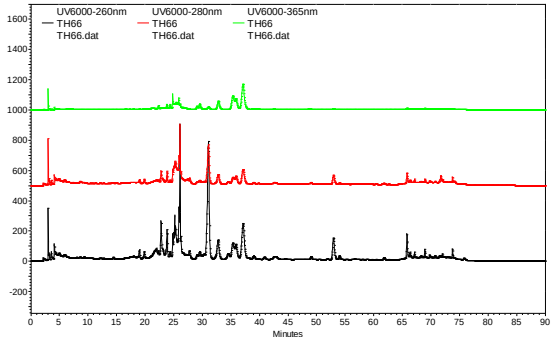


TH67 *Lupinus albus* (καρποί) (EtOAc)



TH68 *Lupinus albus* (καρποί) (MeOH)

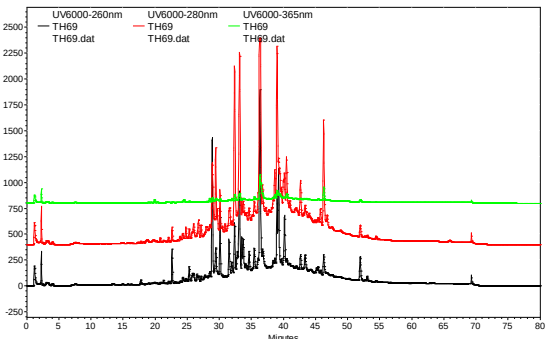




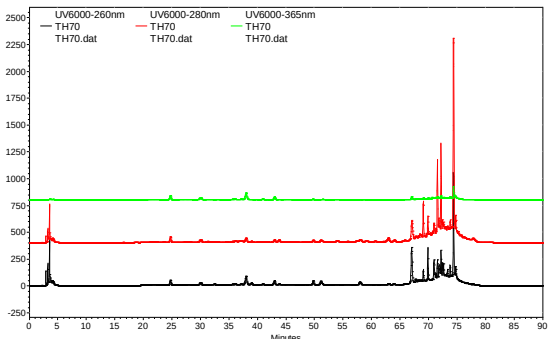
TH66 *Lupinus albus* (υπέργεια τμήματα) (MeOH)

Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH66** *Lupinus albus* (υπέργεια τμήματα) (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

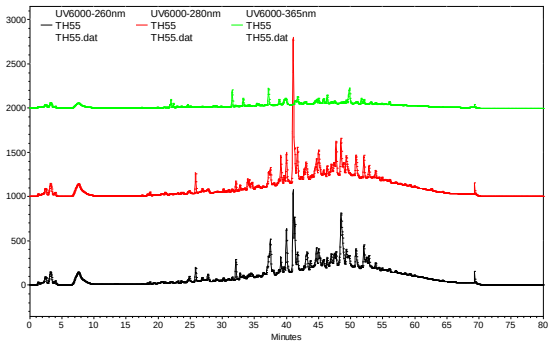
Στην περίπτωση του είδους *Glycyrrhiza glabra*, όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα, τόσο των ριζών όσο και των υπέργειων τμημάτων, φαίνεται να παρουσιάζουν πλούσιο και ιδιαίτερο φυτοχημικό ενδιαφέρον. Από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων HPTLC και HPLC παρατηρούμε πως τα εκχυλίσματα **TH69** και **TH56** είναι ίσως πλουσιότερα σε φλαβάνες και ισοφλαβάνες, μεταβολίτες μέτριας και υψηλής πολικότητας που χαρακτηρίζονται από απορρόφηση στα 254nm και εμφάνιση κόκκινου χρώματος έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης.



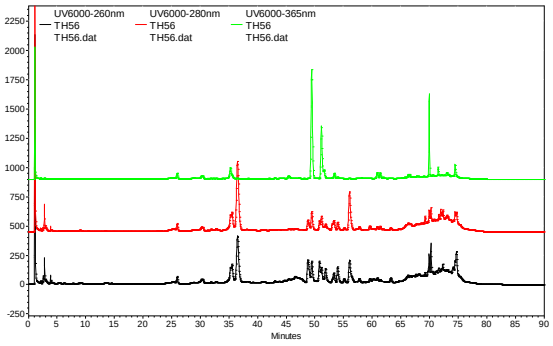
TH69 *Glycyrrhiza glabra* (υπέργεια τμήματα) (EtOAc)



TH70 *Glycyrrhiza glabra* (υπέργεια τμήματα) (MeOH)

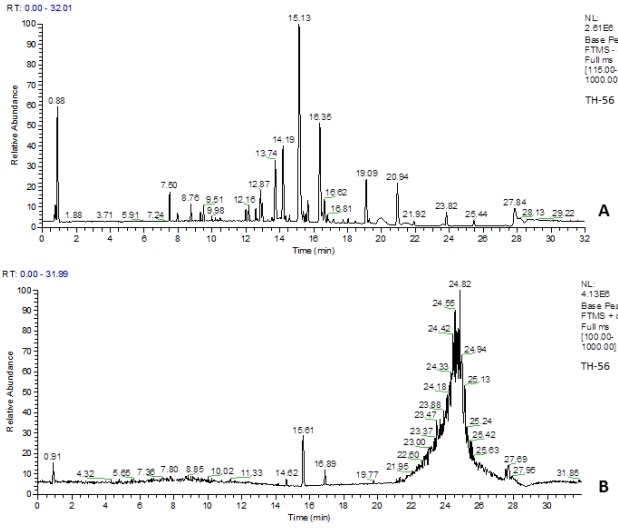


TH55 *Glycyrrhiza glabra* (ρίζες) (EtOAc)

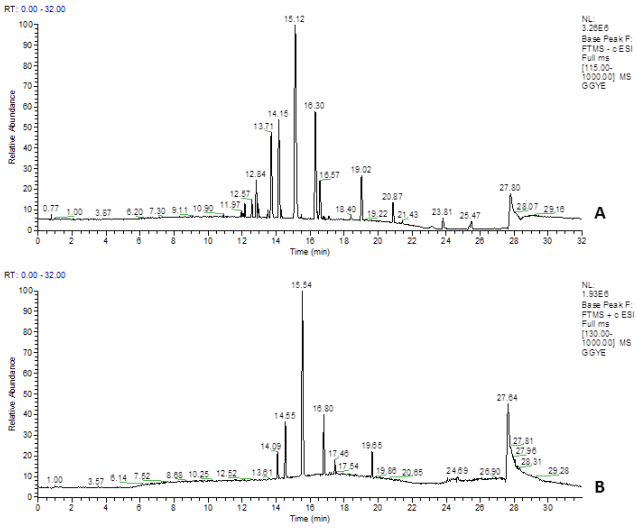


TH56 *Glycyrrhiza glabra* (ρίζες) (MeOH)

Συγκρίνοντας τα φάσματα LC-MS των μεθανολικών εκχυλισμάτων TH56 και TH70 παρατηρούνται ποιοτικές και ποσοτικές ομοιότητες, καθώς φαίνεται να περιέχουν τους ίδιους κύριους μεταβολίτες, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών χαρακτηρίζεται εμφανώς πλουσιότερο.

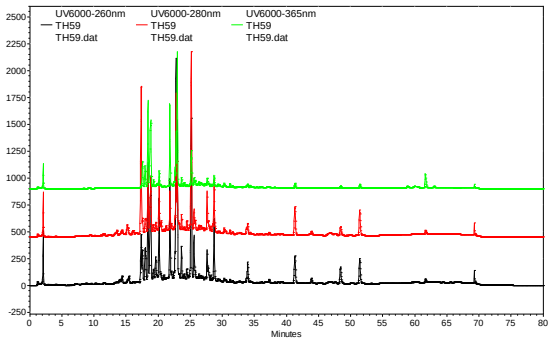


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH56** *Glycyrrhiza glabra* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

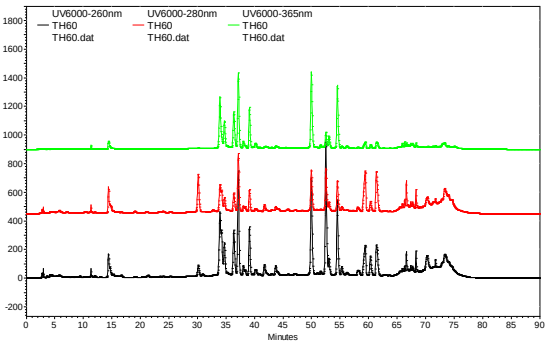


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH70** *Glycyrrhiza glabra* (υπέργεια τμήματα) (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

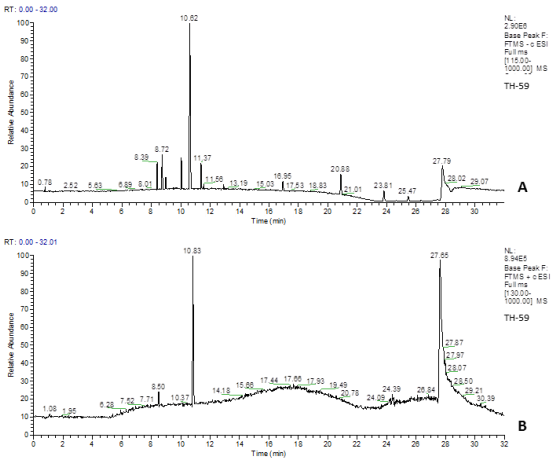
Η οικογένεια Rhamnaceae εκπροσωπείται από τρία είδη, τα οποία στο χρωματογραφικό έλεγχο με HPTLC εμφάνισαν πλούσιο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή μέτριας και υψηλής πολικότητας (πορτοκαλί-κίτρινη χρώση μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη). Με βάση τα χρωματογραφήματα HPLC τα πλουσιότερα εκχυλίσματα φαίνεται να είναι τα **TH59** και **TH60,** τα οποία αντιστοιχούν στο είδος *Rhamnus alpinus*, ενώ από τα φάσματα μάζας φαίνεται πως και τα τρία είδη περιέχουν κοινούς κύριους μεταβολίτες, με τα είδη *Rhamnus lycioides* και *Rhamnus sibthorpiana* να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες ομοιότητες.



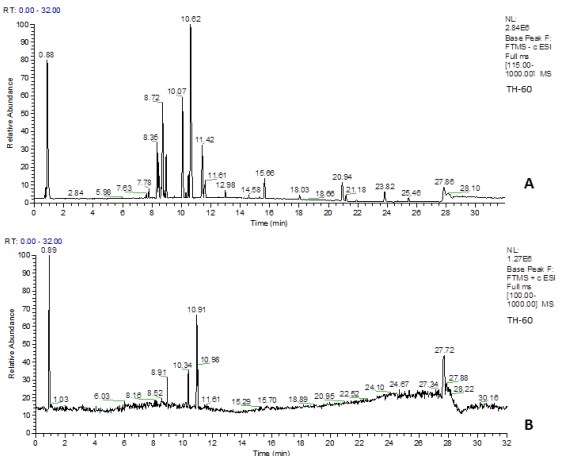
TH59 *Rhamnus alpinus* (EtOAc)



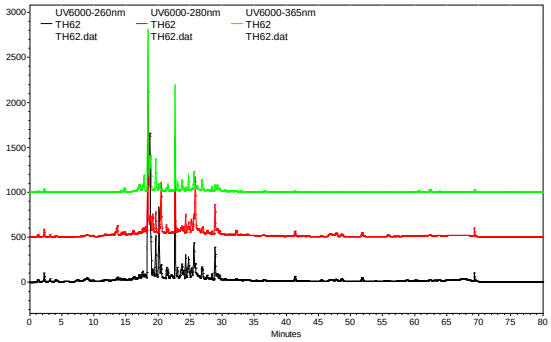
TH60 *Rhamnus alpinus* (MeOH)



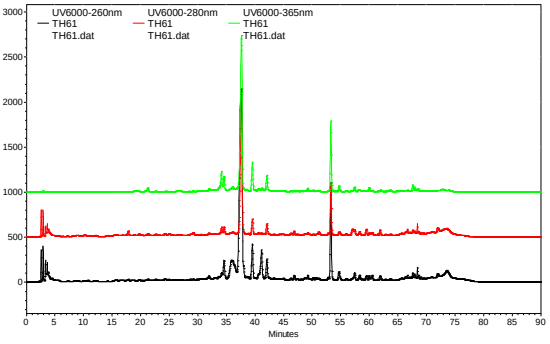
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH59** *Rhamnus alpinus* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



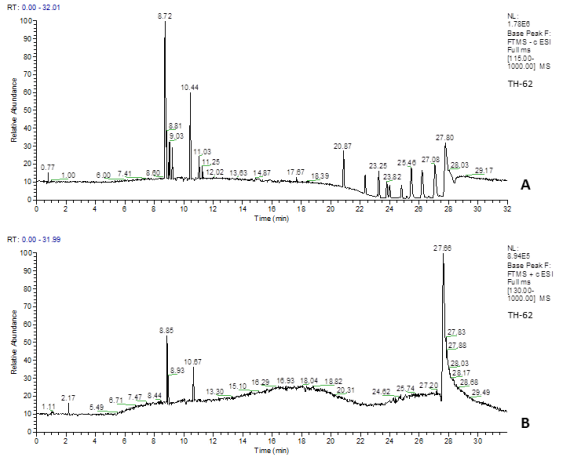
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH60** *Rhamnus alpinus* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



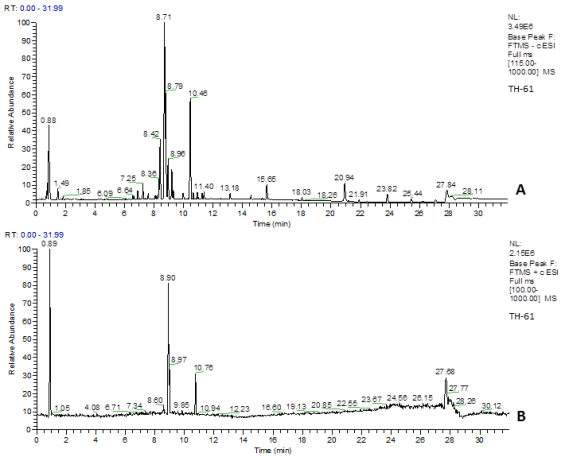
TH62 *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus* (EtOAc



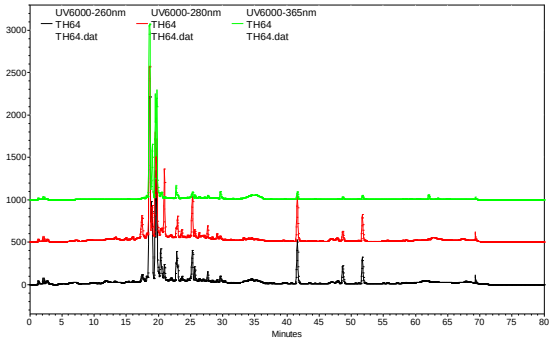
TH61 *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus* (MeOH)



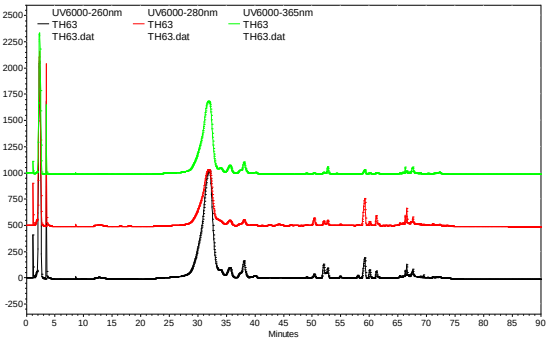
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH62** *Rhamnus lycioides sbsp. graecus* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



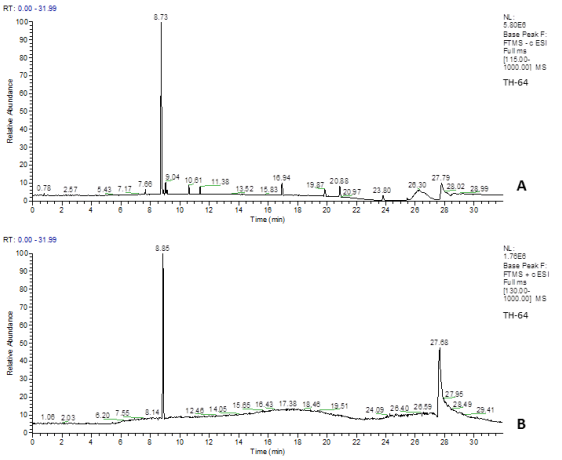
Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH61** *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.



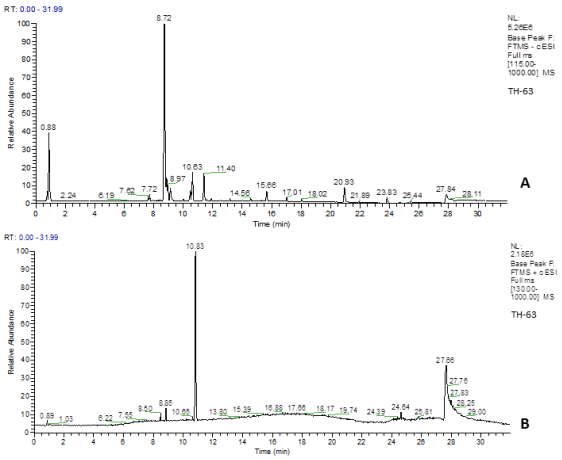
TH64 *Rhamnus sibthorpiana* (EtOAc)



TH63 *Rhamnus sibthorpiana* (MeOH)

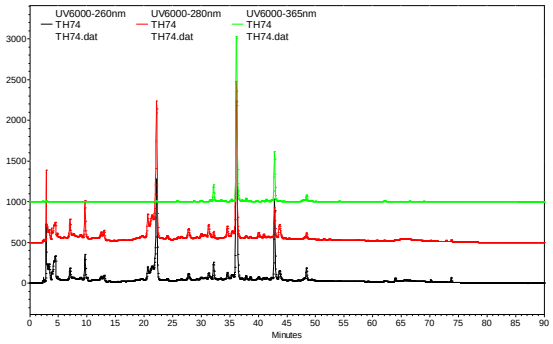


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH64** *Rhamnus sibthorpiana* (EtOAc) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

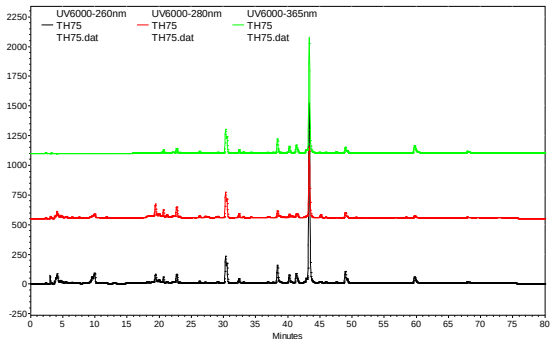


Χρωματογραφήματα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS [A] και HPLC-(+)ESI-HRMS [B], **TH63** *Rhamnus sibthorpiana* (MeOH) συγκέντρωσης 100 μg /ml.

Με βάση τους χρωματογραφικούς ελέγχους, τα εκχυλίσματα της *Ceratonia siliqua* εμφανίστηκαν πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, πιθανότατα της κατηγορίας των φαινολικών παραγώγων και φλαβονοειδών, με το μεθανολικό εκχύλισμα **TH74** των υπέργειων τμημάτων του φυτού να παρουσιάζει το πλουσιότερο φυτοχημικό προφίλ.

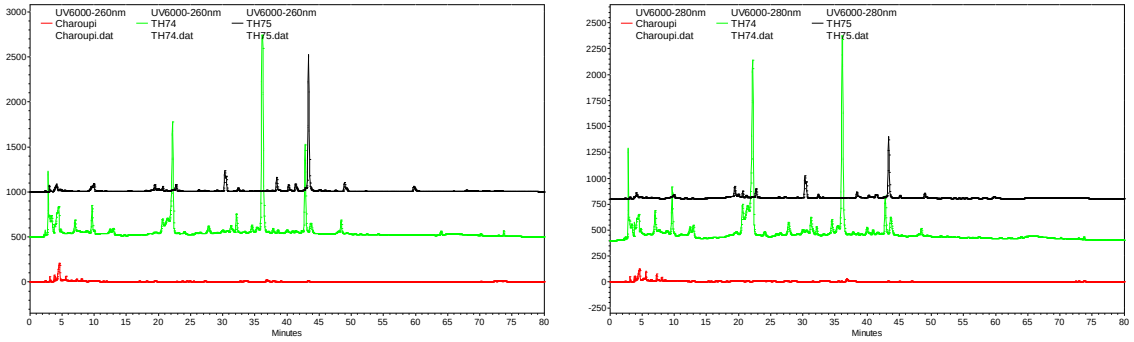


TH74 *Ceratonia siliqua* (MeOH)



TH75 *Ceratonia siliqua* (καρποί) (MeOH)

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα HPLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων του χαρουπάλευρου (**charoupi**), των υπέργειων τμημάτων (**TH74**) και των καρπών της *Ceratonia siliqua* (**TH75**), παρατηρούμε πως το **TH74** παρουσιάζει το μεγαλύτερο φυτοχημικό ενδιαφέρον λόγω της πλθώρας των δευτερογενών μεταβολιτών του. Επίσης, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως οι βασικοί μεταβολίτες του εκχυλίσματος **TH75** εντοπίζονται στο **TH74,** όπως επίσης και η πλειοψηφία των μεταβολιτών του εκχυλίσματος του χαρουπάλευρου (**charoupi**).



TH74 / TH75 /charoupi *Ceratonia siliqua* (MeOH)

3.2 Προκαταρτική βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων

3.2.1 Προκαταρτικός έλεγχος της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων

Δεδομένου ότι τα οιστρογόνα συνεισφέρουν στην διατήρηση της οστικής μάζας, επιδρώντας τόσο στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης όσο και της οστεοβλαστογένεσης, κυρίως μέσω καταστολής της δράσης των οστεοκλαστών και επαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, προχωρήσαμε στην αξιολόγηση της οιστρογονικής δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, καθώς η χρήση τους είναι πολύ διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της οιστρογονικής δράσης φυσικών και συνθετικών ενώσεων (Alexi, *et al.*, 2009), (Fokialakis, *et al.,* 2004). Η κυτταρική σειρά Ishikawa είναι κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου που εκφράζουν ERα & ERβ υποδοχείς και χρησιμοποιείται για *in vitro* εκτίμηση οιστρογόνου δράσης μέσω επαγωγής της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) απουσία οιστρογόνου στο υλικό καλλιέργειας. Η κυτταρική σειρά MCF-7 είναι ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου μαστού που εκφράζουν τον ERα υποδοχέα και χρησιμοποιούνται για *in vitro* εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

Ως εκλεκτικοί ρυθμιστές των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM's) χαρακτηρίζονται οι ουσίες που επιδρούν ασκώντας επαγωγή της AlkP στα κύτταρα Ishikawa (απουσία οιστρογόνου στο θρεπτικό υλικό), χωρίς όμως να επιδρούν σημαντικά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7.

3.2.1.1 Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.4.2.3 ενώ ως δείκτης της εγγενούς οιστρογονικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης. Η επαγωγή της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa, προκαλείται μόνο με την παρουσία οιστρογόνου και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης δράσης των υπό εξέταση δειγμάτων (Markiewicz, *et al.*, 1993).

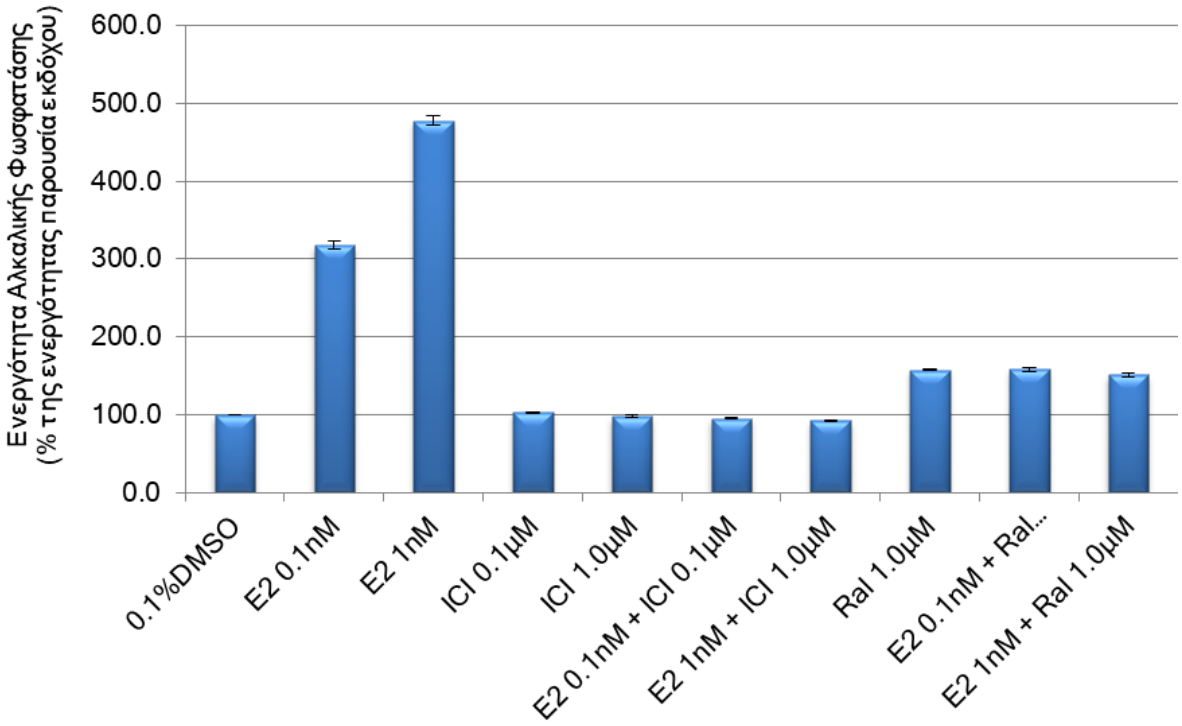
Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η οιστραδιόλη, η οποία αποτελεί τον φυσικό προσδέτη του υποδοχέα ER και σε συγκέντρωση 1 nM επάγει περίπου 5 φορές την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης, ενώ η επαγωγή καταστέλλεται πλήρως στην παρουσία ICI-182.780 (ισχυρό αντιοιστρογόνο). Σε αντίθεση με το ICI, η ραλοξιφαίνη ως αντιοιστρογόνο τύπου SERM, εμφανίζει μικρότερο αγωνισμό της τάξης του 15% αυτού της οιστραδιόλης.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα επαγωγής της AlkP των 75 επιλεγμένων εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Ο αγωνισμός των υπό εξέταση δειγμάτων σε σχέση με εκείνον της οιστραδιόλης (E_2 1 nM) υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ αγωνισμός} = (OD_{\text{δείγματος}}-OD_{\text{εκδόχου}})*100/(OD_{E2}-OD_{\text{εκδόχου}}),$$

όπου OD είναι η οπτική απορρόφηση στα 405 nm.

Ο αγωνισμός καταχωρήθηκε ως ισχυρός/πλήρης (F: full), μέτριος/μερικός (P: partial), ασθενής/μικρός (W: weak) και μηδαμινός (M: marginal), όταν η επαγωγή της έκφρασης AlkP ήταν αντίστοιχα ≥67%, 34-66%, 33-10% και <10%.



Εικόνα 25: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του εκδόχου. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν προέρχεται από την οικογένεια των ψυχανθών Leguminosae ή Fabaceae (44 εκχυλίσματα), η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία φυτοοιστρογόνων. Πράγματι, όπως φαίνεται στον πίνακα21 και τα δύο εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων της *Genista hassertiana* (TH58-57) χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί αγωνιστές, παρουσιάζοντας ικανότητα επαγωγής της έκφρασης της AlkP σε ποσοστό μεγαλύτερο του 82%. Επίσης, ισχυρή αγωνιστική δράση επέδειξαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Chamaecytisus triflorus* (TH19) και *Cytisus villosus* (TH20), με παρόμοια ικανότητα επαγωγής της έκφρασης της AlkP (75,9 και 73,8%, αντίστοιχα), γεγονός που συμφωνεί με την φυλογενετική συγγένεια και την μεγάλη ομοιότητα του φυτοχημικού προφίλ των προαναφερόμενων ειδών. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα

των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (TH66) και της *Glycyrrhiza glabra* (TH70) επέδειξαν εξίσου ισχυρή επαγωγική ικανότητα (71,1 και 71,7%, αντίστοιχα), με αποτέλεσμα να κατατάσσονται μεταξύ των ισχυρών αγωνιστών.

Μερικό αγωνισμό επέδειξαν το μεθανολικό εκχύλισμα όλου του υπέργειου τμήματος του είδους *Chamaecytisus austriacus* (TH18) (επαγγή κατά 39%), καθώς και τα δύο εκχυλίσματα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* (TH55-56) (επαγωγή κατά 50 και 46%, αντίστοιχα). Επίσης, ως μερικοί αγωνιστές χαρακτηρίστηκαν τα εκχύλισματα οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* (TH69) με την ικανότητα επαγωγής της AlkP να κυμαίνεται στο 53% και των καρπών του *Lupinus albus* (TH67) με ποσοστό επαγωγής 55%.

Τα εκχυλίσματα της οικογένειας Leguminosae, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές, ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (TH65), το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστερα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Teline monspessulana* (TH26), καθώς και τα δύο εκχυλίσματα (TH35, 36) των υπέργειων τμημάτων του είδους *Hippocrepis comosa* , ενώ όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα εκδήλωσαν μηδαμινό αγωνισμό.

Πίνακας 21: Δράση εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae ως αγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν της E2 σε συγκέντρωση 1 nM (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Leguminosae			**Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E_2 1nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**
TH15	*Lathyrus clymenum -**E***	Περισπέρμιο	M
TH16	*Lathyrus clymenum **M***	Περισπέρμιο	M
TH47	*Dorycnium hirsutum **E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH17	*Dorycnium hirsutum **M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH46	*Chamaecytisus austriacus **E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH18	*Chamaecytisus austriacus **M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	P (38,6 ± 0,4)
TH37	*Chamaecytisus triflorus **E***	Υπέργεια τμήματα	M
TH19	*Chamaecytisus triflorus-**M***	Υπέργεια τμήματα	F (75,9 ± 0,4)
TH28	*Cytisus villosus **E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH20	*Cytisus villosus **M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	F (73,8 ± 0,1)
TH24	*Melilotus graecus **E***	ρίζες και καρποί	M
TH25	*Melilotus graecus **M***	ρίζες και καρποί	M
TH26	*Teline monspessulana **E***	Υπέργεια τμήματα	W (15,5 ± 0,6)
TH27	*Teline monspessulana **M***	Υπέργεια τμήματα	M
TH29	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans **E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH30	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans **M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH31	*Cercis siliquastrum **E***	Υπέργεια τμήματα και καρποί	M
TH32	*Cercis siliquastrum **M***	Υπέργεια τμήματα και καρποί	M
TH33	*Galega officinalis **E***	Υπέργεια τμήματα	M
TH34	*Galega officinalis **M***	Υπέργεια τμήματα	M
TH35	*Hippocrepis comosa **E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (28,9 ± 1,8)

TH36	*Hippocrepis comosa* ***M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (12 ± 0,3)
TH38	*Anagyris foedida* ***E***	Καρποί και σπόροι	M
TH39	*Anagyris foedida* ***M***	Καρποί και σπόροι	M
TH40	*Calicotome villosa* ***E***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH41	*Calicotome villosa* ***M***	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH42	*Anthyllis montana* ***E***	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	M
TH43	*Anthyllis montana* ***M***	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	M
TH44	*Indigofera secundiflora* ***E***	Υπέργεια τμήματα	M
TH45	*Indigofera secundiflora* ***M***	Υπέργεια τμήματα	M
TH55	*Glycyrrhiza glabra* ***E***	Ρίζες	P (50,1 ± 4)
TH56	*Glycyrrhiza glabra* ***M***	Ρίζες	P (45,5 ± 0,1)
TH69	*Glycyrrhiza glabra* ***E***	Υπέργεια τμήματα	P (52,5 ± 0,3)
TH70	*Glycyrrhiza glabra* ***M***	Υπέργεια τμήματα	F (71,7 ± 4,5)
TH58	*Genista hassertiana* ***E***	Υπέργεια τμήματα	F (82,2 ± 1,7)
TH57	*Genista hassertiana* ***M***	Υπέργεια τμήματα	F (100,7 ± 5,7)
TH65	*Psoralea bituminosa* ***M***	Υπέργεια τμήματα	W (19 ± 0,5)
TH66	*Lupinus albus* ***M***	Υπέργεια τμήματα	F (71,1 ± 4,4)
TH67	*Lupinus albus* ***E***	Καρποί	P (54,9 ± 13,9)
TH68	*Lupinus albus* ***M***	Καρποί	M
TH73	*Ceratonia siliqua-* ***E***	Φύλλα και κλαδιά	M
TH74	*Ceratonia siliqua* ***-M***	Φύλλα και κλαδιά	M
TH75	*Ceratonia siliqua-****M***	Καρποί	M
TH76	*Ceratonia siliqua-* ***M***	χαρουπάλευρο	M

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiaceae επέδειξαν μηδαμινό αγωνισμό, ενώ μεταξύ των υπόλοιπων οικογενειών το μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Rhamnus alpinus* (TH60) και του φυτού *Allium ampeloprassum* (TH72) εκδήλωσαν μερική ικανότητα επαγωγής της AlkP (59 και 55% αντίστοιχα). Τέλος, όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα δεν σημείωσαν αγωνισμό, εκτός από το υδατικό εκχύλισμα των άνθεων του *Crocus sativus* (TH12), το οποίο χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής (Πίνακας 22).

Πίνακας 22: Δράση εκχυλισμάτων της οικ. Lamiacea, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae ως αγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν της E_2 σε συγκέντρωση 1 nM (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Lamiaceae			**Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E_2 nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**
TH1	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH2	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH3	*Sideritis scardica* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH4	*Sideritis scardica* **Et**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH5	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH6	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **M**	Υπέργεια τμήματα	M

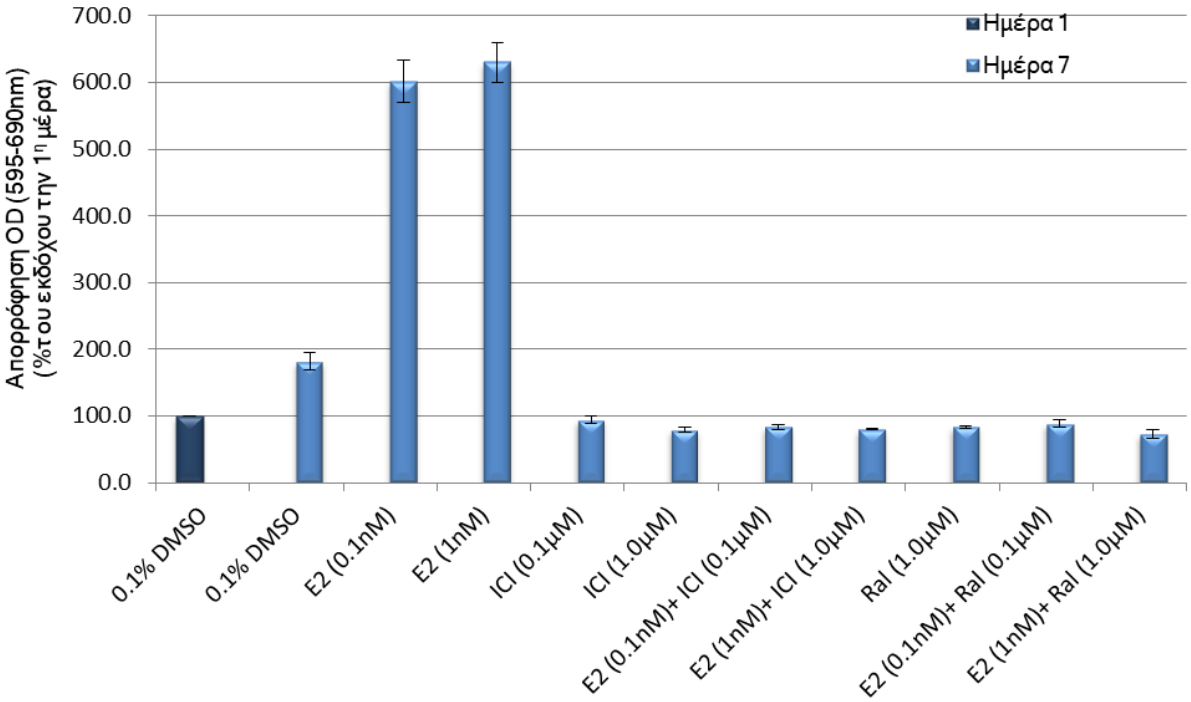
TH7	*Mentha aquatica* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH8	*Mentha aquatica* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH21	*Mentha pulegium* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH9	*Mentha pulegium* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH10	*Mentha longifolia* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH22	*Salvia officinalis* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH13	*Salvia officinalis* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH14	*Salvia fruticosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH23	*Salvia fruticosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
Οικογένεια Rosaceae			
TH11	*Rosa damascena*	Άνθη	M
Οικογένεια Iridaceae			
TH12	*Crocus sativus*	Άνθη	W (23.5 ± 0.3)
Οικογένεια Rutaceae			
TH48	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH49	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH50	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH51	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH53	*Citrus aurantium* **E**	Φλούδα	M
Οικογένεια Vitaceae			
TH54	*Vitis vinifera*	Καρποί	M
Οικογένεια Rhamnaceae			
TH59	*Rhamnus alpinus* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	Υπέργεια τμήματα	P (58,7 ± 16,9)
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH61	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH64	*Rhamnus sibthorpiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH63	*Rhamnus sibthorpiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
Οικογένεια Liliaceae			
TH71	*Allium ampeloprasum* **E**	Φύλλα	M
TH72	*Allium ampeloprasum* **M**	Φύλλα	P (55 ± 12,4)

Συνολικά από τα 75 εκχυλίσματα που αξιολογήθηκαν ως προς την εκδήλωση οιστρογονικότητας στην κυτταρική σειρά Ishikawa σε συγκέντρωση 1 μg/ml, 6 εκχυλίσματα εκδήλωσαν ισχυρή οιστρογόνο δράση, 7 εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές, ενώ 5 εκχυλίσματα εκδήλωσαν ασθενή οιστρογόνο δράση. Τα περισσότερα εκχυλίσματα που εκδήλωσαν οιστρογονικότητα προέρχονται από την οικογένεια Leguminosae και πιο συγκεκριμένα, όλα τα εκχυλίσματα των ριζών και των υπέργειων τμημάτων της *Glycyrrhiza glabra* παρουσίασαν μέτρια και ισχυρή οιστρογονικότητα, καθώς και τα εκχυλίσματα των καρπών και των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus*. Στην περίπτωση της *Genista hassertiana* και τα δύο εκχυλίσματά της σημείωσαν ισχυρή επαγωγή της έκφρασης της AlkP, ενώ τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Cytisus villosus, Chamaecytisus triflorus* και *Chamaecytisus austriacus* σημείωσαν μερική επαγωγή της έκφρασης AlkP. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως κανένα από τα μελετούμενα εκχυλίσματα της οικογένειας Labiatae δεν

εκδήλωσε οιστρογόνο δράση, ενώ μεταξύ των υπόλοιπων οικογενειών τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων του *Allium ampeloprasum* και των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* παρουσίασαν μέτρια οιστρογόνο δράση. Αξίζει να σημειωθεί πως το προαναφερόμενο εκχύλισμα ήταν και το μοναδικό μεταξύ των τριών ειδών του γένους *Rhamnus* που εκδήλωσε δραστικότητα.

3.2.1.2 Προσδιορισμός της οιστρογονικότητας στην κυτταρική σειρά MCF-7

Όπως έχει προαναφερθεί, τα κύτταρα MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού) διαθέτουν κυρίως τον ERα υποδοχέα (Lazennec, *et al.*, 2001). Παρουσία οιστρογόνου επάγεται ο κυτταρικός τους πολλαπλασιασμός παρουσιάζοντας μέγιστη αποτελεσματικότητα σε συγκέντρωση οιστραδιόλης ≥ 0.1 nM. Έτσι, μετά από επώαση έξι ημερών παρουσία οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM ή παρουσία μόνο του εκδόχου ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αυξάνεται κατά περίπου 6 και 2 φορές αντίστοιχα, σε σχέση με αυτόν της πρώτης ημέρας καλλιέργειας. Ο πολλαπλασιασμός παρουσία μόνο του εκδόχου αντιπροσωπεύει την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων, που ήταν ήδη εντός κύκλου όταν απομακρύνθηκε η ορμόνη, προκειμένου να προσδιοριστεί η δραστικότητα των δειγμάτων απουσία οιστραδιόλης. Επίσης, πλήρης καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκε στην περίπτωση της επώασης των κυττάρων παρουσία του παράγοντα ICI-182.780.



Εικόνα 26: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί του εκδόχου κατά την 1η ημέρα επώασης. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, RaI: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στην παρούσα μελέτη, τα παρασκευασθέντα εκχυλίσματα, αξιολογήθηκαν και ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 σε συγκέντρωση 1 μg/ml, όπως περιγράφεται στην § 1.4.2.2. Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 εκφράστηκε ως αγωνισμός ως προς την οιστραδιόλη (0.1 nM) και ο τύπος υπολογισμού παρουσιάζεται στη § 3.2.1.1.

Πιο συγκεκριμένα, από την οικογένεια Leguminosae, τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών *Chamaecytisus triflorus* (TH19), *Genista hassertiana* (TH57), *Glycyrrhiza glabra* (TH70) και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Lupinus albus* (TH67) διατήρησαν την σημαντική οιστρογόνο δράση τους και στην κυτταρική σειρά MCF-7, καθώς παρουσίασαν πολύ υψηλή ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού (68, 72, 86 και 105%, αντίστοιχα).

Ως μερικοί αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων στα κύτταρα MCF-7, χαρακτηρίστηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Cytisus villosus* (TH20) και *Lupinus albus* (TH66), τα οποία ήταν και ισχυροί αγωνιστές στα κύτταρα Ishikawa, ενώ μέτρια αγωνιστική δράση επέδειξε το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Chamaecytisus austriacus* (TH18) καθώς και τα εκχυλίσματα των ριζών και υπέργειων τμημάτων της *Glycyrrhiza glabra* (TH56, TH69 αντίστοιχα). Τα τρία προαναφερόμενα εκχυλίσματα εμφανίζονται ως μερικοί αγωνιστές και στις δύο κυτταρικές σειρές. Μέτρια οιστρογονικότητα παρατηρήθηκε και στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Teline monspessulana* (TH26) και *Hippocrepis comosa* (TH35), τα οποία στον έλεγχο στην κυτταρική σειρά Ishikawa χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές.

Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα της οικογένειας Leguminosae επέδειξαν ασθενή ή μηδαμινή οιστρογονικότητα και χαρακτηριστικά αναφέρονται ως ασθενείς αγωνιστές τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του είδους *Glycyrrhiza glabra* (TH55) και των υπέργειων τμημάτων του *Genista hassertiana* (TH58), τα οποία στην κυτταρική σειρά Ishikawa είχαν εκδηλώσει μέτρια και ισχυρή οιστρογονικότητα αντίστοιχα.

Πίνακας 23: Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Ο σχετικός αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Crystal violet. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν την E_2 σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Leguminosae			**Επαγωγή Κυτταρικού Πολ/σμου Αγωνισμός (% της E_2 0.1 nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**
TH15	*Lathyrus clymenum* -**E**	Περισπέρμιο	M
TH16	*Lathyrus clymenum* **M**	Περισπέρμιο	M
TH47	*Dorycnium hirsutum* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH17	*Dorycnium hirsutum* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH46	*Chamaecytisus austriacus* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	M
TH18	*Chamaecytisus austriacus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	P (49,1 ± 7,1)
TH37	*Chamaecytisus triflorus* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH19	*Chamaecytisus triflorus*-**M**	Υπέργεια τμήματα	F (68 ± 4,3)
TH28	*Cytisus villosus* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (10,3 ± 1,3)
TH20	*Cytisus villosus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	P (62,4 ± 5,8)
TH24	*Melilotus graecus* **E**	ρίζες και καρποί	M
TH25	*Melilotus graecus* **M**	ρίζες και καρποί	M
TH26	*Teline monspessulana* **E**	Υπέργεια τμήματα	P (43,8 ± 1,1)
TH27	*Teline monspessulana* **M**	Υπέργεια τμήματα	W (17,6 ± 1,2)
TH29	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH30	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH31	*Cercis siliquastrum* **E**	Υπέργεια τμήματα και καρποί	M
TH32	*Cercis siliquastrum* **M**	Υπέργεια τμήματα και καρποί	M
TH33	*Galega officinalis* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH34	*Galega officinalis* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH35	*Hippocrepis comosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	P (46,6 ± 0,6)
TH36	*Hippocrepis comosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (24,0 ± 3)
TH38	*Anagyris foedida* **E**	Καρποί και σπόροι	M
TH39	*Anagyris foedida* **M**	Καρποί και σπόροι	M
TH40	*Calicotome villosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH41	*Calicotome villosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH42	*Anthyllis montana* **E**	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	M

TH43	*Anthyllis montana* **M**	Υπέργεια τμήματα (ετήσια και πολυετή)	W (19,4 ± 1,6)
TH44	*Indigofera secundiflora* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH45	*Indigofera secundiflora* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH55	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Ρίζες	W (23,8 ± 3,2)
TH56	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Ρίζες	P (60,1 ± 10,1)
TH69	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Υπέργεια τμήματα	P (67,5 ± 3,8)
TH70	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (88,7 ± 4,0)
TH58	*Genista hassertiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	W (33,5 ± 8,1)
TH57	*Genista hassertiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (72,3 ± 10,1)
TH65	*Psoralea bituminosa* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH66	*Lupinus albus* **M**	Υπέργεια τμήματα	P (48,5 ± 6,0)
TH67	*Lupinus albus* **E**	Καρποί	F (105,0 ± 12,2)
TH68	*Lupinus albus* **M**	Καρποί	M
TH73	*Ceratonia siliqua*- **E**	Φύλλα και κλαδιά	M
TH74	*Ceratonia siliqua* **-M**	Φύλλα και κλαδιά	M
TH75	*Ceratonia siliqua*-**M**	Καρποί	M
TH76	*Ceratonia siliqua*- **M**	χαρουπάλευρο	M

Μεταξύ των υπολοίπων εκχυλισμάτων, ελάχιστα ήταν εκείνα που χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογόνο δράση. Πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων της οικογένειας Lamiaceae δεν παρουσίασε επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MCF-7 και δεν είχαν εκδηλώσει οιστρογόνο δράση ούτε στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Εξαίρεση αποτελούν τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (TH5) *και Salvia fruticosa* (TH14), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές επιδεικνύοντας ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού περίπου 15%. Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα σημειώνεται πως ισχυρό αγωνισμό επέδειξαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών *Rhamnus alpinus* (88%) και *Allium ampeloprasum* (100%), τα οποία κατά τον έλεγχο στην κυτταρική σειρά Ishikawa είχαν σημειώσει μερική ικανότητα επαγωγής της έκφρασης της AlkP.

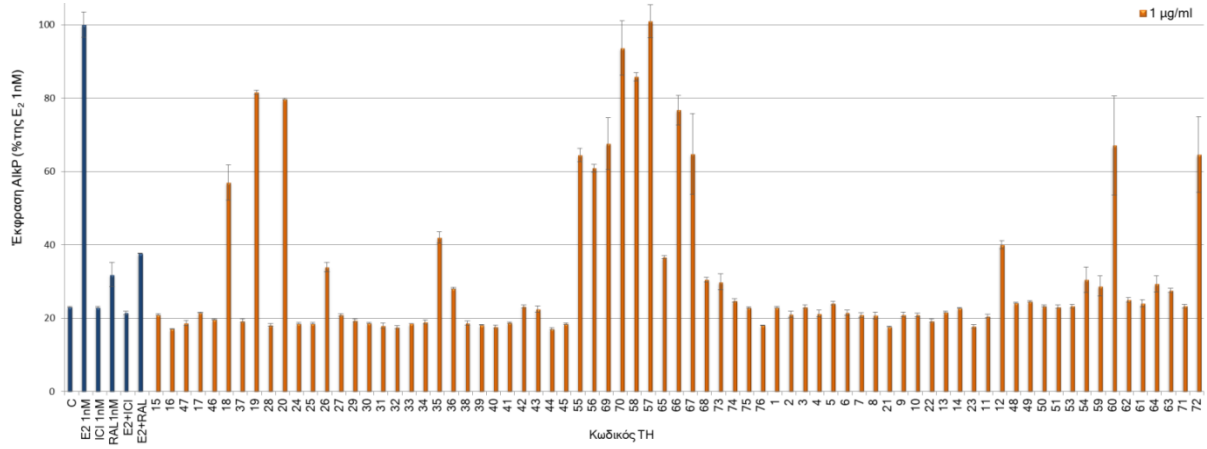
Πίνακας 24: Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικ. Lamiacea, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Ο σχετικός αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Crystal violet. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν την E_2 σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Lamiaceae			**Επαγωγή Κυτταρικού Πολ/σμου Αγωνισμός (% της E_2 0.1 nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**
TH1	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH2	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH3	*Sideritis scardica* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH4	*Sideritis scardica* **Et**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH5	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **E**	Υπέργεια τμήματα	W (14,5 ± 1,3)
TH6	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH7	*Mentha aquatica* **E**	Υπέργεια τμήματα	M

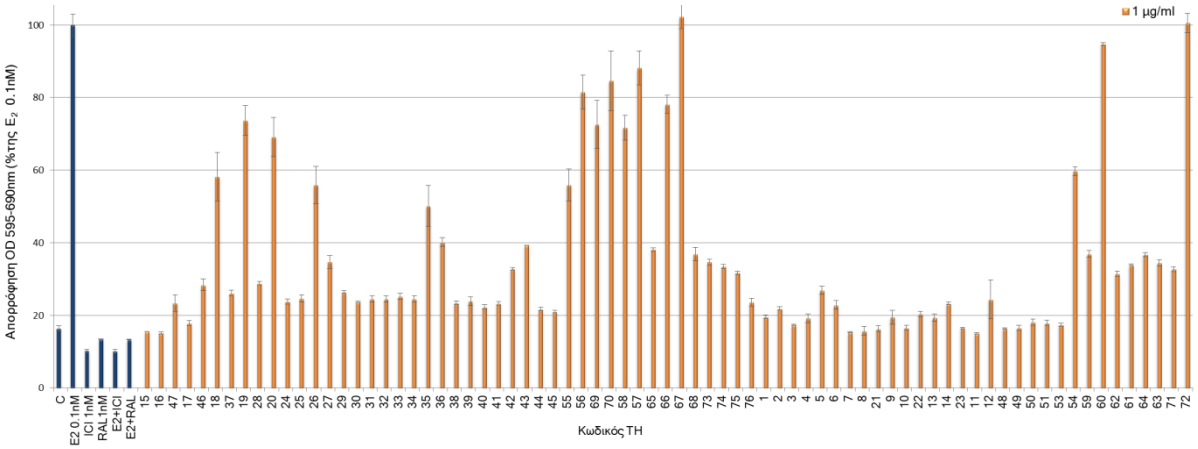
TH8	*Mentha aquatica* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH21	*Mentha pulegium* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH9	*Mentha pulegium* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH10	*Mentha longifolia* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH22	*Salvia officinalis* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH13	*Salvia officinalis* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
TH14	*Salvia fruticosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (10 ± 0,3)
TH23	*Salvia fruticosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	M
Οικογένεια Rosaceae			
TH11	*Rosa damascena*	Άνθη	M
Οικογένεια Iridaceae			
TH12	*Crocus sativus*	Άνθη	M
Οικογένεια Rutaceae			
TH48	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH49	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH50	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH51	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH52	*Citrus aurantium*	Φλούδα	M
TH53	*Citrus aurantium* **E**	Φλούδα	M
Οικογένεια Vitaceae			
TH54	*Vitis vinifera*	Καρποί	M
Οικογένεια Rhamnaceae			
TH59	*Rhamnus alpinus* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (88 ± 1)
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH61	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
TH64	*Rhamnus sibthorpiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	M
TH63	*Rhamnus sibthorpiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	M
Οικογένεια Liliaceae			
TH71	*Allium ampeloprasum* **E**	Φύλλα	M
TH72	*Allium ampeloprasum* **M**	Φύλλα	F (100 ± 6)

Συμπερασματικά, από τα 75 εκχυλίσματα που αξιολογήθηκαν ως προς την εκδήλωση οιστρογονικότητας σε συγκέντρωση 1 μg/ml στην κυτταρική σειρά MCF-7, μόνο 6 εκχυλίσματα εκδήλωσαν ισχυρή οιστρογόνο δράση, 7 εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές, ενώ 8 εκχυλίσματα εκδήλωσαν ασθενή οιστρογόνο δράση. Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων Ishikawa, έτσι και στα MCF-7 η πλειοψηφία των δραστικών εκχυλισμάτων ανήκει στην οικογένεια Leguminosae με τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του *Chamaecytisus triflorus,* της *Glycyrrhiza glabra*, της *Genista hassertiana* και των καρπών του *Lupinus albus* να χαρακτηρίζονται ως οι πιο ισχυροί οιστρογονικοί παράγοντες. Από την οικογένεια Labiatae κανένα εκχύλισμα δεν σημείωσε σημαντική επαγωγή του πολλαπλασιασμού των MCF-7, ενώ από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα μόνο τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των *Rhamnus alpinus* και *Allium ampeloprasum* εκδήλωσαν ισχυρή οιστρογόνο δράση. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η επαγωγή της

αλκαλικής φωσφατάσης (εικόνα 27) και η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (εικόνα 28) ως προς την οιστραδιόλη (1 nM και 0.1 nM αντίστοιχα) όλων των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 1 μg/ml.



Εικόνα 27: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (1 μg/ml) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων



Εικόνα 28: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα διερεύνησης της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων (ι) μέσω προσδιορισμού της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου (Ishikawa) και (ιι) μέσω προσδιορισμού της ικανότητάς τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7) συμπεραίνουμε τα ακόλουθα:

- Από τα 75 εκχυλίσματα που αξιολογήθηκαν, 13 επέδειξαν υψηλή (≥67%) και μέτρια (34-66%) ικανότητα επαγωγής της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa στη συγκέντρωση ελέγχου 1 μg/ml, με τα 11 από αυτά να ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην δεύτερη κυτταρική σειρά ελέγχου, στην οποία 13 εκχυλίσματα σημείωσαν υψηλή (≥67%) και μέτρια (34-

66%) ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των MCF-7 με τα 11 να ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae.

- Συνολικά 15 εκχυλίσματα κρίθηκαν ισχυροί και μέτριοι αγωνιστές (σημαντική οιστρογονική δράση) σε μια ή και τις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa ή/και MCF-7) και μεταξύ αυτών 11 εκχυλίσματα σημείωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση και στις δύο μελετώμενες κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, από την οικογένεια Leguminosae, τα εκχυλίσματα (TH56, 69 και 70) της *Glycyrrhiza glabra,* τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Chamaecytisus austriacus* (TH18), *Chamaecytisus triflorus* (TH19), *Cytisus villosus* (TH20), της *Genista hassertiana* (TH57) όπως και τα εκχυλίσματα TH66 και TH67 του *Lupinus albus* χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογονικότητα. Από τις υπόλοιπες οικογένειες τα εκχυλίσματα (TH60) και (TH72) των *Rhamnus alpinus* και *Allium ampeloprasum* επίσης σημείωσαν σημαντική δραστικότητα τόσο στα κύτταρα Ishikawa, όσο και στα MCF-7.
- Επιπλέον, 2 εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές στην κυτταρική σειρά Ishikawa χωρίς να σημειώνουν ανάλογη δραστικότητα στην κυτταρική σειρά MCF-7 και πιο συγκεκριμένα πρόκειται για και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα της *Genista hassertiana* (TH58) και της *Glycyrrhiza glabra* (TH55).
- Τέλος, 2 εκχυλίσματα που εκδήλωσαν ασθενή αγωνισμό στην κυτταρική σειρά Ishikawa χαρακτηρίστηκαν από μερική ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 και αντιστοιχούν στα είδη *Teline monspessulana* (TH26) και *Hippocrepis comosa* (TH35).

Στον πίνακα 25 παρουσιάζονται τα 15 εκχυλίσματα με τη σημαντικότερη οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa ή/και στην κυτταρική σειρά MCF-7. Ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα όλων των εκχυλισμάτων (πίνακες 21-24) φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση των μετρήσεων [r(Pearson's correlation coefficient)=0.869], με τη μέση τιμή αγωνισμού σε συγκέντρωση 1 μg/ml στα κύτταρα Ishikawa (12,2%) να είναι αντίστοιχη με εκείνη σε συγκέντρωση 1 μg/ml στα κύτταρα MCF-7 (13,9%).

Πίνακας 25: Συνοπτικός πίνακας των εκχυλισμάτων με σημαντική οιστρογόνο δράση στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός ως προς την οιστραδιόλη E_2 (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Εκχυλίσματα με σημαντική οιστρογόνο δράση			**Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E_2 1nM)**	**Επαγωγή Κυτταρικού Πολ/σμου Αγωνισμός (% της E_2 0.1 nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**	**1 μg/ml**
TH18	*Chamaecytisus austriacus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	P (38,6 ± 0,4)	P (49,1 ± 7,1)
TH19	*Chamaecytisus triflorus*-**M**	Υπέργεια τμήματα	F (75,9 ± 0,4)	F (68 ± 4,3)
TH20	*Cytisus villosus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	F (73,8 0,1)	P (62,4 ± 5,8)
TH26	*Teline monspessulana* **E**	Υπέργεια τμήματα	W (15,5 ± 0,6)	P (43,8 ± 1,1)
TH35	*Hippocrepis comosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	W (28,9 ± 1,8)	P (46,6 ± 0,6)

TH55	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Ρίζες	P (50,1 ± 4)	W (23,8 ± 3,2)
TH56	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Ρίζες	P (45,5 ± 0,1)	P (60,1 ± 10,1)
TH69	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Υπέργεια τμήματα	P (52,5 ± 0,3)	P (67,5 ± 3,8)
TH70	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (71,7 ± 4,5)	F (88,7 ± 4,0)
TH58	*Genista hassertiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	F (82,2 ± 1,7)	W (33,5 ± 8,1)
TH57	*Genista hassertiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (100,7 ± 5,7)	F (72,3 ± 10,1)
TH66	*Lupinus albus* **M**	Υπέργεια τμήματα	F (71,1 ± 4,4)	P (48,5 ± 6,0)
TH67	*Lupinus albus* **E**	Καρποί	P (54,9 ± 13,9)	F (105,0 ± 12,2)
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	Υπέργεια τμήματα	P (58,7 ± 16,9)	F (88 ± 1)
TH72	*Allium ampeloprasum* **M**	Φύλλα	P (55 ± 12,4)	F (100 ± 6)

3.2.1.3 Προσδιορισμός της οστεοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα οιστρογόνα συμβάλλουν στη διατήρηση της οστικής μάζας, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς των οιστρογόνων ERα και ERβ (Hawse, *et al.*, 2008) (Spelsberg, *et al.,* 1999), προάγοντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και καταστέλλοντας εκείνη των οστεοκλαστών. Πιο συγκεκριμένα, τα οιστρογόνα προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών ενώ ρυθμίζουν παράλληλα και την παραγωγή OPG, εξασφαλίζοντας έτσι μια ισορροπία στη δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Την περίοδο της εμμηνόπαυσης η συγκέντρωση οιστραδιόλης στην κυκλοφορία περιορίζεται σε περίπου 0.1 nM, οδηγώντας σε μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών και αύξηση των οστεοκλαστών. Επισημαίνεται οτι η επιθυμητή συγκέντρωση οιστραδιόλης στην κυκλοφορία για την εκδήλωση της ευεργετικής δράσης τους είναι 1-10 nM.

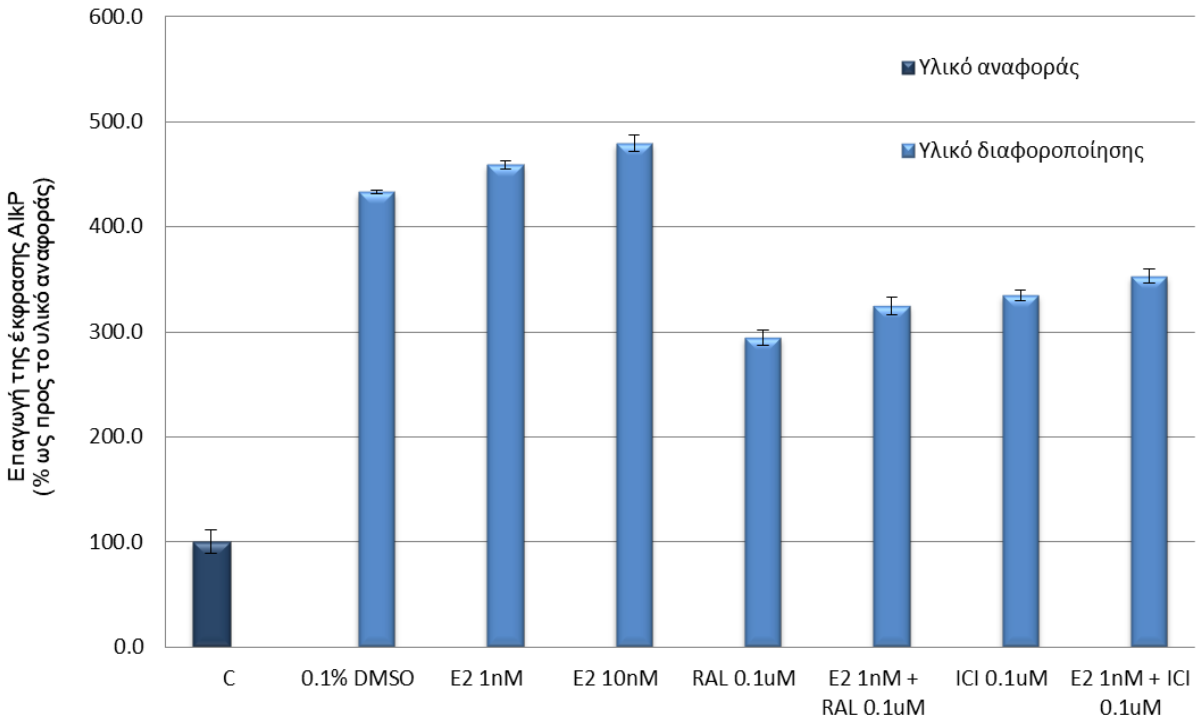
Οι κυτταρικές σειρές MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™) και RAW264.7 (ATCC® TIB-71™) χρησιμοποιούνται ευρέως (Spelsberg T.C., 2008) για την *in vitro* μελέτη της διαφοροποίησης οστεοβλαστών και οστεοκλαστών αντίστοιχα. Τα κύτταρα MC3T3-E1 προέρχονται από τα οστά του θόλου του κρανίου ποντικού C57BL/6 και διαφοροποιούνται *in vitro* σε ώριμους οστεοβλάστες. Η διαδικασία της διαφοροποίησής τους περιλαμβάνει μια αρχική φάση πολλαπλασιασμού που οδηγεί στο σχηματισμό συμπαγούς ταπητίου κυττάρων, την καταστολή του πολλαπλασιασμού και την έναρξη της διαφοροποίησης που εκδηλώνεται με την επαγωγή της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) και την απόθεση εξωκυττάριας ουσίας που περιέχει άλατα φωσφορικού ασβεστίου (υδροξυαπατίτης). Έχει αναφερθεί ότι οιστρογόνα και φυτοοιστρογόνα προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες (Kanno, *et al.*, 2004). Τα μακροφάγα κύτταρα RAW264.7 είναι λευχαιμικά μονοκύτταρα ποντικού που διαφοροποιούνται παρουσία RANKL σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες που εκφράζουν όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό. Έχει αναφερθεί ότι οι οιστρογόνα/ φυτοοιστρογόνα εμποδίζουν τη διαφοροποίησή τους και οδηγούν τους ώριμους οστεοκλάστες σε απόπτωση (Garcia Palacios, *et al.*, 2005) (Kim, *et al.*, 2009). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν αποδείξει ότι η προσθήκη εκλεκτικών ρυθμιστών των

υποδοχέων οιστρογόνων (SERM's) σε καλλιέργεια κυττάρων του μυελού οστών ωοθηκεκτομηθέντων αρουραίων, οδήγησε σε απόπτωση μεγάλο αριθμό οστεοκλαστών (Ke, *et al.*, 1998).

3.2.1.3.1 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των υπό μελέτη εκχυλισμάτων να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Όπως έχει αναφερθεί, πρόκειται για προ-οστεοβλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες παρουσία ασκορβικού οξέος, ενώ η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) χρησιμοποιείται ως δείκτης διαφοροποίησης.

Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία και παρουσία διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.) για διάστημα έξι ημερών και ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (E_2) σε συγκέντρωση 10 nM, η ραλοξιφαίνη (Ral) και η φουλβεστράνη (ICI) σε συγκέντρωση 0.1 μM. Η ραλοξιφαίνη αποτελεί γνωστό SERM παράγοντα, ενώ η φουλβεστράνη δένεται στους ERα & ERβ και προκαλεί την αποικοδόμηση τους μέσω του πρωτεασώματος (εικόνα 29).

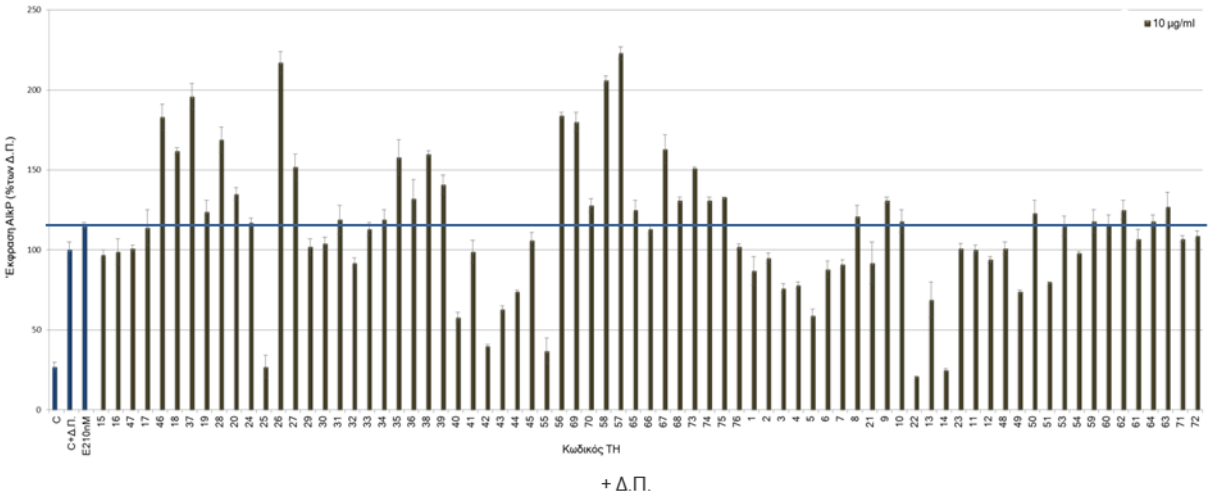


Εικόνα 29: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς, είτε υλικού διαφοροποίησης (50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των ενώσεων αναφοράς για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού αναφοράς. E_2: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων

Τα αποτελέσματα των ενώσεων αναφοράς, στο σύνολο των πειραμάτων, εκφράστηκαν ως % της έκφρασης AlkP των κυττάρων πριν τη διαφοροποίηση, προκειμένου να διαπιστωθεί

αφενός, η ικανότητα των διαφοροποιητικών παραγόντων να επάγουν την έκφραση της AlkP και κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση, και αφετέρου η ικανότητα της οιστραδιόλης να προάγει τη διαφοροποίηση των κύτταρων MC3T3-E1 σε οστεοβλάστες. Η προαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 από την οιστραδιόλη (την ενδογενή του ορού και την προστεθείσα) αναστέλλεται πλήρως τόσο από τη ραλοξιφαίνη, όσο και από τη φουλβεστράνη, γεγονός που υποδεικνύει την συμμετοχή του ενός ή/και των δύο υποδοχέων ER στην προαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1.

Τα 75 εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στις συγκεντρώσεις (10, 1, 0.1 μg/ml) και η ικανότητά τους να προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση εκφράστηκε ως % της επαγωγής της έκφρασης AlkP παρουσία μόνο των διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις εικόνες 30-32 καθώς και στους πίνακες 26-27.



Εικόνα 30: Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (10 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων

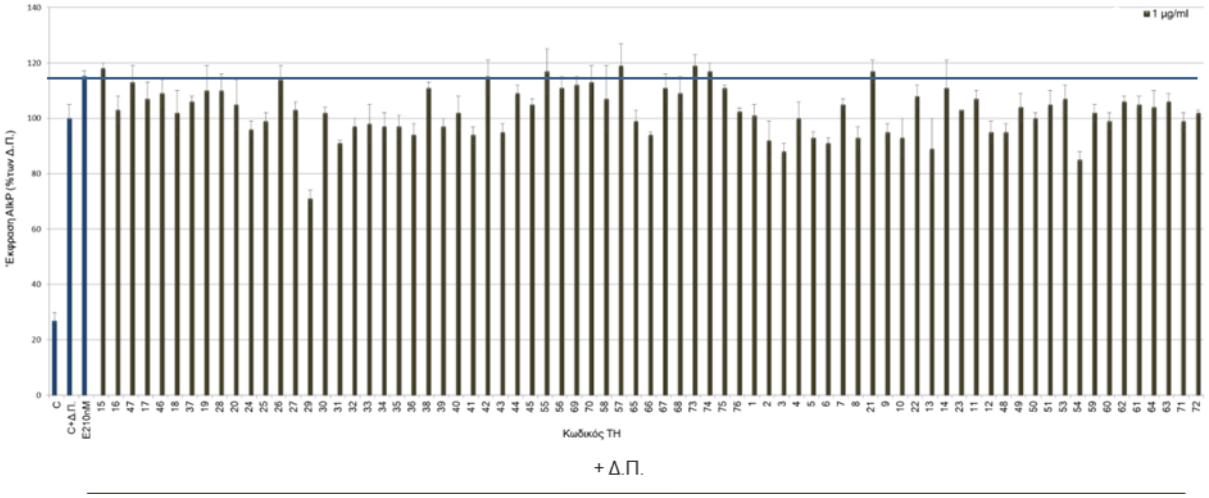
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 30, τα περισσότερα εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 10 μg/ml, αποδείχθηκαν ικανά να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες (48 από τα 75 εκχυλίσματα, 64%), ενώ 36 από αυτά (49%) επέδειξαν ίση ή μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής της AlkP σε σχέση με την οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 10 nM (115.2 ± 1.9%). Στην πλειοψηφία τους τα δραστικότερα εκχυλίσματα προέρχονται από την οικογένεια Leguminosae (πίνακας 26), στην οποία ανήκει και ο μεγαλύτερος αριθμός των δειγμάτων της παρούσας μελέτης. Ανάμεσα σ' αυτά συμπεριλαμβάνονται εκχυλίσματα των γενών *Chamaecytisus, Cytisus Genista, Teline,* με το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Genista hassertiana* (TH57) και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Teline monspessulana* (TH26) να επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη δραστικότητα, με επαγωγή της AlkP 223% και 217% ως προς τους Δ.Π.

Αναλυτικότερα, τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των ειδών *Chamaecytisus triflorus* (TH37), *Chamaecytisus austriacus* (TH46) και *Cytisus villosus* (TH28) προκάλεσαν επαγωγή της AlkP κατά 196%, 183% και 169%, με τα αντίστοιχα μεθανολικά εκχυλίσματα να επάγουν επίσης σημαντικά την έκφραση AlkP (TH19:124%, TH18: 162% και TH20: 135%). Όπως είναι φανερό, όλα τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται από σημαντική ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης των MC3T3 και μάλιστα μεγαλύτερη και από εκείνη της οιστραδιόλης. Η υψηλή δραστικότητα που παρουσιάζουν όλα τα εκχυλίσματα των προαναφερόμενων ειδών συνάδει με τη φυλογενετική τους συγγένεια και την ομοιότητα του χημικού τους περιεχομένου (βλ. § 6.1.2 και § 3.1).

Επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, μεγαλύτερη από εκείνη της οιστραδιόλης, παρουσίασαν και τα δύο εκχυλίσματα του *Hippocrepis comosa* (TH35: 158%, TH36: 132%), τα εκχυλίσματα των καρπών του *Lupinus albus* (TH67: 163%, TH68: 131%), το μεθανολικό εκχύλισμα της *Psoralea bituminosa* (TH65: 125%), καθώς και το εκχύλισμα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* (TH56: 184%). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων της *Glycyrrhiza glabra* εκδήλωσαν σημαντική επαγωγή της διαφοροποίησης και το ίδιο παρατηρήθηκε, τόσο με τα εκχυλίσματα του *Lupinus albus*, όσο και με εκείνα της *Ceratonia siliqua*. Τέλος, επαγωγή αντίστοιχη της οιστραδιόλης προκλήθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium hirsutum* (TH17: 114%).

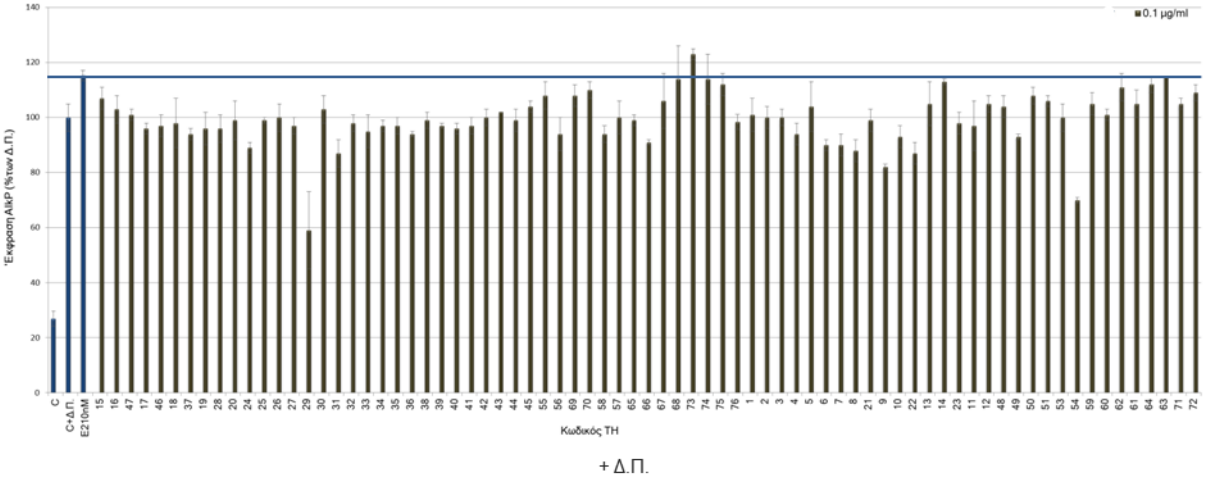
Η επόμενη οικογένεια με πολλούς αντιπροσώπους που αξιολογήθηκε ήταν η Labiatae (πίνακας 27). Από την συγκεκριμένη οικογένεια τα περισσότερα εκχυλίσματα δεν φάνηκε να επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, εκτός από τα μεθανολικά εκχυλίσματα και των τριών ειδών του γένους *Mentha* (TH8-10), τα οποία παρουσίασαν σημαντική ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης σε συγκέντρωση 10 μg/ml. Μεταξύ των υπολοίπων οικογενειών και σε συγκέντρωση 10 μg/ml, το ελαιώδες εκχύλισμα του *Citrus aurantium* (οικ. Rutaceae), το οποίο προήλθε από υπερκρίσιμη εκχύλιση της φλούδας (TH48, 50), σε αντίθεση με τα υδατικά παρασκευάσματα, παρουσίασε σημαντική επαγωγή της έκφρασης AlkP. Επιπλέον, μικρή επαγωγική ικανότητα, που φαίνεται να διατηρείται σε όλες τις συγκεντρώσεις (10, 1, 0.1 μg/ml) επέδειξαν τόσο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (TH71), όσο και το μεθανολικό (TH72) των φύλλων του *Allium ampeloprassum* της οικογένειας Liliaceae (Πίνακας 27).

Τέλος, μια οικογένεια με σημαντικούς αντιπροσώπους ήταν η Rhamnaceae. Πράγματι, όλα τα εκχυλίσματα των επιλεγμένων τριών ειδών της οικογένειας (TH59-64) παρουσίασαν σημαντική επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, με το μεθανολικό εκχύλισμα του *Rhamnus sibthorpiana* (TH63:127%) και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus* (TH62:125%) να ξεπερνούν τη δράση της οιστραδιόλης στη συγκέντρωση 10 μg/ml.



Εικόνα 31:Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (1 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συγκέντρωση 1 μg/ml (εκόνα 31) φαίνεται πως τα περισσότερα εκχυλίσματα καταφέρνουν να διατηρήσουν την επαγωγική τους επίδραση στη διαφοροποίηση των MC3T3-E1. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα (TH42) και (TH55) της οικογένειας Leguminosae, τα οποία στη συγκέντρωση 10 μg/ml κατέστειλαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, στη συγκέντρωση 1 μg/ml χαρακτηρίζονται ως ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα του γένους *Salvia* (TH22, 14), τα οποία στη μεγαλύτερη συγκέντρωση χαρακτηρίζονται ως καταστολείς, ενώ στη συγκέντρωση 1 μg/ml σημείωσαν μικρή επαγωγική επίδραση. Επίσης, ισχυρή επαγωγή διαφοροποίησης στη συγκεκριμένη συγκέντρωση προκαλούν και τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Genista hassertiana* (TH57) και *Ceratonia siliqua* (TH74) σε επίπεδα υψηλότερα από της οιστραδιόλη (E_2). Τέλος, εξ' ίσου ικανοποιητική δράση παρουσιάζουν και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα (TH15 και TH21) των ειδών *Lathyrus clymenum* και *Mentha pulegium,* αντιστοίχως.



Εικόνα 32: Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρα MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχορήγηση των εκχυλισμάτων (0.1 μg/ml) για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη συγκέντρωση 0.1 μg/ml μόνο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα της *Ceratonia siliqua* επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε υψηλότερα επίπεδα από την E_2, ενώ παρατηρούμε πως όλα τα είδη του γένους *Rhamnus* διατήρησαν την επαγωγική τους δράση. Στους πίνακες που ακολουθούν, αποτυπώνεται η ικανότητα των μελετούμενων εκχυλισμάτων να επάγουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης κατά τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες, στις συγκεντρώσεις ελέγχου (10 μg/ml, 1 μg/ml, 0.1 μg/ml).

Πίνακας 26: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae κατά την διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Leguminosae			**Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)**		
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**10 μg/ml**	**1 μg/ml**	**0.1 μg/ml**
TH15	*Lathyrus clymenum* -**E**	Περισπέρμιο	97 ± 3	118 ± 2	107 ± 4
TH16	*Lathyrus clymenum* **M**	Περισπέρμιο	99 ± 12	103 ± 5	103 ± 5
TH47	*Dorycnium hirsutum* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα κ' καρποί	101 ± 2	113 ± 6	101 ± 2
TH17	*Dorycnium hirsutum* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα κ' καρποί	114 ± 5	107 ± 6	96 ± 2
TH46	*Chamaecytisus austriacus* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα κ' καρποί	183 ± 11	109 ± 5	97 ± 4
TH18	*Chamaecytisus austriacus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα κ'καρποί	162 ± 14	102 ± 8	98 ± 9
TH37	*Chamaecytisus triflorus* **E**	Υπέργεια τμήματα	196 ± 2	106 ± 2	94 ± 2
TH19	*Chamaecytisus triflorus*-**M**	Υπέργεια τμήματα	124 ± 6	110 ± 9	96 ± 6
TH28	*Cytisus villosus* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	169 ± 12	110 ± 6	96 ± 5
TH20	*Cytisus villosus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	135 ± 16	105 ± 9	100 ± 7
TH24	*Melilotus graecus* **E**	ρίζες και καρποί	117 ± 3	96 ± 3	89 ± 2
TH25	*Melilotus graecus* **M**	ρίζες και καρποί	27 ± 7	99 ± 3	99 ± 1
TH26	*Teline monspessulana* **E**	Υπέργεια τμήματα	217 ± 9	115 ± 5	100 ± 5
TH27	*Teline monspessulana* **M**	Υπέργεια τμήματα	152 ± 7	103 ± 3	97 ± 3

TH29	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	102 ± 22	71 ± 3	59 ± 14
TH30	*Lembotropis nigricans ssp. nigricans* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	104 ± 4	102 ± 2	103 ± 5
TH31	*Cercis siliquastrum* **E**	Υπέργεια τμήματα και καρποί	119 ± 10	91 ± 1	87 ± 5
TH32	*Cercis siliquastrum* **M**	Υπέργεια τμήματα και καρποί	92 ± 3	97 ± 3	98 ± 3
TH33	*Galega officinalis* **E**	Υπέργεια τμήματα	113 ± 9	98 ± 7	95 ± 6
TH34	*Galega officinalis* **M**	Υπέργεια τμήματα	119 ± 6	97 ± 5	97 ± 2
TH35	*Hippocrepis comosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	158 ± 11	97 ± 4	97 ± 3
TH36	*Hippocrepis comosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	132 ± 12	94 ± 4	94 ± 1
TH38	*Anagyris foedida* **E**	Καρποί και σπόροι	160 ± 2	111 ± 2	99 ± 3
TH39	*Anagyris foedida* **M**	Καρποί και σπόροι	141 ± 6	97 ± 3	97 ± 1
TH40	*Calicotome villosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	58 ± 3	102 ± 6	96 ± 2
TH41	*Calicotome villosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	99 ± 7	94 ± 3	97 ± 3
TH42	*Anthyllis montana* **E**	Υπέργεια τμήματα (ετήσια κ'πολυετή)	40 ± 1	115 ± 6	100 ± 3
TH43	*Anthyllis montana* **M**	Υπέργεια τμήματα (ετήσια κ' πολυετή)	63 ± 2	95 ± 3	102 ± 0
TH44	*Indigofera secundiflora* **E**	Υπέργεια τμήματα	74 ± 1	109 ± 3	99 ± 4
TH45	*Indigofera secundiflora* **M**	Υπέργεια τμήματα	106 ± 5	105 ± 2	104 ± 2
TH55	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Ρίζες	37 ± 8	117 ± 8	108 ± 5
TH56	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Ρίζες	184 ± 23	111 ± 4	94 ± 6
TH69	*Glycyrrhiza glabra* **E**	Υπέργεια τμήματα	180 ± 6	112 ± 3	108 ± 4
TH70	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Υπέργεια τμήματα	128 ± 4	113 ± 6	110 ± 3
TH58	*Genista hassertiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	206 ± 27	107 ± 12	94 ± 3
TH57	*Genista hassertiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	223 ± 4	119 ± 8	100 ± 6
TH65	*Psoralea bituminosa* **M**	Υπέργεια τμήματα	125 ± 6	99 ± 4	99 ± 2
TH66	*Lupinus albus* **M**	Υπέργεια τμήματα	113 ± 3	94 ± 1	91 ± 1
TH67	*Lupinus albus* **E**	Καρποί	163 ± 1	111 ± 5	106 ±10
TH68	*Lupinus albus* **M**	Καρποί	131 ± 2	109 ± 6	115 ±12
TH73	*Ceratonia siliqua*- **E**	Φύλλα και κλαδιά	151 ± 5	119 ± 4	123 ± 2
TH74	*Ceratonia siliqua* **-M**	Φύλλα και κλαδιά	131 ± 2	117 ± 3	115 ± 9
TH75	*Ceratonia siliqua*-**M**	Καρποί	133 ± 0	111 ± 1	112 ± 4
TH76	*Ceratonia siliqua*- **M**	χαρουπάλευρο	102 ± 2	102 ± 1	98 ± 3

Πίνακας 27: Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Lamiaceae, Rosaceae, Iridaceae, Rutaceae, Vitaceae, Rhamnaceae, Liliaceae κατά την διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Lamiaceae			**Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)**		
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**10 μg/ml**	**1 μg/ml**	**0.1 μg/ml**
TH1	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	87 ± 9	101 ± 4	101 ± 6
TH2	*Sideritis raeseri ssp. raeseri* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	95 ± 3	92 ± 7	100 ± 4
TH3	*Sideritis scardica* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	76 ± 3	88 ± 3	100 ± 3
TH4	*Sideritis scardica* **Et**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	78 ± 2	100 ± 6	94 ± 4
TH5	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **E**	Υπέργεια τμήματα	59 ± 4	93 ± 2	104 ± 9

TH6	*Origanum vulgare ssp. hirtum* **M**	Υπέργεια τμήματα	88 ± 5	91 ± 2	90 ± 2
TH7	*Mentha aquatica* **E**	Υπέργεια τμήματα	91 ± 3	105 ± 2	90 ± 4
TH8	*Mentha aquatica* **M**	Υπέργεια τμήματα	121 ± 7	93 ± 4	88 ± 4
TH21	*Mentha pulegium* **E**	Υπέργεια τμήματα	92 ± 13	117 ± 4	99 ± 4
TH9	*Mentha pulegium* **M**	Υπέργεια τμήματα	131 ± 2	95 ± 3	82 ± 1
TH10	*Mentha longifolia* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	118 ± 7	93 ± 7	93 ± 4
TH22	*Salvia officinalis* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	21± 0	108 ±4	87 ± 4
TH13	*Salvia officinalis* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	69 ± 11	89 ± 11	105 ± 8
TH14	*Salvia fruticosa* **E**	Υπέργεια τμήμα ανθισμένα	25 ± 1	111 ± 10	113 ± 1
TH23	*Salvia fruticosa* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	101 ± 3	103 ± 0	98 ± 4
	Οικογένεια Rosaceae				
TH11	*Rosa damascena*	Άνθη	100 ± 3	107 ± 3	97 ± 9
	Οικογένεια Iridaceae				
TH12	*Crocus sativus*	Άνθη	94 ± 2	95 ± 4	105 ± 3
	Οικογένεια Rutaceae				
TH48	*Citrus aurantium*	Φλούδα	101 ± 4	95 ±3	104 ± 4
TH49	*Citrus aurantium*	Φλούδα	74 ± 1	104 ± 5	93 ± 1
TH50	*Citrus aurantium*	Φλούδα	123 ± 8	100 ± 2	108 ± 3
TH51	*Citrus aurantium*	Φλούδα	80 ± 0	105 ± 5	106 ± 2
TH53	*Citrus aurantium* **E**	Φλούδα	115 ± 6	107 ± 5	100 ± 5
	Οικογένεια Vitaceae				
TH54	*Vitis vinifera*	Καρποί	98 ± 1	85 ± 3	70 ± 1
	Οικογένεια Rhamnaceae				
TH59	*Rhamnus alpinus* **E**	Υπέργεια τμήματα	118 ± 7	102 ± 3	105 ± 4
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	Υπέργεια τμήματα	116 ± 6	99 ± 3	101 ± 2
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **E**	Υπέργεια τμήματα	125 ± 6	106 ± 2	111 ± 5
TH61	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **M**	Υπέργεια τμήματα	107 ± 6	105 ± 3	105 ± 5
TH64	*Rhamnus sibthorpiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	118 ± 4	104 ± 6	112 ± 3
TH63	*Rhamnus sibthorpiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	127 ± 9	106 ± 3	115 ± 0
	Οικογένεια Liliaceae				
TH71	*Allium ampeloprasum* **E**	Φύλλα	107 ± 2	99 ± 3	105 ± 2
TH72	*Allium ampeloprasum* **M**	Φύλλα	109 ± 3	102 ± 1	109 ± 3

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του ελέγχου της οστεοβλαστικής δραστηριότητας των 75 παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 συμπεραίνουμε πως:

❖ Στη συγκέντρωση ελέγχου 10μg/ml, 48 εκχυλίσματα εκδήλωσαν επαγωγή μεγαλύτερη από αυτή των διαφοροποιητικών παραγόντων (64% επί του συνόλου), 34 εκ των οποίων προέρχονται από την οικογένεια Leguminosae. Σημειώνεται πως 36 από τα δραστικά εκχυλίσματα προκάλεσαν επαγωγή μεγαλύτερη ή ίση της E_2 (49% επί του συνόλου), με τα 27 να προέρχονται από την οικογένεια των ψυχανθών.

❖ Στη συγκέντρωση 1 μg/ml, 46 εκχυλίσματα προήγαγαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση με τα 8 να σημειώνουν δράση καλύτερη ή ίση της E_2 και με την πλειοψηφία των εκχυλισμάτων να ανήκουν και πάλι στην οικογένεια Leguminosae.

❖ Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως 36 εκχυλίσματα κατάφεραν να διατηρήσουν την επαγωγική τους επίδραση και στη συγκέντρωση 0.1 μg/ml ενώ 2 από αυτά να εμφανίζονται εξ' ίσου ή περισσότερο δραστικά της οιστραδιόλης.

❖ Τα δραστικότερα εκχυλίσματα ανήκουν στα δύο είδη του γένους *Chamaecytisus*, σε όλα τα είδη του γένους *Rhamnus* που μελετήθηκαν, καθώς και τα είδη *Cytisus villosus, Teline monspessulana, Hippocrepis comosa, Glycyrrhiza glabra, Genista hassertiana, Lupinus albus, Ceratonia siliqua, Psoralea bituminosa*..

❖ Από τα 48 εκχυλίσματα που προήγαγαν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 στη συγκέντρωση ελέγχου 10 μg/ml τα 13 χαρακτηρίστηκαν και ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων τόσο στα κύτταρα Ishikawa, όσο και στα MCF-7 ενώ τα υπόλοιπα παρουσίασαν ασθενή ή καθόλου οιστρογόνο δράση. Συγκεκριμένα, από τα 36 εκχυλίσματα με υψηλή ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών (≥E2) σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων χαρακτηρίστηκαν 10 από αυτά στα κύτταρα Ishikawa και 11 στα MCF-7.

Στηριζόμενοι λοιπόν στα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρωταρχική βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων σχετικά με την επίδρασή τους στην οστεοβλαστική δραστηριότητα, σε συνδυασμό πάντα με την αξιολόγηση της οιστρογόνου δράσης τους και του φυτοχημικού τους προφίλ, καταλήξαμε στα κάτωθι εκχυλίσματα/φυτικά είδη, τα οποία αξιολογήθηκαν περαιτέρω:

✓ Στην περίπτωση του ***Dorycnium hirsutum*** και τα δύο εκχυλίσματα φάνηκαν να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, ενώ δεν εκδήλωσαν οιστρογονικότητα σε καμία κυτταρική σειρά. Μάλιστα, το μεθανολικό εκχύλισμα (TH17) στη συγκέντρωση 10 μg/ml εκδήλωσε επαγωγή της έκφρασης της AlkP της τάξεως του 114% (ανάλογη της E_2 σε συγκέντρωση10 nM) και σε συνδυασμό με την προκαταρτική φυτοχημική του αξιολόγηση, που ανέδειξε ισχυρή παρουσία φλαβονοειδών ουσιών, επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

✓ Το επόμενο εκχύλισμα, το οποίο επιλέχθηκε για να μελετηθεί φυτοχημικά, ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του ***Cytisus villosus*** (TH20). Όπως έχει αναφερθεί τα γένη *Cytisus* και *Chamaecytisus* χαρακτηρίζονται από κοινούς βασικούς μεταβολίτες, γεγονός που συνάδει και με τα αποτελέσματα της βιολογικής αξιολόγησής τους. Όλα τα εκχυλίσματα των ειδών *Cytisus villosus*, *Chamaecytisus triflorus* και *Chamaecytisus austriacus* κρίθηκαν ως ικανοί επαγωγείς της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, με το μεθανολικό εκχύλισμα του *Cytisus villosus* να διατηρεί τη δράση του και στη συγκέντρωση 0.1 μg/ml. Λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα της προκαταρτικής φυτοχημικής αξιολόγησης, καθώς και το γεγονός πως

για το συγκεκριμένο είδος δεν έχει αναφερθεί καμία προγενέστερη μελέτη που να σχετίζεται με τις πιθανές οστεοπροστατευτικές και οιστρογονικές ιδιότητές του, επιλέχθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών του και την αξιολόγηση των βιολογικών τους ιδιοτήτων.

- ✓ Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του ***Hippocrepis comosa*** (TH35) παρουσίασε ισχυρή επαγωγή της έκφρασης της AlkP στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών σε ποσοστό 158%, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή οστεοπροστατευτική δράση. Η προαναφερόμενη δραστικότητα σε συνδυασμό με την μικρή οιστρογονικότητα που εκδήλωσε, αλλά και το γεγονός πως το συγκεκριμένο είδος δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα τόσο φυτοχημικά όσο και ως προς τις βιολογικές του ιδιότητες, συνετέλεσε στην επιλογή του για περαιτέρω μελέτη.
- ✓ Τα επόμενα φυτικά είδη που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη ήταν η ***Psoralea bituminosa*** και το ***Lupinus albus.*** Και στις δύο περιπτώσεις τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων (TH65, 66) προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Το εκχύλισμα TH65 της *Psoralea bituminosa* εκδήλωσε ασθενή οιστρογονικότητα στην σειρά Ishikawa, ενώ στην περίπτωση του *Lupinus albus* σημειώθηκε ισχυρή οιστρογόνο δράση, γεγονός που συνάδει με την παραδοσιακή χρήση του φυτού για την αντιμετώπιση διάφορων γυναικολογικών παθήσεων. Από τα τρία εκχυλίσματα του *Lupinus album* που αξιολογήθηκαν, επιλέχθηκε το TH66 λόγω μεγαλύτερου φυτοχημικού ενδιαφέροντος. Την επιλογή των προαναφερόμενων ειδών ενίσχυσαν φυτοχημικές αναφορές ως προς τους περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες και την εκδήλωση οιστρογονικότητας. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί και η παραδοσιακή χρήση της *Psoralea coryfolia* (συγγενές είδος της *P. bituminosa*) στην κινεζική θεραπευτική για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης.
- ✓ Το επόμενο φυτικό είδος που μελετήθηκε περαιτέρω είναι η ***Ceratonia siliqua*** και πιο συγκεκριμένα το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της (TH74), όπως επίσης και το χαρουπάλευρο (TH76). Ο έλεγχος της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης όλων των εκχυλισμάτων (υπέργειων τμημάτων και καρπών) του είδους τα ανέδειξε ως ικανούς διαφοροποιητικούς παράγοντες των MC3T3-E1, ενώ παράλληλα εμφάνισαν μηδαμινή οιστρογονικότητα και στις δύο μελετώμενες κυτταρικές σειρές. Παρά το γεγονός ότι το εν λόγω φυτοχημικό είδος έχει μελετηθεί στο παρελθόν, με βάση τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές συσχέτισής του με πιθανή οστεοπροστατευτική δράση. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πρόκειται για ένα εδώδιμο είδος ευρείας εφαρμογής και κατανάλωσης, γεγονός που θα μπορούσε να ενισχύσει τη χρήση του ως δυνητικά οστεοπροστατευτικό παράγοντα. Επιπλέον, ο προκαταρκτικός φυτοχημικός έλεγχος έδειξε πως όλα τα εκχυλίσματα περιέχουν κοινούς βασικούς μεταβολίτες, με το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων να εμφανίζεται ελαφρώς πλουσιότερο (βλ. § 3.1) και αυτός ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκε για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη. Το χαρουπάλευρο

επιλέχθηκε για την *in vivo* μελέτη σε μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων αρουραίων, καθώς αποτελεί έναν πολύ κοινό διατροφικό παράγοντα, ο οποίος προέρχεται από τους καρπούς του φυτού και έχει ανάλογο φυτοχημικό προφίλ.

- ✓ Οι ρίζες του είδους ***Glycyrrhiza glabra*** παρουσιάζουν ιδιαίτερα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων και εθνοφαρμακολογικών χρήσεων. Παλαιότερες φυτοχημικές μελέτες του είδους έχουν αναδείξει την ύπαρξη μεταβολιτών με οστεοπροστατευτικές ιδιότητες, σε συνδυασμό με τη συγχορήγηση του εκχυλίσματος της γλυκύρριζας με άλλα φυτικά εκχυλίσματα στην κινεζική ιατρική για τη θεραπεία οστικών παθήσεων, μας οδήγησε στην *in vivo* αξιολόγησή του σε μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων αρουραίων.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσίασαν όλα τα εκχυλίσματα του γένους ***Rhamnus*** (TH59-64) που μελετήθηκαν, καθώς χαρακτηρίστηκαν ως ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέχθηκαν. Επίσης, με εξαίρεση το *Rhamnus alpinus,* δεν εκδήλωσαν οιστρογονικότητα, ενώ επιπλέον δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη φυτοχημική μελέτη και τη βιολογική αξιολόγηση των ειδών *R. lycioides* και *R. sibthorpiana.*

3.2.1.4 Προσδιορισμός της ικανότητας των επιλεγμένων εκχυλισμάτων να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση

Το επόμενο στάδιο ελέγχου ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας των επιλεγμένων εκχυλισμάτων να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7, τα οποία είναι λευχαιμικά μονοκύτταρα ποντικού, τα οποία παρουσία της πρωτεΐνης RANKL μπορούν να διαφοροποιούνται σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες, ικανούς να εκφράζουν Όξινη Φωσφατάση Ανθεκτική στο Τρυγικό (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP).

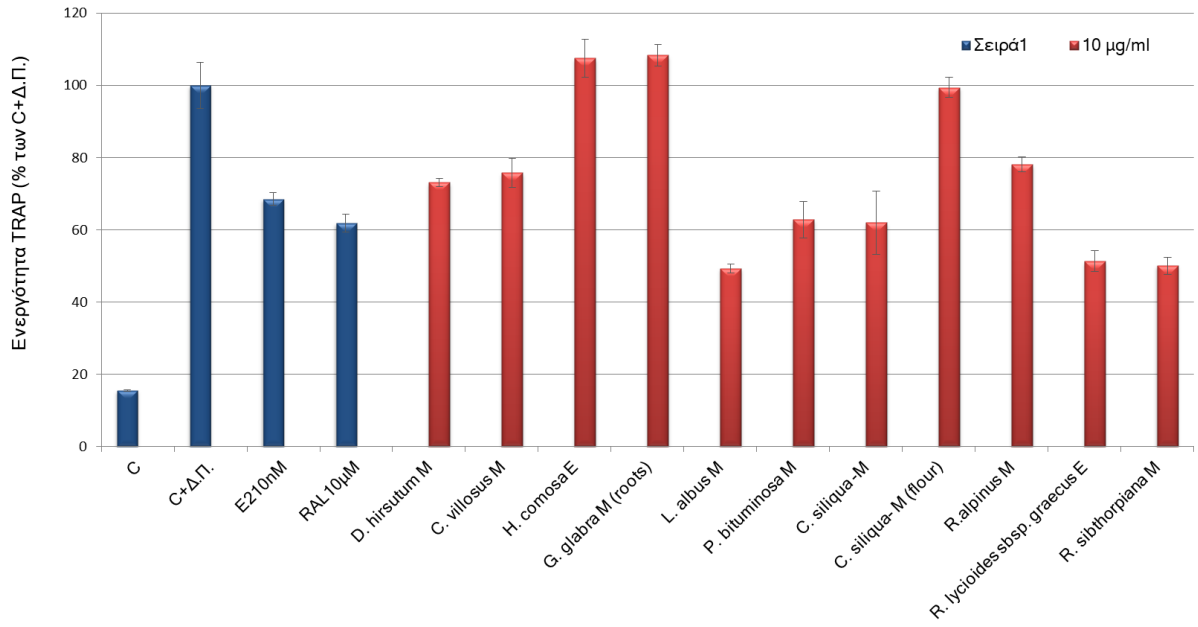
Τα κύτταρα επωάζονται παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων και των δειγμάτων για 4 ημέρες και η οστεοκλαστογένεση πιστοποιείται μετά από χρώση με Naphthol AS. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης της TRAP, πραγματοποιείται με μέτρηση της απορρόφησης του παραγόμενου χρωμογόνου στα 405 nm, έπειτα από λύση των κυττάρων παρουσία τρυγικού οξέος και προσθήκη φωσφορικού εστέρα της νιτροφαινόλης (p-nitrophenyl phosphate), ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (10 nM) και η ραλοξιφαίνη (10 μM) και διαπιστώθηκε η κατασταλτική επίδραση τόσο της ραλοξιφαίνης, όσο και της οιστραδιόλης στην επαγόμενη από την κυτταροκίνη RANKL έκφραση της TRAP.

Τα 14 εκχυλίσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την επαγόμενη από την κυτταροκίνη RANKL έκφραση της TRAP σε συγκέντρωση 10 μg/ml και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τις εκατό ποσοστό της έκφρασης TRAP στο υλικό διαφοροποίησης (RANKL 50 ng/ml).

Πίνακας 28: Επαγωγή της έκφρασης Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) των εκχυλισμάτων της οικ. Leguminosae στα κύτταρα RAW264.7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης των Διαφοροποιητικών Παραγόντων (Δ.Π.) (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικογένεια Leguminosae			Επαγωγή της έκφρασης TRAP (% των Δ.Π.)
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ-ΔΙΑΛΥΤΗΣ**	**ΔΡΟΓΗ**	**1 μg/ml**
TH17	*Dorycnium hirsutum* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	73 ± 1
TH20	*Cytisus villosus* **M**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	76 ± 4
TH35	*Hippocrepis comosa* **E**	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	108 ± 5
TH56	*Glycyrrhiza glabra* **M**	Ρίζες	108 ± 3
TH65	*Psoralea bituminosa* **M**	Υπέργεια τμήματα	63 ± 5
TH66	*Lupinus albus* **M**	Υπέργεια τμήματα	50 ± 1
TH74	*Ceratonia siliqua* **-M**	Φύλλα και κλαδιά	62 ± 9
TH76	*Ceratonia siliqua-* **M**	χαρουπάλευρο	99 ± 3
	Οικογένεια Rhamnacae		
TH59	*Rhamnus alpinus* **E**	Υπέργεια τμήματα	65 ± 6
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	Υπέργεια τμήματα	78 ± 2
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **E**	Υπέργεια τμήματα	51 ± 3
TH61	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **M**	Υπέργεια τμήματα	58 ± 6
TH64	*Rhamnus sibthorpiana* **E**	Υπέργεια τμήματα	67 ± 8
TH63	*Rhamnus sibthorpiana* **M**	Υπέργεια τμήματα	50 ± 2

Όπως φαίνεται στην εικόνα 33 και τον Πίνακα 28 η πλειοψηφία των επιλεγμένων εκχυλισμάτων φάνηκαν να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση, με εξαίρεση το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Hippocrepis comosa* (TH35) και το μεθανολικό εκχυλίσμα του είδους *Glycyrrhiza glabra* (TH56).



Εικόνα 33: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο δειγμάτων(10 μg/ml). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Dorycnium hirsutum* (TH17) και *Cytisus villosus* (TH20) σημείωσαν καταστολή της οστεοκλαστογένεσης σε ποσοστό περίπου 25%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως όλα τα επιλεγμένα εκχυλίσματα του γένους *Rhamnus* φάνηκαν ικανά να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων RAW264.7 σε οστεοκλάστες σε ποσοστά από 20-50%, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Rhamnus sibthorpiana* (TH63) και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus* (TH62) αποδείχτηκαν τα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη δράση. Τέλος, εξ' ίσου ικανά να καταστέλλουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση φάνηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Psoralea bituminosa* (TH65), *Lupinus albus* (TH66) και *Ceratonia siliqua* (TH74).

Συγκρίνοντας και συνυπολογίζοντας τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων βιολογικών ελέγχων (Πίνακας 29) σε όλες τις κυτταρικές σειρές (Ishikawa/MCF-7, MC3T3-E1 και RAW264.7) καταλήξαμε στην επιλογή 10 εκχυλισμάτων για περαιτέρω διερεύνηση.

Αναλυτικότερα, το εκχύλισμα TH17 του είδους ***Dorycnium hirsutum*** εκδήλωσε επαγωγή της έκφρασης της AlkP των MC3T3-E1 σε ποσοστό 114% (ανάλογο της $E_2$10nM) και σε συνδυασμό με την καταστολή της ενεργότητας ττης TRAP κατά περίπου 25% αλλά και την απουσία οιστρογονικότητας, αποτέλεσε υποσχόμενη πηγή πηγή για την ανεύρεση οστεοπροστατευτικών παραγόντων. Το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους ***Cytisus villosus*** (TH20), συνδυάζει την επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με την καταστολή της οστεοκλαστογένεσης, ενώ η εκδήλωση οιστρογονικότητας παραπέμπει στην πιθανή εκδήλωση SERM δραστικότητας τόσο του εκχυλίσματος, όσο και των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών του. Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα τουείδους ***Hippocrepis comosa*** (TH35), ενώ δεν φάνηκε να επιδρά στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών παρουσίασε ισχυρή επαγωγική επίδραση στην έκφραση της AlkP στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 (158%), η οποία σε συνδυασμό με την μικρή οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa το κατλεστησε υποψήφιο για περαιτέρω διερεύνηση. Το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους ***Psoralea bituminosa*** (TH65) σημείωσε καταστολή της οστεοκλαστογένεσης στην κυτταρική σειρά RAW264.7 της τάξεως του 40%, ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών μεγαλύτερη από την E_2 (125%), και χαρακτηρίστηκε από απουσία οιστρογονικότητας. Το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους ***Lupinus albus*** (TH66) χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός και μερικός αγωνιστής στις σειρές Ishikawa και MCF-7, αντίστοιχα. Επίσης, προκάλεσε επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (κατά 113%) και την υψηλότερη ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης (κατά 51%). Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του είδους ***Ceratonia siliqua*** (TH74,76), όπως προαναφέρθηκε, παρατηρήθηκε προαγωγή της οστεοβλαστογένεσης και μηδαμινή οιστρογονικότητα, ενώ το εκχύλισμα TH74 αποδείχτηκε ικανό να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση κατά περίπου 40%. Οι προαναφερόμενες ιδιότητες ήταν καθοριστικές για την επιλογή του εκχυλίσματος TH74 για περαιτέρω φυτοχημική διερεύνηση,

ενώ το εκχύλισμα TH76 λόγω του υψηλού διατροφικού του ενδιαφέροντος χορηγήθηκε σε *in vivo* μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων. Το εκχύλισμα των ριζών του είδους ***Glycyrrhiza glabra*** παρουσίασε αξιοσημείωτη βιολογική δραστικότητα. Επιλέχθηκε ως δυνητικά οστεοπροστατευτικός παράγοντας, καθώς ενίσχυσε σημαντικά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (184%) και παρουσίασε μερικό αγωνισμό στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Τέλος, αποφασίστηκε η διερεύνηση των δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος τουοξικού αιθυλεστέρα του είδους ***Rhamnus lycioides*** **sbsp.** ***graecus*** (TH62) καθώς έδειξε ότι επάγει τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 και καταστέλλει τη διαφοροποίηση των μακροφάγων RAW264.7 σε οστεοκλάστες, ενώ παρουσίασε οριακή οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ανάλογες ήταν και οι παρατηρήσεις για το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους ***Rhamnus sibthorpiana*** (TH63), γεγονός που κρίνεται ως φυσιολογικό δεδομένης της ομοιότητας του φυτοχημικού τους προφίλ. Για περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκε και το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους ***Rhamnus alpinus*** (TH60), καθώς εκδήλωσε αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες και φάνηκε να περιέχει μεταβολίτες που απουσίαζαν από τα υπόλοιπα είδη του γένους.

Πίνακας 29: Συνοπτικός πίνακας των επιλεγμένων δραστικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα MC3T3, στα κύτταρα Ishikawa, MCF-7 και RAW264.7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

		MC3T3-E1 Έκφρασης AlkP (% των Δ.Π.)	**RAW264.7 Έκφρασης TRAP (% των Δ.Π.)**	**ISHIKAWA Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM)**	**MCF-7 Κυτ. Πολ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM)**
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ**	**10 g/ml**	**10 g/ml**	**1 g/ml**	**1 g/ml**
TH17	*Dorycnium hirsutum* **M**	114 ± 5	73 ± 1	M	M
TH20	*Cytisus villosus* **M**	135 ± 16	76 ± 4	F (74 ± 0)	P (62 ± 6)
TH35	*Hippocrepis comosa* **E**	158 ± 11	108 ± 5	W (29 ± 2)	P (47 ± 1)
TH56	*Glycyrrhiza glabra* **M**	184 ± 23	108 ± 3	P (46 ± 0)	P (60 ± 10)
TH65	*Psoralea bituminosa* **M**	125 ± 6	63 ± 5	W (19 ± 1)	M
TH66	*Lupinus albus* **M**	113 ± 3	49 ± 1	F (71 ± 4)	P (48 ± 6)
TH74	*Ceratonia siliqua* **-M**	131 ± 2	62 ± 9	M	M
TH76	*Ceratonia siliqua*- **M**	102 ± 2	99 ± 3	M	M
TH60	*Rhamnus alpinus* **M**	116 ± 6	78 ± 2	P (59 ± 17)	F (88 ± 1)
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus* **E**	125 ± 6	51 ± 3	M	M
TH63	*Rhamnus sibthorpiana* **M**	127 ± 9	50 ± 2	M	M

4 Φυτοχημική μελέτη εκχυλισμάτων

4.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Από το όρος Πατέρας στη Βορειοδυτική Αττική, συλλέχθηκαν τα υπέργεια τμήματα καθώς και οι καρποί του φυτού *Dorycnium hirsutum* (οικ. Fabaceae), ενώ τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Cytisus villosus* (οικ. Fabaceae) καθώς και του φυτού *Hippocrepis comosa* (οικ. Fabaceae) συλλέχθηκαν από το όρος Δίρφυς στην περιοχή της Εύβοιας.

Dorycnium hirsutum

Cytisus villosus

Hippocrepis comosa

Τα υπέργεια τμήματα της *Ceratonia siliqua* (οικ. Fabaceae) καθώς και του φυτού Rhamnus lycioides sbsp. graecus (οικ. Rhamnaceae) συλλέχθηκαν από την περιοχή Ζαρός κοντά στο Ηράκλειο της Κρήτης, ενώ οι ρίζες του φυτού *Glycyrrhiza glabra* (οικ. Fabaceae) συλλέχθηκαν στην Κεφαλλονιά. Το φυτό *Psoralea bituminosa* (οικ. Fabaceae) συλλέχθηκε στην περιοχή της Λιβαδειάς ενώ τα υπέργεια τμήματα του *Lupinus albus* (οικ. Fabaceae) συλλέχθηκαν στην περιοχή γύρω από το μοναστήρι της Καισαριανής στην Αττική.

Ceratonia siliqua

Glycyrrhiza glabra

Psoralea bituminosa

Lupinus albus

Τέλος, το *Rhamnus alpinus* (οικ. Rhamnaceae) συλλέχθηκε στο όρος Γκιώνα στη Στερεά Ελλάδα, ενώ το είδος *Rhamnus sibthorpiana* (οικ. Rhamnaceae) συλλέχθηκε στο βουνό Κουλοχέρα στη Νοτιοδυτική Λακωνία

Rhamnus alpinus

Rhamnus sibthorpiana

Rhamnus lycioides sbsp. graecus

Μετά τη συλλογή του φυτικού υλικού, ακολούθησε η ξήρανση σε σκιερό και καλά αεριζόμενο χώρο για 30 μέρες περίπου και η κονιοποίησή του, με σκοπό τη διευκόλυνση της εκχύλισης και επομένως της παραλαβής των περιεχόμενων μεταβολιτών.

4.2 Παρασκευή εκχυλισμάτων

Στις περιπτώσεις των εκχυλισμάτων που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, προκειμένου να είναι εφικτή τόσο η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, όσο και η χορήγηση των τελικώς επιλεγμένων παρασκευασμάτων in vivo σε πειραματόζωα, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή τους σε μεγαλύτερη κλίμακα με τη βοήθεια υπερήχων. Αναλυτικότερα, 200g του εκάστοτε φυτικού υλικού αναμίχθηκαν με το διαλύτη επιλογής (οξικό αιθυλεστέρα ή μεθανόλη) σε αναλογία 7:1 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση χωρίς θέρμανση σε υδατόλουτρο υπερήχων (Elma S 100H Elmasonic) σε τρεις κύκλους των 30 λεπτών ο καθένας. Το φυτικό υλικό απομακρύνθηκε με διήθηση, ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) και ζύγιση του τελικού ξηρού εκχυλίσματος.

Αξίζει να σημειωθεί πως συγκριτικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδος πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με την τεχνική A.S.E και εκείνων με τη χρήση υπερήχων και επιβεβαιώθηκε ότι έχουν παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ. Παρακάτω συνοψίζονται οι αποδόσεις των παραγόμενων εκχυλισμάτων.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΔΡΟΓΗ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)
TH17	*Dorycnium hirsutum*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα και καρποί	MeOH	10.3
TH20	*Cytisus villosus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	12.3
TH35	*Hippocrepis comosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.1
TH60	*Rhamnus alpinus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	9.2
TH62	*Rhamnus lycioides sbsp. graecus*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	3.2
TH63	*Rhamnus sibthorpiana*	Rhamnaceae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	8.9
TH65	*Psoralea bituminosa*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	7.7
TH66	*Lupinus albus*	Leguminosae	Υπέργεια τμήματα	MeOH	6.4
TH74	*Ceratonia siliqua*	Leguminosae	Φύλλα και κλαδιά	MeOH	13.1

4.3 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών

Τα επιλεγμένα φυτικά εκχυλίσματα κλασματώθηκαν με χρήση της τεχνικής FCPC, με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Αναλόγως με την πολυπλοκότητα και το ποιοτικό προφίλ του εκάστοτε εκχυλίσματος, η κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση είτε ενός μόνο διφασικού συστήματος διαλυτών (μέθοδος ισοκρατικής έκλουσης) είτε αλληλουχίας διφασικών συστημάτων με συνεχώς αυξανόμενη πολικότητα κινητής φάσης (μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης). Τα προκύπτοντα κλάσματα μελετήθηκαν περαιτέρω με χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20), υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση “silica flash” και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

4.3.1 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium hirsutum* (DHM)

Ο προκαταρτικός χρωματογραφικός έλεγχος λεπτής στιβάδας έδειξε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα των υπεργείων τμημάτων του είδους *Dorycnium hirsutum* περιέχει σε μεγάλο ποσοστό φλαβονοειδή και φαινολικές ενώσεις ποικίλης πολικότητας. Ύστερα από την πραγματοποίηση ελέγχου προσομοίωσης του διαχωρισμού με διάφορα διφασικά συστήματα διαλυτών, προτιμήθηκε η χρήση του συστήματος c-Hex/EtOAc/EtOH/H_2O 2/8/2/8. Πιο συγκεκριμένα, έλεγχος κατανομής των ουσιών στις δύο φάσεις πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα 10 mg αρχικού εκχυλίσματος και των διαλυτών του διφασικού συστήματος μέχρι όγκου 4 ml. Ακολούθησε έντονη ανακίνηση προκειμένου να διαλυθεί το εκχύλισμα και να κατανεμηθούν οι ουσίες, στις δύο φάσεις. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του χημικού περιεχομένου τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και διαπιστώθηκε η ικανοποιητική κατανομή των ουσιών-στόχων.

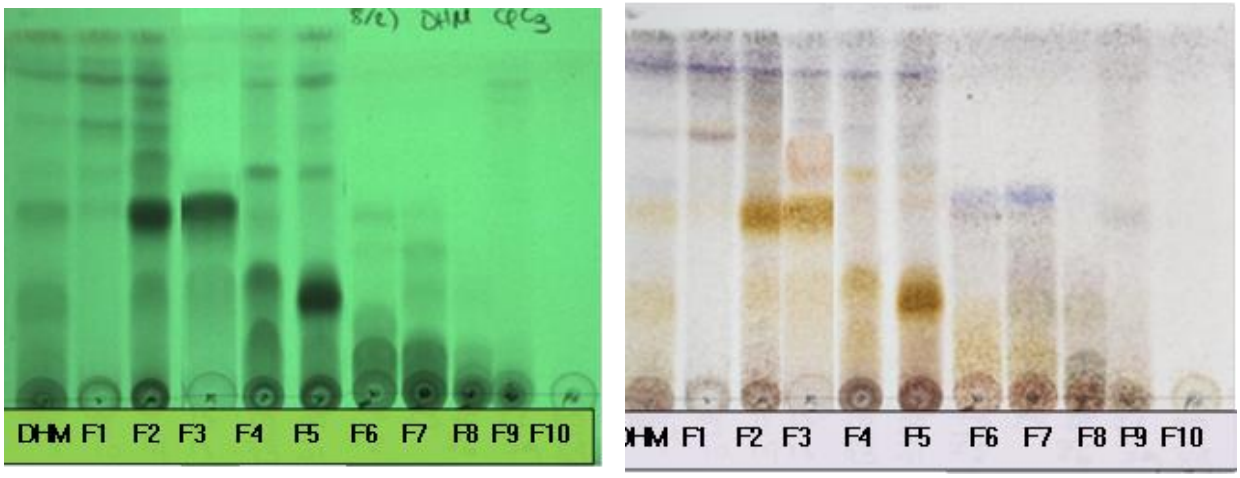
Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 200 ml. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 500 mg, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία περίπου 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο ‘loop’ της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 1100 στροφές/min και ροή 5 ml/min, και μετά την εξισορρόπηση του συστήματος (σημείο στο οποίο η φάση που εισέρχεται στη στήλη εξέρχεται κιόλας διατηρώντας την αναλογία των δύο φάσεων σταθερή) ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή των κλασμάτων καθορισμένου όγκου.

Παραλάβαμε 73 κλάσματα των 8 ml, έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες, οπότε και έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Η ροή της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού ήταν 5 ml/min σε ascending mode και η περιστροφή 1100 rpm.

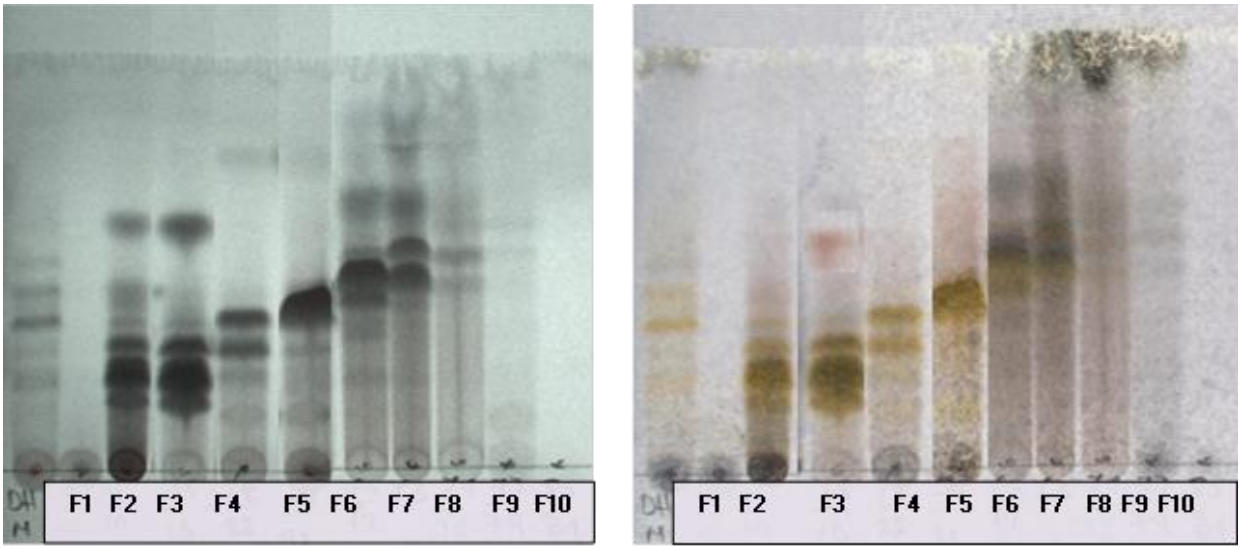
Προέκυψαν συνολικά 101 κλάσματα εκ των οποίων τα 73 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν 28 επιπλέον κλάσματα. Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH και σε αναλογίες 99/1, 95/5, 90/10 και 80/20 πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 10 κλάσματα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 30. Στην εικόνα 34 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH (80/20) και με TLC αντίστροφης φάσης σε H_2O/ACN (75/25+1%F.A.) στην εικόνα 35.

Πίνακας 30: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος *Dorycnium hirsutum*

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
DHM-F1	9-10	38.2
DHM-F2	11-14	12.0
DHM-F3	15-18	12.1
DHM-F4	18-23	7.7
DHM-F5	24-41	8.0
DHM-F6	49-53	8.6
DHM-F7	73	9.3
DHM-F8	74-76	176.0
DHM-F9	77-79	22.0
DHM-F10	80-84	2.3



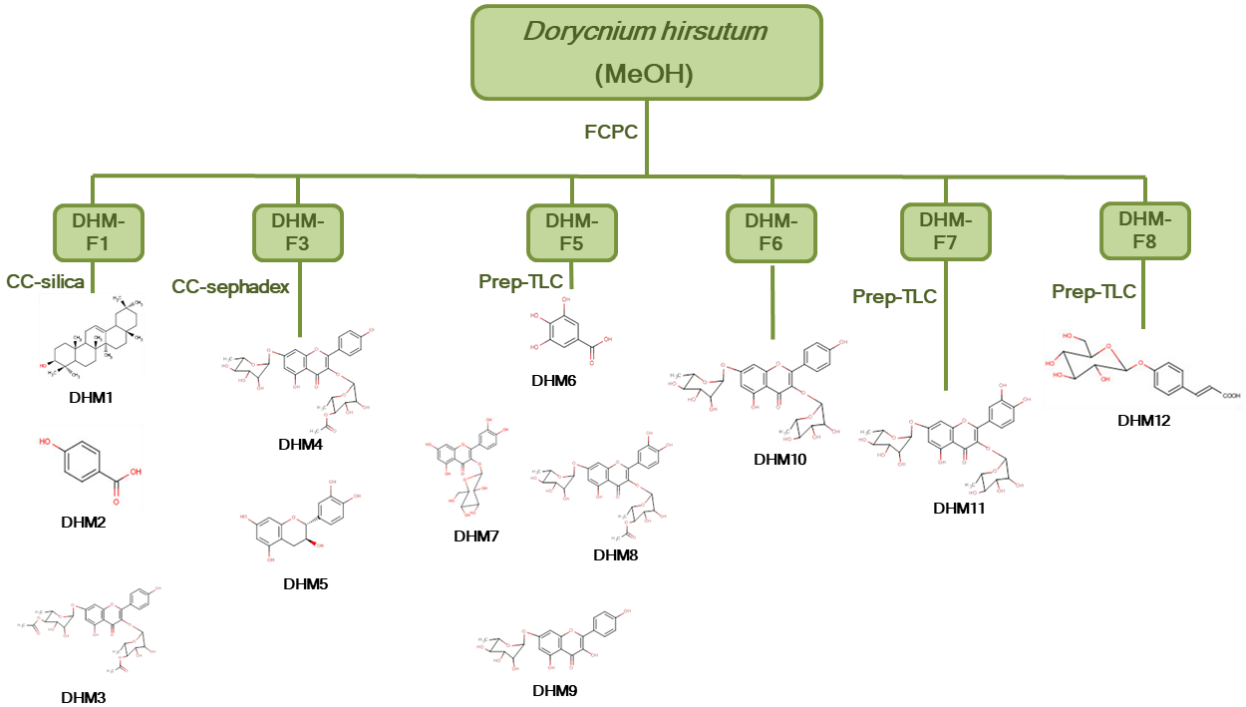
Εικόνα 34: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του DHM σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (80/20)



Εικόνα 35: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του DHM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (75/25+1%F.A.)

4.3.1.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών του DHM

Μεταξύ των 10 κλασμάτων, τα οποία προέκυψαν μετά από επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Dorycnium hirsutum* (DHM) με την τεχνική του FCPC, ένα περιείχε σε σχεδόν καθαρή μορφή μία ένωση, ενώ από την περαιτέρω μελέτη 5 κλασμάτων με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές προέκυψαν άλλες 11 ενώσεις. Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία παραλαβής των μεταβολιτών του DHM.



Σχήμα 2: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Dorycnium hirsutum* (DHM)

4.3.1.1.1 Μελέτη του κλάσματος DHM-F1

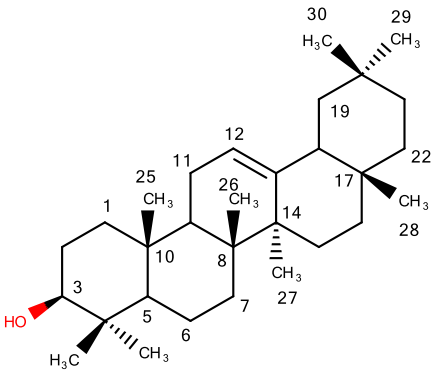
Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα DHM-F1 περιέχει σχετικά άπολους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενοειδών. Έτσι, για την επεξεργασία του χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης (CL_chromatography), με πληρωτικό υλικό silica gel flash και κινητή φάση μίγμα διαλυτών κυκλοεξάνιο (c-Hex) και οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

❖ **β-Αμυρίνη (DHM1)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC όλων των κλασμάτων του προαναφερόμενου χρωματογραφικού διαχωρισμού έδειξε ότι τα κλάσματα CL-3 και CL-4 περιείχαν από ένα κύριο μεταβολίτη (DHM1 και DHM2, αντίστοιχα). Η ένωση DHM1 δεν παρουσιάσε απορρόφηση στα 254 nm, μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης εμφάνισε μπλε χρώση και με τη βοήθεια των NMR φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως *β*-αμυρίνη. Πιο συγκεκριμένα, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος είναι χαρακτηριστική η παρουσία 8 απλών κορυφών (*δ* 1.13, 0.96, 0.94, 0.87, 0.87, 0.83, 0.79, 0.78) που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν στα 8 μεθύλια του μεταβολίτη. Το μεθινικό πρωτόνιο της θέσης 3 συντονίζεται στα 3.22 ppm ως dd κορυφή, λόγω σύζευξης με τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 2, ενώ ο αντίστοιχος οξυγονωμένος άνθρακας εμφανίζεται στα 79.1 ppm. Στα 5.17 ppm συναντάμε το πρωτόνιο H-12 του διπλού δεσμού ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 3.6 Hz και άνθρακα στα 122.7 ppm. Με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη που αποτυπώνονται στον πίνακα 31, είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Wang, *et al.*, 2017).

Πίνακας 31: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM1

DHM1 ($CDCl_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR *δ* σε ppm
1	1.46 (1H, m) / 1.21 (1H, m)	38.7
2	1.72 (1H, m) / 1.47 (1H, m)	27.4
3	3.22 (1H, dd, 10.8 / 4.2)	79.1

4	-	38.9
5	0.78 (1H, m)	55.3
6	1.48 (1H, m) / 1.52 (1H, m)	18.5
7	1.02 (1H, m) / 1.19 (1H, m)	32.8
8	-	39.9
9	1.45 (1H, m)	47.8
10	-	37.0
11	1.79 (1H, m) / 1.34 (1H, m)	23.6
12	5.17 (1H, t, 3.6)	121.9
13	-	145.4
14	-	41.9
15	1.13 (1H, m) / 1.38 (1H, m)	26.3
16	1.09 (1H, m) / 1.34 (1H, m)	27.1
17	-	32.6
18	2.03 (1H, dd, 12.0 / 4.0)	47.3
19	1.49 (1H, m) / 1.24 (1H, m)	46.9
20	-	31.2
21	1.46 (1H, m) / 1.22 (1H, m)	34.9
22	1.52 (1H, m) / 1.18 (1H, m)	37.3
23	0.78 (1H, s)	28.2
24	0.79 (1H, s)	15.8
25	0.94 (1H, s)	15.7
26	0.96 (1H, s)	16.9
27	1.13 (1H, s)	26.1
28	0.83 (1H, s)	28.5
29	0.87 (1H, s)	33.5
30	0.87 (1H, s)	23.8

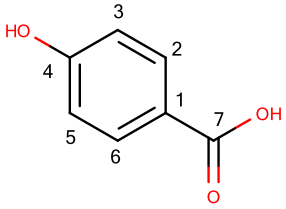
Πρόκειται για ένα τριτερπένιο που απαντάται σε πλήθος φυτικών ειδών, όπως είναι είδη των γενών *Nepeta* (Rehman, *et al.*, 2017), *Citrus* (Tahsin, *et al.*, 2017), *Salvia* (Bisio, *et al.*, 2016), *Vitex* (Kopa, *et al.,* 2016) και *Echinops* (Bouattour, *et al.*, 2017), ενώ σε αρκετές περιπτώσεις εντοπίζεται ως μίγμα με την *α*-αμυρίνη (Vázquez, *et al.*, 2012). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν είχε απομονωθεί από το γένος *Dorycnium,* ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν επισημανθεί οι αντιμικροβιακές, αντιβακτηριδιακές (Viswanathan, *et al.*, 2012) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της (Melo, *et al.*, 2010) (Holanda Pinto, *et al.*, 2008) (Shih, *et al.*, 2010).

- **p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (DHM2)**

Ο μεταβολίτης DHM2 ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και ταυτοποιήθηκε ως p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το οποίο μολονότι είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο δεν έχει αναπομονωθεί άλλη φορά μέχρι σήμερα από το γένος *Dorycnium*. Είναι κυρίως γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση (Velika, et al., 2012), ενώ οι εστέρες του είναι γνωστοί ως 'parabens' και χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά σε καλλυντικά προϊόντα (Soni, *et al.*, 2005). Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρήθηκαν δύο διπλές κορυφές (J = 8.8 Hz, *ortho* σύζευξη), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό p-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Στον πίνακα 32 αποτυπώνονται οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων και των πρωτονίων του μεταβολίτη DHM2, οι οποίες καθορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας (Wang, *et al.*, 2018).

Πίνακας 32: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM2

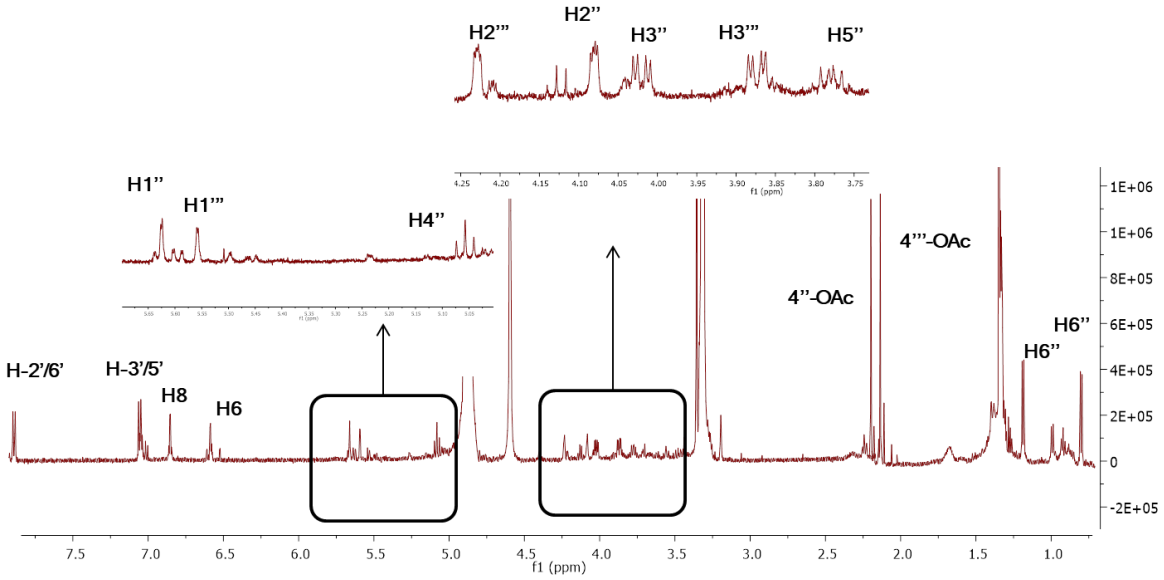
DHM2 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	122.8
2/6	7. 87 (2H, d, 8.8)	132.0
3/5	6.82 (2H,d, 8.8)	115.8
4	-	163.4
7	-	170.5

❖ 3,7- δι-*O* -(4-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)καιμπφερόλη (DHM3)

Το κλάσμα CL-10 φάνηκε να περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό έναν πολικότερο μεταβολίτη που παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από ψεκασμό με το διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης εμφάνισε κίτρινη καφέ χρώση. Ύστερα από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως 3,7-δι-*O*-(4-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)καιμπφερόλη, ενώ σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα από κάποια φυσική πηγή και επομένως αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν**.



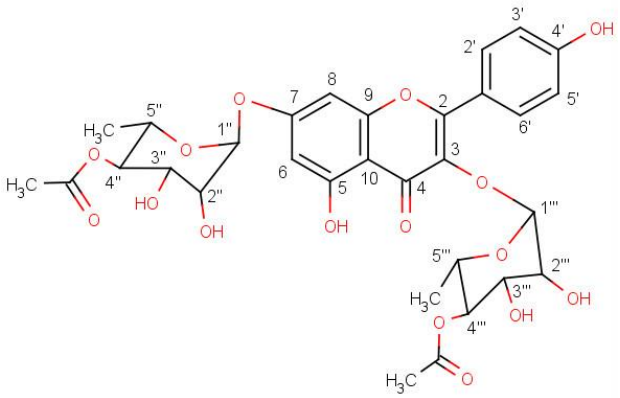
Εικόνα 36: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM3

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος (εικόνα 36) διακρίνουμε τις κορυφές των αρωματικών πρωτονίων της καιμπφερόλης (γενίνη ή άγλυκο τμήμα), ενώ στην σακχαριδική περιοχή (δ5.62 και 5.55) διακρίνουμε δύο κορυφές ανωμερικών πρωτονίων με σταθερά σύζευξης 1.7 Hz. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρια πρωτόνια στα 1.17 ppm και 0.81 ppm, συμπεράναμε ότι πρόκειται για δύο ραμνόσες. Με τη βοήθεια του φάσματος HMBC και συγκεκριμένα των συζεύξεων ανάμεσα στους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες (δ 163.7 και 135.7) και τα ανωμερικά πρωτόνια (δ 5.62 και 5.55) των

σακχαριδικών μονάδων, προσδιορίστηκαν οι θέσεις σύνδεσής τους στη γενίνη (θέση 7 και 3, αντίστοιχα). Επίσης, η χημική μετατόπιση των πρωτονίων H-6 (δ 6.53) και H-8 (δ 6.70) συνάδει με τη σύνδεση σακχαριδικής μονάδας στη θέση 7 της γενίνης. Τα υπόλοιπα πρωτόνια των ραμνοσών ταυτοποιήθηκαν με τη μελέτη του φάσματος COSY. Επιπρόσθετα, η ύπαρξη δύο απλών κορυφών που ολοκληρώνουν για τρια πρωτόνια στα 2.06 και 2.12 ppm φανερώνουν την παρουσία ακετυλοομάδων, καθώς εμφανίζουν σύζευξη ^{2}J με καρβονυλικούς άνθρακες σε δ 171.1, σύμφωνα με τα δεδομένα του φάσματος HMBC. Οι προαναφερόμενοι άνθρακες με τη σειρά τους παρουσιάζουν ^{3}J σύζευξεις με τα σακχαριδικά πρωτόνια H-4'' (δ 5.05) και H-4''' (δ 4.83), τα οποία εμφανίζονται σαφώς πιο αποθωρακισμένα από τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων, γεγονός που φανερώνει τη σύνδεση των ακετυλομάδων στη θέση 4 των δύο ραμνοσών. Η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης έγινε με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη αναφέρονται στον πίνακα 33.

Πίνακας 33: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM3

DHM3 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	159.9
3	-	135.7
4	-	179.9
5	-	163.0
6	6.53 (1H, d, 2.0)	100.4
7	-	163.7
8	6.70 (1H, d, 2.0)	95.7
9		157.8
10		107.6
1'	-	122.2
2'/6'	7.80 (2H, d, 8.8)	132.0
3'/5'	6.90 (2H, d, 8.8)	116.5
4'	-	161.9
	7-*O*-ραμνοπυρανόση	
1''	5.62 (1H, d, 1.7)	99.5
2''	4.08 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	70.3
3''	4.02 (1H, dd, 10.1 / 3.5)	68.7
4''	5.05 (1H, t, 10.1)	73.8
5''	3.79 (1H, m)	68.7
6''	1.17 (3H, d, 6.5)	17.8
	3-*O*-ραμνοπυρανόση	
1'''	5.55 (1H, d, 1.7)	102.4
2'''	4.23 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	70.7

3’’’	3.87 (1H, dd, 10.1 / 3.5)	68.7
4’’’	4.83 (*)	73.6
5’’’	3.30 (1H, m)	68.4
6’’’	0.81 (3H, d, 6.5)	17.5
4’’’-OAc	2.06 (3H,s)	20.9 171.1
4’’-OAc	2.12 (3H, s)	20.9 171.1

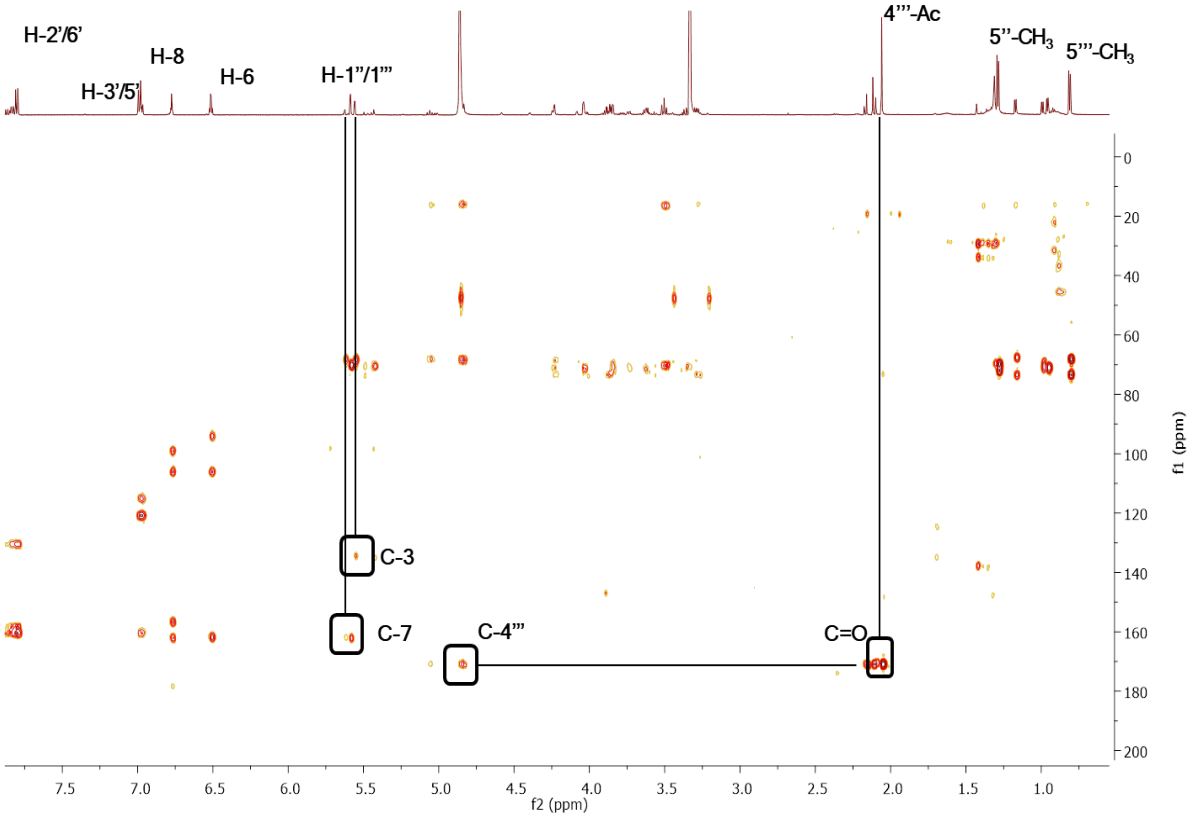
* Αλληλεπικάλυψη με το σήμα της υγρασίας του διαλύτη

4.3.1.1.2 Μελέτη του κλάσματος DHM-F3

Το κλάσμα DHM-F3 στη χρωματογραφία TLC φάνηκε να περιέχει δύο κύριους μεταβολίτες, οι οποίοι απορροφούσαν στα 254 nm και έδωσαν διαφορετική χρώση έπειτα από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με τη θειϊκή βανιλλίνη. Στη συνέχεια, 20 mg του κλάσματος επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν οι μεταβολίτες DHM4 και DHM5.

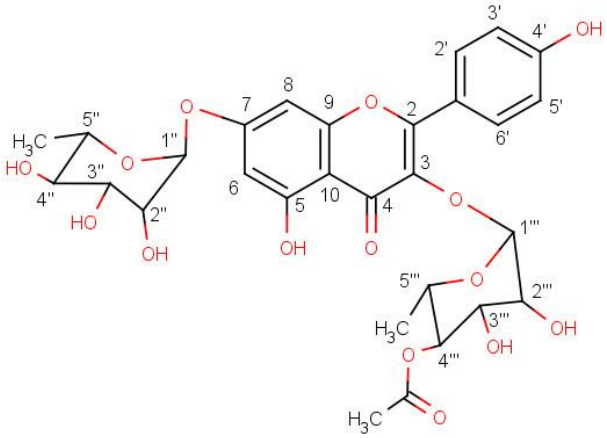
❖ **7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-3-*O*-(4-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)καιμπφερόλη (DHM4)**

Η έντονη απορρόφηση στο UV του μεταβολίτη DHM4 και η κίτρινη-καφέ χρώση που εμφάνισε έπειτα από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης, μας παρέπεμψε στην εικόνα του μεταβολίτη DHM3. Πράγματι, η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε πως πρόκειται για το μονοακετυλιωμένο ανάλογο του DHM3, ενώ η καθαρότητά του προσδιορίσθηκε σε 80% περίπου. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη DHM3. Διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στη χημική μετατόπιση του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης στη θέση 7 της καιμπφερόλης, το οποίο εμφανίζεται ελαφρώς πιο θωρακισμένο (δ 5.58 αντί για δ 5.62), ενώ σημαντική θωράκιση παρουσιάζει το H-4’’ του ίδιου σακχάρου καθώς απουσιάζει η ακετυλομάδα από τη συγκεκριμένη θέση. Από το φάσμα HMBC (εικόνα 37) παρατηρούμε τη ^{2}J σύζευξη των πρωτονίων της ακετυλόμάδας (δ 2.06) με το καρβονύλιο στα 171.0 ppm, το οποίο στη συνέχεια παρουσιάζει ^{3}J σύζευξη με το εμφανώς αποθωρακισμένο H-4’’’ (δ 4.83 ppm). Η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης έγινε με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη DHM4, τα οποία είναι σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Min, et al., 2001), εμφανίζονται στον πίνακα 34.



Εικόνα 37: Φάσμα ^{1H}-NMR και HMBC της ένωσης DHM4

Πίνακας 34: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM4

DHM4 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	-	159.9
3	-	135.7
4	-	179.9
5	-	163.0
6	6.53 (1H, d, 2.0)	100.4
7	-	163.7
8	6.70 (1H, d, 2.0)	95.7
9		157.8
10		107.6
1'	-	122.2
2'/6'	7.80 (2H, d, 8.8)	131.7
3'/5'	6.90 (2H, d, 8.8)	116.5

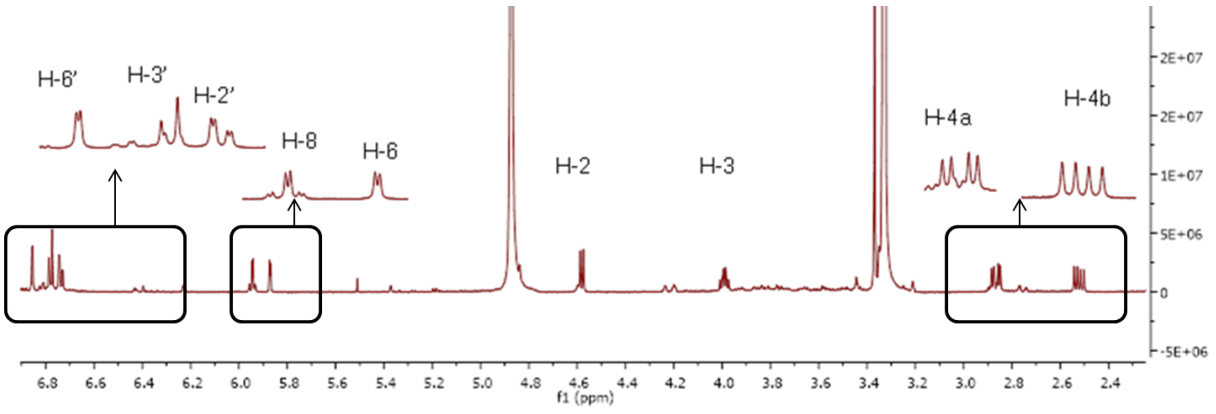
4’	-	161.9
	7-*O*-ραμνοπυρανόση	
1’’	5.58 (1H, d, 1.7)	99.5
2’’	4.03 (1H, m)	70.3
3’’	3.86 (1H, dd, 10.1 / 3.5)	71.7
4’’	3.50 (1H, t, 10.1)	72.5
5’’	3.63 (1H, m)	69.7
6’’	1.29 (3H, d, 6.5)	17.8
	3-*O*-ραμνοπυρανόση	
1’’’	5.55 (1H, d, 1.7)	102.4
2’’’	4.23 (1H, m)	70.7
3’’’	3.36 (1H, dd, 10.1 / 3.5)	71.0
4’’’	4.83 (*)	73.6
5’’’	3.29 (1H, m)	68.6
6’’’	0.81 (3H, d, 6.5)	17.5
4’’’-OAc	2.06 (3H,s)	20.9 171.0

*Αλληλεπικάλυψη με το σήμα της υγρασίας του διαλύτη

Η 7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-3-*O*-(4-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)καιμπφερόλη συναντάται στο γένος *Dorycnium* και έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *Dorycnium hirsutum* (Pistelli, *et al.*, 2006). Επίσης έχει απομονωθεί από τις ρίζες των φυτών *Matteuccia struthiopteris* (Li, *et al.*, 2015) και *Dryopteris crassirhizoma* (Min, *et al.*, 2001), δύο φυτικά είδη μεγάλης εθνοφαρμακολογικής σημασίας καθώς χρησιμοποιούνται στην κινεζική ιατρική για την πρόληψη και αντιμετώπιση των ιώσεων. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης αποτελεί αξιόλογο αναστολέα του ενζύμου λιποξυγενάση, ενώ έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιική δράση (Bo Li, 2015) (Pistelli, *et al.*, 2006) (Min, *et al.*, 2001).

❖ **Κατεχίνη (DHM5)**

Ο μεταβολίτης DHM5 παρουσίασε ασθενή απορρόφηση στο UV και κόκκινη χρώση έπειτα από ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης. Με χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την φλαβανόλη κατεχίνη, η οποία έχει ξαναπομονωθεί από το είδος *Dorycnim hirsutum* (Pistelli L., 2006).



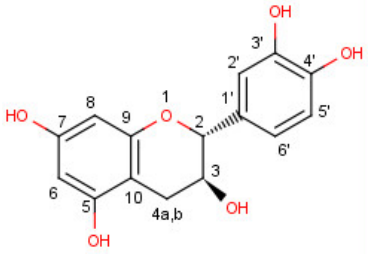
Εικόνα 38: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM5

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος διακρίνεται ο χαρακτηριστικός συνδυασμός τρισυποκατάστασης του δακτυλίου Β, ο οποίος αποτελείται από μια διπλή κορυφή (J = 2.2 Hz)

σε *δ* 6.86, μια διπλή κορυφή (*J* = 8.2 Hz) σε *δ* 6.78 και μια διπλή διπλής (*J* = 8.2 / 2.2 Hz) σε *δ* 6.74. Τα πρωτόνια 8 και 6 του δακτυλίου Α συντονίζονται στα 5.94 και 5.87 ppm αντίστοιχα, ενώ χαρακτηριστικά είναι τα πρωτόνια 4a και 4b που εμφανίζονται στην αλειφατική περιοχή ως διπλές διπλών κορυφές με σταθερές σύζευξης 16.0 / 3.9 Hz και 16.0 / 7.8 Hz, αντίστοιχα. Τέλος, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συναντάμε το H-2 ως διπλή κορυφή και το H-3 ως td λόγω της σύζευξής του με τα H-2, H-4a και H-4b. Οι τιμές των ανθράκων προσδιορίστηκαν με χρήση φασμάτων δύο διαστάσεων (HSQC-DEPT, HMBC). Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 35 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Gasca, *et al.*, 2017).

Πίνακας 35: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM5

DHM5 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	4.58 (1H, d, 7.8)	83.0
3	3.99 (1H, td, 7.8 / 3.9)	68.7
4a	2.87 (1H, dd. 16.0 / 3.9)	28.5
4b	2.52 (1H, dd, 16.0 / 7.8)	
5	-	157.5
6	5.87 (1H, d, 2.3)	95.0
7	-	157.5
8	5.94 (1H, d, 2.3)	96.1
9	-	157.0
10	-	100.7
1’	-	131.7
2’	6.86 (1H, d, 2.2)	115.3
3’	-	146.8
4’	-	146.8
5’	6.78 (1H, d, 8.2)	116.1
6’	6.74 (1H, d, 8.2 / 2.2)	120.0

Η κατεχίνη είναι γνωστή κατά κύριο λόγο για την αντιοξειδωτική της δράση (Iñiguez-Franco, *et al.*, 2012) (Lotito, *et al.*, 1999). Επίσης, έχει αναφερθεί η ικανότητά της να αναστέλλει την οστική απορρόφηση μέσω της ικανότητάς της να σταθεροποιεί τα επίπεδα του κολλαγόνου (Delaissé, *et al.*, 1986) και να καταστέλλει την έκκριση κυτταροκινών από τα οστεοβλαστικά κύτταρα. Επίσης, φάνηκε να αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την ενεργότητα του ενζύμου της ALP στην κυτταρική σειρά MC3T3 (Choi, e*t al.*, 2003).

4.3.1.1.3 Μελέτη του κλάσματος DHM-F5

Το κλάσμα DHM-F5 στο χρωματογραφικό με TLC έλεγχο φάνηκε να περιέχει αρκετές ουσίες οι οποίες απορροφούσαν στα 254 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης οι περισσότερες έδωσαν κίτρινη-καφέ χρώση. Για το λόγο αυτό, το κλάσμα

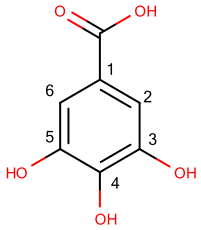
υποβλήθηκε σε περαιτέρω μελέτη με χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (prep-TLC), ώστε να παραληφθούν οι περιεχόμενοι μεταβολίτες. Έτσι, 20 mg του δείγματος διαλύθηκαν σε μεθανόλη και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel αντίστροφης φάσης με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα διαλυτών H_2O/ACN 75/25 1% FA, παραλήφθησαν τέσσερις ζώνες και με την φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε ταυτοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

❖ **Γαλλικό οξύ (DHM6)**

Ο μεταβολίτης DHM6 εμφάνισε απορόφηση στα 254 ενώ μετά από ψεκασμό με θεϊκή βανιλλίνη εμφάνισε ασθενή γκρι χρώση και ταυτοποιήθηκε ως γαλλικό οξύ. Η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης έγινε με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (HSQC-DEPT, HMBC) και τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Numonov, *et al.*, 2017), του μεταβολίτη αναφέρονται στον πίνακα 36.

Πίνακας 36: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM6

DHM6 (MeOD)



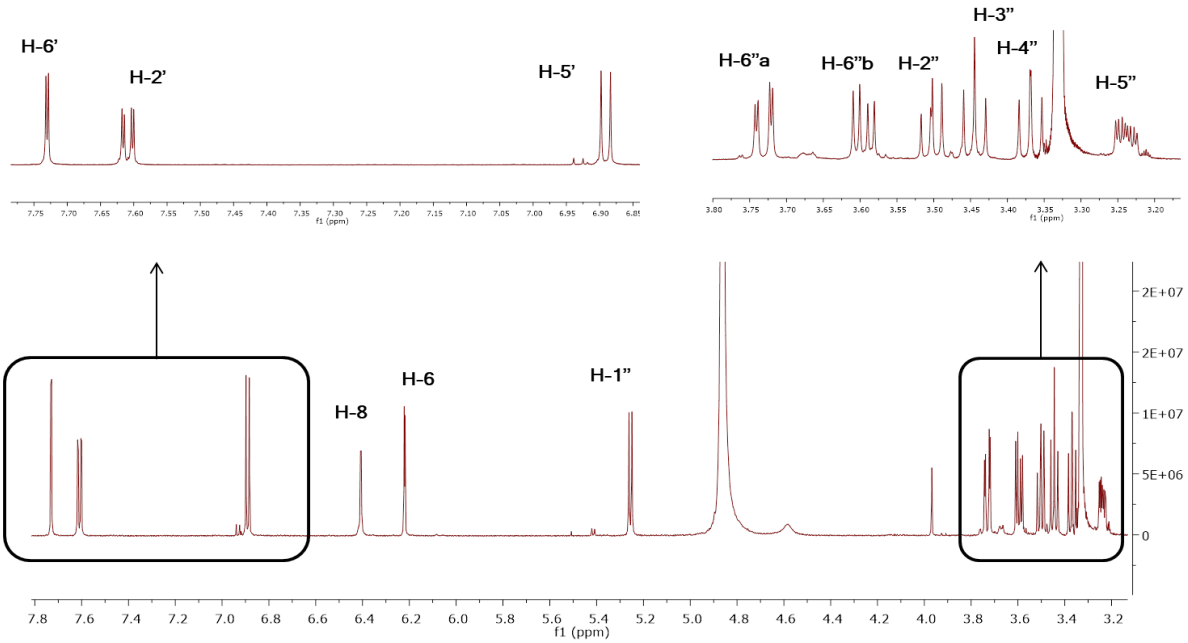
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	121.7
2/6	7.06 (2H, s)	110.5
3/5	-	146.5
4	-	139.3
C=O	-	170.4

Ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και απαντάται σε πλήθος φυτικών ειδών (Fernandes, et al., 2015) ενώ δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία η απομόνωσή του από το είδος *Dorycnium hirsutum*. Καλύπτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων εκδηλώνοντας αντιοξειδωτική (Kim, 2007), αντιμικροβιακή (Sarjit, *et al.*, 2015), αντιμυκητιασική (Li, *et al.*, 2017), αντιφλεγμονώδη (Khouzani, *et al.*, 2017) και αντικαρκινική δράση (Liang, *et al.*, 2012) (Chia, *et al.*, 2010) ενώ τα τελευταία χρόνια συσχετίζεται με ευεργετική επίδραση στην νόσο του Alzheimer (Hajipour, *et al.,* 2016).

❖ **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της κερκετίνης (DHM7)**

Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για το μεταβολίτη 3-*O*-*β*-D-γλυκοσίδη της κερκετίνης ή ισοκερκιτρίνη. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος (εικόνα 39), χαρακτηριστικό είναι το ABX αρωματικό σύστημα, το οποίο αντιστοιχεί στον τριστυποκατεστημένο δακτύλιο Β και αποτελείται από τη διπλή κορυφή στα 7.86 ppm με σταθερά σύζευξης 2.2 Hz, τη διπλή διπλής κορυφή στα 7.61 ppm με σταθερές σύζευξης 8.5 και 2.2 Hz, καθώς και τη διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.5 Hz στα 6.90 ppm. Το ανωμερικό

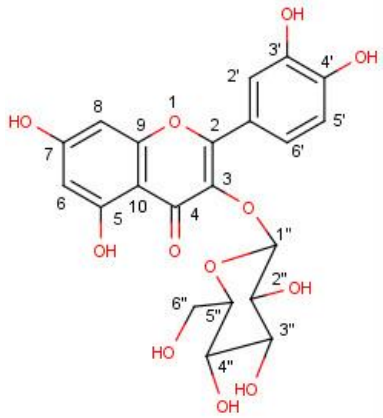
πρωτόνιο της γλυκόζης στα 5.18 ppm εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή με J = 8.5 Hz, γεγονός που υποδηλώνει τη β διαμόρφωση του σακχάρου.



Εικόνα 39: Φάσμα ^{1H}-NMR και HMBC της ένωσης DHM7

Επίσης, τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a'' και H-6b'' συντονίζονται στα 3.66 και 3.58 ppm, ενώ σε δ 3.90-3.45 συντονίζονται τα υπόλοιπα γλυκοσιδικά πρωτόνια της γλυκόσης. Η σύνδεση της γλυκόσης στη θέση 3 της γενίνης προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του φάσματος HMBC και συγκεκριμένα από τη ^{3}J σύζευξη του άνθρακα της προαναφερόμενης θέσης (δ 135.8) με το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη DHM7, τα οποία είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Archila, *et al.*, 2018), αναφέρονται στον πίνακα 37.

Πίνακας 37: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM7

DHM7 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	-	158.7
3	-	135.8
4	-	179.9

5	-	163.4
6	6.24 (1H, d, 2.0)	98.5
7	-	166.1
8	6.44 (1H, d, 2.0)	93.5
9		158.2
10		105.4
1’	-	122.9
2’	7.86 (1H, d, 2.2)	117.8
3’	-	145.6
4’	-	149.8
5’	6.90 (1H, d, 8.5)	115.7
6’	7.61 (1H, dd, 8.5 / 2.2)	123.0
	3- *O*-*β*-γλυκοπυρανόση	
1’’	5.18 (1H, d, 8.2)	105.2
2’’	3.87 (1H, *)	70.0
3’’	3.58 (1H, *)	75.1
4’’	3.84 (1H, *)	72.9
5’’	3.49 (1H, m)	77.2
6’’a	3.66 (1H, dd, 12.0 / 2.2)	61.8
6’’b	3.58 (1H, *)	

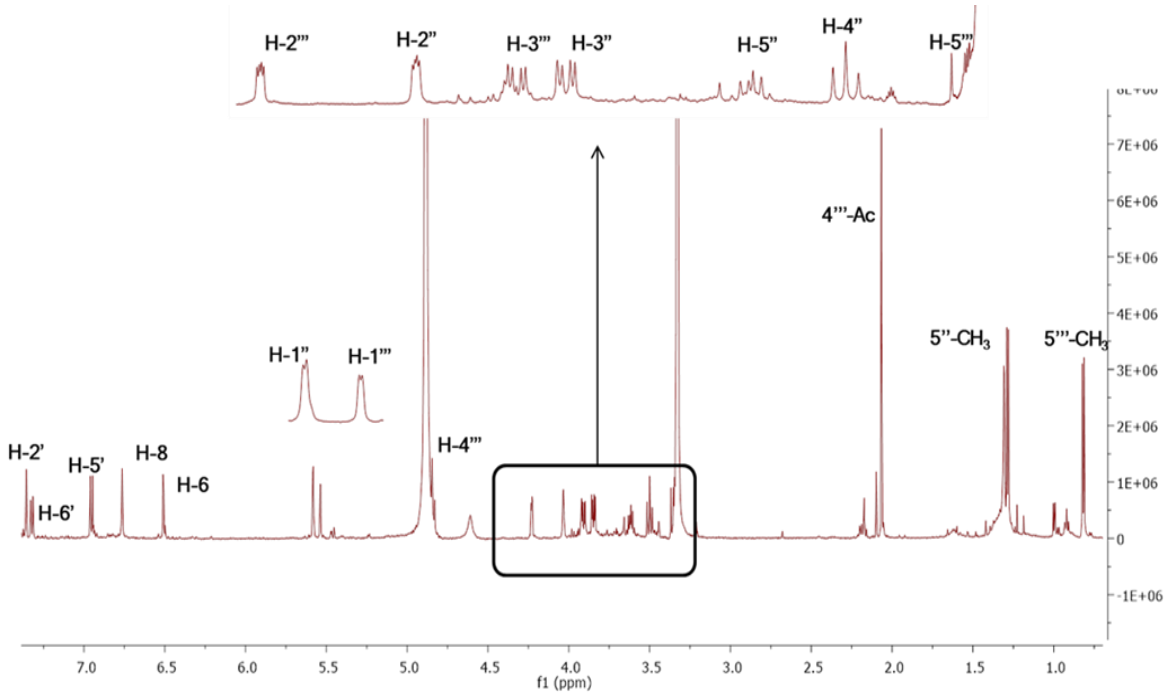
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Ο 3-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσίδης της κερκετίνης έχει απομονωθεί από πλήθος φυτικών ειδών, ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από το γένος *Dorycnium*. Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι η αντιυπερτασική (Gasparotto, *et al.*, 2011), η αντιαλλεργική (Makino, *et al.*, 2013), η αντιοξειδωτική (Sukito, *et al.*, 2014), η αντιμυκητιασική και αντιβακτηριδιακή (Yun, *et al.*, 2018), ενώ σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε να προάγει τη διαδικασία επιμετάλλωσης στην οστεοβλαστική κυτταρική σειρά SaOS-2 (Wang, *et al.*, 2014).

❖ **7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-3-*O*-(4*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (DHM8)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε την παρουσία σακχαριδικού παραγώγου φλαβονοειδούς, ενώ η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για το μεταβολίτη 7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-3-*O*-(4*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος (εικόνα 40) συντονίζονται τα πρωτόνια H-6 (*δ* 6.53) και H-8 (*δ* 6.70) του μεταβολίτη, τα οποία είναι ελαφρώς αποθωρακισμένα λόγω της υποκατάστασης σακχάρου στη θέση 7 της κερκετίνης. Στα 5.58 και 5.54 ppm εντοπίζονται τα ανωμερικά πρωτόνια των δύο μονάδων ραμνόσης που συνδέονται στις θέσεις 7 και 3 της γενίνης, αντίστοιχα. Η ύπαρξη των ραμνοσών επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των μεθυλίων των θέσεων 5’’ και 5’’’ στα 1.28 και 0.82 ppm, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως στα 2.07 ppm του φάσματος ^{1}H-NMR εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια, με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 20.8 ppm, γεγονός που παραπέμπει στην ύπαρξη ακετυλομάδας.

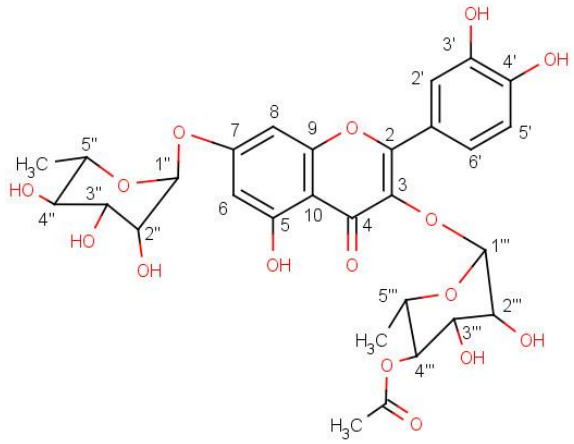


Εικόνα 40: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM8

Ωστόσο, με τη βοήθεια του φάσματος HMBC και συγκεκριμένα από τη σύζευξη ^{3}Jανάμεσα στον άνθρακα του καρβονυλίου (δ 171.0) και το πρωτόνιο H-4''' της ραμνόσης (δ 4.85) καθορίστηκε η παρουσία της εστερομάδας στην προαναφερόμενη θέση του σακχάρου της θέσης 3 της κερκετίνης. Έτσι, δικαιολογείται και η αισθητή αποθωράκιση του πρωτονίου H-4''' σε σύγκριση με το αντίστοιχο πρωτόνιο της δεύτερης μονάδας ραμνόσης (H-4'', δ 3.50). Η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης έγινε με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (HSQC-DEPT, HMBC) και τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη DHM8 αναφέρονται στον πίνακα 38 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Pistelli L., 2006). Η 7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-3-*O*-(4*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *Dorycnium hirsutum* (Pistelli L., 2006).

Πίνακας 38:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM8

DHM8 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	159.5
3	-	135.7

4	-	179.9
5	-	163.0
6	6.53 (1H, d, 2.0)	100.4
7	-	163.7
8	6.70 (1H, d, 2.0)	95.7
9		157.8
10		107.6
1'	-	122.2
2'	7.39 (1H, d, 2.2)	117.0
3'	-	146.5
4'	-	150.0
5'	6.90 (1H, dd, 8.2 / 2.2)	116.5
6'	7.37 (1H, d, 8.2)	123.0
7-*O*-ραμνοπυρανόση		
1''	5.58 (1H, d, 1.7)	99.7
2''	4.03 (1H, dd, 3.9 / 1.7)	71.7
3''	3.85 (1H, dd, 9.9 / 3.9)	72.1
4''	3.5 (1H, t, 9.9)	73.3
5''	3.63 (1H, m)	71.2
6''	1.28 (3H, d, 6.2)	17.9
3-*O*-ραμνοπυρανόση		
1'''	5.54 (1H, d, 1.7)	102.4
2'''	4.23 (1H, dd, 3.9 / 1.7)	71.7
3'''	3.91 (1H, dd, 9.9 / 3.9)	69.9
4'''	4.85 (*)	75.1
5'''	3.37 (1H, m)	72.4
6'''	0.82 (3H, d, 6.2)	17.5
4'''-OAc	2.07 (3H,s)	20.8 171.0

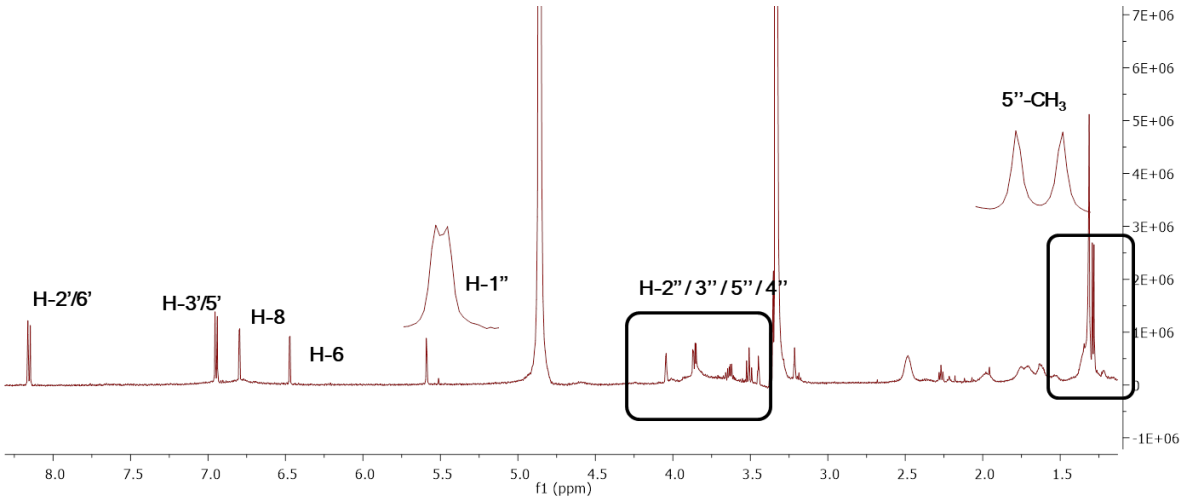
*Αλληλεπικάλυψη με το σήμα της υγρασίας του διαλύτη

❖ 7-*O* - ραμνοπυρανισίδης της καιμπφερόλης (DHM9)

Ο μεταβολίτης DHM9 παρουσίασε παρόμοια TLC χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τους προαναφερόμενους μεταβολίτες, φανερώνοντας ότι πρόκειται για σακχαριδικό παράγωγο φλαβονοειδούς. Πράγματι, από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τον 7-*O*-ραμνοπυρανοσίδη της καιμπφερόλης, ο οποίος είναι επίσης γνωστός ως ραμνοισορομπίνη.

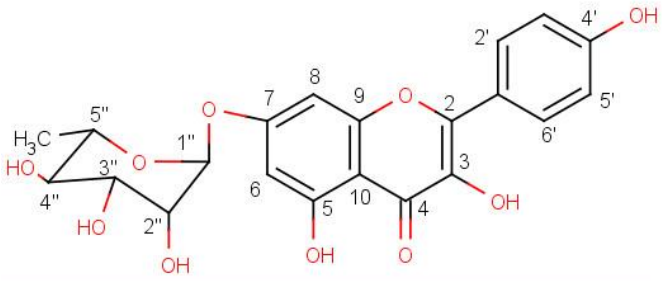
Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 41) διακρίνουμε τις χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H-2'/-6' και H-3'/H-5' που εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 8.0 Hz, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία, ενώ τα πρωτόνια H-8 και H-6 συντονίζονται στα 6.79 και 6.47 ppm αντίστοιχα ως διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz). Χαρακτηριστική είναι η κορυφή του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης στα 5.57 ppm, η οποία εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή, ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια του σακχάρου εμφανίζονται στα 1.26 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.5 Hz. Τα υπόλοιπα πρωτόνια της ραμνόσης εντοπίσθηκαν με τη βοήθεια του φάσματος COSY, ενώ η θέση σύνδεσης του σακχάρου στην 7 θέση της γενίνης προσδιορίστηκε από τη σύζευξη ^{3}J του φάσματος HMBC ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο (δ 5.58) και τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-7 στα 163.4 ppm. Η προαναφερόμενη παρατήρηση είναι σε συμφωνία με την αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 και H-8 της γενίνης. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων

και των ανθράκων του μεταβολίτη DHM9 αναφέρονται στον πίνακα 39 και είναι σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Archila, *et al.*, 2018).



Εικόνα 41: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM9

Πίνακας 39: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM9

DHM9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	-	160.5
3	-	135.7
4	-	179.9
5	-	163.0
6	6.47 (1H, d, 2.0)	99.8
7	-	163.4
8	6.79 (1H, d, 2.0)	95.3
9		157.8
10		106.4
1'	-	123.1
2'/6'	8.15 (2H, d, 8.8)	130.8
3'/5'	6.94 (2H, d, 8.8)	116.5
4'	-	157.2
7- *O*-ραμνοπυρανόση		
1"	5.58 (1H, d, 1.7)	99.8
2"	4.04 (1H,dd, 3.6 / 1.7)	71.8
3"	3.86 (1H, dd, 9.6 / 3.6)	72.3
4"	3.50 (1H, t, 9.6)	74.0
5"	3.60 (1H, m)	71.2
6"	1.26 (3H, d, 6.5)	18.1

Η ραμνοισορομπίνη έχει απομονωθεί στο παρελθόν από διάφορα φυτικά είδη όπως τα *Aconitum vulparia* (Fico, *et al.*, 2003), *Olax mannii* (Okoye, *et al.*, 2015), *Smilax china* (Lincha, *et al.*, 2016), *Chenopodium ambrosioides* (Ghareeb, *et al.*, 2016), *Salvia roborowskii* (Liu, *et al.*,

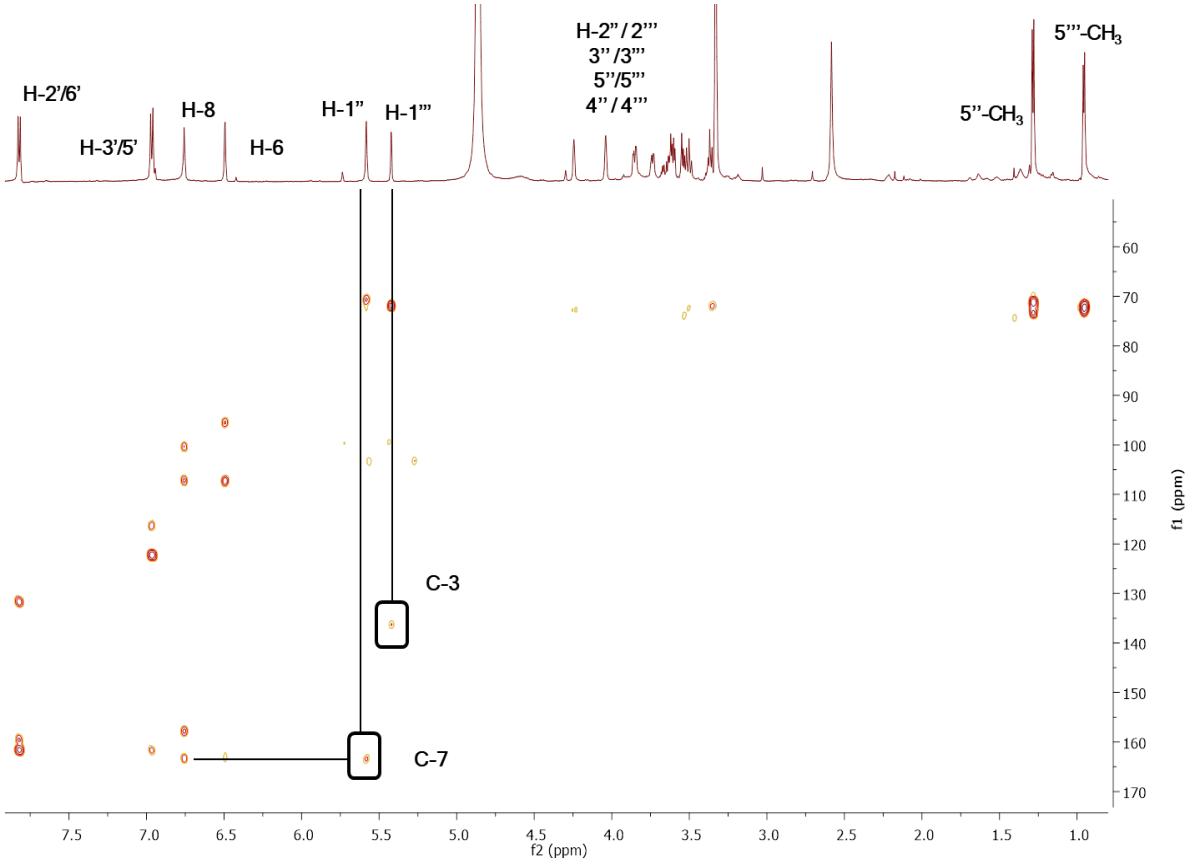
2015) και *Cinnamomum osmophloeum* (Lin, *et al.*, 2012). Τα προαναφερόμενα φυτικά είδη χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή θεραπευτική για την αντιμετώπιση φλεγμονών και φλεγμονοδών παθήσεων. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος μεταβολίτης δεν έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα από το γένος *Dorycnium,* παρ' όλο που έχουν εντοπιστεί πλήθως άλλων σακχαριδικών παραγώγων της καιμπφερόλης. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εκτός από τη σημαντική αντιοξειδωτική δράση, *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει τη συγκεκριμένη ουσία σε πολύ ελπιδοφόρο αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Rho, *et al.*, 2011).

4.3.1.1.4 Μελέτη του κλάσματος DHM-F6

Το κλάσμα DHM-F6 φάνηκε να περιέχει κυρίως έναν μεταβολίτη (DHM-10), ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως ο 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης.

❖ **3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (DHM10)**

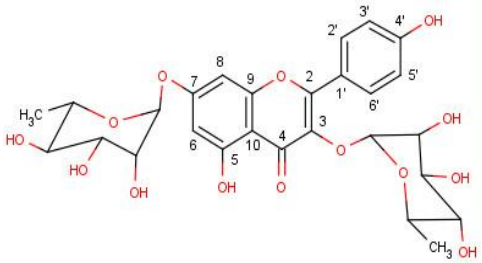
Το φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη DHM10 παρουσιάζει πολύ μεγάλες ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη DHM4, καθώς οι δύο ενώσεις διαφοροποιούνται δομικά μόνο στην παρουσία ακετυλίου στη θέση 4''' της ραμνόσης. Στην περίπτωση του μεταβολίτη DHM10, η απουσία της προαναφερόμενης ακετυλομάδας έχει ως αποτέλεσμα την εμφανή θωράκιση του πρωτονίου H-4''' (δ3.35), σε σύγκριση με το αντίστοιχο πρωτόνιο του μεταβολίτη DHM4 (δ4.85).



Εικόνα 42: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBCτης ένωσης DHM10

Οι θέσεις σύνδεσης των δύο σακχαριδικών μονάδων στη γενίνη προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HMBC (εικόνα 42), ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των υπόλοιπων ανθράκων και πρωτονίων της ένωσης φαίνονται στον πίνακα 40.

Πίνακας 40: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM10

DHM10 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	-	159.9
3	-	136.5
4	-	179.9
5	-	162.7
6	6.49 (1H, d, 2.0)	100.4
7	-	163.3
8	6.76 (1H, d, 2.0)	95.4
9	-	157.8
10	-	107.4
1’	-	122.3
2’/6’	7.82 (2H, d, 8.8)	131.8
3’/5’	6.9 (2H, d, 8.8)	116.5
4’	-	161.9
7- *O*-ραμνοπυρανόση		
1’’	5.58 (1H, d, 1.7)	99.7
2’’	4.27 (1H, dd, 3.6 / 1.7)	72.1
3’’	3.85 (1H, dd, 9.6 / 3.6)	72.1
4’’	3.48 (1H, *)	72.3
5’’	3.62 (1H, m)	71.2
6’’	1.27 (3H, d, 6.5)	17.9
3- *O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’	5.42 (1H, d, 1.7)	103.4
2’’’	4.04 (1H, dd, 3.6 / 1.7)	71.0
3’’’	3.74 (1H,dd, 9.6 / 3.6)	72.1
4’’’	3.35 (1H, *)	71.1
5’’’	3.52 (1H, *)	73.6
6’’’	0.95 (3H, d, 6.5)	17.4

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης έχει απομονωθεί από το *Dorycnium hirsutum* και από άλλα είδη του γένους (Pistelli, *et al.*, 2006) καθώς επίσης και από άλλες φυσικές πηγές (Han, *et al.*, 2016) (Stavropoulou, *et al.*, 2017).

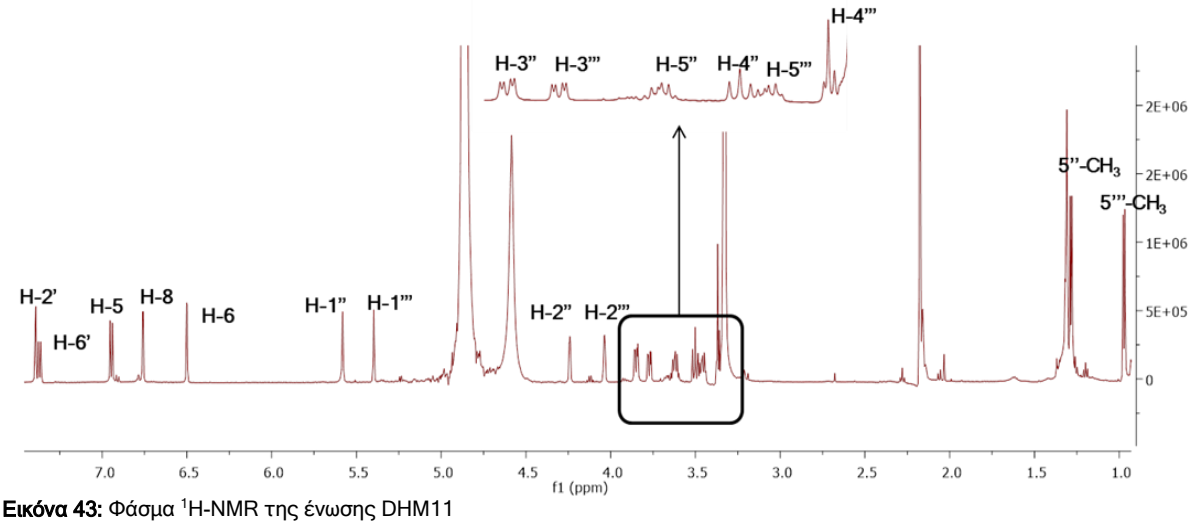
4.3.1.1.5 Μελέτη του κλάσματος DHM-F7

Στο κλάσμα DHM-F7 κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC εντοπίστηκε μια ουσία η οποία φάνηκε ότι ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Με σκοπό την παραλαβή της σε

καθαρή μορφή εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής TLC χρωματογραφίας (prep-TLC). Έτσι περίπου 8 mg δείγματος επιστρώθηκαν σε πλάκα αλουμινίου TLC, το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα H_2O/ACN 75/25 1% FA και τελικά παραλήφθηκε ο 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της κερκετίνης (DHM11).

❖ **3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της κερκετίνης (DHM11)**

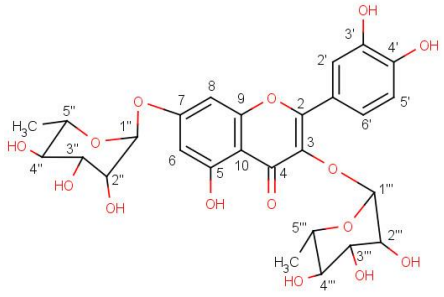
Ο μεταβολίτης DHM11 εμφάνισε απορρόφηση στα 254 nm, μετά από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος TLC με θειϊκή βανιλλίνη έδωσε καφέ-κίτρινη χρώση και με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα ταυτοποιήθηκε ως ο 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της κερκετίνης. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 43) παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη DHM8, ενώ η σημαντικότερη διαφορά σχετίζεται με την απουσία της ακετυλομάδας από τη θέση 4''' και την σαφέσταση θωράκιση του αντίστοιχου πρωτονίου της ραμνόσης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 3 της κερκετίνης.



Εικόνα 43: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM11

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων του μεταβολίτη DHM11, οι οποίες είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Mulinacci, *et al.*, 1995), αναφέρονται στον πίνακα 41.

Πίνακας 41: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM11

DHM11 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*** **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*** **σε ppm**
2	-	159.9

3	-	136.5
4	-	179.9
5	-	162.7
6	6.49 (1H, d, 2.0)	100.4
7	-	163.3
8	6.76 (1H, d, 2.0)	95.4
9		157.8
10		107.4
1'	-	122.9
2'	7.39 (1H, d, 2.3)	116.8
3'	-	146.3
4'	-	149.8
5'	6.95 (1H, d, 8.8)	116.5
6'	7.37 (1H, dd, 8.8 / 2.3)	131.8
	7- *O*-ραμνοπυρανόση	
1''	5.58 (1H, d, 1.7)	99.7
2''	4.04 (1H, dd, 3.6 / 1.7)	71.5
3''	3.85 (1H, dd, 9.6 / 3.6)	72.1
4''	3.50 (1H, t, 9.6)	73.8
5''	3.62 (1H, m)	71.2
6''	1.27 (3H, d, 6.5)	17.9
	3- *O*-ραμνοπυρανόση	
1'''	5.42 (1H, d, 1.7)	103.4
2'''	4.23 (1H, dd, 3.6 / 1.7)	71.9
3'''	3.77 (1H,dd, 9.6 / 3.6)	72.1
4'''	3.34 *	73.2
5'''	3.52 (1H, m)	73.6
6'''	0.95 (3H, d, 6.5)	17.4

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη με το σήμα του διαλύτη

Μέχρι σήμερα έχει καταγραφεί η απομόνωση ακετυλιωμένων παραγώγων του από *Dorycnium hirsutum* (Pistelli, *et al.*, 2006).

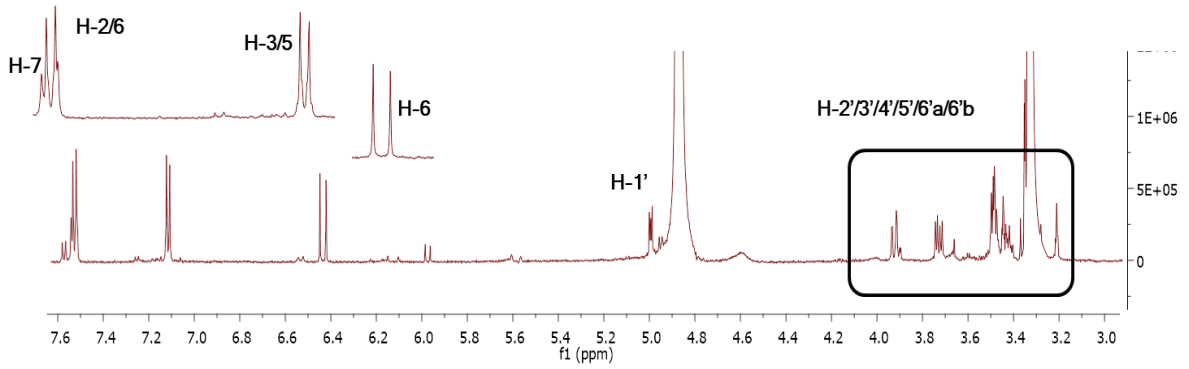
4.3.1.1.6 Μελέτη του κλάσματος DHM-F8

Με σκοπό την παραλαβή του κύριου μεταβολίτη του κλάσματος DHM-F7 εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής TLC χρωματογραφίας (prep-TLC). Το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα H_2O/ACN 75/25 1% FA και παραλήφθηκε ο μεταβολίτης DHM12.

❖ **4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-*trans*-π-κουμαρικό οξύ (DHM12)**

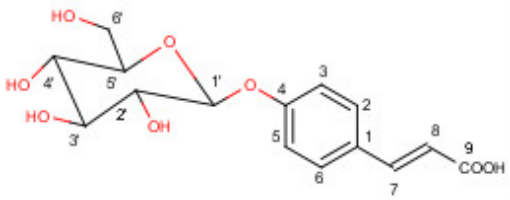
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος (Εικόνα 44) εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές (J = 8.5 Hz) που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2/H-6 και H-3/H-5 του π-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, σε δ 7.55 και 6.40 συντονίζονται δύο γειτονικά πρωτόνια που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σταθερά σύζευξης 16 Hz και αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια της π-κουμαρικής ομάδας. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης (H-1') εμφανίζεται στα 4.98 ppm και παρουσιάζει σύζευξη ^3J στο φάσμα HMBC με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-4 (δ 149.5) υποδηλώνοντας τη σύνδεση του σακχάρου στη θέση 4 του κουμαρικού οξέος.

Στον πίνακα 42 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη DHM12, οι οποίες είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Francezon, et al., 2017).



Εικόνα 44: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης DHM12

Πίνακας 42: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης DHM12

DHM12 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** *δ* **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** *δ* **σε ppm**
1	-	127.7
2/6	7.52 (2H, d, 8.5)	128.9
3/5	7.13 (2H, d, 8.5)	116.5
4	-	149.5
7	7.55 (1H, d, 16.0)	142.0
8	6.40 (1H, d, 16.0)	120.0
9	-	171.5
1'	4.98 (1H, d, 7.5)	100.6
2'	3.49 (1H, *)	73.4
3'	3.49 (1H, *)	76.6
4'	3.45 (1H, *)	70.0
5'	3.49 (1H, *)	76.6
6'a	3.92 (1H, dd, 12.0 / 2.1)	61.0
6'b	3.73 (1H, dd, 12.0 / 5.2)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη μεταξύ των πρωτονίων

Το 4-*O*-γλυκοζυλιωμένο παράγωγο του π-κουμαρικού οξέος έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη όπως είναι τα *Hippophae rhamnoides* (Li, *et al.*, 2014)*, Aconitum flavum* (Wang, *et al.*, 2016)*, Rhus parviflora* (Shrestha, *et al.*, 2013) *Onobrychis viciifolia* (Regos, *et al.*, 2009)*, Aristolochia foveolata* (Leu, *et al.*, 1998) και *Trifolium repens* (Foo, *et al.*, 2000)*.* Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το γένος *Dorycnium,* ενώ μεταξύ των σημαντικότερων βιολογικών ιδιοτήτων του περιλαμβάνονται η αντιοξειδωτική (Syed, *et al.*, 2017), η αντιφλεγμονώδης (Shrestha, *et al.*, 2013) και η νευροπροστατευτική (Li, *et al.*, 2016).

4.3.2 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cytisus villosus* (CVM)

Με βάση τον προκαταρτικό χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στιβάδας, το μεθανολικό εκχύλισμα των υπεργείων τμημάτων του είδους του *Cytisus villosus* χαρακτηρίζεται από την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων μεταβολιτών, το ολικό εκχύλισμα κλασματώθηκε με την τεχνική της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής και τη χρήση του διφασικού συστήματος (EtOAc/EtOH/H_2O 10/1/10), το οποίο σε προγενέστερες μελέτες εκχυλισμάτων με ανάλογο χημικό φορτίο είχε αποδειχθεί αποτελεσματικό.

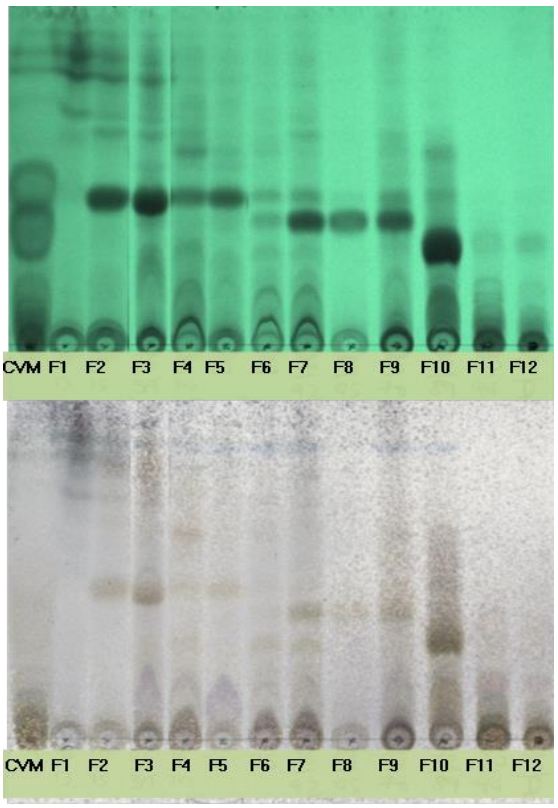
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος προσομοίωσης του διαχωρισμού για το επιλεγμένο σύστημα διαλυτών, όπου 10 mg εκχυλίσματος και 4 ml του διφασικού συστήματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Μετά από την ανατάραξη του περιεχομένου διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα διαλύθηκε πλήρως και ο διαχωρισμός των δύο φάσεων έλαβε χώρα σε λιγότερο από 60 δευτερόλεπτα. Επίσης, ο έλεγχος του περιεχομένου των δύο φάσεων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) έδειξε ικανοποιητική κατανομή των κύριων συστατικών.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με δυνατότητα διοχέτευσης του διαλύτη μέχρι 24 min/ml και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 7g, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία περίπου 50:50. Από τις δύο φάσεις του επιλεγμένου συστήματος, η ελαφριά-άνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η βαριά-κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min και ροή 15 ml/min σε 'ascending mode', και μετά την εξισορρόπηση του συστήματος (σημείο στο οποίο η φάση που εισέρχεται στη στήλη εξέρχεται κιόλας διατηρώντας την αναλογία των δύο φάσεων σταθερή) ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή 91 κλασμάτων όγκου 30ml. Όταν ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται συστατικά πραγματοποιήθηκε αναστροφή των φάσεων, με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή σε 'descending mode' μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Έτσι, προέκυψαν συνολικά 127 κλάσματα εκ των οποίων τα 91 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 36 κλάσματα. Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH και σε αναλογίες 99/1, 95/5, 90/10 και 80/20 πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 12 κλάσματα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 43 ενώ στην εικόνα 45 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων με TLC κανονικής

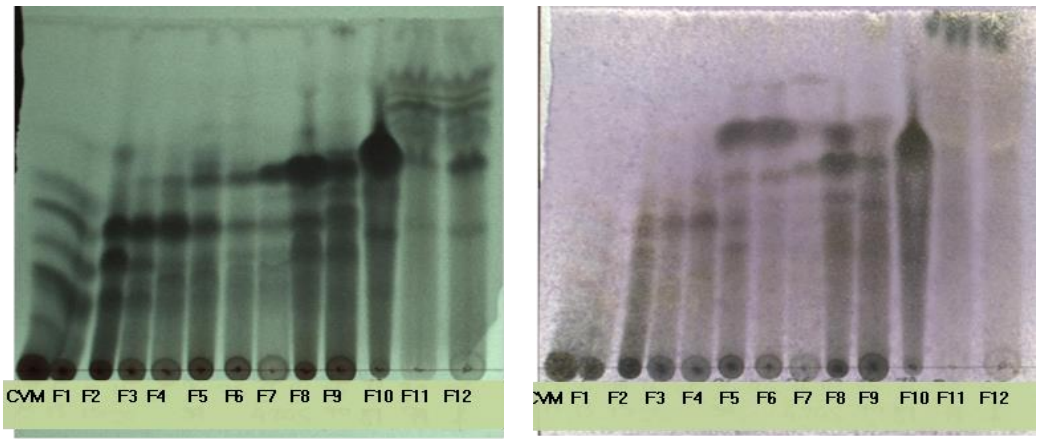
φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH (80/20). Τα κλάσματα ελέγχθηκαν και σε TLC αντίστροφης φάσης σε H_2O/ACN (70/30) (εικόνα 46), ώστε να αναδειχτεί καλύτερα το περιεχόμενο των κλασμάτων στους πιο πολικούς μεταβολίτες.

Πίνακας 43: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος CVM

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
CVM-F1	6-13	1,36
CVM-F2	14-15	86.7
CVM-F3	16-24	315.0
CVM-F4	25	18.6
CVM-F5	26-34	232.7
CVM-F6	35	175.4
CVM-F7	36-42	131.0
CVM-F8	43-45	40.5
CVM-F9	46-70	312.1
CVM-F10	72-89	511.2
CVM-F11	90-94	3.5
CVM-F12	Τελικό	216.1



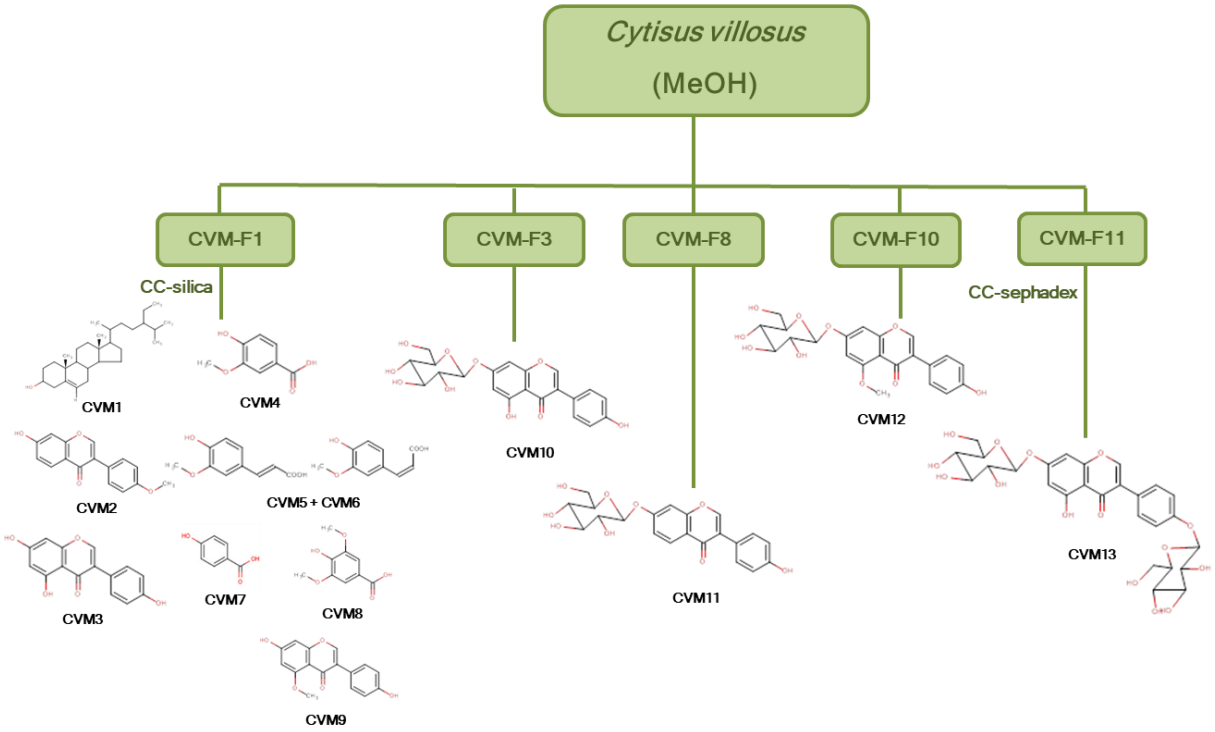
Εικόνα 45: :Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του CVM σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (80/20).



Εικόνα 46: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του CVM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30)

4.3.2.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών του εκχυλίσματος CVM

Από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Cytisus villosus* με την τεχνική του FCPC προέκυψαν 12 κλάσματα, μεταξύ των οποίων δύο περιείχαν απομονωμένους μεταβολίτες σε σχετικά υψηλή καθαρότητα, ενώ από την περαιτέρω μελέτη τριών άλλων κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών προέκυψαν δέκα ακόμη μεταβολίτες. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία:



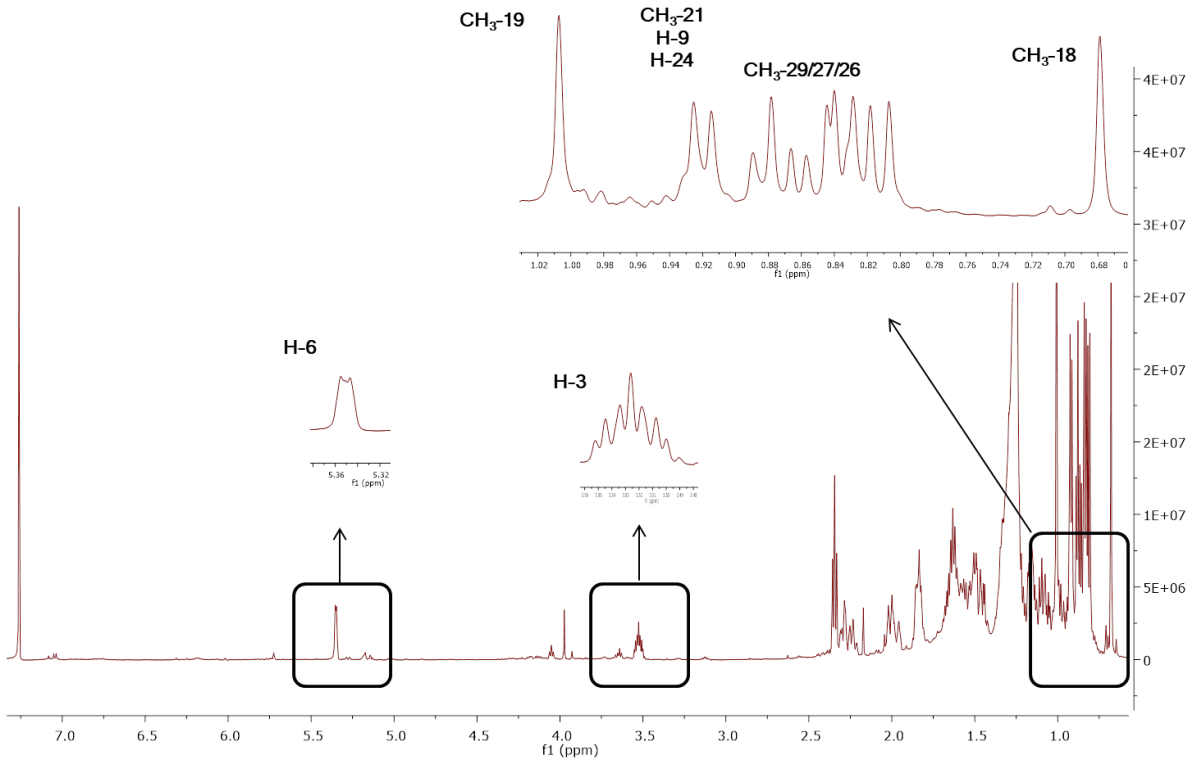
Σχήμα 3: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cytisus villosus* (CVM).

4.3.2.1.1 Μελέτη του κλάσματος CVM-F1

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα CVM-F1 περιέχει σχετικά άπολες ουσίες και δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενοειδών. Έτσι, για την επεξεργασία του χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης (CL_chromatography), με πληρωτικό υλικό silica 'flash' και κινητή φάση μίγμα διαλυτών κυκλοεξάνιο (cHex) και οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Μετά από τον χρωματογραφικό έλεγχο των συλλεχθέντων κλασμάτων με τη χρήση TLC και τη λήψη φασμάτων διαπιστώθηκε ότι απομονώθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

❖ **β-Σιτοστερόλη (CVM1)**

Το κλάσμα CL-8 της στήλης φάνηκε να περιέχει ένα μεταβολίτη που δεν παρουσίαζε απορρόφηση στα 254 και 365 nm, αλλά έπειτα από εμφάνιση του χρωματογραφήματος με το αντιδραστήριο θεϊικής βανιλλίνης έδωσε έντονη μπλε χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι πρόκειται για τη *β*-σιτοστερόλη, η οποία είναι μια φυτοστερόλη που απαντάται σε πλήθος φυτικών ειδών αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή της από το γένος *Cytisus*.

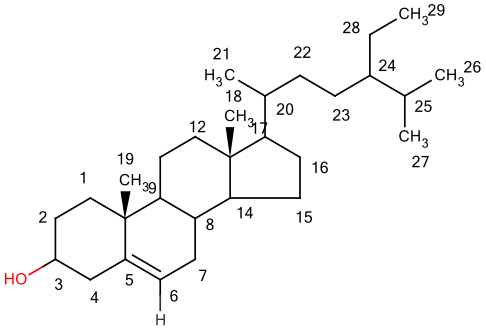


Εικόνα 47: Φάσμα ^{1}H της ένωσης CVM1

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM1 (εικόνα 47) εμφανίζεται στα 3.52 ppm μια πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης H-3, ενώ το ολεφινικό πρωτόνιο H-6 συντονίζεται στα 5.35 ppm. Σε υψηλότερες τιμές πεδίου και συγκεκριμένα σε *δ* 2.34 και 2.31 συντονίζονται τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-4, η οποία γειτνιάζει με το διπλό δεσμό και το οξυγονωμένο μεθίνιο της ένωσης. Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος (2.0 - 0.0 ppm) εμφανίζονται τα υπόλοιπα σήματα της *β*-σιτοστερόλης, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν οι κορυφές των μεθυλικών πρωτονίων. Πιο συγκεκριμένα, τα μεθύλια των θέσεων 18 και 19 εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 0.68 και 1.01 ppm αντίστοιχα, ενώ τα μεθύλια των θέσεων 26 και 27 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές (*J* = 6.5 Hz) σε *δ* 0.81 και 0.84, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης C-29 εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή, λόγω της γειτνίασης με τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-28. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 44 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Jayaprakasha, *et al.*, 2007).

Πίνακας 44: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM1

CVM1 ($CDCl_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
1	1.84 (1H, *) / 1.08 (1H, *)	37.4
2	1.84 (1H, *) / 1.50 (1H, *)	31.8
3	3.55 (1H, m)	72.2
4	2.34 (1H, m) / 2.31 (1H, *)	42.1
5	-	141.0
6	5,35 (1H, m)	122.7
7	1.51 (1H, *) / 1.97 (1H, *)	32.1
8	1.98 (1H, m)	33.0
9	0.95 (1H, *)	51.5
10	-	37.9
11	1.49 (2H, m)	22.1
12	2.04 (1H, *) / 1.18 (1H, *)	40.9
13	-	41.9
14	1.01 (1H, *)	58.1
15	1.57 (1H, m) / 1.07 (1H, m)	25.1
16	1.86 (1H, *m) / 1.29 (1H, *m)	29.2
17	1.14 (1H, *)	57.4
18	1.01 (3H, s)	12.2
19	0.68 (3H, s)	19.7
20	1.38 (1H, m)	37.3
21	0.92 (3H, d, 6.5)	19.2
22	1.38 (1H, *) /1.04 (1H, *)	35.0
23	1.16 (2H, *)	26.9
24	0.94 (1H, m)	47.2
25	1.68 (1H, m)	26.3
26	0.81 (3H, d, 6.5)	19.6
27	0.84 (3H, d, 6.5)	19.5
28	1.22 (3H, m)	22.5
29	0.85 (3H, t, 7.5)	12.2

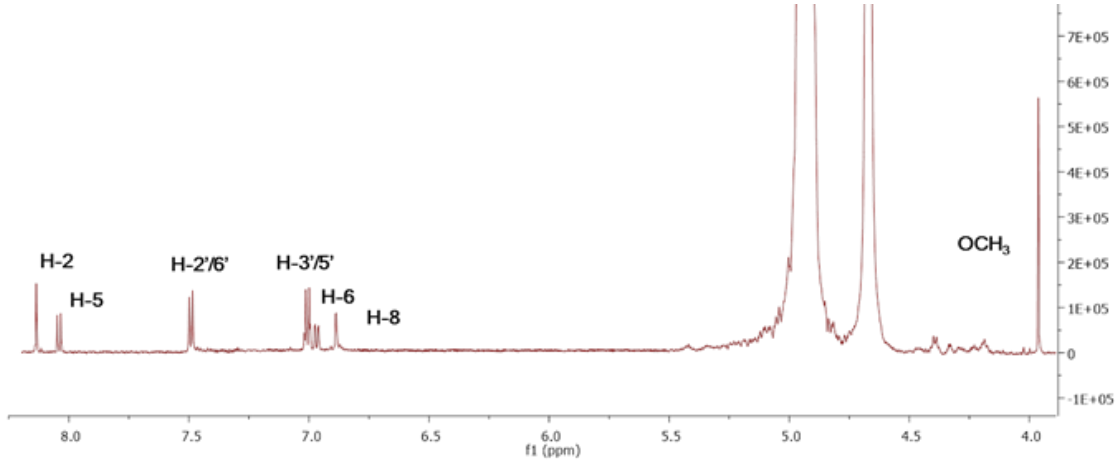
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική και αντιδιαβητική δράση της (Karan, *et al.*, 2012) η αντιβακτηριδιακή (Amit, *et al.*, 2012) καθώς και η αντι-αγγειογενετική (Sharmila, *et al.*, 2017). Σημειώνει σημαντική δράση της στη μείωση της χοληστερίνης, την πρόληψη της τριχόπτωσης και του καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς και τη βελτίωση των συμπτωμάτων της ήπιας και μέτριας καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη (Bulama, *et al.*, 2015)(Yuk, Woo *et al.* 2007).

❖ **Φορμονονετίνη (CVM2)**

Τα κλάσματα CL-15 και CL-16 της χρωματογραφικής στήλης του κλάσματος CVM-F1, καθώς φάνηκε να περιέχουν κυρίως ένα κοινό μεταβολίτη, συνενώθηκαν και υποβλήθησαν σε

παρασκευαστική χρωματογραφία TLC με σκοπό την παραλαβή της εν λόγω ουσίας σε καθαρότερη μορφή. Έτσι, περίπου 8 mg δείγματος επιστρώθηκαν σε σε γυάλινη πλάκα silica gel στο σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2 / MeOH 90/10, την απόξεση της αντίστοιχης ζώνης και την εκχύλιση με το προαναφερόμενο σύστημα διαλυτών παραλήφθηκε ο εν λόγω μεταβολίτης. Στη συνέχεια, η απομονωμένη ένωση μετά από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως 4'-μεθόξυ-7-υδρυξυισοφλαβόνη ή φορμονονετίνη.

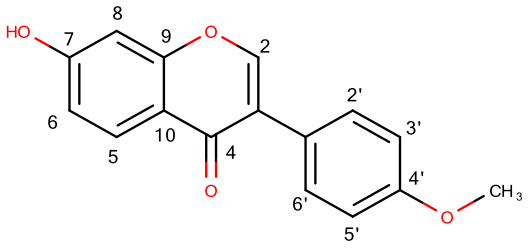


Εικόνα 48: Φάσμα ^{1}H της ένωσης CVM2

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM2 (εικόνα 48) παρατηρούμε τη χαρακτηριστική για τις ισοφλαβόνες απλή κορυφή του H-2 στα 8.19 ppm, του οποίου ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε *δ* 158.9. Τα πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5' του δακτυλίου Β συντονίζονται ως δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.8 Hz) στα 7.50 και 7.02 ppm, αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου Α αποτελούν ένα χαρακτηριστικό ABX τρισυποκατεστημένο σύστημα και εμφανίζονται σε *δ* 8.09 (d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 6.97 (dd, *J* = 8.8 / 2.5, H-6) και 6.89 (d, *J* = 2.5 Hz, H-8). Η μεθοξυομάδα συντονίζεται στα 3.86 ppm με τη μορφή απλής κορυφής που ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια, ενώ με τη βοήθεια φάσματος HMBC η θέση σύνδεσής της καθορίστηκε στη θέση 4' του δακτυλίου Β καθώς παρουσιάστηστηκε ^3J σύζευξη των προαναφερόμενων πρωτονίων με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-4' (*δ* 157.4). Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), φαίνονται στον πίνακα 45 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Kim, *et al.*, 2010).

Πίνακας 45: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM2

CVM2 (MeOD)

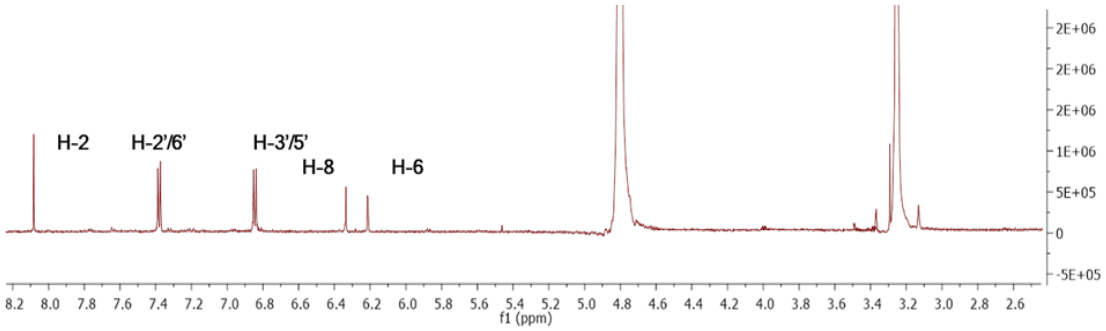


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	8.19 (1H, s)	158.9
3	-	124.2
4	-	174.4
5	8.09 (1H, d, 8.8)	127.2
6	6.97 (1H, dd, 8.8 / 2.5)	116.2
7	-	162.5
8	6.89 (1H, d, 2.5)	103.1
9	-	153.1
10	-	116.0
1’	-	123.1
2’/6’	7.50 (2H, d, 8.8)	130.9
3’/5’	7.02 (2H, d, 8.8)	114.5
4’	-	157.4
4’-OCH_3	3.86 (3H, s)	55.5

Η ισοφλαβόνη φορμονονετίνη έχει εντοπισθεί σε πλήθος φυτικών ειδών της οικογένειας Leguminosae όπως είναι είδη των γενών *Glycyrrhiza* (Shults, *et al.*, 2017) (Li, *et al.,* 2017)*, Astragalus* (Tang, *et al.*, 2018) (Wang, *et al.*, 2015)*, Dalbergia* (Mutai, *et al.*, 2013)*, Genista* (Tosun, *et al.*, 2009) και τα είδη *Trifolium pretense* (Drenin, *et al.*, 2011) και *Pueraria lobata* (Liu, *et al.*, 2015). Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα η απομόνωσή της ούτε από το *Cytisus villosus*, αλλά ούτε και από άλλο είδος του γένους *Cytisus*. Η φορμονονετίνη χαρακτηρίζεται από ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως: αντιοξειδωτική (Mu, *et al.*, 2009), αντιμικροβιακή (Lauwaet, *et al.*, 2010)*,* νευροπροστατευτική (Zhou, *et al.*, 2012)*,* αγγειοδιασταλτική και καρδιοπροστατευτική (Zhang, *et al.*, 2011) (Wu, *et al.*, 2010) κ.α. Αξιοσημείωτη είναι η οιστρογονική της δράση (Zhao-Ning, *et al.*, 2006), ενώ έχει ευεργετική επίδραση στα οστά. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι ενισχύει την οστική αναδόμηση σε πειραματικό μοντέλο ελαττωματικού φλοιώδους οστού (Singh, *et al.*, 2017) και εμφανίζεται ως ικανός αντιαπορροφητικός παράγοντας του οστού παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών (Huh, e*t al.*, 2014,). Επίσης, ενεργοποιεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Gautam, *et al.*, 2011), ενώ σε *in vivo* μελέτες ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων έχει αποδειχθεί πως εμποδίζει την οστική απώλεια (Ha, *et al.*, 2010) και βελτιώνει την ποιότητα των οστών (Kaczmarczyk-Sedlak, *et al.*, 2014).

❖ **Γενιστεΐνη (CVM3)**

Το κλάσμα CL-20 της χρωματογραφικής στήλης του κλάσματος CVM-F1 φάνηκε να περιέχει ένα μεταβολίτη που παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm, ενώ μετά την εμφάνιση με θεϊκή βανιλλίνη έδωσε ροζ αχνή χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για τη γενιστεΐνη, η οποία συγκαταλλέγεται ανάμεσα στις πιο γνωστές ισοφλαβόνες.

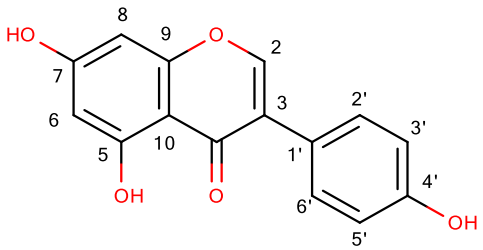


Εικόνα 49: Φάσμα ^{1H}-NMR της ένωσης CVM3

Όπως φαίνεται στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 49), σε *δ* 8.08 εμφανίζεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή των ισοφλαβονών που αντιστοιχεί στο H-2, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε *δ* 155.3. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος επίσης εμφανίζονται σε *δ* τα πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5' ως διπλές (*J* = 8.9 Hz) κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και είναι χαρακτηριστικές του π-υποκατεστημένου αρωματικού συστήματος του δακτυλίου Β. Τα πρωτόνια H-8 και H-6 συντονίζονται στα 6.36 και 6.24 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με *J* =2.1 Hz. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη υπολογίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και αποτυπώνονται στον πίνακα 46 σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Boumaza, *et al.*, 2006).

Πίνακας 46: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM3

CVM3 (MeOD)



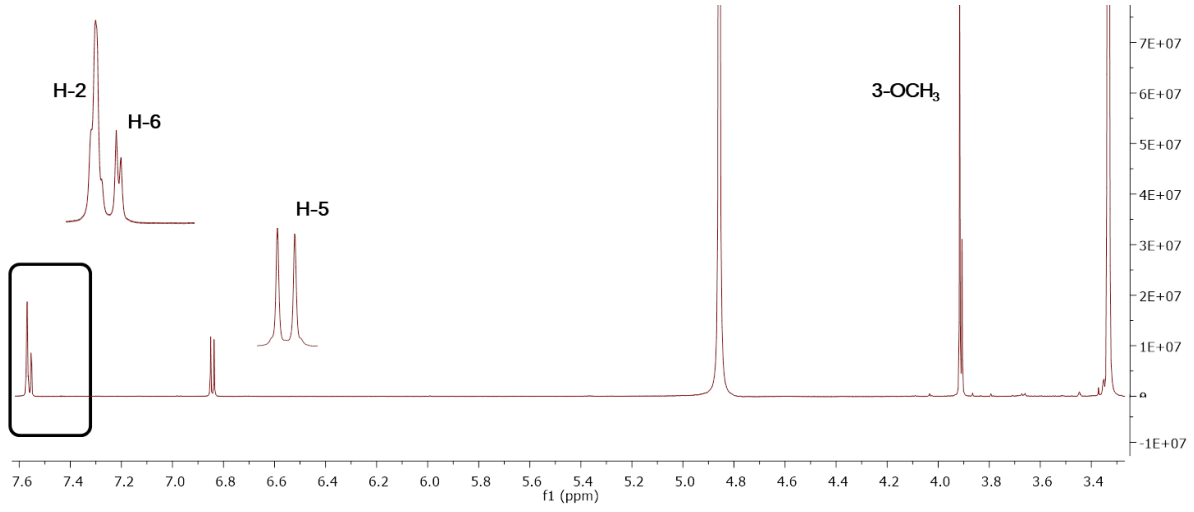
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR *δ* σε ppm
2	8.08 (1H, s)	155.3
3	-	126.0
4	-	182.5
5	-	164.0
6	6.24 (1H, d, 2.1)	101.0
7	-	164.7
8	6.36 (1H, d, 2.1)	95.8
9	-	158.7
10	-	107.7

1’	-	122.8
2’/6’	7.39 (2H, d, 8.9)	131.4
3’/5’	6.87 (2H, d, 8.9)	116.3
4’	-	158.6

Η γενιστεϊνη απαντάται σε πάρα πολλά φυτικά είδη, κυρίως της οικογένειας Leguminosae αλλά και άλλων οικογενειών. Μερικά από τα πιο γνωστά γένη από τα οποία έχει απομονωθεί η γενιστεΐνη είναι τα εξής: *Pueraria* (Reppert, *et al.,* 2008) (Satpathy, *et al.*, 2017) *Genista* (Tosun, *et al.*, 2003) (Orhan, *et al.*, 2011), *Trifolium* (Dabkeviciene, *et al.*, 2012) (Brandli, *et al.,* 2010), *Lupinus* (Von Baer, *et al.*, 2006) (Stobiecki, *et al.,* 2010) και *Glycyrrhiza* (Khalaf, *et al.*, 2010) (Zhou, *et al.*, 2016). Σημαντική πηγή της γενιστεϊνης και των γλυκοσιδών της αποτελεί το είδος *Glycine max*, το οποίο είναι ευρέως γωστό ως σόγια (Fukutake, *et al.*, 1996) (Aguirre, *et al.,* 2007). Επίσης, έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Cytisus* (Hanganu, et al., 2016) και πολύ πρόσφατα και από το *Cytisus villosus* (Larit, *et al.*, 2018). Μεταξύ άλλων η γενιστεΐνη έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Yamagishi, *et al.*, 2001), πιθανώς μέσω και αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Lee, *et al.*, 2014), ενώ διεγείρει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Sugimoto, *et al.*, 2000) (Yamaguchi, *et al.*, 2000) (Chen, *et al.*, 2003). Αρκετές *in vivo* μελέτες σε πειραματικά μοντέλα οστεοπόρωσης ακόμα και χορήγησή της σε οστεοπορωτικές γυναίκες (Sehmisch, *et al.*, 2008) (Arcorac, *et al.*, 2017) έχουν επιβεβαιώσει την οστεοπροστατευτική της δράση.

❖ 3-Μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM4)

Ο μεταβολίτης CVM4 παρουσίασε έντονη απορρόφηση στα 254 nm, ενώ μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με θειϊκή βανιλλίνη έδωσε μια αχνή ροζ χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για το μεταβολίτη 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ ή βανιλλικό οξύ. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 50) και συγκεκριμένα σε δ 7.58, 6.85 και 7.57 συντονίζονται αντίστοιχα τα πρωτόνια H-2 (d, J = 2.0 Hz), H-5 (d, J = 8.2 Hz) και H-6 (dd, J = 8.2/2.0 Hz), τα οποία αποτελούν ένα χαρακτηριστικό ABX τρισυποκατεστημένο σύστημα.

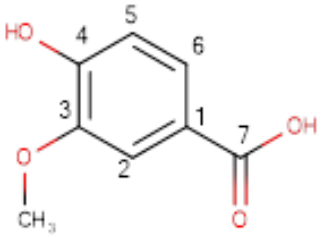


Εικόνα 50: Φάσμα ^{1H}-NMR της ένωσης CVM4

Τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 3.91 ppm, ενώ η παρουσία της στη θέση C-3 επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια του φάσματος HMBC όπου φάνηκε η ^{3}J σύζευξη των συγκεκριμένων πρωτονίων με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της προαναφερόμενης θέσης. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης προσδιορίσθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) περιλαμβάνονται στον πίνακα 47 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Ahmed, *et al.*, 2014).

Πίνακας 47: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM4

(CVM4) MeOD



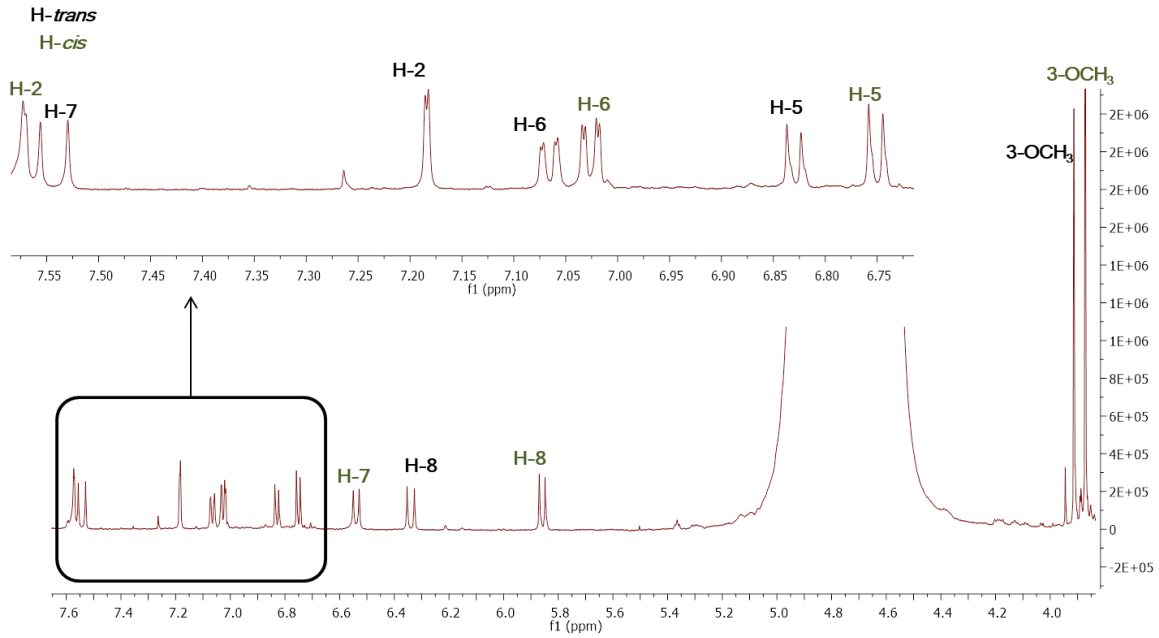
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1		123.6
2	7.58 (1H, brd, 2.0)	113.8
3	-	152.4
4	-	148.3
5	6.85 (1H, d, 8.2)	115.8
6	7.57 (1H, dd, 8.2 / 2.0)	113.8
7	-	170.5
3-OCH_3	3.91 (3H, s)	56.4

Το βανιλλικό οξύ έχει απομονωθεί από πλήθος φυτικών ειδών αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το γένος *Cytisus*. Μεταξύ της πληθώρας των βιολογικών δράσεων που έχουν αποδοθεί στο προαναφερόμενο φυσικό προϊόν, περιλαμβάνονται η καταστολή της ηπατικής ίνωσης και της φλεγμονής που προκαλλείται από χρόνια ηπατική βλάβη (Itoh, *et al.*, 2009; Itoh, *et al.*, 2010), όπως επίσης και η καρδιοπροστατευτική δράση με πιθανή ευεργετική επίδραση στην αντιμετώπιση της υπέρτασης (Kumar, *et al.*, 2014) (Stanely Mainzen Prince, *et al.*, 2011). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ως το κύριο συστατικό κινεζικού σκευάσματος έχει μελετηθεί για την οστεοπροστατευτική του δράση και έχει αποδειχτεί ότι ενεργοποιεί την οστεοβλαστική δραστηριότητα μέσω των MAP κινασών (Xiao, *et al.*, 2014).

❖ ***trans*-Φερουλικό οξύ (CVM5) / *cis*-Φερουλικό οξύ (CVM6)**

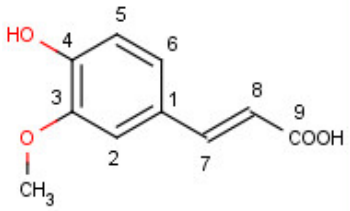
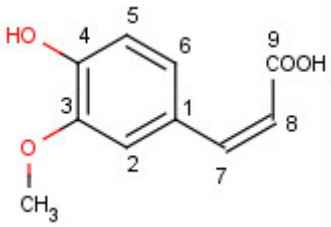
Στο χρωματογράφημα TLC φάνηκε ότι η ζώνη που αντιστοιχεί στους συγκεκριμένους μεταβολίτες παρουσιάζει απορρόφηση στα 254 nm και ελαφριά μωβ χρώση έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για μίγμα των *cis*- και *trans* ισομερών του φερουλικού οξέος σε αναλογία 55 /45 %, αντιστοίχως. Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 51) εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων και των δύο ισομερών. Μεταξύ των παρατηρούμενων σημάτων, χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των ολεφινικών πρωτονίων H-7 και H-8, η μορφή των οποίων συμβάλλει στη διάκριση των δύο μεταβολιτών

μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια Η-7 και Η-8 του διπλού δεσμού του *trans*-ισομερούς εμφανίζονται σε δ 7.55 και 6.33 αντίστοιχα, ως δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 16.0 Hz, ενώ τα αντίστοιχα σήματα του *cis*-ισομερούς εμφανίζονται πιο θωρακισμένα (*δ* 6.54 και 5.86, αντίστοιχα) ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 12.5 Hz.



Εικόνα 51: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM5 και CVM6

Πίνακας 48: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CVM5 και CVM6

CVM5 (MeOD) *trans*-Φερουλικό οξύ			CVM6 (MeOD) *cis*-Φερουλικό οξύ		
					
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13}C NMR *δ* σε ppm**	**ΘΕΣΗ**	**^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13}C NMR δ σε ppm**
1	-	127.7	1		126.8
2	7.18 (1H, d, 2.0)	111.3	2	7.57 (1H, d, 2.0)	113.8
3	-	149.5	3	-	148.0
4	-	149.1	4	-	148.1
5	6.83 (1H, d, 8.2)	116.3	5	6.75 (1H, d, 8.2)	115.5
6	7.07 (dd, 8.2 / 2.0)	123.5	6	7.03 (dd, 8.2 / 2.0)	124.7
7	7.55 (1H, d, 16.0)	145.2	7	6.54 (1H, d, 12.5)	146.5
8	6.33 (1H, d, 16.0)	117.8	8	5.86 (1H, d, 12.5)	121.7
9	-	172.1	9	-	172.0
3-OCH_3	3.91 (3H, s)	56.3	3-OCH_3	3.87 (3H, s)	56.2

Το φερουλικό οξύ αποτελεί κοινό μεταβολίτη στο φυτικό βασίλειο, ενώ έχει απομονωθεί και από το γένος *Cytisus* στο παρελθόν (Hanganu, *et al.,* 2016). Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του μέχρι σήμερα από το είδος *Cytisus villosus*. Επίσης, το φερουλικό οξύ καθώς και τα παράγωγά του βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και τη θεραπευτική.

Διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Zhao, *et al.*, 2008) (Graf, 1992) (Itagaki, *et al.*, 2009,) καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Sudheer, *et al.*, 2005) (Suzuki, *et al.*, 2002) (Hong, *et al.*, 2106), αντιεπιληπτική δράση (Hassanzadeh, *et al.*, 2017), ενώ εστερικά του παράγωγα εκδηλώνουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Sultana, *et al.*, 2005) (Joshi, *et al.*, 2006.). Η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση οδήγησε στη διερεύνηση της πιθανής οστεοπροστατευτικής του επίδρασης, όπου αναδείχθηκε πως δρα ανασταλτικά στη λειτουργία των οστεκλαστών ενώ ενισχύει και την οστεοβλαστική δραστηριότητα (Lai, *et al.*, 2006) (Sagar, *et al.*, 2016.) (Sassa, *et al.*, 2003). Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την ικανότητα του φερουλικού οξέος να προωθεί την οστεογένεση από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα μέσω του μηχανισμού της υποξίας (Du, *et al.*, 2017).

Στο κλάσμα CL-22 της χρωματογραφικής στήλης του κλάσματος CVM-F1 εφαρμόστηκε παρασκευαστική TLC, με σκοπό τον διαχωρισμό των περιεχόμενων μεταβολιτών του. Έτσι, περίπου 25 mg του δείγματος διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2 / MeOH 90/10, παραλήφθηκαν τρείς ζώνες.

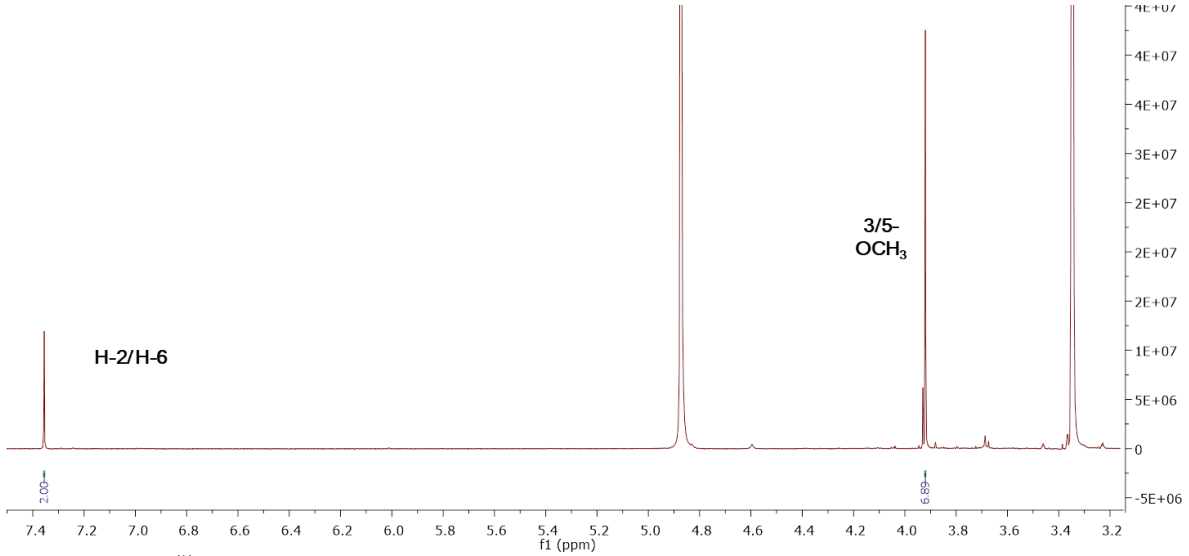
- **p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM7)**

Η μία από τις προαναφερόμενες ζώνες παρουσίασε στο χρωματογράφημα TLC πολύ έντονη απορρόφηση στα 254 nm, ενώ έπειτα από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης έδωσε πολύ αχνή γκρι χρώση. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος από το *Cytisus villosus*, ενώ αναλυτικά περιγράφεται στην § 4.3.1.1.1 δεδομένου ότι το συναντήσαμε και στο *Dorycnium hirsutum* (DHM2).

- **3,5-Διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM8)**

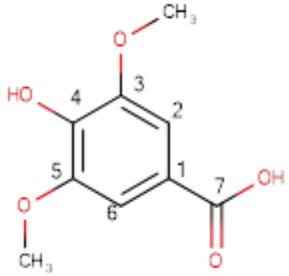
Η δεύτερη ζώνη από την προαναφερόμενη παρασκευαστική TLC χρωματογραφία παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλλίνης έδωσε αχνή γκρι χρώση.

Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη διαπιστώθηκε ότι ανήκει στο μεταβολίτη 3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ ή συριγκικό οξύ. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (Εικόνα 52) τα πρωτόνια H-2/H-6 συντονίζονται ως μια κοινή απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια στα 7.36 ppm, ενώ τα μεθοξύλια των θέσεων 3 και 5 εμφανίζονται ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 6 πρωτόνια στα 3.90 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 49 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Tian, *et al.*, 2018)



Εικόνα 52: Φάσμα ^{1H}-NMR της ένωσης CVM8

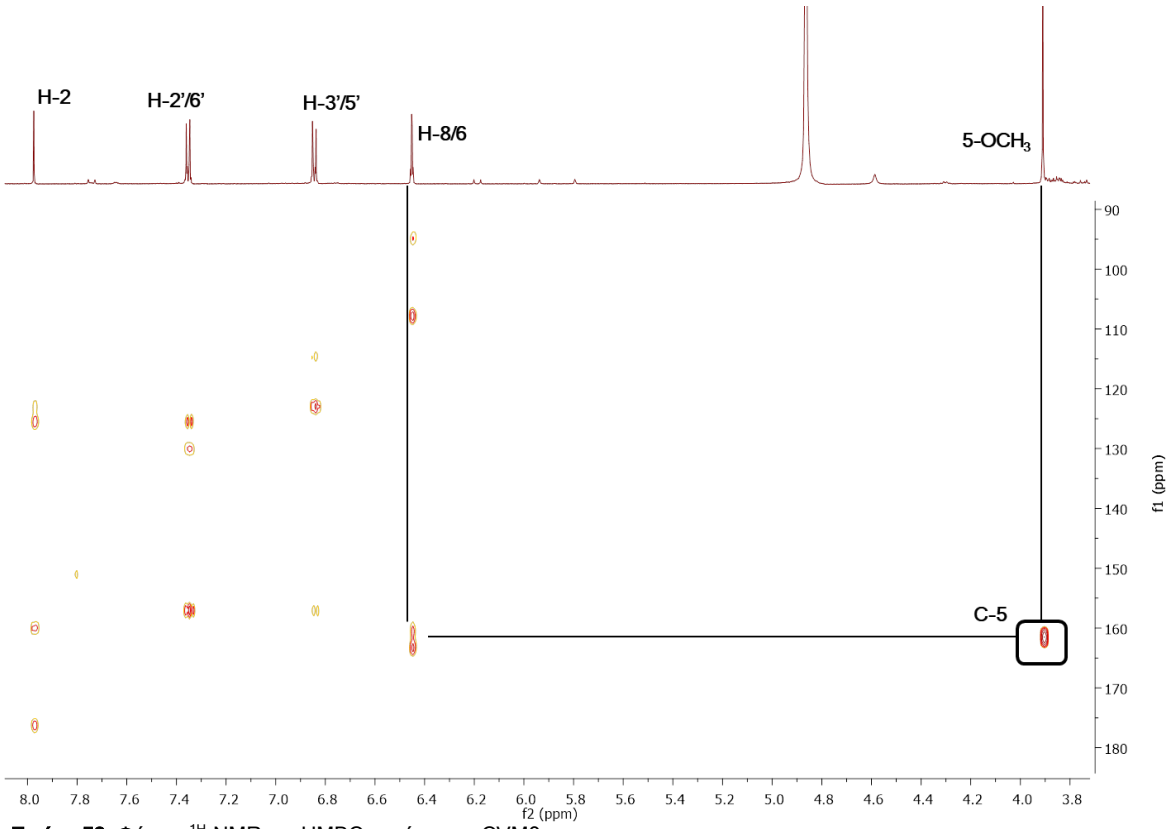
Πίνακας 49: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσηCVM9

CVM 9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*** **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*** **σε ppm**
1		123.6
2/6	7.36 (2H, s)	108.5
3/5	-	148.3
4	-	140.3
7	-	171.5
2-OCH_3 / 5-OCH_3	3.90 (6H, s)	56.6

Το συριγκικό οξύ μεταξύ άλλων έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Morus (Dalmagr, et al.*, 2017), καθώς και από τα είδη *Lentinula edodes* (Itoh, e*t al.,* 2010)*, Herba dendrobii* (Wei, *et al.,* 2012)*, Radix Isatidis* (Liu, *et al.*, 2003) *Alpinia calcarata Roscoe* (Nadeem, *et al.*, 2011) κ.ά. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση των προηγούμενων παραγώγων του βενζοϊκού οξέος, μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το γένος *Cytisus*. Αναφορικά με τις βιολογικές του ιδιότητες φαίνεται να καταστέλλει την ηπατική ίνωση (Itoh, *et al.,* 2010), έχει χαρακτηριστεί ως αντιδιαβητικός παράγοντας σε *in vivo* μελέτες (Muthukumaran, *et al.*, 2013) (Srinivasan, *et al.*, 2014), ενώ έχει εκδηλώσει και αξιοσημείωτη αντιβακτηριδιακή και αντιμικροβιακή δράση (Zaldivar, 1999) (Campos, 2003) (Shi, *et al.*, 2016). Τέλος, έχει εκδηλώσει αντιαγγειογενετικές ιδιότητες *σε in vivo* μοντέλο 'zebrafish embryo' επιδρώντας στον VEGF υποδοχέα (Karthik, *et al.*, 2014) καθώς και αντικαταθλιπτική και νευροπροστατευτική δράση σε *in vivo* μοντέλο ποντικών (Dalmagr, *et al.,* 2017).

❖ **5-*O*-Μεθυλογενιστεΐνη (CVM9)**

Η τρίτη ζώνη της παρασκευαστικής χρωματογραφίας του κλάσματος CL-22 παρουσίασε ασθενή απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης έδωσε υποκίτρινη χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι ο μεταβολίτης που αντιστοιχεί στην προαναφερόμενη ζώνη (CVM9) είναι η 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR εντοπίζεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή σε *δ* 7.97, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 152.4 ppm. Επίσης, στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές σε *δ* 7.35 και 6.84, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στο π-υποκατεστημένο σύστημα του δακτυλίου Β. Τα H-6 και H-8 συντονίζονται σε όμοια πεδία στα 6.45 ppm, ενώ η θέση της μεθοξυλομαδας (δ 3.90) προσδιορίστηκε από το φάσμα HMBC (εικόνα 53), όπου εμφανίστηκε ^{3}J σύζευξη των πρωτονίων της με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της θέσης 5 της γενίνης (*δ* 162.5), ο οποίος με τη σειρά του εμφανίζει σύζευξη με το πρωτόνιο H-6. Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με την αποθωράκιση του H-6 κατά 0.25 ppm περίπου.

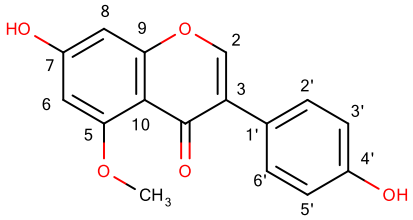


Εικόνα 53: Φάσμα ^{1H}-NMR και HMBCτης ένωσης CVM9

Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης προσδιορίστηκαν μετά από τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 50 σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Boumaza, *et al.*, 2006).

Πίνακας 50: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM9

CVM9 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	^{13}C NMR *δ* σε ppm
2	7.97 (1H, s)	152.4
3	-	126.8
4	-	177.6
5	-	162.7
6	6.45 (1H, *)	97.4
7	-	164.0
8	6.45 (1H, *)	96.0
9	-	161.2
10	-	109.0
1’	-	124.1
2’/6’	7.35 (2H, d, 8.9)	131.6
3’/5’	6.84 (2H, d, 8.9)	116.3
4’	-	158.6
5-OCH_3	3.9 (3H, s)	56.4

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα υπέργεια τμήματα αρκετών ειδών του γένους *Genista* (Boumaza, *et al.*, 2006) (Pistelli, *et al.*, 2000), το *Lupinus luteus* (Tahara, *et al.*, 1986), τις ρίζες του *Eriosema tuberosum* (Ma, *et al.*, 1998) κ.ά, αλλά όχι από το γένος *Cytisus*. Ως δομικό ανάλογο της γενιστεΐνης αναμένεται να εκδηλώνει παρόμοιες βιολογικές δράσεις με κυριότερη την εκδήλωση οιστρογονικότητας, αλλά η παρουσία του μεθοξυλίου φαίνεται να την περιορίζει σε κάποιο βαθμό (Morito, *et al.,* 2002).

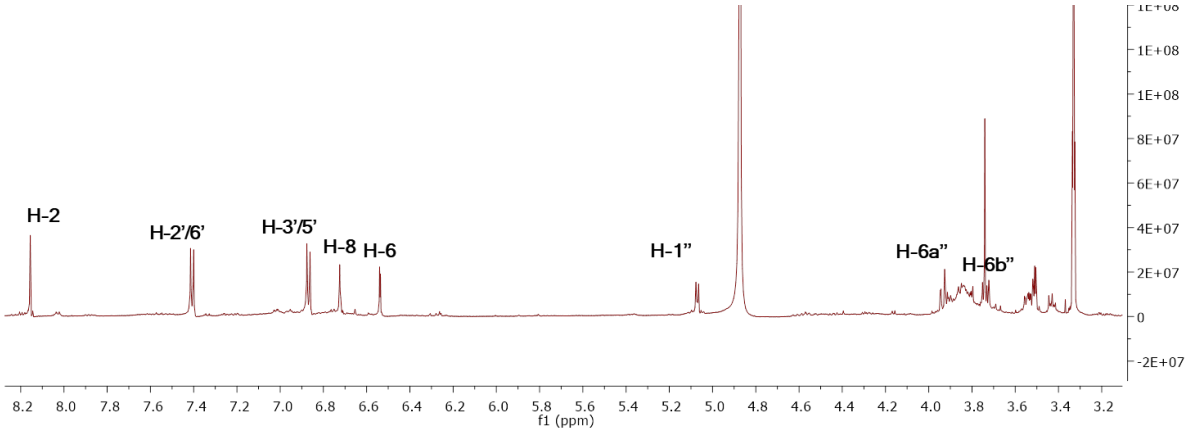
4.3.2.1.2 Μελέτη του κλάσματος CVM-F3

Το κλάσμα CVM-F3, το οποίο προήλθε από την κλασμάτωση του αρχικού εκχυλίσματος με CPC, φάνηκε να περιέχει έναν κυρίως μεταβολίτη σε υψηλή καθαρότητα.

❖ **7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (CVM10)**

Στο χρωματογράφημα TLC ο μεταβολίτης CVM10 εμφανίστηκε εμφανώς πολικότερος της γενιστεΐνης, απορροφούσε στα 254 nm και εμφάνισε έντονη γκρι χρώση έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλλίνης. Πρόκειται για το γλυκοζυλιωμένο παράγωγο του μεταβολίτη CVM3 (γενιστεΐνη), του οποίου το φάσμα 1H-NMR (εικόνα 54) παρουσιάζει ομοιότητες στην αρωματική περιοχή με το αντίστοιχο φάσμα της γενιστεΐνης. Οι διαφορές των δύο φασμάτων εντοπίζονται κυρίως στην οξυγονωμένη περιοχή, όπου στην περίπτωση του μεταβολίτη CVM10 εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων της γλυκοπυρανόσης, τα οποία απουσιάζουν από την αντίστοιχη περιοχή του φάσματος 1H-NMR

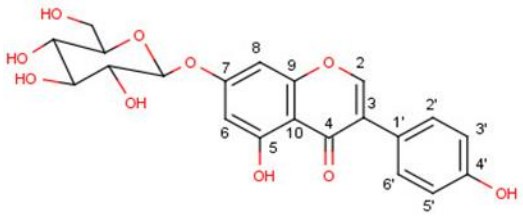
του μεταβολίτη CVM3. Πιο συγκεκριμένα, το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου συντονίζεται στα 5.01 ppm ως διπλή κορυφή με J = 7.0 Hz, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης C-6 της γλυκόσης εμφανίζονται στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος (δ 3.93 και 3.74, αντίστοιχα). Τα υπόλοιπα σήματα του σακχαριδικού σήματος εμφανίζονται στην περιοχή 3.55 - 3.45 ppm. Η αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 (δ 6.54) και H-8 (δ 6.72) συνάδει με την σύνδεση του σακχάρου στην 7 θέση της γενίνης, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τη μελέτη του φάσματος HMBC, όπου φάνηκε η σύζευξη ^{3}J του οξυγονωμένου αρωματικού άνθρακα C-7 (δ 164.7) με τα προαναφερόμενα πρωτόνια.



Εικόνα 54: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης CVM10

Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 51 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Liu, *et al.,* 2015).

Πίνακας 51: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM10

CVM10 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**13 C NMR δ σε ppm**
2	8.15 (1H, s)	155.3
3	-	126.1
4	-	182.5
5	-	164.0
6	6.54 (1H, d, 2.0)	101.0
7	-	164.7
8	6.72(1H, d, 2.0)	95.8
9	-	158.7
10	-	107.7
1'	-	122.8
2'/6'	7.41 (2H, d, 8.5)	131.4
3'/5'	6.87 (2H, d, 8.5)	116.3
4'	-	158.6
7- *O*-γλυκοπυρανόση		

1''	5.08 (1H, d, 7.0)	101.5
2''	3.50 (1H, *)	74.7
3''	3.51 (1H, *)	78.0
4''	3.43 (1H, t, 9.0)	71.3
5''	3.52 (1H, *)	78.6
6a''	3.93 (1H, dd, 12.0 / 1.8)	62.5
6b''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.4)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

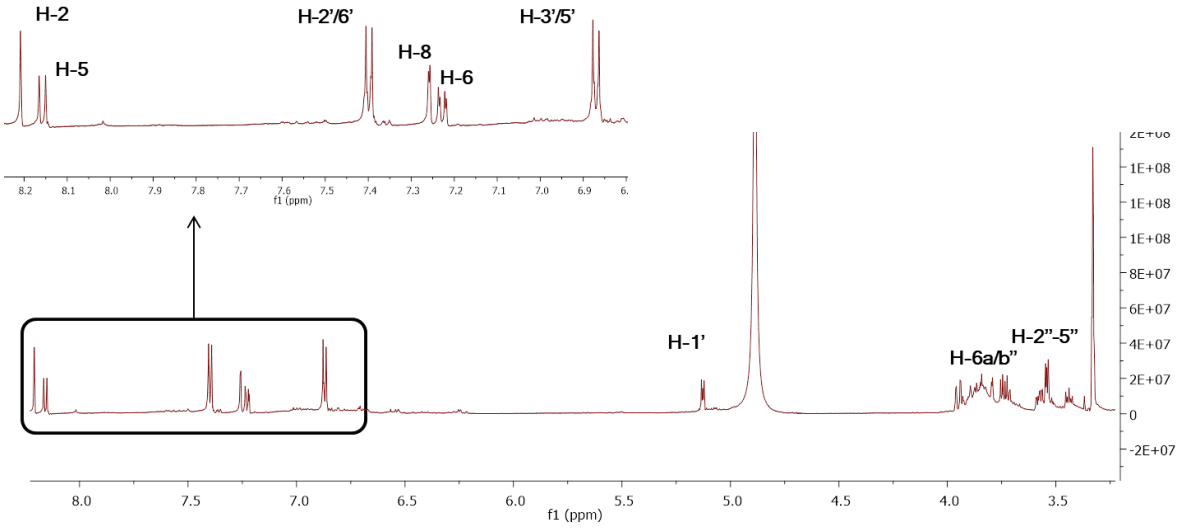
Ο 7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης ή αλλιώς γενιστίνη**,** αποτελεί ένα από τους κύριους μεταβολίτες της σόγιας (Kudou, e*t al.*, 1991), ενώ έχει εντοπισθεί και σε άλλα γένη της οικογένειας Leguminosae, όπως είναι τα *Sophora* (Zhang, *et al.*, 2014) (Tang, *et al.*, 2008), *Trifolium* (Isik, *et al.*, 2007)*, Calicotome* (Pistelli, *et al.*, 2003)*, Lupinus* (Kamel, 2003) (Katagiri, *et al.*, 2000) (Kaman, *et al.*, 1974) και *Genista* (Noccioli, *et al.*, 2011) (Tosun, *et al.*, 2009). Μολονότι απαντάται σε άλλα είδη του γένους *Cytisus*, μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το είδος *C. villosus*. Μεταξύ των βιολογικών της ιδιοτήτων ξεχωρίζει η οιστρογόνος δράση της (Allred, 2001) (Kato, *et al.*, 2000).

4.3.2.1.3 Μελέτη του κλάσματος CVM-F8

Στο κλάσμα CVM-F8 εντοπίστηκε η ύπαρξη ενός μεταβολίτη, ο οποίος παρουσίασε έντονη απορρόφηση στο UV και έδωσε γκρι χρώση έπειτα από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Λαμβάνοντας υπόψη τα φασματοσκοπικά δεδομένα, η προαναφερόμενη ουσία ταυτοποιήθηκε ως ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης.

❖ **7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης (CVM11)**

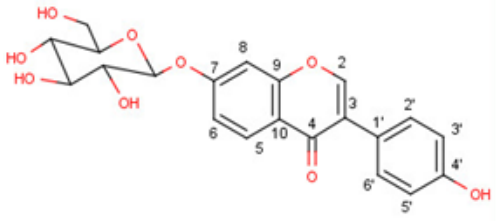
Το φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM11 (εικόνα 55) παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη CVM10, τόσο στην αρωματική όσο και την οξυγονωμένη περιοχή.



Εικόνα 55: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM11

Πιο συγκεκριμένα, το χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών πρωτόνιο H-2 εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε *δ* 8.21, ενώ τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.7 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και συντονίζονται σε δ 7.40 (H-2'/H-6') και 6.87 (H-3'/H-5'). Επίσης, το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκοπυρανόσης (*δ* 5.13), τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-6 (*δ* 3.95 και 3.74) και τα υπόλοιπα σήματα του σακχάρου (*δ* 3.55-3.40) σχεδόν ταυτίζονται με τα αντίστοιχα σήματα του μεταβολίτη CVM10. Από την άλλη μεριά, παρατηρούνται διαφορές στα σήματα των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου Α, τα οποία στην περίπτωση του μεταβολίτη CVM11 σχηματίζουν ένα ABX σύστημα το αποτελείται από μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.9 Hz (*δ* 8.16, H-5), μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 2.3 Hz (*δ* 7.26, H-8) και μία διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.9 και 2.3 Hz (*δ* 7.23, H-6). Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 52 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Liu, *et al.,* 2015).

Πίνακας 52: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσηCVM11

CVM11 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*** **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*** **σε ppm**
2	8.21 (1H, s)	155.2
3	-	125.7
4	-	178.2
5	8.16 (1H, d, 8.9)	128.3
6	7.23 (1H, dd, 8.9 / 2.3)	117.0
7	-	163.4
8	7.26 (1H, d, 2.3)	104.9
9	-	158.9
10	-	104.0
1'	-	123.6
2'/6'	7.40 (2H, d, 8.7)	131.5
3'/5'	6.87 (2H, d, 8.7)	116.3
4'	-	158.4
7- *O*-γλυκοπυρανόση		
1''	5.13 (1H, d, 7.4)	101.7
2''	3.55 (1H, m)	75.0
3''	3.53 (*)	78.0
4''	3.42 (1H, t, 9.0)	71.3
5''	3.58 (*)	78.5
6a''	3.95 (1H, dd, 12.0 / 1.8)	62.3
6b''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.4)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης έχει απομονωθεί από αρκετά φυτικά γένη με κυριότερους εκπροσώπους τα γένη *Pueraria* (Chkadua, *et al.*, 1996) (Seong, *et al.,* 2016),

Glycyrrhiza (Ji, *et al.*, 2016)*, Genista* (Tosun, *et al.*, 2003), ενώ αποτελεί ένα από τα κύρια ισοφλαβονοειδή της σόγιας (Kudou, *et al.*, 1991)((Wang, *et al.*, 2018). Επίσης, σχετικά πρόσφατα απομονώθηκε και από το *Cytisus striatus* (Abreu, *et al.,* 2017). Εμφανίζει ποικίλες και ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες είναι παρόμοιες με τις ιδιότητες των άλλων ισοφλαβονοριδών που περιέχονται στη σόγια.

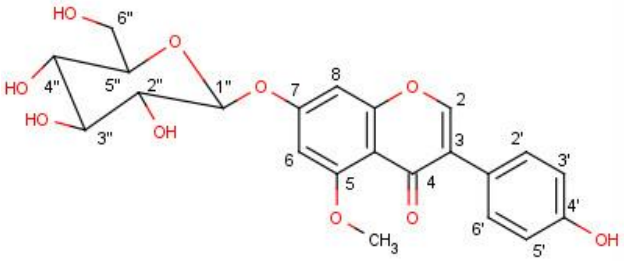
4.3.2.1.4 Μελέτη του κλάσματος CVM-F10

Στην περίπτωση του κλάσματος CVM-F10, από τη μελέτη του TLC χρωματογραφήματος, διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός μεταβολίτη (CVM12) ο οποίος είχε παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τους δύο προαναφερόμενους μεταβολίτες (CVM10 και CVM11) αλλά ήταν πιο πολικός.

❖ **7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (CVM12)**

Από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη CVM12 διαπιστώθηκε ότι αποτελεί το γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της ισοφλαβόνης CVM9. Πιο συγκεκριμένα, η αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM12 είναι παρόμοια με την αντίστοιχη περιοχή του φάσματος του μεταβολίτη CVM9. Η διαφοροποίηση έγκειται στην αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 (δ 6.74) και H-8 (δ 6.82), γεγονός που συνάδει με τη σύνδεση της γλυκόσης στη θέση 7 της γενίνης. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR του μεταβολίτη CVM12 εμφανίζονται μια σειρά από σήματα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια του σακχάρου και απουσιάζουν από την αντίστοιχη περιοχή του φάσματος του μεταβολίτη CVM9. Πιο συγκεκριμένα, το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης εμφανίζεται στα 5.10 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 7.4 Hz, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 101.7. Επίσης, τα χαρακτηριστικά μεθυλενικά πρωτόνια H-6''a και H-6''b συντονίζονται στα 3.96 και 3.72 ppm, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται στα 3.57-3.41 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν μετά από τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 53.

Πίνακας 53: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CVM12

CVM12 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ **σε ppm (**J **σε Hz)**	**^{13} C NMR** δ **σε ppm**
2	8.03 (1H, s)	152.8
3	-	125.5

4	-	178.5
5	-	161.5
6	6,74 (1H, d, 2.2)	98.4
7	-	162.0
8	6,82 (1H, d, 2.2)	97.5
9	-	159.5
10	-	102.5
5-OCH_3	3.93 (3H, s)	56.6
1'		122.7
2'/6'	7.35 (2H, d, 8.7)	131.5
3'/5'	6.85 (2H, d, 8.7)	116.1
4'	-	156.7
7-*O*-γλυκοπυρανόση		
1''	5.1 (1H, d, 7.4)	101.7
2''	3.53 (1H, *)	74.9
3''	3.53 (1H, *)	78.2
4''	3.41 (1H, *t*, 9.3)	71.6
5''	3.57 (1H, m)	78.8
6a''	3.96 (1H, *)	62.7
6b''	3.72 (1H, dd, 12.0 / 6.3)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη των πρωτονίων

Μολονότι ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης δεν έχει εντοπισθεί μέχρι σήμερα στο γένος *Cytisus*, έχει απομονωθεί από αρκετά φυτικά είδη όπως τα *Eriosema tuberosum* (Ma, *et al.,* 1998)*, Desmodium gangeticum* (Mishra, *et al*., 2005) και *Iris tingitana* (Salwa, *et al*., 2009).

4.3.2.1.5 Μελέτη του κλάσματος CVM-F11

Με σκοπό την παραλαβή του περισσότερο πολικού μεταβολίτη του κλάσματος CVM-F11, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη. Αναλύθηκαν περίπου 20 mg του κλάσματος και μετά το πέρας του διαχωρισμού παραλήφθηκε ο μεταβολίτης CVM13.

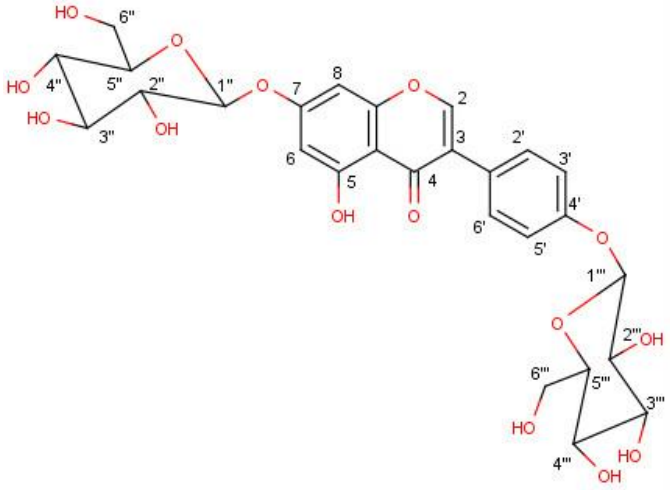
❖ **7, 4'-δι-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (CVM13)**

Από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη CVM13 διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα διγλυκοσιδικό παράγωγο της γενιστεΐνης. Στο φάσμα ^{1}H-NMR, εκτός από τα χαρακτηριστικά σήματα της γενιστεϊνης, παρατηρούμε την ύπαρξη δύο ανωμερικών πρωτονίων σε *δ* 5.06 και 4.98, τα οποία εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 7.5 Hz. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συντονίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα των μεθυλενίων της θέσης C-6 των δύο σακχαριδικών μονάδων, ενώ τα πρωτόνια H-4'' και 4''' (*δ* 3.42) εμφανίστηκαν ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 9.0 Hz, γεγονός που συνάδει με την παρουσία γλυκοπυρανοσών. Τα πρωτόνια H-6 (*δ* 6.55) και H-8 (*δ* 6.74) είναι εμφανώς αποθωρακισμένα, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τη σύνδεση της μίας σακχαριδικής μινάδας στην 7 θέση της γενίνης. Η θέση σύνδεσης της δεύτερης γλυκοπυρανόσης διαπιστώθηκε από το φάσμα HMBC και συγκεκριμένα τη σύζευξη ^3J ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο σε *δ* 4.98 και τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της θέσης C-4' (*δ* 158.6). Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 54 προσδιορίστηκαν με τη

βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Parajuli, *et al.,* 2017).

Πίνακας 54: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης

CVM13 (MeOD)



ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
2	8.21 (1H, s)	155.6
3	-	124.2
4	-	182.4
5	-	164.0
6	6.55 (1H, d, 2.0)	101.0
7	-	164.4
8	6.74 (1H, d, 2.0)	95.7
9	-	159.1
10	-	107.7
1'	-	125.9
2'/6'	7.53 (2H, d, 8.5)	131.2
3'/5'	7.20 (2H, d, 8.5)	117.4
4'	-	158.6
	7- *O*-γλυκοπυρανόση	
1''	5.06 (1H, *d*, 7.5)	99.6
2''	3.50 (1H, *)	74.7
3''	3.50 (1H, *)	78.1
4''	3.42 (1H, t, 9.0)	71.3
5''	3.52 (1H, *)	78.6
6a''	3.93 (1H, dd, 12.0 / 1.8)	62.5
6b''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.4)	
	4'- *O*-γλυκοπυρανόση	
1'''	4.98 (1H, d, 7.5)	102.0
2'''	3.50 (1H, *)	74.7
3'''	3.50 (1H, *)	78.1
4'''	3.42 (1H, t, 9.0)	71.3
5'''	3.49 (1H, *)	78.4
6a'''	3.93 (1H, dd, 12.0 / 1.8)	62.5
6b'''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.4)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο 7, 4'-δι-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης έχει απομονωθεί από πολλά φυτικά είδη με κυριότερους εκπροσώπους τα γένη *Lupinus* (Franski, *et al.,* 1999) (Kachlicki, *et al.*, 2005), *Sophora* (Tang, *et al.*, 2001), *Genista* (Noccioli, *et al.*, 2012) (Noccioli, *et al.*, 2011), ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή της από το γένος *Cytisus.*

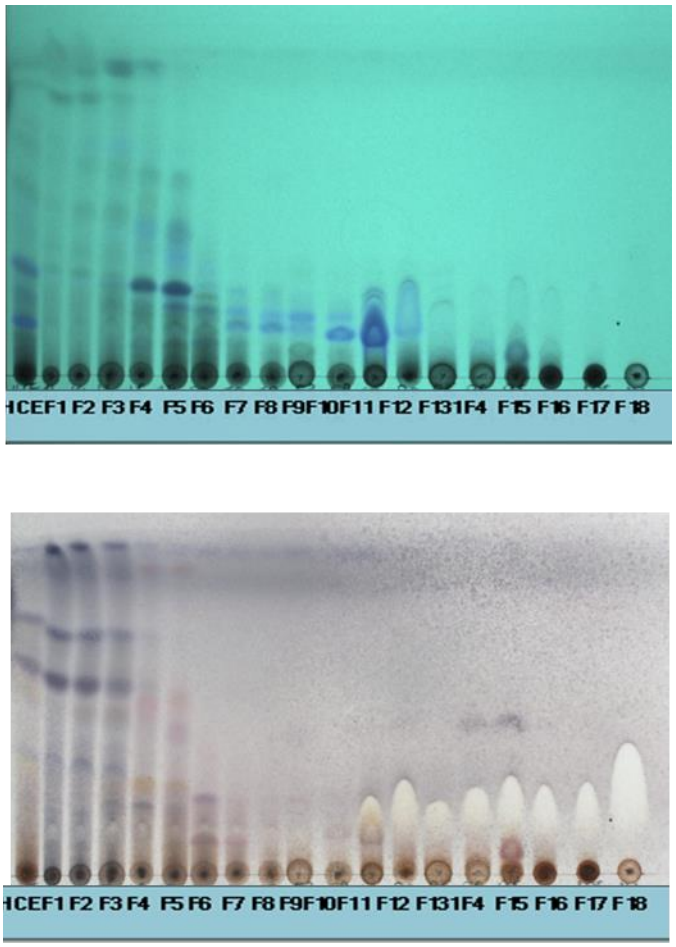
4.3.3 Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Hippocrepis comosa* (HCE)

Για την κλασμάτωση εκχυλίσματος HCE, το οποίο έχει παρασκευασθεί από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Hippocrepis comosa*, αποφασίστηκε η χρήση ενός διφασικού συστήματος μεσαίας πολικότητας το οποίο απαρτίζεται από Hex/EtOAc/MeOH/H2O σε αναλογία 4/6/5/5. Με βάση τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού ελέγχου, το προαναφερόμενο σύστημα διαλυτών αποδείχτηκε κατάλληλο για τον αρχικό διαχωρισμό των μεταβολιτών του HCE, καθώς παρατηρήθηκε πλήρης διάλυση του εκχυλίσματος, ταχύς διαχωρισμός των φάσεων και ικανοποιητική κατανομή των περιεχόμενων ουσιών και στις δύο φάσεις του συστήματος.
Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 200 ml. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 700 mg, το οποίο διαλύθηκε σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία περίπου 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη σε 'ascending mode' με ταχύτητα περιστροφής 1000 στροφές/min και ροή 5 ml/min, ενώ μετά την εξισορρόπηση του συστήματος ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή των κλασμάτων. Συλλέχθηκαν 80 κλάσματα των 5 ml, έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες, ενώ στη συνέχεια έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή σε 'descending mode' μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Τελικά προέκυψαν συνολικά 115 κλάσματα εκ των οποίων τα 80 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 35 κλάσματα.

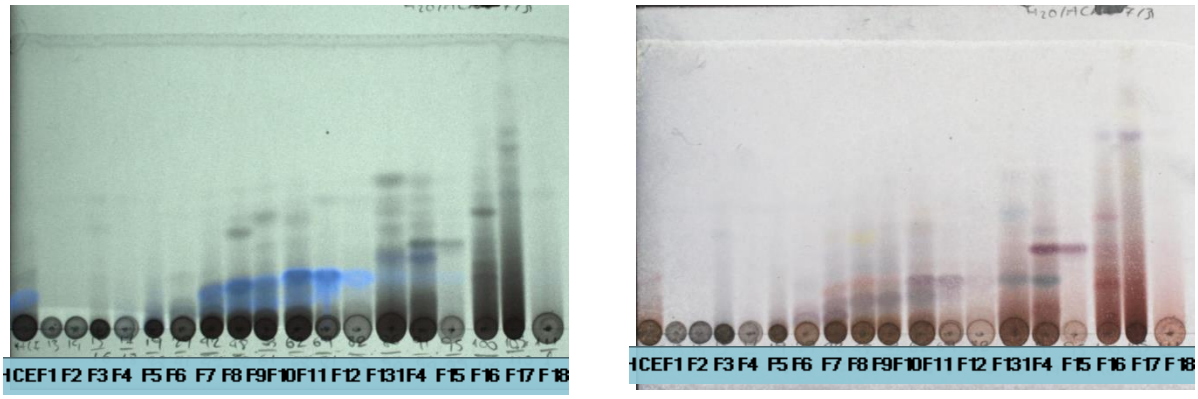
Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης Toluene/EtOAc 80/20 και CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες 95/5, 90/10 και 80/20 πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 18 κλάσματα τα οποία αναφέρονται στον πίνακα 55 ενώ στις εικόνες 56-57 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων τόσο με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH 85/15 όσο και TLC αντίστροφης φάσης σε σύστημα H_2O/ACN 70/30, αντίστοιχα.

Πίνακας 55: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του εστερικού εκχυλίσματος HCE

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
HCE-F1	13	65.5
HCE-F2	14	78.0
HCE-F3	15-16	53.2
HCE F4	17-18	30.2
HCE-F5	19-28	40.5
HCE-F6	29-41	30.7
HCE-F7	42-47	11.6
HCE-F8	48-52	9.4
HCE-F9	53-61	10.9
HCE-F10	62-68	8.1
HCE-F11	69-81	10.0
HCE-F12	82-85	5.6
HCE-F13	86-90	12.7
HCE-F14	91-94	9.5
HCE-F15	95-99	2.1
HCE-F16	100-104	39.2
HCE-F17	105-110	88.4
HCE-F18	111-T	50.6



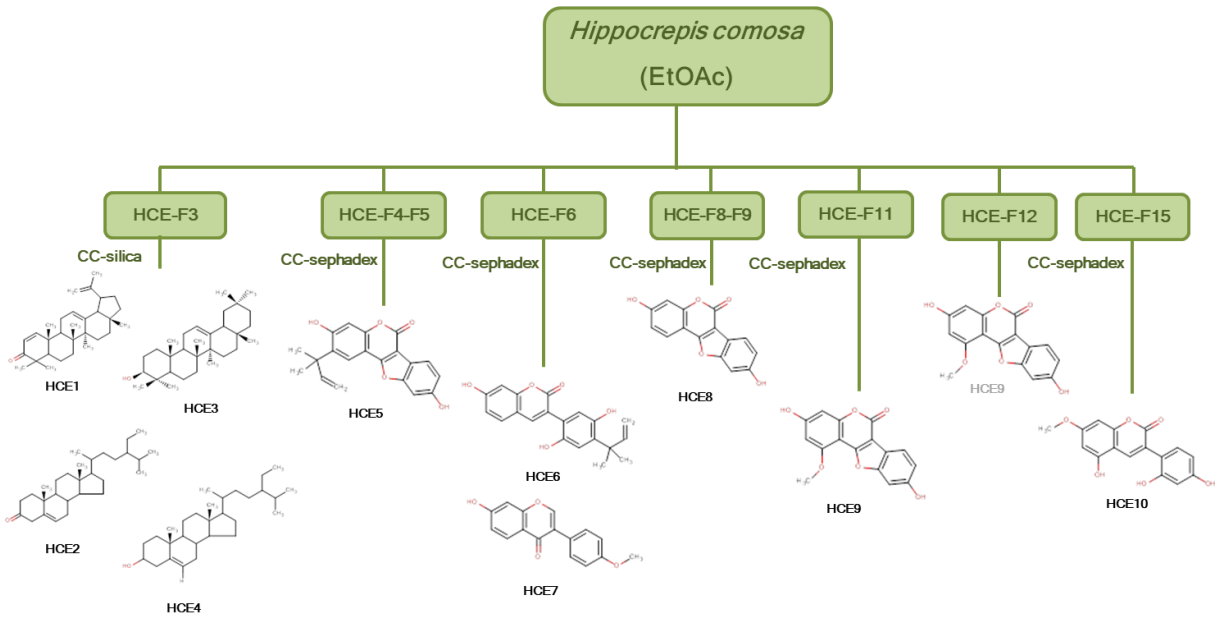
Εικόνα 56 :Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του HCE σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (95/5).



Εικόνα 57: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του HCE σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30).

4.3.3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών του εκχυλίσματος HCE

Με βάση τα αποτελέσματα του TLC χρωματογραφικού ελέγχου, από τα 18 κλάσματα που προέκυψαν μετά από επεξεργασία του εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Hippocrepis comosa* με την τεχνική του FCPC, δύο περιείχαν μια ένωση σε καθαρή μορφή, ενώ από την περαιτέρω μελέτη επτά κλασμάτων με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές απομονώθηκαν άλλες εννέα ενώσεις. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία:



Σχήμα 4: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Hippocrepis comosa* (HCE).

4.3.3.1.1 Μελέτη του κλάσματος HCE-F3

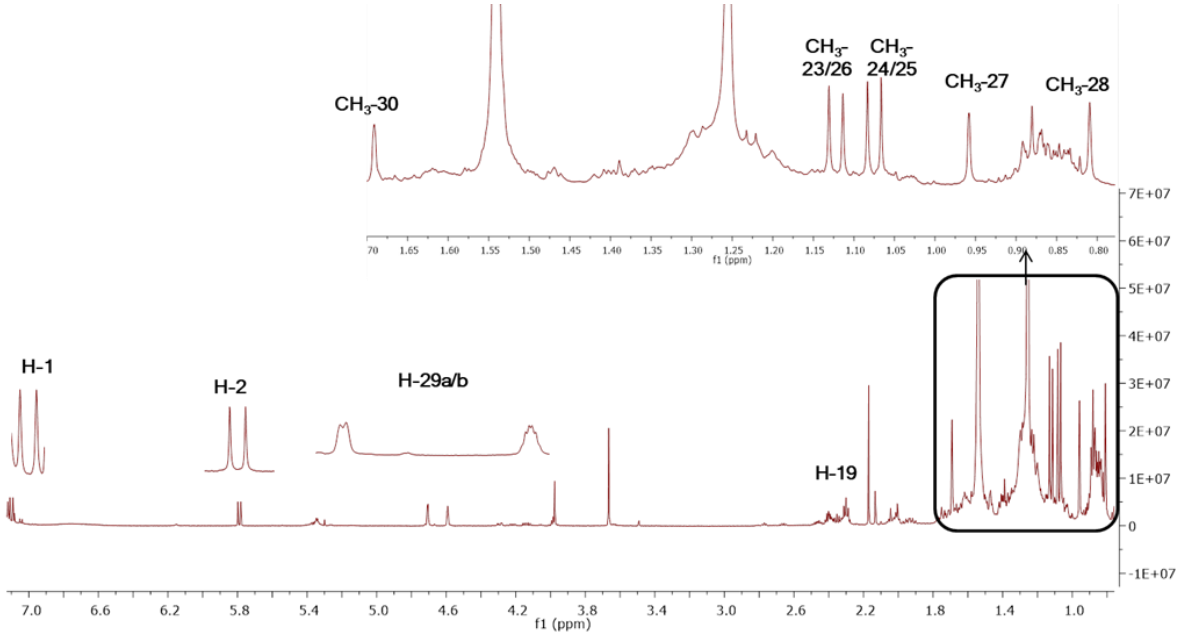
Από τον TLC χρωματογραφικό έλεγχο, το κλάσμα HCE-F3 φάνηκε να περιέχει σχετικά άπολες ουσίες, οι οποίες ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενοειδών. Έτσι, για την επεξεργασία του χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης (CL: column_ chromatography), με πληρωτικό υλικό silica gel 'flash' και κινητή φάση μίγμα διαλυτών κυκλοεξάνιο (c-Hex) και οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από τη διαδικασία αρχικά συλλέχθηκαν 109 κλάσματα, ενώ μετά τις συνενώσεις προέκυψαν 15 κλάσματα.

Δύο από τα προκύπτοντα κλάσματα (CL9-10, CL11-12) φάνηκε να περιέχουν έναν κοινό κύριο μεταβολίτη και για το λόγο αυτό συνενώθηκαν και επεξεργάστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική TLC, ώστε να επιτευχθεί η απομόνωσή του. Έτσι, περίπου 10mg του δείγματος διαλύθηκαν σε CH_2Cl_2 και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5, ενώ το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών c-Hex/EtOAc 95/5. Από

την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκε ο μεταβολίτης HCE1 της κατηγορίας των τερπενοειδών.

❖ **Δ^1-λουπενόνη (HCE1)**

Ο μεταβολίτης HCE1 παρουσίασε ελαφριά απορρόφηση στα 254nm, έπειτα από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης έδωσε έντονη μπλε χρώση και μετά τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως Δ^1-λουπενόνη ή γκλοχιδόνη. Η Δ^1-λουπενόνη διαθέτει το βασικό σκελετό των τερπενίων τύπου λουπανίου και μεταξύ των κύριων δομικών χαρακτηριστικών της περιλαμβάνονται οι δύο διπλοί δεσμοί στις θέσεις 1(2) και 20(29) και το καρβονύλιο στη θέση 3 του βασικού σκελετού.



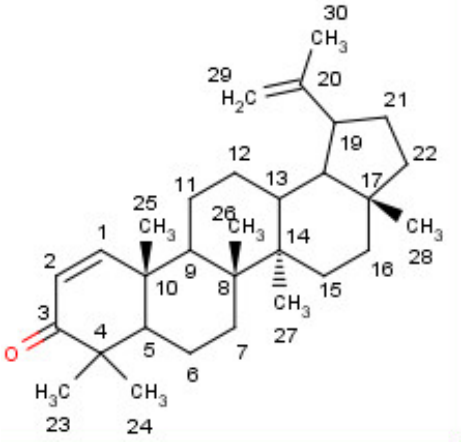
Εικόνα 58: Φάσμα ^{1H}-NMR του μεταβολίτη HCE1

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης (εικόνα 58) παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές κορυφές των μεθυλενικών πρωτονίων H-29a (d, J = 2.2 Hz) και H-29b (d, J = 2.2 Hz) σε δ 4.65 και 4.57, των οποίων ο άνθρακας συντονίζεται στα 109.5 ppm. Επίσης, Το πρωτόνιο H-19 εμφανίζεται στα 2.38 ppm ως πολλαπλή κορυφή, ενώ στην αλειφατική περιοχή του φάσματος εντοπίζονται 7 απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσων C-23 (δ 1.11), C-24 (δ 1.06), C-25 (δ 1.04), C-26 (δ 1.09), C-27 (δ 0.94), C-28 (δ 0.79) και C-30 (δ 1.67). Η κορυφή των μεθυλικών πρωτονίων H-30 εμφανίζεται σαφέστατα αποθωρακισμένη λόγω της γειτνίασης με τον διπλό δεσμό Δ 20(29), ενώ τα όλα τα προαναφερόμενα σήματα παρουσιάζουν ομοιότητα με τα αντίστοιχα σήματα της λουπεόλης, η οποία είναι από τα πιο διαδεμένα τριτερπένια της κατηγορίας. Ωστόσο, στην περίπτωση του μεταβολίτη HCE1 απουσιάζει από την οξυγονωμένη περιοχή η κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσεως C-3, καθώς σε αυτή τη θέση όπως προαναφέρθηκε υπάρχει καρβονύλιο, του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα 205.7 ppm. Αντίθετα, στην ολεφινική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE1 εμφανίζονται επιπλέον τα πρωτονια H-1

(d, 10.2 Hz) και H-2 (d, 10.2 Hz), τα οποία συντονίζονται στα 7.09 και 5.79 ppm, αντίστοιχα. Η έντονη αποθωράκιση του άνθρακα της θέσης C-1 (δ 160.1) συνάδει με τη γειτνίαση του συγκεκριμένου διπλού δεσμού με το καρβονύλιο της θέσης 3. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 56 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Aguiar, *et al.*, 2005).

Πίνακας 56: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE1

HCE1 ($CDCl_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	7.09 (1H, d, 10.2)	160.1
2	5.79 (1H, d, 10.2)	125.4
3	-	205.7
4	-	44.5
5	1.53 (1H, *)	53.1
6	1.54 (2H, *)	19.0
7	1.47 (1H, *)	33.9
8	-	42.0
9	1.55 (1H, *)	44.5
10	-	39.6
11	1.61 (1H, *) / 1.37 (1H, *)	21.4
12	1.73 (1H, *) / 1.10 (1H, *)	25.1
13	1.71 (1H, *)	38.2
14	-	42.8
15	1.95 (1H, *) / 1.20 (1H, *)	27.4
16	1.49 (1H, *) / 1.38 (1H, *)	35.3
17	-	43.0
18	1.37 (1H, *)	48.2
19	2.38 (1H, m)	48.4
20	-	151.0
21	1.92 (1H, *) / 1.25 (1H, *)	29.8
22	1.38 (1H, *) /1.18 (1H, *)	39.8
23	1.11 (1H, s)	27.9
24	1.06 (1H, s)	21.4
25	1.04 (1H, s)	19.2
26	1.09 (1H, s)	16.5
27	0.94 (1H, s)	14.5
28	0.79 (1H, s)	18.2
29	4.65 (1H, d, 2.2) / 4.57 (1H, d, 2.2)	109.5
30	1.67 (3H, s)	20.0

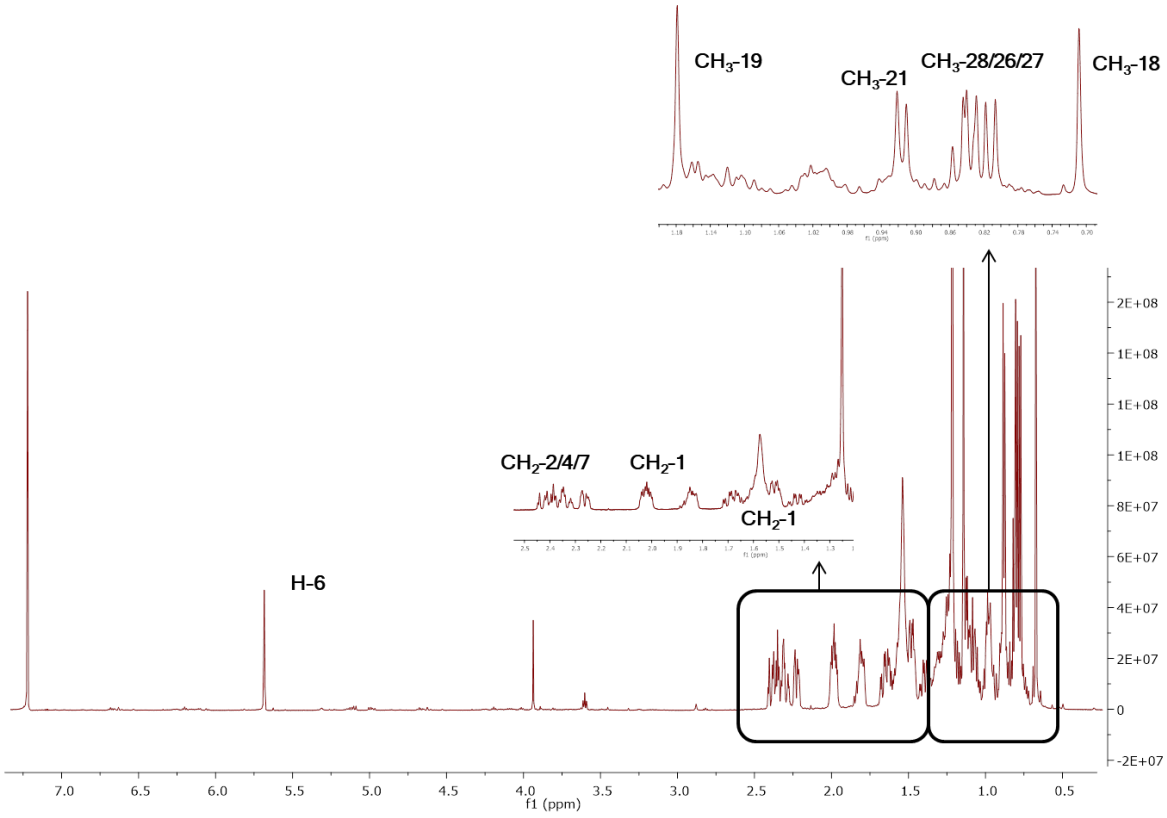
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η γκλοχιδόνη αρχικά απομονώθηκε από είδη του γένους *Glochidion* (Puapairoj, e*t al.*, 2005) (Srivastava, *et al.*, 1988), απ' όπου πήρε και το όνομά της, αλλά έκτοτε έχει εντοπισθεί στα γένη *Maytenus* (Nunez, *et al.*, 2005), *Byrsonima* (Aguiar, *et al.,* 2005), *Ailanthus* (Thongnest, *et al.*, 2017) και *Salvia* (Çulhaoğlu, *et al.*, 2015) ενώ απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Hippocrepis.* Διαθέτει αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, όπως είναι η αντικαρκινική (Tanaka, *et al.*, 2004;) η αντιφλεγμονώδης (Reyes, *et al.*, 2006) και η ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου χοληνεστεράση (Çulhaoğlu, *et al.*, 2015).

Τα επόμενα δύο κλάσματα (CL17-27 CL28-35), τα οποία προήλθαν από την υγρή χρωματογραφία στήλης στο κλάσμα HCE-F3, φάνηκε να περιέχουν δύο κοινούς μεταβολίτες και για το λόγο αυτό συνενώθηκαν και επεξεργάστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική TLC σε σύστημα ανάπτυξης Toluene/EtOAc 80/20. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν δύο μεταβολίτες (HCE2 και HCE3), οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων.

❖ ***β*-Σιτοστερόνη (HCE2)**

Στον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, ο μεταβολίτης HCE2 παρουσίασε μια ελαφριά απορρόφηση στα 254 nm και μετά από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με θεϊκή βανιλλίνη εμφάνισε καφέ χρώση. Ακολούθησε η φασματοσκοπική μελέτη της απομονωμένης ουσίας, η οποία κατέληξε στην ταυτοποίησή της ως *β*-σιτοστερόνη.



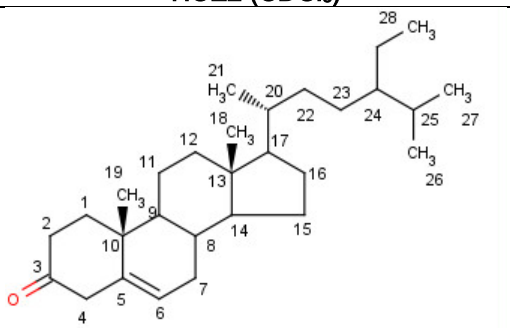
Εικόνα 59: Φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE2

Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR του μεταβολίτη HCE2 (εικόνα 59) παρατηρήσαμε τα χαρακτηριστικά σήματα των μεθυλομάδων της σιτοστερόνης και

συγκεκριμένα: (i) τις δύο απλές κορυφές σε δ 0.71 και 1.18 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-18 και H-19, (ii) οι τρεις διπλές κορυφές (J = 6.5 Hz) σε δ 0.83, 0.81 και 0.92 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-26, H-27 και H-21 και (iii) η τριπλή κορυφή (J = 7.5 Hz) σε δ 0.87 που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-28. Αντίθετα, απουσιάζει από την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος το σήμα που αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσης C-3, καθώς στην περίπτωση του μεταβολίτη HCE2 στη συγκεκριμένη θέση υπάρχει καρβονυλικός άνθρακας (δ 199). Η παρουσία του προαναφερόμενου καρβονυλίου έχει ως αποτέλεσμα την αποθωράκιση (i) των γειτονικών μεθυλενικών πρωτονίων των θέσεων: C-2 που συντονίζονται στα 2.44 και 2.32 ppm, C-1 που συντονίζονται στα 2.01 και 2.68 ppm και C-4 που συντονίζονται στα 2.40 και 2.33 ppm (ii) του ολεφινικού άνθρακα της θέσης C-5 που συντονίζεται στα 172.0 ppm και (iii) του ολεφινικού πρωτονίου H-6 που εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε δ 5.72. τέλος, στο φάσμα COSY παρατηρείται σύζευξη του H-6 με το μεθυλενικό πρωτόνιο H-7 σε δ 2.38 επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη του διπλού δεσμού στις θέσεις 5 και 6. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων, οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 57, προσδιορίσθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 57: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE2

HCE2 ($CDCl_3$)



ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	2.01 (1H, *) / 1.68 (1H, *)	35.5
2	2.44 (1H, *) / 2.32 (1H, *)	34.0
3	-	199.0
4	2.40 (1H, m) / 2.33 (1H, *)	33.5
5	-	171.6
6	5,72 (1H, s)	123.8
7	2.38 (1H, *) / 2.26 (1H, *)	32.7
8	1.50 (1H, m)	35.0
9	0.90 (1H, *)	53.6
10	-	38.0
11	1.43 (2H, m)	21.0
12	2.00 (1H, *) / 1.16 (1H, *)	39.3
13	-	41.4
14	1.01 (1H, *)	56.0
15	1.6 (1H, m) / 1.07 (1H, m)	24.1
16	1.86 (1H, *m) / 1.29 (1H, *m)	28.0
17	1.11 (1H, *)	56.0
18	0.71 (3H, s)	11.9
19	1.18 (3H, s)	17.2
20	1.35 (1H, m)	36.0
21	0.92 (3H, d, 6.5)	18.5
22	1.31 (1H, *) /1.00 (1H, *)	33.8

23	1.15 (2H, *)	23.0
24	0.91 (1H, m)	46.0
25	1.64 (1H, m)	29.1
27	0.81 (3H, d, 6.5*)*	19.1
26	0.83 (3H, d, 6.5*)*	19.7
29	1.2 (2H, *)	23.0
28	0.87 (3H, t, 7.5)	14.1

Μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από το μελετούμενο είδος και γένος αλλά έχει απομονωθεί από πολλά φυτικά είδη (Karuppiah, *et al.*, 2005) (Kanok-on, *et al.*, 2012) (Zhou, *et al.*, 2015) ενώ έχει αναφερθεί ότι εκδηλώνει υπογλυκαιμική δράση (Alexander-Lindo, 2004).

- **β-Αμυρίνη (HCE3)**

Ο μεταβολίτης HCE3 δεν παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm και έπειτα από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με θεϊκή βανιλλίνη έδωσε μπλε χρώση. Έπειτα από φασματοσκοπική μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τη *β*-αμυρίνη, η οποία μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή της από το γένος *Hippocrepis*. Η περιγραφή της *β*-αμυρίνης παρατίθεται στην παράγραφο 4.3.1.1 όπου αναφέρεται η απομόνωσή της από το είδος *Dorycnium hirsutum*, (DHM1).

- **β-Σιτοστερόλη (HCE4)**

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης παρουσίασε παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τον μεταβολίτη HCE3, ενώ με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποίηθηκε ως *β*-σιτοστερόλη η οποία μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από το γένος *Hippocrepis.* Η περιγραφή της παρατίθεται στην παράγραφο 4.3.2.1, όπου αναφέρεται η απομόνωσή της από το είδος *Cytisus villosus*, (CVM1).

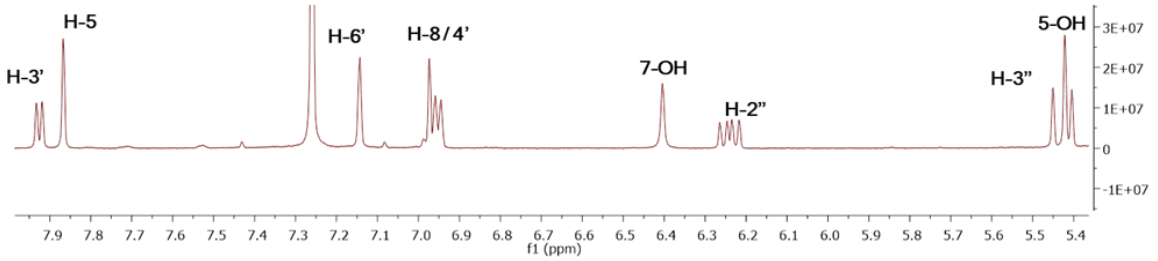
4.3.3.1.2 Μελέτη του κλάσματος HCE-F4 και HCE-F5

Ο χρωματογραφικός έλεγχος των δύο κλασμάτων έδειξε πως περιέχουν έναν κύριο μεταβολίτη σε μεγάλη περιεκτικότητα. Με σκοπό την απομόνωσή του πραγματοποιήθηκε αρχικά η συνένωση των δύο κλασμάτων και ακολούθησε επεξεργασία με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση Sephadex LH-20 και ως διαλύτη έκλουσης ο οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc).

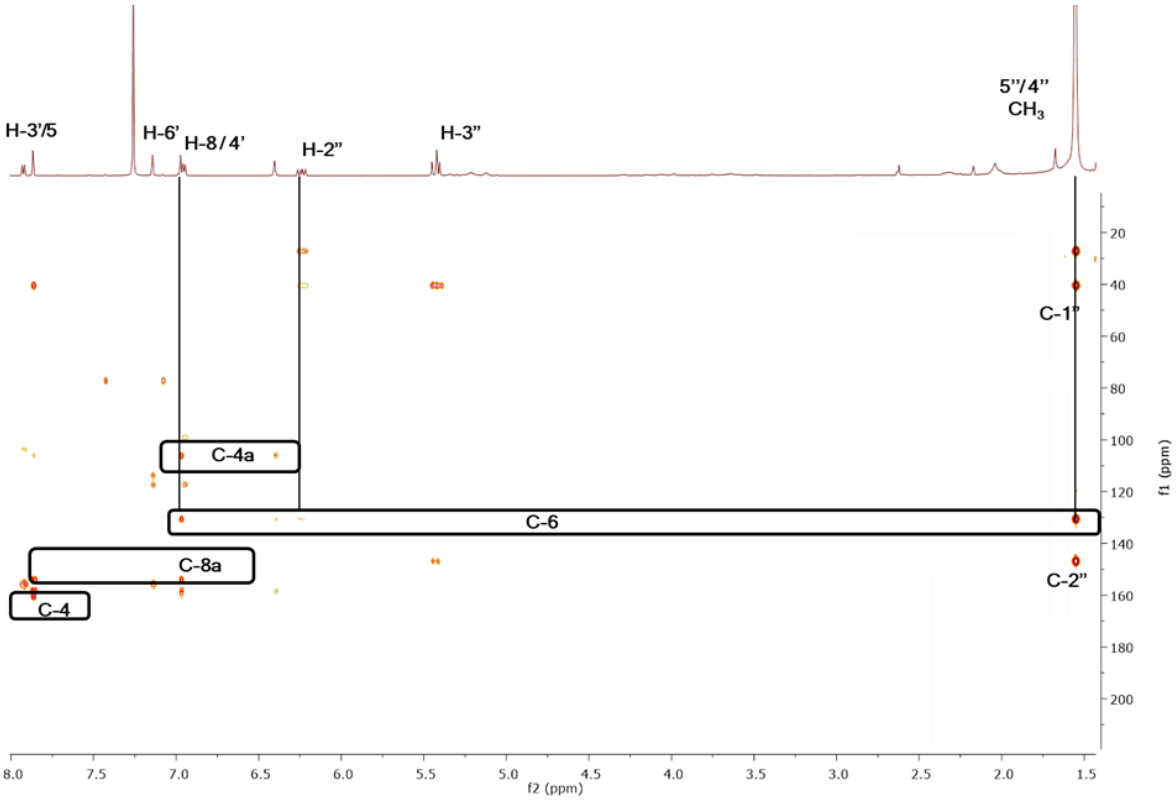
- **6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)-5,7'-διυδροξυκουμεστάνιο ή 6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)κουμεστρόλη (HCE5)**

Ο μεταβολίτης HCE5 παρουσίασε απαλή κυανή απορρόφηση στα 254 nm και μετά από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο βανιλλίνης έδωσε απαλή μωβ χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη συνετέλεσε στην ταυτοποίησή του ως ένα πρενυλιωμένο παράγωγο κουμεστανίου. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 60) παρατηρούμε τα σήματα του ABX συστήματος του δακτυλίου D, το οποίο αποτελείται από μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.7 Hz (*δ* 7.92), μία ευρεία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.7 Hz (*δ* 6.95) και μία ευρεία

απλή κορυφή (*δ* 7.14). Οι προαναφερόμενες κορυφές αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3', H-4' και H-6', ενώ τα πρωτόνια H-5 και H-8 συντονίζονται ως απλές κορυφές σε *δ* 7.87 και 6.97, αντίστοιχα. Επίσης, τα σήματα των ολεφινικών πρωτονίων της α,α-διμεθυλαλλυλο- ομάδας, τα οποία εμφανίζονται ως μία διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 17.0 και 9.7 Hz (*δ* 6.25, H-2'') και μία πολλαπλή κορυφή που ολοκλρώνει για δύο πρωτόνια αντιστοιχεί στο μεθυλένιο της θέσης C-3'' (*δ* 5.42). Τα μεθύλια της προαναφερόμενης ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια στα 1.54 ppm.



Εικόνα 60: Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη HCE5

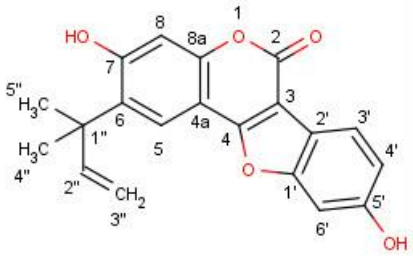


Εικόνα 61: Φάσμα ^{1}H και HMBC του μεταβολίτη HCE5

Ωστόσο, τα δεδομένα του φάσματος HMBC (εικόνα 61) αποδείχτηκαν καθοριστικά στην προσπάθεια προσδιορισμού της δομής του μεταβολίτη. Πιο συγκεκριμένα, το πρωτόνια H-3' και H-6' εμφανίζουν συζεύξεις με τους άνθρακες C-3 (*δ* 103.7) και C-1' (*δ* 155.8), αντίστοιχα. Επίσης, το πρωτόνιο H-5 δακτυλίου A εμφανίζει σύζευξεις με τους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες C-8a (*δ* 154.2), C-4 (*δ* 160.0) και C-7 (*δ* 158.7), ενώ το πρωτόνιο H-8 του ίδιου δακτυλίου παρουσιάζει συζεύξεις τόσο τους οξυγονωμένους άνθρακες C-8a (*δ* 154.2) και C-7

(*δ* 158.7), όσο και με τους άνθρακες C-4a (*δ* 106.1) και C-6 (*δ* 130.5). Ο άνθρακας C-6 παρουσιάζει με τη σειρά του συζεύξη ^{3}J με τα μεθυλικά πρωτόνια της διμεθυλαλλυλικής ομάδας (*δ* 1.54), γεγονός που φανερώνει τη θέση σύνδεσης της τελευταίας στο βασικό σκελετό. Το είδος των κορυφών μαρτυρά υποκατάσταση στη θέση 6. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη HCE5 προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 58 και είναι σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Choi, *et al.*, 2010).

Πίνακας 58: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE5

HCE5 ($CDCl_3$)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** *δ* **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** *δ* **σε ppm**
2	-	158.5
3	-	103.7
4	-	160.3
4a	-	106.1
5	7.87 (1H, s)	119.5
6	-	130.5
7	-	158.7
8	6.97 (1H, s)	106.2
8a		154.2
1’	-	155.8
2’	-	118.0
3’	7.92 (1H, d, 8.7)	122.1
4’	6.95 (1H, brd, 8.7)	114.0
5’	-	155.8
6’	7.14 (1H, brs)	99.2
1’’	-	40.6
2’’	6.25 (1H, dd, 17.0 / 9.7)	147.1
3’’	5.42 (2H, m)	115.2
4’’/5’’	1.54 (6H, s)	27.4
7-OH	6.41 (1H,s)	-
5’-OH	5.42 (1H, s)	-

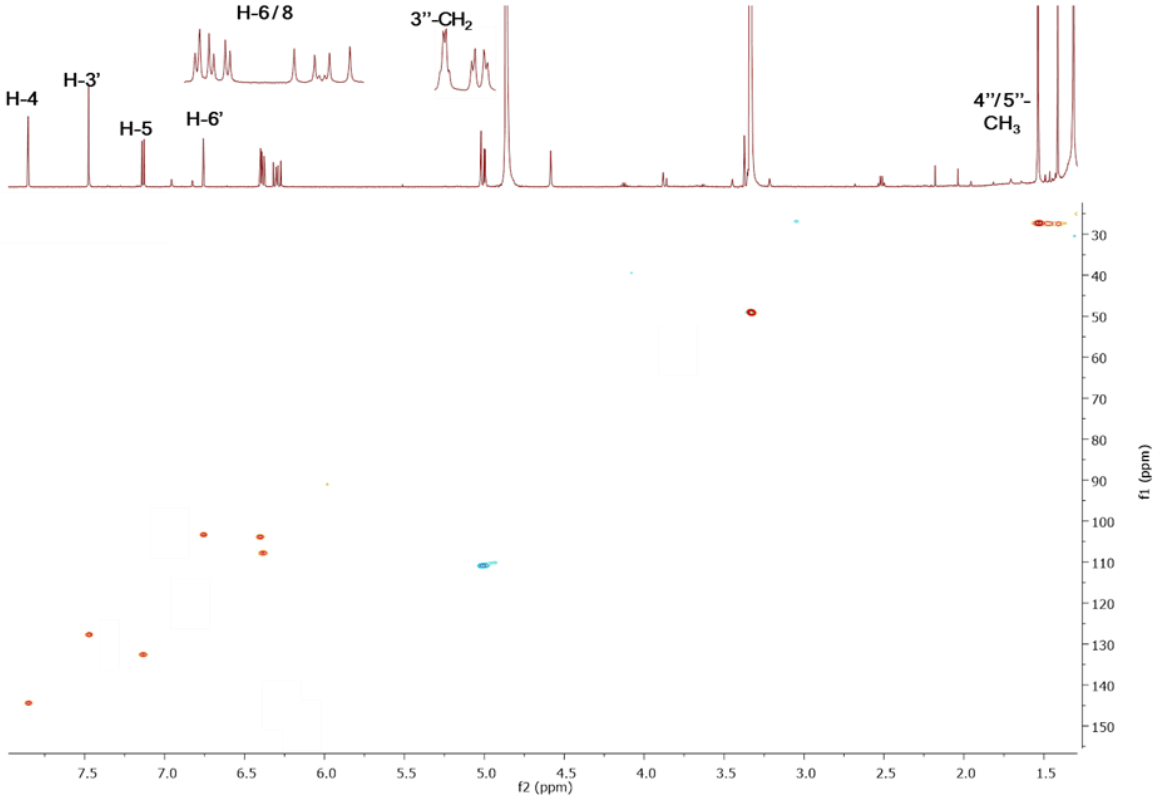
Το 6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)-5,7'-διυδροξυκουμεστάνιο αποτελεί ανάλογο της ψωραλιδίνης, απομονώνεται πρώτη φορά από το γένος *Hippocrepis* ενώ στο παρελθόν έχει ξαναπομονωθεί μόνο μία φορά από τη *Pueraria lobata* (Choi, *et al.*, 2010). Η κουμεστρόλη και η ψωραλιδίνη ευνοούν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, καθώς επίσης αναστέλλουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, με την ψωραλιδίνη να εμφανίζει υψηλότερη δραστικότητα και στις δύο περιπτώσεις (Sun, *et al.*, 2007) (Kong, *et al.*, 2017) (Zhai, *et al.*, 2017).

4.3.3.1.3 Μελέτη του κλάσματος HCE-F6

Με σκοπό την απομόνωσ των κύριων μεταβολιτών του κλάσματος HCE-F6 εφαρμόστηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση Sephadex LH-20 και EtOAc ως διαλύτης έκλουσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

❖ **3-(4-α,α-διμεθυλαλλυλο-2,5-διυδροξυφαινυλο)-7-υδροξυκουμαρίνη (HCE6)**

Ο μεταβολίτης HCE6 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και κόκκινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των 3-αρυλοκουμαρινών και πιο συγκεκριμένα πως πρόκειται για ένα πρενυλιωμένο παράγωγο της 3-(2',5'-διυδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-7-όλης.



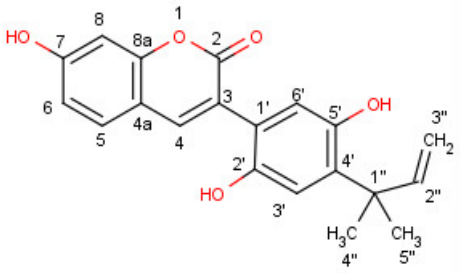
Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H και HSQC του μεταβολίτη HCE6

Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ^{1}H-NMR (Εικόνα 62) παρατηρούμε τη χαρακτηριστική απλή κορυφή του H-4 στα 7.85 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 144.5 ppm. Το προαναφερόμενο πρωτόνιο εμφανίζει σύζευξη ^{3}J με το καρβονύλιο της θέσης C-2 (δ 162.5), τον οξυγονωμένο άνθρακα C-8a (δ 159.1) καθώς και τον άνθρακα C-5 στα 132.6 ppm. Οι κορυφές των πρωτονίων H-8 (δ 6.38, d, J = 2.4 Hz), H-6 (δ 6.40, dd, J = 8.0/2.4 Hz), H-5 (δ 7.14, d, J = 8.0 Hz) σχηματίζουν ένα ABX σύστημα, ενώ τα πρωτόνια H-6' και H-3' του δακτυλίου C συντονίζονται ως απλές κορυφές σε δ 6.76 και 7.47, αντίστοιχα. Στο φάσμα HMBC το H-3' παρουσιάζει σύζευξη με έναν άνθρακα στα 40.5 ppm, με τον οποίο επίσης παρουσιάζουν

σύζευξη τα μεθυλενικά πρωτόνια H-3'' (δ 5.01) και τα μεθυλικά πρωτόνια H-4'' και H-5'' (δ 1.54 και 1.49). Με βάση τα προαναφερόμενα καθορίστηκε η θέση σύνδεσης της α,α-διμεθυλαλλυλικής ομάδας στη θέση C-4' του βασικού σκελετού της ένωσης. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 59 προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 59: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE6

HCE6 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	162.6
3	-	122.1
4	7.85 (1H, s)	144.5
4a	-	103.2
5	7.14 (1H, d, 8.0)	132.6
6	6.40 (1H, dd, 8.0 / 2.4)	103.9
7	-	158.3
8	6.38 (1H, d, 2.4)	107.8
8a	-	159.1
1'	-	113.8
2'	-	157.3
3'	7.47 (1H, s)	128.0
4'	-	131.5
5'	-	161.0
6'	6.76 (1H, brs)	103.5
1''	-	40.1
2''	6.30 (1H, dd, 17.0 / 9.7)	148.8
3''	5.01 (2H, m)	111.6
4''	1.54 (3H, s)	27.5
5''	1.49 (3H, s)	27.5

Ο μεταβολίτης HCE6 αποτελεί **νέο** φυσικό προϊόν καθώς δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα η απομόνωσή του από κάποια φυσική πηγή.

❖ **Φορμονονετίνη (HCE7)**

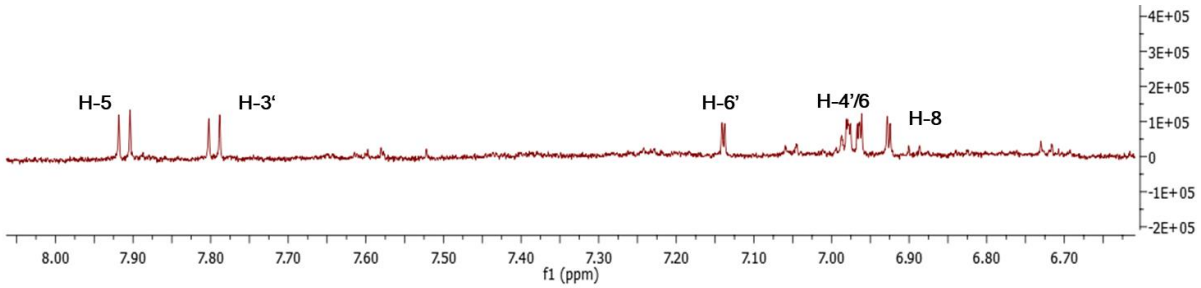
Ο μεταβολίτης HCE7 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και ελαφρά μωβ χρώση έπειτα από την εμφάνιση με το διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι πρόκειται για την ισοφλαβόνη φορμονονετίνη, η οποία απομονώνεται πρώτη φορά από το γένος *Hippocrepis* και έχει παραληφθεί προηγουμένως και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Cyticus villosus* (βλ., CVM2).

4.3.3.1.4 Μελέτη των κλασμάτων HCE-F8 και HCE-F9

Με σκοπό την παραλαβή του κύριου μεταβολίτη των κλασμάτων HCE-F8 και HCE-F9, πραγματοποιήθηκε αρχικά η συνένωσή τους και ακολούθησε η εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε EtOAc ως διαλύτης έκλουσης και παραλήφθηκε το ακόλουθο φυσικό προϊόν.

❖ **Κουμεστρόλη ή 5',7-διυδροξυκουμεστάνιο (HCE8)**

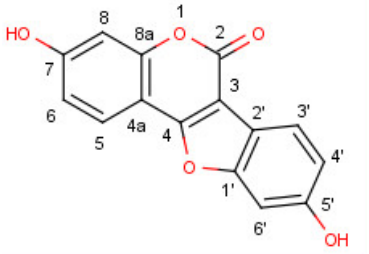
Ο μεταβολίτης HCE8 παρουσίασε κυανή απορρόφηση στα 254nm και ασθενή μωβ χρώση έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη. Ανήκει στην κατηγορία των κουμεστανίων και μετά από τη μελέτη των φασματοσκοπικών του δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως κουμεστρόλη.



Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης HCE8

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 63) παρατηρούμε τα σήματα των δύο ABX συστημάτων που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δακτυλίων A και D. Τα πρωτόνια H-5 (d, J= 8.2 Hz), H-6 (dd, J= 8.2 / 2.0) και H-8 (d, J= 2.0 Hz) του δακτυλίου A συντονίζονται σε δ 7.91, 6.96 και 6.92 αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια H-3' (d, J= 8.2 Hz), H-4' (dd, J = 8.2 / 2.0 Hz) και H-6' (d, J = 2.0 Hz) του δακτυλίου D εμφανίζονται σε δ 7.79, 6.98 και 7.14 αντίστοιχα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη HCE8, τα οποία περιλαμβάνονται στον πίνακα 60, προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Kshirsagar, *et al.*, 2013).

Πίνακας 60: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE8

HCE8 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ **σε ppm (**J **σε Hz)**	**^{13}C NMR** δ **σε ppm**
2	-	157.6
3	-	102.0
4	-	158.1

4a	-	96.0
5	7.91 (1H, d. 8.2)	157.2
6	6.96 (1H,dd, 8.6 / 2.0)	115.3
7	-	162.2
8	6.93 (1H,d, 2.0)	103.9
8a	-	155.9
1’	-	157.2
2’	-	113.7
3’	7.79 (1H, d, 8.2)	122.4
4’	6.98 (1H, dd, 8.2 / 1.7)	115.0
5’	-	156.5
6’	7.14 (1H,d, 1.7)	99.3

Η κουμεστρόλη έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη, όπως είναι τα *Pueraria lobata* (Seong, *et al*., 2016), *Ducrosia ismaelis* (Morgan, *et al*., 2014), *Melilotus messanensis* (Macías, *et al*., 1999), *Medicago sativa* (Koshino, *et al*., 1993), *Glycine max* (roots) (Lee, *et al*., 2006), *Psoralea corylifolia* (Gupta, *et al*., 1980) και *Bituminaria morisiana* (Cottiglia, *et al*., 2005) ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή της από το μελετούμενο είδος και γένος. Έχει αποδειχθεί ικανός αντιοξειδωτικός (Jeon, 2012) και αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Yuk, *et al*., 2017) (Jantaratnotai, 2013). *In vivo* δοκιμή σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες έδειξε πως εμποδίζει την οστική απορρόφηση διατηρώντας τα επίπεδα ασβεστίου στα οστά (Tsutsumi, *et al*., 1994), ενώ έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών στην κυττρική σειρά RAW264.7 (Kanno, *et al*., 2004).

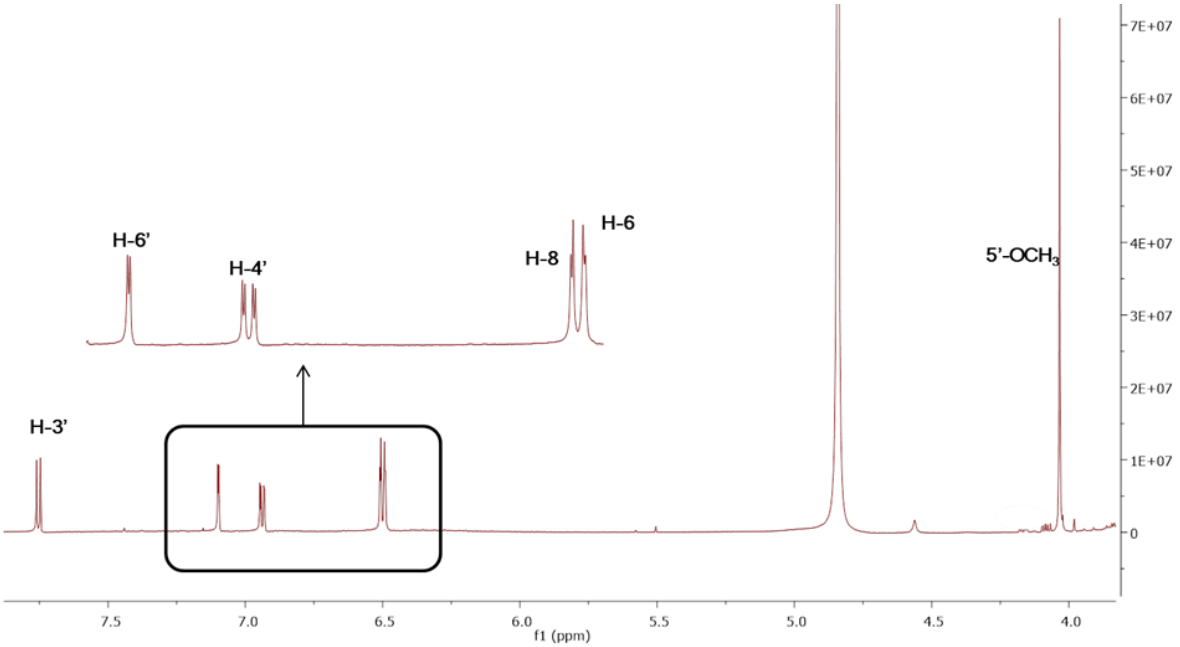
4.3.3.1.5 Μελέτη του κλάσματος HCE-F11

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα HCE-F11 περιέχει ένα κύριο μεταβολίτη, του οποίου η απομόνωση επιτεύχθηκε με την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην οποία χρησιμοποιήθηκε EtOAc ως διαλύτης έκλουσης.

- **Ισοτριφολιόλη (HCE9)**

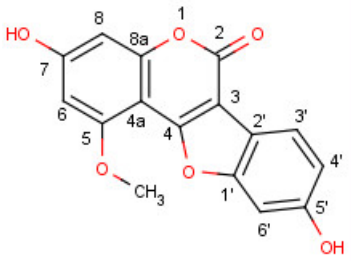
Ο μεταβολίτης HCE9 εμφάνισε παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τον προαναφερόμενο μεταβολίτη HCE8 και η φασματοσκοπική μελέτη του έδειξε πως πρόκειται για το 5-μεθοξυ- παράγωγο της κουμεστρόλης ή αλλιώς ισοτριφολιόλη. Η παρουσία της μεθόξυ-ομάδας στη θέση C-5 του βασικού σκελετού έχει ως αποτέλεσμα ο δακτύλιος Α να διαθέτει δύο πρωτόνια, σε αντίθεση με τη κουμεστρόλη (HCE9) στην οποία τα τρία πρωτόνια του συγκεκριμένου δακτυλίου σχηματίζουν ένα ABX σύστημα. Τα προαναφερόμενα πρωτόνια (H-6 και H-8) εμφανίζονται στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 64) ως διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz) σε δ 6.49 και 6.51, αντίστοιχα. Η θέση σύνδεσης της μεθόξυ- ομάδας επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια του φάσματος HMBC, στο οποίο φάνηκε ότι τα πρωτόνια της (δ 4.04) παρουσιάζουν σύζευξη ^{3}J με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της θέσης C-5 (δ 157.2), ο οποίος με τη σειρά του παρουσιάζει σύζευξη ^{3}J με το πρωτόνιο H-6. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη HCE9, τα οποία περιλαμβάνονται στον πίνακα 61 προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων

2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Jeong, *et al.*, 2013).



Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης HCE9

Πίνακας 61: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE9

HCE9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	-	157.2
3	-	101.3
4	-	160.3
4a	-	95.9
5	-	157.2
6	6.49 (1H,d, 2.0)	97.2
7	-	162.2
8	6.51 (1H,d, 2.0)	97.2
8a	-	155.7
1’	-	156.8
2’	-	113.7
3’	7.77 (1H, d, 8.2)	121.9
4’	6.94 (1H, dd, 8.2 / 1.7)	115.0
5’	-	156.5
6’	7.12 (1H, d, 1.7)	99.5
5-OCH$_3$	4.04 (3H, s)	56.9

Η ισοτριφολιόλη έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα της *Glycyrrhiza uralensis* (Tao, *et al.*, 2012) (Hatano, *et al.*, 2000), το *Glycine max* (Jeong, *et al.*, 2013) και τις ρίζες του *Campylotropis hirtella* (Xie, e*t al.*, 2016); ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από το γένος *Hippocrepis*. Έχει δείξει αξιόλογη αντιπηκτική (Tao, *et al.,* 2012) και αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία είναι ισχυρότερη της κουμεστρόλης (Li, *et al.,* 2017). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει την απόκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων σε LPS-επαγόμενη φλεγμονή στην κυτταρική σειρά RAW264.7.

4.3.3.1.6 Μελέτη του κλάσματος HCE–F12

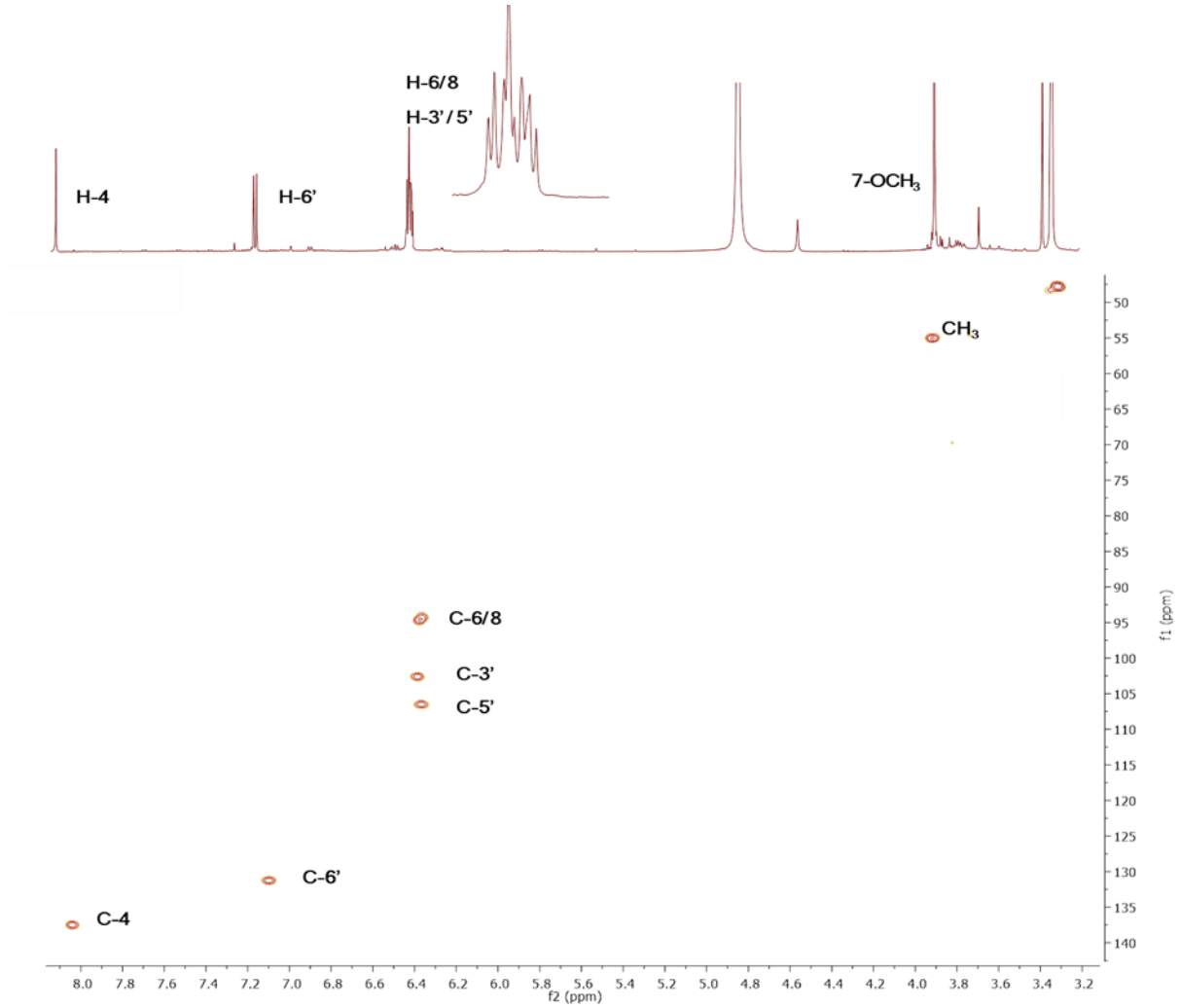
Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα HCE-F12 περιέχει ένα κύριο μεταβολίτη, του οποίου η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την ισοτριφολιόλη (HCE9), η οποία έχει ήδη απομονωθεί από το γειτονικό κλάσμα HCE-F11.

4.3.3.1.7 Μελέτη του κλάσματος HCE-F15

Στο κλάσμα HCE-F15, το οποίο προήλθε από την αρχική κλασμάτωση του ολικού εκχυλίσματος HCE, εφαρμόσθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα και παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή ο μεταβολίτης HCE10.

❖ **3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη (HCE10)**

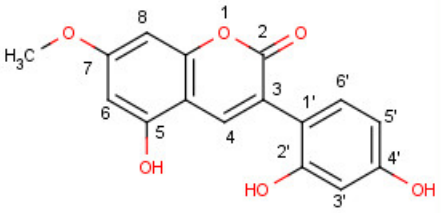
Ο μεταβολίτης HCE10 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm ενώ έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊικής βανιλλίνης έδωσε σκούρα κόκκινη χρώση. Μετά από τη μελέτη των φασματοσκοπικών του δεδομένων, ο μεταβολίτης HCE10 ταυτοποιήθηκε ως η 3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη. Στο φάσμα ^{1}H-NMR εμφανίζεται το πρωτόνιο H-4 ως απλή κορυφή στα 8.05 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 139.2 ppm (HSQC, εικόνα 65) γεγονός που συνάδει με την παρουσία του 3-άρυλοκουμαρινικού σκελετού. Στο φάσμα HMBC εμφανίζεται ^{3}J σύζευξη του H-4 με τον καρβονυλικό άνθρακα της θέσης C-2 (δ 164.2) και τους οξυγωνομένους αρωματικούς άνθρακες των θέσεων C-8a (δ 159.1) και C-5 (δ 158.8). Επιπρόσθετα, η 3-αρυλουποκατάσταση επιβεβαιώθηκε από τη σύζευξη ^{3}J του προαναφερόμενου πρωτονίου με τον άνθρακα της θέσης C-1’ στα 116.1 ppm. Τα πρωτόνια H-6 και H-8, όπως επίσης και τα H-3’ και H-5’ του δακτυλίου B, φαίνεται να έχουν παρόμοιο χημικό περιβάλλον καθώς συντονίζονται όλα στα 6.38 ppm περίπου. Αντίθετα, το πρωτόνιο H-6’ διαφοροποιείται και εμφανίζεται αποθωρακισμένο ως μία διπλή κορυφή (J = 8.0 Hz) στα 7.11 ppm. Η θέση σύνδεσης της μεθοξυομάδας προσδιορίστηκε στη θέση 7 του σκελετού λόγω της σύζευξης των πρωτονίων της με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-7, ο οποίος συντονίζεται στα 159.2 ppm και παρουσιάζει επίσης σύζευξη (^{2}J) με τα H-8 και H-6 του δακτυλίου A.



Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H και HSQC του μεταβολίτη HCE10

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη HCE10, τα οποία περιλαμβάνονται στον πίνακα 62 προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC).

Πίνακας 62: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης HCE10

HCE10 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*σε ppm (*J*σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*σε ppm**
2	-	164.2
3	-	121.1
4	8.05 (1H, s)	139.2
4a	-	105.6
5	-	158.8
6	6.38 (1H, *)	95.9
7	-	159.2
8	6.38 (1H, *)	96.5
8a	-	159.1
1'	-	116.1

2’	-	160.2
3’	6.38 (1H, *)	108.4
4’	-	157.7
5’	6.38 (1H, *)	104.4
6’	7.11 (1H, d, 8.0)	133.1
7-OCH_3	3.93 (3H, s)	56.9

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η 3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη αποτελεί ένα **νέο** φυσικό προϊόν, καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυσική πηγή.

4.3.4 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Ceratonia siliqua* (CSM)

Το μεθανολικό εκχύλισμα των ετησίων βλαστών και των φύλλων της *Ceratonia* siliqua, κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο του χημικού του περιεχομένου με TLC, φάνηκε να διαθέτει αρκετά πλούσιο φυτοχημικό προφίλ με ουσίες διαφορετικής πολικότητας. Με σκοπό την καλύτερη δυνατή κλασμάτωσή του, αποφασίστηκε η εφαρμογή της τεχνικής FCPC και η χρήση μιας σειράς διφασικών συστημάτων διαλυτών διαδοχικά αυξανόμενης πολικότητας, των οποίων η σύσταση φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

Αριθμός Συστήματος	Hexane	EtOAc	BuOH	MeOH	H_2O
1	2	4	0.0	1.0	5
2	1	4.5	0.5	1.0	5
3	0.5	4.0	1.5	1.0	5
4	0.5	3.0	2.5	1.0	5
5	0.5	1.0	4.5	1.0	5
6	0.5	0.0	5.5	1.0	5

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με δυνατότητα διοχέτευσης του διαλύτη μέχρι 24 min/ml και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 6g, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων του πρώτου διφασικού συστήματος σε αναλογία 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο ‘loop’ της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Ακολούθως διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min και ροή 10-15 ml/min, ενώ μετά την εξισορρόπηση του συστήματος ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η διοχέτευση της οργανικής φάσης κάθε συστήματος το ένα μετά το άλλο σε ‘ascending mode’. Έτσι, συλλέχθηκαν 126 κλάσματα των 30ml, έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες και στη συνέχεια έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση του τελευταίου συστήματος να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της

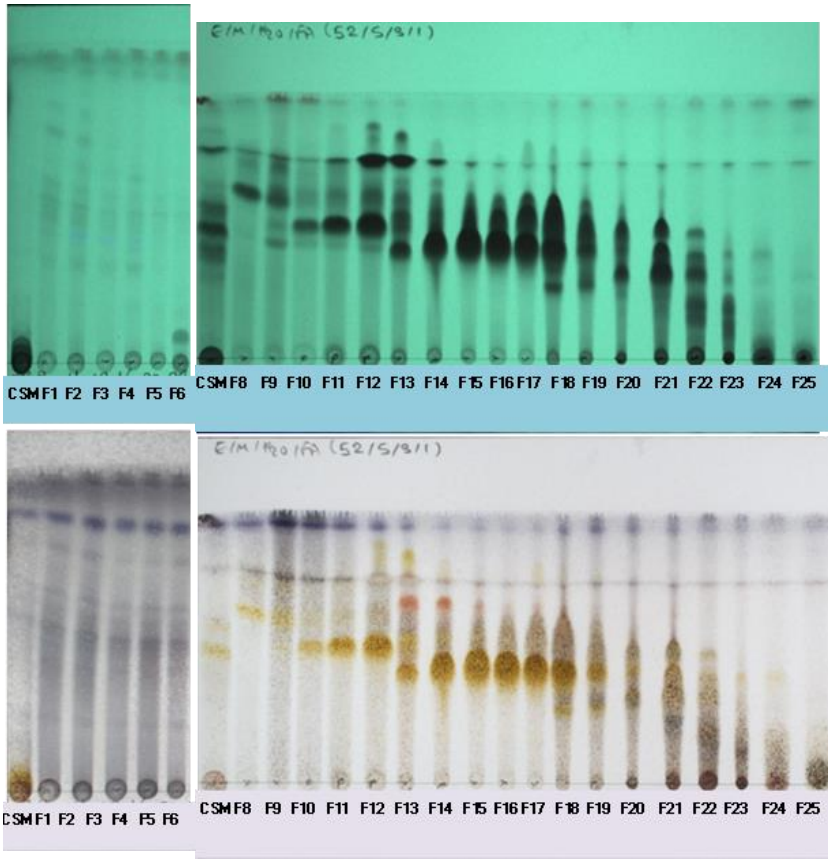
ανάλυσης. Συνολικά προέκυψαν 162 κλάσματα εκ των οποίων τα 126 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση κάθε διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 36 κλάσματα. Για τον καθαρισμό και την αποθήκευση της στήλης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 2 lt MeOH/H_2O σε αναλογία 50/50.

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC τόσο κανονικής φάσης σε συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και 90/10, όσο και αντίστροφης φάσης σε σύστημα H_2O/ACN 70/30, αποφασίστηκαν και πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις με αποτέλεσμα να προκύψουν τελικά 25 κλάσματα. Τα συνενωμένα κλάσματα ελέγχθηκαν επίσης σε TLC κανονικής φάσης με συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και EtOAc/MeOH/H_2O/FA 52/5/9/1 (εικόνα 66) όπως επίσης και σε TLC αντίστροφης φάσης με σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN 70/30 (εικόνα 67), ενώ τα αντίστοιχα βάρη περιλαμβάνονται στον πίνακα 63.

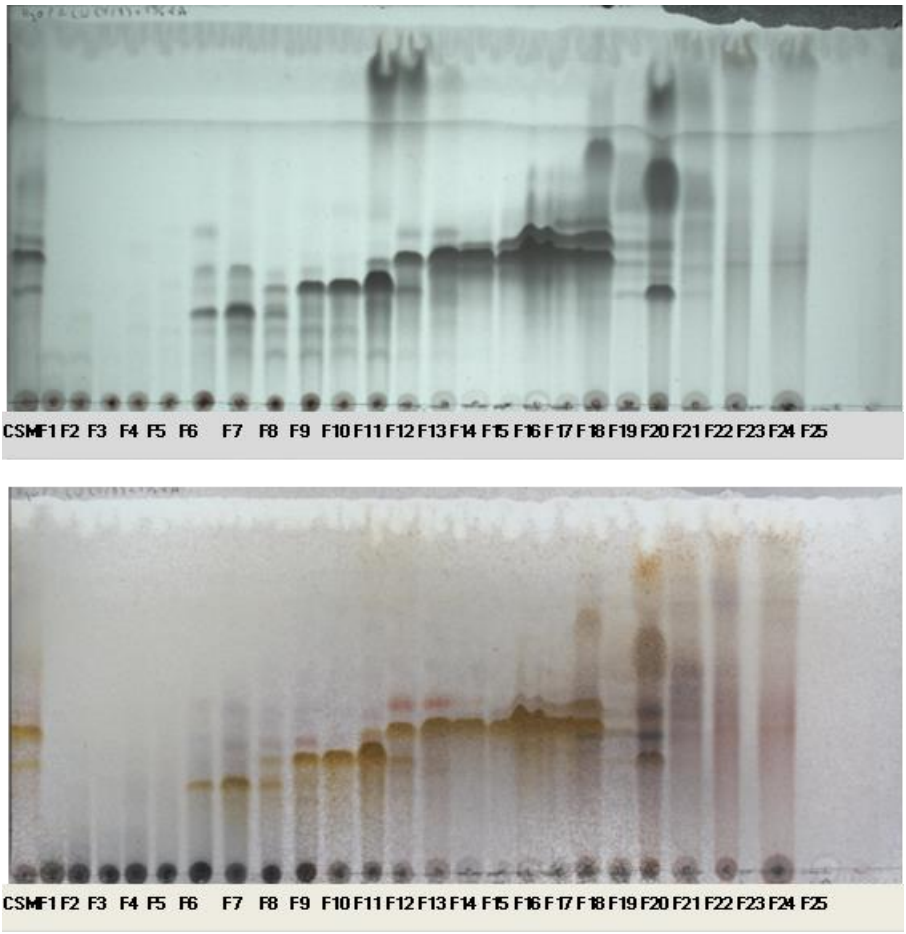
Πίνακας 63:Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
CSM-F1	7-8	99.5
CSM-F2	9-10	106.6
CSM-F3	11-13	174.3
CSM-F4	14-15	82.1
CSM-F5	16-19	1222.0
CSM-F6	20-23	76.7
CSM-F7	24-33	78.4
CSM-F8	34-39	26.7
CSM-F9	40-49	39.2
CSM-F10	50-53	49.9
CSM-F11	54-55	55.0
CSM-F12	56-59	45.7
CSM-F13	60-63	107.6
CSM-F14	64-65	138.1
CSM-F15	66	114.4
CSM-F16	67	219.0
CSM-F17	68	143.4
CSM-F18	69-74	260.6
CSM-F19	75-91	361.5
CSM-F20	92-94	153.4
CSM-F21	95-108	1610.4
CSM-F22	109-121	231.1
CSM-F23	122-143	324.4
CSM-F24	144-162	277.6
CSM-F25	f	809.1

του μεθανολικού εκχυλίσματος CSM



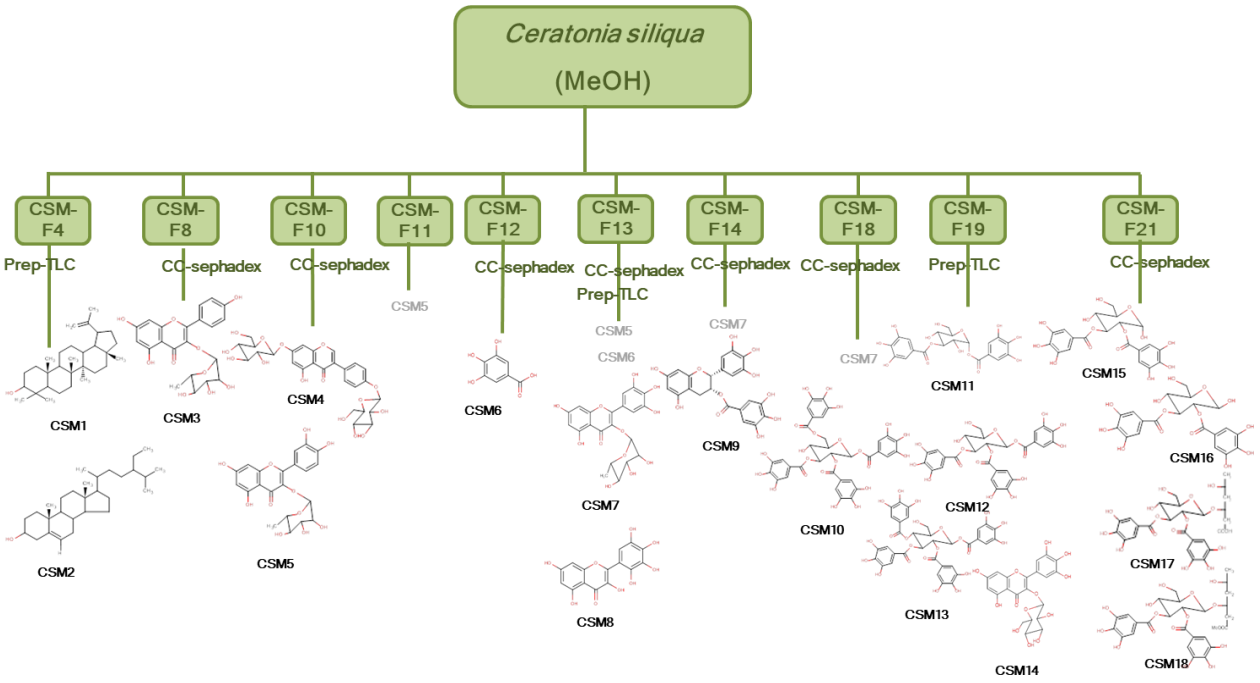
Εικόνα 66: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων της CSM σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H_2O/FA 52/5/9/1



Εικόνα 67: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων της CSM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (70/30).

4.3.4.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών του εκχυλίσματος CSM

Από τα 25 προαναφερόμενα κλάσματα που προέκυψαν μετά από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων *Ceratonia siliqua* με την τεχνική του FCPC, ένα περιείχε μια ένωση σε καθαρή μορφή ενώ από την περαιτέρω μελέτη δέκα κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών καταλήξαμε στην απομόνωση συνολικά δεκαοχτώ μεταβολιτών. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία:



Σχήμα 5: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Ceratonia siliqua* (CSM)

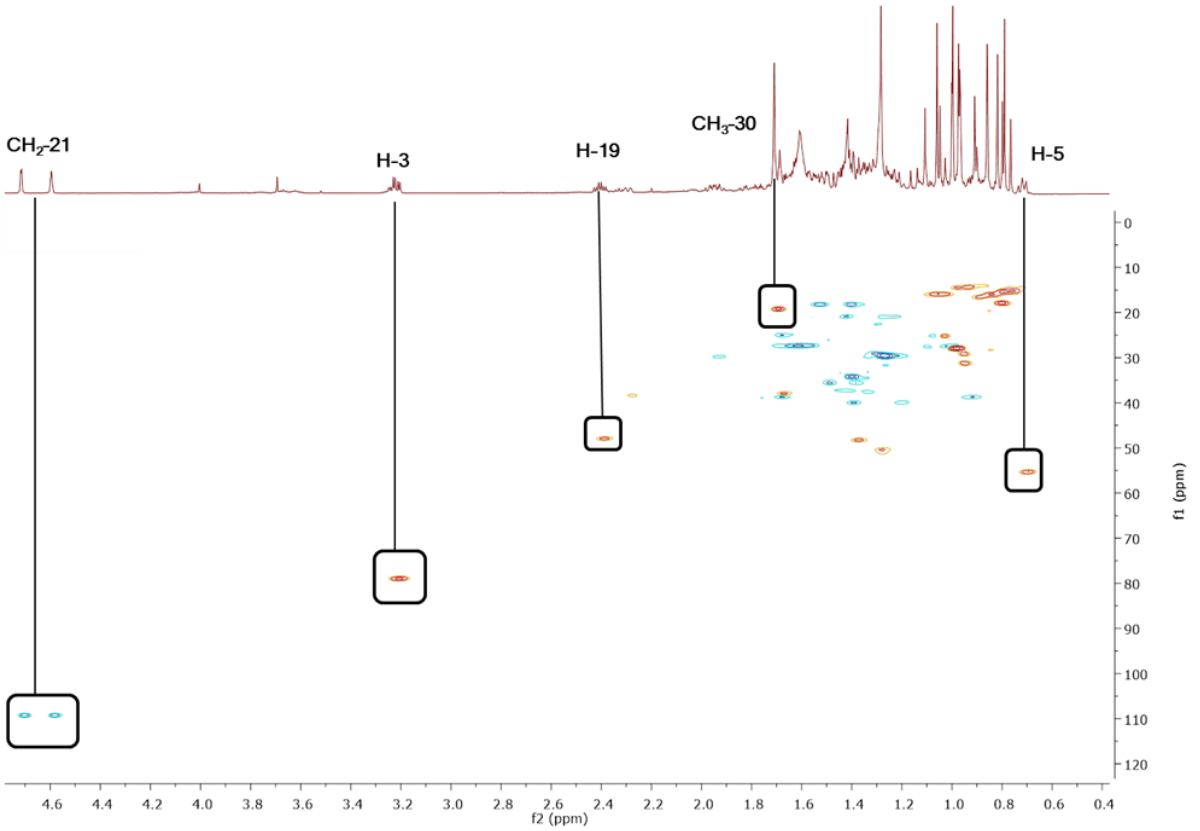
4.3.4.1.1 Μελέτη του κλάσματος CSM-F4

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα CSM-F4 περιέχει σχετικά άπολες ουσίες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων, καθώς δεν παρουσίασαν απορρόφηση στα 254nm και έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης έδωσαν μπλε χρώση. Με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του κλάσματος με την τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC, στην οποία 50mg επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat και το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2 / MeOH 95/5. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν οι ακόλουθοι κύριοι μεταβολίτες του κλάσματος:

- **Λουπεόλη (CSM1)**

Ο μεταβολίτης CSM1 παρουσίασε τα προαναφερόμενα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά και με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα ταυτοποιήθηκε ως λουπεόλη. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 68) χαρακτηριστικό είναι το πρωτόνιο του οξυγονωμένου μεθινίου της θέσης 3 που εμφανίζεται στα 3.19 ppm ως διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 11.4 και 4.9 Hz, ενώ στα 1.68 ppm παρατηρούμε μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 30 που συνδέεται με άνθρακα διπλού δεσμού. Η θέση του επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια των δεδομένων του φάσματος HMBC, όπου φαίνεται η σύζευξη ^2J ανάμεσα στηα πρωτόναι H-30 και τον τεταρτοταγή άνθρακα στα 151.3 ppm που αντιστοιχεί στη θέση C-20. Στο ίδιο φάσμα, τα μεθύλια των θέσεων 24 και 25, τα οποία εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 0.98 και 0.76 ppm αντίστοιχα, παρουσιάζουν σύζευξη ^3J τόσο με τον άνθρακα C-5

που συντονίζεται σε *δ* 55.3, όσο και με τον οξυγονωμένο άνθρακα της θέσης C-3 (*δ* 80.2). Τα υπόλοιπα μεθυλικά πρωτόνια της ένωσης εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 1.03 (C-26), 0.97 (C-27), 0.79 (C-28) και 0.83 (C-29). Επίσης, χαρακτηριστικά είναι τα σήματα των πρωτονίων του μεθυλενίου της θέσης 21, τα οποία εμφανίζονται ως δύο ευρείς απλές κορυφές στα 4.69 και 4.56 ppm, ενώ ο αντίστοιχος ολεφινικός άνθρακας συντονίζεται στα 109.3 ppm.



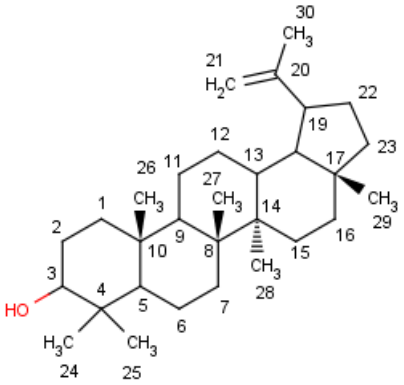
Εικόνα 68: Φάσμα ^{1}H και HSQC-DEPT της ένωσης CSM1

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της λουπεόλης, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), παρατίθενται στον πίνακα 64 και είναι σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Liu, *et al.*, 2015).

Η λουπεόλη αποτελεί τριτερπένιο τύπου λουπανίου και έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές (Kosyakov, *et al.,* 2014) (Lagharia, 2011), σε μεγάλο ποσοστό από εδώδιμα είδη όπως φρούτα και λαχανικά (Siddique, *et al.*, 2011), ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί απομόνωσή της από τη *Ceratonia siliqua*. Εμφανίζει ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων όπως αντιφλεγμονώδη (Geetha, *et al.*, 2001), αντιοξειδωτική, αντιδιαβητική, αντιική, αντιμικροβιακή (Rao, *et al.*, 2017), καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική (Nagaraj, *et al.*, 2001), χημειοπροστατευτική (Chaturvedi, *et al.*, 2008) και δράση κατά της αρθρίτιδας (Geetha, *et al.*, 1999), ενώ πρόσφατα έχει χαρακτηριστεί και ως οστεοπροστατευτικός παράγοντας καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Im, *et al.*, 2016)

Πίνακας 64: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM1

CSM1 ($CDCl_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	1.68 (1H, *) / 0.91 (1H, m)	38.7
2	1.61 (1H, *) /1.54 (1H, *)	27.4
3	3.19 (dd, 11.4 / 4,9)	80.2
4	-	38.8
5	0.69 (1H, m)	55.3
6	1.54 (1H, *) / 1.39 (1H, *)	18.3
7	1.41 (2H, *)	34.2
8	-	40.8
9	1.28 (1H, *)	50.4
10	-	37.1
11	1.42 (1H, *) / 1.25 (1H, *)	20.9
12	1.68 (1H, *) / 1.07 (1H, *)	25.1
13	1.67 (1H, *)	38.0
14	-	42.8
15	1.71 (1H, *) /1.01 (1H, *)	27.4
16	1.49 (1H, *) / 1.38 (1H, *)	35.5
17	-	43.0
18	1.37 (1H, *)	48.2
19	2.38 (1H, m)	48.4
20	-	151.3
21	4.69 (1H, brs) /4.56 (1H, brs)	109.3
22	1.42 (1H, *) /1.20 (1H, *)	40.0
23	1.93 (1H, *) / 1.33 (1H, *)	29.8
24	0.98 (3H, s)	28.5
25	0.76 (3H, s)	15.6
26	1.03 (3H, s)	16.0
27	0.97 (3H, s)	14.5
28	0.79 (3H, s)	18.2
29	0.83 (3H, s)	16.6
30	1.68 (3H, s)	19.3

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

❖ *β*-Σιτοστερόλη (CSM2)

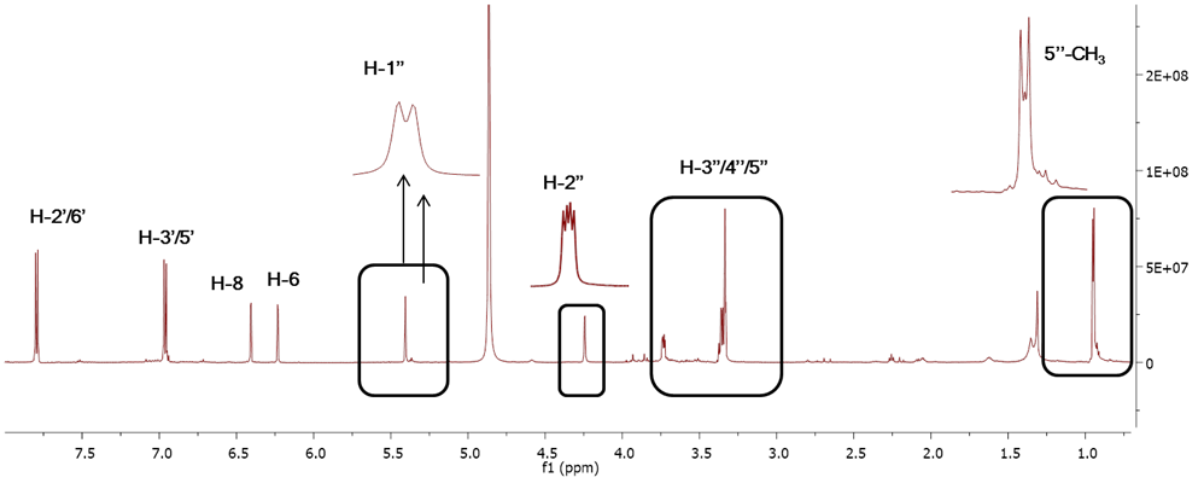
Η συγκεκριμένη φυτοστερόλη έχει ξαναπομονωθεί στην παρούσα εργασία από τα φυτά *Cytisus villosus* και *Hippocrepis comosa*, ενώ μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία μόνο η απομόνωσή της από τους καρπούς της *Ceratonia siliqua* (Gohar, *et al.*, 2009). Τα φασματοσκοπικά της δεδομένα παρουσιάζονται στην § 4.3.2.1.1 (CVM1).

4.3.4.1.2 Μελέτη του κλάσματος CSM-F8

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το κλάσμα CSM-F8 περιέχει ένα κύριο μεταβολίτη, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε κίτρινη πορτοκαλί χρώση έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη, παραπέμποντας ότι ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Έτσι, 20 mg του κλάσματος επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτης έκλουσης την μεθανόλη, απ' όπου παραλήφθηκε ο μεταβολίτης CSM3.

❖ **3 - *O*- ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης ή αφζελίνη (CSM3)**

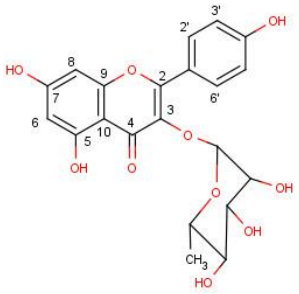
Λαμβάνοντας υπόψη τα φασματοσκοπικά δεδομένα, ο μεταβολίτης CSM3 ταυτοποιήθηκε ως ο 3 -*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης.



Εικόνα 69: Φάσμα ^{1}H της ένωσης CSM3

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 69) συντονίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H-2'/H-6' και H-3'/H-5' του δακτυλίου B, οι οποίες εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 8.8 Hz, γεγονός που συνάδει με την π-υποκατάσταση του προαναφερόμενου δακτυλίου. Επίσης, τα πρωτόνια H-8 και H-6 του δακτυλίου A συντονίζονται ως διπλές κορυφές με meta σύζευξη στα 6.41 και 6.23 ppm, αντίστοιχα. Στην οξυγωνομένη περιοχή του φάσματος, η διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 1.5 Hz στα 5.40 ppm αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 103.4 ppm. Επίσης, σε δ 0.95 εμφανίζεται μία διπλή κορυφή (J = 6.0 Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης C-5 της ραμνόσης. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες που προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), αναφέρονται στον πίνακα 65 και είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία (Lee, *et al.*, 2014).

Πίνακας 65: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM3

CSM3 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	-	158.6
3	-	136.2
4	-	179.9
5	-	163.7
6	6.23 (1H, d, 2.1)	99.6
7	-	165.3
8	6.41 (1H, d, 2.1)	95.4
9		159.3
10		105.4
1’	-	122.3
2’/6’	7.79 (2H, d, 8.8)	131.8
3’/5’	6.96 (2H, d, 8.8)	116.5
4’	-	161.9
	3- *O*-ραμνοπυρανόση	
1’’’	5.40 (1H, d, 1.5)	103.4
2’’’	4.24 (1H, dd, 3.0 / 1.5)	73.0
3’’’	3.73 (1H. 9.0 / 3.0)	72.2
4’’’	3.36 (1H, *)	71.9
5’’’	3.36 (1H, *)	71.9
6’’’	0.95 (3H, d, 6.0)	17.5

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η αφζελίνη απαντάται σε αρκετά φυτικά είδη, ενώ έχει απομονωθεί από τους καρπούς της *Ceratonia siliqua* (Owen, *et al.*, 2003). Έχει χαρακτηριστεί ως αξιόλογος αναστολέας της τυροσινάσης (Rho, *et al.*, 2010) και ως πιθανός αντιδιαβητικός παράγοντας καθώς εμποδίζει την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης (Rodriguez, *et al.,* 2010). Επίσης, διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Diantini, *et al.*, 2012) (Halimah, *et al.*, 2015), ενώ σχετικά πρόσφατα αναδείχτηκε η ικανότητά της να προστατεύει από την έκθεση στη UV ακτινοβολία (Shin, *et al.*, 2013).

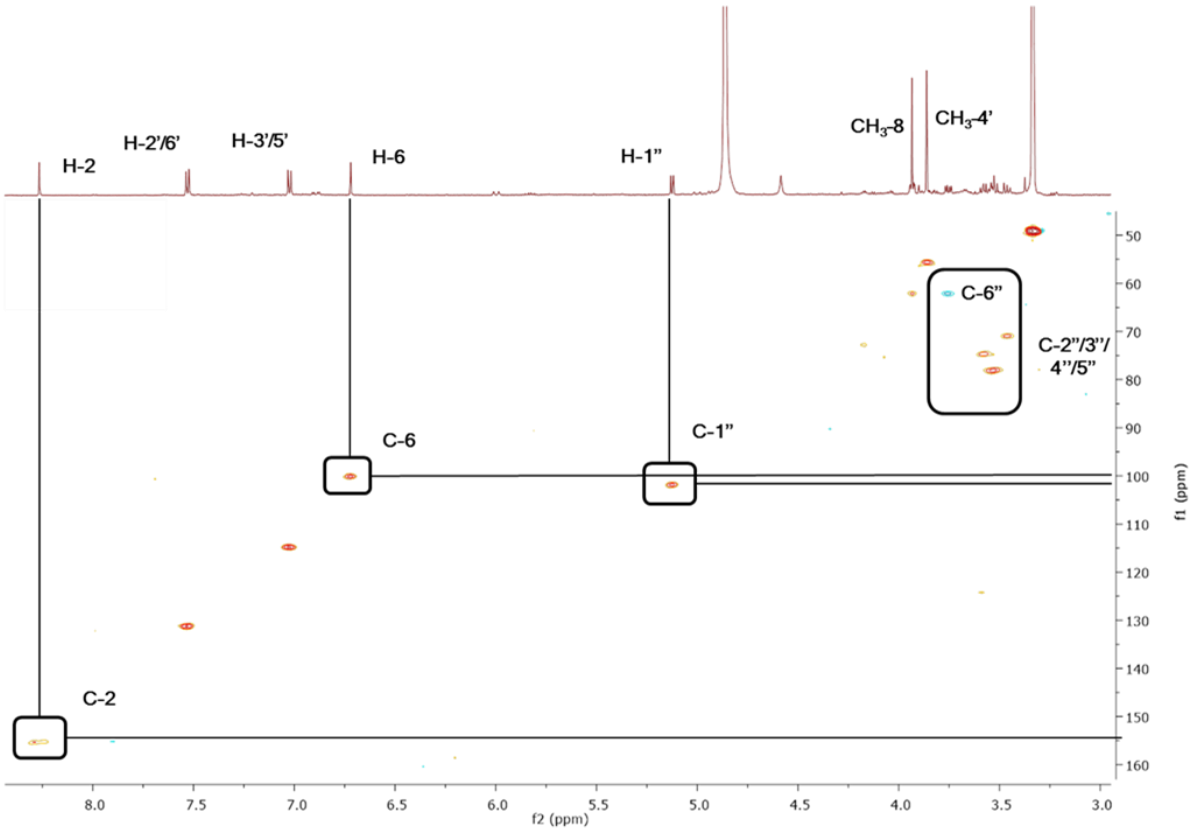
4.3.4.1.3 Μελέτη του κλάσματος CSM-F10

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το κλάσμα CSM-F10 περιέχει δύο κύριους μεταβολίτες, οι οποίοι διαθέτουν παρόμοια πολικότητα αλλά ανήκουν σε διαφορετική χημική κατηγορία, καθώς και οι δύο παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στα 254 nm αλλά μετά από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος ο ένας μεταβολίτης έδωσε ροζ ασθενή χρώση ενώ ο δεύτερος έντονη καφε-κίτρινη χρώση. Με σκοπό την απομόνωσή τους εφαρμόστηκε σε 40 mg του μίγματος χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και

διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη και παραλήφθηκαν ο μεταβολίτης CSM4 και ο μεταβολίτης CSM5.

❖ **7- *O*-γλυκοπυρανοσίδης της 8-μεθοξυ-4'-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (CSM4)**

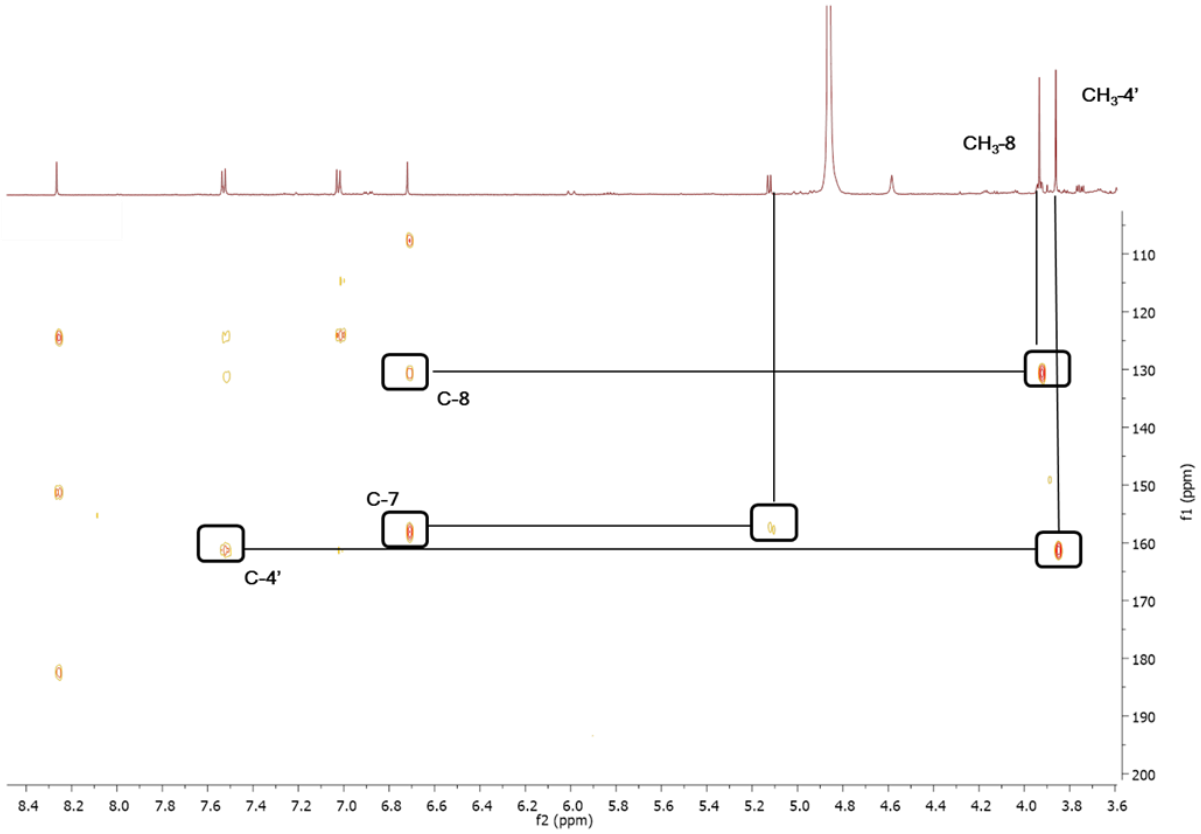
Λαμβάνοντας υπόψη τα φασματοσκοπικά δεδομένα, ο πιο άπολος μεταβολίτης CSM4 ταυτοποιήθηκε ως το γλυκοσιδικό παράγωγο της 8-μεθοξυ-4'-Ο-μεθυλογενιστεΐνης.



Εικόνα 70: Φάσμα ^{1}H και HSQC-DEPT της ένωσης CSM4

Στο φάσμα ^{1}H και HSQC-DEPT (εικόνα 70) του μεταβολίτη CSM4, παρατηρείται το χαρακτηριστικό σήμα που αντιστοιχεί στη θέση C-2 των ισοφλαβονών. Πιο συγκεκριμένα, το H-2 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8.26 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε *δ* 155.8. Επίσης, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.5 Hz) στα 7.53 και 7.02 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στο π-υποκατεστημένο σύστημα του δακτυλίου Β. Το πρωτόνιο του δακτυλίου Α εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 6.72 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.5 ppm. Με βάση τις συγκεκριμένες χημικές μετατοπίσεις συμπεράναμε πως πρόκειται για το μεθίνιο της θέσης C-6, καθώς τα φλαβονοειδή τα οποία έχουν πρωτόνιο στη θέση C-8 και υποκατάσταση στη θέση C-6 ο αντίστοιχος μεθινικός άνθρακας εμφανίζεται σαφέστατα πιο θωρακισμένος και συντονίζεται στα 94 ppm περίπου (Horie, *et al.*, 1998). Η διπλή κορυφή στα 5.11 ppm με σταθερά σύζευξης 7.7 Hz αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (C-1''), συντονίζεται στα 102.3 ppm. Η παρουσία της γλυκόσης επιβεβαιώθηκε από τα χαρακτηριστικά σήματα των πρωτονίων H-6a και H-6b που συντονίζονται στα 3.90 και 3.76 ppm του μεθυλενίου της θέσης C-6'', του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα

62.2 ppm. Οι υπόλοιπες κορυφές των πρωτονίων και των ανθράκων της γλυκοπυρανόσης συντονίζονται στα 3.59 - 3.43 ppm και 70 - 78 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια των δύο μεθόξυ-ομάδων εμφανίζονται ως απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία, σε *δ* 3.86 και 3.92 ppm αντίστοιχα.

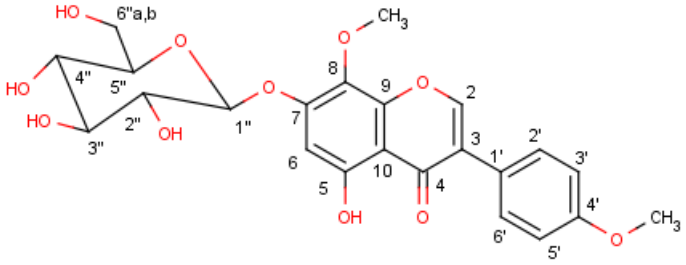


Εικόνα 71: Φάσμα HMBC της ένωσης CSM4

Παρατηρώντας το φάσμα HMBC (εικόνα 71), διαπιστώνουμε τη ^{3}J σύζευξη των πρωτονίων της μεθοξυλομάδας στα 3.86 ppm με τον άνθρακα της θέσης 4' (*δ* 161.8), ενώ τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας στα 3.93 ppm παρουσιάζουν ^{3}J σύζευξη με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-8, του οποίου η χημική μετατόπιση είναι χαρακτηριστική (*δ* 130.3). Με αυτόν τον τρόπο καθορίστηκαν οι θέσεις σύνδεσης των μεθοξυλόμάδων στο βασικό σελετό του ισοφαλβονοειδούς. Επιπλέον, το πρωτόνιο H-6 παρουσιάζει τις αναμενόμενες συζεύξεις με τους με τους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες των θέσεων C-5, C-7 και C-8, οι οποίοι συντονίζονται στα 159.0, 157.8 και 130.3 ppm, αντίστοιχα. Η θέση σύνδεσης της γλυκόσης καθορίστηκε από τη ^{3}J σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου με τον άνθρακα στη θέση C-7. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 66.

Πίνακας 66: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM4

CSM4 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.26 (1H, s)	155.8
3	-	124.6
4	-	183.0
5	-	159.0
6	6.72 (1H, s)	100.5
7	-	157.8
8	-	130,3
9	-	151.5
10	-	108.1
1’	-	124.4
2’/6’	7.53 (2H, d, 8.5)	131.4
3’/5’	7.02 (2H, d, 8.5)	115.3
4’	-	161.8
8-OCH_3	3.93 (3H, s)	62.1
4’-OCH_3	3.86 (3H.s)	55.9
	7- *O*-γλυκοπυρανόση	
1’’	5.11 (1H, d, 7.7)	102.3
2’’	3.56 (1H, *)	75.2
3’’	3.50 (1H, *)	78.0
4’’	3.42 (1H, t, 9.0)	71.1
5’’	3.52 (1H, *)	78.4
6a’’	3.90 (1H, *)	62.5
6b’’	3.76 (1H, dd 2.0 / 9.0)	62.5

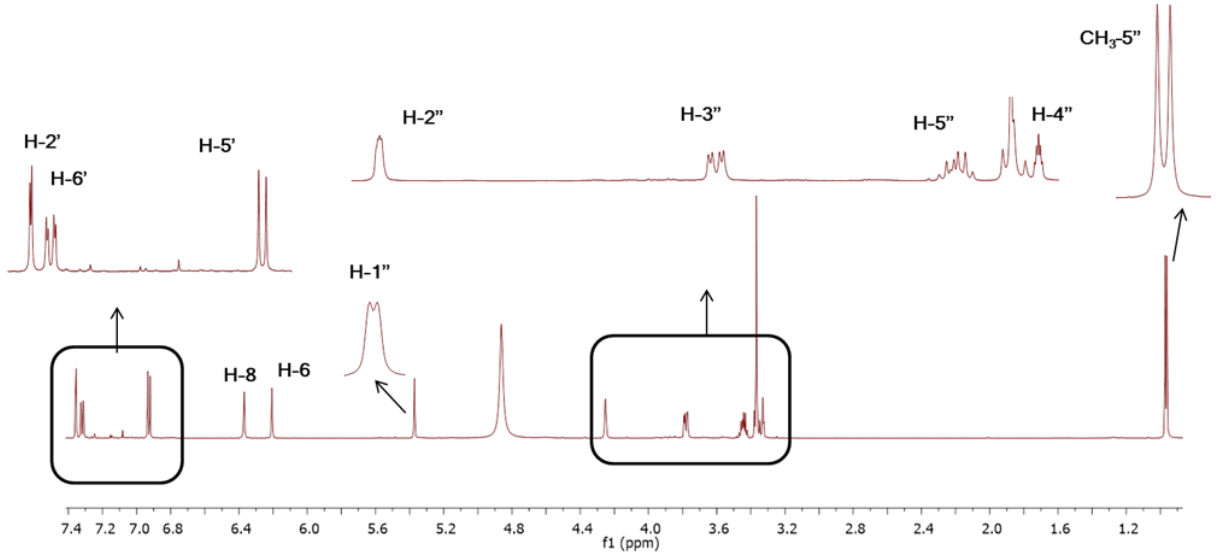
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί μόνο από το *Iris germanica L. var. alba* (Ali, *et al.*, 1993), ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για τις βιολογικές του ιδιότητες. Το άγλυκο τμήμα της ένωσης (8-μεθοξυ-4’-Ο-μεθυλογενιστεΐνης) έχει απομονωθεί μόνο από το είδος *Polygala virgata* (Bashir, *et al.*, 1992) και έχει περιγραφεί η συνθετική του παρασκευή (Horie, *et al.*, 1998).

❖ **3-*O*- ραμνοπυρανοσίδης της κερκετίνης / κερσιτρίνη (CSM5)**

Ο πιο πολικός μεταβολίτης με βάση τα φασματοσκοπικά του δεδομένα ταυτοποιήθηκε ως κερκιτρίνη. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 72) παρατηρείται το τρισυποκατεστημένο ABX σύστημα του δακτυλίου Β, το οποίο αποτελείται από μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 2.1 Hz (H-2’) σε δ 7.32, μια διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.3 και 2.1 Hz (H-6’) σε δ 7.28 και μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz (H-5’) σε δ 6.89. Τα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου Α συντονίζονται στα 6.17 και 6.32 ppm ως ευρείες απλές κορυφές. Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερόμενες κορυφές, σε συνδυασμό με τα σήματα που εμφανίζονται στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR, συμπεράναμε πως πρόκειται

για παράγωγο της κερκετίνης που φέρει ένα σάκχαρο, γεγονός που συνάδει με την πολικότητα του μεταβολίτη. Η μορφή του ανωμερικού πρωτονίου, το οποίο εμφανίζεται στα 5.33 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 1.7 Hz, αλλά και η ύπαρξη μιας διπλής κορυφής (J = 6.0 Hz) που ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια στα 0.93 ppm υποδηλώνουν την παρουσία ραμνόσης. Από το φάσμα HMBC και συγκεκριμένα τη ^{3}J σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου με τον οξυγονωμένο άνθρακα της θέσης C-3 (δ 136.1) προσδιορίστηκε η θέση σύνδεσης του σακχάρου στη γενίνη.

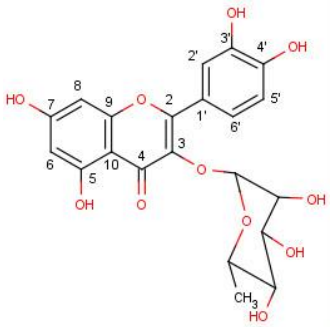


Εικόνα 72: Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη CSM5

Με τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Lee, *et al.*, 2014) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 67.

Πίνακας 67: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM5

CSM5 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	159.3
3	-	136.1
4	-	178.4
5	-	163.1
6	6.17 (1H, d, 2.0)	99.2
7	-	166.1
8	6.32 (1H, d, 2.0)	94.5
9	-	158.6

10	-	106.1
1’	-	122.8
2’	7.32 (1H, d, 2.1)	116.2
3’	-	146.3
4’	-	149.7
5’	6.89 (1H, d, 8.3)	115.6
6’	7.28 (1H, dd, 8.3 / 2.1)	122.3
3- *O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’	5.33 (1H, d, 1.7)	102.8
2’’’	4.21 (1H, dd, 3.0 / 1.7)	75.3
3’’’	3.74 (1H, dd, 9.9 / 3.0)	71.4
4’’’	3.31 (1H, t, 9.9)	72.7
5’’’	3.40 (1H, m)	71.3
5’’’-CH_3	0.93 (1H, d, 6.0)	17.0

Ο 3-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της κερκετίνης απαντάται σε αρκετές φυτικές πηγές ενώ έχει απομονωθεί και από τους καρπούς του φυτού *Ceratonia siliqua* (Owen, *et al.*, 2003). Χαρακτηρίζεται για την αντιοξειδωτική της ικανότητα (Kumari, *et al.*, 2011), ενώ έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Wagner, *et al.*, 2006) και προστατεύει έναντι της ακτινοβολίας UVB *in vitro* αλλά και *in vivo* όπως έχει αποδειχθεί σε μοντέλο ‘zebra fish’ (Yang, *et al.*, 2012). Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η κερκιτρίνη παρεμποδίζει την εξέλιξη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης σε *in vivo* μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων των αρουραίων, παρεμβαίνοντας στο μονοπάτι σηματοδότησης MAPK (Li, *et al.,* 2017). Επιπλέον, σε συγκέντρωση 500 μM φάνηκε να ευνοεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση στην κυτταρική σειρά MC3T3 και να καταστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση στην κυτταρική σειρά RAW (Satue, *et al.*, 2013). Τέλος, μελέτη έχει αναδείξει την προστατευτική επίδραση της κερκιτρίνης στα οστεοβλαστικά κύτταρα έπειτα από έκθεσή τους σε H_2O_2 (Choi, 2012).

4.3.4.1.4 Μελέτη του κλάσματος CSM-F11

Το κλάσμα CSM-F11, όπως έδειξε ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC, περιείχε σε υψηλή καθαρότητα ένα κύριο μεταβολίτη με χρωματογραφικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών. Πράγματι η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την κερκιτρίνη (CSM5), η οποία συγκαταλλέγεται στους κύριους μεταβολίτες της *Ceratonia siliqua*.

4.3.4.1.5 Μελέτη του κλάσματος CSM-F12

Η κερκιτρίνη εντοπίζεται και στο κλάσμα CSM-F12 μαζί με ένα μεταβολίτη υψηλότερης πολικότητας με χρωματογραφικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν στην κατηγορία των φαινολικών οξέων. Με σκοπό την απομόνωσή του, 120 mg μίγματος επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και μεθανόλη ως διαλύτης έκλουσης, απ’όπου παραλήφθηκε ο μεταβολίτης CSM6.

❖ **Γαλλικό οξύ (CSM6)**

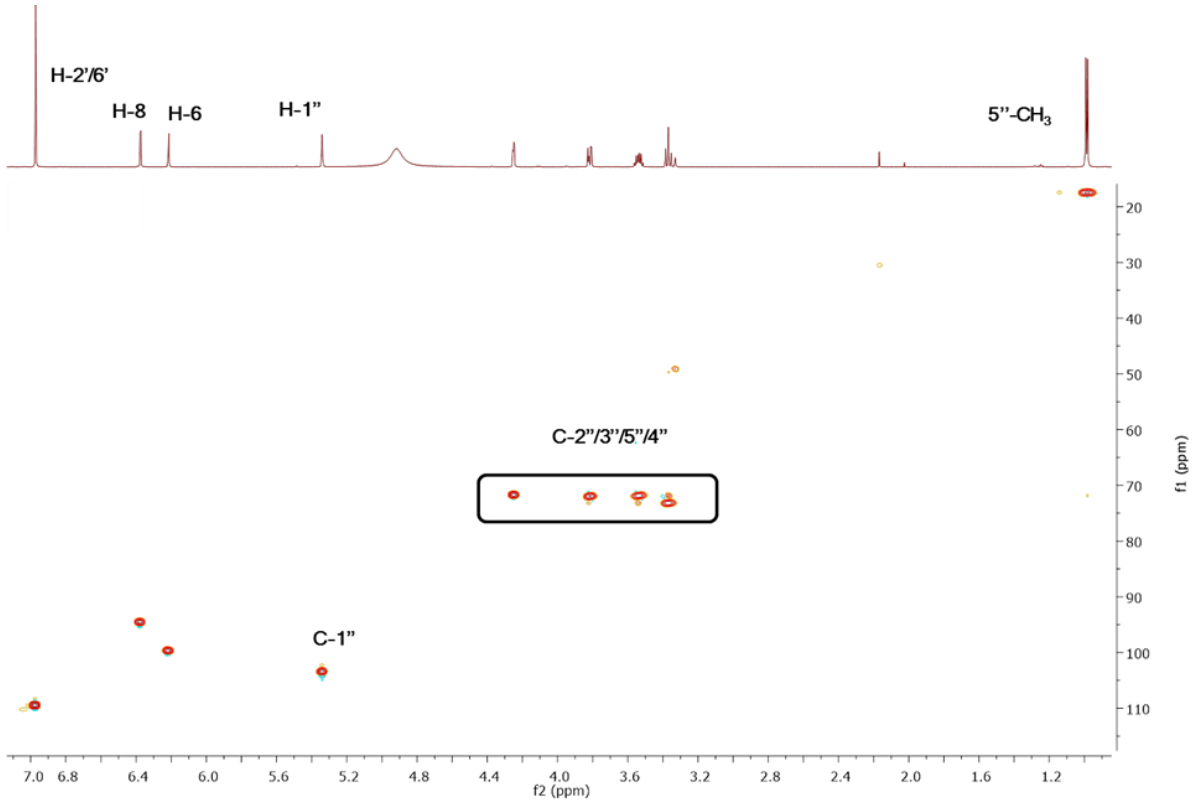
Είναι ένα από τα πιο συχνά απαντώμενα φαινολικά οξέα στη φύση, ενώ ποσοτικά αποτελεί και έναν από τους βασικότερους μεταβολίτες της *Ceratonia siliqua* (Goulas, *et al.*, 2016) (El Bouzdoudi, *et al.*, 2017), από την οποία έχει απομονωθεί και στο παρελθόν (Eldahshan, 2011). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη έχουν αναφερθεί προηγουμένως στην § 4.3.1.1.3, (DHM6).

4.3.4.1.6 Μελέτη του κλάσματος CSM-F13

Ο χρωματογραφικός έλεγχος TLC του κλάσματος CSM-F13 φάνηκε να περιέχει αρκετούς μεταβολίτες οι οποίοι ήταν φαινολικά παράγωγα. Έτσι, 60 mg του κλάσματος επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με τις προαναφερόμενες συνθήκες και εκτός από το γαλλικό οξύ και την κερκιτρίνη, τα οποία είχαν ήδη απομονωθεί από προηγούμενο κλάσμα, με τη χρήση παρασκευαστικής TLC απομονώθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

❖ **3- *O*-ραμνοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (CSM7)**

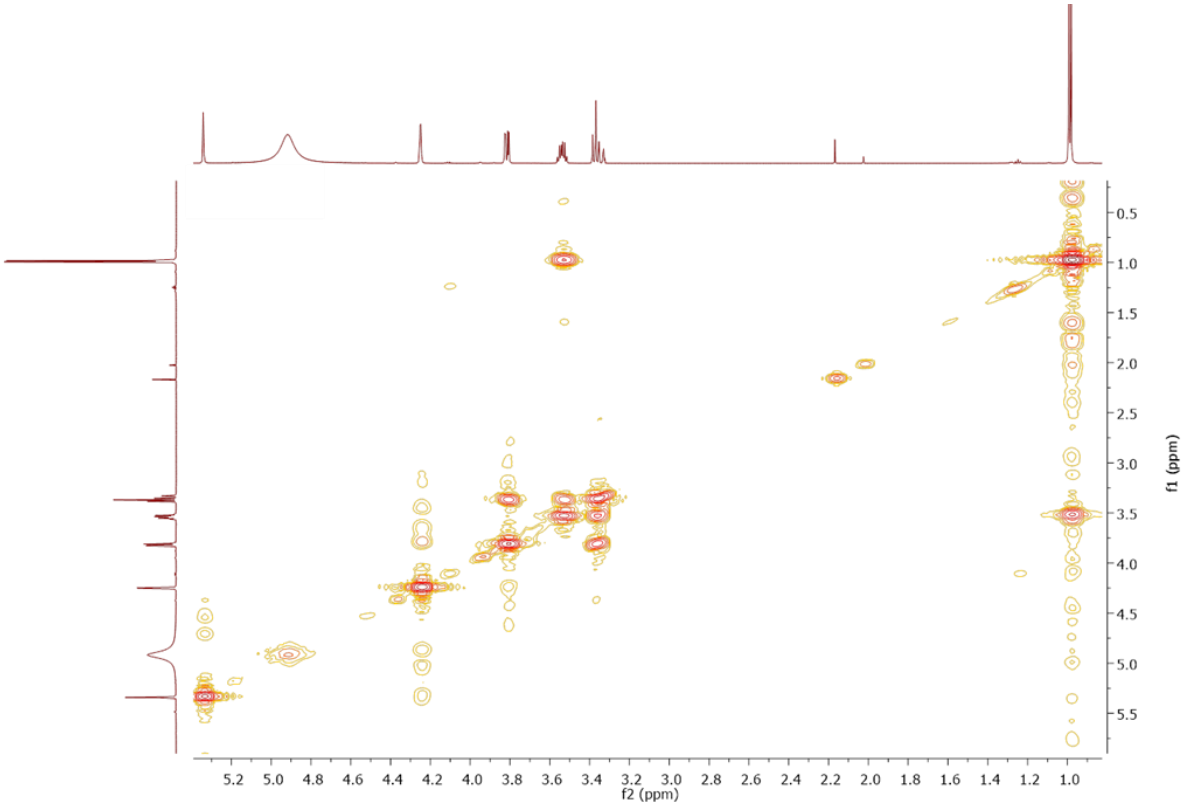
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H-NMR (Εικόνα 73) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-6 (δ 6.21) και H-8 (δ 6.37) του δακτυλίου A ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz, ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου B (H-2' και H-6') δίνουν κοινή κορυφή σε δ 6.97, καθώς έχουν το ίδιο περιβάλλον, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 109.6 ppm.



Εικόνα 73: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM7

Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου εμφανίζεται σε δ 5.34 ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 1.7 Hz, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου H-6'' συντονίζονται σε δ 0.99 ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.0 Hz.

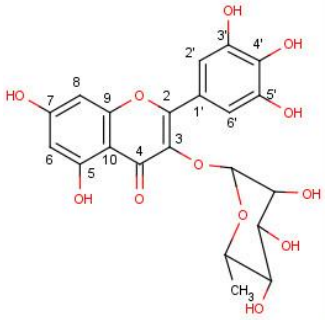
Τα πρωτόνια H-2'' (δ 4.25), H-3'' (δ 3.82) και H-4'' (δ 3.37), τα οποία εντοπίσθηκαν με τη βοήθεια του φάσματος COSY (Εικόνα 74), εμφανίζονται ως διπλή διπλής με σταθερές σύζευξης 3.5 και 1.7 Hz, διπλή διπλής με σταθερές σύζευξης 9.5 και 3.5 Hz και τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 9.5 Hz, αντίστοιχα.



Εικόνα 74: Φάσμα COSY του μεταβολίτη CSM7

Η μορφή των προαναφερόμενων κορυφών συνάδει με την παρουσία ραμνόσης στην ένωση, ενώ η θέση σύνδεσής στη θέση C-3 της μυρικετίνης προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φάσματος HMBC, όπου φάνηκε η ^{3}J σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου με τον οξυγονωμένο άνθρακα της προαναφερόμενης θέσης C-3 (δ 136.3). Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 68 σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Wubshet, *et al.*, 2015).

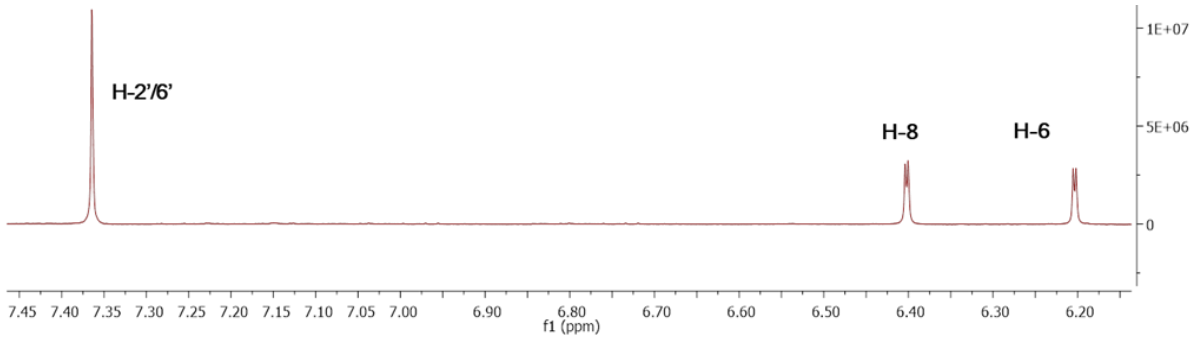
Πίνακας 68: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM7

CSM7 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** *δ* **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** *δ* **σε ppm**
2	-	159.4
3	-	136.3
4	-	178.4
5	-	163.3
6	6.21 (1H, d, 2.0)	99.8
7	-	165.8
8	6.37 (1H, d, 2.0)	94.5
9	-	158.4
10	-	105.9
1’	-	121.5
2’/6’	6.97 (2H, s)	109.6
3’/5’	-	146.9
4’	-	137.9
3-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’	5.34 (1H, d, 1.7)	103.4
2’’	4.25 (1H,dd, 3.5 / 1.7)	71.5
3’’	3.82 (1H, dd, 9.5 / 3.5)	72.8
4’’	3.37 (1H, t, 9.5)	73.3
5’’	3.51 (1H, m)	72.8
6’’	0.99 (3H, d, 6.0)	17.5

Ο 3-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της μυρικετίνης έχει απομονωθεί από τους καρπούς της *Ceratonia siliqua*, όπου μαζί με την κερκιτρίνη αποτελούν τα κύρια συστατικά τους *(Ydjedd, et al.*, 2017) (Owen, *et al.*, 2003). Χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιογόνο δράση (Hayder, *et al.*, 2008), ενώ πλήθος μελετών έχουν αναδείξει την αντιφλεγμονώδη δράση του (Kim, *et al.*, 2013).

❖ Μυρικετίνη (CSM8)

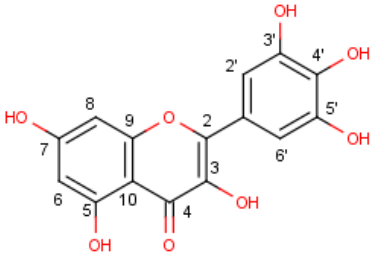
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 75) του μεταβολίτη CSM8 εμφανίζεται η απλή κορυφή στα 6.97 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια Η2’ και Η-6’, ενώ στα 6.37 και 6.21 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια Η-8 και Η-6 ως διπλές κορυφές με *J* = 2.0 Hz, αντίστοιχα.



Εικόνα 75: Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη CSM8

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων του μεταβολίτη CSM8, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 69, προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Yang, *et al.*, 2011).

Πίνακας 69: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM8

CSM8 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	-	159.4
3	-	136.3
4	-	178.4
5	-	163.3
6	6.20 (1H, d, 2.0)	99.8
7	-	165.8
8	6.40 (1H, d, 2.0)	94.5
9	-	158.4
10	-	105.9
1'	-	121.5
2'/6'	7.36 (2H, s)	109.6
3'/5'	-	146.9
4'	-	137.9

Η μυρικετίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών και είναι πολύ διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο, αλλά κυρίως σε γένη των οικογενειών Myricaceae (Tang, *et al.*, 2006), Anacardiaceae (Matic, *et al.,* 2013), Polygonaceae (El-Kader, *et al.*, 2013), Pinaceae (Kaundun, *et al.*, 1998) και Primulaceae (Toth, *et al.*, 2014). Έχει αναφερθεί η σημαντική περιεκτικότητά της στα μούρα, στα λαχανικά, στο τσάϊ ακόμα και σε κρασιά (Hertog, *et al.*, 1993) (Ong, *et al.*, 1997) ενώ έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα της *Ceratonia siliqua* (Vaya, *et al.*, 2006). Παρουσιάζει ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντικαρκινική, η αντιδιαβητική και η καρδιοπροστατευτική δράση, ενώ μελέτες υποστηρίζουν πως μπορεί να δρα ευεργετικά ακόμα και σε ασθένειες σχετιζόμενες με το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως η νόσος

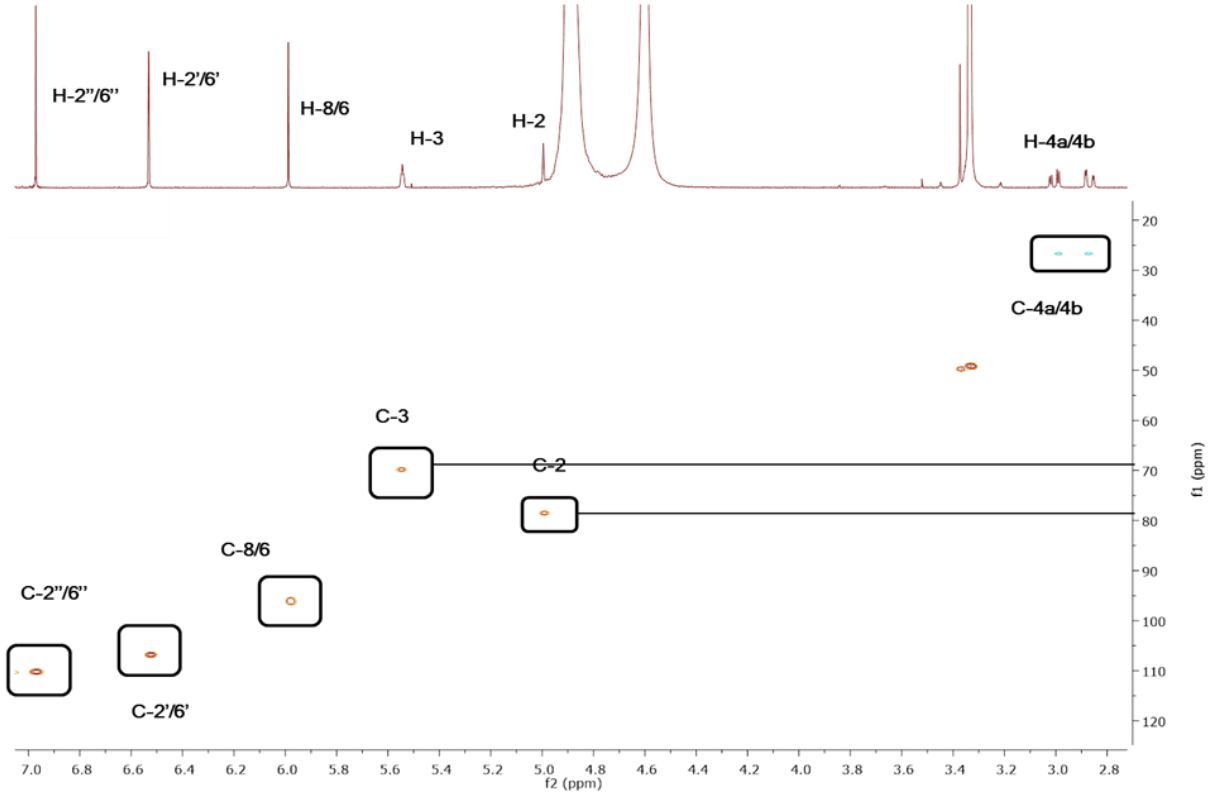
του Parkinson και του Alzheimer (Semwal, *et al.,* 2015). Ερευνητική μελέτη, η οποία αφορούσε την αντιμετώπιση της περιοδοντίτιδας, ανέδειξε την αντιφλεφμονώδη δράση της μυρικετίνης σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών και την ικανότητά της να καταστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (Ko, 2012). Επίσης, η μυρικετίνη φάνηκε να προστατεύει τα οστεοβλαστικά κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη και τη δυσλειτουργία που επιφέρει η έκθεσή τους στη 2-δεοξυ-d-ριβόση, γεγονός που την ανάγει σε πιθανό προστατευτικό πράγοντα σε περιπτώσεις ασθένειας των οστών που σχετίζονται με τον διαβήτη (Kyung-Hee, *et al.*, 2008).

4.3.4.1.7 Μελέτη του κλάσματος CSM-F14

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι ο κύριος μεταβολίτης του κλάσματος CSM-F14 είναι ο 3-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (CSM7), ενώ εντοπίσθηκε και ένας δεύτερος πολικότερος μεταβολίτης ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά από την εμφάνιση με θεϊική βανιλλίνη εμφάνισε κόκκινη χρώση. Με σκοπό το διαχωριμό τους, εφαρμόστηκε η τεχνική της χρωματογραφιάς μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως η μεθανόλη διαλύτης έκλουσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν ο 3-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της μυρικετίνης και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης.

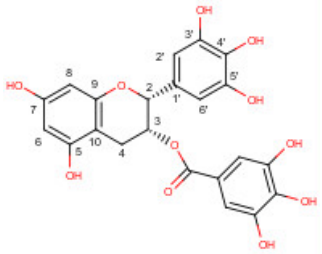
- **Γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (CSM9)**

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 76) του μεταβολίτη CSM9 παρατηρούμε τρεις απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2''/H-6'' (δ 6.97), H-2'/H-6' (δ 6.52) και H-6/H-8 (δ 5.98). Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάμσατος εμφανίζονται δύο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των H-3 (δ 5.55, m) και H-2 (δ 4.99, s) του βασικού σκελετού, των οποίων οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 69.8 ppm και 78.5. Οι προαναφερόμενες χημικές μετατοπίσεις και η μορφή των πρωτονίων H-3 και H-2 είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα της επιγαλλοκατεχίνης, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τα αντίστοιχα της γαλλοκατεχίνης (Choi, *et al.*, 2015). Επίσης, χαρακτηριστικά είναι τα σήματα του μεθυλενίου της θέσης C-4, τα πρωτόνια του οποίου εμφανίζονται ως διπλές διπλών σε δ 3.00 (J = 17.2 και 4.6 Hz) και δ 2.86 (J = 17.2 και 2.8 Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 26.7 ppm. Στο φάσμα HMBC φαίνεται ότι ο καρβονυλικός άνθρακας C-7'' (δ 167.8) παρουσιάζει σύζεύξεις ^{3}J τόσο με τα πρωτόνια H-2''/H-6'' (δ 6.97) όσο και με το πρωτόνιο της θέσης C-3 του βασικού σκελετού. Η αποθωράκιση του πρωτονίου H-3 συνάδει με την εστεροποίηση του υδροξυλίου στη θέση αυτή από την ομάδα του γαλλικού οξέος. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 70 προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).



Εικόνα 76: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM9

Πίνακας 70: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM9

CSM9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** **δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR** **δ σε ppm**
2	4.99 (1H, s)	78.5
3	5.55 (1H, m)	69.8
4a	3.00 (1H, d, 17.2 / 4.6)	26.7
4b	2.86 (1H, d, 17.2 / 2.8)	
5	-	157.0
6/8	5.98 (2H, s)	96.2
7	-	157.6
9	-	157.3
10	-	99.4
1'	-	131.1
2'/6'	6.52 (2H, s)	106.8
3'/5'	-	145.0
4'	-	133.1
1''	-	121.6
2''/6''	6.97 (2H, s)	110.3
3''/5''	-	146.3
4''	-	140.0
7''	-	167.8

Ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης αποτελεί τον κυρίαρχο δευτερογενή μεταβολίτη του είδους *Camellia sinensis* (Choi, *et al.*, 2015), ενώ εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες σε όλες τις ποικιλίες τσαγιού. Έχει απομονωθεί από πολλά φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα *Pelargonium sidoides* (Goedecke, *et al.*, 2005)*, Syzygium samarangense* (Kuo, *et al.*, 2004)*, Limonium gmelinii* (Gadetskaya, *et al.*, 2014)*, Myrica rubra* (Yang, *et al.*, 2011) όπως και η *Ceratonia siliqua* (Eldahshan, 2011). Πολυάριθμες μελέτες επικεντρώνονται στις ποικίλες βιολογικές δράσεις του μεταβολίτη, με τις βασικότερες από αυτές να είναι η αντιοξειδωτική, η δράση κατά της αθηροσκλήρωσης (Xu, *et al.,* 2014), η αντιδιαβητική (Sampath, *et al.*, 2016) (Li, *et al.,* 2007), η αντιφλεγμονώδης (Yu, *et al.*, 2017) (Allen, *et al.*, 1981) (Khalatbary, *et al.*, 2011), η καρδιοπροστατευτική (Eng, *et al.*, 2017) και η αντικαρκινική (Sahar, *et al.*, 2017) (Pons-Fuster L.E., *et al.*, 2017). Πιθανή οστεοπροστατευτική δράση αποδίδεται στον μεταβολίτη CSM9, καθώς πρόσφατη μελέτη έδειξε πως ενεργοποιεί την σύνθεση της οστεοπροτογερίνης (ενός παράγοντα που καταστέλλει την οστική απορρόφηση) και τη δράση των οστεοβλαστικών κυττάρων (Kuroyanagia, *et al.*, 2017), ενώ επιπλέον αυξάνει την παραγωγή του παράγοντα IL-6 στα προαναφερόμενα κύτταρα (Kuroyanagi, *et al.*, 2013).

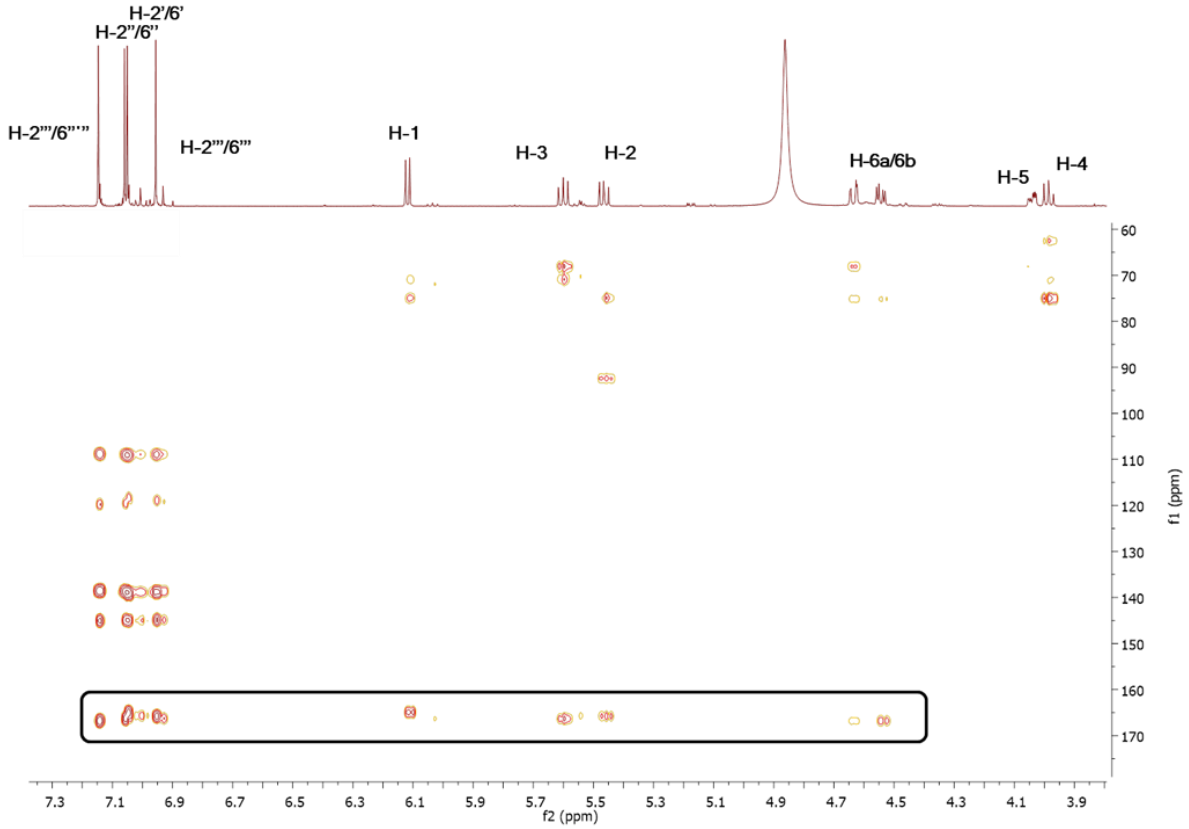
4.3.4.1.8 Μελέτη του κλάσματος CSM-F18

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι τα κλάσματα CSM-F17 και CSM-F18 παρουσιάζουν παρόμοιο περιεχόμενο σε μεταβολίτες, αλλά λόγω επαρκούς ποσότητας αποφασίσθηκε η περαιτέρω μελέτη του κλάσματος CSM-F18. Στα προααναφερόμενα κλάσματα εντοπίστηκε ένας μεταβολίτης παρόμοιας πολικότητας με τον 3-*O* ραμνοπυρανοσίδη της μυρικετίνης, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης έδωση μωβ-γκρι χρώση. Με σκοπό την απομόνωσή του, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (με συνθήκες ανάλογες με αυτές που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο) και παραλήφθηκαν οι μεταβολίτες CSM7 και CSM10.

- **1,2,3,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση (CSM10)**

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 77) του μεταβολίτη CSM10 παρατηρούμε τέσσερις απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των τεσσάτων ομάδων του γαλλικού οξέος (H-2'/H-6', H-2''/H-6'', H-2'''/H-6''', H-2''''/H-6''''') που ανά δύο είναι χημικώς ισοδύναμα. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC (εικόνα 77) καθώς κάθε μια από τις απλές κορυφές παρουσιάζει ^{3}J σύζευξη με καρβονυλικό άνθρακα σε δ 168.5 - 166.5. Οι τέσσερις προαναφερόμενοι καρβονυλικοί άνθρακες (δ 166.6, 167.2,167.8 και 168.3) παρουσιάζουν με τη σειρά τους ^{3}J συζεύξεις με τα αντίστοιχα πρωτόνια των θέσεων του σακχάρου (C-1, C-2, C-3, C-6) στις οποίες υπάρχει εστεροποίηση. Τα προαναφερόμενα πρωτόνια εμφανίζονται σαφώς αποθωρακισμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια των μη εστεροποιημένων θέσεων και

συντονίζονται σε δ 6.12 (d, J = 8.3 Hz, H-1), 5.45 (dd, J = 9.5 / 8.3 Hz, H-2), 5.58 (t, J = 9.5 Hz, H-3) και 4.64 (1H, dd, J = 12.2 / 1.8 Hz, H-6a) / 4.54 (1H, dd, J = 12.2 / 5.0 Hz, H-6b).

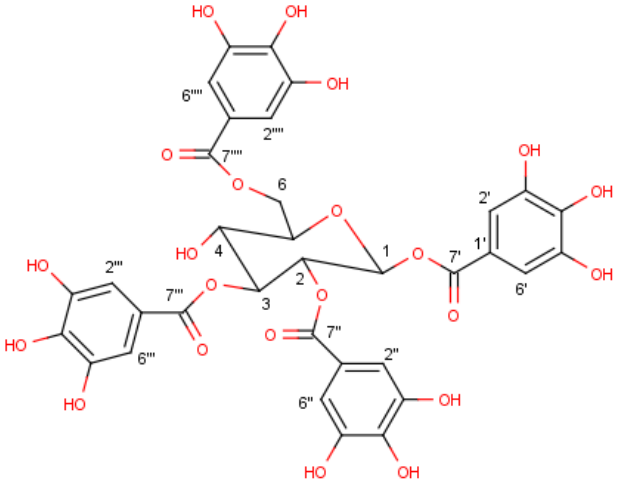


Εικόνα 77: Φάσμα ^{1}H -NMR και HMBC της ένωσης CSM10

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 71 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Owen, *et al.*, 2003).

Πίνακας 71: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM10

CSM10 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	6.12 (1H, d, 8.3)	93.7
2	5.45 (1H, dd, 9.56)	72.3
3	5.58 (1H, t, 9.2)	76.4

4	3.99 (1H, t, 8.7)	69.5
5	4.05 (1H, m)	76.7
6a	4.64 (1H, dd, 1.8 / 11.9)	63.8
6b	4.54 (1H, dd, 5.0 / 12.4)	
1’	-	119.7
2’/6’	7.05 (2H, s)	110.6
3’/5’	-	146.3
4’	-	140.5
7’	-	166.6
1’’	-	121.0
2’’/6’’	7.06 (2H, s)	110.6
3’’/5’’	-	146.4
4’’	-	140.1
5’’	-	146.4
7’’	-	167.8
1’’’	-	120.3
2’’’/6’’’	6.96 (2H, s)	110.3
3’’’/5’’’	-	146.4
4’’’	-	140.3
7’’’	-	167.2
1’’’’	-	121.5
2’’’’/6’’’’	7.15 (2H, s)	110.2
3’’’’/5’’’’	-	146.4
4’’’’	-	140.1
7’’’’	-	168.3

Η 1,2,3,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση ανήκει στην κατηγορία των γαλλοταννινών και έχει απομονωθεί από αρκετά φυτικά είδη, όπως είναι τα είδη *Euphorbia jolkinii* (Lee, e*t al*., 2004), *Syzygium guineense* (Nguyen, *et al.,* 2016) και *Ceratonia siliqua* (Laal, *et al*., 2015). Επίσης, έχει απομονωθεί από το *Geranium wilfordii*, το οποίο χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην αντιμετώπιση γαστροεντερικών διαταραχών και φαίνεται ότι σε σημαντικό βαθμό οφείλει τη δράση του στο συγκεκριμένο φυσικό προϊόν καθώς μελέτη έδειξε πως αναστέλλει τη δράση του *Helicobacter pylori* (Zhang, *et al*., 2013). Επιπλέον έχει χαρακτηριστεί ως σημαντικός αναστολέας της τυροσινάσης (Matsuo, *et al.,* 1997) (Lall, *et al*., 2015) και της παγκρετικής λιπάσης (Kwon, *et al.,* 2013). Προγενέστερη μελέτη είχε αναδείξει την αντιυπερτασική δράση της 1,2,3,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκόσης, η οποία εκφράζεται μέσω αναστολής της δράσης του ενζύμου ACE (Liu, e*t al*., 2003), ενώ χαρακτηρίζεται και ως πιθανός αντιδιαβητικός παράγοντας καθώς αυξάνει την κυτταρική πρόσληψη της γλυκόζης (Yang, *et al.,* 2013). Γνωστές είναι η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του μεταβολίτη CSM10 (Min, *et al.,* 2017), ενώ φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση στην αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου BACE1. Τέλος, έχει αναφερθεί η αντιική δράση και πιο συγκεκριμένα η ανασταλτική επίδραση του φαινολικού αυτού παραγώγου έναντι του ιού της ηπατίτιδας (Duan, *et al*., 2004).

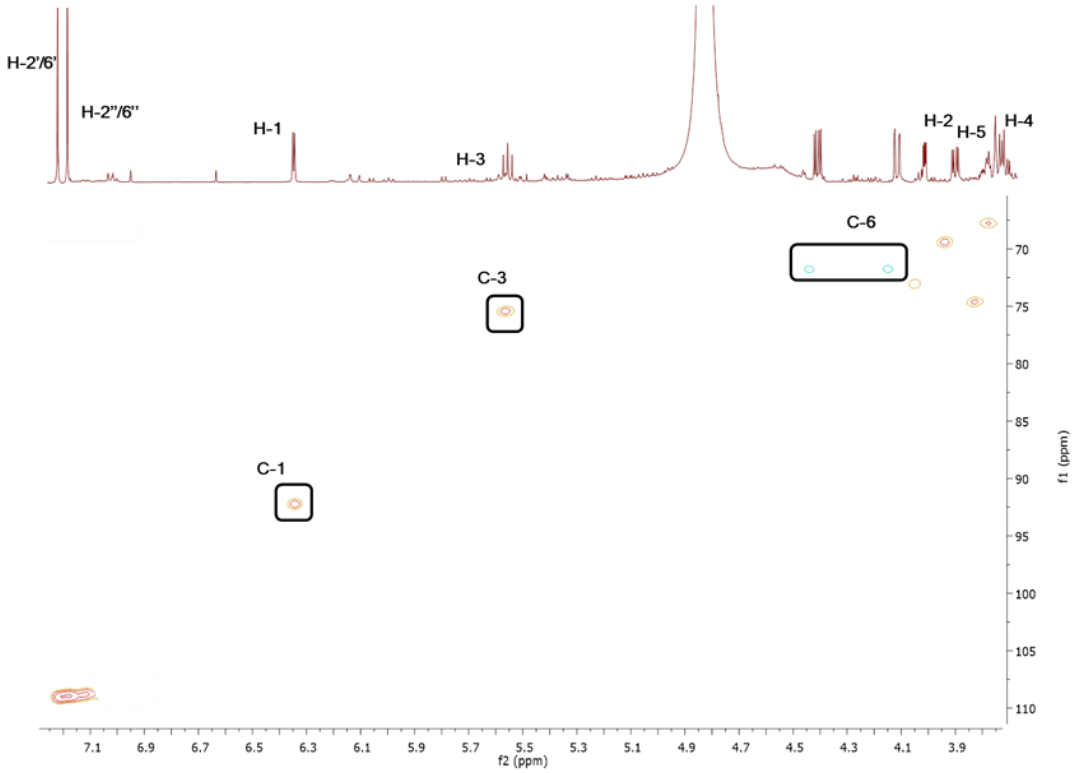
4.3.4.1.9 Μελέτη του κλάσματος CSM-F19

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα CSM-F19 περιέχει πέντε πολικούς μεταβολίτες με παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά και διαφορετικά Rf. Με σκοπό την απομόνωσή τους πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία TLC, όπου 25

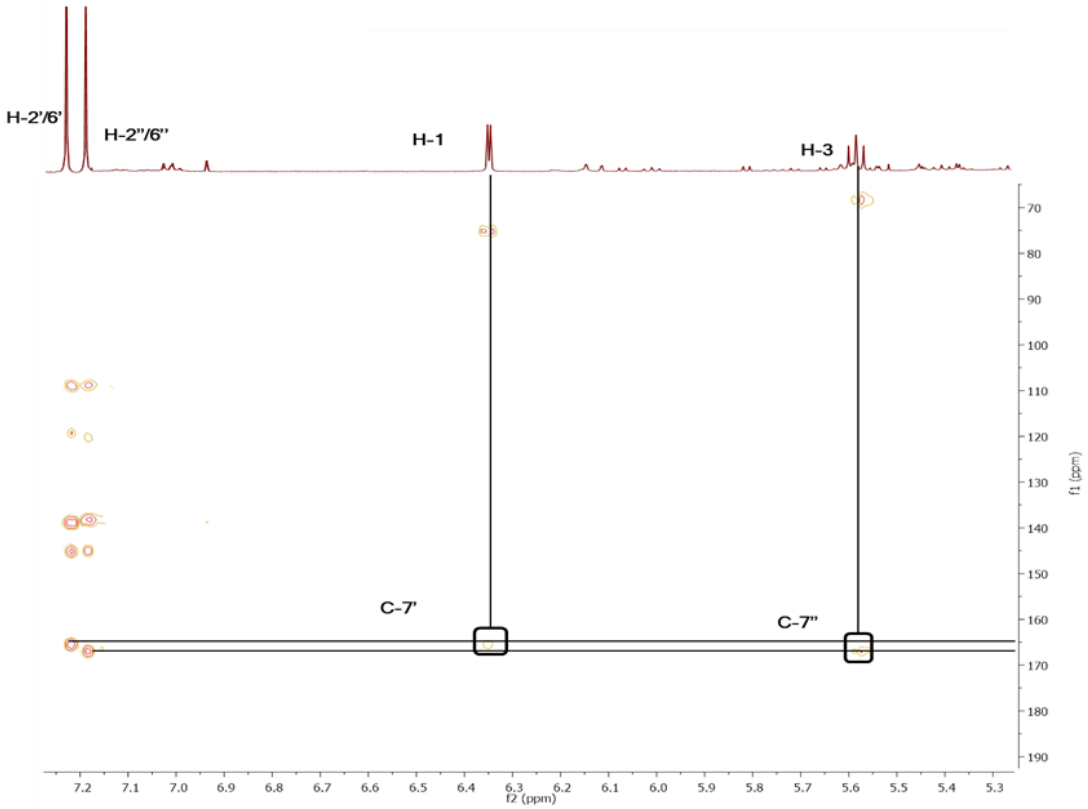
mg του κλάσματος επιστρώθηκαν σε πλάκα αντίστροφης φάσης και το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα H_2O/ACN 70/30 και 1% F.A. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση (CSM11)**

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 78) του μεταβολίτη CSM11 παρατηρούμε δύο απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα τέσσερα πρωτόνια των δύο ομάδων γαλλικού οξέος (H-2'/H-6' και H-2''/H-6'').



Εικόνα 78: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM11

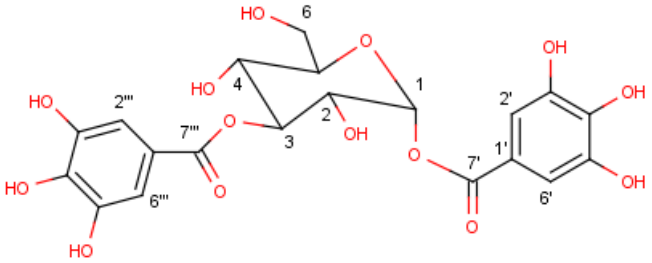


Εικόνα 79: Φάσμα ^{1H}-NMR και HMBC του μεταβολίτη CSM11

Στο φάσμα HMBC (εικόνα 79) τα προαναφερόμενα πρωτόνια παρουσιάζουν ^{3}J σύζευξη με τους άνθρακες των καρβονυλίων των ομάδων γαλλικού οξέος, οι οποίοι συντονίζονται σε δ 166.8 και 168.8 και παρουσιάζουν με τη σειρά τους ^{3}J σύζευξεις με τα πρωτόνια H-1 και H-3 του σακχάρου, αντίστοιχα. Τα προαναφερόμενα πρωτόνια εμφανίζονται σαφώς πιο αποθωρακισμένα από τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου τα οποία βρίσκονται σε θέσεις που δεν είναι εστεροποιημένες. Επίσης, η μορφή του ανωμερικού πρωτονίου, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 3.5 Hz, φανερώνει ότι πρόκειται για α-ανωμερές καθώς το προαναφερόμενο πρωτόνιο έχει ισημερινό προσανατολισμό. Οι κορυφές των υπόλοιπων πρωτονίων του σακχάρου, τα οποία συντονίζονται σε δ 3.95 (1H, dd, 10.0 / 3.7, H-2), 5.58 (1H, t, 10.0, H-3), 3.78 (1H, t, 10.0, H-4), 3.83 (1H, m, H-5), 4.45 (1H, dd, 11.0 / 4.5, H-6a) και 4.16 (1H, dd, 11.0 / 1.5, H-6b), συνάδουν με την παρουσία γλυκόσης στην ένωση. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 72, προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 72: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM11

CSM11 (MeOD)

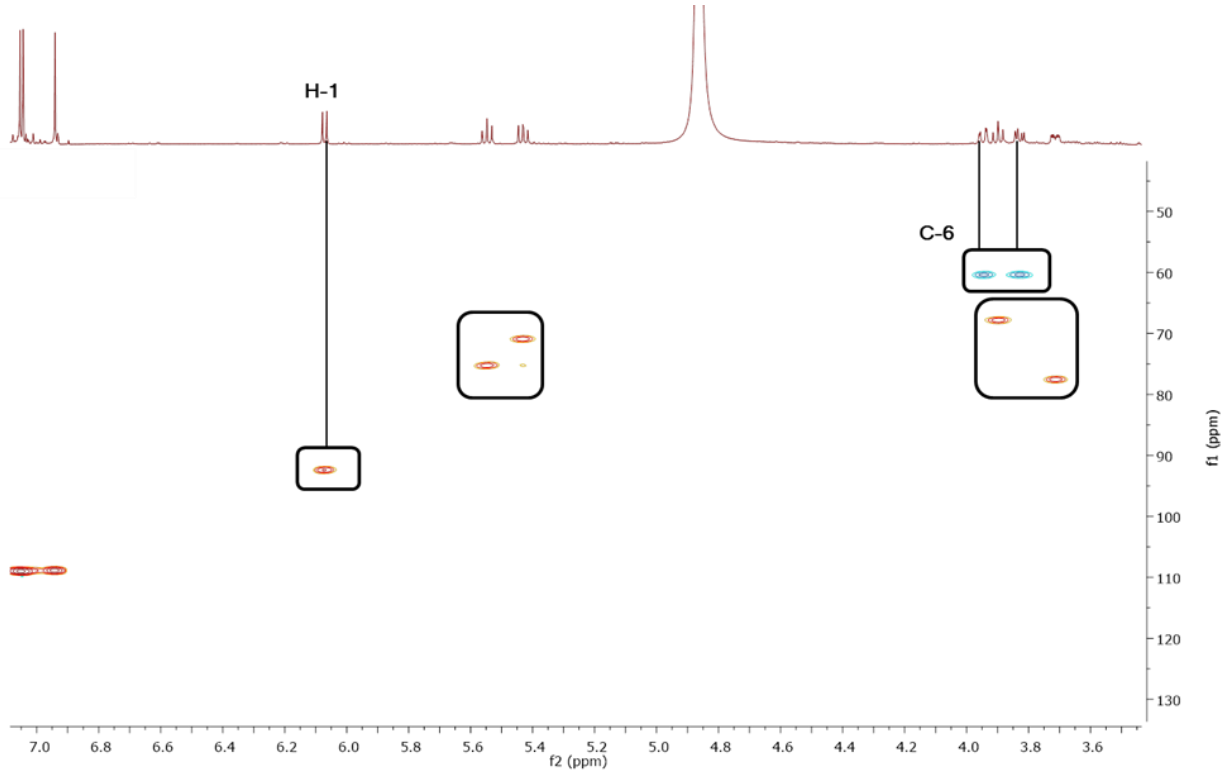


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	6.35 (1H, d, 3.7)	93.7
2	3.95 (1H, dd, 10 / 3.7)	70.9
3	5.58 (1H, t, 10)	76.8
4	3.78 (1H, m)	69.2
5	3. 83 (1H, m)	76.4
6a	4.45 (1H, dd, 4 / 10)	73.1
6b	4.16 (1H, dd, 1.5 / 10)	
1’	-	120.7
2’/6’	7.22 (2H, s)	110.6
3’/5’	-	146.6
4’	-	140.1
7’	-	166.8
1’’	-	121.0
2’’/6’’	7.18 (2H, s)	110.6
3’’/5’’	-	146.4
4’’	-	140.1
7’’	-	168.8

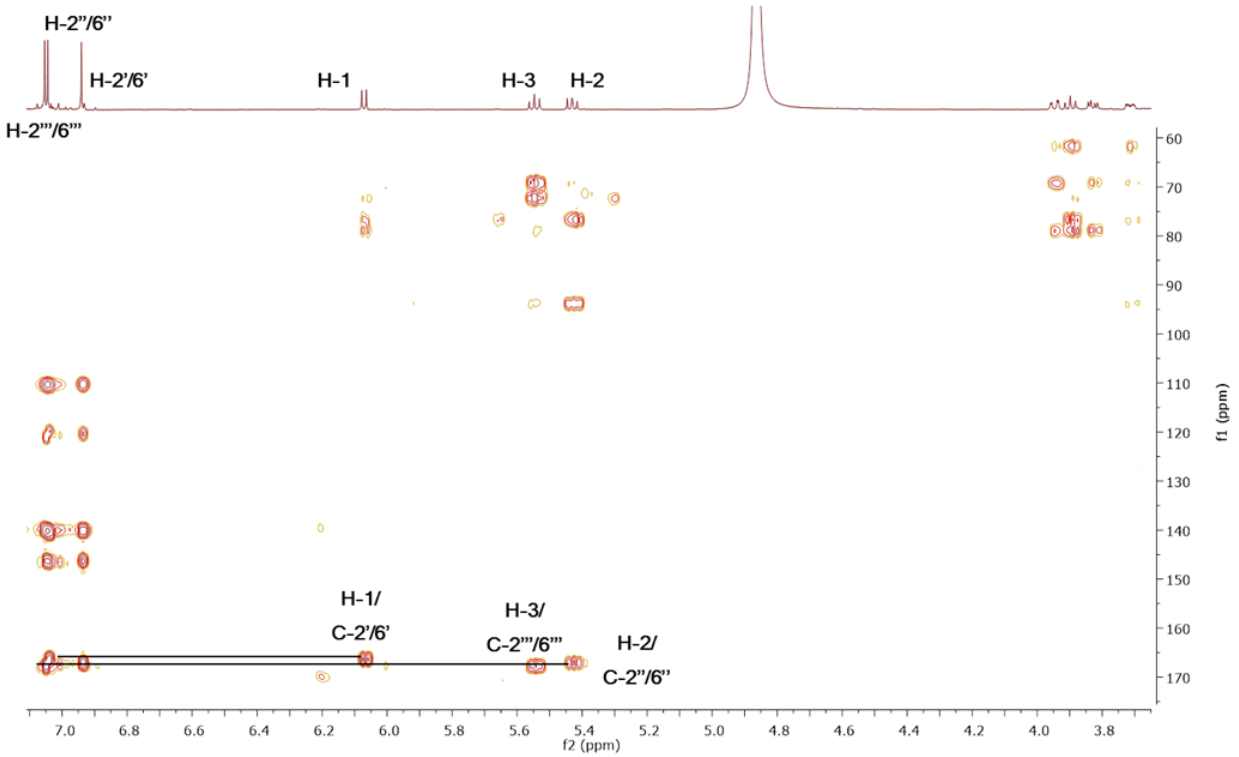
Η 1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυσική πηγή επομένως αποτελεί **νέο** φυσικό προϊόν.

❖ 1,2,3-τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση (CSM12)

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του μεταβολίτη CSM12 παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη CSM10. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 80) παρατηρούμε τρεις απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα έξι πρωτόνια των τριών ομάδων γαλλικού οξέος (H-2’/H-6’, H-2’’/H-6’’ και H-2’’’/H-6’’’). Το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται στα 6.07 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.7 Hz, γεγονός που φανερώνει τον αξονικό προσανατολισμό του. Το προαναφερόμενο πρωτόνιο, όπως επίσης και τα πρωτόνια H-2 (*δ* 5.43, dd, J = 9.7 / 8.7 Hz) και H-3 (*δ* 5.55, t, *J* = 9.7 Hz) του σακχάρου, είναι εμφανώς αποθωρακισμένα λόγω της εστεροποίησης των αντίστοιχων υδοξυλίων με τις ομάδες γαλλικού οξέος, η οποία επιβεβαιώνεται από τις ^{3}J σύζευξεις του φάσματος HMBC (εικόνα 81) ανάμεσα στους καρβονυλικούς άνθρακες και τα αντίστοιχα σακχαριδικά πρωτόνια. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου διαπιστώθηκαν με τη βοήθεια του φάσματος COSY (εικόνα 82). Συντονίζονται σε *δ* 3.99 (t, *J* = 9.7 Hz, H-4), *δ* 3.70 (m, H-5), *δ* 3.95 (dd, *J* = 12.3 / 3.1 Hz, H-6a) και *δ* 3.85 (dd, *J* = 12.3 / 4.9 Hz, H-6b), γεγονός που συνάδει με την παρουσία γλυκοπυρανόσης στην ένωση.

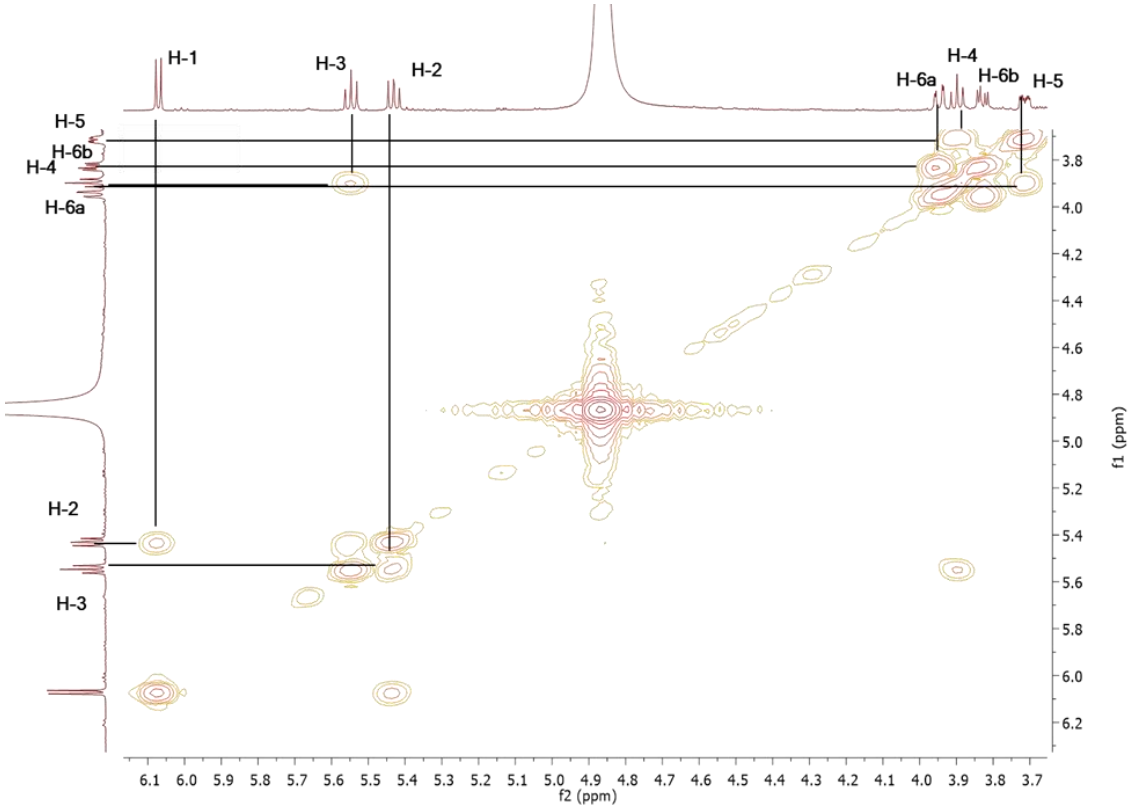


Εικόνα 80¨: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM12



Εικόνα 81: Φάσμα ^{1H}-NMR και HMBC του μεταβολίτη CSM12

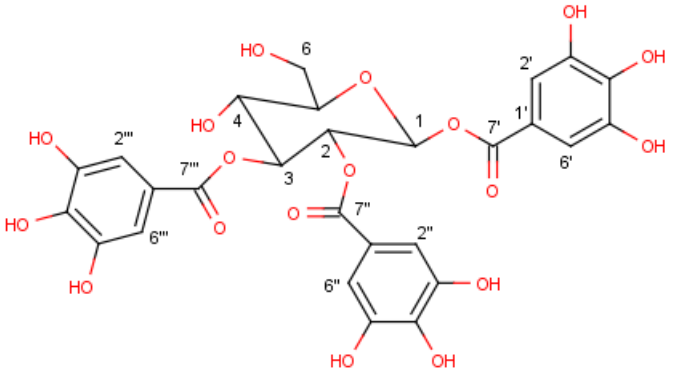
.



Εικόνα 82: Φάσμα ^{1}H -NMR και COSY του μεταβολίτη CSM12

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της 1,2,3-τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκόζης αναφέρονται στον πίνακα 73 και είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία (Li, *et al.,* 2015).

Πίνακας 73: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM12

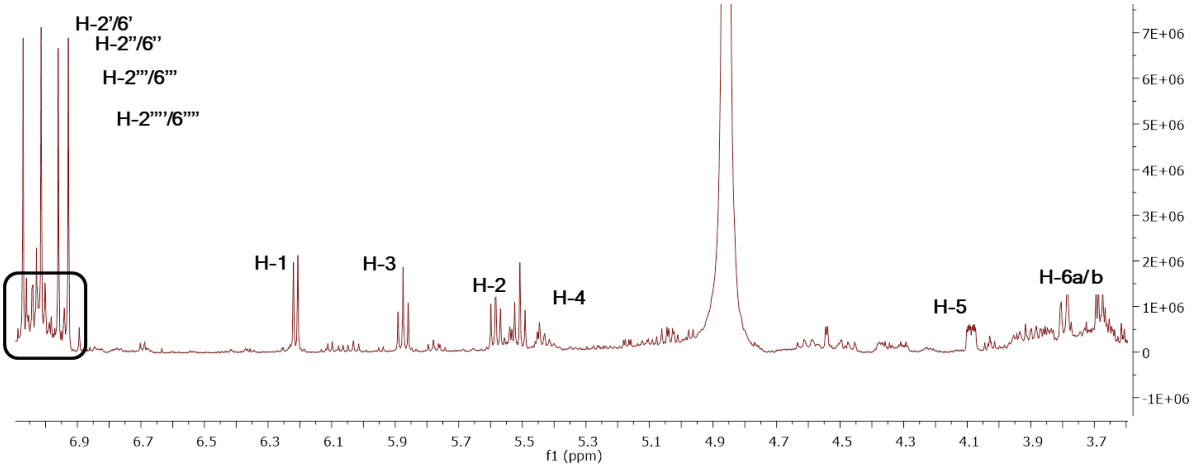
CSM12 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	6.07 (1H, d, 8.7)	93.7
2	5.43 (1H, dd, 9.7)	72.3
3	5.55 (1H, t, 9.7)	76.7
4	3.99 (1H, t, 9.7)	69.3
5	3.70 (1H, m)	78.9
6a	3.95 (1H, dd, 12.3 / 3.1)	61.8
6b	3.85 (1H, dd, 12.3 / 4.9)	
1’	-	119.7
2’/6’	7.04 (2H, s)	110.3
3’/5’	-	146.3

4’	-	140.5
7’	-	167.1
1’’	-	121.0
2’’/6’’	6.95 (2H, s)	110.2
3’’/5’’	-	146.4
4’’	-	140.1
7’’	-	166.9
1’’’	-	120.3
2’’’/6’’’	7.05 (2H, s)	110.3
3’’’/5’’’	-	146.4
4’’’	-	140.3
7’’’	-	167.7

Η 1,2,3-τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση ανήκει στην κατηγορία των γαλλοτανινών και έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη, όπως είναι τα *Geum japonicum* (Yoshida, *et al*., 1985)*, Cornus officinalis* (Lee, *et al*., 2011)*, Quercus phillyraeoides* (Nonaka, *et al.,* 1989)*, Punica granatum* (Nawwar, *et al*., 1994) καθώς και από αρκετά είδη των γενών *Euphorbia* (Lee, *et al*., 1991) και *Plantago* (Makhmudov, *et al*., 2011). Παρ’ όλο που στη *Ceratonia siliqua* έχουν εντοπιστεί διάφορα τριγαλλοϋλο- γλυκοσιδικά παράγωγα, η 1,2,3- τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα από το συγκεκριμένο είδος. Διαθέτει ποικίλες βιολογικές ιδιότητες όπως όλες οι γαλλοτανίνες, αλλά πιο σημαντικές θεωρούνται η αντιδιαβητική (Lee, *et al.,* 2011) και αντικαρκινική δράση της (Li, *et al*., 2015).

❖ 1,2,3,4 -τετρα-*O*- γαλλοϋλο-*β*-D γλυκοπυρανόση (CSM13)

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του μεταβολίτη CSM13 παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη CSM10. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 83) παρατηρούμε τέσσερις απλές κορυφές (δ 7.15, 7.06, 7.05 και 6.96) οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα οκτώ πρωτόνια των τριών ομάδων γαλλικού οξέος (H-2’/H-6’, H-2’’/H-6’’, H-2’’’/H-6’’’, H-2’’’’/H-6’’’’). Τα σήματα στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος αφορούν τα πρωτόνια της γλυκόσης και διακρίνονται σε δύο ομάδες: (i) τα πρωτόνια H-1 (*δ* 6.21), H-2 (*δ* 5.58), H-3 (*δ* 5.87) και H-4 (*δ* 5.51) που εμφανίζονται αποθωρακισμένα λόγω της εστεροποίησης στις αντίστοιχες θέσεις του σακχάρου (ii) τα πρωτόνια H-5 (*δ* 4.09), H-6a (*δ* 3.80), H-6b (*δ* 3.56) που εμφανίζονται πιο θωρακισμένα καθώς στις αντίστοιχες θέσεις δεν λαμβάνει χώρα εστεροποίηση υδροξυλομάδας με γαλλικό οξύ. Η μορφή των προαναφερόμενων πρωτονίων συνάδει με την παρουσία γλυκοπυρανόσης, στην οποία ο υποκαταστάτης στην ανωμερική θέση έχει *β*-προσανατολισμό και το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz (αξονική διευθέτηση). Οι θέσεις σύνδεσης των γαλλικών οξέων επιβεβαιώθηκαν και με το φάσμα HMBC, όπου παρατηρήθηκαν συζεύξεις ανάμεσα στους καρβονυλικούς άνθρακες και τα σακχαριδικά πρωτόνια των θέσεων εστεροποίησης.

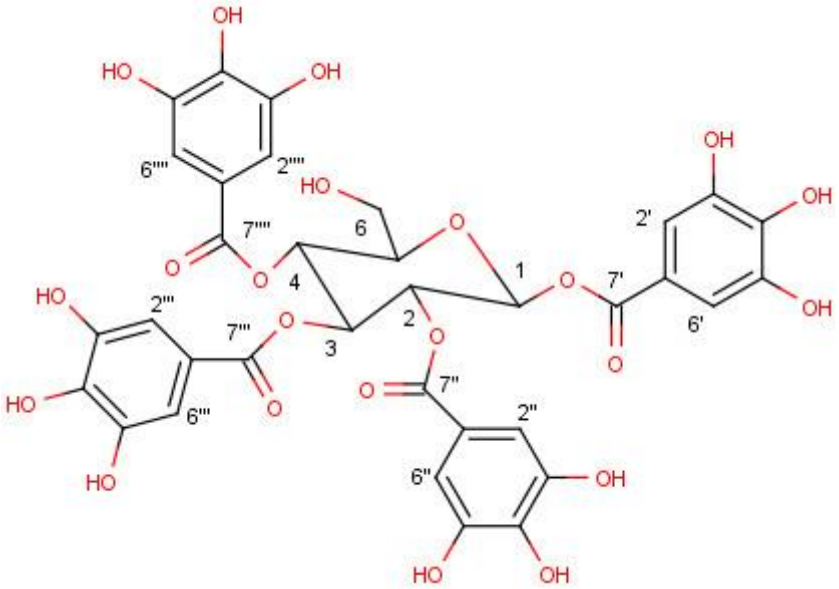


Εικόνα 83 :Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη CSM13

Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 74 προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 74: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM13

CSM13 (MeOD)



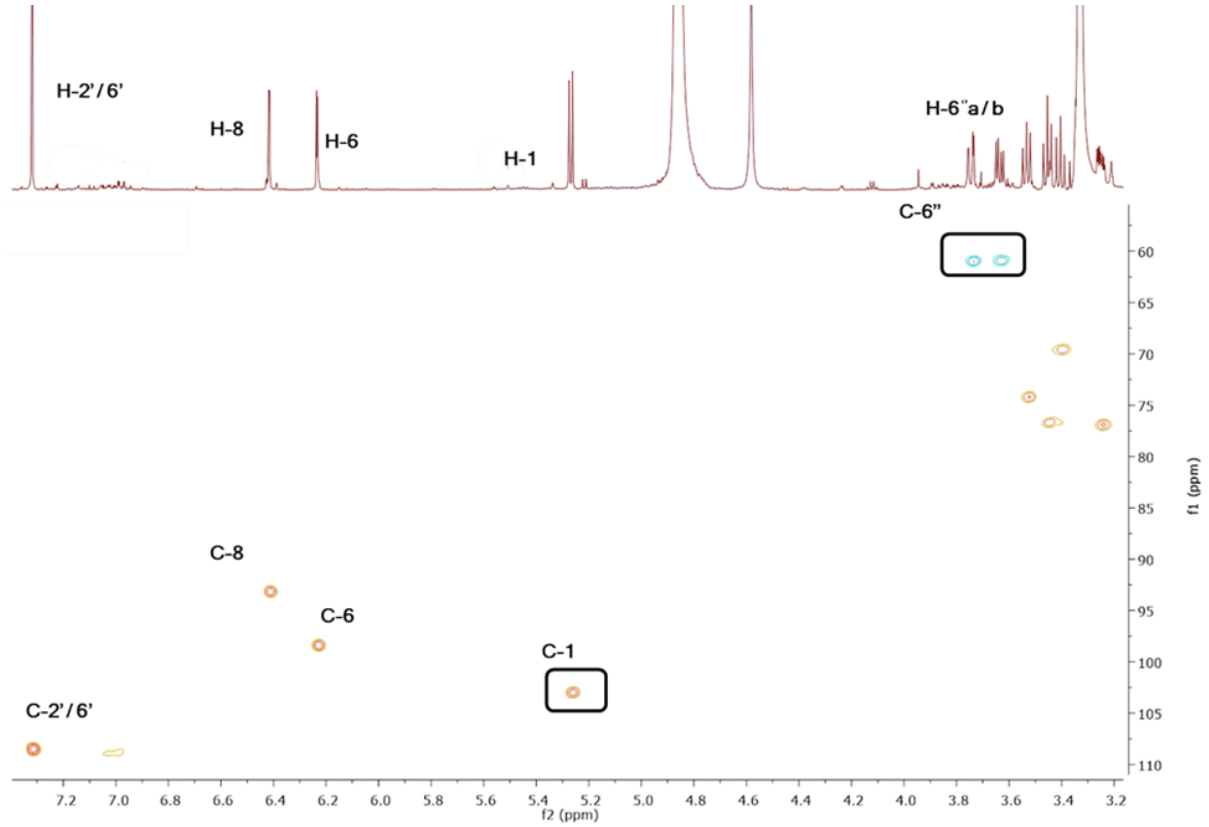
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	6.21 (1H, d, 8.3)	93.7
2	5.58 (1H, dd, 9.5 / 8.3)	72.3
3	5.87 (1H, t, 9.5)	76.4
4	5.51 (1H, t, 9.5)	69.5
5	4.09 (1H, m)	76.7
6a	3.80 (1H, dd, 12.9 / 2.1)	63.8
6b	3.56 (1H, dd, 12.9 / 4.9)	
1'	-	119.7
2'/6'	7.05 (2H, s)	110.6
3'/5'	-	146.3
4'	-	140.5
7'	-	166.6
1''	-	121.0
2''/6''	7.06 (2H, s)	110.6
3''/5''	-	146.4

4''	-	140.1
7''	-	167.8
1'''	-	120.3
2'''/6'''	6.96 (2H, s)	110.3
3'''/5'''	-	146.4
4'''	-	140.3
7'''	-	167.2
1''''	-	121.5
2''''/6''''	7.15 (2H, s)	110.2
3''''/5''''	-	146.4
4''''	-	140.1
7''''	-	168.3
1	6.21 (1H, d, 8.3)	93.7
2	5.58 (1H, dd, 9.5 / 8.3)	72.3
3	5.87 (1H, t, 9.5)	76.4
4	5.51 (1H, t, 9.5)	69.5
5	4.09 (1H, m)	76.7
6a	3.80 (1H, dd, 12.9 / 2.1)	63.8
6b	3.56 (1H, dd, 12.9 / 4.9)	110.2
1'	-	119.7

Η 1,2,3,4 -τετρα-*O*- γαλλοϋλο-*β*-D γλυκοπυρανόση έχει απομονωθεί από το φλοιό της *Caesalpinia ferrea* (Wyrepkowski, *et al.,* 2014) και το *Juglans regia* (Jin, *et al.,* 2008) ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από τη *Ceratonia siliqua.*

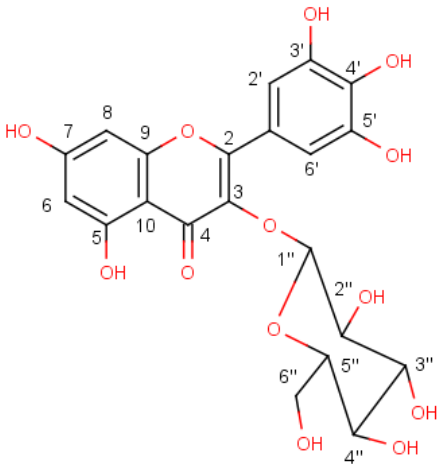
❖ 3-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (CSM14)

Ο μεταβολίτης CSM14 αποτελεί γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της μυρικετίνης (CSM8), με την οποία παρουσιάζει αρκετές φασματοσκοπικές ομοιότητες. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 84) εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 (δ 6.23) και H-8 (δ 6.41), ενώ τα ισοδύναμα πρωτόνια H-2' και H-6' του δακτυλίου Β εμφανίζονται ως απλή κορυφή στα 7.33 ppm. Η ύπαρξη γλυκόσης στην ένωση επιβεβαιώνεται από την παρουσία των σημάτων του ανωμερικού πρωτονίου (δ 5.27, d, J = 7.7 Hz), των πρωτονίων του μεθυλενίου της θέσης C-6'' (δ 3.75, dd, J = 12.0 / 2.8 Hz και 3.63, dd, J = 12.0 / 4.5 Hz), καθώς επίσης και των πρωτονίων H-3'' και H-4'', τα οποία εμφανίζονται ως τριπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 8.7 Hz σε δ 3.40 και 3.46, αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη CSM14 αναφέρονται στον πίνακα 75 και είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία (Scharbert, *et al.*, 2004).



Εικόνα 84: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPT του μεταβολίτη CSM14

Πίνακας 75: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM14

CSM14 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	-	159.4
3	-	135.7
4	-	178.4
5	-	163.3
6	6.23 (1H, d, 2.0)	98.3
7	-	166.2
8	6.41 (1H, d, 2.0)	93.2
9	-	158.4
10	-	105.9
1'	-	121.5
2'/6'	7.33 (2H, s)	108.6

3'/5'	-	146.9
4'	-	137.9
	3-*O*-γλυκοπυρανόση	
1''	5.27 (1H, d, 7.7)	103
2''	3.54 (1H, dd, 8.7 / 7.7)	74.0
3''	3.40 (1H, t, 8.7)	69.5
4''	3.46 (1H, t, 8.7)	76.8
5''	3.25 (1H, m)	77.1
6''a	3.75 (1H, dd, 12.0 / 2.8)	61.0
6''b	3.63 (1H, dd, 12.0 / 4.5)	

Ο μεταβολίτης CSM14 έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το φλοιό και τους καρπούς της *Ceratonia silqua* (Papagiannopoulos, *et al.*, 2004) (Laal, *et al.*, 2015) και από διάφορα άλλα φυτικά είδη όπως: *Astragalus complanatus* (Cui, *et al.*, 1993)*, Dioscorea bulbifera* (Gao, *et al.*, 2002)*, Ribes nigrum* (Sandell, *et al.,* 2009)*, Pelargonium reniforme* (Latte, *et al.*, 2002)*, Limonium aureum* (Ye, *et al.,* 2006)*, Camellia sinensis* (Wu, *et al.*, 2016) και *Humulus lupulus* (Tanaka, *et al.*, 2014). Διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Walker, *et al.,* 2008), εμφανίζει κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυτταρών του προστάστη που πιθανότατα σχετίζεται με οξειδοαναγωγικούς μηχανισμούς (De Leo, *et al.*, 2006), ενώ πρόσφατη μελέτη ανέδειξε τον 3-*O*-γλυκοσίδη της μυρικετίνης ως ικανό αναστολέα του ενζύμου υαλουρονιδάση (Liu, *et al.,* 2015).

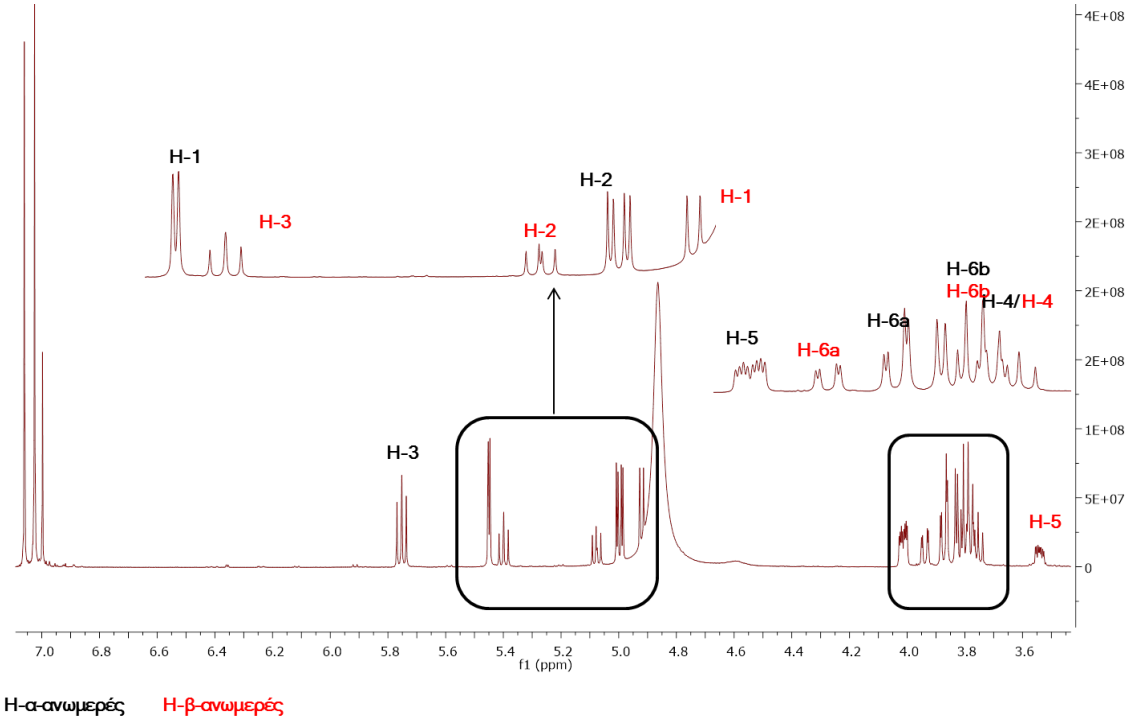
4.3.4.1.10 Μελέτη του κλάσματος CSM-F21

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα CSM-F21 περιέχει ιδιαίτερα πολικούς μεταβολίτες που παρουσίασαν απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης έδωσαν γκρι – καφέ χρώση. Με σκοπό την απομόνωσή τους εφαρμόσυηκε η τεχνική της χρωματογραφιάς μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και η μεθανόλη ως διαλύτης έκλουσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν σε μίγμα τα δύο ανωμερή της 2,3-*O* -διγαλλοϋλο-D-γλυκοπυρανόσης (CSM15, CSM16) και το 3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκό οξύ (CSM17) και τέλος σε μίγμα τον προαναφερόμενο μεταβολίτη με τον μεθυλεστέρα του (CSM18).

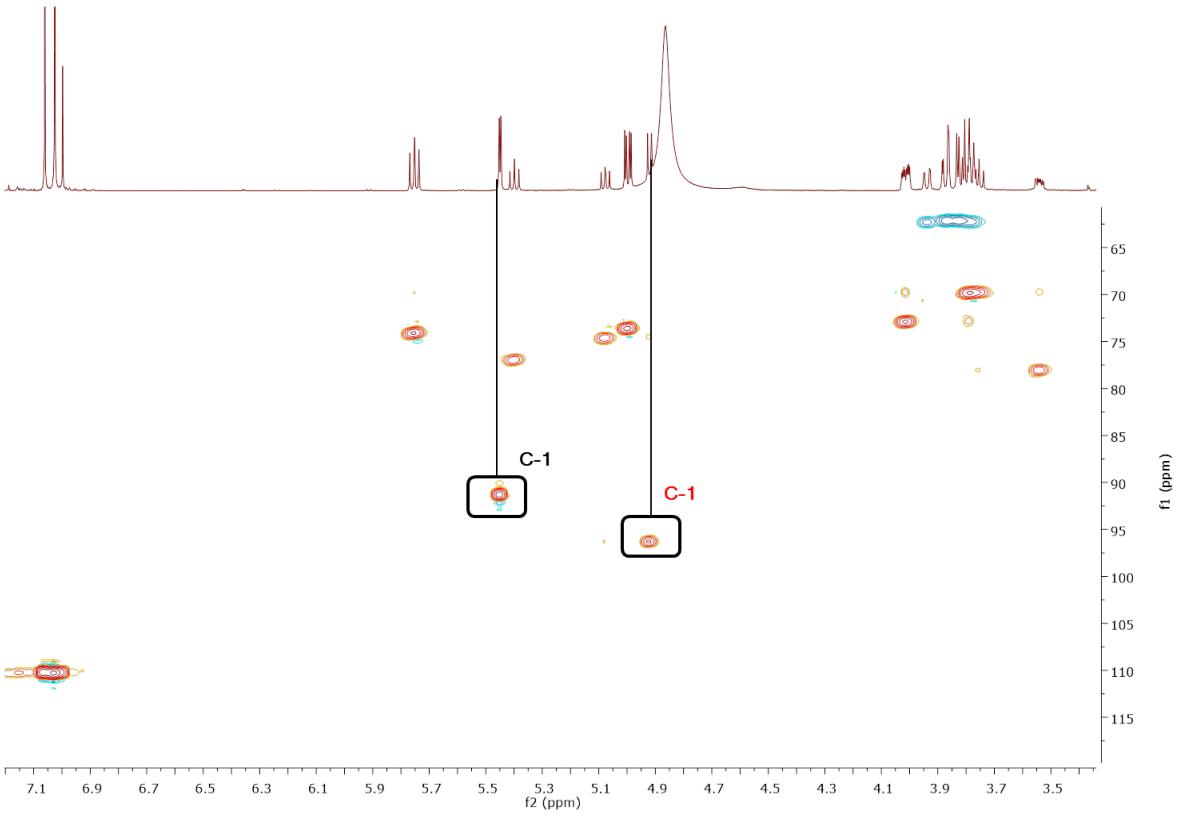
❖ **2,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση (CSM15) και 2,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση (CSM16)**

Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 85) παρατηρούμε ότι εμφανίζονται σήματα που αντιστοιχούν σε δύο μεταβολίτες, οι οποίοι αποτελούν τα δύο ανωμερή της ίδιας ένασης που συνυπάρχουν στο μίγμα σε αναλογία 2:1. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι δύο απλές κορυφές των πρωτονίων των ομάδων γαλλικού οξέος, τόσο για το *α*-ανωμερές (*δ* 7.06 και 7.02) όσο και για το *β*-ανωμερές (*δ* 7.02 και 6.99). Όσον αφορά στο σακχαριδικό τμήμα των δύο μεταβολιτών, παρατηρούμε ότι τα ανωμερικά πρωτόνια και τα πρωτόνια των θέσεων H-2 και H-3 εμφανίζονται σαφώς αποθωρακισμένα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτόνια των

γλυκοπυρανοσών. Στην περίπτωση του *α*-ανωμερούς, το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 3.7 Hz (*δ* 5.45), το πρωτόνιο H-2 ως διπλή διπλής με σταθερά σύζευξης 10.0 και 3.7 Hz (*δ* 4.99) και το H-3 ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 10.0 Hz (*δ* 5.75).



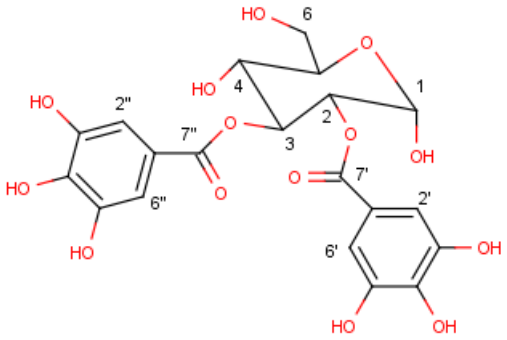
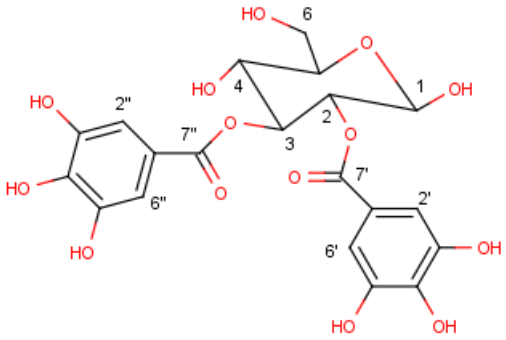
Εικόνα 85: Φάσμα ^{1}H -NMR των μεταβολιτών CSM15 και CSM16



Εικόνα 86: Φάσμα ^{1}H-NMR και HSQC-DEPT των μεταβολιτών CSM15 και CSM16

Από την άλλη μεριά στην περίπτωση του *β*-ανωμερούς, το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.0 Hz (*δ* 4.92), το πρωτόνιο H-2 ως διπλή διπλής με σταθερές σύζευξης 10.0 και 8.0 Hz (*δ* 4.99) και το H-3 ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 10.0 Hz (*δ* 5.40). Τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων συντονίζονται στην περιοχή 4.05-3.50 ppm. Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC (εικόνα 86) προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις για τους ανωμερικούς άνθρακες σε *δ* 91.4 για το *α*-ανωμερές και *δ* 96.4 ppm για το *β*-ανωμερές. Τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια του φάσματος COSY, ενώ οι θέσεις σύνδεσης των ομάδων γαλλικού οξέος επιβεβαιώθηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HMBC όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις.

.Πίνακας 76: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CSM15 και CSM16

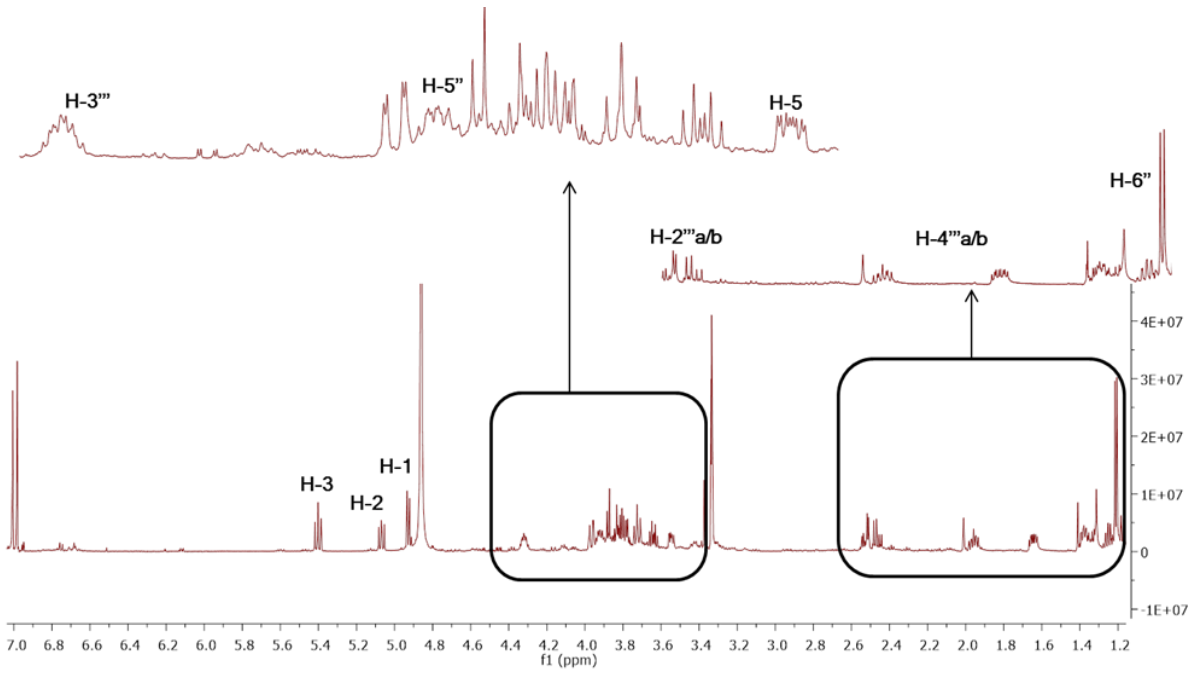
	CSM15 *α*-ανωμερές (MeOD)		**CSM16 *β*-ανωμερές(MeOD)**	
				
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR *δ* σε ppm**	**^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR *δ* σε ppm**
1	5.45 (1H, d, 3.7)	91.4	4.92 (1H, d, 8.0)	96.4
2	4.99 (1H, dd, 10.0 / 3.7)	70.9	5.07 (1H, dd, 10.0 / 8.0)	74.6
3	5.75 (1H, t, 10.0)	74.2	5.40 (1H, t, 10.0)	76.9
4	3.79 (1H, *)	69.8	3.79 (1H, *)	69.8
5	4.01 (1H, m)	72.9	3.54 (1H, m)	78.1
6a	3.85 (1H, dd, 12.0 / 2.2)	62.3	3.95 (1H, dd, 12.0 / 2.2)	62.3
6b	3.80 (1H, *)		3.75 (1H, *)	
1’	-	120.0	-	120.0
2’/6’	7.02 (2H, s)	110.2	6.99 (2H, s)	110.2
3’/5’	-	145.0	-	145.0
4’	-	138.4	-	138.4
7’	-	166.5	-	166.5
1’’	-	119.8	-	119.8
2’’/6’’	7.06 (2H, s)	109.6	7.02 (2H, s)	109.6
3’’/5’’	-	145.0	-	145.0
4’’	-	138.4	-	138.4
7’’	-	166.5	-	166.5

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

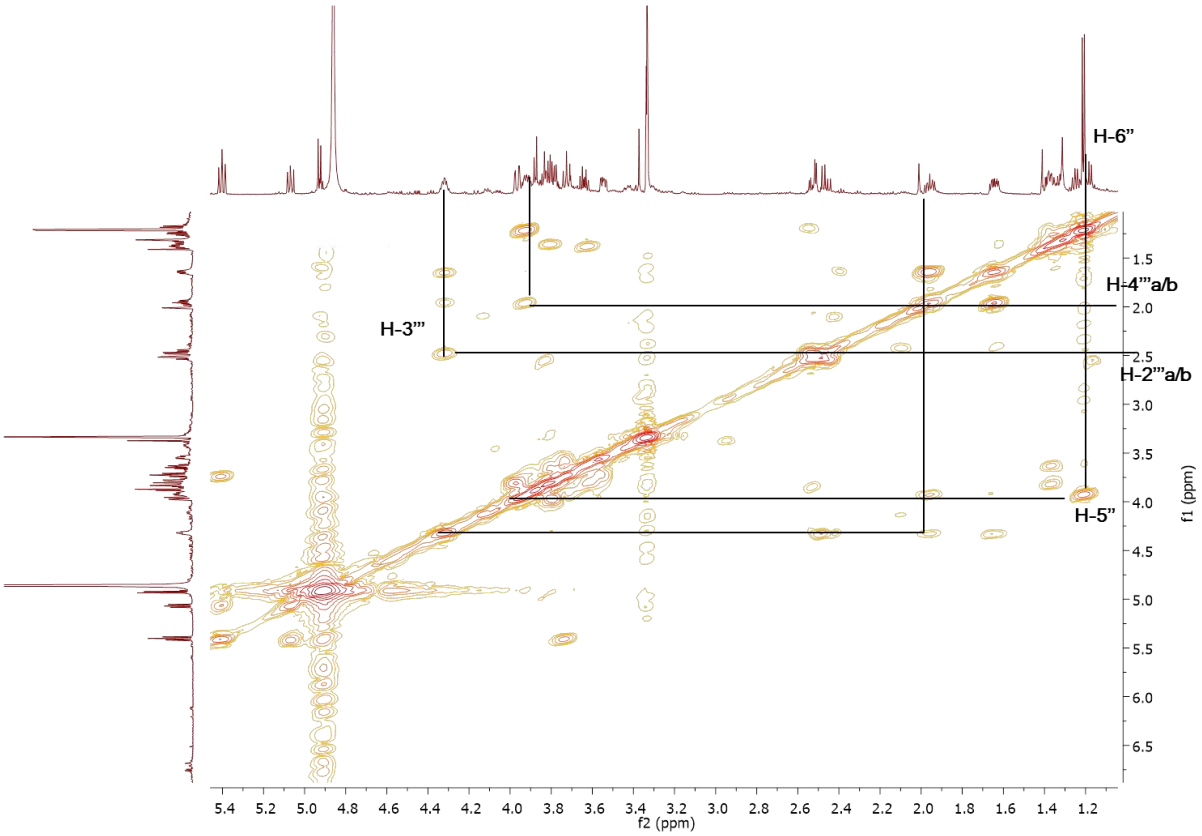
Το *α*-ανωμερές έχει απομονωθεί από τα είδη *Euphorbia thymifolia* (Lee, *et al.*, 1990) και *Tamarix nilotica* (Nawwar, *et al.,* 1984) ενώ το *β*-ανωμερές έχει απομονωθεί από αρκετά είδη του γένους *Euphorbia* (Rakhimov, *et al.*, 2011), όπως επίσης και τα είδη *Tamarix nilotica* (Nawwar, *et al.*, 1984) και *Plantago lanceolata* (Makhmudov, *et al.,* 2011). Μέχρι σήμερα κανένα από τα δύο ανωμερή δεν έχει απομονωθεί από το φυτό *Ceratonia siliqua*.

❖ **3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκό οξύ (CSM17)**

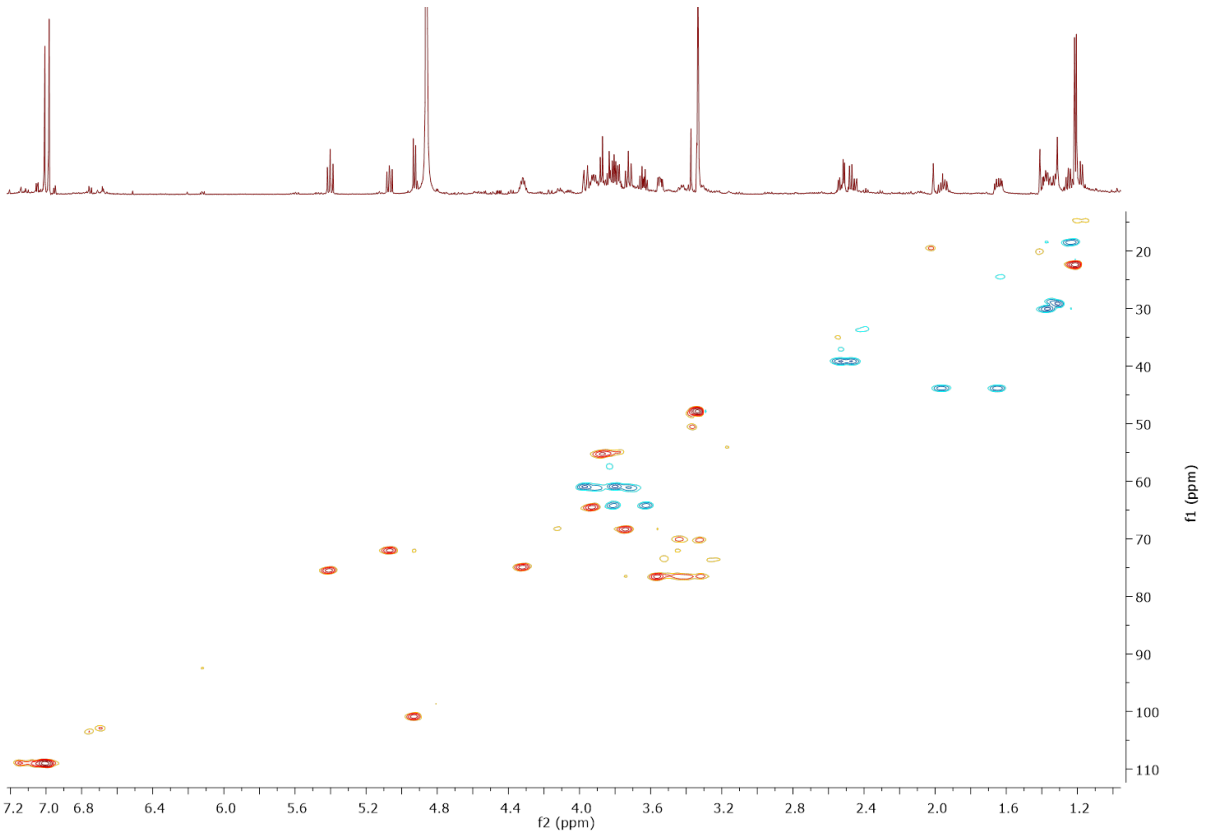
Ο μεταβολίτης CSM17 αποτελεί ανάλογο του μεταβολίτη CSM16, το οποίο στην ανωμερική θέση της γλυκοπυρανόνης φέρει συνδεδεμένη μία ομάδα 3,5-διϋδροξυεξανοϊκού οξέος. Έτσι, δικαιολογημένα οι φασματοσκοπικές τους διαφορές περιορίζονται κυρίως στις κορυφές που αντιστοιχούν στην ομάδα του διϋδροξυεξανοϊκού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 87) παρατηρούμε τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης C-2’’’, τα οποία εμφανίζονται ως διπλές διπλών στα 2.52 (J = 15.6 / 3.9 Hz) και 2.46 (J = 15.6 / 7.8 Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 39.5, όπως φαίνεται από το φάσμα HSQC-DEPT (εικόνα 89). Τα προαναφερόμενα πρωτόνια παρουσιάζουν σύζευξη (COSY, εικόνα 88) με το πρωτόνιο H-3’’’ (δ 3.34, m), το οποίο με τη σειρά του συζεύγνυται με τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης C-4’’’ που εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές σε δ1.95 και 1.63. Επίσης, το πρωτόνιο της θέσης C-5’’’ (δ3.93) παρουσιάζει συζεύξεις στο φάσμα COSY τόσο με τα πρωτόνια H-4a’’’ / H-4b’’’ όσο και με τα μεθυλικά πρωτόνια H-6’’’, τα οποία εμφανίζονται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.7 Hz σε δ1.21. Ο καρβονυλικός άνθρακας τς καρβοξυλομάδας (δ 172.4) παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης C-2’’’ (δ 2.46 και 2.52), ενώ η σύζευξη του H-3’’’ (δ 4.34) με τον ανωμερικό άνθρακα της γλυκοπυρανόσης (δ 100.9) υπέδειξε τη θέση σύνδεσης της ομάδας του 3,5-διϋδροξυεξανοϊκού οξέος με το σάκχαρο.



Εικόνα 87: Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη CSM17



Εικόνα 88: Φάσμα ^{1}H -NMR και COSY του μεταβολίτη CSM17

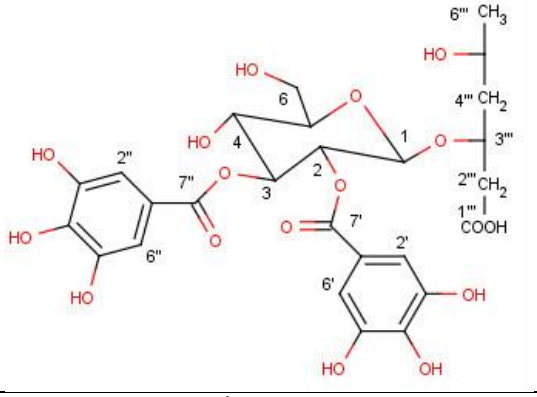


Εικόνα 89: Φάσμα ^{1}H -NMR και HSQC-DEPTτου μεταβολίτη CSM17

Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης περιλαμβάνονται στον πίνακα 77.

Πίνακας 77: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης CSM17

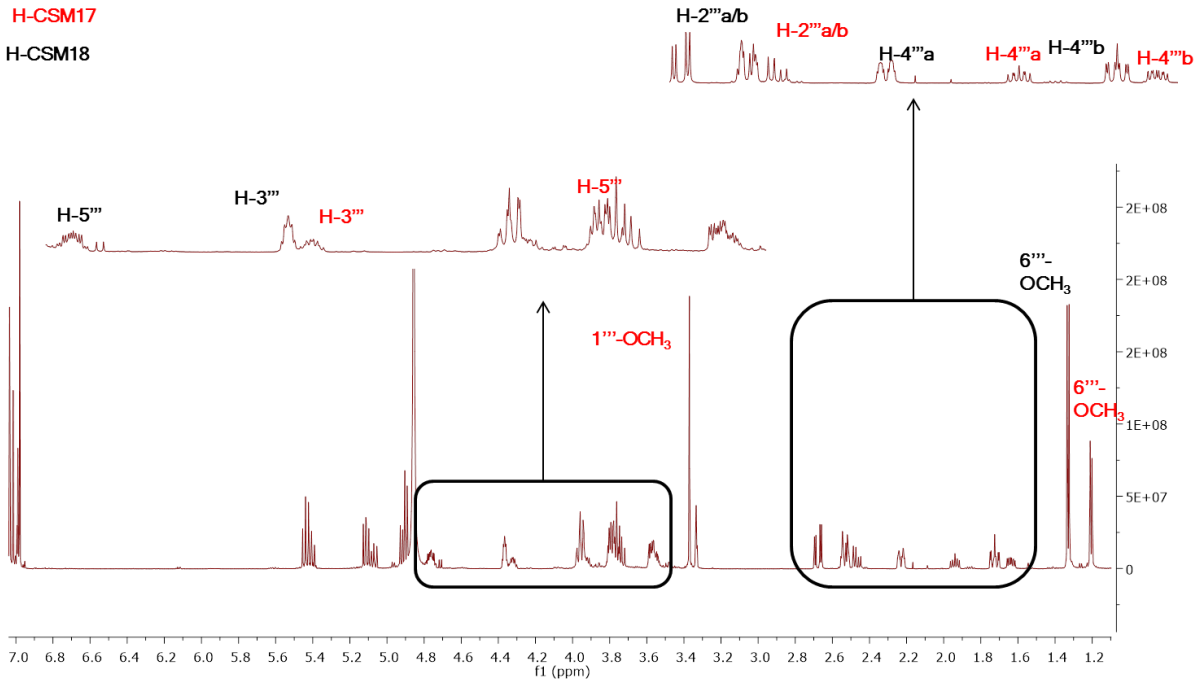
CSM17 β-ανωμερές (MeOD)



	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	4.92 (1H, d, 7.9)	100.9
2	5.04 (1H, dd, 9.7 / 7.9)	73.8
3	5.38 (1H, t, 9.7)	77.2
4	3.72 (1H, t, 9.7)	69.8
5	3.56 (1H, m)	78.3
6a	3.96 (1H, dd, 12.0 / 2.2)	62.7
6b	3.7 (1H, dd, 12.0 / 4.5)	140.0
1’	-	121.1
2’/6’	6.98 (2H, s)	110.2
3’/5’	-	146.6
4’	-	140.0
7’	-	167.5
1’’	-	121.3
2’’/6’’	7.00 (2H, s)	109.6
3’’/5’’	-	146.6
4’’	-	140.0
7’’	-	167.9
1’’’	-	172.4
2a’’’	2.46 (1H. dd, 15.6 / 7.8)	39.5
2b’’’	2.52 (1H. dd, 15.6 / 3.9)	
3’’’	4.34 (1H. m)	75.1
4a’’’	1.95 (1H, m)	43.9
4b’’’	1.63 (1H, m)	
5’’’	3.93 (1H, m)	64.8
6’’’	1.21 (3H, d, 6.7)	22.3

❖ **Μεθυλεστέρας του 3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκού οξέος (CSM18)**

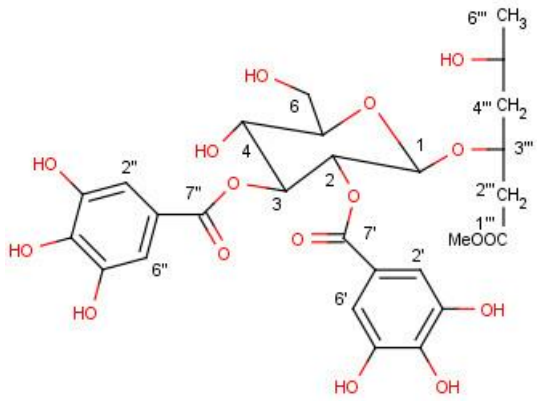
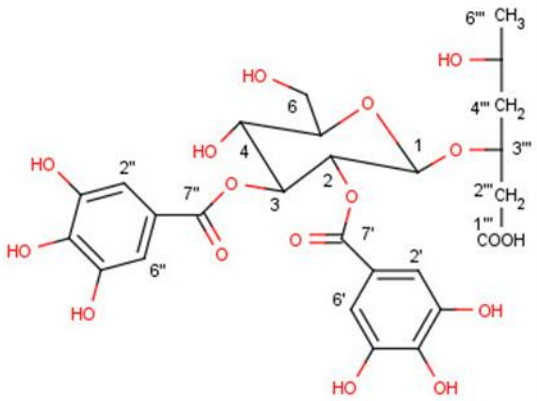
Ο μεθυλεστέρας του 3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκού οξέος παραλήφθηκε σε μίγμα με το αντίστοιχο οξύ και οι διαφορές στα φασματοσκοπικά τους δεδομένα περιορίζονται στην παρουσία των μεθυλικών πρωτονίων στα 3.36 ppm και την μικρή αποθωράκιση του καρβονυλικού άνθρακα.



Εικόνα 90: Φάσμα ^{1}H -NMR του μεταβολίτη CSM18

Στον πίνακα 78 περιλαμβάνονται οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων και των πρωτονίων των προαναφερόμενων μεταβολιτών, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 78: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων CSM17 και CSM18

	CSM18 (MeOD)		CSM17 (MeOD)	
				
	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	4.92 (1H, d, 7.9)	102.5	4.88 (1H, d, 7.9)	101.8
2	5.07 (1H, dd, 9.7 / 7.9)	73.6	5.11 (1H, dd, 9.7 / 7.9)	73.6
3	5.40 (1H, t, 9.7)	77.2	5.44 (1H, t, 9.7)	77.2
4	3.72 (1H, t, 9.7)	69.8	3.75 (1H, t, 9.7)	69.9
5	3.56 (1H, m)	78.3	3.56 (1H, m)	78.3
6a 6b	3.94 (1H, dd, 12.0 / 2.2) 3.78 (1H, dd, 12.0 / 4.5)	62.7	3.96 (1H, dd, 12.0 / 2.2) 3.7 (1H, dd, 12.0 / 4.5)	62.7
1’	-	121.0	-	121.0
2’6’	6.99 (2H, s)	110.5	6.98 (2H, s)	110.5
3’/5’	-	146.6	-	146.6
4’	-	140.2	-	140.2
7’	-	167.4	-	167.4

1''	-	121.2	-	121.2
2''/6''	7.01 (2H, s)	110.6	7.03 (2H, s)	110.6
3''/5''	-	146.6	-	146.6
4''	-	140.2	-	140.2
7''	-	167.9	-	167.9
1'''	-	173.4	-	172.8
2a'''	2.46 (1H. m)	40.6	2.67 (1H. m)	36.5
2b'''	2.52 (1H. m)		2.52 (1H. m)	
3'''	4.34 (1H. m)	76.4	4.36 (1H. m)	72.2
4a'''	1.95 (1H, m)	45.5	2.22 (1H, m)	36.7
4b'''	1.63 (1H, m)		1.72 (1H, m)	
5'''	3.93 (1H, m)	66.2	4.77 (1H, m)	74.8
6'''	1.21 (3H, d, 6.7)	24	1.33 (3H, d, 6.2)	21.8
$COOCH_3$	3.36 (3H, s)	56.2	-	-

4.3.5 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (PBM)

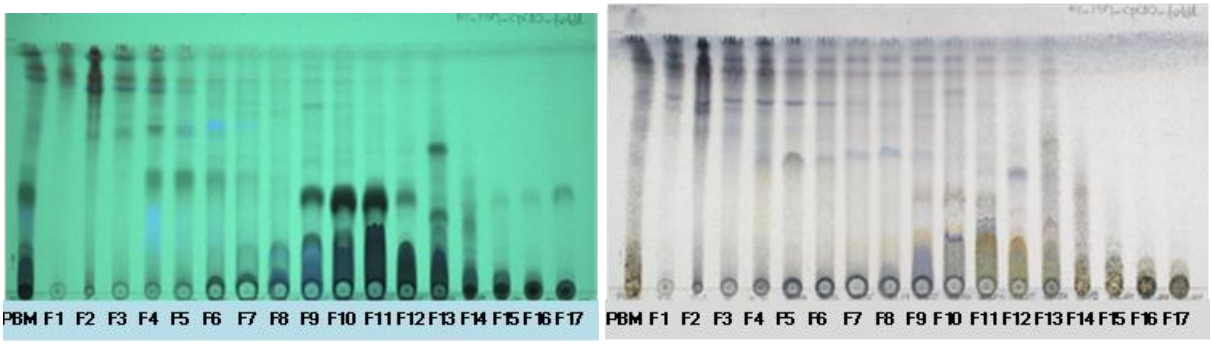
Για την κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων της *Psoralea bituminosa*, αποφασίστηκε η χρήση του διφασικού συστήματος EtOAc/EtOH/H_2O (10/1/10), καθώς με βάση τον έλεγχο το συγκεκριμένο σύστημα παρουσιάσε ικανοποιητική κατανομή των περιεχόμενων συστατικών στις δύο φάσεις και κρίθηκε ως αποτελεσματικό για την κλασμάτωση των δευτερογενών μεταβολιτών του προαναφερόμενου εκχυλίσματος.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 9.5 g, τα οποία διαλύθηκαν σε 10 ml κάτω φάσης και 10 ml πάνω φάσης. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας η οργανική αποτέλεσε την κινητή φάση και η υδατική την στατική. Αρχικά εισήχθη στη στήλη η στατική φάση και στη συνέχεια διοχετεύτηκε η κινητή σε 'ascending mode', με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές το λεπτό, μέχρι την εξισορρόπηση του συστήματος. Στη συνέχεια ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και παραλήφθηκαν 97 κλάσματα μέχρι τη στιγμή κατά την οποία ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες. Στο σημείο αυτό έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης

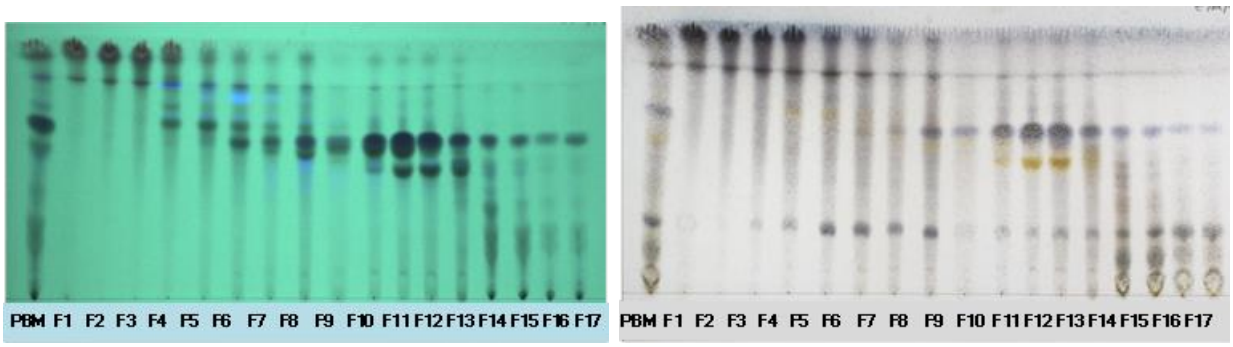
Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20) πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 17 κλάσματα (Πίνακας 79). Ακολούθως απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH (80/20) (εικόνα 91) και E/M/$H_2$0/FA (50/10/7/1) (εικόνα 92). Τα κλάσματα ελέγχθηκαν και σε TLC αντίστροφης φάσης σε H_2O/ACN (70/30).

Πίνακας 79: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος PBM

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
PBM-F1	3-4	43.2	**PBM-F10**	38-44	154.0
PBM-F2	5-7	1.420.3	**PBM-F11**	45-52	286.1
PBM-F3	8	130.2	**PBM-F12**	53-65	289.1
PBM-F4	9-15	490.3	**PBM-F13**	66-79	252.3
PBM-F5	16-19	106.9	**PBM-F14**	80-82	1.206.4
PBM-F6	20-24	63.5	**PBM-F15**	83-85	4.150.6
PBM-F7	25-26	32.5	**PBM-F16**	86-89	178.9
PBM-F8	27-31	45.6	**PBM-F17**	90-97	50.6
PBM-F9	32-37	74.3			



Εικόνα 91: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του PBM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20)

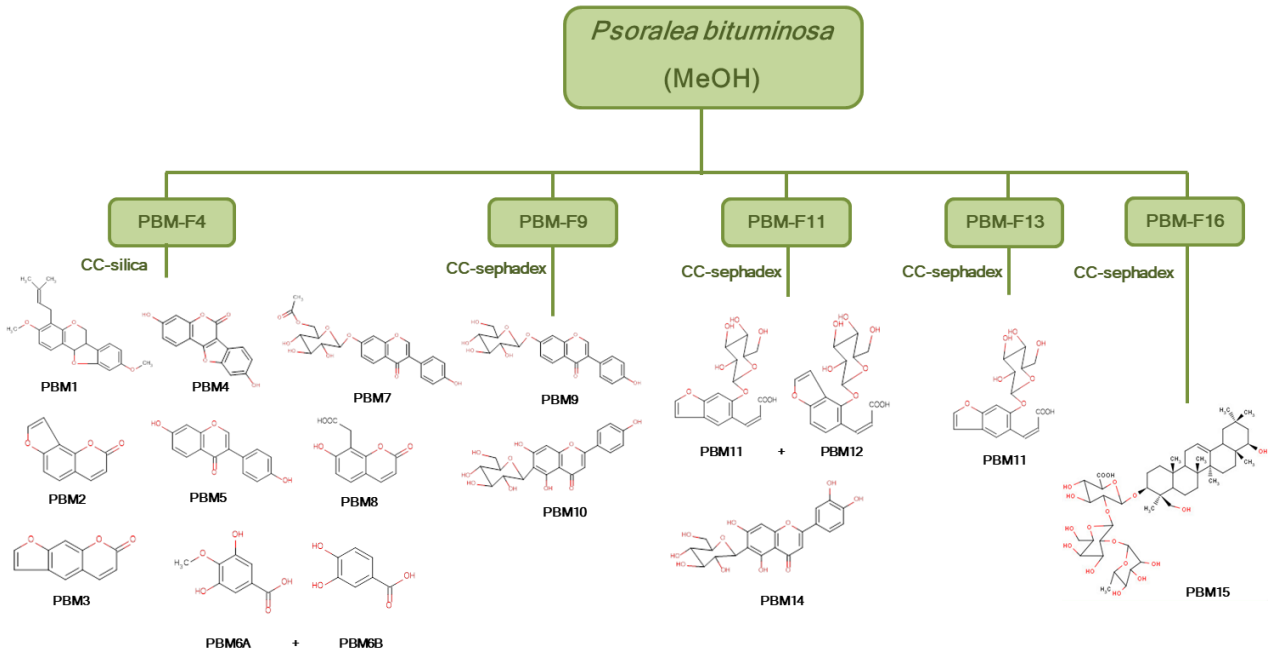


Εικόνα 92: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του PBM σε σύστημα ανάπτυξης E/M/H_20/FA (50/10/7/1)

4.3.5.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών του εκχυλίσματος PBM

Από τα 17 προαναφερόμενα κλάσματα που προέκυψαν μετά από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* με την τεχνική του FCPC, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη 5 κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών με αποτέλεσμα να καταλήξουμε στην απομόνωση 15 μεταβολιτών.

Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία απομόνωσης των συστατικών του εκχυλίσματος PBM:



Σχήμα 6:Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (PBM)

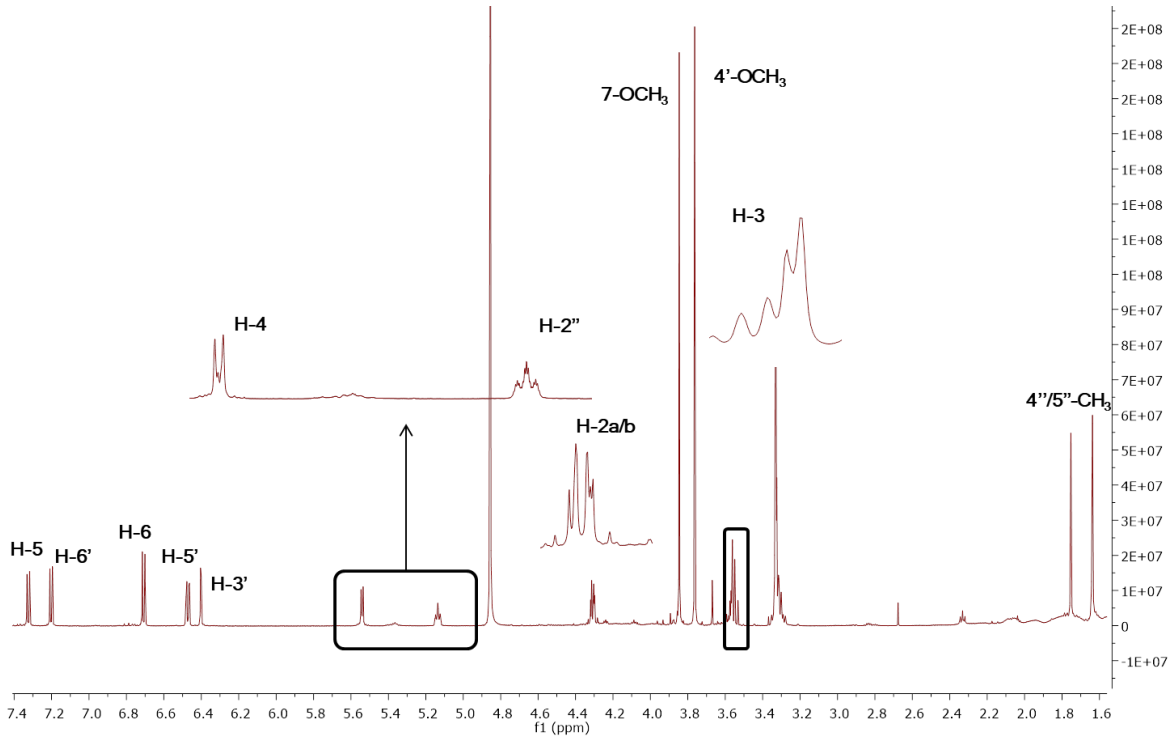
4.3.5.1.1 Μελέτη του κλάσματος PBM-F4

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα PBM-F4 περιέχει σχετικά άπολες ουσίες, για την απομόνωσή των οποίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης (CL: column_chromatography), με πληρωτικό υλικό silica gel 'flash' και κινητή φάση μίγμα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας Συνολικά ελήφθησαν 550 κλάσματα τα οποία μετά τον έλεγχο του περιεχομένου τους με TLC συνενώθηκαν σε 27 τελικά κλάσματα. Από τη προαναφερόμενη διαδικασία τελικά απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες:

- **Μπιτουκαρπίνη Α (PBM1)**

Ο μεταβολίτης PBM1 στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται ως μια κηλίδα η οποία απορροφά στα 254 και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται μωβ. Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 93) και συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή μπορούμε να διακρίνουμε στα 7.32 και 6.71 ppm από μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.6 Hz που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του δακτυλίου Α Η-5 και Η-6. Στα 7.20 ppm συντονίζεται το Η-6' ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.6 Hz, το Η-5' στα 6.47 ppm ως μια διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.6 και 2.3 Hz και το Η-3' στα 6.40 ppm ως μια διπλή κορυφή με J = 2.3 Hz. Στα 5.54 ppm συναντάμε το πρωτόνιο

H-4, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.6 Hz, υποδηλώνοντας τη *cis* σύζευξή του με το H-3 (*δ* 3.56). Βάση βιβλιογραφίας, η στερεοχημεία των στερεογονικών κέντρων των θέσεων 3 και 4 είναι (3R, 4R) (Pistelli, *et al.*, 2003). Τα πρωτόνια της θέσης 2 εμφανίζονται στα 4.31 και 4.29 ppm ως δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 9.5 Hz. Τα πρωτόνια των μεθοξυλομάδων των θέσεων 7 και την 4' συντονίζονται, ως απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία, σε *δ* 3.85 και 3.76 αντίστοιχα, ενώ οι θέσεις σύνδεσης εξακριβώθηκαν με χρήση φασμάτων 2D HSQC-DEPT και HMBC. Τέλος, τα μεθύλια της πρενυλομάδας συντονίζονται σε *δ* 1.75 και 1.64 ως απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια, ενώ το H-2'' εμφανίζεται στα 5.14 ppm ως πολλαπλή κορυφή.

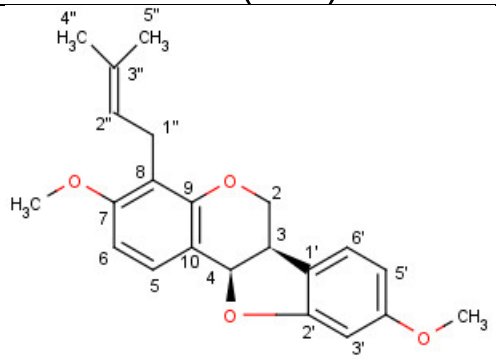


Εικόνα 93: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM1

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 80.

Πίνακας 80: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM1

PBM1 (MeOD)



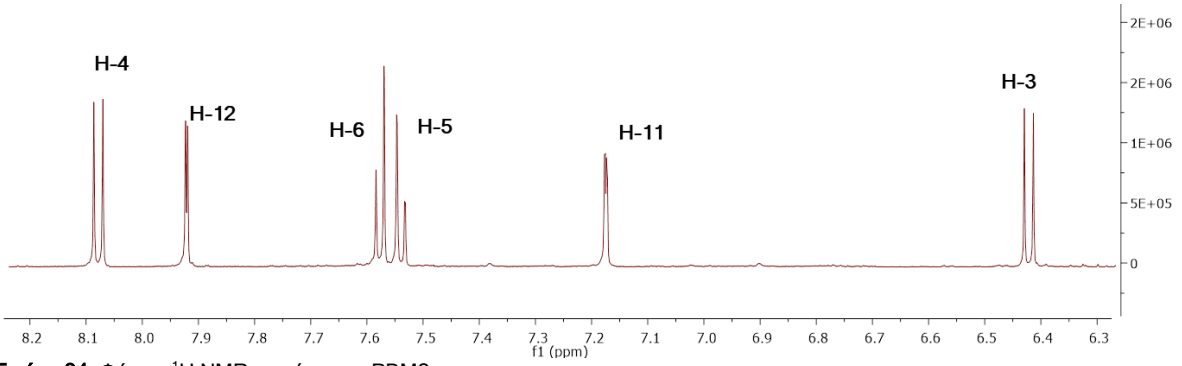
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2a	4.31 (1H, d, 9.5)	67.8
2b	3.56 (1H, d, 9.5)	67.8
3	3.56 (1H, m)	40.9
4	5.54 (1H, d, 6.6)	80.5
5	7.32 (1H, d, 8.6)	130.2
6	6.71 (1H, d, 8.6)	105.6
7	-	159.8
8	-	114.8
9	-	155.7
10	-	118.9
1’	-	120.9
2’	-	162.5
3’	6.40 (1H, d, 2.3)	97.5
4’	-	161.0
5’	6,47 (1H, dd, 8.6 / 2.3)	107.3
6’	7,20 (1H, d, 8.6)	126.1
7-OCH_3	3.85 (3H, s)	56.1
4’-OCH_3	3.76 (3H, s)	55.8
	πρενυλομάδα	
1’’	3.31 (2H, d, 7.9)	23.7
2’’	5.14 (1H, m)	123.9
3’’	-	132.0
4’’	1.75 (3H, s)	25.8
5’’	1.66 (3H, s)	17.7

Η μπιτουκαρπίνη Α ανήκει στην κατηγορία των πτεροκαρπανών, μια κατηγορία ουσιών που συναντάται αρκετά συχνά στο γένος *Psoralea*. Η μπιτουκαρπίνη Α έχει απομονωθεί από τα υπέργεια τμήματα των φυτών *Psoralea bituminosa* (Noccioli, *et al.*, 2014), *Psoralra balsatica* (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017) και *Psoralea morisiana* (Pistelli, *et al.*, 2003) στο παρελθόν, ενώ έχει αναφερθεί η πιθανή αντικαρκινική της δράση (Maurich, *et al.*, 2006).

❖ **Ισοψωραλένιο (PBM2)**

Ο μεταβολίτης PBM2 εμφάνισε έντονη μπλέ απορρόφηση στα 254 nm και ασθενή μπλε χρώση έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης. Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 94) παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων του φουρανικού δακτυλίου, τα οποία εμφανίζονται στα 7.89 (H-12) και 6.98 ppm (H-11) ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης *J* =2.0 Hz. Τα χαρακτηριστικά σήματα του κουμαρινικού σκελετού αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4 και H-3, τα οποία συντονίζονται στα 8.09 και 6.43 ppm ως διπλές κορυφές με *J* = 10.0 Hz, ενώ

τα H-6 και H-5 συντονίζονται ως διπλές κορυφές με J = 10.0 Hz στα 7.59 και 7.54 ppm, αντίστοιχα. Η θέση του φουρανικού δακτυλίου επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC, καθώς τα H-12 και H-6 παρουσιάζουν κοινή σύζευξη με τον άνθρακα C-8 σε δ 118.1.

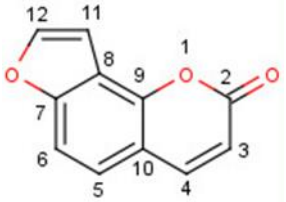


Εικόνα 94: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM2

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 81 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017) (Clarke, *et al.*, 2002).

Πίνακας 81: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM2

PBM2 (MeOD)



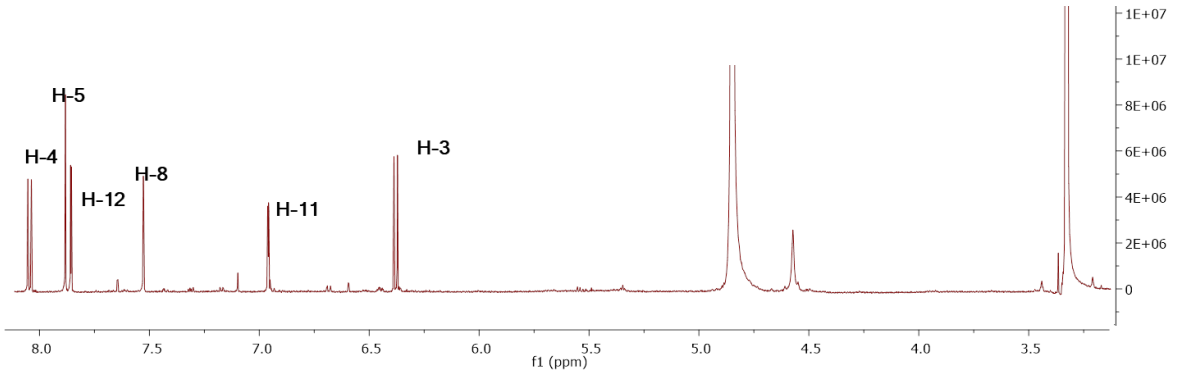
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	162.8
3	6.43 (1H, d, 10.0)	114.5
4	8.09 (1H, d, 10.0)	146.7
5	7.59 (1H, d, 8.7)	125.5
6	7.54 (1H, d, 8.7)	109.7
7	-	157.8
8	-	118.1
9	-	149.3
10	-	115.3
11	7.19 (1H, d, 2.0)	104.3
12	7.93 (1H, d, 2.0)	147.7

Το ισοψωραλένιο ή αγκελικίνη ανήκει στην κατηγορία των φουρανοκουμαρινών και έχει απομονωθεί από αρκετά είδη των γενών *Psoralea* (Won, e*t al.*, 2015) (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017) (Lemouchi, *et al.,* 2015) και το μελετούμενο είδος (D'Angiolillo, *et al.*, 2014) και *Angelica* (Tian, *et al.*, 2017) (Guan, *et al.*, 2015) (Mohammadi, *et al.*, 2010), καθώς και από τα είδη *Geijera parviflora* (Sadgrove, *et al.,* 2014), *Heracleum leskowii* (Skalicka-Woźniak, *et al.*, 2012), *Ferulopsis hystrix* (Shulʹts, *et al.*, 2012) και *Melicope semecarpifolia* (Chou, *et al.*, 2005). Εμφανίζει ισχυρή αντιική (Cho, *et al.,* 2013), αντιφλεγμονώδη (Liu, *et al.*, 2013) και

αντιοξειδωτική δράση (Xiao, *et al.,* 2010), ενώ όπως και το ψωραλένιο φαίνεται ικανό να αναστρέφει την επαγόμενη από τη σκοπολαμίνη αμνησία, σε *in vivo* μοντέλο ποντικών, μέσω αναστολής της δράσης της AchE (Wu, *et al.*, 2007).

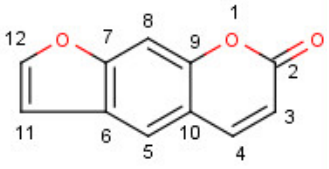
❖ **Ψωραλένιο (PBM3)**

Ελαφρώς πολικότερος και με παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά εμφανίζεται ο μεταβολίτης PBM3, ο οποίος ταυτοποίηθηκε ως ψωραλένιο. ουσιαστικά ένα ισομερές του προηγούμενου μεταβολίτη (PBM2). Όπως παρατηρούμε στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 95) η χαρακτηριστική φασματοσκοπική διαφορά του μεταβολίτη PBM3 με τον PBM2 εντοπίζεται στα H-8 και H-6, τα οποία συντονίζονται ως απλές κορυφές στα 7.56 και 7.92 ppm αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων του μεταβολίτη PBM3 προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 82 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017).



Εικόνα 95: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM3

Πίνακας 82: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM3

PBM3 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	-	162.7
3	6.40 (1H, d, 10.0)	114.8
4	8.09 (1H, d, 10.0)	146.4
5	7.92 (1H, s)	121.4
6	-	126.1
7	-	157.8
8	7.56 (1H, s)	100.1
9	-	153.2
10	-	116.4
11	6.98 (1H, d, 2.2)	107.3
12	7.89 (1H, d, 2.2)	148.5

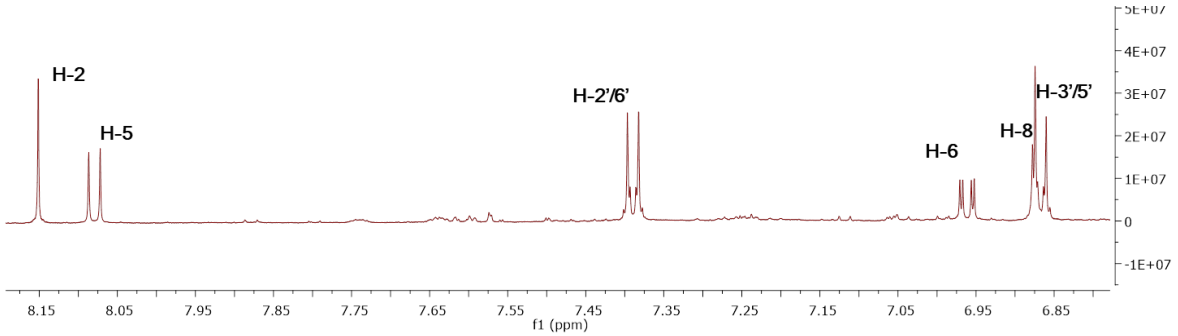
Το ψωραλένιο έχει απομονωθεί από πολλά είδη των γενών *Psoralea* (Li, *et al.*, 2017) (Zhang, *et al.,* 2016) (Lemouchi, *et al.*, 2017) και το μελετούμενο είδος (D'Angiolillo, *et al.*, 2014)*, Angelica* (Yang, *et al.*, 2018) (Yang, *et al.*, 2017) και *Ruta*, όπως επίσης και από τα *είδη Caryopteris odorata* (Abbasi, *et al.*, 2017)*, Heracleum persicum* (Dehghan, *et al.*, 2017) και *Dorstenia foetida* (Heinke, *et al.*, 2011)*.* Όπως και το ισοψωραλένιο, έχει αποδειχτεί ότι διαθέτει φυτοοιστρογόνο δράση καθώς δρουν σαν εκλεκτικοί αγωνιστές του ERα στην κυττρική σειρά HeLa (Xin, *et al.*, 2010), ενώ έχει δειχτεί ως ικανός ενεργοποιητής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (Tang, *et al.*, 2011) (Li, *et al.,* 2017). Επιπλεόν, χαρακτηρίστηκε ως πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας στην καρκινική σειρά MCF-7/ADR (Wang, *et al.*, 2016). Επίσης, διαθέτει αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του *Helicobacter pylori* (Zhang, *et al.*, 2010), ενώ σε συνδυασμό με έκθεση σε UVA ακτινοβολία χρησιμοποιείται για τη θεραπευτική αντιμετώπιση για την ψωρίαση. Πρόσφατα αποδείχθηκε πως ενσωμάτωσή του σε λιποσώματα παρουσίασε αύξηση της αποτελεσματικότητάς του (Doppalapudi, *et al.,* 2017).

❖ **Κουμεστρόλη (PBM4)**

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία των κουμεστανίων και ταυτοποιήθηκε ως κουμεστρόλη. Έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Psoralea (Bourgaud, et al.*, 1999), αλλά όχι από το είδος *P. bituminos*a, ενώ στη συγκεκριμένη εργασία έχει περιγραφεί η απομόνωσή τους από το φυτό *Hippocrepis comosa* (βλ.4.3.3.1.4, HCE8).

❖ **Νταντζεΐνη (PBM5)**

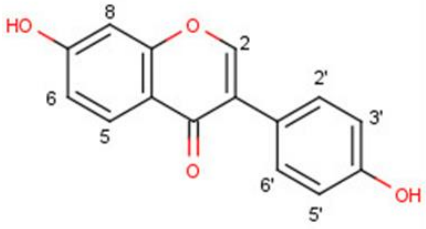
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 96) εμφανίζεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή των ισοφλαβονών σε *δ* 8.15, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2. Τα πρωτόνια H-2' και H-6' εμφανίζονται σε *δ* 7.39 ως μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.5 Hz, ενώ τα H-3', H-5' συντονίζονται σε *δ* 6.87 ως διπλή κορυφή με την ίδια σταθερά σύζευξης, υποδηλώνοντας την *para*-υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια του δακτυλίου A εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-8 και έχει *J* = 2.2Hz, μια διπλή διπλής που αντιστοιχεί στο H-6 και μια διπλή με *J* = 8.8 Hz που αντιστοιχεί στο H-5.



Εικόνα 96: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM5

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 83 προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία (Kim, *et al.*, 2010).

Πίνακας 83: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM5

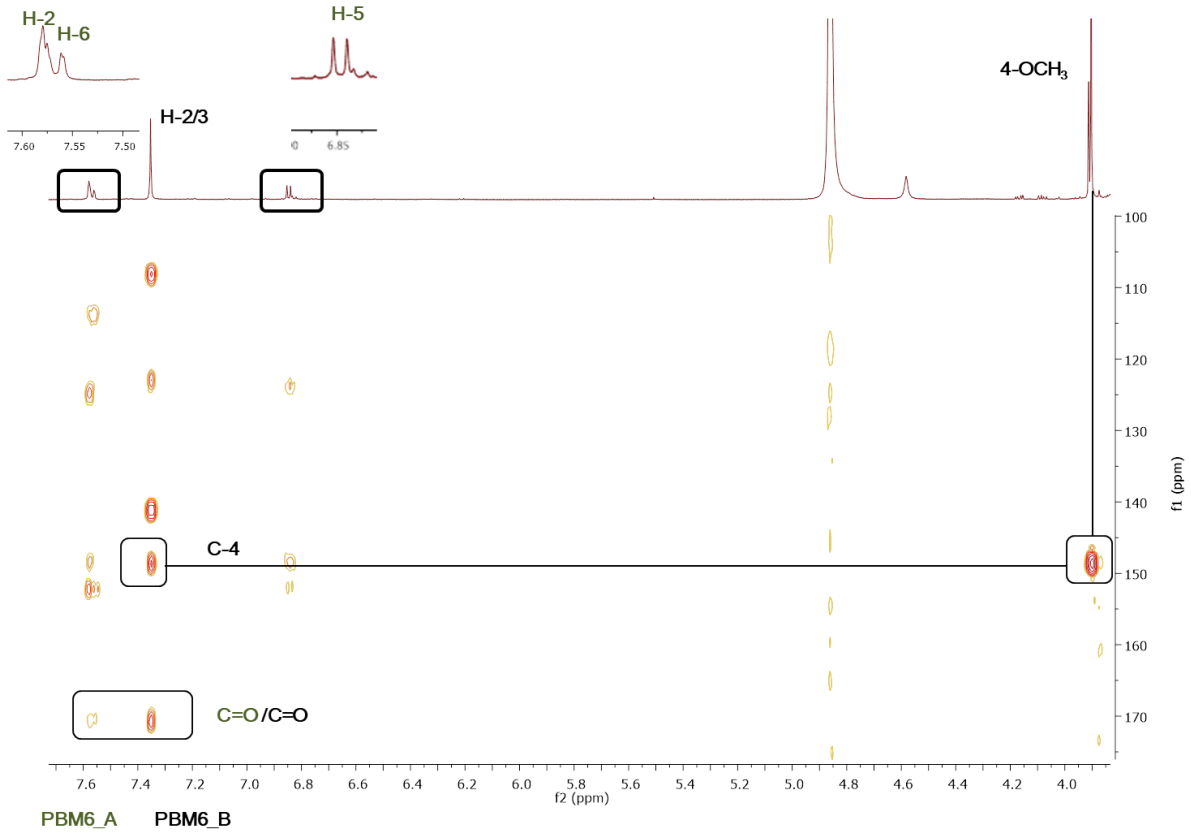
PBM5 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ **σε ppm (**J **σε Hz)**	**^{13} C NMR** δ **σε ppm**
2	8.15 (1H, s)	154.9
3	-	121.9
4	-	178.1
5	8.08 (1H, d, 8.8)	128.2
6	6.96 (1H, d, 8.8 / 2.2)	100.0
7	-	164.4
8	6.88 (1H, d, 2.2)	103.4
9	-	160.1
10	-	118.3
1’	-	124.3
2’/6’	7.39 (2H, d, 8.5)	131.5
3’/5’	6.87 (2H, d, 8.5)	116.3
4’	-	158.9

Η νταντζεΐνη είναι μια ισοφλαβόνη ευρέως διαδεδομένη στη φύση, η οποία έχει απομονωθεί από διάφορα είδη των γενών *Psoralea* (D'Angiolillo, *et al.*, 2017) (Cottiglia, *et al.*, 2005) (Yuldashev, *et al.*, 1996), *Sophora* (Yang, *et al.*, 2012), *Phaseolus* (Ganesan, *et al.*, 2017) (Aisyah, *et al.*, 2016), *Astragalus* (Butkute, *et al.*, 2018), *Pueraria* (Wang, *et al.*, 2018) (Chen, *et al.,* 2017), *Genista* (Orhan, *et al.*, 2011), *Glycyrrhiza* (Ji, *et al.*, 2016), καθώς επίσης και τα είδη *Trifolium pretense* (Abdou, *et al.*, 2016) και *Glycine max* (Šibul, *et al.,* 2016). Διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων με αρκετές μελέτες να αναδεικνύουν την οστεοπροστατευτική της δράση (Jarić, *et al.,* 2018) (Tousen, *et al.,* 2015) (Jin, *et al.*, 2017), ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε πως αυξάνει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστικών κυττάρων μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών (He, *et al.*, 2017) (Sun, *et al.*, 2016).

❖ 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (PBM6) και 4-*O*-μεθυλογαλλικό οξύ (PBM7)

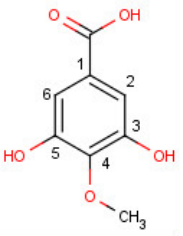
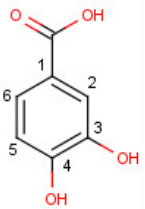
Η φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος έδειξε ότι πρόκειται για μίγμα των μεταβολιτών 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και 4-*O*-μεθυλογαλλικό οξύ σε αναλογία 1:3. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 97) παρατηρούμε σε δ 7.36 την απλή κορυφή που αντιστοιχεί στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια H-2 και H-6 του 4-*O*-μεθυλογαλλικού οξέος, ενώ το χαρακτηριστικό ABX τρισυποκατεστημένο σύστημα του 3,4-διυδροξυβενζοϊκού οξέος απαρτίζεται από μία διπλή κορυφή (J = 8.7 Hz) σε δ 6.85 (H-5), μία διπλή διπλής κορυφή (J = 8.7 / 1.6 Hz) σε δ 7.57 (H-6) και μία διπλή κορυφή (J = 1.6 Hz) σε δ 7.58 (H-2). Επίσης, στην

οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζονται τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας του 4-*O*-μεθυλογαλλικού οξέος, τα οποία εμφανίζονται ως απλή κορυφή σε *δ* 3.90 και παρουσιάζουν στο φάσμα HMBC (εικόνα 97) ^{3}J σύζευξη με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στα 149.2 ppm (C-4). Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε και τις ^{3}J συζεύξεις των καρβονυλικών ανθράκων (*δ* 171.2) με τα πρωτόνια H-2 και H-6 τόσο στην περίπτωση του 3,4-διυδροξυβενζοϊκού οξέος όσο και στην περίπτωση του 4-*O*-μεθυλογαλλικού οξέος. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 84 προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).



Εικόνα 97: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC του μίγματος των ενώσεων PBM6 και PBM7

Πίνακας 84: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων PBM6 και PBM7

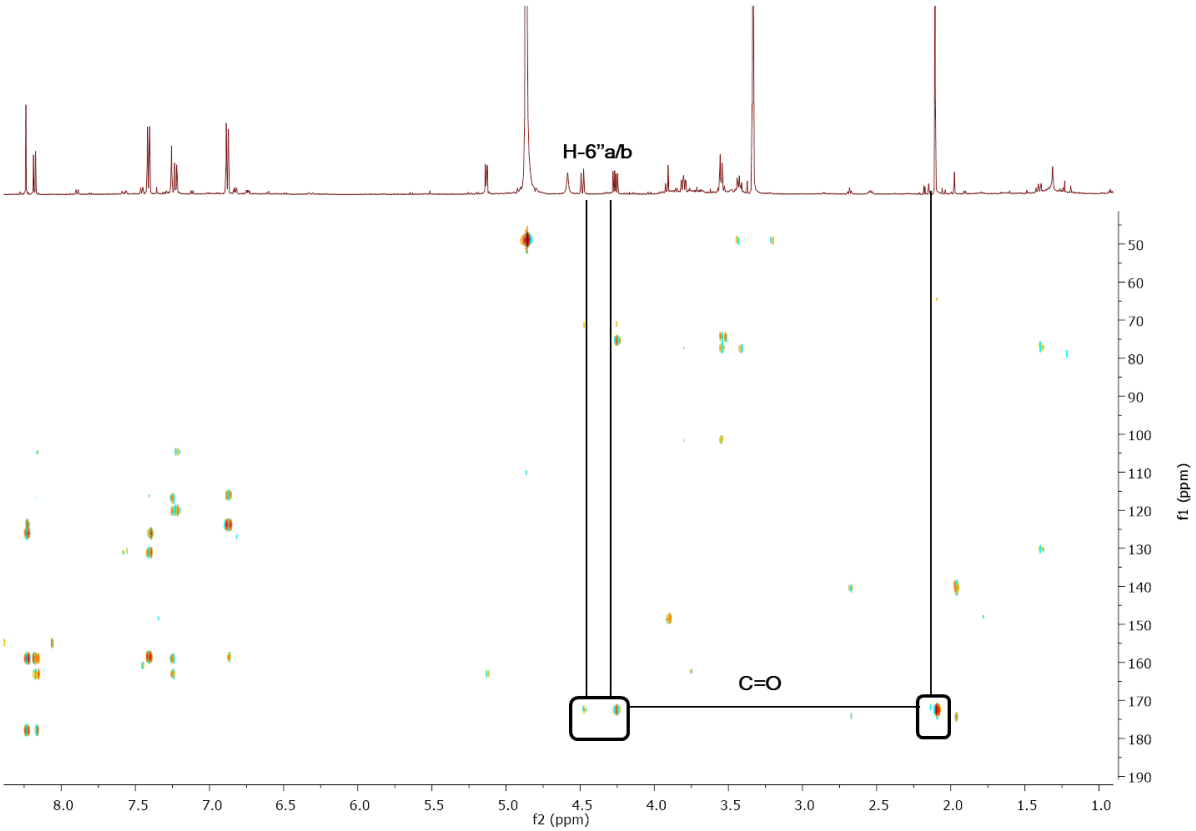
PBM6 (MeOD)			PBM7 (MeOD)		
					
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm	ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	121.7	1		123.6
2/6	7.36 (2H, s)	108.3	2	7.58 (1H, d, 1.6)	113.8
3/5	-	146.5	3	-	152.4
4	-	149.2	4	-	148.3

C=O	-	171.2	5	6.85 (1H, d, 8.7)	115.6
OCH_3	3.90 (3H, s)	56.6	6	7.57 (1H, dd, 8.7 / 1.6)	125.1
			C=O	-	171.2

Το 4-*O*-μεθυλογαλλικό οξύ μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από τη *Psoralea bituminosa* αλλά έχει εντοπιστεί στα *Limonium duriusculum* (Kerkatou, *et al.*, 2016) *Punica granatum* (Farag, *et al.*, 2015) και *Polygonum capitatum* (Liao, *et al.*, 2013) ενώ έχει χαρακτηριστεί ως ικανός αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Lee, *et al.,* 2006). Το 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ έχει απομονωθεί από τη *Psoralea bituminosa* (Sarikurkcu, *et al.*, 2016) και πλήθος άλλων φυτικών ειδών ενώ πρόσφατα αναδείχθηκε η ικανότητα να αναστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (Wu, *et al.*, 2016) και να ενισχύει την οστεογένεση στην κυτταρική σειρά ινοβλαστών C3H10T1/2 (Rivera-Piza, *et al.,* 2017).

❖ **7-*O*-(6 - *O* - ακετυλο - *β* - γλυκοπυρανόσυλο) νταντζεΐνη (PBM8)**

Ο μεταβολίτης PBM8, από φασματοσκοπική άποψη, είναι αναμενόμενο να παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το μεταβολίτη CVM11.



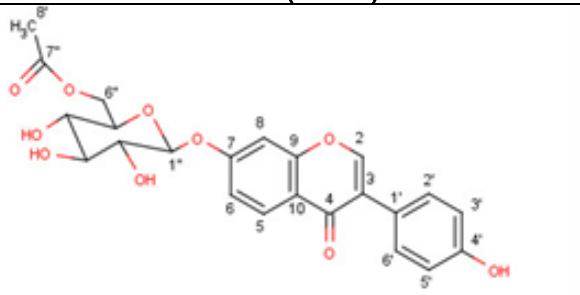
Εικόνα 98: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης PBM8

Η διαφορά τους να επικεντρώνεται στην αποθωράκιση των πρωτονίων H6''a και H-6b'' και την ύπαρξη μιας απλής κορυφής που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια στα 2.10 ppm, γεγονός που παραπέμπει στην ύπαρξη ακετυλίου στη θέση 6'' του σακχάρου. Μάλιστα στο φάσμα HMBC (εικόνα 98) φαίνεται η σύζευξη των πρωτονίων του ακετυλίου στα 2.10 ppm με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 172.5 ppm, ο οποίος παρουσιάζει σύζευξη με τη σειρά του με τα πρωτόνια H-6''a

και H-6''b, τη θέση σύνδεσης του ακετυλίου στη θέση C-6 του σακχάρου. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη παρουσιάζονται στον πίνακα 85.

Πίνακας 85: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM8

PBM8 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.23 (1H, s)	155.1
3	-	125.7
4	-	178.1
5	8.18 (1H, d, 8.8)	128.2
6	7.22 (1H, dd, 8.8 / 2.3)	116.9
7	-	161.2
8	7.25 (1H, dd, 2.3)	124.1
9	-	162.5
10	-	120.1
1'	-	123.7
2'/6'	7.41 (2H, d, 8.8)	131.2
3'/5'	6.88 (2H, d, 8.8)	116.1
4'	-	158.5
	7- *O*-γλυκοπυρανόση	
1''	5.13 (1H, d, 6.7)	101.5
2''	3.55 (1H, *)	74.6
3''	3.54 (1H, *)	77.6
4''	3.42 (1H, t, 9.2)	71.5
5''	3.79 (1H, m)	75.6
6a''	4.48 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	64.5
6b''	4.25(1H, dd, 12.0 / 2.0)	64.5
7''-C=O	-	172.5
8''-CH_3	2.10 (1H, s)	20.5

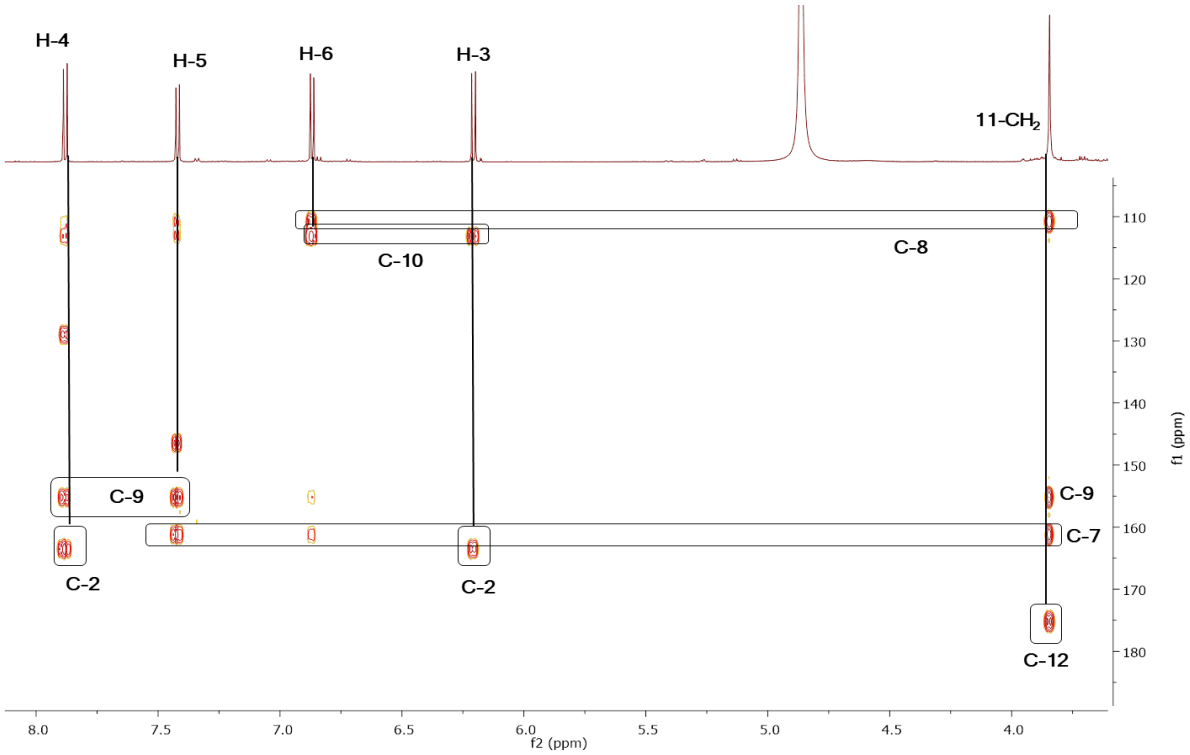
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η 7-*O*-β-*D*-6''-O-ακετυλογλυκοπυρανοσυλονταϊντζεΐνη είναι το ακυτυλιωμένο παράγωγο του μεταβολίτη CVM11, έχει εντοπισθεί στο είδος *Glycine max* (Hosny, *et al.*, 2002), ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το γένος *Psoralea.*

❖ **8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη (PBM9)**

Ο μεταβολίτης PBM9 εμφάνισε πολύ έντονη κυανή απορρόφηση στα 254nm, ενώ μετά από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκή βανιλλίνη έδωσε κίτρινη έντονη χρώση. Από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως 8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από άλλη φυσική πηγή και επομένως αποτελεί **νέο** φυσικό προϊόν. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 99) παρατηρούμε την ύπαρξη τεσσάρων διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια, ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή και συγκεκριμένα στα 3.84 ppm συναντάμε μια απλή κορυφή που

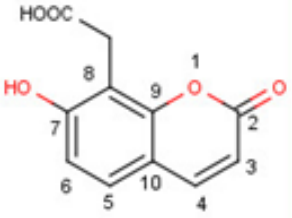
ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Οι κορυφές στα 7.88 και 6.21 ppm εμφανίζουν μεταξύ τους σύζευξη 9.5 Hz που παραπέμπει στα πρωτόνια H-3 και H-4 του κουμαρινικού σκελετού, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC (εικόνα 99) καθώς εμφανίζουν σύζευξη με τον καρβονυλικό άνθρακα C-2 της κουμαρίνης (δ 163.8). Οι κορυφές στα 7.42 και 6.87 ppm με J = 8.5 Hz αντιστοιχούν στα H-5 και H-6 του δακτυλίου A. Στο φάσμα HMBC εμφανίζεται η σύζευξη των H-5 και H-4 με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-9 (δ 155.3) όπως επίσης και των H-3 και H-6 με τον C-10 (δ 113). Η απλή κορυφή στα 3.84 αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που συνδέεται στη θέση 8 του αρωματικού δακτυλίου, καθώς παρουσιάζει σύζευξη τόσο με τον C-8 στα 110.7 ppm και τους άνθρακες C-7 και C-9, όσο και με τον καρβοξυλικό άνθρακα στα 175.2 ppm. Επίσης, τα πρωτόνια H-5, H-6 και H-11 παρουσιάζουν σύζευξη με τον οξυγωνομένο αρωματικό άνθρακα C-7 στα 161.1 ppm.



Εικόνα 99: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης PBM9

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης, οι οποίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 86, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 86: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM9

PBM9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** **δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR** **δ σε ppm**
2	-	163.8
3	6.21 (1H, d, 9.5)	111.8
4	7.88 (1H, d, 9.5)	146.5
5	7.42 (1H, d, 8.5)	127.5
6	6.87 (1H, d, 8.5)	113.4
7	-	161.1
8	-	110.7
9	-	155.3
10	-	113.0
11	3.84 (2H, s)	29.3
12	-	175.2

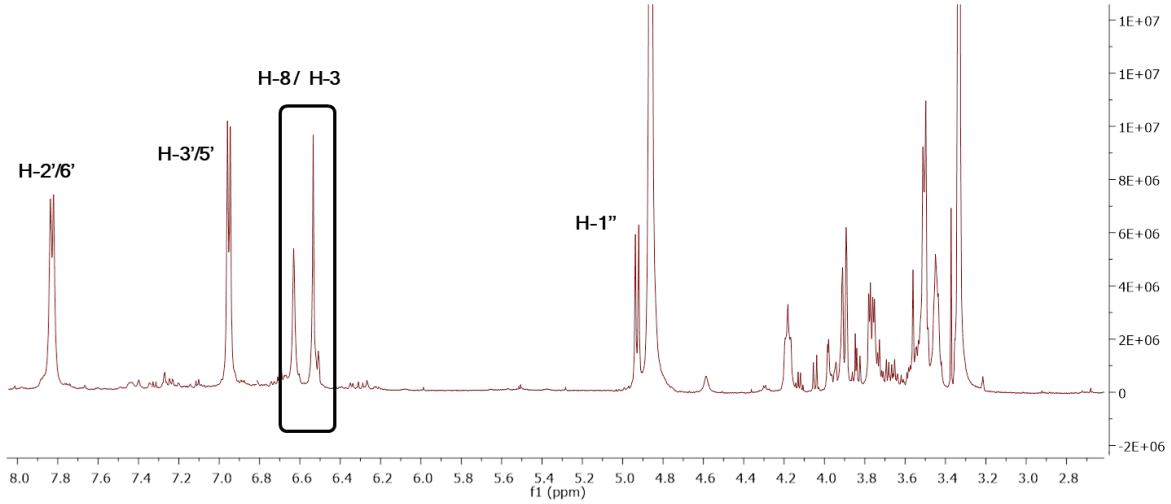
4.3.5.1.2 Μελέτη του κλάσματος PBM-F9

Το κλάσμα PBM-F9 υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και μεθανόλη ως διαλύτης έκλουσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες: **7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλονταντζεΐνη (PBM10) / 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλαπιγενίνη (PBM11)**. Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος 84-89 έδειξε πως πρόκειται για μίγμα δύο μεταβολιτών, οι οποίοι σύμφωνα με τη φασματοσκοπική μελέτη είναι ο 7-*O*-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της νταϊτζεΐνης (PBM10) και ο 6-C-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της απιγενίνης (PBM11) σε αναλογία περίπου 70/30. Ο μεταβολίτης PBM10 έχει ξαναπομονωθεί από είδη του γένους όπως *Psoralea plicata* (Hamed, *et al.,* 1997), *P. drupaceae* (Yuldashev, *et al.,* 1996), *P. corylifolia* (Alam, *et al.*, 2018) *P. balsatica* (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017) αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το μελετούμενο είδος. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η 7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλονταντζεΐνη έχει απομονωθεί από το φυτό *Cytisus villosus* ως μεταβολίτης CVM11 και η περιφραφή στα φασματοσκοπικά της δεδομένα γίνεται στην παράγραφο 4.3.2.1. Ο μεταβολίτης PBM11, δεδομένου ότι απομονώθηκε σε καθαρή μορφή από το επόμενο κλάσμα, περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

❖ **6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλαπιγενίνη (PBM11)**

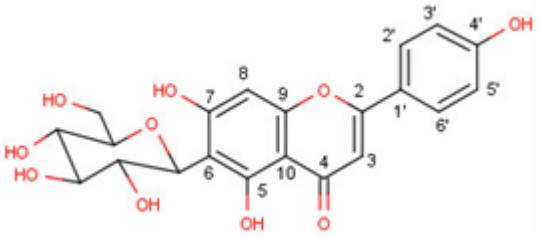
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 100) παρατηρείται το χαρακτηριστικό π-υποκατεστημένο σύστημα του δακτυλίου Β, το οποίο αποτελείται από δύο διπλές κορυφές που ολκληρώνουν για δύο πρωτόνια και έχουν σταθερά σύζευξης 8.2 Hz. Το πρωτόνιο Η-8 του Α δακτυλίου εμφανίζεται στα 6.63 ppm ως απλή κορυφή, ενώ το πρωτόνιο Η-3 συντονίζεται στα 6.54 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης συντονίζεται στα 4.92 ppm

και έχει τη μορφή διπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης 10.0 Hz, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για το *β*-ανωμερές. Επίσης, ο ανωμερικός άνθρακας συντονίζεται στα 75.4 ppm, γεγονός που συν άδει με τη *C*-γλυκοζυλίωση. Οι χημικές μετατοπίσεις του μεταβολίτη PBM11, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 87 και ταυτίζονται με εκείνες της βιβλιογραφίας (Hao, *et al.*, 2016).



Εικόνα 100: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης PBM11

Πίνακας 87:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM11

PBM11 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*** **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*** **σε ppm**
2	-	166.5
3	6.54 (1H, s)	95.2
4	-	184.1
5	-	162.3
6	-	109.1
7	-	164.9
8	6.63 (1H, s)	103.9
9	-	159.1
10	-	105.3
1'	-	123.4
2'/6'	7.87 (2H, d, 8.2)	129.4
3'/5'	6.95 (2H, d, 8.2)	117.0
6-*C*-γλυκοπυρανόση		
1''	4.92 (1H, d, 10.0)	75.4
2''	4.18 (1H, t, 10.0)	72.6
3''	3.49 (1H, *)	80.2
4''	3.49 (1H, *)	71.5
5''	3.42 (1H, *)	82.5
6a''	3.88 (1H, d, 12.0)	75.4
6b''	3.76 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	62.7

*Παρατηρείται αλληλεπίδραση πρωτονίων

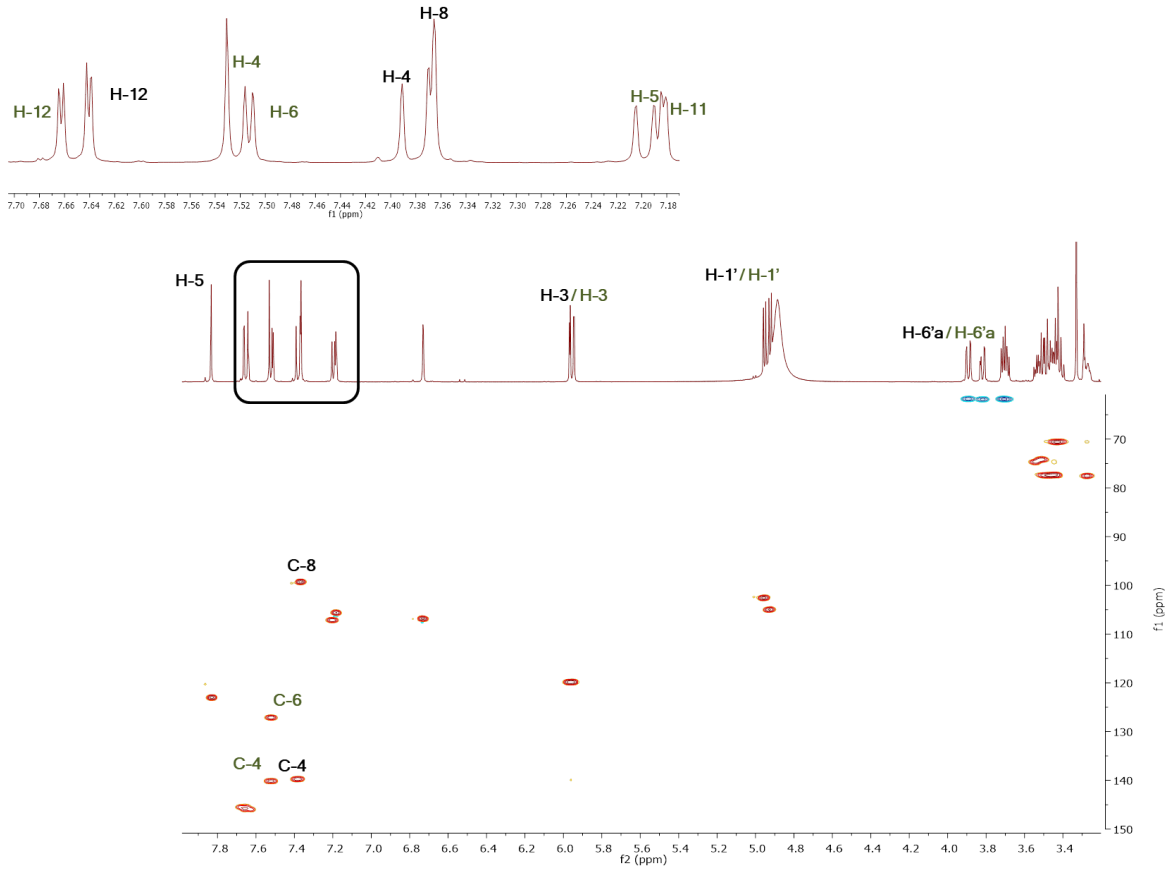
Ο μεταβολίτης 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της απιγενίνης ή αλλιώς ισοβιτεξίνη, είναι μια φλαβόνη η οποία συναντάται σε πλήθος φυτικών ειδών, έχει απομονωθεί από το γένος *Psoralea* αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπισθεί στη *P. bituminosa.* Διαθέτει αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, όπως είναι η αντιυπεργλυκαιμική (Folador, *et al.*, 2010), η αντιπυρετική (Strada, *et al.,* 2017), η αντιοξειδωτική (Khole, *et al.*, 2014) και η νευροπροστατευτική, ενώ έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί αναστολέα του ενζύμου ακετυλενοχοληνεστεράση (Conforti, *et al.,* 2009).

4.3.5.1.3 Μελέτη του κλάσματος PBM-F11

Και στη συγκεκριμένη περίπτωση, το κλάσμα επεξεργάστηκε με χρωματογραφιά μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη καθώς φάνηκε να περιέχει μεταβολίτες διαφορετικών μεταξύ τους κατηγοριών απ' όπου παραλάβαμε τα εξής:

- **Ψωραλενοσίδης PBM12 / Ισοψωραλενοσίδης PBM13**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα 67-97 περιέχει ένα κύριο μεταβολίτη, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε σκούρα μπλε χρώση έπειτα από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με θεϊική βανιλλίνη.

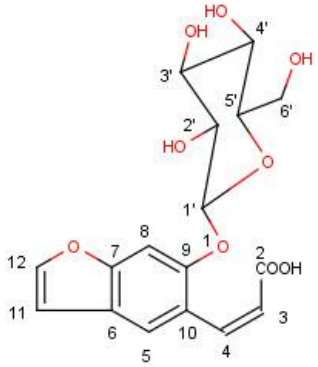
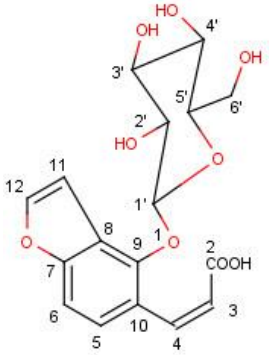


Εικόνα 101: Φάσμα ^{1}H-NMR των ενώσεων PBM12 και PBM13

Ωστόσο, η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για μίγμα δύο ισομερών ενώσεων, του ψωραλενοσίδη PBM12 και ισοψωραλενοσίδη PBM13 σε αναλογία σχεδόν 50 / 50. Ουσιαστικά πρόκειται για τα γλυκοσιδικά παράγωγα των μεταβολιτών ψωραλένιο (PBM3) και ισοψωραλένιο (PBM4), οι οποίοι έχουν απομονωθεί προηγουμένα στα πλαίσια της παρούσης εργασίας από το εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Psoralea bituminosa*.

Η βασική διαφορά των δύο μεταβολιτών περιορίζεται στη θέση σύνδεσης της γλυκοπυρανοσυλόξυ- ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο. Έτσι, στην περίπτωση του μεταβολίτη PBM13, το πρωτόνιο H-11 εμφανίζεται σαφώς αποθωρακισμένο (δ 7.18) σε σύγκριση με το αντίστοιχο πρωτόνιο του μεταβολίτη PBM12 (δ 6.73), ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου A εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές (J = 8.7 Hz) σε δ 7.52 (H-6) και 7.20 (H-5) αντί για τις δύο απλές κορυφές δ 7.36 (H-8) και 7.83 (H-5), οι οποίες παρατηρούνται στο φάσμα του μεταβολίτη PBM12. Οι κορυφές των σακχαριδικών πρωτονίων των δύο μεταβολιτών συμπίπτουν με εξαίρεση τα ανωμερικά πρωτόνια και τα H-6'a των μεθυλενίων, τα οποία στην περίπτωση του μεταβολίτη PBM12 εμφανίζονται ελαφρώς πιο αποθωρακισμένα. Οι χημικές μετατοπίσεις των μεταβολιτών προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 88 και είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία (Qiao, *et al.*, 2006).

Πίνακας 88 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των ενώσεων PBM12 και PBM13

	PBM12 (MeOD)		PBM13 (MeOD)	
				
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	170.4		170.4
3	5.96 (1H, d, 12.5)	119.8	5.96 (1H, d, 12.5)	119.8
4	7.38 (1H, d, 12.5)	140.0	7.52 (1H, d, 12.5)	140.2
5	7.83 (1H, s)	123.2	7.20 (1H, d, 8.7)	107.3
6	-	122.8	7.52 (1H, d, 8.7)	127.3
7	-	157.3	-	157.8
8	7.36 (1H, s)	99.5	-	120.0
9	-	154.8	-	149.7
10	-	123.0	-	122.0
11	6.73 (1H, d, 2.2)	106.9	7.18 (1H, d, 2.2)	105.6
12	7.64 (1H, d, 2.2)	145.9	7.66 (1H, d, 2.2)	145.5
	1-*O*-γλυκοπυρανόση		1-*O*-γλυκοπυρανόση	
1''	4.95 (1H, d, 7.5)	102.5	4.92 (1H, d, 7.5)	105
2''	3.53 (1H, *)	74.7	3.53 (1H, *)	74.7
3''	3.47(1H, *)	77.5	3.47(1H, *)	77.5
4''	3.44(1H, *)	70.7	3.44(1H, *)	70.7
5''	3.29(1H, *)	77.7	3.29(1H, *)	77.7

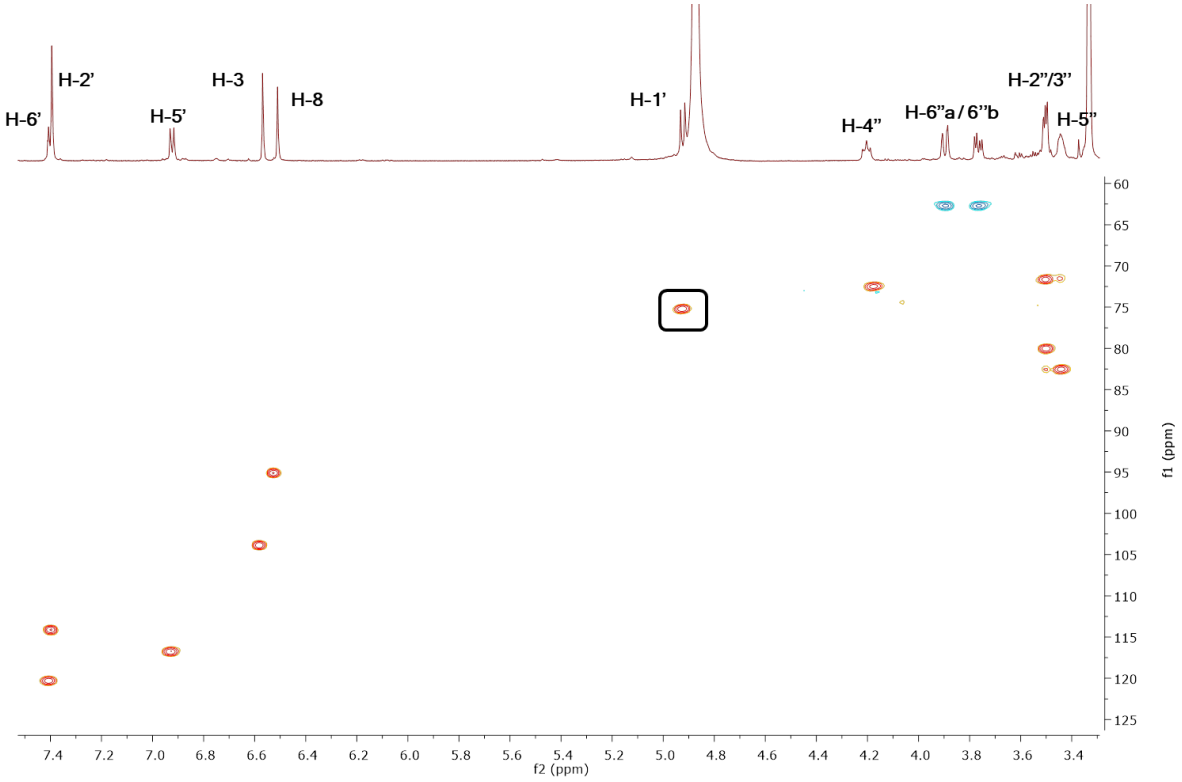
6a''	3.89(1H, dd, 2.0 / 2.5)	61.9	3.81(1H, dd, 2.0 / 2.5)	61.9
6b''	3.69 (1H, m)		3.70 (1H, m)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο ψωραλενοσίδης έχει απομονωθεί στο παρελθόν από την *Psoralea corylifolia (Qiao, et al.*, 2006) και την *Psoralea plicata* (Hamed, *et al.*, 1997) μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από την *P. bituminosa,* το *Ficus carica* (Takahashi, *et al.*, 2014), ενώ πρόσφατα απομονώθηκε και από τη *Litsea cubeba* (Wang, *et al.*, 2017) και το *Zanthoxylum armatum* (Guo, *et al.*, 2017). Ο ισοψωραλενοσίδης έχει απομονωθεί από την *Psoralea corylifolia* (Qiao, *et al.*, 2006) και το *Zanthoxylum armatum* (Guo, *et al.*, 2017).

❖ **6-*C*-*β*-D γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη (PBM14)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος 169-211 έδειξε ότι υπάρχει ένας κύριος μεταβολίτης (PBM14), ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε πορτοκαλί χρώση μετά από την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης. Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη η ένωση ταυτοποιήθηκε ως ο 6-*C*-γλυκοσίδης της λουτεολίνης.



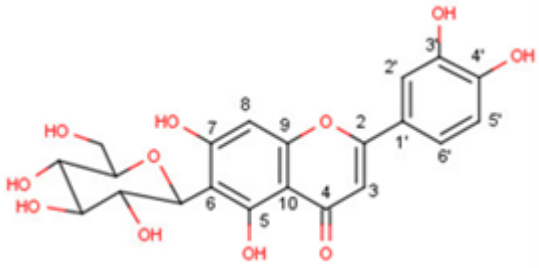
Εικόνα 102: Φάσμα και ^{1}H-HSQC της ένωσης PBM14

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 102) τα H-8 και H-3 εμφανίζονται σαν απλές κορυφές και συντονίζονται στα 6.58 και 6.52 ppm αντίστοιχα. Το H-2' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (J = 2.2 Hz) στα 7.39 ppm, το H-6' ως διπλή διπλής (J = 8.2 / 2.2 Hz) στα 7.40 ppm, ενώ το H-5' ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.2 Hz στα 6.92 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο συντονίζεται στα 4.92 ppm με σταθερά σύζευξης 10.0 Hz, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για το *β*-ανωμερές, ενώ η χημική μετατόπιση του ανωμερικού

άνθρακα (*δ* 75.0) συνάδει με την *C*-γλυκοζυλίωση στην θέση C-6 της γενίνης. Οι χημικές μετατοπίσεις του μεταβολίτη PBM10, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 89 και είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία (Hao, *et al.*, 2016).

Πίνακας 89: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM14

PBM14 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2		166.4
3	6.58 (1H, s)	104.6
4	-	184.2
5	-	162.9
6	-	109.2
7	-	164.8
8	6.52 (1H, s)	95.3
9	-	159.4
10	-	109.5
1’	-	123.7
2’	7.39 (1H, d, 2.2)	114.3
3’	-	147.1
4’	-	151.3
5’	6.92 (1H, d, 8.2)	116.8
6’	7.40 (1H, d, 8.2 / 2.2)	120.4
	6-*C*-γλυκοπυρανόση	
1’’	4.92 (1H, d, 10.0)	75.0
2’’	3.50 (1H, *)	71.5
3’’	3.50 (1H, *)	82.5
4’’	4.20 (1H,t, 10.0)	72.5
5’’	3.44(1H, *)	82.7
6a’’	3.90(1H, d, 12.0 / 2.0)	62.7
6b’’	3.76(1H, d, 12.0 / 5.5)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η 6-*C*-*β*-D γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη έχει απομονωθεί από πολλές φυτικές πηγές, ενώ έχει εντοπισθεί σε αρκετα είδη των γενών *Fagopyrum* (Liu, *et al.*, 2008)*, Erythrina* (Ashmawy, *et al.*, 2016)*, Gentiana* (Olennikov, *et al.*, 2015) (Venditti, *et al.*, 2013)*, Swertia* (Wang, *et al.*, 2008) ενώ έχει ξαναπομονωθεί και από το μελετούμενο είδος (Llorent-Martínez, e*t al.*, 2015) και την *Psoralea balsatica* (Bandeira Reidel, *et al.*, 2017). Εκδηλώνει αντιοξειδωτική δράση (Deepha, *et al.*, 2014), ηπατοπροστατευτική δράση (Yuan, *et al.,* 2016) κυρίως μέσω αντιφλεγμονοδών μηχανισμών (Lin, *et al.*, 2015), ενώ είναι ικανός χημειοπροστατευτικός πράγοντας βάση *in vitro* ελέγχων στην κυτταρική σειρά HepG2 (Yuan, *et al.*, 2012).

4.3.5.1.4 Μελέτη του κλάσματος PBM-F13

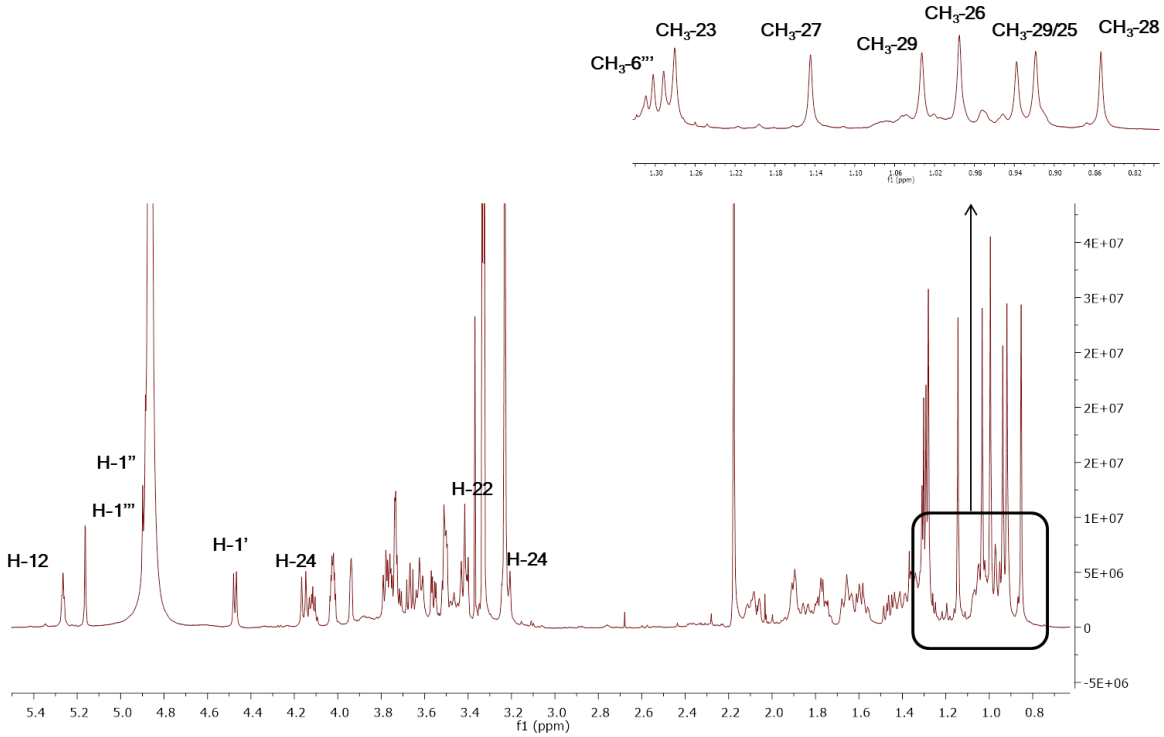
Με σκοπό την παραλαβή ενός μεταβολίτη που παρουσίασε έντονη απορρόφηση στα 254 nm και σκούρα κυανή χρώση μετά από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης, εφαρμόστηκε στο κλάσμα 104_111 η τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκε ο ψωραλενοσίδης (PBM12) καθώς και ο μεταβολίτης 6-*C*-β-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη, των οποίων τα φασματοσκοπικά δεδομένα έχουν περιγραφεί σε προγούμενες παραγράφους.

4.3.5.1.5 Μελέτη του κλάσματος PBM-F16

Το κλάσμα PBM-F16 επεξεργάστηκε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως διαλύτης έκλουσης τη μεθανόλη, με αποτέλεσμα την απομόνωση ενός μεταβολίτη αυξημένης πολικότητας που δεν παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm αλλά μετά την εμφάνιση με το διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης εμφάνισε μπλε γκρι χρώση.

❖ **Σογιασαπωνίνη Ι (PBM15)**

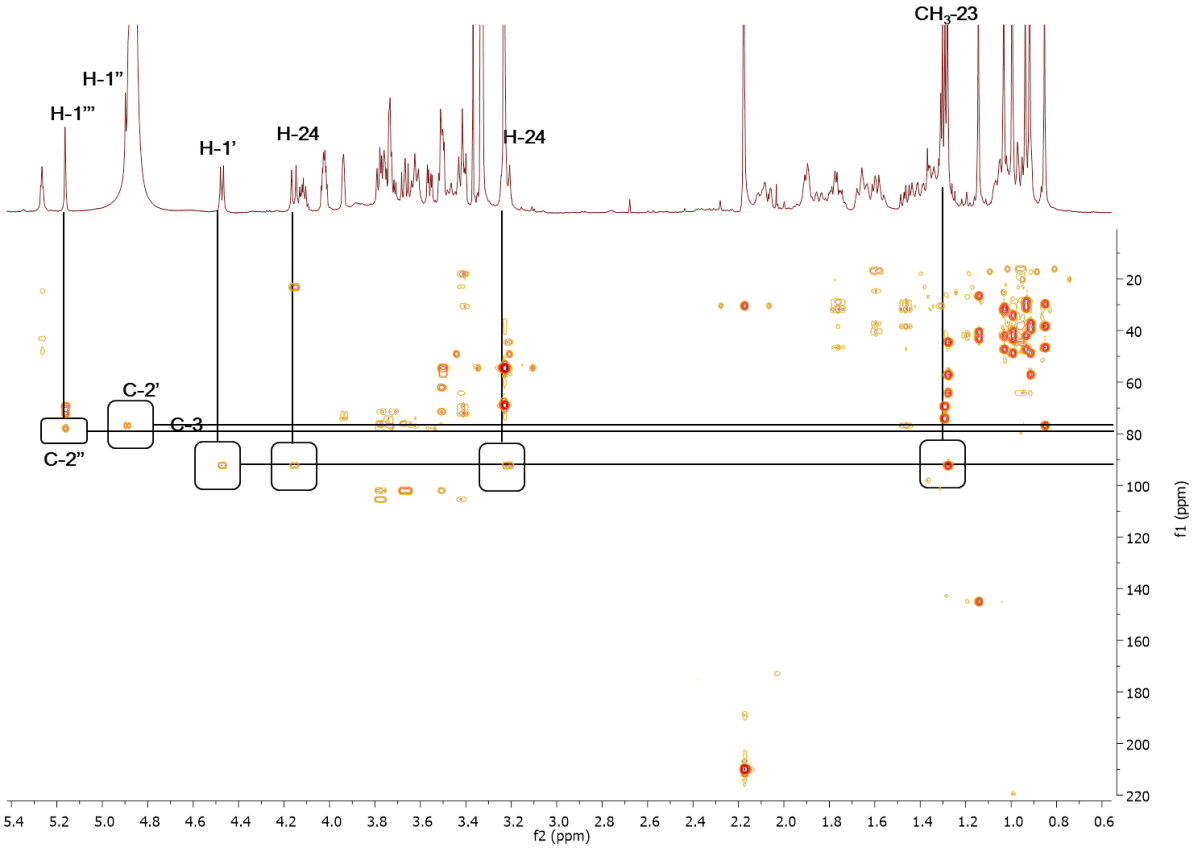
Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι πρόκειται για ένα τρισακχαριδικό πράγωγο της σογιασαπογενόλη Β και συγκεκριμένα τη σογιασαπονίνη Ι.



Εικόνα 103: Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης PBM15

Πιο συγκεκριμένα, στην ολεφινική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 103) εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή (J = 3.6 Hz) η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-12, ενώ ο

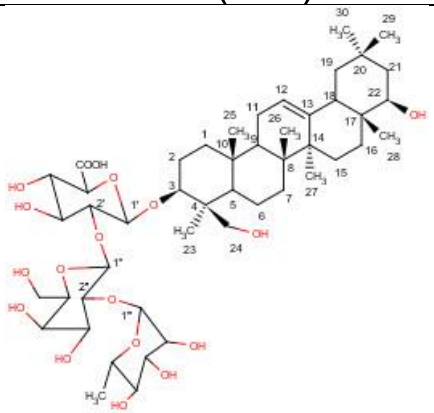
αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 123.7. Το μεθινικό πρωτόνιο της θέσεως C-3 εμφανίζεται συντονίζεται στα 3.42 ppm, ενώ η χημική μετατόπιση του αντίστοιχου άνθρακα (92.8 ppm) συνάδει με γλυκοσυλίωση σε αυτή τη θέση. Πράγματι, στο φάσμα HMBC (εικόνα 104) παρατηρείται η σύζευξη ^3J ανάμεσα στον άνθρακα C-3 και το ανωμερικό πρωτόνιο που εμφανίζεται σε δ 4.47 ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 7.6 Hz. Στο ίδιο φάσμα, φαίνονται οι ^3J συζεύξεις του άνθρακα C-3 τόσο με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-24 (δ 4.16 και 3.22) όσο και με τα μεθυλικά πρωτόνια H-23 (δ 1.28). Τα υπόλοιπα μεθυλικά πρωτόνια της γενίνης εμφανίζονται ως απλές κορυφές σε δ 0.92 (H-25), 1.00 (H-26), 1.14 (H-27), 0.85 (H-28), 0.94 (H-29) και 1.03 (H-30). Επίσης, τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσεως C-24 εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 11.5 Hz στα 4.16 και 3.22 ppm, ενώ το πρωτόνιο του οξυγονωμένου μεθινίου της θέσης C-22 συντονίζεται στα 3.41 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 77.1 ppm. Όσον αφορά το σακχαριδικό τμήμα του μεταβολίτη, έχει διαπιστωθεί η παρουσία τριών σακχάρων. Το ανωμερικό πρωτόνιο μιας ομάδας ραμνοπυρανόσης εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε δ 5.16, με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 102.6 ppm, ενώ τα χαρακτηριστικά μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως C-6 του σακχάρου συντονίζονται ως διπλή κορυφή (J = 6.5 Hz) στα 1.29 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνοπυρανόσης παρουσιάζει ^3J σύζευξη με τον άνθρακα στα 78.4 ppm, του οποίου το αντίστοιχο πρωτόνιο εμφανίζεται στα 3.67 ppm ως διπλή διπλής κορυφή (J = 9.8 / 7.5 Hz). Το προαναφερόμενο σήμα αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2'' μιας ομάδας γαλακτοπυρανόσης, το οποίο στο φάσμα COSY παρουσιάζει σύζευξη τόσο με το πρωτόνιο H-3'' στα 3.56 ppm (dd, J = 9.8 /3.5 Hz) όσο και με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' (δ 4.89, d, J = 7.5 Hz). Με αυτόν τον τρόπο καθορίστηκε ο τρόπος σύνδεσης των δύο προαναφερόμενων σακχαριδικών μονάδων μεταξύ τους. Τέλος, η θέση σύνδεσης της γαλακτοπυρανόσης στην ομάδα του γλυκουρονικού οξέος προσδιορίσθηκε από τη ^3J σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου H-1'' (δ 4.89) με τον άνθρακα C-2', ο οποίος συντονίζεται στα 77.4 ppm.



Εικόνα 104: Φάσμα ^{1}H και HMBC της ένωσης PBM15

Οι χημικές μετατοπίσεις του μεταβολίτη PBM15, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 90 και είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία (Llorent-Martínez, *et al.*, 2015)..

Πίνακας 90: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης PBM15

PBM15 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	1.66 (1H, *) /1.05 (1H, *)	37.8
2	2.09 (1H, *) / 1.84 (1H, *)	27.4
3	3.42 (1H, *)	92.8
4	-	45.0
5	0.96 (1H, *)	57.6
6	1.64 (1H, *) / 1.38 (1H, *)	19.8
7	1.58 (1H, *) / 1.43 (1H, *)	34.2
8	-	40.5

9	1.59 (1H, *)	49.5
10	-	37.8
11	1.91 (2H, *)	25.4
12	5.26 (1H, t, 3.6)	123.7
13	-	145.8
14	-	43.2
15	1.79 (1H, *) / 1.05 (1H, *)	27.1
16	1.77 (1H, *) / 1.30 (1H, *)	28.0
17	-	38.7
18	2.07 (1H, *)	46.7
19	1.76 (1H, *) / 0.98 (1H, *)	47.7
20	-	31.8
21	1.46 (1H, *) /1.35 (1H, *)	42.4
22	3.41 (1H, *)	77.1
23	1.28 (3H, s)	23.4
24	4.16 (1H, d, 11.5) / 3.22 (1H, d, 11.5)	64.6
25	0.92 (3H, s)	16.5
26	1.00 (3H, s)	17.8
27	1.14 (3H, s)	25.8
28	0.85 (3H, s)	20.6
29	0.94 (3H, s)	32.8
30	1.03 (3H, s)	29.3
	3-*O*-γλυκουρονικό	
1’	4.47 (1H, d, 7.6)	105.5
2’	3.78 (1H, *)	77.4
3’	3.62 (1H, *)	78.7
4’	3.45 (1H, *)	74.2
5’	3.58 (1H, *)	77.1
6’	-	210.3
	2’-*O*-γαλακτοπυρανόση	
1’’	4.89 (1H, d, 7.5)	102.4
2’’	3.67 (1H, dd, 9.8 / 7.5)	78.4
3’’	3.56 (1H, dd, 9.8 / 3.5)	76.8
4’’	3.72 (1H, *)	71.5
5’’	3.50 (1H, m)	74.2
6’’a	3.77 (1H, dd, 12.0 / 2.8)	62.1
6’’b	3.72 (1H, dd, 12.0 / 5.5)	
	2’’-*O*-ραμνοπυρανόση	
1’’’	5.16 (1H, brs)	102.6
2’’’	3.95 (1H *)	72.6
3’’’	3.74 (1H *)	72.0
4’’’	3.41 (1H *)	74.6
5’’’	4.12 (1H, m)	69.9
6’’’	1.29 (3H, d, 6.5)	18.4

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Απαντάται κατά κύριο λόγο στα γένη *Medicago* (Tava, *et al.*, 2011) (Tava, *et al.,* 2009)*, Lupinus* (Woldemichael, *et al.*, 2003) (Woldemichael, *et al.*, 2002)*, Trifolium* (Pérez, *et al.*, 2015) (Simonet, *et al.*, 1999)*, Pueraria* (Niiho, *et al.,* 2010) (Arao, *et al.*, 1996) και στο *Glycine max* (Lan, *et al.,* 2017) (Takahashi, *et al.,* 2008) ενώ έχει απομονωθεί από τη *Psoralea bituminosa* (Llorent-Martínez, *et al.*, 2015)*,* το *Phaseolus vulgaris* (Bianco, *et al.*, 2018) και το *Melilotus officinalis* (Hirakawa, *et al.*, 2000)*.* Επίσης, χαρακτηρίζεται για την ηπατοπροστατευτική (Arao, *et al.,* 1997) και αντιφλεγμονώδη δράση της (Zha, *et al.,* 2014) ενώ δρα και ως αντιυπερτασικός παράγοντας ως αναστολέας της ρενίνης (Takahashi, *et al.*, 2008).

4.3.6 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (LAM)

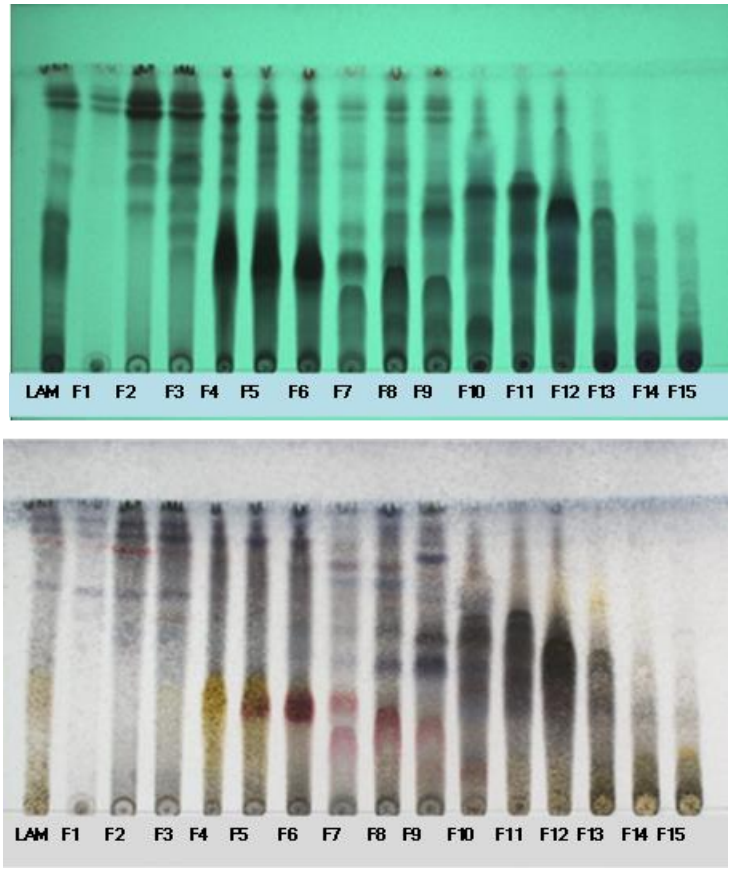
Με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, από το μεθανολικό εκχύλισμα του *L. albus*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του CPC, ενώ η εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών βασίστηκε σε δοκιμές συστημάτων διαλυτών και αξιολόγηση της κατανομής των περιεχόμενων συστατικών του μίγματος στις δύο φάσεις τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Έτσι, με τη βοήθεια των προαναφερόμενων ελέγχων προσομοίωσης κατανομής-διαχωρισμού, ανάμεσα σε διάφορα συστήματα επιλέχθηκε το σύστημα EtOAc/EtOH/H_2O 10/1/10 για την κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (LAM).

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance, και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 8 g, το οποίο διαλύθηκε σε 11 ml κάτω φάσης και 10 ml πάνω φάσης. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) την στατική. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή της στατικής φάσης στη στήλη. Στη συνέχεια διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη σε 'ascending mode' με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές ανά λεπτό μέχρι την εξισορρόπηση του συστήματος. Μετά την εισαγωγή του δείγματος παραλήφθηκαν 61 κλάσματα των 30ml (έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες), ενώ στη συνέχεια έγινε αναστροφή των φάσεων με τη υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης.

Προέκυψαν συνολικά 110 κλάσματα εκ των οποίων τα 61 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 49 κλάσματα. Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 80/20 πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 15 κλάσματα (πίνακας 91) ενώ στην εικόνα 105 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH 80/20. Επίσης, τα κλάσματα ελέγχθηκαν και σε TLC αντίστροφης φάσης σε H_2O/ACN 70/30.

Πίνακας 91:Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος LAM

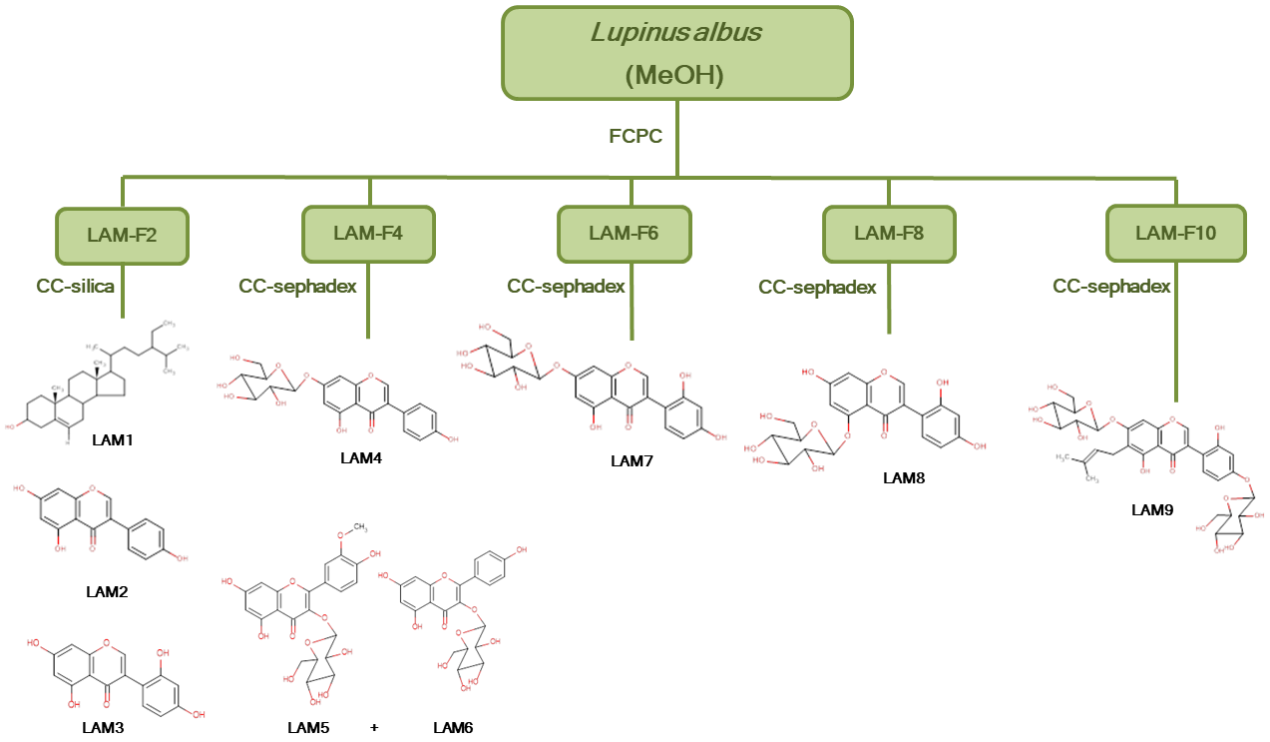
Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
LAM-F1	6-8	4.2
LAM-F2	9-11	1250.3
LAM-F3	12-13	111.2
LAM-F4	14-23	503.6
LAM-F5	24-30	97.3
LAM-F6	31-46	114.4
LAM-F7	47-49	2.95
LAM-F8	50-70	147.9
LAM-F9	71-80	57.8
LAM-F10	81-87	105.4
LAM-F11	88-90	67.9
LAM-F12	91-92	122.6
LAM-F13	93	512.1
LAM-F14	94-95	3.710.9
LAM-F15	96-110	1530.1



Εικόνα 105: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του LAM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20)

4.3.6.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών του εκχυλίσματος LAM

Από τα 15 προαναφερόμενα κλάσματα που προέκυψαν μετά από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* με την τεχνική του FCPC, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη 5 κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών με αποτέλεσμα να καταλήξουμε στην απομόνωση 9 μεταβολιτών. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία απομόνωσης των συστατικών του εκχυλίσματος LAM:



Σχήμα 7: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Lupinus albus* (LAM)

4.3.6.1.1 Μελέτη του κλάσματος LAM-F2

Με σκοπό την απομόνωση των κυριότερων συστατικών του κλάσματος LAM-F2 πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (silica gel 40-60μm), ενώ η κινητή φάση ήταν μίγμα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH συνεχώς αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά ελήφθησαν 594 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν σε 20 τελικά κλάσματα, από τα οποία στη συνέχεια παραλήφθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **β-Σιτοστερόλη (LAM1)**

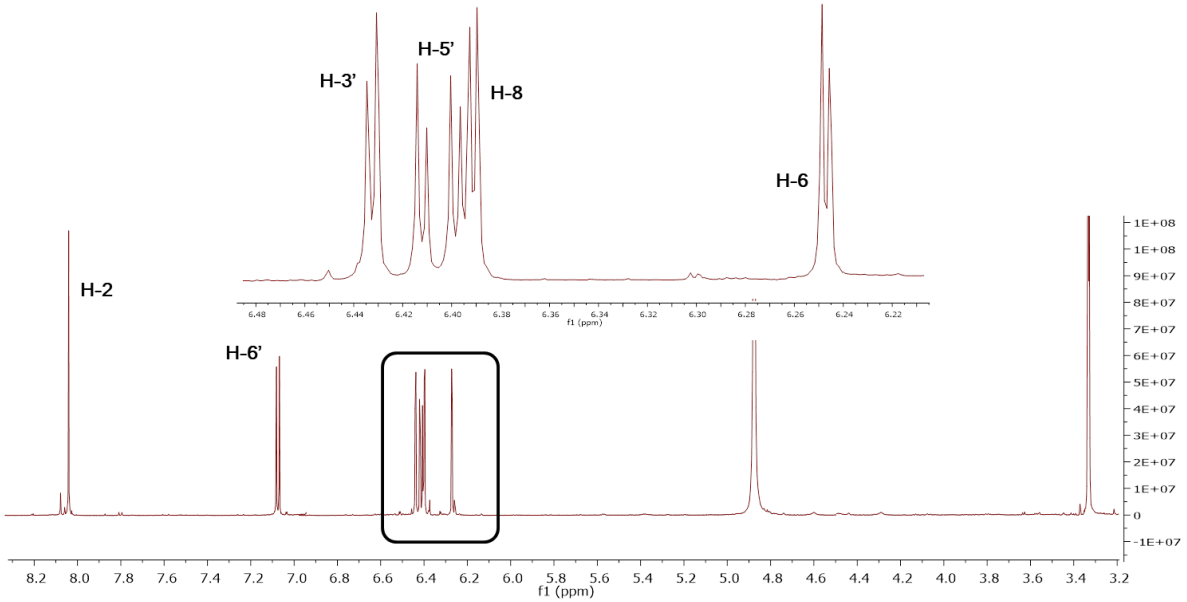
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως *β*-σιτοστερόλη, η οποία έχει απομονωθεί στα πλαίσια της παρούσας εργασίας από το μεθανολικό εκχύλισμα του εκχύλισμα του *Cytisus villosus* και της *Ceratonia siliqua* και το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του *Hippocrepis comosa*. Η *β*-σιτοστερόλη έχει ξαναπομονωθεί στο παρελθόν από τους καρπούς του *Lupinus albus* (Hamama, *et al.*, 2004) και τα φασματοσκοπικά του δεδομένα περιγράφονται στην παράγραφο 0 (CVM1).

- **Γενιστεΐνη (LAM2)**

Πρόκειται για το μεταβολίτη γενιστεΐνη η οποία έχει απομονωθεί από αρκετά είδη του γένους *Lupinus* και από το *Lupinus albus* (Kachlicki, *et al.,* 2005) (Von Baer, *et al.*, 2006) (Ranilla, *et al.,* 2009) και έχει ξαναπομονωθεί στην παρούσα εργασία από το φυτό *Cytisus villosus* (CVM3, 4.3.2.1).

❖ **2'-Υδροξυγενιστεΐνη (LAM3)**

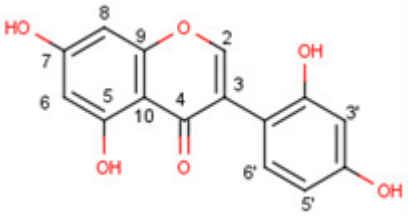
Ο μεταβολίτης LAM3 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θεϊικής βανιλλίνης εμφάνισε έντονη ροζ χρώση. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 106) εμφανίζεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή των ισοφλαβονών σε δ 8.03, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2, ενώ τα πρωτόνια H-8 και H-6 εμφανίζονται στα 6.38 και 6.25 ppm αντιστοίχως ως διπλές κορυφές (J = 2.2 Hz) που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμια. Τα πρωτόνια του Β δακτυλίου αποτελούν ένα χαρακτηριστικό τρισυποκατεστημένο ABX σύστημα, το οποίο φασματοσκοπικά αποτυπώνεται από μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.0 Hz, μια διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.0 και 2.2 Hz και μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 2.2 Hz. Τα προαναφερόμενα σήματα αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6', H-5' και H-3', τα οποία συντονίζονται στα 6.39, 6.42 και 7.06 ppm, αντίστοιχα.



Εικόνα 106: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης LAM3

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη LAM3, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 92, προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 92: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM3

LAM3 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	8.03 (1H, s)	156.6
3	-	123.1
4	-	182.6
5	-	164.0
6	6.25 (1H, d, 2.2)	100.3
7	-	165.9
8	6.38 (1H, d, 2.2)	94.7
9	-	159.5
10	-	106.2
1’	-	111.3
2’	-	157.8
3’	6.42 (1H, d, 2.2)	104.4
4’	-	160.5
5’	6.39 (1H, dd, 8.0 / 2.2)	108.1
6’	7.06 (1H, d, 8.0)	133.2

Ο μεταβολίτης LAM3 αποτελεί το 2’-υδροξυ- παράγωγο του μεταβολίτη LAM2 (γενιστεϊνη) και έχει ξαναπομονωθεί από τα γένη *Sophora* (Zhang, *et al.*, 2014), (Yang, *et al.*, 2012), *Apios* (Kim, *et al.,* 2018) (Lin, *et al.*, 2016), *Flemingia* (Madan, *et al.*, 2009) *(Rahman, et al.*, 2004) το γένος *Lupinus* (Wojakowska, *et al.,* 2013) (Zhang, *et al.*, 2011) καθώς και από το *Lupinus albus* (D'Agostina, *et al.,* 2008). Παράγωγα της 2’-υδροξυγενιστεΐνης απαντώνται στα περισσότερα είδη του γένους *Lupinus* με το *Lupinus albus* να εμφανίζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (Aisyah, *et al.*, 2006). Η αντιμικροβιακή δράση του φυτού αποδίδεται σε σημαντικό βαθμό στην παρουσία του μεταβολίτη LAM3, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και προσφέρει στο φυτό προστασία έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Duranti, *et al.*, 2008).

4.3.6.1.2 Μελέτη του κλάσματος LAM-F4

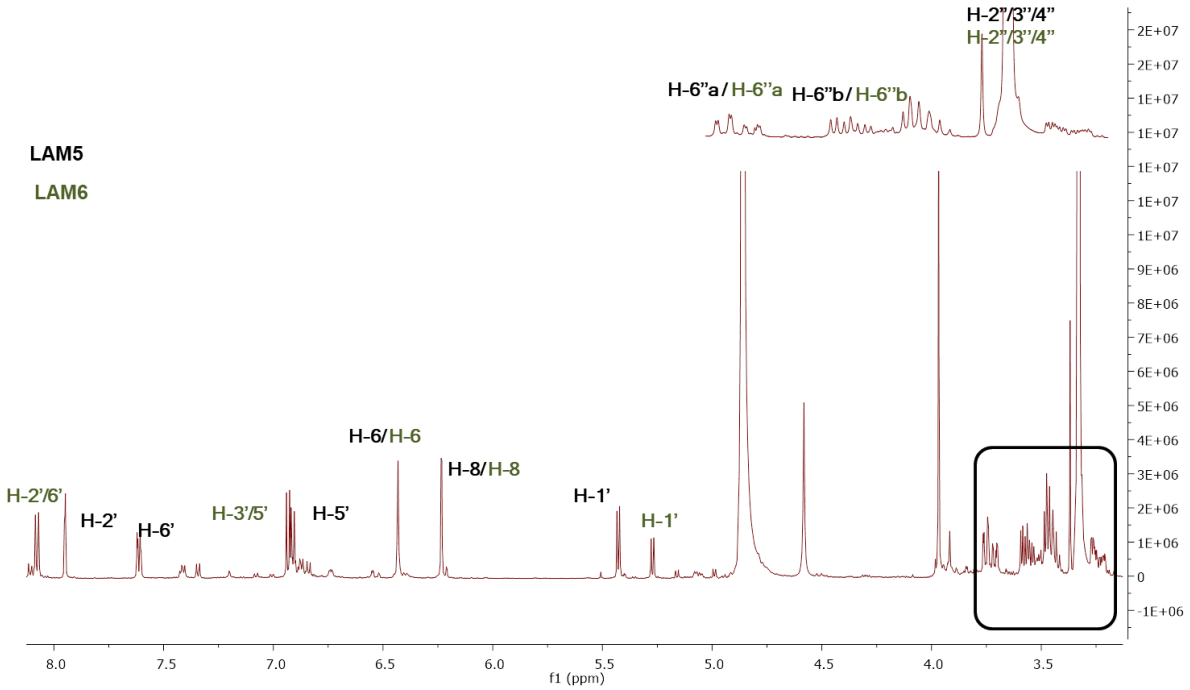
Το κλάσμα LAM-F4 επεξεργάστηκε με χρωματογραφιά μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (LAM4)**

Ο μεταβολίτης LAM4 αποτελεί το 7-*O* γλυκοσιδικό παράγωγο της γενιστεΐνης, ο οποίος έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το γένος *Lupinus* (Wojakowska, *et al.*, 2013) *(Stobiecki, et al.*, 2010) και το μελετούμενο είδος (D'Agostina, *et al.*, 2008) (Katagiri, *et al.*, 2000). Επίσης, έχει απομονωθεί στα πλαίσια της παρούσας εργασίας από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Cytisus villosus* (CVM10) και η φασματοσκοπική περιγραφή του αναφέρεται στην παράγραφο 4.3.2.1.2.

❖ **3-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της ισοραμνετίνης (LAM5) / 3-*O*- γλυκοπυρνοσίδης της καιμπφερόλης (LAM6)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος LAM-F4 αποκάλυψε την ύπαρξη δύο μεταβολιτών με πολύ κοντινό Rf, οι οποίοι απαντώνται στο μίγμα σε αναλογία 67 / 33 και μετά από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκαν ως 3-*O*- γλυκοσίδης της ισοραμνετίνης (LAM5) και -3-*O*- γλυκοσίδης της καιμπφερόλης (LAM6) ή αστραγαλίνη. Στο φάσμα ^{1}H-NMR του μίγματος (εικόνα 107) εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων H-6 και H-8, τα οποία συντονίζονται και για τους δύο μεταβολίτες στα 6.23 και 6.43 ppm αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια των δακτυλίων B διαφοροποιούνται. Επίσης, τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας στα 3.97 ppm παρουσιάζουν ^{3}J σύζευξη με τον οξυγονωμένο άνθρακα στα 148.5 ppm, ο οποίος με τη σειρά του παρουσιάζει σύζευξη τόσο με πρωτόνιο στα 6.93 ppm (H-5') που εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή με J = 8.0Hz όσο και με το πρωτόνιο H-2' στα 7.95 ppm (d, J = 2.0 Hz). Με αυτόν τον τρόπο, η θέση σύνδεσης της μεθοξυλομάδας προσδιορίστηκε στη θέση 3' της γενίνης και ο μεταβολίτης LAM5 ταυτοποιήθηκε ως ισοραμνετίνη. Επιπλέον, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συναντάμε τα ανωμερικά πρωτόνια των σακχάρων που ταυτοποιήθηκαν ως γλυκοπυρανόσες και για τους δύο μεταβολίτες και με τη βοήθεια φάσματος HMBC αποκαλύφθηκε πως συνδέονται στην 3 θέση των γενινών.

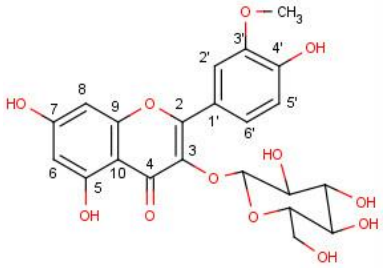


Εικόνα 107: Φάσμα ^{1H} -NMR των ενώσεων LAM5 και LAM6

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των μεταβολιτών, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 93 και τον πίνακα 94 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Enerstvedt, *et al.*, 2018) (Balkan, *et al.,* 2017).

Πίνακας 93: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM5

LAM5 (MeOD)

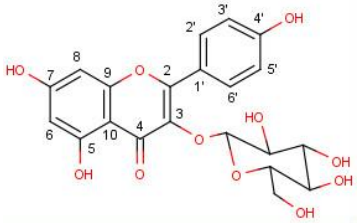


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	148.5
3	-	135.3
4	-	180.0
5	-	162.7
6	6.23(1H, d, 2.0)	99.8
7		165.9
8	6.43(1H, d, 2.0)	94.7
9	-	158.3
10	-	105.7
1’	-	123.2
2’	7.95(1H, d, 2.0)	114.4
3’	-	148.5
4’	-	158.9
5’	6.93 (1H, d, 8.4)	116.0
6’	7.61 (1H,d, 8.4 / 2.0)	123.9
3’-OCH_3	3.97 (3H, s)	56.7
3-*O*-γλυκοπυρανόση		
1’’	5.43 (1H, d, 7.2)	103.6
2’’	3.51 (1H, *)	74.6
3’’	3.51 (1H, *)	77.7
4’’	3.47 (1H, *)	75.8
5’’	3.26 (1H, *)	78.4
6a’’	3.75 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b’’	3.58 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Πίνακας 94: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM6

LAM6 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	161.6
3	-	135.9
4	-	180.0
5	-	162.7
6	6.23 (1H, d, 2.0)	99.8
7		165.9
8	6.43 (1H, d, 2.0)	94.7
9	-	158.3
10	-	105.7
1’	-	122.9
2’/6’	8,08 (2H, d, 8.8)	132.4
3’/5’	6.91 (2H, d, 8.8)	116.2

4’	-	159.2
	3-*O*-γλυκοπυρανόση	
1’’	5.27(1H, d, 7.2)	104.1
2’’	3.51(1H, *)	74.6
3’’	3.51(1H, *)	77.7
4’’	3.45(1H, *)	75.8
5’’	3.22 (1H, *)	78.4
6a’’	3.71 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b’’	3.54 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

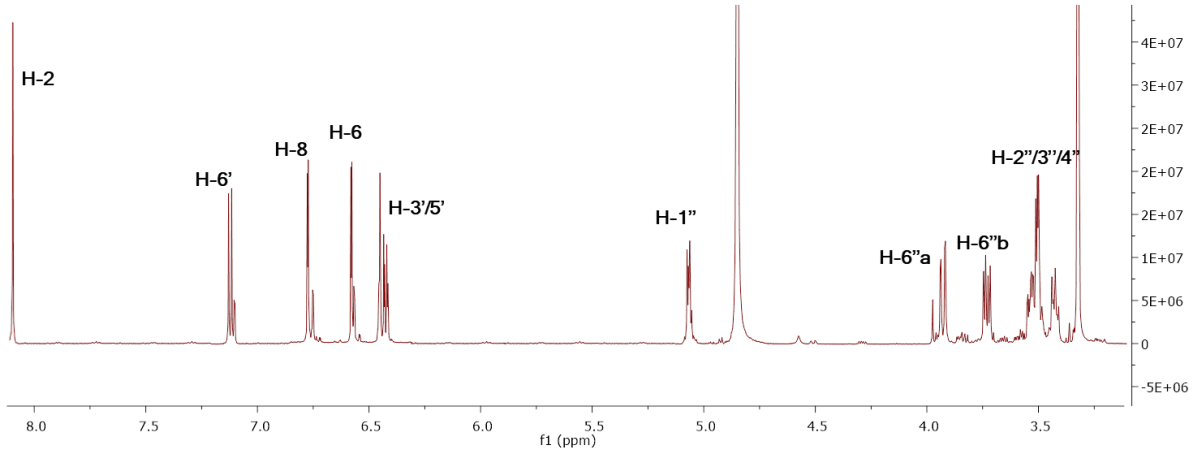
Και οι δύο προαναφερόμενοι μεταβολίτες έχουν εντοπιστεί στο παρελθόν στο μελετούμενο είδος (Bednarek, *et al.*, 2001) (D'Agostina, *et al.*, 2008), καθώς και σε άλλα φυτικά είδη (Abdel-Hamid, *et al.*, 2016) (Kimura, *et al.,* 2015) (Zeng, *et al.*, 2017) (Wang, *et al.*, 2017). Ο 3-*O*-γλυκοσίδης της ισοραμνετίνης έχει χαρακτηριστεί αξιόλογος αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Antunes-Ricardo, *et al.*, 2015) (Luyen, *et al.*, 2015) όπως και η αστραγαλίνη (Ma, *et al.,* 2013) (Li, *et al.*, 2013) ενώ παρουσιάζει και αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (Choi, *et al.,* 2013).

4.3.6.1.3 Μελέτη του κλάσματος LAM-F6

Το κλάσμα LAM-F6 επεξεργάστηκε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Από την προαναφερόμενη διαδικασία παραλήφθηκε ο κύριος μεταβολίτης του κλάσματος, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm και έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊϊκής βανιλλίνης εμφάνισε ροζ έντονη χρώση.

- **7-*O*-β-γλυκοπυρανοσυλο-2’-υδροξυγενιστεΐνη (LAM7)**

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 108) τα πρωτόνια των θέσεων Η-8 και Η-6 εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία (δ 6.74 και 6.53) σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια της γενίνης του μεταβολίτη LAM3, λόγω της γλυκοζυλίωσης που λαμβάνει χώρα στη θέση 7 του δακτυλίου Α. Το αρωματικό πρωτόνιο του μεταβολίτη συντονίζεται στα 5.08 ppm, ενώ στο φάσμα HMBC εμφανίζεταιη σύζευξή του με τον C-7. Τα μεθυλενικά πρωτόνια της γλυκόζης συντονίζονται στα 3.94 και 3.74 ppm ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια της γλυκοπυρανόσης στην περιοχή 3.56 - 3.44 ppm.

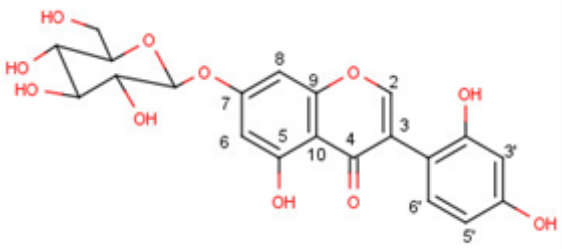


Εικόνα 108: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης LAM7

Στον πίνακα 95 περιλαμβάνονται τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη LAM7, τα οποία είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Watanabe, *et al.*, 1993).

Πίνακας 95: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM7

LAM7 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.10 (1H, s)	157.3
3	-	122.3
4	-	183.1
5	-	164.3
6	6.53 (1H, d, 2.2)	101.8
7	-	165.0
8	6.74 (1H,d, 2.2)	96.2
9	-	159.4
10	-	108.5
1'	-	122.8
2'	-	157.8
3'	6.42 (1H,d, 2.2)	104.8
4'	-	160.8
5'	6.40 (1H, dd, 8.0 / 2.2)	108.4
6'	7.08 (1H, d, 8.0)	133.6
	7-*O*-γλυκοπυρανόση	
1''	5.08 (1H, d, 7.5)	101.8
2''	3.51 (1H, *)	74.6
3''	3.51 (1H, *)	77.7
4''	3.44 (1H, *)	71.7
5''	3.56 (1H, *)	78.4
6a''	3.94(1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b''	3.74(1H, dd, 12.0 / 5.0)	62.4

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

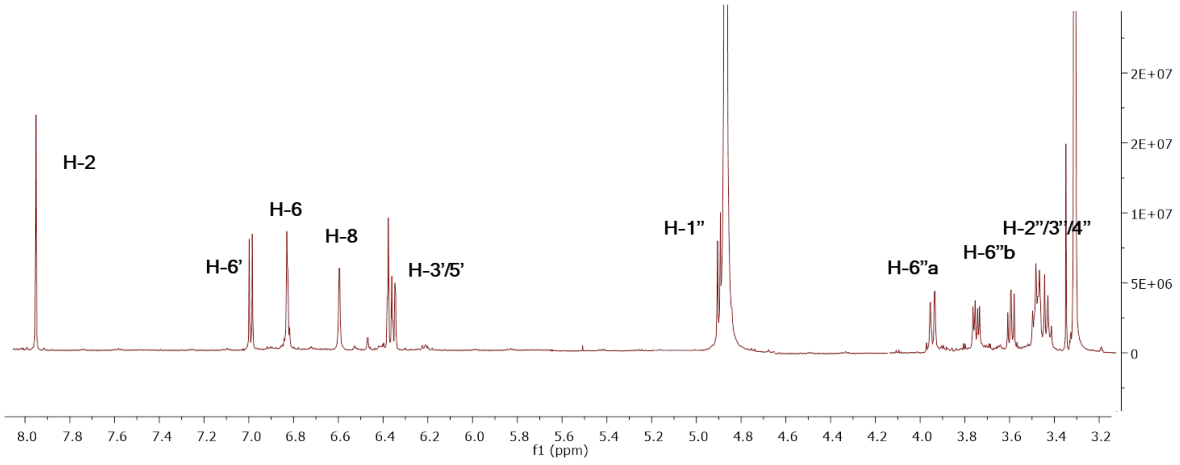
Ο μεταβολίτης LAM7 αποτελεί ένα γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της 2'-υδροξυγενιστεϊνης (LAM3). Έχει απομονωθεί από τις ρίζες και τα υπέργεια τμήματα των φυτών *Lupinus albus* είδος (D'Agostina, *et al.*, 2008) (Katagiri, *et al.*, 2000) και *L. luteus* και *L. polyphyllous* (Watanabe, et al., 1993) ενώ αποτελεί έναν από τους κυριότερους μεταβολίτες του γένους (Kachlicki P., 2005). Επίσης, έχει απομονωθεί από το *Apios taiwanianus* (Lin, *et al.*, 2016) και την *Eriosema laurentii* (Ateba, *et al.*, 2016).

4.3.6.1.4 Μελέτη του κλάσματος LAM-F8

Το κλάσμα LAM-F8 επεξεργάστηκε με χρωματογραφιά μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Έτσι, απομονώθηκε ο κύριος μεταβολίτης του κλάσματος, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης εμφάνισε ροζ έντονη χρώση.

❖ **5-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη (LAM8)**

Παρατηρώντας το φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη LAM8 (εικόνα 109) παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη LAM7, με τη διαφορά ότι παρατηρείται σημαντική αποθωράκιση για το H-6 του δακτυλίου Α, γεγονός το οποίο συνάδει με τη γλυκοζυλίωση στη θέση 5 της γενίνης. Επίσης το ανωμερικό πρωτόνιο συντονίζεται στα 4.89 ppm, δηλαδή εμφανίζεται ελαφρώς πιο θωρακισμένο συγκριτικά με το μεταβολιτη LAM7, ενώ παρουσιάζει σύζευξη με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στα 160.4 ppm που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-5.

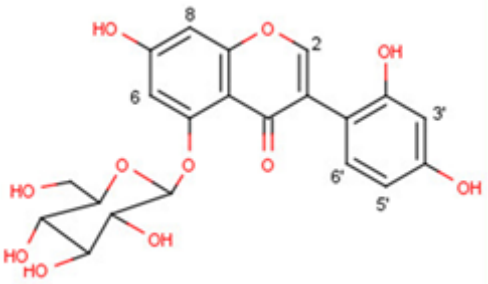


Εικόνα 109: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης LAM8

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 96.

Πίνακας 96: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM8

LAM8 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.00 (1H, s)	154.9
3	-	122.3
4	-	179.4
5	-	160.4
6	6.85 (1H, d, 2.2)	104.2
7	-	164.4
8	6.62 (1H, d, 2.2)	98.6
9	-	159.4
10	-	108.5
1’	-	117.7
2’	-	157.8
3’	6.40 (1H,d, 2.2)	104.8
4’	-	160.8
5’	6.38 (1H, d, 8.0 / 2.2)	108.4
6’	7.01 (1H, d, 8.0)	133.6
5-*O*-γλυκοπυρανόση		
1’’	4.89 (1H, d, 7.5)	101.8
2’’	3.52 (1H, *)	77.0
3’’	3.52 (1H, *)	76.1
4’’	3.47 (1H, *)	70.2
5’’	3,61 (1H, *)	73.3
6a’’	3.96 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b’’	3.76 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο μεταβολίτης LAM8 είναι επίσης ένα γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της 2’-υδροξυγενιστεϊνης, το οποίο φέρει το σάκχαρο στη θέση 5 του βασικού σκελετού και δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα από άλλη φυσική πηγή **(νέο φυσικό προϊόν).**

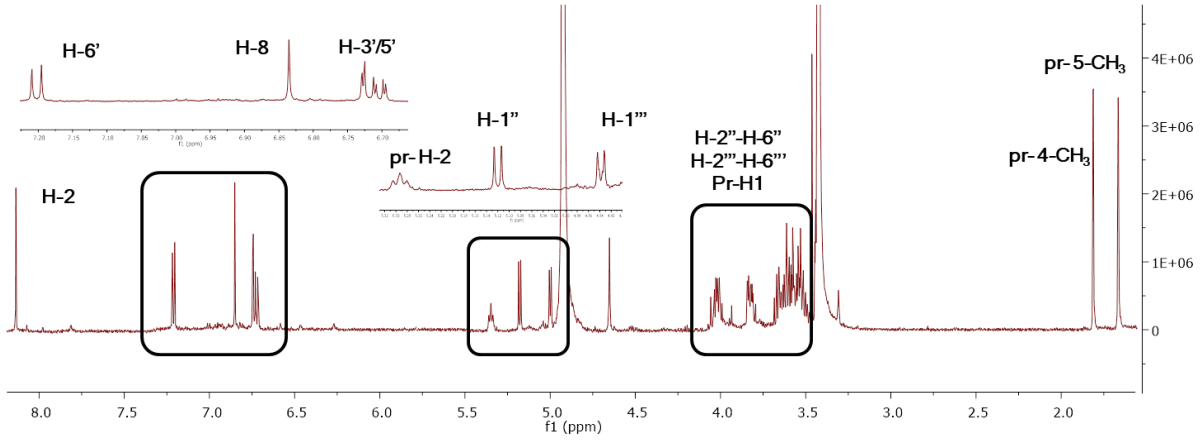
4.3.6.1.5 Μελέτη του κλάσματος LAM-F10

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το κλάσμα LAM-F10 περιέχει ένα μεταβολίτη αυξημένης πολικότητας. Με σκοπό την απομόνωσή του εφαρμόστηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη.

- **6-(3,3-διμεθυαλλυλο)-7,4’-δι-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-2’-υδροξυγενιστεϊνη ή 7,4’-δι-*O*-γλυκοπυρανοσυλολουτεόνη (LAM9)**

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 110) διακρίνουμε σε δ 8.13 τη χαρακτηριστική απλή κορυφή των ισοφλαβονών, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ

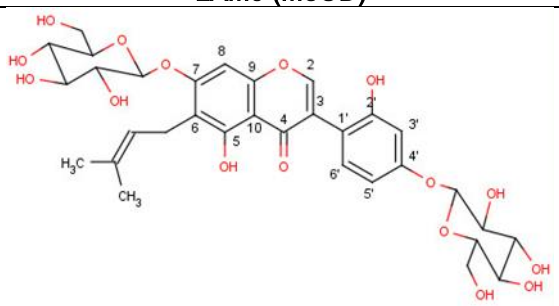
157.3. Το γεγονός ότι το πρωτόνιο H-8, το οποίο εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 6.84 ppm, είναι αποθωρακισμένο συνάδει με τη γλυκοσυλίωση στη θέση C-7 της γενίνης.



Εικόνα 110: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης LAM9

Ομοίως, τα πρωτόνια του δακτυλίου Β είναι εμφανώς αποθωρακισμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια της λουτεόνης εξαιτίας της γλυκοσυλίωσης στη θέση C-4'. Ωστόσο, οι θέσεις σύνδεσης των δύο ομάδων γλυκοπυρανόσης στη λουτεόνη επαληθεύθηκαν με τα δεδομένα του φάσματος HMBC και συγκεκριμένα μέσω των συζεύξεων ^{3}J των ανωμερικών πρωτονίων (δ 5.12 και 4.93) με τους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες των θέσεων C-7 (δ 162.5) και C-4' (δ 160.8), αντίστοιχα. Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR παρατηρούμε μια ευρεία τριπλή κορυφή με άνθρακα στα 123.4 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο της 3,3-διμεθυλαλλυλομάδας, ενώ τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων της εμφανίζονται ως απλές κορυφές σε δ 1.80 και 1.68. Στο φάσμα HMBC παρατηρήθηκε ότι τα μεθυλενικά πρωτόνια της 3,3-διμεθυλαλλυλομάδας (δ 3.38) παρουσιάζουν σύζευξη με τον αρωματικό άνθρακα στα 115.6 ppm (C-6), ο οποίος με τη σειρά του εμφανίζει σύζευξη με το πρωτόνιο H-8. Με αυτόν τον τρόπο καθορίστηκε η θέση σύνδεση της πρενυλομάδας στο βασικό σκελετό.

Πίνακας 97: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης LAM9

LAM9 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ **σε ppm (**J **σε Hz)**	**^{13} C NMR** δ **σε ppm**
2	8.13 (1H, s)	157.3
3	-	122.3
4	-	182.5
5	-	164.3

6	-	115.6
7	-	162.5
8	6.84 (1H, s)	94.4
9	-	157.4
10	-	108.5
1'	-	115.0
2'	-	157.8
3'	6.73 (1H,d, 2.2)	105.5
4'	-	160.8
5'	6.70 (1H, dd, 8.0 / 2.2)	109.2
6'	7.20 (1H, d, 8.0)	133.6
	7-*O*-γλυκοπυρανόση	
1''	5.12 (1H, d, *J* = 7.5 Hz)	101.8
2''	3.52 (1H, *)	77..0
3''	3.52 (1H, *)	76.1
4''	3.47 (1H, *)	70.2
5''	3,62 (1H, *)	73.3
6a''	3.94 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	
	4'-*O*-γλυκοπυρανόση	
1'''	4.93 (1H, d, 7.5)	102.3
2'''	3.52 (1H, *)	77.0
3'''	3.52 (1H, *)	76.1
4'''	3.47 (1H, *)	70.2
5'''	3,62 (1H, *)	73.3
6a'''	3.94 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b'''	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	
	3,3-διμεθυλαλλυλομάδα	
1	3.38 (2H, d, 7.0)	22.4
2	5.29 (1H, t, 7.0)	123.4
3	-	132.5
4	1.80 (3H, s)	18.1
5	1.68 (3H, s)	26.2

Αποτελεί το διγλυκοσιδικό παράγωγο της λουτεόνης, η οποία συναντάται στο γένος *Lupinus* (Harborne, *et al*., 1976) και έχει απομονωθεί και από *Lupinus albus* (Bednarek, *et al.*, 2001) (Katagiri, *et al.,* 2000) στο παρελθόν. Ο μεταβολίτης LAM9 μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί από την *Tecomella undulata* (Laghari, *et al.,* 2013) και έχει εντοπιστεί στο είδος *Lupinus reflexus* (Stobiecki, *et al.,* 2010) κατά τη μελέτη του φυτοχημικού του προφίλ.

4.3.7 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM)

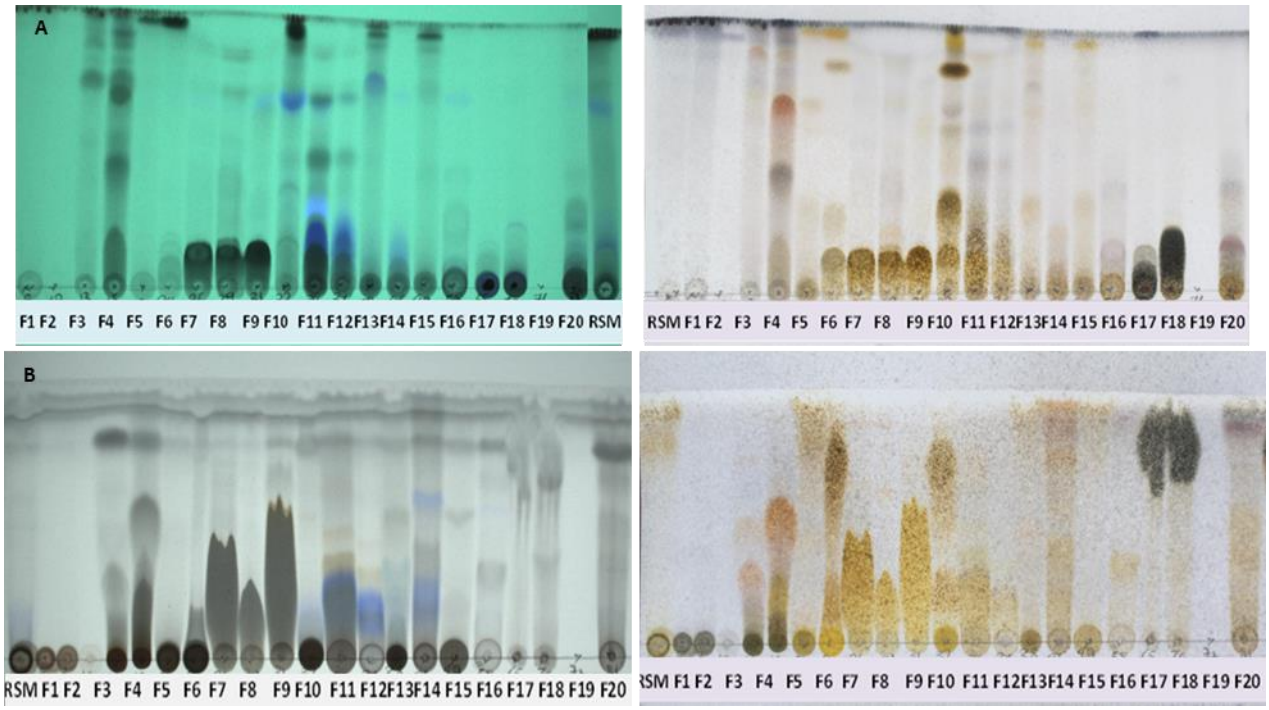
Με σκοπό την την κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM), αποφασίστηκε η χρήση του διφασικού 8G με βάση την κατανομή των περιεχόμενων συστατικών στις δύο φάσεις. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με δυνατότητα διοχέτευσης του διαλύτη μέχρι 24 ml/min και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 8g, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη,

όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη σε 'ascending mode' με ροή 10-15 ml/min και ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min, ενώ μετά την εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του δείγματος. Στη συνέχεια, παραλήφθηκαν 115 κλάσματα των 30ml (έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες) και ακολούθως έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν συνολικά 138 κλάσματα, εκ των οποίων τα 115 συλλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων συλλέχτηκαν επιπλέον 23 κλάσματα.

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC τόσο κανονικής φάσης σε συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και 90/10, όσο και αντίστροφης φάσης σε σύστημα H_2O/ACN 70/30, πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 20 κλάσματα (Πίνακας 98). Στην εικόνα 111 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με TLC κανονικής φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH 90/10 καθώς και σε TLC αντίστροφης φάσης H_2O/ACN 70/30. Τα συνενωμένα κλάσματα ελέγχθηκαν επίσης και σε TLC κανονικής φάσης σε συστήματα CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και EtOAc/MeOH/H_2O/FA 52/5/9/1

Πίνακας 98: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RSM

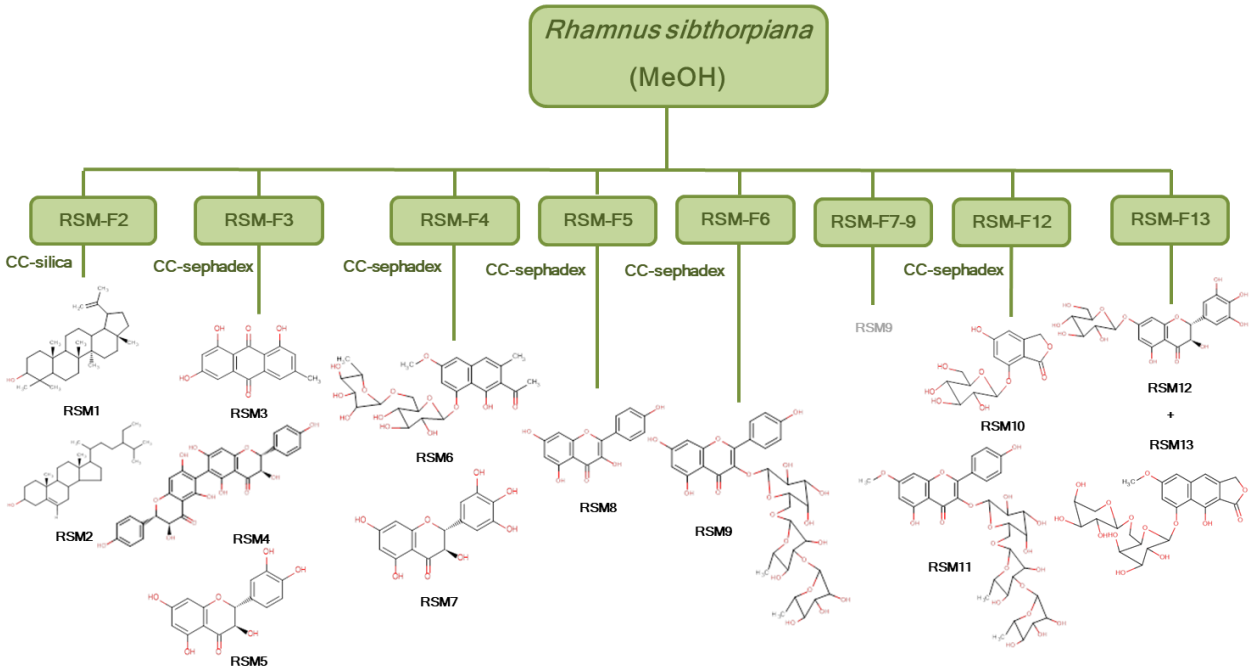
Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
RSM-F1	7-9	34	**RSM-F11**	34-36	154
RSM-F2	10-12	500	RSM-F12	37	105
RSM-F3	13-14	158	RSM-F13	38-44	160
RSM-F4	15-21	484	**RSM-F14**	45-48	145
RSM-F5	22-23	160	**RSM-F15**	49-57	99
RSM-F6	24-25	980	**RSM-F16**	58-64	68
RSM-F7	26-28	1	**RSM-F17**	65-73	2.5
RSM-F8	29-30	120	**RSM-F18**	74-76	781
RSM-F9	31	476	**RSM-F19**	77-79	112
RSM-F10	32-33	200	**RSM-F20**	81-83	12



Εικόνα 111: Χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων του RSM σε (A): κανονική πλάκα σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (80/20) και (B): σε αντίστροφη πλάκα σε σύστημα ανάπτυξης H2O/ACN (70/30)

4.3.7.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος RSM

Από τα 20 προαναφερόμενα κλάσματα που προέκυψαν μετά από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* με την τεχνική του FCPC, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη 8 κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών με αποτέλεσμα να καταλήξουμε στην απομόνωση 13 μεταβολιτών. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία απομόνωσης των συστατικών του εκχυλίσματος RSM.



Σχήμα 8: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana*(RSM)

4.3.7.1.1 Μελέτη του κλάματος RSM-F2

Το κλάσμα RSM-F2 υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης (CC1) με στατική φάση γέλη πυριτίου (silica gel 40-60μm) και κινητή φάση μίγμα c-Hex/EtOAC συνεχώς αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά συλλέχθηκαν 360 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν σε 20 τελικά κλάσματα, από τα οποία απομονώθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **Λουπεόλη (RSM1)**

Η φασματοσκοπική μελέτη των κλασμάτων CC1_36-39, τα οποία ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι περιέχουν απομονωμένο ένα δευτερογενή μεταβολίτη, αποκάλυψε πως πρόκειται για το τριτερπένιο λουπεόλη. Η λουπεόλη αναφορικά με το γένος *Rhamnus* έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα μόνο από τα είδη *Rhamnus wightii* (Pepalla, *et al.,* 1991) και *Rhamnus nipalensis* (Singh, *et al*., 2008) ενώ στην παρούσα εργασία έχει απομονωθεί από το είδος *Ceratonia siliqua* και περιφράφεται αναλυτικά στην § 4.3.4.1.1, (CSM1).

- ***β*-Σιτοστερόλη (RSM2)**

Ο επόμενος μεταβολίτης, ο οποίος ήταν απομονωμένος στα κλάσματα CC1_71-78, μετά από τη μελέτη των φασμάτων NMR ταυτοποιήθηκε ως *β*-σιτοστερόλη. Πρόκειται για ένα πολύ κοινό μεταβολίτη της κατηγορίας των φυτοστερολών, ο οποίος στο παρελθόν έχει απομονωθεί μεταξύ άλλων από τα *Rhamnus wightii* (Pepalla, *et al*., 1991) και *Rhamnus formosana (Lin, et al*., 1990). Δεδομένου ότι ο εν λόγω μεταβολίτης έχει απομονωθεί στην παρούσα εργασία από άλλα μελετούμενα φυτικά εκχυλίσματα (*C. villosus, C.siliqua, L.albus*) τα φασματοσκοπικά και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του περιγράφονται στην § 4.3.2.1 (CVM1).

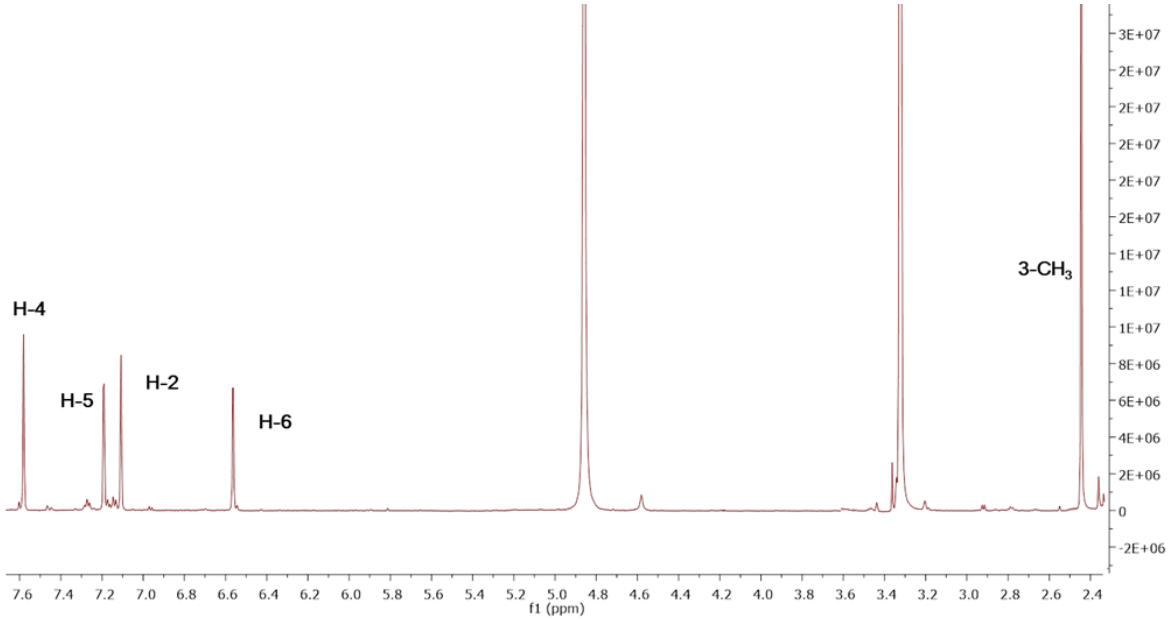
4.3.7.1.2 Μελέτη του κλάσματος RSM-F3

Το κλάσμα RSM-F3 υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη και δύο από τα προκύπτοντα κλάσματα επεξεργάστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική TLC σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 90/10, απ' όπου απομονώθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **Εμοδίνη (RSM3)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι ο μεταβολίτης RSM3 παρουσίασε έντονη κιτρινοπορτοκαλί απορρόφηση στα 254 και 366nm, ενώ έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης έδωσε πορτοκαλί χρώση.

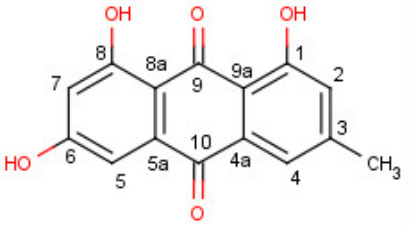
Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την εμοδίνη η οποία ανήκει στην



Εικόνα 112: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM3

κατηγορία των ανθρακινονών. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H-NMR (εικόνα 112) παρατηρούμε δύο ευρείες απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-4 του δακτυλίου A, τα οποία στο φάσμα HMBC εμφανίζουν σύζευξη με τον άνθρακα στα 21.9 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 3 του βασικού σκελετού. Οι δύο διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz) στα 7.19 και 6.55 ppm αντιστοιχούν στα H-5 και H-7 του C δακτυλίου, ενώ στο φάσμα HMBC φαίνονται οι συζεύξεις ^3J των πρωτονίων H-5 και H-4 με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 183.5 ppm (C-10). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), αναφέρονται στον πίνακα 99 και είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Kuo, *et al.*, 1990) (Wei, *et al.,* 2013).

Πίνακας 99: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM3

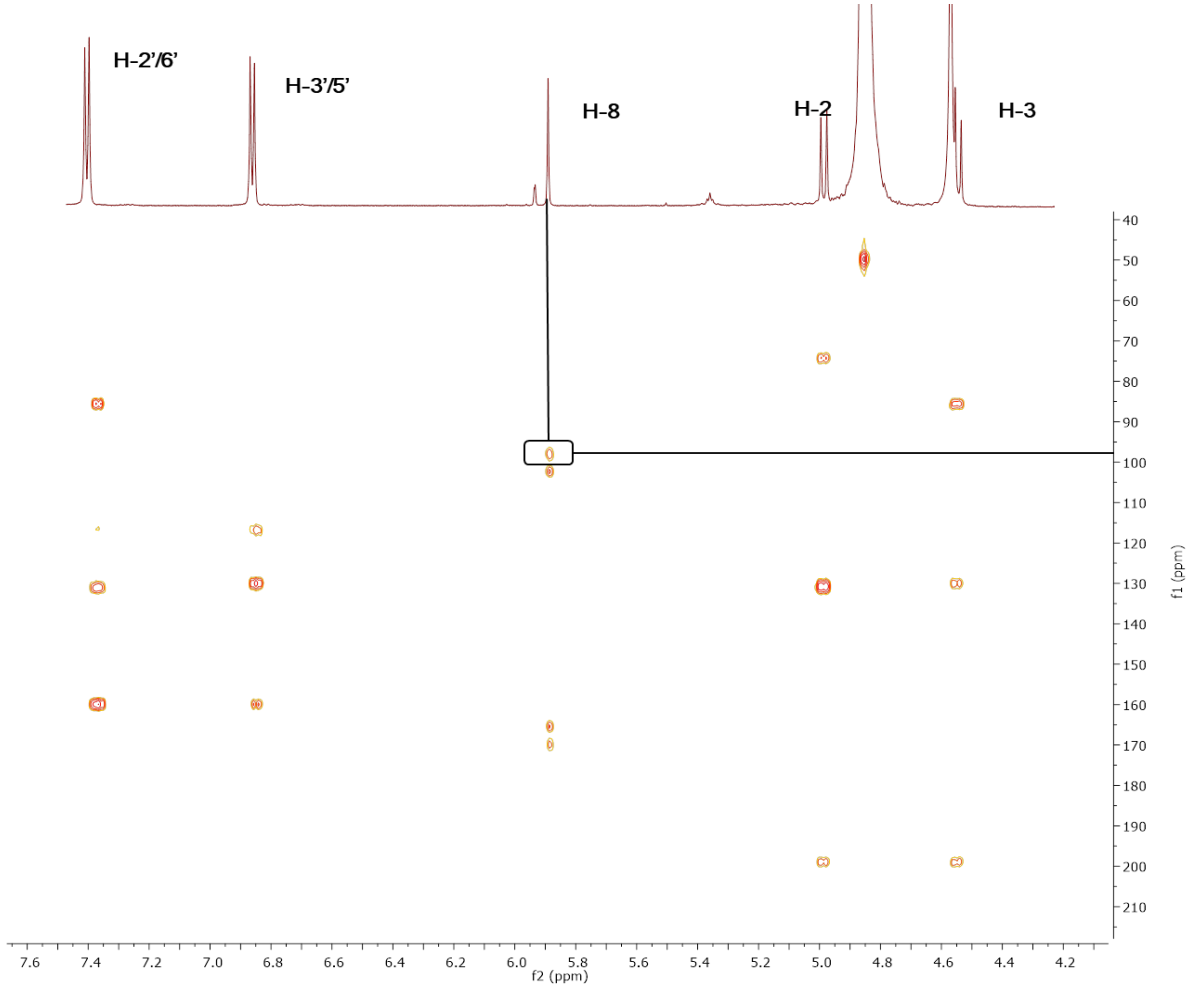
RSM3 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** ***δ*** **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** ***δ*** **σε ppm**
1	-	163.2
2	7.11 (1H, brs)	125.0
3	-	149.5
4	7.58 (1H, brs)	121.7
4a	-	133.2
5	7.19 (1H, d, 2.0)	110.4
5a	-	136.3
6	-	167.3
7	6.55 (1H, d, 2.0)	108.9
8	-	162.0
8a	-	110.3
9	-	191.0
9a	-	114.5
10	-	183.5
3-CH_3	2.45 (3H, s)	21.9

Η εμοδίνη αποτελεί έναν από τους χαρακτηριστικότερους μεταβολίτες των γενών *Rhamnus* (Gonçalves, e*t al.*, 2018) (Genovese, *et al.*, 2010) (Kosalec, *et al.,* 2013) και *Polygonum* (Feng, *et al.*, 2017) (Dong, *et al.,* 2017). Μελέτες αναφέρουν πως καταστέλλει την επαγόμενη από το κάδμιο οστεοπόρωση αναστέλλοντας το σχηματισμό των οστεοκλαστών (Chen, *et al.*, 2017) εμποδίζει την οστική απορρόφηση έπειτα από LPS επαγόμενη οστεοπόρωση σε μοντέλλο ποντικών (Kang, *et al.*, 2014), ενώ αυξάνει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση ενεργοποιώντας την PI3K και την έκφραση της BMP-2 (Lee, *et al.*, 2008). Θεωρείται αξιόλογος αντικαρκινικός παράγοντας καθώς συνδυάζει αντιγλεγμονώδη δράση και αντιαγγειογενετικές ιδιότητες (Hsu, *et al.*, 2012), ενώ πρόσφατα έχει αναφερθεί η ικανότητά της να προκαλεί χημειευαισθητοποίηση έναντι πολλών τύπων καρκίνου (Gupta, *et al.*, 2018). Επιπλέον, αναστέλλει τη μελανογένεση προσφέροντας νευροπροστασία (Ahn, *et al.*, 2016), ενώ θεωρείται και αξιόλογος αντιδιαβητικός παράγοντας (Bae, e*t al.,* 2015).

❖ **6,6'-Δισαρωμαδενδρίνη (RSM4)**

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι ο μεταβολίτης RSM4 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 και 366nm, ενώ έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης έδωσε κόκκινη χρώση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM4 παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα δεδομένα του φλαβανονόλης αρωμαδενδρίνη. Πιο συγκεκριμένα, στα 4.99 και 4.56 ppm του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 113) εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 11.8 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-3 των δακτυλίων C των δύο μονομερών της ταξιφολίνης. Επίσης, σε *δ* 7.37 και 6.85 συντονίζονται τα αρωματικά

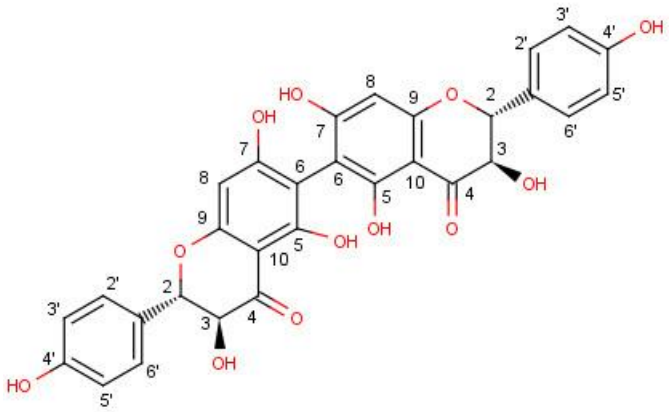
πρωτόνια των δακτυλίων C των δύο μονομερών ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 8.4 Hz. Σε αντίθεση με το αντίστοιχο φάσμα της αρωμαδενδρίνης, στην περίπτωση του μεταβολίτη RSM4 εμφανίζεται μόνο το αρωματικό πρωτόνιο της θάσης C-8 του δακτυλίου A ως απλή κορυφή στα 5.89 ppm, καθώς στη θέση C-6 γίνεται η σύνδεση των δύο μονομερών μεταξύ τους. Μάλιστα, στο φάσμα HMBC (εικόνα 113) είναι εμφανής η ^{3}J αλληλεπίδραση του άνθρακα C-6 (δ 98.2) με το πρωτόνιο H-8 (δ 5.89) του κάθε μονομερούς.



Εικόνα 113: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBCτης ένωσης RSM4

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM4, τα οποία αποδόθηκαν με βάση τα φάσματα 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), παρατίθενται στον πίνακα 100.

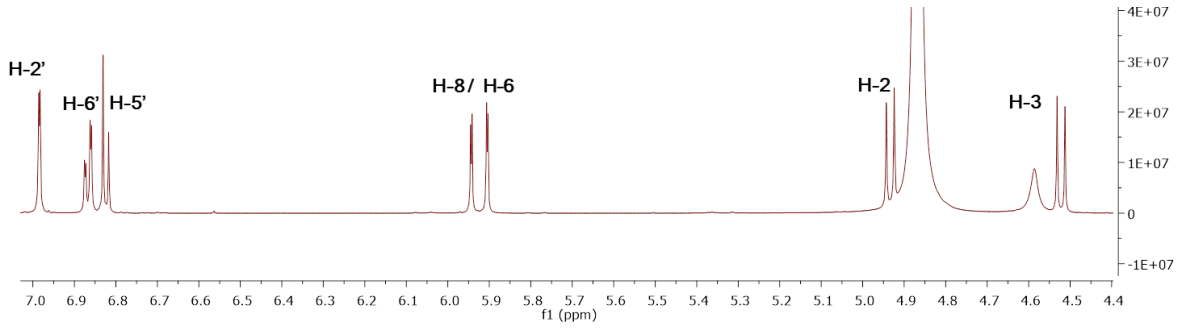
Πίνακας 100: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM4

RSM4 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ σε ppm (J σε Hz)	**^{13} C NMR** δ σε ppm
2	4.99 (2H, d, 11.8)	85.3
3	4.56 (2H, d, 11.8)	73.9
4	-	198.8
5	-	165.3
6	-	98.2
7	-	169.7
8	5.94 (2H, s)	96.6
9	-	165.6
10	-	101.7
1’	-	129.5
2’/6’	7.37 (4H, d, 8.4)	130.7
3’/5’	6.85 (4H, d, 8.4)	116.4
4’		159.9

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από άλλη φυσική πηγή και αποτελεί **νέο φυσικό προϊόν.**

❖ (2R, 3R)-Ταξιφολίνη (RSM5)

Στον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC ο μεταβολίτης RSM5 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε κόκκινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την ταξιφολίνη.



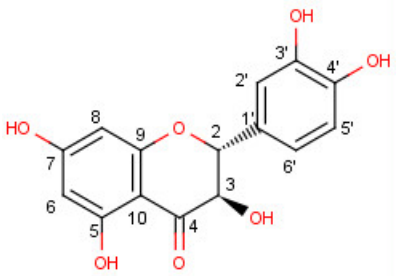
Εικόνα 114: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM5

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόννα 114) εμφανίζονται μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz (δ 6.98), μία διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.0 και 2.0 Hz (δ 6.87) και μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.0 Hz (δ 6.82), οι οποίες

αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2', H-6' και H-5' του δακτυλίου B. Επιπλέον, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H-6 (δ 5.90) και H-8 (δ 5.94) του δακτυλίου A, τα οποία εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz, είναι σε συμφωνία με την απουσία διπλού δεσμού στις θέσεις 2 και 3 του βασικού σκελετού του φλαβονοειδούς. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συναντάμε δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και εμφανίζουν σταθερά σύζευξης J = 11.5 Hz. Η συγκεκριμένη σύζευξη υποδηλώνει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων H-2 και H-3 και μετά από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα αποφασίσθηκε η 2R, 3R-στερεχημεία του μεταβολίτη (Xu, *et al.*, 2013) (Saejueng, *et al.*, 2015). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρατίθενται στον πίνακα 101.

Πίνακας 101: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM5

RSM5 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	4.93 (1H, d, 11.5)	85.0
3	4.52 (1H, d, 11.5)	73.6
4	-	198.2
5	-	165.1
6	5.90 (1H, d, 2.0)	97.2
7	-	168.5
8	5.94 (1H, d, 2.0)	96.1
9	-	164.3
10	-	101.5
1'	-	129.7
2'	6.98 (1H, d, 2.0)	115.8
3'	-	146.8
4'		146.9
5'	6.82 (1H, d, 8.0)	116.0
6'	6.87 (1H, dd, 8.0 / 2.0)	102.9

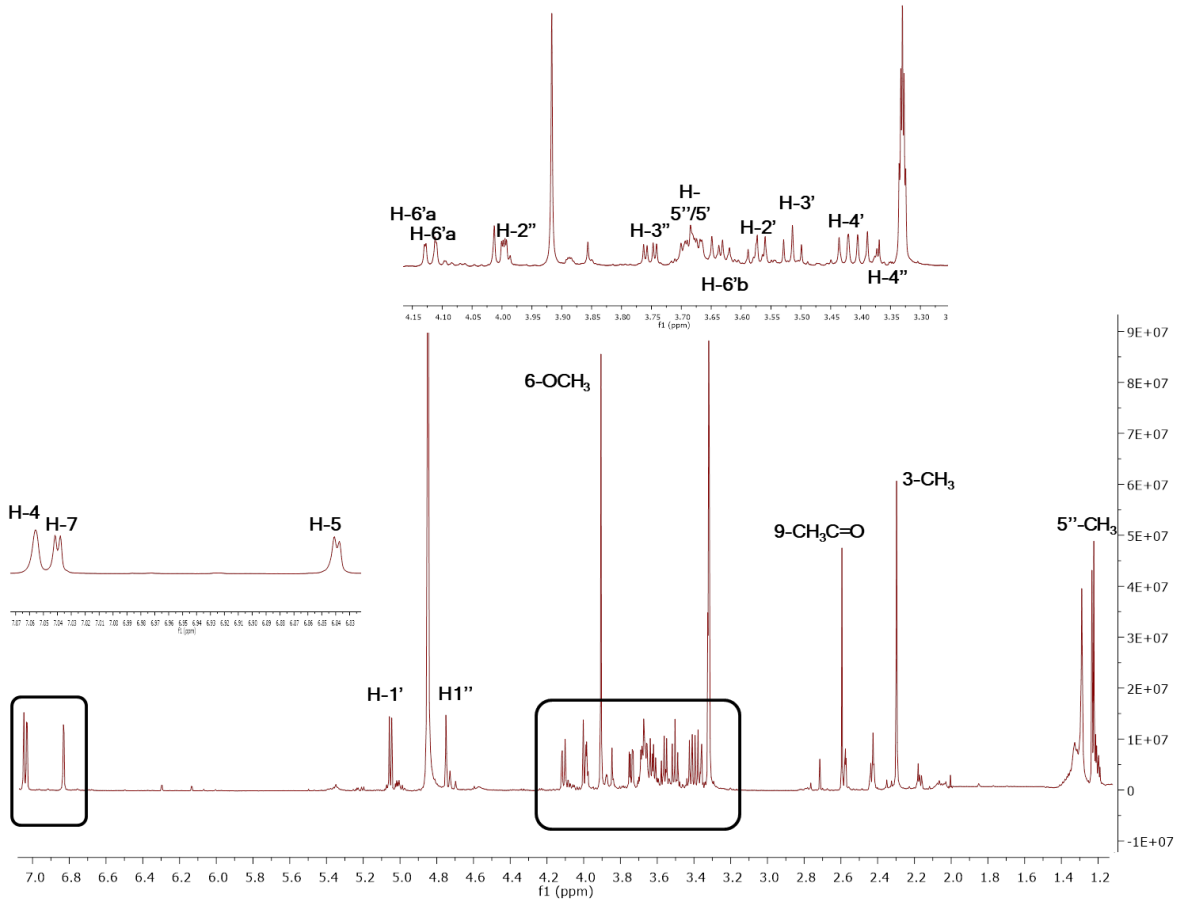
Η ταξιφολίνη έχει απομονωθεί από πλήθος φυτικών ειδών (Xu, *et al.*, 2013) (Gabaston, *et al.,* 2017) καθώς και από είδη του γένους *Rhamnus* (Chen, *et al.,* 2016) (Marzouk, *et al.*, 1999). Μελέτες έχουν δείξει ότι διαθέτει αξιόλογη κυτταροτοξική (Makena, *et al.,* 2007) και αντιοξειδωτική δράση (Crespo, *et al.*, 2008), ενώ έχει αναφερθεί ότι ευνοεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 και καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση στην κυτταρική σειρά RAW264 (MarArriero, *et al.*, 2013).

4.3.7.1.3 Μελέτη του κλάσματος RSM-F4

Με σκοπό την παραλαβή των δύο κύριων μεταβολιτών του κλάσματος εφαρμόστηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη. Με την προαναφερόμενη διαδικασία απομονώθηκαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

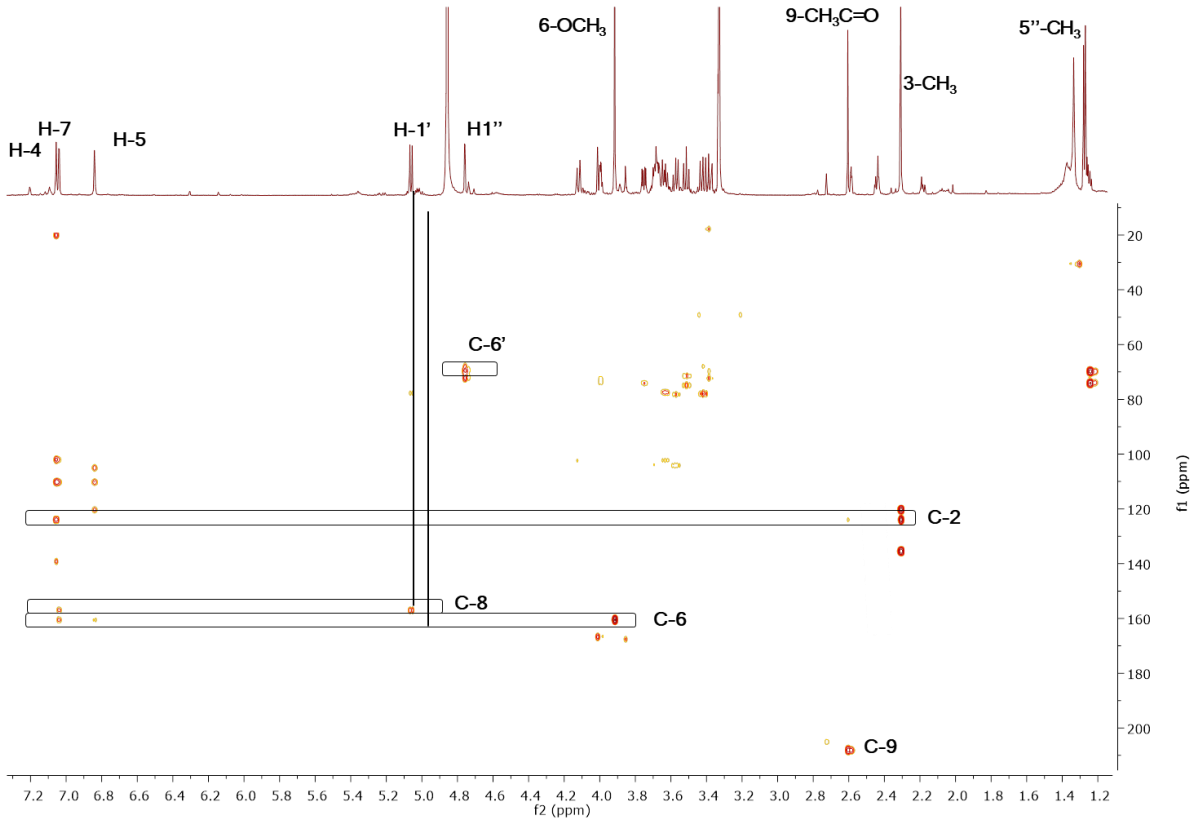
❖ **8-*O*- ραμνοπυρανοσυλο-(1->6)-γλυκοπυρανοσίδης της τοραχρυσόνης (RSM6)**

Ο μεταβολίτης RSM6 παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm και έπειτα από την εμφάνιση με θεϊική βανιλλίνη έδωσε γκρι χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για ένα δισακχαριδικό παράγωγο της τοραχρυσόνης, και πιο συγκεκριμένα για τον 8-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-(1->6)-γλυκοπυρανοσίδη της τοραχρυσόνης.



Εικόνα 115: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM6

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 115) παρατηρείται σε δ7.07 ppm η απλή κορυφή του H-4, ενώ στα 7.05 και 6.85 ppm εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz) των πρωτονίων H-7 και H-5.

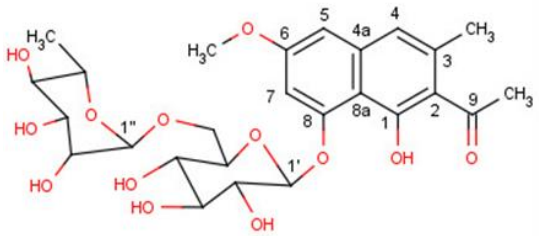


Εικόνα 116: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης RSM6

Τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας, τα οποία εμφανίζονται ως απλή κορυφή στα 3.92 ppm, παρουσιάζουν στο φάσμα HMBC (εικόνα 116) σύζευξη ^{3}J με τον οξυγονωμένο άνθρακα στα 160.5 ppm (C-6), ο οποίος επίσης συζεύγνυται με τα πρωτόνια H-7 και H-5. Επίσης, στο προαναφερόμενο φάσμα φαίνονται οι συζεύξεις των πρωτονίων της μεθυλομάδας (δ 2.32) της θέσης C-3 και του πρωτονίου H-4 με τον άνθρακα C-2 στα 123.8 ppm. Η απλή κορυφή σε δ 2.61 ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια, παρουσιάζει σύζευξη με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 208.3 ppm και αντιστοιχεί στο ακετύλιο της θέσης C-2. Στα 5.07 ppm συναντάμε το ανωμερικό πρωτόνιο γλυκόζης, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 7.8 Hz, υποδηλώνοντας τη β-διαμόρφωση του σακχάρου. Στο φάσμα HMBC φαίνεται η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόσης με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα σε δ 156.8, φανερώνοντας τη σύνδεση του σακχάρου στη θέση C-8 του βασικού σκελετού. Τα χαρακτηριστικά πρωτόνια του μεθυλενίου της της γλυκόσης (H-6'a, H-6'b) συντονίζονται στα 4.13 και 3.63 ppm και είναι ελαφρώς αποθωρακισμένα, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 67.8 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο στα 4.76 ppm (d, J = 1.6 Hz) και η διπλή κορυφή (J = 6.3 Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια συνάδουν με την παρουσία ραμνόσης. Από το φάσμαα HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης με τον μεθυλενικό άνθρακα της γλυκόσης, η οποία φανερώνει τη σύνδεση της ραμνόσης στη θέση C-6' της γλυκόσης. Τα υπόλοιπα σακχαριδικά πρωτόνια, τα οποία ταυτοποίηθηκαν κυρίως με τη βοήθεια του φάσματος COSY, συντονίζονται στην οξυγωνομένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στην περιοχή 4.00 - 3.41 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του

μεταβολίτη αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρατίθενται στον πίνακα 102.

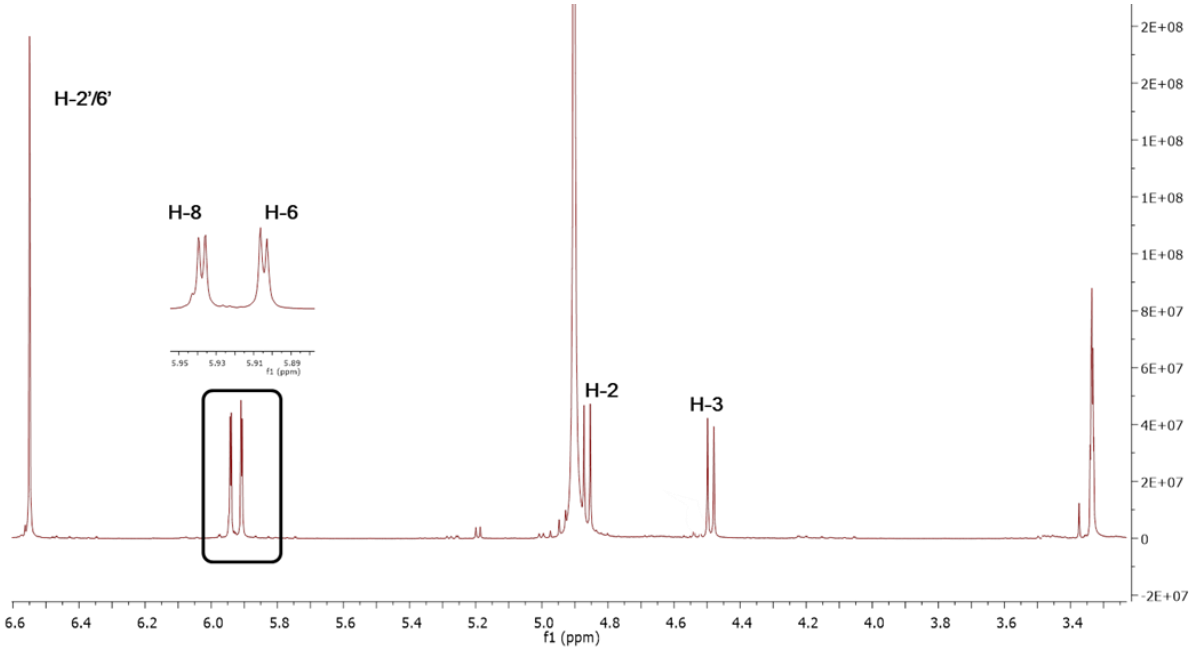
Πίνακας 102: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM6

RSM6 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** *δ* **σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR** *δ* **σε ppm**
1	-	149.6
2	-	123.8
3	-	135.3
4	7.07 (1H, brs)	120.4
4a		135.9
5	6.85 (1H, d, 2.0)	102.6
6	-	160.5
7	7.05 (1H, d, 2.0)	104,9
8	-	156.8
8a		110.1
9	-	208.3
6-OCH_3	3.92 (3H, s)	56.2
3-CH_3	2.32 (3H, s)	19.9
CH_3CO	2.61 (3H, s)	32.4
8-*O*-*β*-γλυκοπυρανόση		
1’	5.07 (1H, d, 7.8)	104.2
2’	3.57 (1H, *)	75.0
3’	3.51(1H, t, 9.9)	78.4
4’	3.41 (1H, t, 9.9)	71.5
5’	3.65 (1H, *)	77.5
6’a	4,13 (1H, dd, 11.0 / 1.6)	67.8
6’b	3,63 (1H, *)	
6’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’	4.76 (1H, d, 1.6)	102.3
2’’	4.00 (1H, dd, 3.5 / 1.6)	72.0
3’’	3.76 (1H, dd, 9.8 / 3.5)	76.4
4’’	3.39 (1H, *)	74.1
5’’	3.67 (1H, *)	69.8
6’’	1.25 (3H, d, 6.3)	17.9

Η γενίνη τοραχρυσόνη (torachrysone) έχει απομονωθεί μόνο από είδη του γένους *Rumex* (Liang, *et al.*, 2010) (Jiang, *et al.,* 2007) και το είδος *Senna longiracemosa* (Alemayehu, *et al.*, 1993), ενώ χαρακτηρίζεται από σημαντική αντι-οιστρογόνο δράση (El-Halawany, *et al.*, 2007). Το 8-*O*- γλυκοσιδικό παράγωγό της, το οποίο έχει απομονωθεί από είδη των γενών *Rheum* (Fei, *et al.*, 2017) (Ah Reum, *et al.*, 2016), *Rumex* (Liang, *et al.*, 2010) και *Polygonum* (Zhao, *et al.*, 2017) (Sun, *et al.*, 2015), φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη τριχοφυΐας (Sun, *et al.,* 2013). Μέχρι σήμερα ο μεταβολίτης RSM6 **δεν έχει απομονωθεί από άλλη φυσική πηγή και επομένως αποτελεί νέο φυσικό προϊόν**.

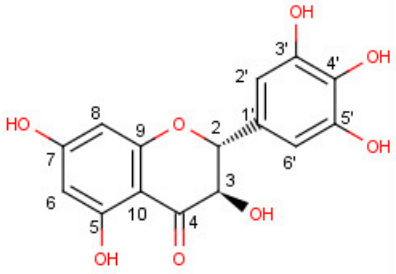
❖ **Αμπελοψίνη (RSM7)**

Ο μεταβολίτης RSM7 εμφάνισε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε κόκκινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης, ενώ η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για τη (2R, 3R)-διυδρομυρικετίνη ή αμπελοψίνη. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 117, τα H-8 και H-6 του δακτυλίου A συντονίζονται στα 5.93 και 5.90 ppm ως d κορυφές με J = 2.0 Hz, ενώ τα H-2'/6' εμφανίζονται ως μια κοινή απλή κορυφή λόγω συμμετρίας στα 6.55 ppm. Τα H-2 και H-3 συντονίζονται στα 4.86 και 4.48 ppm με τη μορφή διπλών κορυφών και J = 11.4 Hz, δηλώνοντας την *trans* διαμόρφωσή τους και κατ' επέκταση την (2R, 3R) στερεοχημεία του δακτυλίου B και της υδροξυλομάδας στη θέση 3. Η συγκεκριμένη διαμόρφωση του μεταβολίτη άλλωστε είναι κυρίαρχη στη φύση. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον πίνακα 103.



Εικόνα 117: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM7

Πίνακας 103: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM7

RSM7 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
2	4.86 (1H, d, 11.4)	84.0
3	4.48 (1H, d, 11.4)	73.0
4	-	198.0
5	-	163.2
6	5.90 (1H, d, 2.0)	94.9
7	-	162.7
8	5.93 (1H, d, 2.0)	95.9
9	-	163.9
10	-	100.4
1’	-	128.1
2’/6’	6.55 (2H, s)	106.7
3’/5’	-	134.9
4’	-	145.9

Η αμπελοψίνη έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Limonium* (Jenis, *et al.*, 2017) (Gadetskaya, *et al.*, 2015) και *Rhododendron* (Wang, *et al.,* 2012) (Jin, e*t al.*, 2009), το *Rhamnus davurica* (Chen, *et al.*, 2017) και το *Ampelopsis grossedentata* (Xin, *et al.,* 2015) του οποίο αποτελεί κυρίαρχο μεταβολίτη και από το οποίο πήρε και το όνομά του. Ανάμεσα στις βιολογικές δράσεις του είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης (Hou, *et al.*, 2015) (Li, *et al.,* 2015), η ηπατοπροστατευτική και η καρδιοπροστατευτική (Chen, *et al.*, 2016) (Liu, *et al.*, 2016). Επίσης, φάνηκε ικανή να αναστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία *in vitro,* στην κυτταρική σειρά RAW264.7 και BMMCs μέσω διαφόρων μονοπατιών και αντιφλεγμονοδών μηχανισμών, καθώς και την οστική απώλεια σε ωστεοπορωτικό μοντέλο ωοθηκεκτομηθένων ποντικών (Zhao, *et al.,* 2017).

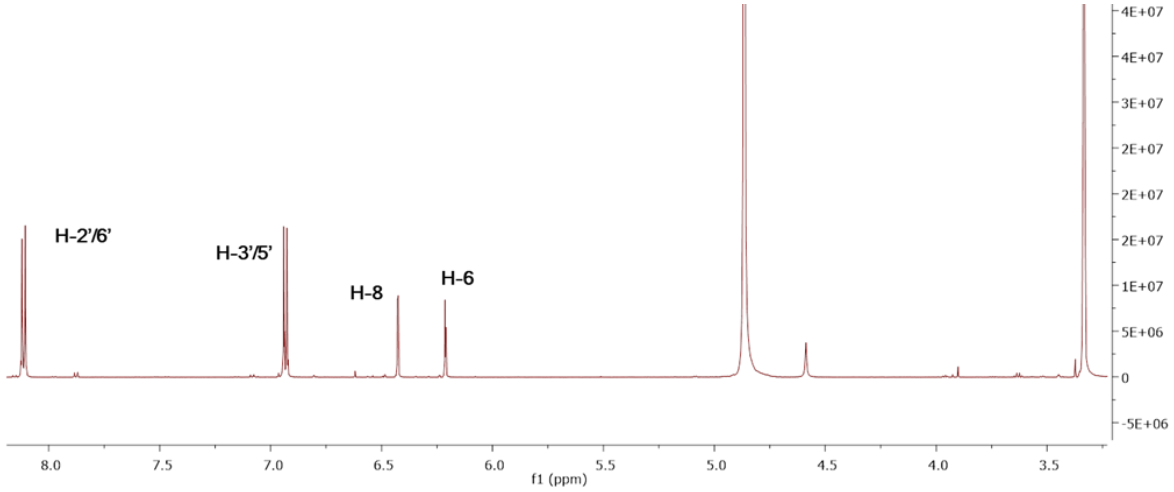
4.3.7.1.4 Μελέτη του κλάσματος RSM-F5

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος RSM-F5 έδειξε ότι περιέχεται ένας κύριος μεταβολίτης σε πολύ υψηλή καθαρότητα, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε έντονη κίτρινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θεϊικής βανιλλίνης.

❖ **Καιμπφερόλη (RSM8)**

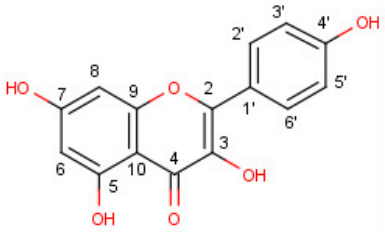
Με βάση τα δεδομένα του φασματοσκοπικού ελέγχου, ο οποίος πραγματοποιήθηκε στο προαναφερόμενο κλάσμα, διαπιστώθηκε ότι ο περιεχόμενος μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία

των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα ότι πρόκειται για τη φλαβονόλη καιμπφερόλη. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ^{1}H-NMR (Εικόνα 118) εμφανίζονται σε δ 8.11 και 6.93 δύο διπλές κορυφές (J = 8.9 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5'. Επίσης, τα πρωτόνια H-6 και H-8 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz στα 6.20 και 6.43 ppm, αντίστοιχα. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Liu, *et al.*, 2012) και παρουσιάζονται στον πίνακα 104.



Εικόνα 118: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM8

Πίνακας 104: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM8

RSM8 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** δ **σε ppm (**J **σε Hz)**	**^{13} C NMR** δ **σε ppm**
2	-	159.2
3	-	146.5
4	-	174.4
5	-	161.4
6	6.20 (1H, d, 2.0)	100.1
7	-	163.9
8	6.43 (1H, d, 2.0)	95.2
9	-	157.1
10	-	103.4
1'	-	122.4
2'/6'	8.11 (2H, d, 8.9)	131.7
3'/5'	6.93 (2H, d, 8.9)	116.8
4'	-	147.8

Η καιμπφερόλη έχει απομονωθεί από πολυάριθμες φυτικές πηγές, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται είδη του γένους *Rhamnus* (Chen, *et al.*, 2016) (Moussi, *et al.,* 2015) (Marzouk,

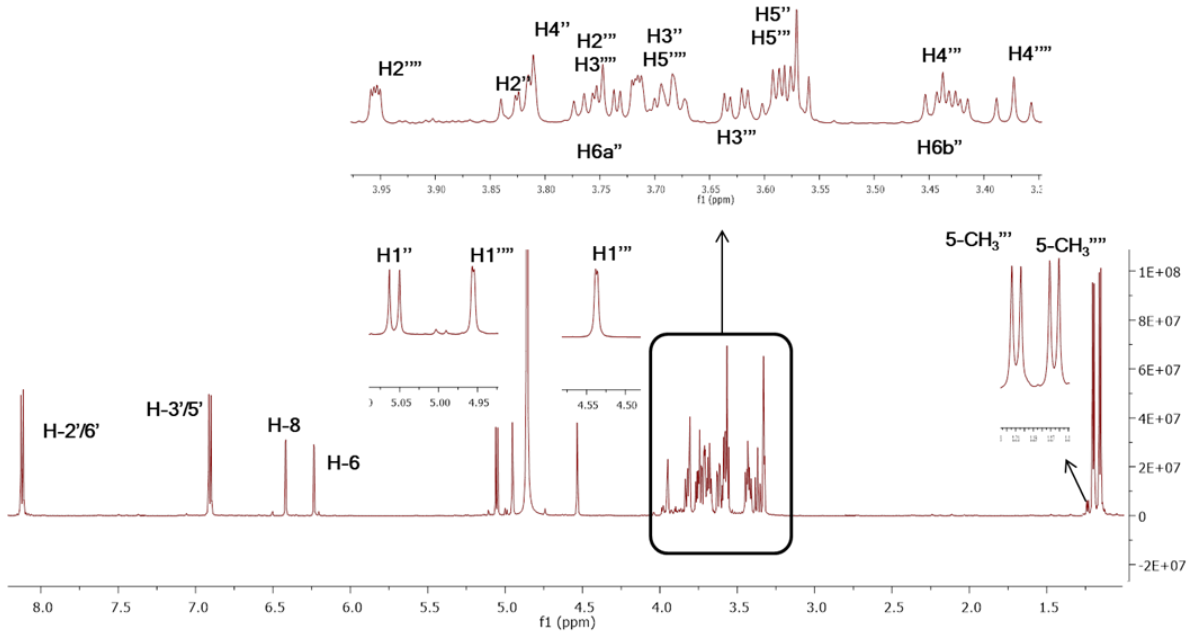
et al., 1999). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι διαθέτει αξιόλογες βιολογικές δράσεις, όπως η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αντιαλλεργική, η αντικαρκινική (Calderon Montano, 2011) και η αντιφλεγμονώδης (Basu, *et al.*, 2017), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιαζει η οστεοπροστατευτική ικανότητά της. Μελέτες αποδεικνύουν πως επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Khedgikar, *et al.*, 2016) (Choi, 2011) (Byun, *et al.*, 2012) (Mazaki, *et al.,* 2014) και αναστέλλει την οστική απορρόφηση (Wattel, *et al.*, 2003), ενώ η οστεογενετική της ικανότητα έχει επιβεβαιωθεί και με *in vivo* πειράματα (Nowak, *et al.*, 2017) (Kumar, et al., 2012).

4.3.7.1.5 Μελέτη του κλάσματος RSM-F6

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος RSM-F6 έδειξε ότι περιέχονται δύο κύριοι μεταβολίτες, από τους οποίους ο πιο άπολος είναι η καιμπφερόλη και ο πιο πολικός ένα τρισακχαριδικό παράγωγό της. Έτσι, με σκοπό την παραλαβή του τελευταίου το κλάσμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης MeOH. Με την προαναφερόμενη διαδικασία επιτεύχθηκε η απομόνωση του μεταβολίτη RSM9.

❖ **3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)- καιμπφερόλη (RSM9)**

Η φασματοσκοπική μελέτη του μεταβολίτη RSM9 έδειξε ότι πρόκριται για ένα παράγωγο καιμπφερόλης το οποίο φέρει τρεις μονάδες σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (Εικόνα 119) παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα της γενίνης.



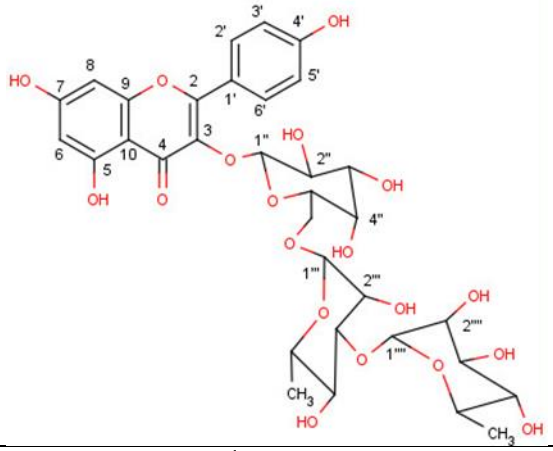
Εικόνα 119: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM9

Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζονται σε *δ* 8.13 και 6.91 δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.9 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H-2'/H-6'

και H-3'/H-5'. Επίσης, τα πρωτόνια H-6 και H-8 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.2 Hz στα 6.25 και 6.43 ppm, αντίστοιχα. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή ενοπίζονται τρεις κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και παραπέμπουν σε ανωμερικά πρωτονία σακχάρων. Πιο συγκεκριμένα στα 5.06 ppm συντονίζεται μια διπλή κορυφή με J = 7.7 Hz και ανωμερικό άνθρακα στα 105.6 ppm. Από το φάσμα HSQC-DEPT παρατηρούμε την ύπαρξη χαρακτηριστικής μεθυλενομάδας με άνθρακα στα 67.4 ppm και πρωτόνια στα 3.42 και 3.75 ppm, η οποία αντιστοιχεί στη θέση C-6'' της εξόσης. Με τη βοήθεια του φάσματος COSY προσδιορίστηκαν τα υπόλοιπα πρωτόνια της εξόσης και από τη μορφή του πρωτονίου H-4'' συμπεράναμε αφενός την ισημερινή διευθέτησή του και αφετέρου το γεγονός ότι πρόκειται για γαλακτοπυρανόση. Στο φάσμα HMBC παρατηρήθηκε σύζευξη του H-1'' με οξυγονωμένο άνθρακα στα 134.1 ppm, ο οποίος αντιστοιχεί στον C-3 της γενίνης, υποδεικνύοντας τη θέση σύνδεσης της γαλακτόσης στον σκελετό της καιμπφερόλης. Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο άλλων ανωμερικών πρωτονίων (δ 4.95 και 4.53) φανερώνουν πως δε συνδέονται απ' ευθείας με τη γενίνη καθώς στην περίπτωση αυτή θα αναμένονταν σε ελαφρώς χαμηλότερα πεδία. Το γεγονός ότι εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με J = 1.7 Hz, αλλά και η ύπαρξη δύο διπλών κορυφών (J = 6.6 Hz) που ολοκληρώνουν για τρια πρωτόνια παραπέμπουν στην ύπαρξη δύο μονάδων ραμνόσης. Η χημική μετατόπιση του C-6'' της γαλακτόσης υποδηλώνει ότι στη θέση αυτή συνδέεται η μία από τις άλλες δύο σακχαριδικές μονάδες, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC καθώς το H-1''' εμφανίζει σύζευξη με τον C-6'' στα 67.4 ppm. Ομοίως, το H-1'''' εμφανίζει σύζευξη με άνθρακα στα 79.5 ppm, ο οποίος αντιστοιχεί στον C-3''' της ραμνόσης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM9, τα οποία αποδόθηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), παρουσιάζονται στον πίνακα 105 και είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία (Satake, *et al.*, 1993) (Ozipek, *et al.*, 1994).

Πίνακας 105: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM9

RSM9 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	158.3
3	-	134.1
4	-	174.4
5	-	162.3
6	6.25 (1H, d, 2.2)	100.3
7	-	165.0
8	6.43 (1H, d, 2.2)	95.2
9		157.4
10	-	104.7
1’	-	121.9
2’/6’	8.13 (2H, d, 8.9)	133.0
3’/5’	6.91 (2H, d, 8.9)	116.7
4’	-	161.0
3-*O*-γαλακτοπυρανόση		
1’’	5.06 (1H, d, 7.7)	105.6
2’’	3.82 (1H, dd, 9.8 / 7.7)	73.0
3’’	3.69 (1H, dd, 9.8 / 3.5)	75.3
4’’	3.80 (1H, br s)	70.2
5’’	3.57 (1H, *)	75.0
6a’’	3.42 (1H, *)	67.4
6b’’	3.75 (1H, *)	67.4
6’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’	4.53 (1H, d, 1.7)	101.8
2’’’	3.73 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	72.2
3’’’	3.62 (1H, dd, 9.9 / 3.5)	79.5
4’’’	3.43 (1H, *)	73.0
5’’’	3.58 (1H, *)	70.0
6’’’	1.22 (3H, d, 6.6)	17.2
3’’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’’	4.95 (1H, d, 1.7)	104.7
2’’’’	3.95 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	72.0
3’’’’	3.73 (1H, dd, 9.9 / 3.5)	72.0
4’’’’	3.37 (1H, t, 9.9)	74.0
5’’’’	3.69 (1H, *)	69.9
6’’’’	1.17 (3H, d, 6.6)	17.2

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Η 3-O-(α-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-α-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)γαλακτοπυρανοσυλο)-καιμπφερόλη έχει απομονωθεί από τα είδη *Rhamnus petiolaris* (Ozipek, *et al*., 1994), *R. thymifolius* (Satake, *et al*., 1993), *R. disperma* (Marzouk, *et al*., 1999), *R. alaternus* (Riess-Mauer, *et al.,* 1982) και είδη του γένους *Actinidia* (Lu, *et al.,* 2010) (Syed, *et al*., 2017). Το σακχαριδικό

του τμήμα είναι χαρακτηριστικό του γένους *Rhamnus*, καθώς ανάλογά του με διάφορες γενίνες απαντώνται σε όλα τα είδη του γένους (Riess-Mauer, *et al.*, 1982) *(Cuoco, et al.*, 2014). Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης χαρακτηρίζεται για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση του και την προστασία έναντι γονιδιοτοξικότητας (Bhouri, *et al.*, 2012) (Bhouri, *et al.*, 2011).

4.3.7.1.6 Μελέτη των κλασμάτων RSM-F7-F8-F9

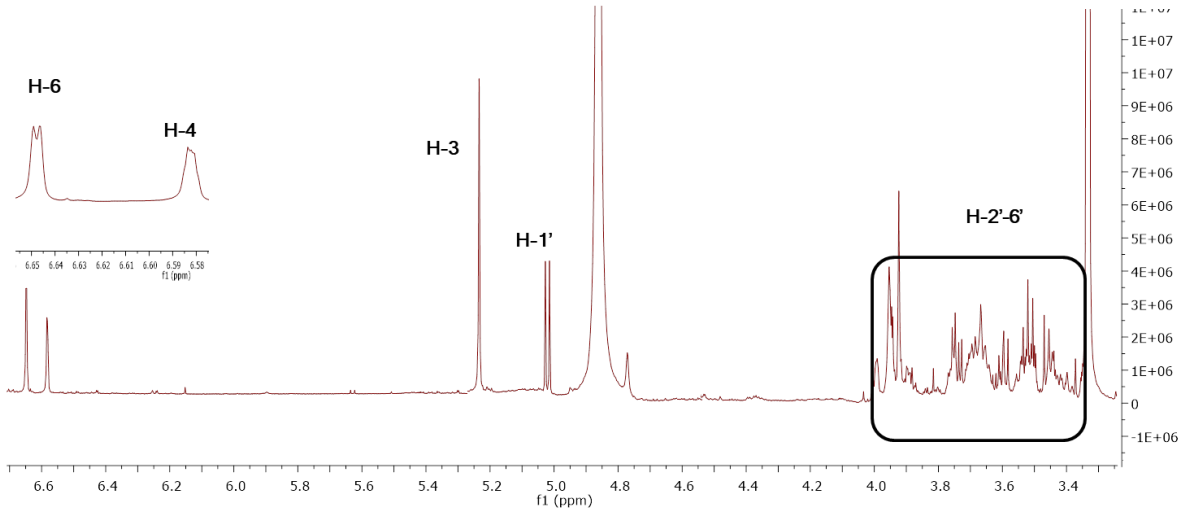
Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι τα κλάσματα RSM-F7, RSM-F8 και RSM-F9 περέχου κυρίως ένα μεταβολίτη, ο οποίος μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκε ως η 3-O-(α-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-α-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)γαλακτοπυρανοσυλο)-καιμπφερόλη, η οποία αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του εκχυλίσματος.

4.3.7.1.7 Μελέτη του κλάσματος RSM-F12

Το κλάσμα RSM-F12, το οποίο σύμφωνα με τον χρωματογραφικό έλεγχο φάνηκε να περιέχει μεταβολίτες που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης MeOH. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

❖ **7-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-5,7-διυδροξυισοβενζοφουραν-1(3H)-όνη (RSM10)**

Ο μεταβολίτης RSM10 παρουσίασε κυανή απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊικής βανιλλίνης έδωσε γκρι-καφέ χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την 7-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-5,7-διυδροξυισοβενζοφουραν-1 (3H)-όνη.



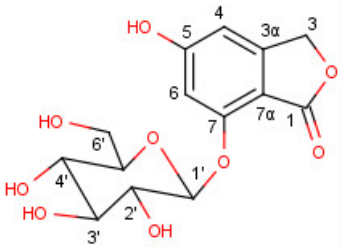
Εικόνα 120: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM10

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (Εικόνα 120), διακρίνουμε σε δ 6.65 και 6.58 δύο διπλές κορυφές (J = 1.6 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η

καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-4 του δακτυλίου A. Στα 5.23 ppm συντονίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και στο φάσμα HSQC αντιστοιχεί σε μεθυλενικό άνθρακα στα 70.5 ppm. Στο φάσμα HMBC παρατηρήσαμε ότι τα τόσο τα προαναφερόμενα μεθυλενικά πρωτόνια (H-3) όσο και τα πρωτόνια H-4 και το H-6 παρουσιάζουν σύζευξη με τον άνθρακα C-7a που συντονίζεται στα 105.5 ppm. Επίσης, το πρωτόνιο H-4 παρουσιάζει σύζευξη με τον μεθυλενικό άνθρακα C-3 στα 70.5 ppm, ενώ τα αντίστοιχα πρωτόνια (H-3) εμφανίζουν ^{3}J σύζευξη με τον καρβονυλικό άνθρακα της θέσης C-1 (δ 172.3). Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συντονίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο γλυκόσης σε δ 5.02 (d, J = 7.7 Hz), το οποίο στο φάσμα HMBC εμφανίζει σύζευξη με τον οξυγονωμένο άνθρακα C-7, υποδεικνύοντας τη θέση σύνδεσης του σακχάρου στο βασικό σκελετό. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM10, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρατίθενται στον πίνακα 106.

Πίνακας 106: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM10

RSM10 (MeOD)

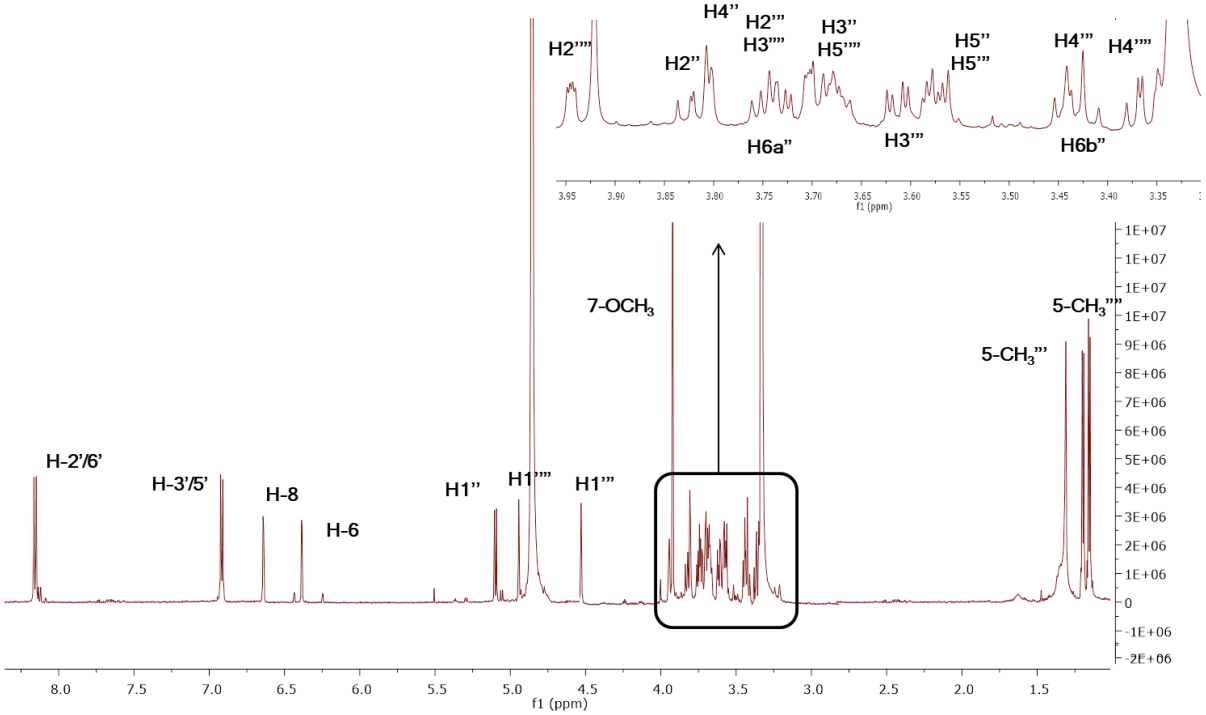


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	172.3
2	-	-
3	5.23 (2H, s)	70.5
3a	-	153.7
4	6.58 (1H. d, 1.6)	103.3
5	-	167.5
6	6.65 (1H, d, 1.6)	103.8
7	-	158.8
7a	-	105.5
	7 - *O*-γλυκοπυρανόση	
1’	5.02 (1H, d, 7.7)	101.8
2’	3.58 (1H, dd, 9.9 / 7.7)	74.2
3’	3.53 (1H, t, 9.9)	77.7
4’	3.44 (1H, t, 9.9)	71.0
5’	3.51 (1H, m)	78.2
6a’	3.93 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.4
6b’	3.74 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	

Ο μεταβολίτης RSM10 έχει απομονωθεί από τα είδη *Polygonum cuspidatum* (Yang, *et al.*, 2016), *Gnaphalium adnatum* (Zheng, *et al.*, 2014), *Helichrysum italicum* (D'Abrosca, *et al.*, 2013), *Helichrysum arenarium* (Morikawa, *et al.*, 2009), *Anaphalis lacteal* (Ren, *et al.,* 2008), ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από το γένος *Rhamnus.*

❖ **3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)- ραμνοσιτρίνη (RSM11)**

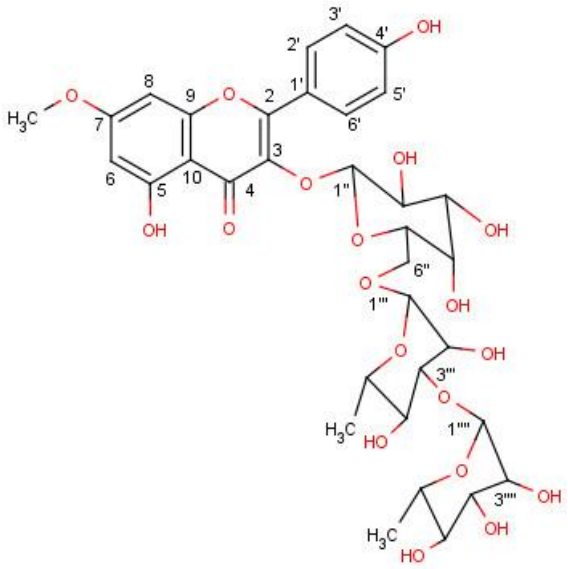
Ο μεταβολίτης RSM11 παρουσίασε παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τον RSM9. Όσον αφορά τα NMR φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών RSM9 και RSM11 παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα, ενώ οι κυριότερες διαφορές οφείλονται στην παρουσία μεθοξυλομάδας στη θέση C-7 του μεταβολίτη RSM11. Πιο συγκεκριμένα, στο ^{1}H-NMR (Εικόνα 121) παρατηρούμε ότι τα πρωτόνια H-6 (δ 6.39) και H-8 (δ 6.68) εμφανίζονται ελαφρώς αποθωρακισμένα κατά 0.2 ppm περίπου, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του μεταβολίτη RSM9, η οποία οφείλεται στη μεθυλίωση του υδροξυλίου της θέσης C-7. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζεται μια απλή κορυφή σε δ 3.92, η οποία ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσης C-7 του μεταβολίτη, ενώ στο φάσμα HMBC εμφανίζεται σύζευξη των προαναφερόμενων πρωτονίων με τον οξυγονωμένο άνθρακα C-7 στα 167.7 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM11, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Satake, *et al.,* 1993) και παρατίθενται στον πίνακα 107.



Εικόνα 121: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RSM11

Πίνακας 107: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM11

RSM11 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR *δ* σε ppm
2	-	158.3
3	-	134.1
4	-	174.4
5	-	162.3
6	6.39 (1H, d, 2.2)	100.3
7	-	167.7
8	6.68 (1H, d, 2.2)	95.2
9		157.4
10	-	104.7
1’	-	121.9
2’/6’	8.13 (2H, d, 8.9)	133.0
3’/5’	6.91 (2H, d, 8.9)	116.7
4’	-	161.0
7-OCH_3	3.92 (3H, s)	56.4
3-*O*-γαλακτοπυρανόση		
1’’	5.10 (1H, d, 7.7)	105.6
2’’	3.82 (1H, dd, 9.9 / 7.7)	73.0
3’’	3.69 (1H, *)	75.3
4’’	3.80 (1H, brs)	70.2
5’’	3.57 (1H, *)	75.0
6a’’	3,74 (1H, *)	67.4
6b’’	3,43 (1H, *)	67.4
6’’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’	4.53 (1H, d, 1.7)	102.0
2’’’	3.73 (1H, *)	72.2
3’’’	3.62 (1H, dd, 9.9 / 3.5)	79.5
4’’’	3.43 (1H, t, 9.9)	73.0
5’’’	3.58 (1H, *)	70.0
6’’’	1.20 (3H, d, 6.6)	17.7
3’’’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’’	4.95 (1H, d, 1.7)	104.7
2’’’’	3.94 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	72.0
3’’’’	3.71 (1H, *)	72.0
4’’’’	3.37 (1H, *)	74.0
5’’’’	3.69 (1H, *)	69.9
6’’’’	1.15 (3H, d, 6.6)	17.7

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

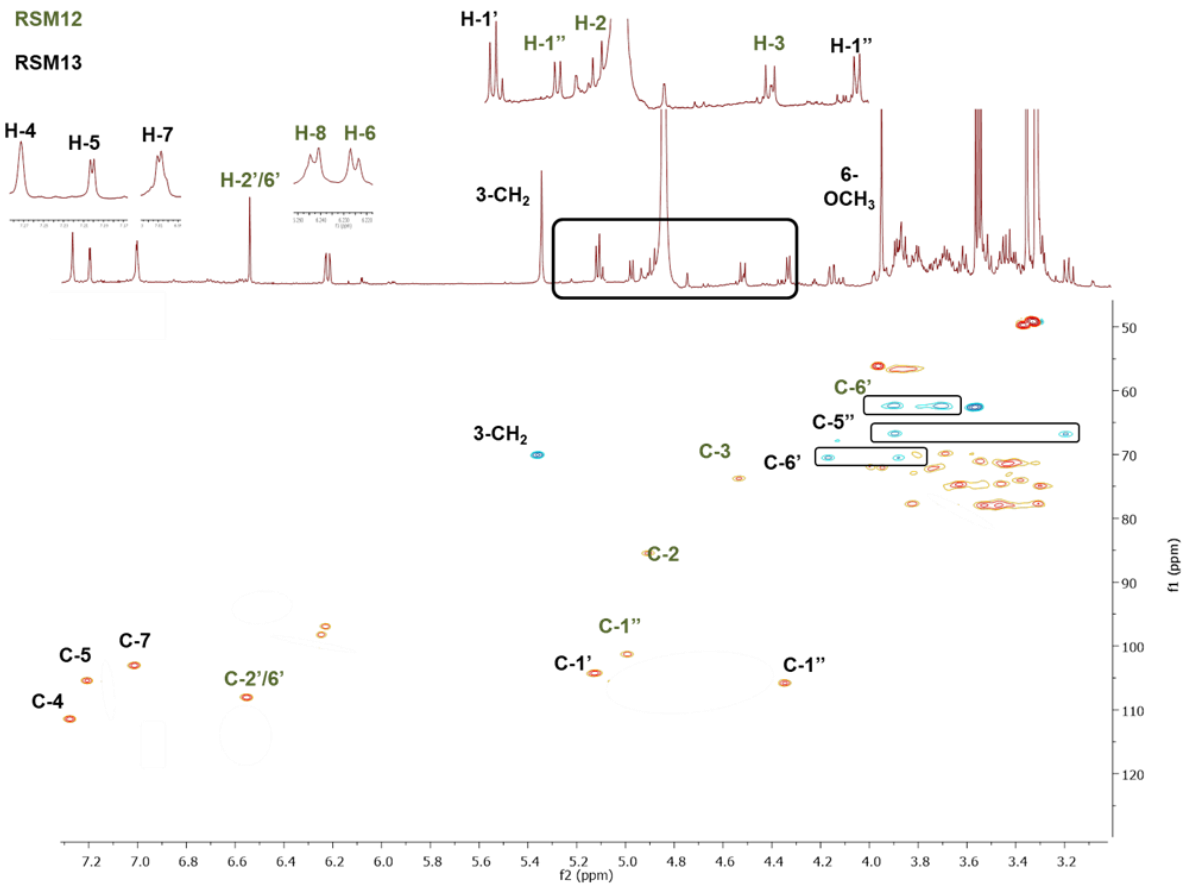
Η 3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)-ραμνο-σιτρίνη έχει απομονωθεί από τα είδη *R. disperma* (Marzouk, *et al.,* 1999)*, R. thymifolius* (Satake, *et al.*, 1993)*, R. catharticus* και *R. alaternus* (Riess-Mauer, *et al.*, 1982). Διαθέτει υψηλή αντιοξειδωτική δράση και προστασία έναντι της γονιδιοτοξικότητας (Bhouri, *et al.*, 2012) (Bhouri, *et al.*, 2011), ενώ η γενίνη ραμνοσιτρίνη διαθέτει αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση και είναι σημαντικός προστατευτικός παράγοντας έναντι του οξειδωτικού στρες (Hong, *et al.*, 2009).

4.3.7.1.8 Μελέτη του κλάσματος RSM-F13

Το κλάσμα RSM-F13 στη χρωματογραφία TLC φάνηκε να περιέχει κυρίως δύο μεταβολίτες, ενώ η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για μίγμα των μεταβολιτών RSM12 και RSM13 σε αναλογία 30 / 70.

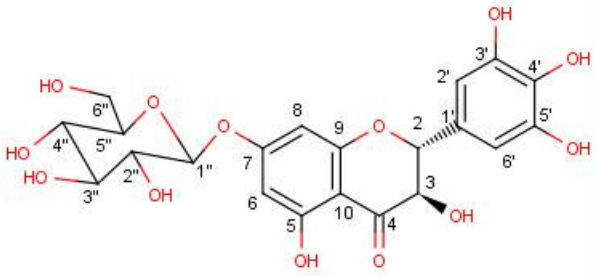
- **7-*O*-*β*-Γλυκοπυρανοσίδης της αμπελοψίνης (RSM12)**

Ο μεταβολίτης RSM12 παρουσιάζει απορρόφηση στα 254 nm ενώ έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης έδωσε σκούρα καφέ χρώση. Η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της αμπελοψίνης (RSM7) και συγκεκριμένα τον 7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδη της αμπελοψίνης. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο προαναφερόμενος μεταβολίτης παρουσίασε φασματοσκοπικές ομοιότητες με τη γενίνη αμπελοψίνη που περιγράφηκε προηγουμένως, με τη διαφορά ότι τα H-8 (*δ* 6.24) και H-6 (*δ* 6.22) του δακτυλίου A εμφανίζονται σαφώς αποθωρακισμένα (βλέπε το φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 122) του μίγματος των μεταβολιτών RSM12 και RSM13) λόγω της *O*-γλυκοζυλίωσης στη θέση 7 του δακτυλίου. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (*J* = 7.7 Hz) στα 4.99 ppm, ενώ ο ανωμερικός άνθρακας συντονίται στα 101.4 ppm. Στο φάσμα HMBC το προαναφερόμενο πρωτόνιο παρουσιάζει σύζευξη με τον οξυγονωμένο άνθρακα στα 167.7 ppm που αντιστοιχεί στον C-7 της γενίνης υποδηλώνοντας θέση σύνδεσης του σακχάρου. Επίσης, τα χαρακτηριστικά μεθυλενικά πρωτόνια H-6''a και H-6''b συντονίζονται στα 3.89 και 3.57 ppm αντίστοιχα, ενώ ο μεθυλενικός άνθρακας C-6'' εμφανίζεται στα 62.5 ppm. Η σταθερά της σύζευξης των πρωτονίων H-2 και H-3 είναι 11.4Hz, γεγονός που φανερώνει την *trans* διευθέτησή τους στο χώρο.



Εικόνα 122: Φάσμα ^{1}H NMR και HSQC-DEPT του μίγματος των ενώσεων RSM12 και RSM13

Πίνακας 108: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM12

RSM12 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR** *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	**^{13}C NMR** *δ* σε ppm
2	4.90 (1H, d, 11.4)	85.5
3	4.53 (1H, d, 11.4)	73.9
4	-	199.5
5	-	164.0
6	6.22 (1H, d, 2.0)	98.3
7	-	167.7
8	6.24 (1H, d, 2.0)	97.0
9	-	163.9
10	-	100.4
1'	-	128.1
2'/6'	6.55 (2H, s)	108.1
3'/5'	-	134.9
4'	-	145.9
7-*O*-γλυκοπυρανόση		
1"	4.99 (1H, d, 7.7)	101.4
2"	3.46 (1H, *)	74.5

3''		
4''		
5''		
6''a	3.89 (1H, *)	62.5
6''b	3.57 (1H, *)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

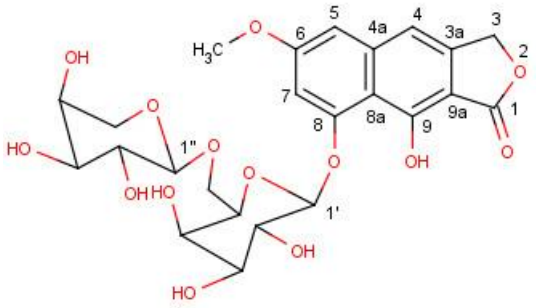
Ο 7-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσίδης της αμπελοψίνης έχει εντοπισθεί μόνο σε είδη του γένους *Plantago* (Zhou, *et al*., 2013), έχει απομονωθεί από το είδος *Picea abies* (Slimestad, *et al.*, 1994) ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από το γένος *Rhamnus*.

❖ ***α*-Σορινίνη (RSM13)**

Στο χρωματογραφικό έλεγχο ο μεταβολίτης RSM13 παρουσίασε έντονη κυανή απορρόφηση στα 254 nm ενώ έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη σημειώνει γκρι-καφε χρώση. Ο φασματοσοπικός έλεγχος αποκάλυψε πως πρόκειται για ένα δισακχαριδικό παράγωγο της α-σοριγενίνης και πιο συγκεκριμένα για τον 8-*O*-πριμβεροσίδη της 6-μεθοξυσοριγενίνης. Στο φάσμα ^{1}H-NMR (Εικόνα 122) του μίγματος των μεταβολιτών RSM12 και RSM13 και συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται τα πρωτόνια H-4 (*δ* 7.27), H-5 (*δ* 7.20) και H-7 (*δ* 7.01) ως μια απλή και δύο διπλές (*J* = 2.4 Hz) κορυφες, αντίστοιχα. Στο φάσμα HMBC φαίνεται ότι το πρωτόνιο H-4 παρουσιάζει σύζευξη με τον άνθρακα στα 70.2 ppm, ο οποίος αντιστοιχεί στο μεθυλένιο της θέσης C-3. Ο άνθρακας της θέσης C-9a του δακτυλίου συντονίζεται στα 105.5 ppm και εμφανίζει σύζευξη τόσο με το πρωτόνιο H-4 όσο και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-3. Επιπλέον, τα τρία αρωματικά πρωτόνια παρουσιάζουν σύζευξη με αρωματικό άνθρακα σε *δ* 111.4, ο οποίος αντιστοιχεί στον C-8a. Επιπρόσθετα, τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας στα 3.96 ppm παρουσιάζουν σύζευξη με τον C-6 του δακτυλίου στα 162.3 ppm, γεγονός που υποδεικνύει τη θέση σύνδεσης της προαναφερόμενης ομάδας στο βασικό σκελετό. Χαρακτηριστική είναι η ^{3}J σύζευξη ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης στα 5.07 ppm και τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στα 158.8 ppm (C-8), η οποία υποδηλώνει τη θέση σύνδεσης του σακχάρου στο βασικό σκελετό της ένωσης. Επίσης, η χημική μετατόπιση του μεθυλενικού άθρακα της γλυκόσης (*δ* 70.5) υποδηλώνει το σχηματισμό γλυκοσιδικού δεσμού και επομένως τη σύνδεση της δεύτερης σακχαριδικής μονάδας στη συγκεκριμένη θέση. Το ανωμερικό πρωτόνιο του δεύτερου σακχάρου εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (*J* = 6.5 Hz) στα 4.35 ppm, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H-5''a (*δ* 3.90) και H-5''b (*δ* 3.18) και του μεθυλενικού άνθρακά του (*δ* 66.9) ήταν καθοριστικές για την ταυτοποίησή του ως ξυλοπυρανόση. Η θέση σύνδεσης της ξυλόσης στον C-6' της γλυκόσης επιβεβαιώθηκε από το φάσμα HMBC. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM13, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία (Coskun, *et al*., 1984) και παρατίθενται στον πίνακα 109.

Πίνακας 109: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RSM13

RSM13 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	172.5
2	-	-
3	5.36 (2H, s)	70.1
3a	-	145.3
4	7.27 (1H, s)	111.5
4a		105.7
5	7.20 (1H, d, 2.4)	105.5
6	-	162.3
7	7.01 (1H, d, 2.4)	103.1
8	-	158.8
8a	-	111.4
9	-	157.0
9a	-	105.5
6-OCH_3	3.96 (3H, s)	56.1
	8-*O*-γλυκοπυρανόση	
1’	5.07 (1H, d, 7.8)	104.2
2’	3.63 (1H, *)	74.5
3’	3.47 (1H, *)	76.8
4’	3.54 (1H, *)	70.9
5’	3.58 (1H, *)	77.9
6’a	4.13 (1H, dd, 11.8 / 1.8)	70.5
6’b	3.88 (1H, *)	
	6”-*O*-ξυλοπυρανόση	
1’’	4.35 (1H, d, 6.5)	105.8
2’’	3.30 (1H, *)	73.9
3’’	3.54 (1H, *)	76.3
4’’	3.50 (1H, *)	70.0
5’’a	3.90 (1H, *)	66.9
5’’b	3.18 (1H, dd, 11.8 / 9.0)	

*Παρατηρείται επικάλυψη πρωτονίων

Η *α*-σορινίνη έχει απομονωθεί μόνο από το γένος *Rhamnus* συγκεκριμένα από το είδος *Rhamnus nakaharai* (Ng, *et al.*, 2007), *Rhamnus pallasii* (Coskun, *et al.*, 1984) καθώς και από το *Rhamnus japonica* (Nikuni, 1942) στο παρελθόν. Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί η αξιόλογη αντιοξειδωτική της δράση (Ng, *et al.*, 2007).

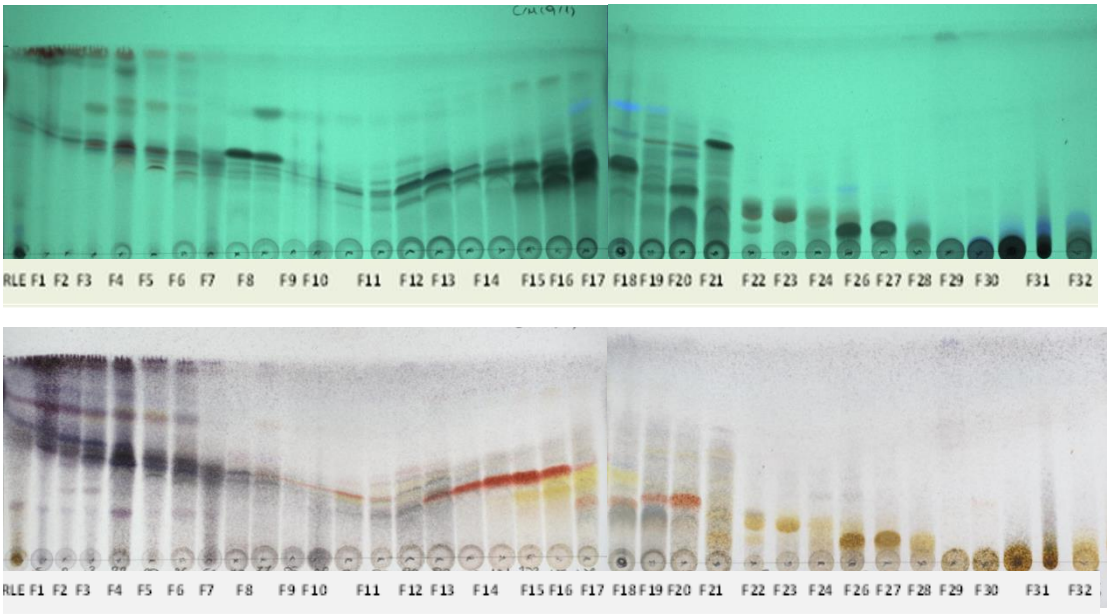
4.3.8 Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLE)

Στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC το εκχύλισμα EtOAc των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* subsp. *graecus* φάνηκε ότι διαθέτει πλούσιο φυτοχημικό προφίλ και περιέχει ουσίες διαφορετικής πολικότητας που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Με σκοπό την καλύτερη δυνατή κλασμάτωσή του αποφασίστηκε η εφαρμογή της τεχνικής της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής και η χρήση αλληλουχίας διφασικών συστημάτων διαλυτών, τα οποία επιλέχθηκαν με βάση προγενέστερες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα RLE αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) και δεδομένου ότι ήταν πλούσιο σε μεταβολίτες μέσης ή υψηλής πολικότητας επιλέξαμε τα ακόλουθα συστήματα διαλυτών:

Αριθμός Συστήματος	Heptane	EtOAc	EtOH	H_2O
1	13.0	2.0	7.0	8.0
2	10.0	5.0	7.0	8.0
3	7.0	8.0	7.0	8.0
4	4.0	11.0	7.0	8.0
5	1.0	14.0	7.0	8.0

Όπως διαπιστώνεται πολύ εύκολα από τη μελέτη του προαναφερόμενου πίνακα, η σύσταση της υδατικής φάσης παραμένει σχεδόν σταθερή ενώ η πολικότητα της οργανικής φάσης συνεχώς αυξάνεται από το σύστημα 1 στο σύστημα 5. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με δυνατότητα διοχέτευσης του διαλύτη μέχρι 24 min/ml και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 2.5 g, το οποίο διαλύθηκε σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία 50:50. Από τις δύο φάσεις του 1^{ου} συστήματος διαλυτών, η πιο ελαφριά (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η πιο βαριά (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min και ροή 10-15 ml/min σε 'ascending mode', ενώ μετά την εξισορρόπηση του συστήματος ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή 148 κλασμάτων όγκου 30ml το καθένα. Μετά την ολοκλήρωση της διαδοχικής διοχέτευσης των οργανικών φάσεων των προαναφρόμενων διφασικών συστημάτων, έγινε αναστροφή των ρόλων και η υδατική χρησιμοποιήθηκε ως κινητή σε 'descending mode' μέχρι το τέλος της ανάλυσης με ροή 10-15 ml/min σε και περιστροφή 650 rpm. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν συνολικά 178 κλάσματα εκ των οποίων τα 148 συλλέχτηκαν με κινητή τις οργανικές φάσεις των διφασικών συστημάτων, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση του τελευταίου

συστήματος) συλλέχτηκαν επιπλέον 30 κλάσματα. Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC, τόσο κανονικής φάσης σε συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και 90/10 όσο και αντίστροφης σε σύστημα H_2O/ACN 70/30, πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 32 κλάσματα (πίνακας 110). Το χημικό προφίλ των προαναφερόμενων κλασμάτων ελέχθηκε με TLC κανονικής φάσης με συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 90/10 (εικόνα 123), CH_2Cl_2/MeOH 95/5 και EtOAc/MeOH/H_2O/FA 52/5/9/1 καθώς και σε TLC αντίστροφης φάσης με σύστημα διαλυτών H_2O/ACN 70/30. Μετά από την μελέτη των προκύπτοντων χρωματογραφημάτων αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη των κλασμάτων τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.



Εικόνα 123: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του RLE σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (90/10)

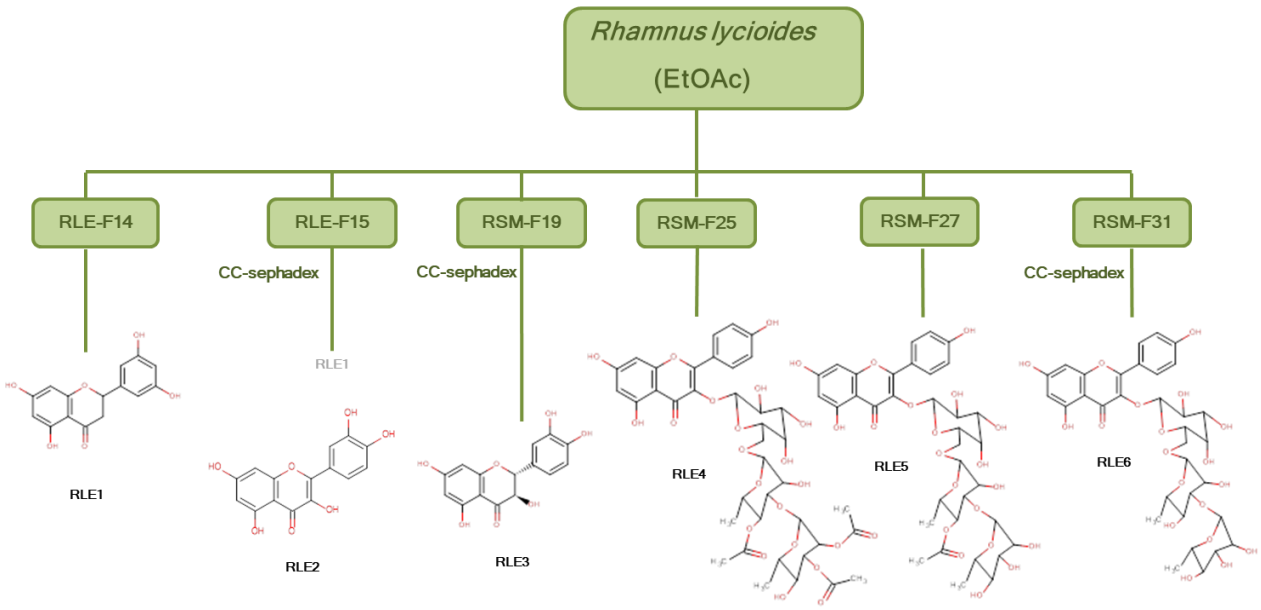
Πίνακας 110: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RLE

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
RLE-F1	5-7	35.3	**RLE-F17**	107-110	19.6
RLE-F2	8-12	28.9	**RLE-F18**	111-115	19.3
RLE-F3	13-21	206.0	**RLE-F19**	116-117	53.9
RLE-F4	22-28	61.5	**RLE-F20**	118-119	37.1
RLE-F5	29-35	42.8	**RLE-F21**	120-125	51.3
RLE-F6	36-53	212.2	**RLE-F22**	126-127	107.3
RLE-F7	54-71	226.1	**RLE-F23**	128-130	85.4
RLE-F8	72-84	20.6	**RLE-F24**	131-133	12.1
RLE-F9	85-86	41.2	**RLE-F25**	134-136	42.1
RLE-F10	87-89	232.0	**RLE-F26**	137-139	14.6
RLE-F11	90-91	33.4	**RLE-F27**	140-148	13.4
RLE-F12	94-97	26.9	**RLE-F28**	149-164	8.9
RLE-F13	98-99	10.6	**RLE-F29**	165	10.7

RLE-F14	100-101	5.5	**RLE-F30**	166-167	58.1
RLE-F15	102-104	26.6	**RLE-F31**	168-174	265.6
RLE-F16	105-106	12.6	**RLE-F32**	175-178	10.3

4.3.8.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος RLE

Από την επεξεργασία του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *Rhamnus lycioides* με την τεχνική του FCPC προέκυψαν 32 κλάσματα, μεταξύ των οποίων 3 περιείχαν απομονωμένους μεταβολίτες σε σχετικά υψηλή καθαρότητα, ενώ από την περαιτέρω μελέτη τριών άλλων κλασμάτων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών προέκυψαν 3 ακόμη μεταβολίτες. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία:



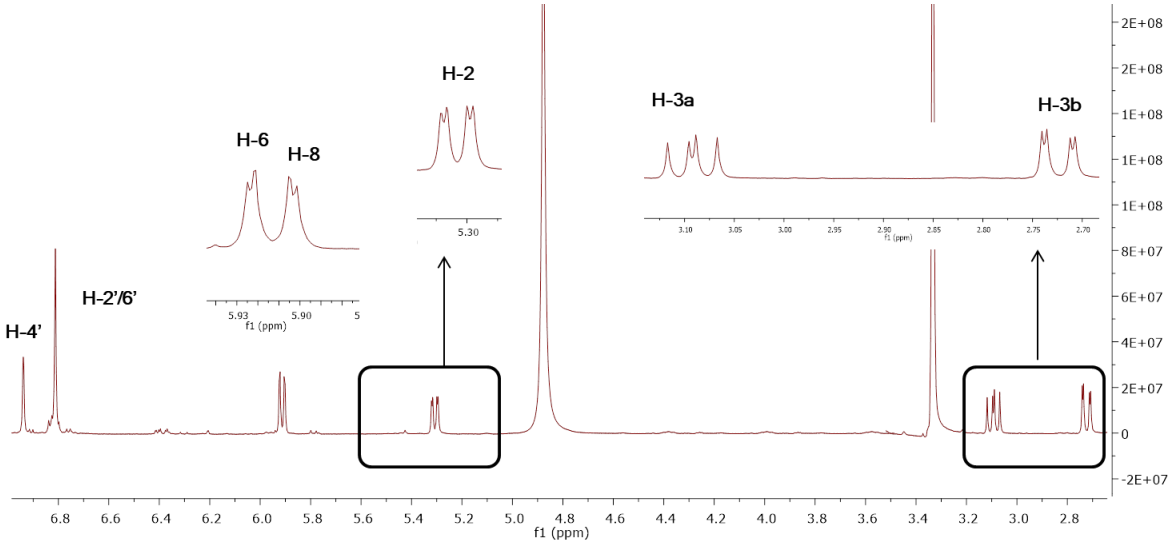
Σχήμα 9: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLE)

4.3.8.1.1 Μελέτη του κλάσματος RLE_F14

Το κλάσμα RLE_F14 όπως παραλήφθηκε έπειτα από την κλασμάτωση του εκχυλίσματος φάνηκε να περιέχει έναν κύριο μεταβολίτη σε υψηλή καθαρότητα ο οποίος αποφασίστηκε να μελετηθεί περαιτέρω.

❖ 5,7,3′,5′-Τετραϋδροξυφλαβανόνη (RLE1)

Ο μεταβολίτης RLE1 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm ενώ έπειτα από την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης έδωσε κόκκινη χρώση. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (Εικόνα 124) εντοπίζεται μια απλή κορυφή σε δ6.94, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-4' του δακτυλίου B, ενώ τα άλλα δύο πρωτόνια (H-2' και H-6') του ίδιου δακτυλίου συντονίζονται στα 6.81 ppm. Επίσης, τα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A συντονίζονται στα 5.90 και 5.92 ppm ως δύο διπλές κορυφές με J = 2.0Hz. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζεται το H-2 με τη μορφή dd (J = 13.0 / 3.0 Hz) σε δ 5.30, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 80.5 ppm. Τα πρωτόνια H-3a και H-3b εμφανίζονται ως διπλές διπλών κορυφές σε δ 3.09 (J = 17.0 / 13.0) και 2.72 (J = 17.0 / 3.0), ενώ οι σταθερές σύζευξης υποδηλώνουν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Sun, *et al.*, 2007) την S διαμόρφωση στη θέση C-2.

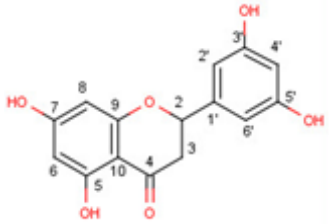


Εικόνα 124: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RLE1

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RLE1, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Hashmi, *et al.*, 2014) και παρουσιάζονται στον πίνακα 112.

Πίνακας 112: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE1

RLE1 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	5.30 (1H, dd, 13.0 / 3.0)	80.5
3a	3.09 (1H, dd, 17.0 / 13.0)	44.0
3b	2.72 (1H, dd, 17.0 / 3.0)	
4	-	198.0

5	-	164.9
6	5.90 (1H, d, 2.0)	96.2
7	-	168.4
8	5.92 (1H, d, 2.0)	97.0
9	-	131.7
10	-	103.5
1’	-	131.8
2’/6’	6.81 (2H, s)	114.7
3’/5’	-	146.8
4’	6.94 (1H, s)	116.3

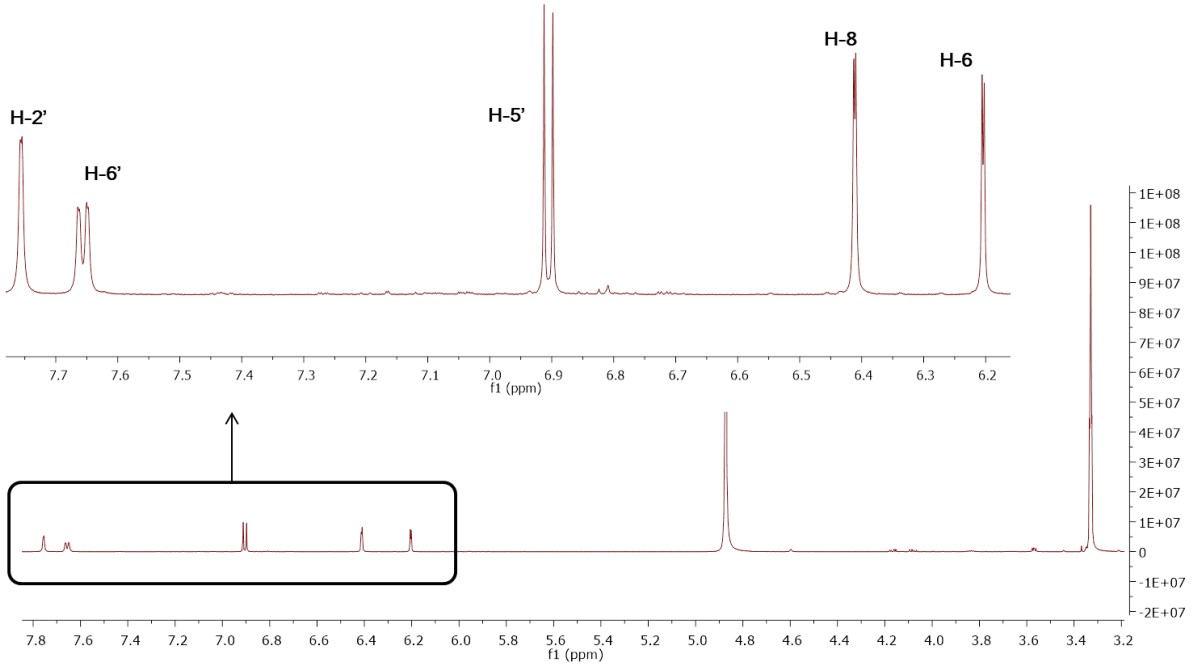
Ο μεταβολίτης 5,7,3′,5′-τετραϋδροξυφλαβανόνη εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Rhamnus,* ενώ έχει αναφερθεί η απομόνωσή του από τα είδη *Cyperus teneriffae* (Amesty, *et al.*, 2011)*, Celastrus flagellaris* (Zhao, *et al.*, 2012)*, Rheum officinale* (Gao, *et al.*, 2013)*, Olea ferruginea* (Hashmi, *et al.,* 2014), *Chlorophora regia* (Kyekyeku, *et al.*, 2016) και *Gleditsia sinensis* (Yang, *et al.*, 2016).

4.3.8.1.2 Μελέτη του κλάσματος RLE_F15

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα RLE_F15 περιέχει κυρίως δύο μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν σε διαορετικές χημικές κατηγορίες και έτσι αποφασίστηκε η επεξεργασία του με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Από την προαναφερόμενη διαδικασία, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και MeOH ως διαλύτης έκλουσης, παραλήφθηκαν οι μεταβολίτες RLE1 και RLE2.

- **Κερκετίνη (RLE2)**

Ο μεταβολίτης RLE2 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη έδωσε κίτρινη χρώση. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 125, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR παρατηρούμε ένα χαρακτηριστικό ABX σύστημα, το οποίο αποτελείται από μια διπλή κορυφή με J = 2.0 Hz (δ 7.76, H-2’), μια διπλή διπλής κορυφή με J = 8.5 και 2.0 Hz (δ 7.66, H-6’) και μια διπλή κορυφή με J = 8.5 Hz (δ 6.90, H-5’). Επίσης, τα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A εμφανίζονται ως διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz) στα 6.20 και 6.41 ppm, αντίστοιχα.

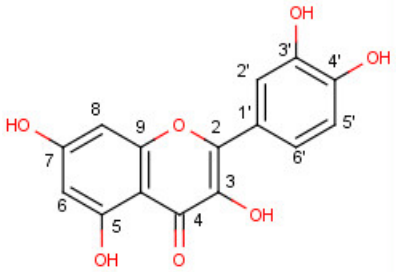


Εικόνα 125: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RLE2

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RLE2, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον πίνακα 113 (Tachakittirungrod, *et al.*, 2007) (Archila, *et al.*, 2018).

Πίνακας 113: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE2

RLE2 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	148.7
3	-	132.1
4	-	177.9
5	-	162.5
6	6.20 (1H, d, 1.9)	99.2
7	-	165.7
8	6.41 (1H, d, 1.9)	94.3
9	-	158.5
10	-	104.3
1'	-	124.0
2'	7.76 (1H, d, 2.0)	116.3
3'	-	148.8
4'	-	146.3
5'	6.90 (1H, d, 8.5)	116.3
6'	7.66 (1H, dd, 8.5 / 2.0)	121.7

Η φλαβονόλη κερκετίνη συναντάται σε πλήθος φθσικών πηγών ενώ και απομονωθεί από αρκετά είδη του γένους *Rhamnus* (Tacherfiout, *et al.*, 2018) (Chen, *et al.*, 2017) (Moussi, *et al.,* 2015) (Hamed, *et al.*, 2015) (Pandey, *et al.,* 2006). Διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη δράση (Lesjak, *et al.*, 2018) (Chekalina, *et al.*, 2018) (Lee, *et al.*, 2016) καθώς και αντιαγγειογενετική και αντικαρκινική δράση (Huang, *et al.*, 2018) (Bharathi Raja, *et al.*, 2017). Βάση μελετών αναστέλλει τη δράση του ενζύμου τυροσινάση (Fan, *et al.*, 2017) και της ξανθινοξειδάσης (Zhang, *et al.*, 2018) ενώ εκδηλώνει αγγειοπροστατευτική επίδραση μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και τη δράση της μεταλλοπρωτεινάσης (MMP)-2 *(Pereira, et al.*, 2018). Αναστέλλει τη δράση των οστεοκλαστών στην κυτταρική σειρά RAW264.7 *(Pang, et al.*, 2006) και την οστεοκλαστογένεση, ενώ ενισχύει τον πολλαπλασιαμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Forte, *et al.*, 2016).

4.3.8.1.3 Μελέτη του κλάσματος RLE-F19

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το κλάσμα RLE-F19 περιέχει κυρίως ένα μεταβολίτη. Με σκοπό την απομόνωση του μεταβολίτη RLE3 εφαρμόσθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και ως διαλύτης έκλουσης MeOH.

❖ **Ταξιφολίνη (RLE3)**

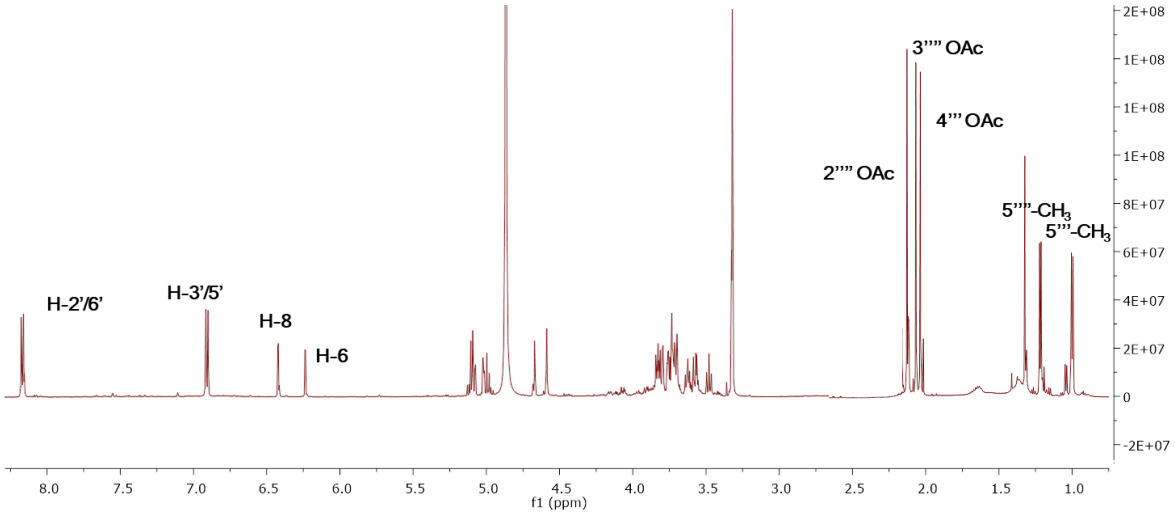
Ο μεταβολίτης RLE3 παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε κόκκινη χρώση μετά την εμφάνιση με το διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης, ενώ η φασματοσκοπική μελέτη αποκάλυψε πως πρόκειται για την ταξιφολίνη. Έχει αναπομονωθεί από πλήθος φυτικών ειδών, καθώς και από είδη του γένους *Rhamnus* (Chen, *et al.*, 2016) (Marzouk, *et al.*, 1999), ενώ στην παρούσα εργασία έχει ξαναπομονωθεί και περιγράφεται ως μεταβολίτης RSM5.

4.3.8.1.4 Μελέτη του κλάσματος RLE-F25

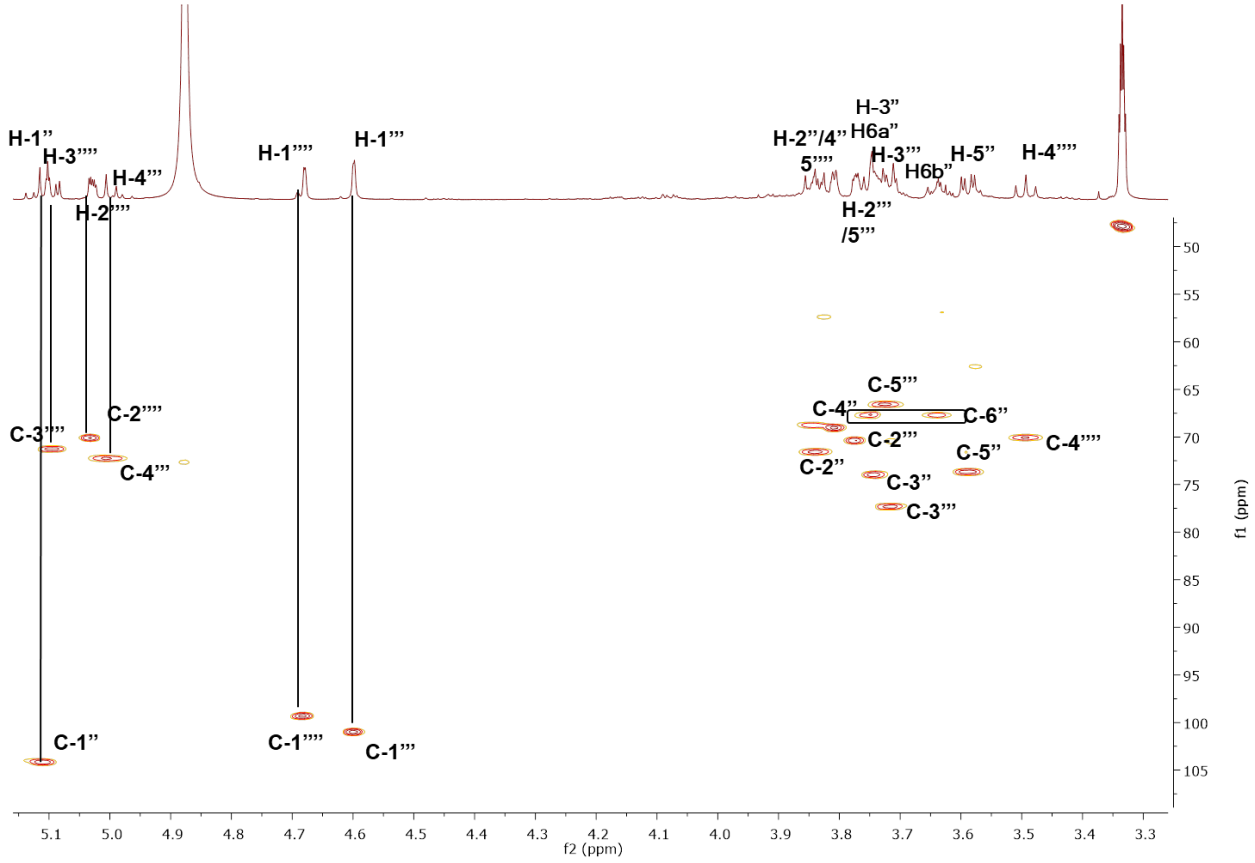
Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το κλάσμα RLE-F25 περιείχε έναν κύριο μεταβολίτη σε υψηλή καθαρότητα ο οποίος ύστερα από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως:

❖ **3-*O*-(2,3-δι-*O*-ακετυλο-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-4-O-ακετυλο-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)- καιμπφερόλη (RLE4).**

Ο μεταβολίτης RLE4 παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm ενώ έπειτα από την εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη έδωσε καφέ χρώση. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη RSM9, ενώ οι σημαντικότερες διαφορές πηγάζουν από την παρουσία τριών ακετυλομάδων οι οποίες εστεροποιούν μία υδροξυλομάδα της πρώτης μονάδας ραμνόσης και δύο υδροξυλομάδες της δεύτερης ραμνόσης.



Εικόνα 126: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RLE4



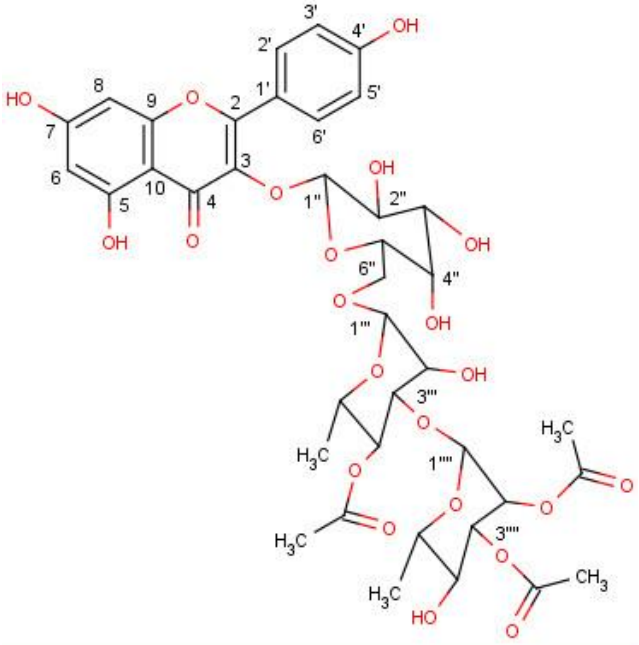
Εικόνα 127: Φάσμα ^{1}H NMR και HSQC-DEPT της ένωσης RLE4

Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ^{1}H-NMR (Εικόνα 126) και στις ίδιες χημικές μετατοπίσεις σε σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη RSM9, συναντάμε τις κορυφές πρωτονίων της καιμπφερόλης καθώς και τα πρωτόνια της γαλακτοπυρανόσης. Ελαφρώς αποθωρακισμένο εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο H-1''' της ραμνόσης στα 4.59 ppm, το οποίο στο φάσμα HMBC παρουσιάζει ^{3}J σύζευξη με τον C-6'' της γαλακτόσης (δ 69.1) υποδηλώνοντας τη θέση σύνδεσης των δύο προαναφρόμενων σακχαριδικών μονάδων. Ωστόσο, εμφανώς αποθωρακισμένο εμφανίζεται το πρωτόνιο H-4''' (δ 5.00), το οποίο ανήκει στην πρώτη μονάδα

ραμνόσης, ενώ στο φάσμα HMBC παρατηρείται η σύζευξή του με τον καρβονυλικό άνθρακα (*δ* 170.8) ακετυλομάδας. Ομοίως τα πρωτόνια H-2'''' και H-3'''', τα οποία ανήκουν στη δεύτερη μονάδα ραμνόσης, εμφανίζονται αποθωρακισμένα συγκριτικά με του μεταβολίτη RSM9 και συντονίζονται σε *δ* 5.03 και 5.09. Επίσης, στο φάσμα HMBC παρατηρούνται συζεύξεις των προαναφερόμενων πρωτονίων με καρβονυλικούς άνθρακες (*δ* 170.8) ακετυλίων, των ομοίων τα πρωτόνια εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 2.12 και 2.06 ppm, αντίστοιχα. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RLE4, τα οποία αποδόθηκαν με τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), παρατίθενται στον πίνακα 114.

Πίνακας 114: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE4

RLE4 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR *δ* σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR *δ* σε ppm
2	-	158.3
3	-	134.2
4	-	174.4
5	-	162.3
6	6.25 (1H, d, 2.2)	100.3
7	-	165.0
8	6.43 (1H, d, 2.2)	95.2
9		157.4
10	-	104.7
1'	-	121.9
2'/6'	8.17 (2H, d, 8.9)	133.0
3'/5'	6.91 (2H, d, 8.9)	116.7
4'	-	161.0
3-*O*-γαλακτοπυρανόση		
1''	5.11 (1H, d, 7.7)	105.6
2''	3.84 (1H, dd, 9.9 / 7.7)	73
3''	3.74 (1H, *)	75.4
4''	3.81 (1H, br s)	70.2
5''	3.58 (1H, *)	75.0
6a''	3.75 (1H, *)	69.1
6b''	3.63 (1H, *)	
6''-*O*-ραμνοπυρανόση		

1’’’	4.59 (1H, d, 1.7)	102.4
2’’’	3.77 (1H, *)	71.8
3’’’	3.71 (1H, *)	78.6
4’’’	5.00 (1H, t, 9.9)	73.5
5’’’	3.73 (1H, *)	68.0
6’’’	0.99 (3H, d, 6.6)	17.6
4’’’-OAc	2.03 (3H, s)	20.6
C=O	-	170.8
3’’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’’	4.68 (1H, d, 1.7)	100.7
2’’’’	5.03 (1H, dd, 3.5 / 1.7)	71.4
3’’’’	5.09 (1H, dd, 9.5 / 3.5)	72.7
4’’’’	3.49 (1H, *)	71.5
5’’’’	3.84 (1H, *)	70.2
6’’’’	1.21 (3H, d, 6.6)	17.8
2’’’’OAc	2.12	20.6
3’’’’OAc	2.06	20.8
C=O	-	170.8

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

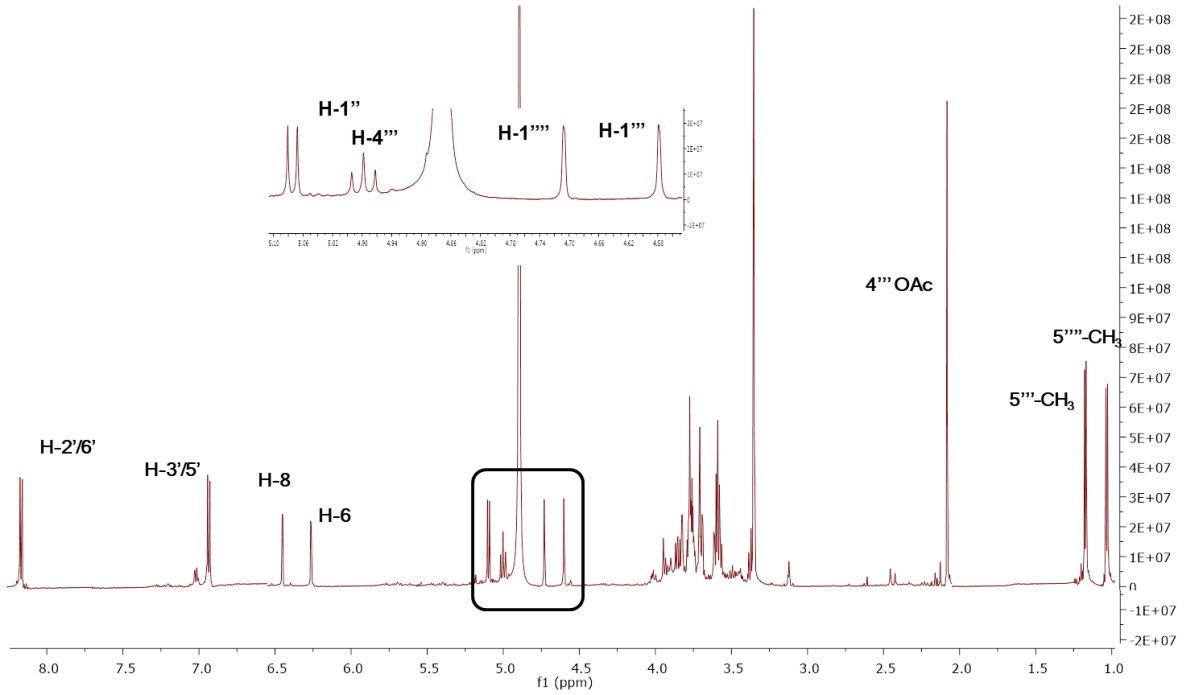
Ο μεταβολίτης RLE4 μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυσική πηγή επομένως αποτελεί ένα **νέο** φυσικό προϊόν.

4.3.8.1.5 Μελέτη του κλάσματος RLE_F27

Το κλάσμα RLE_140_148 σύμφωνα με τον χρωματογραφικό έλεγχο φάνηκε να περιέχει κυρίως ένα μεταβολίτη ο οποίος μετά από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων ταυτοποιήθηκε ως

- **3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-4-O-ακετυλο-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)- καιμπφερόλη (RLE5).**

Σε σύγκριση με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RSM9, οι κύριες διαφορές πηγάζουν από την παρουσά ακετυλομάδας. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ^{1}H-NMR (Εικόνα 128) παρατηρούμε ότι το πρωτόνιο H-4’’’ εφανίζεται αρκετά αποθωρακισμένο, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την παρουσία ακετυλομάδας σε αυτή τη θέση. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη του προαναφερόμενου πρωτόνιο με το καρβονύλιο της τακετυλομάδας (δ 171.5).

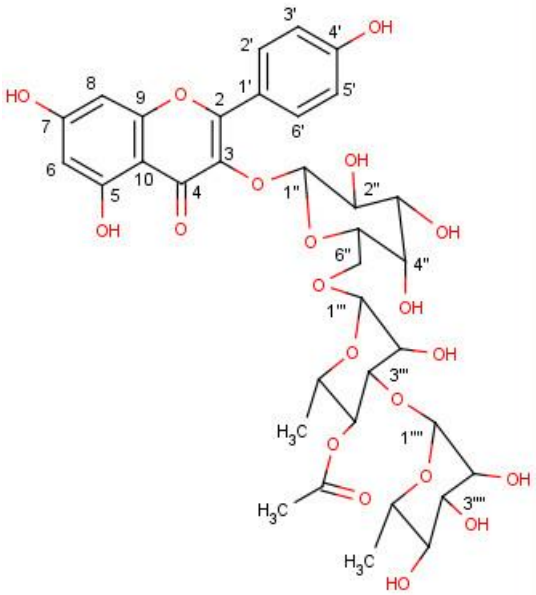


Εικόνα 128: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RLE5

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RLE5 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία *(Xin, et al.*, 2011) και παρουσιάζονται στον πίνακα 115.

Πίνακας 115: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RLE5

RLE5 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	158.3
3	-	134.1
4	-	174.4
5	-	162.3
6	6.25 (1H, d, 2.2)	99.9
7	-	165.0
8	6.43 (1H, d, 2.2)	94.8
9		157.4

10	-	104.7
1’	-	121.9
2’/6’	8.15 (2H, d, 8.9)	132.5
3’/5’	6.91 (2H, d, 8.9)	116.7
4’	-	161.0
3-*O*-γαλακτοπυρανόση		
1’’	5.07 (1H, d, 7.7)	105.7
2’’	3.83 (1H, *)	73.9
3’’	3.69 (1H, *)	75.3
4’’	3.80 (1H, *)	70.3
5’’	3.57 (1H, *)	75.0
6a’’	3,55 (1H, *)	68.4
6b’’	3,77 (1H, *)	68.4
6’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’	4.58 (1H, d, 1.7)	102.3
2’’’	3.75 (1H, *)	71.7
3’’’	3.62 (1H, *)	79.5
4’’’	4.98 (1H, t, 9.0)	74.2
5’’’	3.58 (1H, *)	75.0
6’’’	1.17 (3H, d, 6.6)	17.8
4’’’-OAc	2.06 (3H, s)	20.8
C=O	-	171.5
3’’’-*O*-ραμνοπυρανόση		
1’’’’	4.71 (1H, d, 1.7)	103.8
2’’’’	3.68 (1H, *)	72.1
3’’’’	3.72 (1H, *)	75.1
4’’’’	3.37 (1H, *)	74.2
5’’’’	3.60	70.0
6’’’’	1.03 (3H, d, 6.6)	17.5

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο μεταβολίτης RLE5 έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το *Actinidia valvata* (Xin, *et al.*, 2011) καθώς και το είδος *Rhamnus thymifolius* (Satake, *et al.*, 1993) ενώ επέδειξε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (Xin, *et al.*, 2011).

4.3.8.1.6 Μελέτη του κλάσματος RLE_F31

Ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι στο κλάσμα RLE_F31 περιέχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό ο μεταβολίτης RLE6, ο οποίος μετά τη φασματοσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της καιμπφερόλης.

❖ **3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)- καιμπφερόλη (RLE6)**

Ο εν λόγω μεταβολίτης έχει απομονωθεί από τα είδη *Rhamnus petiolaris* (Ozipek, *et al.*, 1994), *R. thymifolius* (Satake, *et al.*, 1993), *R. disperma* (Marzouk, *et al.*, 1999), *R. alaternus* (Riess-Mauer, *et al.*, 1982) ενώ στη συγκεκριμένη εργασία έχει ξαναπομονωθεί από το *Rhamnus sibthorpiana* και αναφέρεται ως ο μεταβολίτης RSM9. Τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά περιγράφονται στην § 4.3.7.1.5.

4.3.9 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* (RAM)

Ο πρωταρχικός χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* διαθέτει πλούσιο φυτοχημικό προφίλ και για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η εφαρμογή μιας διφασικών συστημάτων διαλυτών με σκοπό την καλύτερη δυνατή κλασμάτωσή του. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα RAM αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) και δεδομένου ότι ήταν πιο πλούσιο σε μεταβολίτες μέσης ή/και υψηλής πολικότητας επιλέξαμε τα ακόλουθα συστάματα διαλυτών:

Αριθμός Συστήματος	Hexane	EtOAc	BuOH	MeOH	H_2O
1	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
2	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
3	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
4	0.5	0.0	5.5	1.0	5.0

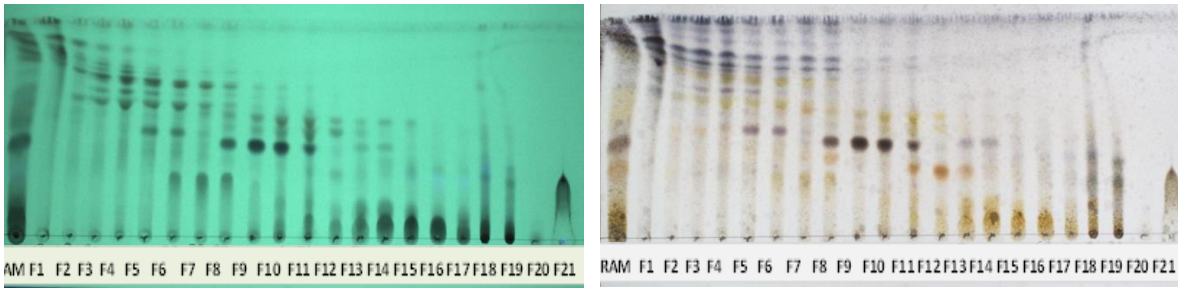
Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη χωρητικότητας 1000 ml, αντλία LabAlliance με δυνατότητα διοχέτευσης του διαλύτη μέχρι 24 min/ml και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους περίπου 6 g, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων αναλογίας 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική φάση. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H_2O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min και ροή 10-15 ml/min σε 'ascending mode, ενώ μετά την εξισορρόπηση του συστήματος ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή κλασμάτων όγκου 30ml. Οι οργανικές φάσεις των προαναφερόμενων συστηάτων χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά και συνολικά παραλήφθηκαν 148 κλάσματα, μέχρι τη στιγμή που ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες, οπότε και έγινε αναστροφή των φάσεων με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν συνολικά 178 κλάσματα εκ των οποίων τα 148 συλλέχτηκαν με κινητές τις οργανικές φάσεις των προαναφερόμενων διφασικών συστημάτων, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση του τελευταίου συστήματος) συλλέχτηκαν επιπλέον 30 κλάσματα.

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC, τόσο κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 95/5, 90/10 και 80/20 όσο και αντίστροφης σε σύστημα διαλυτών H_2O/ACN 70/30, πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και προέκυψαν συνολικά 21 κλάσματα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 116), ενώ στην εικόνα 129 απεικονίζεται ο χρωματογραφικός

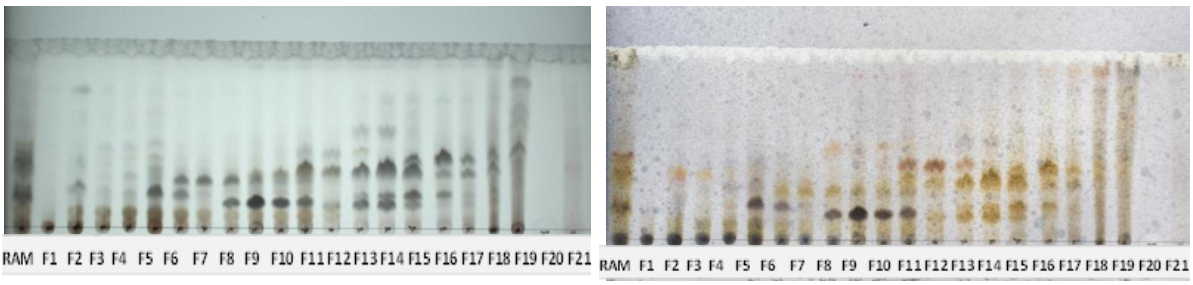
έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων με TLC κανονικής φάσης σε CH_2Cl_2/MeOH 80/20 καθώς και με TLC αντίστροφης φάσης σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/AcN 70/30 στην εικόνα 130.

Πίνακας 116: Πίνακας των συνενωμένων κλασμάτων έπειτα από κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος RAM

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
RAM-F1	13-17	994.5	**RAM-F12**	53-57	340
RAM-F2	18-19 (S3)	159.8	**RAM-F13**	58-59	119
RAM-F3	20-22	147.7	**RAM-F14**	60-63	370
RAM-F4	23	39.6	**RAM-F15**	64-67	376.4
RAM-F5	24-27	127.6	**RAM-F16**	68-70	161.1
RAM -F6	28-31	103.4	**RAM-F17**	71	81.0
RAM-F7	32-38	145	**RAM-F18**	72-80	431.2
RAM-F8	39-44	126.5	**RAM-F19**	81-92	339.7
RAM-F9	45-46	100	**RAM-F20**	93-104	128.3
RAM-F10	47-50	475.2	**RAM-F21**	105-f	601.9
RAM-F11	**51-52**	**105**			



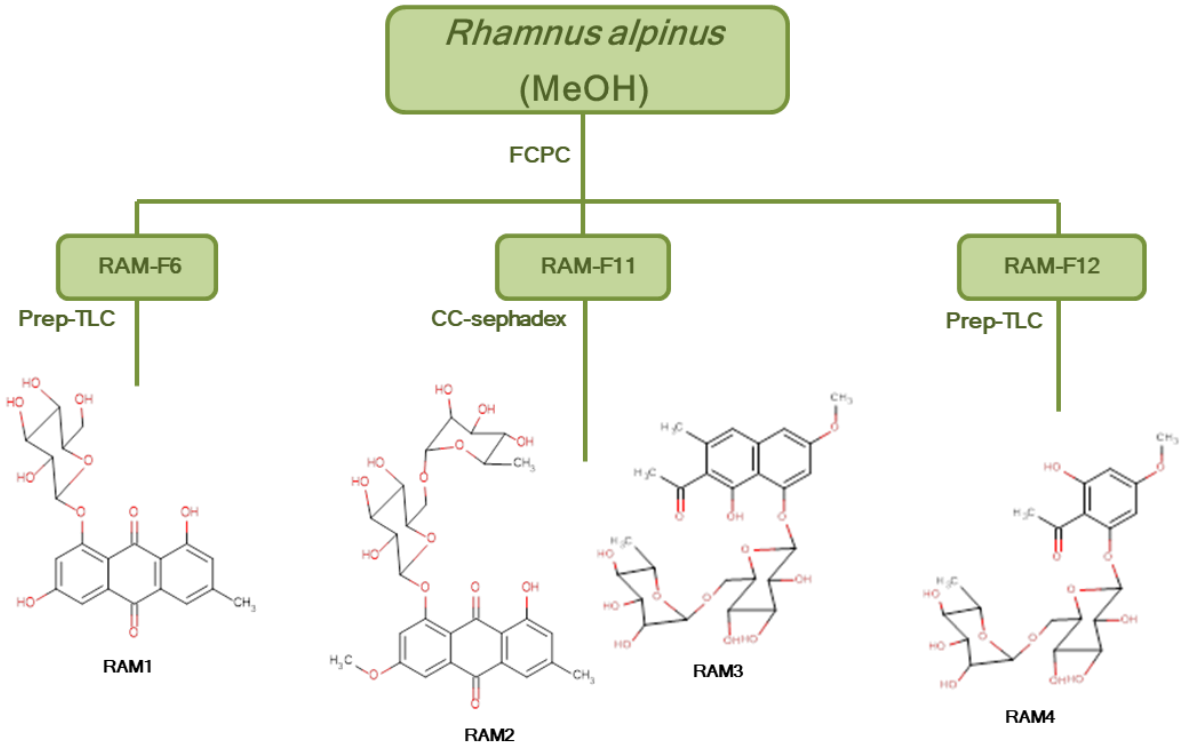
Εικόνα 129: Χρωματογραφήματα σε κανονική πλάκα TLC των κλασμάτων του RAM σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH (95/5)



Εικόνα 130: Χρωματογραφήματα σε αντίστροφη πλάκα TLC των κλασμάτων του RAM σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/MeOH (70/30)

4.3.9.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος RAM

Από την επεξεργασία του εκχυλίσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Rhamnus alpinus* με την τεχνική του FCPC προέκυψαν 21 κλάσματα, 3 επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών και απομονώθηκαν 4 μεταβολίτες. Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η συνολική διαδικασία.



Σχήμα 10: Διαγραμματική πορεία απομόνωσης των περιεχόμενων μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος του των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus alpinus* (RAM)

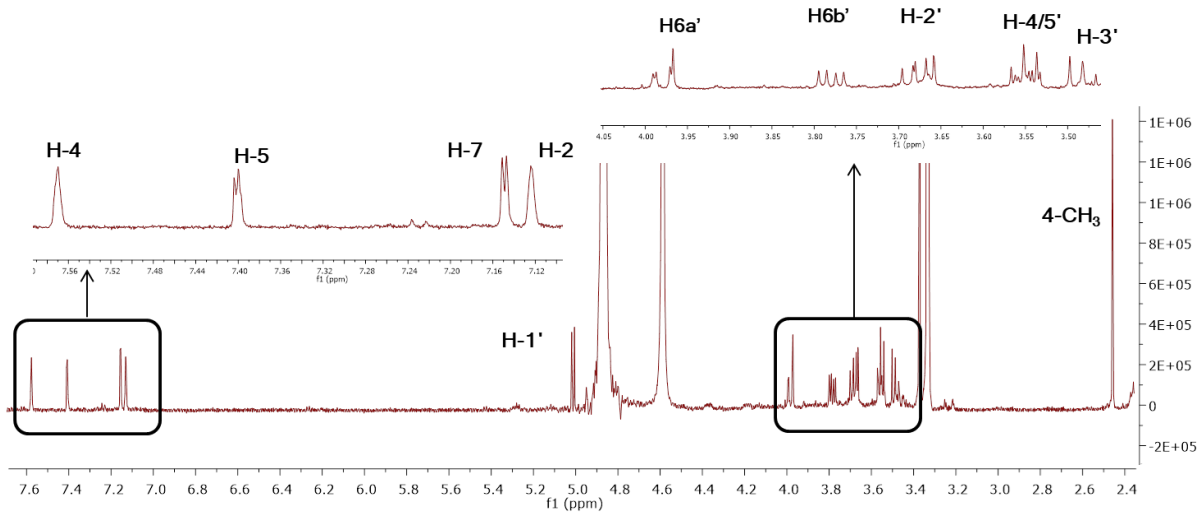
4.3.9.1.1 Μελέτη του κλάσματος RAM-F6

Στον χρωματογραφικό έλεγχο το κλάσμα RAM-F6 φάνηκε να περιέχει σε μεγάλη περιεκτικότητα ένα μεταβολίτη, ο οποίος παρουσίασε απορρόφηση στα 254nm και έδωσε κίτρινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με θεϊκή βανιλλίνη. Με τη εφαρμογή παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 85/15 επιτεύχθηκε η απομόνωση του μεταβολίτη RAM1, ο οποίος μετά τη φασματσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκε ως ο 8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης.

❖ **8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης (RAM1)**

Στην εικόνα 131 φαίνεται ότι στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων της γενίνης, τα οποία έχουν παρόμοιες χημικές

μετατοποίσεις με τα αντίστοιχα πρωτόνια του μεταβολίτη RSM3. Εξαίρεση αποτελεί το πρωτόνιο H-7, το οποίο εμφανίζεται εμφανώς αποθωρακισμένο λόγω της γλυκοζυλίωσης στη θέση 8 της γενίνης καθώς και το πρωτόνιο H-5 το οποίο σημειώνει μικρότερη αποθωράκιση. Επίσης, στο φάσμα HMBC φαίνεται η σύζευξη ^{3}J ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης (δ 5.01) και τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-8, με βάση την οποία επιβεβαιώνεται η θέση σύνδεσης του σακχάρου στο βασικό σκελετό της εμοδίνης. Το σάκχαρο ταυτοποιήθηκε ως β-D-γλυκοπυρανόση αρχικά λαμβάνοντας υπ' όψιν τη μορφή του ανωμερικού πρωτονίου, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 7.7 Hz, την ύπαρξη του μεθυλενικού άνθρακα C-6' στα 62.6 ppm και την μορφή των πρωτονίων H-3 και H-4 που εμφανίζονται ως τριπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 9.9 Hz.

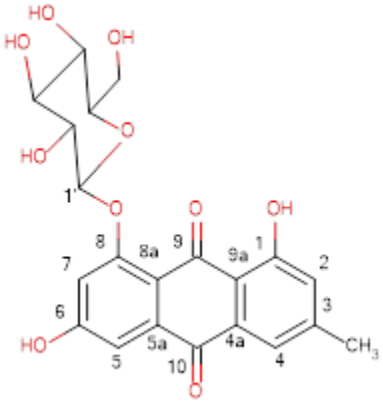


Εικόνα 131: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RAM1

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RAM1, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Liu, *et al.*, 2014) και παρατίθενται στον Πίνακα 119.

Πίνακας 119: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM1

RAM1 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
1	-	163.2
2	7.12 (1H, brs)	125.4

3	-	149.5
4	7.57 (1H, brs)	120.8
4a	-	133.2
5	7.40 (1H, d, 2.0)	110.9
5a	-	136.3
6	-	167.3
7	7.15 (1H, d, 2.0)	111.2
8	-	162.4
8a	-	110.3
9	-	191.0
9a	-	114.5
10	-	183.5
3-CH_3	2.46 (3H, s)	22.0
3- *O*-γλυκοπυρανόση		
1’	5.01 (1H, d, 7.7)	104.3
2’	3.68 (1H, dd, 9.9 / 7.7)	74.8
3’	3.48 (1H, t, 9.9)	71.2
4’	3.55 (1H, *)	77.5
5’	3.55 (1H, *)	78.5
6’a	3.98 (1H, dd, 12.0 / 2.0)	62.6
6’b	3.78 (1H, dd, 12.0 / 5.0)	

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

Ο 8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης συναντάται σε είδη των γενών *Polygonum* (Zhao, *et al.*, 2017) (Sun, *et al.*, 2015) (Kuo, *et al.*, 2001), *Rumex* (Gautam, *et al.*, 2010) *(Lee, et al.*, 2005), *Rheum* (Wang, *et al.*, 2016) (Chen, *et al.*, 2016) και το *Rhamnus libanoticus* (Co§kun, *et al.*, 1990). Χαρακτηρίζεται από νευροπροστατευτική δράση (Wang, *et al.*, 2007), παρεμποδίζει την απόκριση του φλεγμονώδους παράγοντα HMGB1 και έχει δειχτεί ότι είναι δυνατό να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό παράγοντα για την αντιμετώπιση της σήψης ή/και του σηπτικού σοκ (Lee, *et al.*, 2013). Επίσης, σε συνδυασμό με την εμοδίνη αποδείχτηκε ικανός να επάγει τον πολλαπλασιαμό των κυττάρων MCF-7 (Matsuda, *et al.*, 2001).

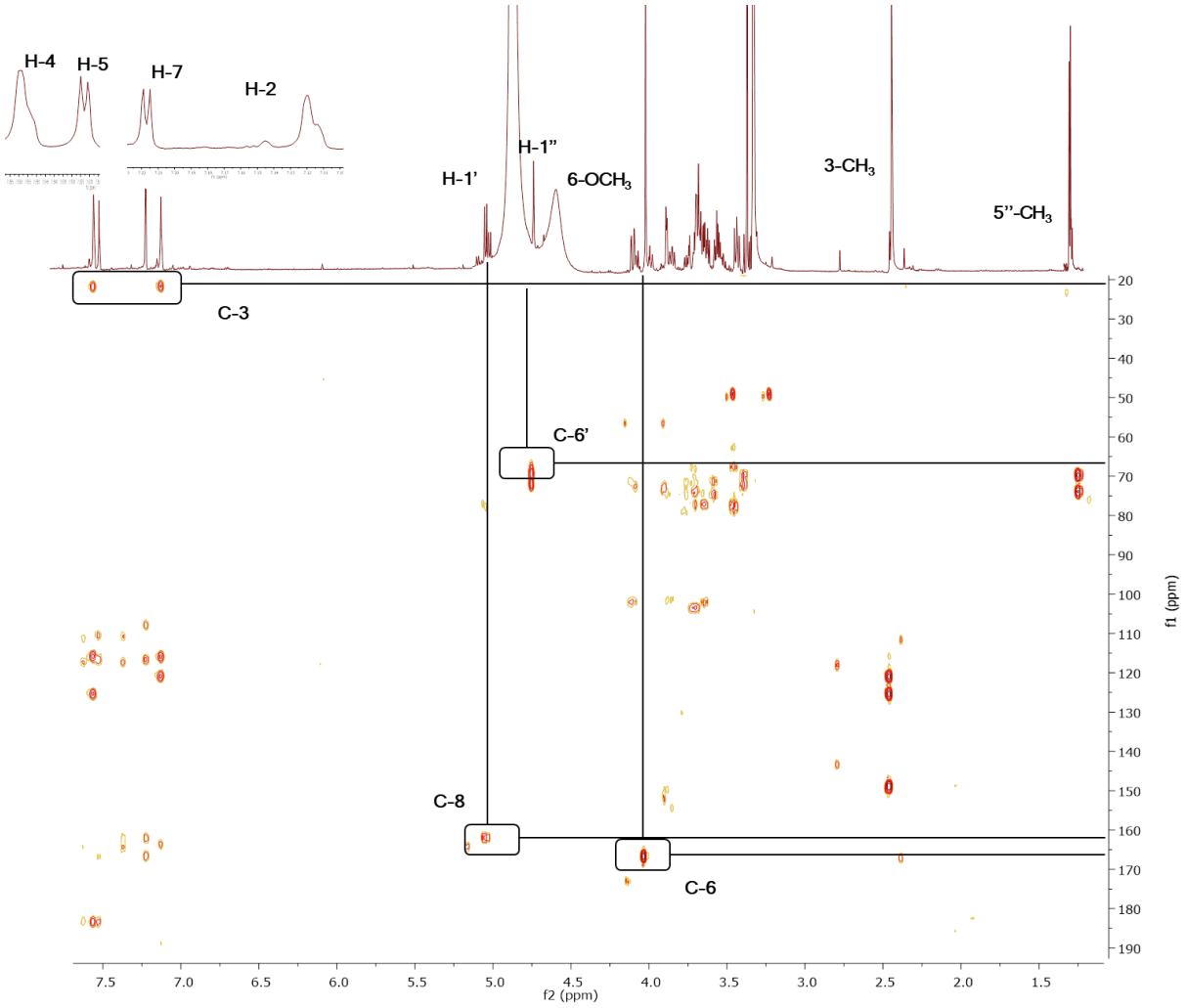
4.3.9.1.2 Μελέτη του κλάσματος RAM-F11

Το κλάσμα RAM-F11 επεξεργάστηκε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης MeOH και προέκυψαν οι ακόλουθοι μεταβολίτες:

- **8-*O*-*β*-ρουτινοσίδης της φυσιόνης (RAM2)**

Το φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 132) της φυσιόνης, η οποία αποτελεί το 6-*O*-μεθυλο- παράγωγο της εμοδίνης, παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα της τελευταίας. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται δύο απλές κορυφές σε *δ* 7.54 και 7.18, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4 και H-2, ενώ τα πρωτόνια H-5 και H-7 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές (*J* = 2.5 Hz) στα 7.52 και 7.21 ppm, αντίστοιχα. Τα τελευταία εμφανίζονται σαφώς αποθωρακισμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του μεταβολίτη RAM1 λόγω της παρουσίας της μεθοξυλομάδας στη θέση C-6, η οποία επαληθεύεται με το φάσμα HMBC από τη σύζευξη των πρωτονίων του μεθοξυλίου με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της προαναφερόμενης θέσης (*δ* 166.6). Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος

ξεχωρίζουν τα ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόσης και της ραμνόσης, τα οποία εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 5.04 (J = 7.7 Hz) και 4.70 (J = 1.4 Hz), αντίστοιχα. Ο μεθυλενικός άνθρακας της γλυκόσης συντονίζεται στα 67.6 ppm και παρουσιάζει στο φάσμα HMBC (εικόνα 132) σύζευξη με το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης, γεγονός που υποδηλώνει τη θέση σύνδεσης των σακχάρων μεταξύ τους. Στο ίδιο φάσμα είναι εμφανής η σύζευξη ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης και τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα της θέσης C-8.



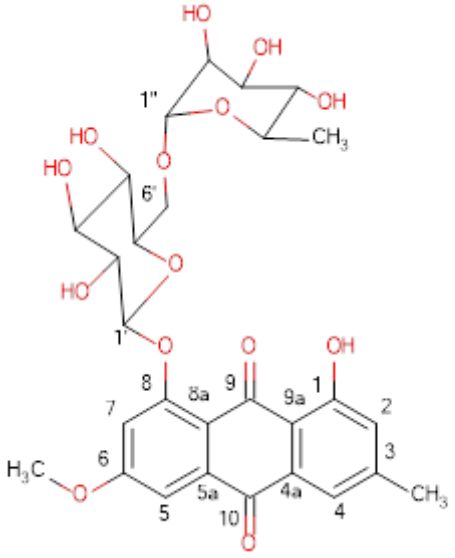
Εικόνα 132: Φάσμα ^{1}H NMR και HMBC της ένωσης RAM2

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RAM2 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC και παρατίθενται στον Πίνακα 121.

Ο 8-*O*-*β*-ρουτινοσίδης της φυσιόνης μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυσική πηγή, επομένως αποτελεί **νέο** φυσικό προϊόν. Ωστόσο, ο 8-*O*-*β*-γλυκοσίδης της φυσιόνης έχει απομονωθεί από αρκετά είδη του γένους *Polygonum* (Sun, *et al.*, 2015) *(Kuo, et al.*, 2001) και *Rheum* (Kubo, *et al.*, 1992).

Πίνακας 121: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM2

RAM2 (MeOD)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	163.3
2	7.18 (1H, s)	125.6
3	-	148.9
4	7.54 (1H, s)	121.1
4a	-	133.2
5	7.52 (1H, d, 2.5)	110.2
5a	-	136.4
6	-	166.6
7	7.21 (1H, d, 2.5)	108.0
8	-	162.6
9	-	191.0
9a	-	114.6
10	-	183.4
10a	-	
2-CH_3	2.4 (3H,s)	21.8
6-OCH_3	4.02 (3H, s)	56.7
	3- *O*-γλυκοπυρανόση	
1’	5.04 (1H, d, 7.7)	103.6
2’	3.68 (1H, *)	74.8
3’	3.44 (1H, t, 9.4)	71.5
4’	3.57 (1H, *)	77.5
5’	3.70 (1H, *)	77.3
6’a	4.10 (1H, dd, 11.6 / 2.0)	67.9
6’b	3.62 (1H, *)	
	6’- *O*-ραμνοπυρανόση	
1’’	4.73 (1H, d, 1.4)	102.1
2’’	3.89 (1H, dd, 3.5 / 1.5)	71.2
3’’	3.69 (1H, *)	72.3
4’’	3.36 (1H, *)	74.0
5’’	3.65 (1H, m)	69.7
5’’-CH_3	1.23 (3H, d, 6.5)	17.9

❖ **Ρουτινοσίδηστης τοραχρυσόνης (RAM3)**

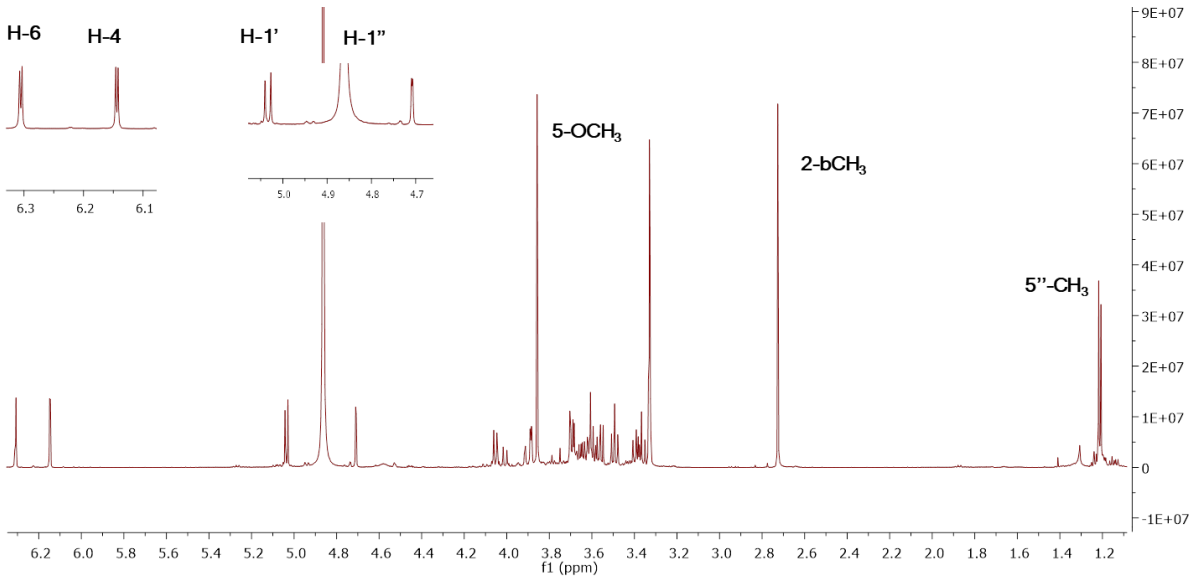
Ο μεταβολίτης RAM3 ταυτοποιήθηκε ως ο ρουτινοσίδηστης τοραχρυσόνης, ο οποίος έχει απομονωθεί στην παρούσα εργασία από το *Rhamnus sibthorpiana* και αναφέρεται ως μεταβολίτης RSM6 ο οποίος επίσης αποτελεί **νέο** φυσικό προϊόν. Αναλυτικά τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά περιγράφονται στην § 4.3.7.1.3.

4.3.9.1.3 Μελέτη του κλάσματος RAM-F12

Με τη εφαρμογή παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC στο κλάσμα RAM-F12, σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2/MeOH 90/10 επιτεύχθηκε η απομόνωση του μεταβολίτη RAM4, ο οποίος μετά τη φασματσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκε ως 4-*O*-μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη.

❖ **4-*O*-Μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη (RAM4)**

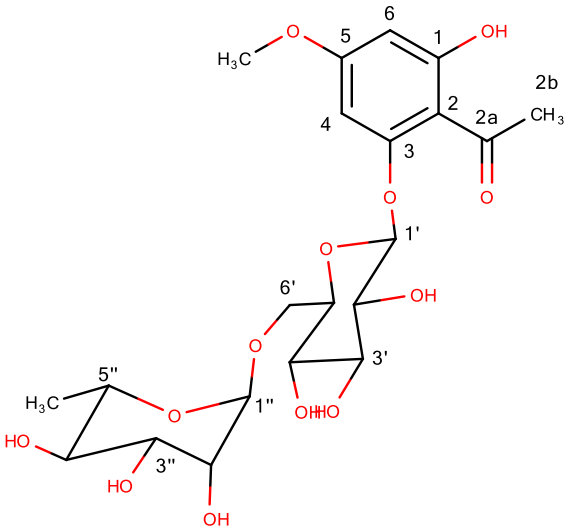
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR (εικόνα 133) και συγκεκριμένα σε δ 6.30 και 6.14 εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές (J = 2.3 Hz) οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 και H-3 της γενίνης. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τις συζεύξεις των προαναφερόμενων πρωτονίων με τους άνθρακες C-1 και C-4 που συντονίζονται στα 107.3 και 168.2 ppm. Επίσης, σύζευξη με τον C-4 παρουσιάζουν και τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας στα 3.86 ppm φανερώνοντας τη θέση σύνδεσή της στο βασικό σκελετό. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στα 5.03 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή (J = 7.9 Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στην ανωμερική θέση της γλυκόσης. Ο ανωμερικός άνθρακας συντονίζεται 102.1 ppm, ενώ η παρουσία γλυκόσης είναι σε συμφωνία και με την παρουσία του μεθυλενικού άνθρακα της θέσης C-6' στα 67.8 ppm. Η χημική μετατόπιση του τελευταίου υποδηλώνει τη σύνδεση της δεύτερης σακχαριδικής μονάδας σε αυτή τη θέση. Στα 4.71 ppm συντονίζεται μια διπλή κορυφή (J = 1.2 Hz), η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης. Ο ανωμερικός άνθρακας της ραμνόσης συντονίζεται στα 102.2 ppm, ενώ από το φάσμα HMBC επιβεβαιώνεται πως συνδέεται στη θέση C-6 της γλυκόσης λόγω της ^3J σύζευξης που παρατηρείται ανάμεσα στο προαναφερόμενο ανωμερικό πρωτόνιο και το μεθυλενικό άνθρακα C-6'. Το χαρακτηριστικό μεθύλιο της θέσης C-5 της ραμνόσης εμφανίζεται στα 1.21 ppm με τη μορφή διπλής κορυφής (J = 6.5 Hz) που ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια. Τέλος, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στα 2.72 ppm παρατηρούμε μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρια πρωτόνια και αντιστοιχεί στην ακετυλομάδα του βασικού σκελετού της ακετοφαινόνης. Στο φάσμα HMBC φαίνονται οι συζεύξεις των προαναφερόμενων πρωτονίων με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 205 ppm και τον αρωματικό άνθρακα C-1 της γενίνης στα 107.3 ppm.



Εικόνα 133: Φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης RAM4

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη RAM4, τα οποία αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Satake, *et al.*, 1991) και παρουσιάζονται στον πίνακα 122.

Πίνακας 122: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης RAM4

RAM4 (MeOD)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13}C NMR δ σε ppm**
1	-	107.3
2	-	162.1
3	6.14 (1H, d, 2.3)	95.8
4	-	168.2
5	6.30 (1H, d, 2.3)	95.4
6	-	161.7
2a	-	205.0
2b	2.73 (3H,s)	33.4
2- *O*-γλυκοπυρανόση		
1’	5.03 (1H, d, 7.9)	102
2’	3.57 (1H, dd, 7.9 / 9.9)	74.8
3’	3.39 (1H, t, 9.9)	71.5

4’	3.61 (1H, t, 9.9)	77.1
5’	3.49 (1H, m)	78.4
6’a	4.06 (1H, dd, 11.6 / 2.0)	67.6
6’b	3.60 (1H, *)	
	6’- *O*-ραμνοπυρανόση	
1’’	4.71 (1H, d, 1.2)	102.2
2’’	3.89 (1H, dd, 3.5 / 1.2)	72.0
3’’	3.69 (1H, dd, 9.5 / 3.5)	72.3
4’’	3.36 (1H, t, 9.5)	74.0
5’’	3.65 (1H, m)	69.8
6’’	1.21 (3H, d, 6.5)	17.7

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

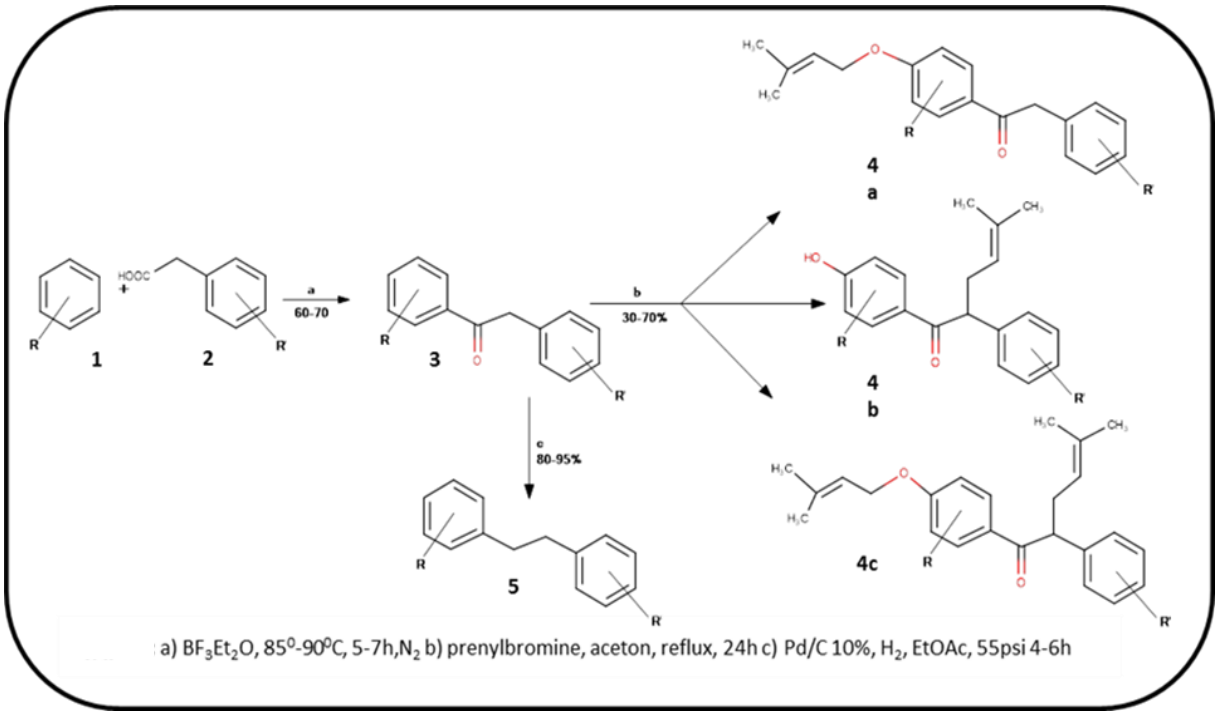
Μολονότι ο μεταβολίτης RAM4 έχει εντοπισθεί στο είδος *Rhamnus libanoticus* (Satake, *et al*., 1991) δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα η απομόνωσή του από το είδος *Rhamnus alpinus.*

5 Συνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόντων

Στο πλαίσιο της προσπάθειας ανεύρεσης νέων εκλεκτικών αναστολέων των οιστρογονικών υποδοχέων με σκοπό την αποτελεσματική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, ως την κύρια ανεπιθύμητη συνέπεια της εμμηνόπαυσης, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση αναλόγων φυσικών προϊόντων τα οποία είναι γνωστά ως φυτοοιστρογόνα. Ο σχεδιασμός και η επιλογή των παρασκευασθέντων ενώσεων βασίστηκε στα αποτελέσματα α) της *in silico* αξιολόγησης των φυσικών προϊόντων της χημειοθήκης του ΕΚΠΑ-ΕΧΦΠΦΧ, ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ), αλλά και β) προγενέστερων *in vitro* μελετών αξιολόγησης της (αντι)-οιστρογονικής ιδιότητας (βλέπε § 2.1) φυσικών προϊόντων που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν η ανάπτυξη δομικών αναλόγων των φυσικών ενώσεων με πιθανή οστεοπροστατευτική επίδραση ιδανικά μέσω εκδήλωσης 'SERM' ιδιοτήτων. Ανάμεσα στις δομές αναφοράς που προέκυψαν, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι δεοξυβενζοΐνες και οι ισοφλαβόνες, καθώς φάνηκε να προσδένονται σε μεγάλο βαθμό στον υποδοχέα οιστρογόνων γεγονός που επιβεβαιώνει την ήδη γνωστή οιστρογονική δράση τους. Έτσι, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην σύνθεση παραγώγων των ανωτέρω κατηγοριών, καθώς και δομικών αναλόγων τους όπως είναι τα χαλκονοειδή και τα στιλβενοειδή. Συνολικά, μέσω κατάλληλων δομικών τροποποιήσεων επιτεύχθηκε ο σχεδιασμός και η παρασκευή συνολικά 60 συνθετικών αναλόγων τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινολών.

5.1 Συνθετική παρασκευή αναλόγων δεοξυβενζοϊνών και διυδροστιλβενίων

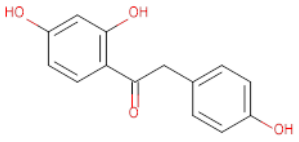
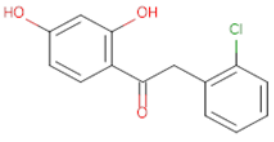
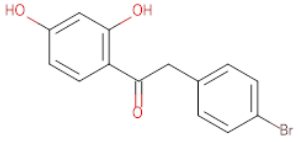
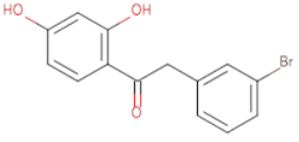
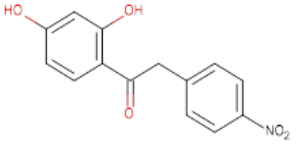
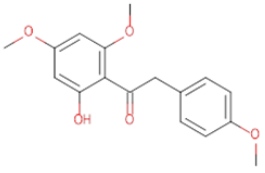
Οι δεοξυβενζοΐνες είναι φυσικά προϊόντα με ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον, έχουν απομονωθεί από χερσαίους και θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά περισσότερο διαδεδομένη είναι η συνθετική τους παρασκευή που στο παρελθόν έχει απασχολήσει και το εργαστήριό μας. Επίσης, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της συνθετικής παρασκευής των ισοφλαβονών, αλλά και βασικό δομικό σκελετό για την ανάπτυξη παραγώγων παραπλήσιων χημικών κατηγοριών, όπως είναι τα διυδροστιλβένια. Τα διυδροστιλβένια, σε συνδυασμό με τα στιλβένια, είναι μια αρκετά μελετημένη ομάδα φυσικών προϊόντων που απαντώνται σε πλήθως φυτικών οργανισμών και εμφανίζουν ένα ιδιαιτέρως ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Με βάση τα προαναφερόμενα, αποφασίσθηκε η συνθετική παρασκευή μιας σειράς δεοξυβενζοϊνών με ποικίλους υποκαταστάτες, πρενυλιωμένων παραγώγων τους και διυδροστιλβενίων από τις αντίστοιχες πρόδρομες δεοξυβενζοΐνες, σύμφωνα με το παρακάτω συνθετικό σχήμαακολουθήθηκαν και οι βασικοί σκελετοί των παραγώγων απεικονίζονται παρακάτω στο σχήμα 11.

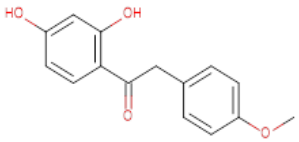
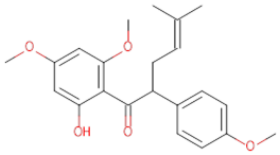
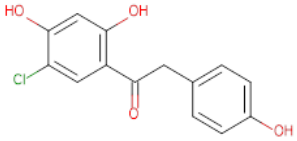
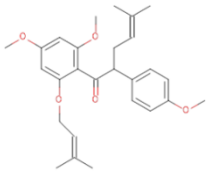
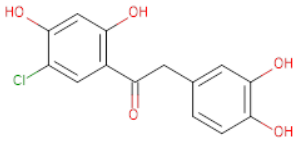
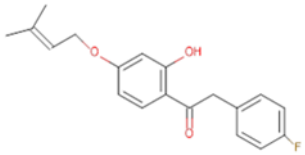
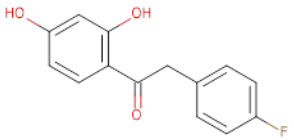
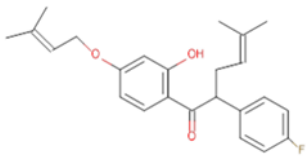
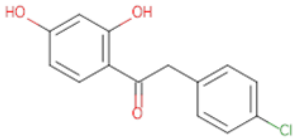
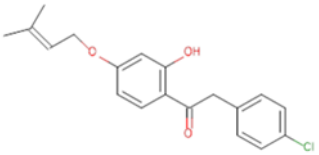
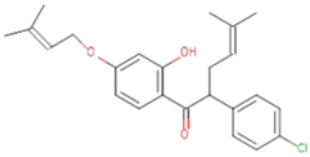
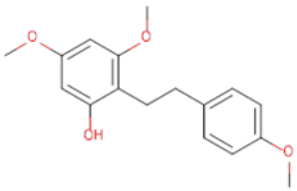
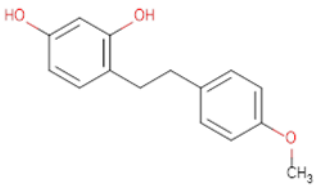
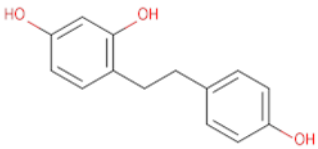
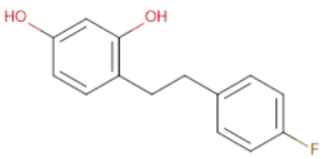
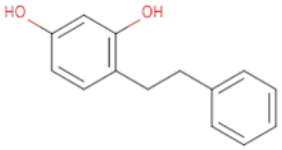
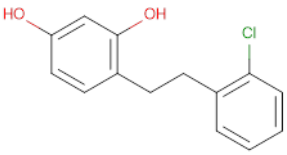


Σχήμα 11: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή αναλόγων δεοξυβενζοϊνών και διυδροστιλβενίων

Πιο συγκεκριμένα, ο βασικός σκελετός των δεοξυβενζοϊνών (**3**) προέκυψε μέσω της αντίδρασης ακυλίωσης **Friedel-Crafts**, μεταξύ μιας κατάλληλα υποκατεστημένης ρεσορκινόλης (**1**) και του κατάλληλα υποκατεστημένου φαινυλοξικού οξέος (**2**) με χρήση οξέων κατά Lewis. Στη συνέχεια με αντίδραση πρενυλίωσής προέκψαν τα **4a**, **4b** και **4c,** ενώ με αντίδραση καταλυτικής υδρογόνωσης, από τις δεοξυβανζοϊνες παραλάβαμε τα αντίστοιχα διυδροστιλβενικά παράγωγα (**5**). Οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν απεικονίζονται στο σχήμα 11 ενώ τα συνθετικά παράγωγα στον πίνακα 123.

Πίνακας 123: Δομές των δεοξυβενζών και διυδροστιλβενίων που συντέθηκαν

ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΙΝΕΣ			
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΔΟΜΗ**	**ΚΩΔΙΚΟΣ**	**ΔΟΜΗ**
SC1		**SC9**	
SC2		**SC10**	
SC3		**SC11**	

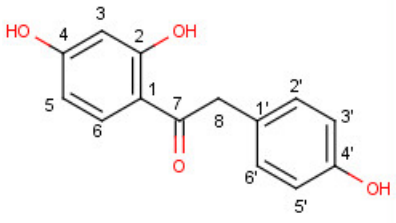
SC4		SC12	
SC5		SC13	
SC6		SC14	
SC7		SC15	
SC8		SC16	
SC17			
ΔΙΥΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΑ			
SC18		SC21	
SC19		SC22	
SC20		SC23	

5.1.1 Σύνθεση της 2,4,4΄-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC1)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 760 mg (5 mmol) 4-υδροξυφαινυλοξεικού οξέος προστέθηκαν 12.5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 85^0C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας για την απομόνωση της 2,4,4΄-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνης. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 89.7%.

Η 2,4,4΄-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνη ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4’-υδροξυφαινυλο)-αιθανόνη, εμφανίζει έντονη απορρόφηση στα 254 nm και έντονη κίτρινη χρώση έπειτα από την εμφάνιση με αντιδραστήριο θεϊικής βανιλλίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC1 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), και παρουσιάζονται στον πίνακα 124.

Πίνακας 124: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC1 **(SC1):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.5
2	-	166.2
3	6.31 (1H, d, 2.0)	104.3
4	-	165.7
5	6.43 (1H, dd, 8.0 / 2.0),	109.5
6	7.95 (1H, d, 8.0)	135.2
7	-	203.8
8	4.07 (2H, s)	44.9
1’	-	126.8
2’/6’	7.16 (2H, d, 8.0)	131.9
3’/5’	6.77 (2H, d, 8.0)	116.9
4’	-	157.4
OH-2	12.75 (1H, s)	-
1	-	113.5

Τα πρωτόνια των θέσεων Η-3 και Η-5 εμφανίζονται στα 6.31 και 6.43 ppm ως διπλή (d) και διπλή-διπλής (dd) κορυφές αντίστοιχα, ενώ το πρωτόνιο Η-6 στα 7.95 ppm ως διπλή (d) κορυφή. Τα προαναφερόμενα σήματα είναι χαρακτηριστικά της παρουσίας τρισυποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα. Το μεθυλένιο της θέσης C-a συντονίζεται στα 4.07 ppm, ελαφρώς

αποθωρακισμένο λόγω της καρβοξυλομάδας στη θέση a. Τα πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5' εμφανίζονται ως δύο διπλές (d) κορυφές που ολοκληρώνει η καθεμια για 2 πρωτόνια όπως και τα, γεγονός που συνάδει με την π-υποκατάστασης στον B δακτύλιο.

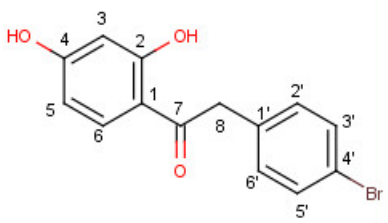
Η συνθετική περιγραφή της συγκεκριμένης ουσίας έχει αναφερθεί στο παρελθόν (Wahala, *et al.*, 1991)(Fokialakis, *et al.*, 2004) ενώ έχει απομονωθεί από το 'soybean miso', ένα παραδοσιακό κινεζικό τρόφιμο (Sugiyama, *et al.*, 2010), αλλά και το φυτικό είδος *Blumea balsamifera.* Τα αποτελέσματα των *in vitro* και *in silico* ελέγχων ανέδειξαν την αγωνιστική δράση έναντι του υποδοχέα οιστρογόνων ERα (Cao, *et al.*, 2013). Θεωρητικές μελέτες προσομοίωσης (*in silico*) αποκάλυψαν πως ο συγκεκριμένος μεταβολίτης προσδένεται πολύ ισχυρά με τη γλυκοπρωτεΐνη (SHBG) ανταγωνίζοντας τη σύνδεσή της με τα ενδογενή στεροειδή (Cherkasov, *et al.*, 2005). Η προαναφερόμενη μελέτη έθεσε τα θεμέλια για την ανακάλυψη νέων μη στεροειδών υποδοχέων της εν λόγω πρωτεΐνης (SHBG) με ενισχυμένες φαρμακολογικές ιδιότητες, καθώς μη φυσιολογικά επίπεδά της στο πλάσμα συνδυάζονται με την εμφάνιση πολυάριθμων ασθενειών συμπεριλαμβανομένης και της οστεοπόρωσης (Van Pttelgergh, *et al.*, 2004,) (Rapuri, *et al.*, 2004).

5.1.2 Σύνθεση της 4'-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC2)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 1,07 g (5 mmol) 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 5 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 55.4%.

Η ταυτοποίηση της 4'-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC2) ή 2-(4-βρωμοφαινυλο)-1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)αιθανόνης επιτεύχθηκε με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), ενώ τα αντίστοιχα δεδομένα παρουσιάζονται στον πίνακα 125. 'Οπως και στην περίπτωση της ουσίας SC1, οι κορυφές των πρωτονίων H-3, H-5 και H-6 του δακτυλίου A είναι χαρακτηριστικές 1,2,4-τρισυποκατεστημένου αρωματικού συστήματος. Επίσης, τα πρωτόνια του δακτυλίου B, H-2'/ H-6' και H-3'/ H-5', συντονίζονται στα 7.29 και 7.50 ppm εμφανώς αποθωρακισμένα λόγω της παρουσίας Br στη θέση 4' της ένωσης. Επίσης, ο άνθρακας C-4' εμφανίζεται σαφώς πιο θωρακισμένος (δ 120.8) σε σύγκριση με τον αντίστοιχο άνθρακα (δ 157.4) της ένωσης SC1. Η προαναφερόμενη υποκατάσταση φαίνεται να επηρεάζει και τη μετατόπιση της μεθυλενομάδας στη θέση C-b, η οποία συντονίζεται στα 4.32 ppm

Πίνακας 125: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC2 **(SC2):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	-	165.7
3	6.33 (1H, d, 2.2)	108.8
4	-	165.7
5	6.45 (1H, dd, 8.8 / 2.2),	107.9
6	7.95 (1H, d, 8.8)	113.1
7	-	202.6
8	4.32 (2H, s)	43.7
1’	-	135.4
2’/6’	7.29 (2H, d, 8.8)	131.8
3’/5’	7.50 (2H, d, 8.8)	131.5
4’	-	120.8
OH-2	12.60 (1H, s)	-

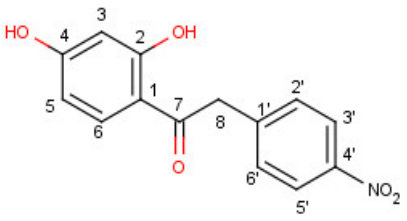
Το παράγωγο SC2 δεν έχει απομονωθεί ποτέ ως φυσικό προϊόν αλλά συναντάται μόνο ως συνθετικό παράγωγο. Είναι γνωστό πως τα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα χαρακτηρίζονται από φυτοοιστρογόνο δράση. Πράγματι, στη συγκεκριμένη ένωση αποδίδεται τόσο αγωνιστική δράση στο σκελετικό ιστό, αυξάνοντας την οστεοβλαστική δραστηριότητα, όσο και ανταγωνιστική δράση έναντι του υποδοχέα ERβ και την ανάπτυξη ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων. Με βάση τα προαναφερόμενα η δεοξυβενζοϊνη SC2 καθίσταται ικανός ‘SERM’ παράγοντας (Papoutsi, et al., 2007). Μελέτη της κυτταροτοξικότητας και ανοσοκατασταλτικής δράσης μέσω αναστολής των anti-CD3/anti-CD28 η αντίστοιχη οξίμη του εν λόγω παραγώγου έδειξε χαμηλή κυτταροταξικότητα και ισχυρή ανοσοκαταστολή ανάμεσα σε άλλα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα (Li, *et al.*, 2010,).

5.1.3 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4’-νιτρο-δεοξυβενζοϊνης (SC3)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 850 mg (5 mmol) 4-νιτροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90^0C υπό συνεχή ανάδευση για 4 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 58.04%.

Η δομή της 2,4-διυδροξυ-4'-νιτροδεοξυβενζοΐνης (SC3) ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)- 2-(4-νιτροφαινυλο)-αιθανόνης αποδόθηκε με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων αποτυπώνονται στον πίνακα 126.

Πίνακας 126: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC3

(SC3):(Me_2CO-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	113.4
2	-	166.2
3	6.34 (1H, d, 2.0),	104.1
4	-	166.2
5	6.48 (1H, dd, 8.0 / 2.0)	109.9
6	7.98 (1H, d, 8.0)	134.5
7	-	201.6
8	4.55 (2H, s)	45.1
1'	-	143.6
2'/6'	7.63 (2H, d, 8.0)	132.4
3'/5'	8.21 (2H, d, 8.0)	124.8
4'	-	148.2
OH-2	12.47 (1H, s)	-

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως στην περίπτωση αυτή τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζονται ιδιαίτερα αποθωρακισμένα, με τα H-2'/H-6' και H-3'/H-5' να συντονίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.63 και 8.21 ppm απαρτίζοντας ένα χαρακτηριστικό π-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Το γεγονός ότι τα πρωτόνια συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία οφείλεται στην ύπαρξη της NO_2 ομάδας στη θέση 4' του δακτυλίου, η οποία φαίνεται να συντελεί στην αποθωράκιση των πρωτονίων της θέσης C-b (δ 4.55) καθώς και του άνθρακα της θέσης 1' που συντονίζεται στα 143.6 ppm.

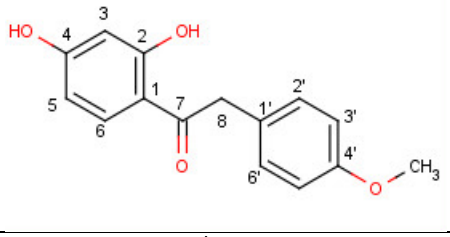
5.1.4 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-μεθοξυδεοξυβενζοΐνης (SC4)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 830 mg (5 mmol) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε

χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 41.2%.

Πίνακας 127: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC4

(SC4):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.4
2	-	166.6
3	6.32 (1H, d, 2.7),	104.2
4	-	165.9
5	6.40 (1H, dd, 8.8 / 2.7)	109.5
6	7.91 (1H, d, 8.8)	135.0
7	-	203.9
8	4.2 (2H, s, CH_2)	44.7
1’	-	127.9
2’/6’	7.2 (2H, d, 8.8)	132.1
3’/5’	6.9 (2H, d, 8.8),	115.3
4’	-	159.7
4’-OCH_3	3.76 (3H, s)	56.5
OH-2	12.7 (1H, s)	-

Οι χημικές μετατοπίσεις της 2,4-διυδροξυ-4’-μεθοξυδεοξυβενζοΐνης ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)αιθανόνης} παρουσίασαν υψηλές ομοιότητες με εκείνες της ουσίας (SC1) όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της δομικής τους ομοιότητας. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στην ύπαρξη μιας μεθοξυλομάδας στη θέση 4’ του δακτυλίου Β, η οποία εμφανίζεται στα 3.76 ppm ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια, με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 56.5 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC4 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 127.

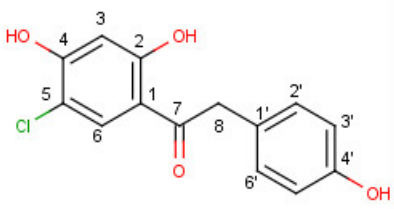
Το συγκεκριμένο συνθετικό ανάλογο έχει μελετηθεί αρκετά και εμφανίζεται ως ικανός αντιοξειδωτικός παράγοντας και ως μέτριος αναστολέας του ενζύμου τυροσινάση. Η πλούσια αντιοξειδωτική ικανότητα των δεοξυβενζοϊνών συνετέλεσε στην απόφαση για την αξιολόγηση της αγγειοδιασταλτικής τους ικανότητας, όπου το εν λόγω παράγωγο αναδείχθηκε ως σημαντικός αναστολέας της επαγόμενης από το KCl αρτηριακής συστολής (Lu, *et al.*, 2010). Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε το SC4, ανάμεσα σε παράγωγα χαλκονών και στιλβενίων, ως ικανό αναστολέα του ενζύμου διυδροφολική αναγωγάση και αξιόλογο αντιμικροβιακό παράγοντα (Srinivasan, *et al.*, 2017).

5.1.5 Σύνθεση της 2,4,4′-τριυδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC5)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) 4-χλωρορεσορκινόλης (1,3-διυδροξυ-4-χλωροβενζόλιο) και 760 mg (5 mmol) 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90^0C υπό συνεχή ανάδευση για 7 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 56.3%.

Δομικά η 2,4,4'-τριυδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνη (SC5) ή 1-(2,4-διυδροξυ-5-χλωρο-φαινυλο)-2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόνη διαφέρει από την (SC1) στην υποκατάσταση της θέσης 5 του δακτυλίου Α από ένα άτομο Cl. Έτσι, στο φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης παρατηρούμε δύο απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμια, σε *δ* 6.50 και 8.09 που αντιστοιχούν στα H-3 και H-6, αντίστοιχα. Η αποθωράκιση του πρωτονίου 6 οφείλεται στη γειτνίαση με το Cl της θέσης 5 του δακτυλίου Α, ενώ όπως φαίνεται και στον πίνακα 128 τα υπόλοιπα πρωτόνια και οι άνθρακες συντονίζονται στα αναμενόμενα πεδία. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC5 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 128: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC5

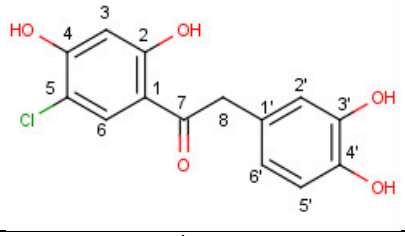
(SC5):(Me_2CO-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	113.4
2	-	164.5
3	6.50 (1H, s)	105.6
4	-	160.5
5	-	114.0
6	8.09 (1H, s)	134.2
7	-	203.4
8	4.25 (2H, s)	45.2
1'	-	127.9
2'/6'	7.17 (2H, d, 8.2)	132.1
3'/5'	6.80 (2H, d, 8.2)	116.6
4'	-	157.4
OH-2	12.58 (1H, s)	-

5.1.6 Σύνθεση της 2,4,3',4'-τετραυδροξυ-5-χλωρο-δεοξυβενζοΐνης (SC6)

Σε μίγμα 350 mg (5 mmol) 4-χλωρορεσορκινόλης (1,3-διυδροξυ-4-χλωροβενζόλιο) και 760 mg (5 mmol) 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 6,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90^0C υπό συνεχή ανάδευση για 5 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 34.0%. Η 2,4,3',4'-τετραυδροξυ-5-χλωρο-δεοξυβενζοΐνη ή 1-(2,4-διυδροξυ-5-χλωροφαινυλο)-2-(3,4-υδροξυφαινυλο)αιθανόνη διαφέρει από την (SC5) στην υποκατάσταση OH στη θέση 3' του δακτυλίου Β. Έτσι, στο φάσμα ^{1}H-NMR σε δ 6.83 συναντάμε μια διπλή κορυφή (J = 2.0 Hz) που αντιστοιχεί στο H-2', σε δ 6.77 εμφανίζεται το H-5' ως διπλή κορυφή (J = 8.0 Hz), ενώ το H-6' συντονίζεται ως dd κορυφή (J = 8.0 / 2.0 Hz) στα 6.68 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC6 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 129.

Πίνακας 129: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC6

(SC6):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.6
2	-	165.1
3	6.50 (1H, s)	105.6
4	-	160.1
5	-	114.0
6	8.05 (1H, s)	134.2
7	-	203.6
8	4.17 (2H, s, CH_2)	45.2
1'	-	127.3
2'	6.83 (2H, d, 2.0)	117.7
3'	-	145.6
4'	-	145.6
5'	6.77 (2H, d, 8.0),	113.6
6'	6.68 (2H, dd, 8.0 / 2.0)	122.2
OH-2	12.60 (1H, s)	

Η συνθετική παρασκευή του συγκεκριμένου παραγώγου, όπως και του παραγώγου SC10, έχει περιγραφεί στο παρελθόν από την ερευνητική μας ομάδα (Fokialakis, *et al.*, 2004), ενώ μέχρι σήμερα εκτός από την διερεύνηση της οιστρογόνου δράσης δεν έχει αξιολογηθεί έναντι άλλων βιολογικών στόχων.

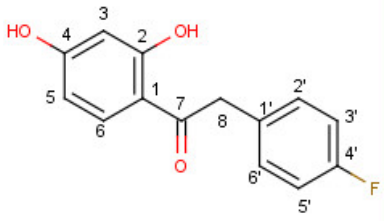
5.1.7 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-φθορο-δεοξυβενζοΐνης (SC7)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 770 mg (5 mmol) 4-φθοροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90^0C υπό συνεχή ανάδευση για $4^{1/2}$ ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 52,8%.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 130, η 2,4-διυδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνη ή 1-(2,4-υδροξυφαινυλο)- 2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανόνη παρουσιάζει παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις με τις ουσίες (SC1-4). Και σε αυτή την περίπτωση η ύπαρξη του φθορίου ως υποκαταστάτη στη θέση 4' του δακτυλίου Β φαίνεται να αποθωρακίζει τα πρωτόνια H-2'/6' και H-3'/5'. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC7 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 130: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC7

(SC7):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.7
2	-	166.6
3	6.33 (1H, d, 2.2)	104.3
4	-	160.1
5	6.45 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	109.5
6	7.97 (1H, d, 8.8)	134.9
7	-	203.1
8	4.32 (2H, s)	44.5
1'	-	132.6
2'/6'	7.36 (2H, d, 8.8)	133.3
3'/5'	7.10 (2H, d, 8.8)	116.5
4'	-	163.2
OH-2	12.6 (1H, s)	-

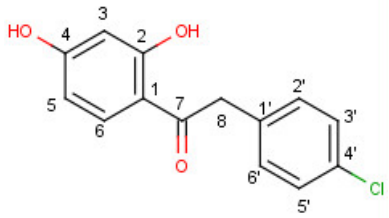
Το συγκεκριμένο παράγωγο σε προηγούμενη μελέτη μας ως προς την ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου τυροσινάση επέδειξε μέτρια δραστικότητα *(Vontzalidou, et al.*, 2012) βλ. κεφάλαιο 8.

5.1.8 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC8)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 850 mg (5 mmol) 4-χλωροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120^0C υπό συνεχή ανάδευση για $4^{1/2}$ ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκς με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση, το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 28,5%.

Ομοίως, στην περίπτωση της 2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης ή 1-(2,4-υδροξυφαινυλο)- 2-(4-χλωροφαινυλο)αιθανόνης η διαφορά εντοπίζεται στην υποκατάσταση Cl στη θέση 4' του δακτυλίου Β, γεγονός το οποίο φαίνεται να επηρεάζει τα πρωτόνια Η-2'/ Η-3'/ Η-5'/ Η-6'. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια στα 7.35 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC8 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 131.

Πίνακας 131 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC8 **(SC8):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	-	166.7
3	6.33 (1H, d, 2.2)	104.3
4	-	165.8
5	6.46 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	109.8
6	7.96 (1H, d, 8.8)	134.8
7	-	203.1
8	4.34 (2H, s, CH_2)	44.8
1'	-	132.6
2'/3'/5'/6	7.35 (4H, s)	133-129
4'	-	163.2

OH-2	12.6 (1H, s)	-

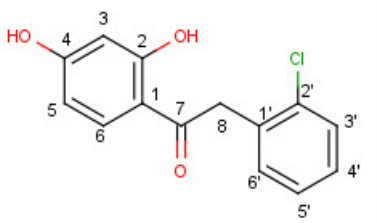
Ομοίως και στην περίπτωση της 2,4-διυδροξυ-4'-χλωρο-δεοξυβενζοΐνης ή {1-(2,4-υδροξυφαινυλ)- 2-(4-χλώροφαινυλ)-αιθανόνης} η διαφορά εντοπίζεται στην υποκατάσταση Cl στη θέση 4' του δακτυλίου Β γεγονός που φαίνεται να επηρεάζει τα πρωτόνια H-2'/3'/5'/6'. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια στα 7.35 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC8 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 131.

Όπως και προηγουμένως, η συγκεκριμένη ουσία συναντάται μόνο ως συνθετικό παράγωγο ενώ το μετρονιδιαζολικό της ανάλογο μεταξύ άλλων επέδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή ιδιότητα. η δεοξυβενζοΐνη ελέγθηκε και ως προς τη δράση της έναντι του *Helicobacter pylori* όπου δεν αποδείχθηκε τόσο δραστική όσο το αντίστοιχο μετρονιδιαζολικό της παράγωγο (Luo, *et al.*, 2010).

5.1.9 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-2'-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC9)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 850 mg (5 mmol) 2-χλωροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για $4^{1/2}$ ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 55,6%. Η 2,4-διυδροξυ-2'-χλωροδεοξυβενζοΐνη ή 1-(2,4-υδροξυφαινυλο)-2-(2-χλωροφαινυλο)αιθανόνη, διαθέτει 2'-Cl υποκατάσταση στο δακτύλιο Β, γεγονός που διαφοροποιεί τις χημικές μετατοπίσεις αλλά κυρίως την πολλαπλότητα των πρωτονίων του δακτυλίου. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια H-3'/H-6' εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια στα 7.45-7.40 ppm, ενώ τα H-4'/H-5' συτονίζονται στα 7.32-7.29 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC9 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 132 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC9 (SC9):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.5
2	-	166.7
3	6.35 (1H, d, 2.2)	104.3
4	-	165.4
5	6.49 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	109.7
6	7.99 (1H, d, 8.8)	134.5
7	-	202.4
8	4.53 (2H, s)	43.8
1’	-	133.6-130.6
2’	-	133.6-130.6
3’	7.45-7.40 (2H, m)	133.6-130.6
4’	7.32-7.29 (2H, m)	130.1
5’	7.32-7.29 (2H, m)	128.5
6’	7.45-7.40 (2H, m)	134.0
OH-2	12.60 (1H, s)	

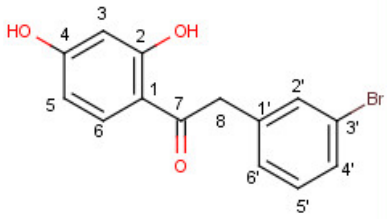
Η σύνθεση του συγκεκριμένου δεοξυβενζοϊνικού παραγώγου αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας (Vontzalidou, *et al.*, 2012) και μέχρι σήμερα δεν έχει διερευνηθεί η πιθανή οστεοπροστατευτική δραστικότητα.

5.1.10 Σύνθεση της 3’-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC10)

Σε μίγμα 550 mg (5 mmol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 1,07 g (5 mmol) 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 40,6%. Στην περίπτωση της 3’-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης, η 3’-Br υποκατάσταση του δακτυλίου Β συντελεί στη μεταβολή της μορφής των πρωτονίων του συγκεκριμένου δακτυλίου σε σύγκριση με τις προαναφερόμενες περιπτώσεις. Χαρακτηριστκή είναι η τριπλή (t) κορυφή του H-2’, λόγω της σύζευξης που παρουσιάζει με τα H-6’/H-4’, καθώς επίσης και οι τριπλές διπλών (dt) κορυφές των πρωτονίων H-

4’ και Η-6’. Στον πίνακα 133 αποτυπώνονται οι χημικές μετατοπίσεις των υπόλοιπων πρωτονίων και ανθράκωνπου αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 133:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC10 **(SC10):(Me_2CO-d^6)**



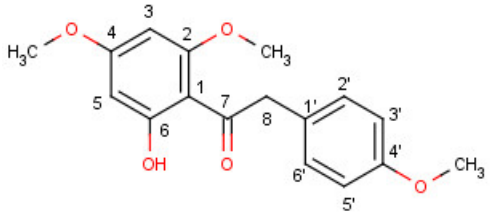
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	-	166.7
3	6.34 (1H, d, 2.4)	104.3
4	-	166.7
5	6.47 (1H, dd, 8.2 / 2.4)	109.6
6	7.97 (1H, d, 8.2)	134.9
7	-	202.7
8	4.36 (2H, s)	45.2
1’	-	138.9
2’	7.55 (1H, t, 1.5)	122.6
3’	-	133.0
4’	7.44 (1H, dt, 8.2 / 1.5)	130.1
5’	7.29(1H, t, 8.2)	131.8
6’	7.35 (1H, dt, 8.2 / 1.5)	130.5
OH-2	12.60 (1H, s)	-

5.1.11 Σύνθεση της 2,4,4’-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC11)

Σε μίγμα 1g (6 mmol) τριμεθοξυβενζολίου (1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο) και 1 g (6 mmol) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2,5 ml BF_3_Et_2O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 95 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκδιαδοχικές εκχυλίσεις με οξεικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια εξατμίστηκε ο οργανικός ιαλύτης με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 900 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται σε 42,5%.

Στην περίπτωση της 2,4,4’-τριμεθοξυ-6-υδροξυ-δεοξυβενζοΐνης ή 1-(4,6-διμεθοξυ-2-υδροξυφαινυλο)- 2-(4-μεθοξυφαινυλο)αιθανόνης, όπως παρατηρούμε και στον πίνακα 134, τα πρωτόνια του δακτυλίου Α εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης *J* = 2.3 Hz, ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά σήματα της π-υποκατάστασης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC11 αποδόθηκαν με τη χρήση φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

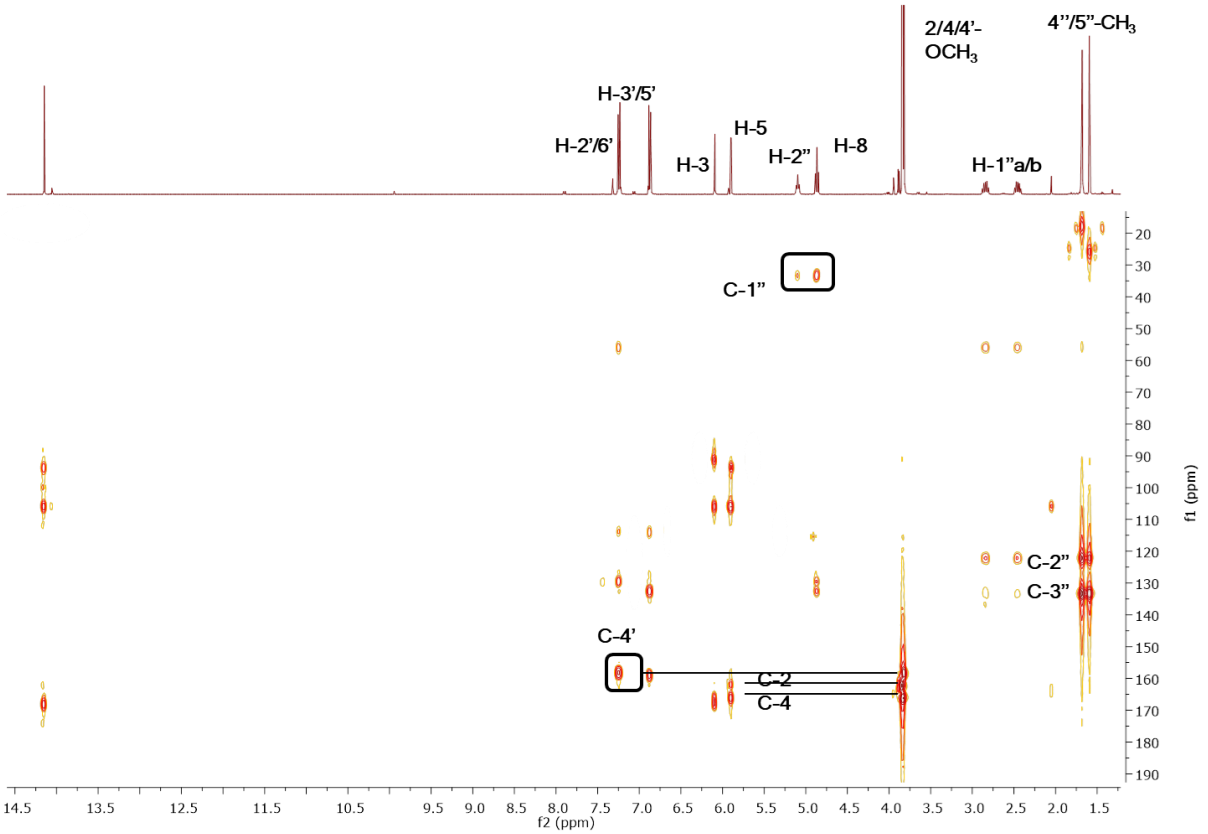
Πίνακας 134:Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC11 (SC11):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	-	167.6
3	6.04 (1H, d, 2.3)	95.2
4	-	163.7
5	6.07 (1H, d, 2.3)	92.2
6	-	167.6
7	-	204.3
8	4.25 (2H, s)	50.5
1’	-	128.9
2’/6’	7.16 (2H, d, 8.2)	131.9
3’/5’	6.85 (2H, d, 8.2)	115.2
4’	-	159.6
2-OCH_3	3.85 (3H, s)	56.4
4-OCH_3	3.94 (3H, s)	56.4
4’-OCH_3	3.76 (3H, s)	56.1
OH-6	13.84 (1H, s)	-

5.1.12 Σύνθεση της 8-πρενυλο-2,4,4’-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC12) και της της 6-*O*-,8-C-διπρενυλο-2,4,4’-τριμεθοξυ-6-υδροξυδεοξυβενζοΐνης (SC13)

Σε μίγμα 70mg (0,23 mmol) της δεοξυβενζοΐνης SC11 και 222,5mg (1.61 mmol) ανθρακικού καλλίου (K_2CO_3) σε 4 mL ακετόνης, προστέθηκαν στάγδην 25 μl πρενυλοβρωμιδίου ($(CH_3)_2C=CHCH_2Br$). Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 55 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης, έκπλυση με ακετόνη, συμπύκνωση του διηθήματος και επαναδιάλυσή του σε νερό, ενώ ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με υδατικό διάλυμα NaOH 2N, συλλέχθηκε η οργανική φάση και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση των ενώσεων SC12 και SC13 . Η απόδοση της αντίδρασης, όσον αφορά την παρασκευή του κύριου προϊόντος (SC12), υπολογίσθηκε σε 58.2%.

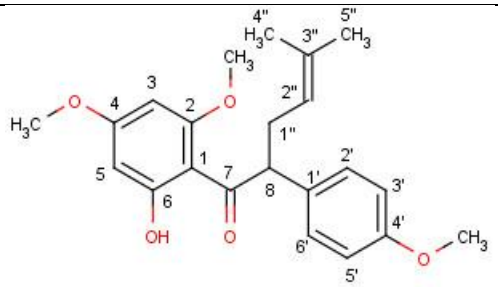


Εικόνα 134: Φάσμα ^{1}H -NMR και HMBC της ένωσης SC12

Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 134) της 8-πρενυλο-2,4,4'-τριμεθοξυ-2-υδροξυδεοξυβενζοϊνης παρατηρούμε ότι τα πρωτόνια του δακτυλίου Α εμφανίζονται ως διπλές κορυφές (J = 2.3 Hz), ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου Β συντονίζονται σε δ 7.18 και 6.85 ως δύο διπλές κορυφές (J = 8.2 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό π-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Επίσης, χαρακτηριστικό είναι το πρωτόνιο της θέσης 2'' της πρενυλομάδας, το οποίο εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή λόγω των συζεύξεων τόσο με τα πρωτόνια της μεθυλενομάδας της θέσης C-1'' όσο και με τις μεθυλομάδες των θέσεων 4'' και 5''. Η απουσία των μεθυλενικών πρωτονίων της θέσης C-8, τα οποία στην περίπτωση του δεοξυβενζοϊνικού παραγώγου SC11 συντονίζονται στα 4.25 ppm, συνάδει με τη σύνδεση της πρενυλομάδας στη συγκεκριμένη θέση. Το πρωτόνιο H-8, εμφανίζεται ως τριπλή (t) κορυφή με J = 7.4 Hz, λόγω σύζευξης με τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης C-1''. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη των μεθυλενικών πρωτονίων H-1'' με τον άνθρακα C-8 στα 56.2 ppm, όπως επίσης και του μεθυλενικού άνθρακα C-1'' (δ 33.6) με τα πρωτόνια H-1'' (δ 5.09) και H-8 (δ 4.80). Τα μεθύλια της πρενυλομάδας συντονίζονται στα 1.63 και 1.53 ppm ως απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια. Οι θέσεις σύνδεσης των μεθοξυομάδων στις θέσεις C-2, C-4 και C-4' προσδιορίζονται από το φάσμα HMBC λόγω σύζευξής τους με τους αντίστοιχους οξυγονωμένους άνθρακες. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC12 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC). **Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά**.

Πίνακας 135 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC12

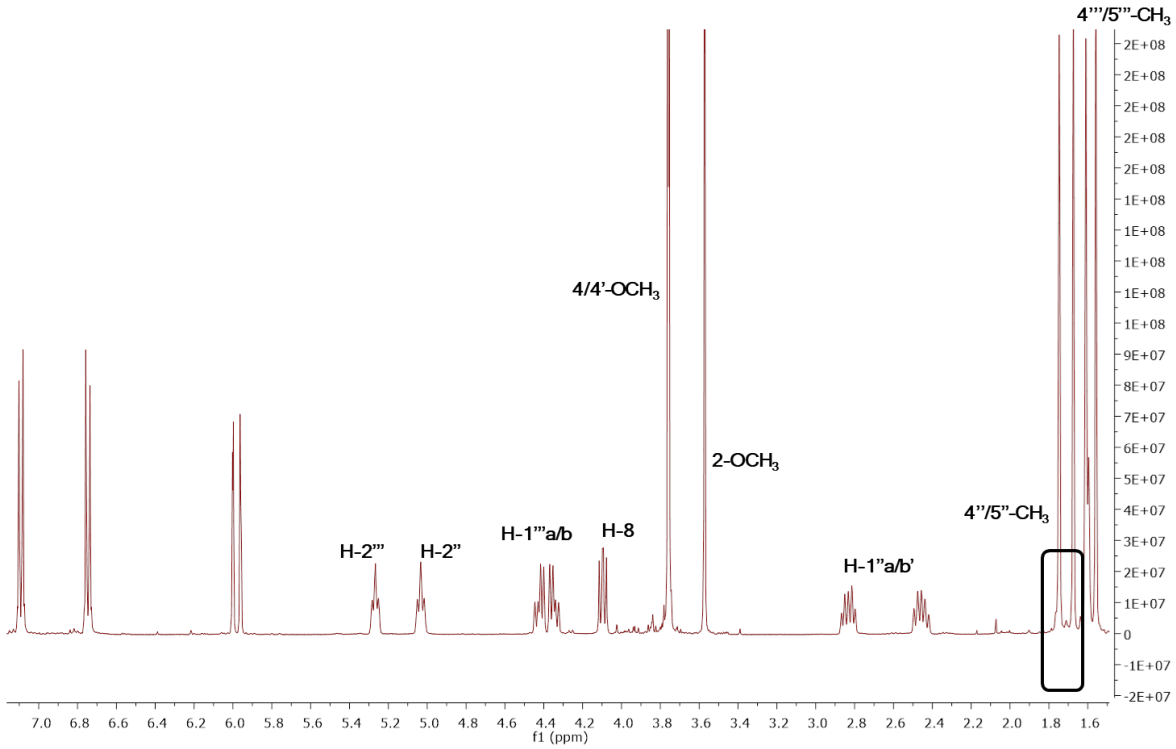
(SC12):(CDCl$_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	116.0
2	-	162.6
3	5.84 (1H, d, 2.3)	101.1
4	-	166.3
5	6.04 (1H, d, 2.3)	103.0
6	14.08 (1H, s, 2-OH)-	167.6
7	-	205.7
8	4.80 (1H, t, 7.4)	56.2
1’	-	116.0
2’/6’	7.18 (2H, d, 8.2)	129.7
3’/5’	6.85 (2H, d, 8.2)	115.2
4’	-	158.3
2-OCH$_3$	3.84 (3H, s)	55.3
4-OCH$_3$	3.83 (3H, s)	55.3
4’-OCH$_3$	3.82 (3H, s)	55.3
8-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’a	2.78 (1H, m)	33.6
1’’b	2.40 (1H, m)	
2’’	5.09 (1H, m)	122.0
3’’	-	132.2
4’’	1.62	26.0
5’’	1.54	18.2

Το διπρενυλιωμένο παράγωγο **SC13** προέκυψε από την αντίδραση παρασκευής του προιόντος **SC12**, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αλλά δεν ήταν το κύριο προϊόν της αντίδρασης με την απόδοση σχηματισμού του να υπολογίζεται σε 23.2%. Στο φάσμα ^{1}H-NMR (εικόνα 135) της ένωσης **SC13** εντοπίζονται τα σήματα των δύο πρενυλομάδων, από τις οποίες η μία παρουσιάζει ανάλογα σήματα με την πρενυλομάδα του προϊότος **SC12**, ενώ τα μεθυλενικά πρωτόνια της δεύτερης εμφανίζονται εμφανώς αποθωρακισμένα στα 4.41 και 4.36 ppm (όπως και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 68.7 ppm) λόγω της σύνδεσης μέσω γέφυρας οξυγόνου στη θέση C-6 του βασικού σκελετού. Πράγματι, στο φάσμα HMBC είναι εμφανής η σύζευξη ανάμεσα στα προαναφερόμενα μεθυλενικά πρωτόνια και ένα οξυγονωμένο άνθρακα στα 157.4 ppm, ο οποίος αντιστοιχεί στον C-6. Το χαρακτηριστικό H-2’’’ συντονίζεται στα 5.28 ppm ως πολλαπλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 120.7 ppm και παρουσιάζει σύζευξη με δύο κορυφές μεθυλίων στα 1.70 και 1.67 ppm που αντιστοιχούν στις θέσεις 4’’’ και 5’’’ της δεύτερης πρενυλομάδας. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC13 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και

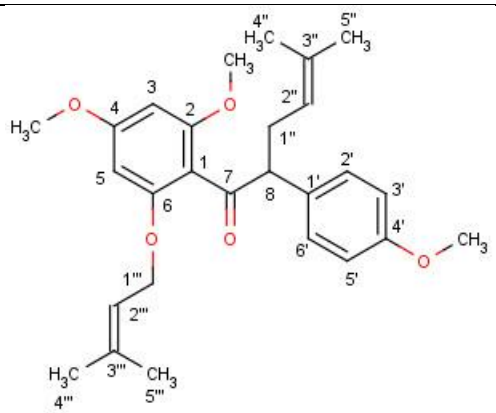
περιλαμβάνονται στον πίνακα 136. **Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.**



Εικόνα 135: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC13

Πίνακας 136: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC13

(SC13):(CDCl$_3$)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	116
2	-	158.2
3	5.96 (1H, d, 2.3)	91.0
4	-	158.5
5	6.0 (1H, d, 2.3)	89.0
6	-	157.4
7	-	205.7
8	4.09 (1H, m)	57.0
1'	-	116.0
2'/6'	7.09 (2H, d, 8.2)	130.0
3'/5'	6.75 (2H, d, 8.2)	113.8
4'	-	158.1

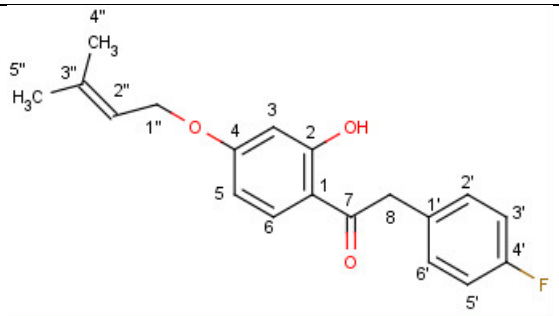
2-OCH_3	3.57 (3H, s)	58.4
4-OCH_3	3.75 (3H, s)	58.2
4'-OCH_3	3.76 (3H, s)	58.2
8-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1''a	2.83 (1H, m)	33.6
1''b	2.46 (1H, m)	
2''	5.03 (1H, m)	122.7
3''	-	131.8
4''	1.6 (3H, s)	26.0
5''	1.56 (3H, s)	18.0
4-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1'''a	4.41 (1H,m)	68.7
1'''b	4.36 (1H, m)	
2'''	5.28 (1H, m)	120.7
3'''	-	137.3
4'''	1.7 (3H, s)	26.2
5'''	1.67 (3H, s)	18.5

5.1.13 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-4-*O*-πρενυλο-4'-φθορο -δεοξυβενζοϊνης (SC14) και της 4-*O*-,8-*C*-διπρενυλο-2,4-διυδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοϊνης (SC15)

Σε μίγμα 102 mg (0,41 mmol) της δεοξυβενζοϊνης SC7 και 226,5 mg (1.64 mmol) ανθρακικού καλλίου (K_2CO_3) σε 4 mL ακετόνης, προστέθηκαν στάγδην 71,6 μl (0,615 mmol) πρενυλοβρωμιδίου ($(CH_3)_2C=CHCH_2Br$). Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 55 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 6 ώρες. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης, έκπλυση με ακετόνη και συμπύκνωση του διηθήματος. Ακολούθησε επαναδιάλυση σε νερό και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με υδατικό διάλυμα NaOH 2N και απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης με απόσταξη υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας από όπου παραλάβαμε δύο προϊόντα. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης ήταν η πρενυλιωμένη δεοξυβενζοϊνη **SC14**, ενώ η απόδοση παρασκευής της προσδιορίστηκε σε 58.2%.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR της ένωσης **SC14** συναντάμε τις αναμενόμενες κορυφές για την 1,4-δισ- και την 1,2,4-τρισ- υποκατάσταση των δακτυλίων B και A, αντιστοίχως. Τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-1'' συντονίζεται ως διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια με σταθερά σύζευξης J = 6.6 Hz σε δ 4.64, γεγονός που συνάδει με τη σύνδεση της πρενυλομάδας μέσω γέφυρας οξυγόνου στο βασικό σκελετό. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC14 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και φαίνονται στον πίνακα 137. **Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.**

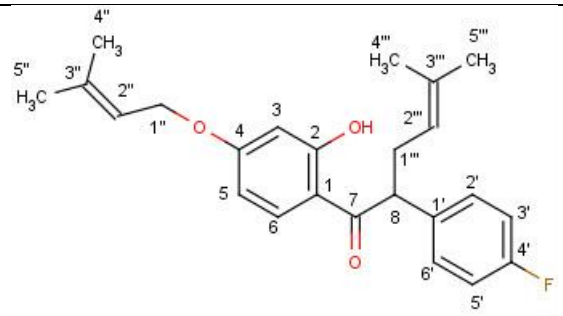
Πίνακας 137: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC14

(SC14):(CDCl$_3$)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	113.7
2	-	166.6
3	6.43 (1H, d, 2.2)	102.7
4	-	160.1
5	6.51 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	109.5
6	8.0 (1H, d, 8.8)	134.9
7	-	203.1
8	4.36 (2H, s)	45.0
1’	-	132.6
2’/6’	7.38 (2H, d, 8.8)	131.7
3’/5’	7.09 (2H, d, 8.8)	116.5
4’	-	163.2
OH-2	12.67 (1H, s)	-
4-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.64 (2H, d, 6.6)	66.8
2’’	5.4 (1H, m)	120.6
3’’	-	137.0
4’’	1.77 (3H, s)	25.9
5’’	1.75 (3H, s)	18.0

Το πρενυλιωμένο παράγωγο **SC15** προέκυψε από την αντίδραση παρασκευής του προιόντος **SC14**, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, ενώ η απόδοση σχηματισμού του προσδιορίσθηκε σε 23.2%. Το προϊόν **SC15** διαφέρει από το **SC14** στην παρουσία μιας δεύτερης πρενυλομάδας η οποία εντοπίζεται στη θέση C-8. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC15 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και αναφέρονται στον πίνακα 138. **Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.**

Πίνακας 138: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC15

(SC15):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.7
2	-	166.6
3	6.36 (1H, d, 2.2)	102.7
4	-	160.1
5	6.40 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	109.5
6	7.84 (1H, d, 8.8)	134.9
7	-	203.1
8	4.65 (1H,m)	53.0
1’	-	132.6
2’/6’	7.36 (2H, d, 8.8)	131.7
3’/5’	7.10 (2H, d, 8.8)	116.5
4’	-	163.2
OH-2	12.60 (1H, s)	-
8-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’a	2.77 (1H, m)	34.1
1’’b	2.45 (1H, m)	34.1
2’’	5.07 (1H, m)	122.8
3’’	-	132.0
4’’	1.60 (3H, s)	26.2
5’’	1.53 (3H, s)	18.3
4-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.54 (2H, d, 6.6)	66.8
2’’	5.4 (1H, m)	120.6
3’’	-	137.0
4’’	1.76 (3H, s)	25.9
5’’	1.73 (3H, s)	18.0

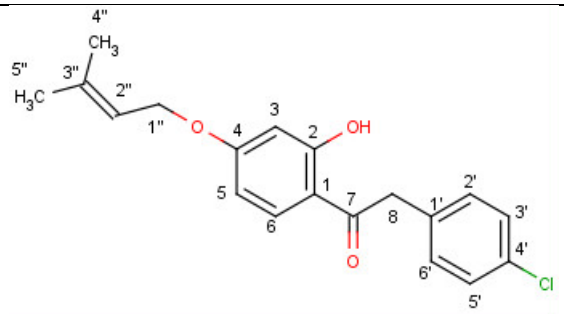
5.1.14 Σύνθεση της 4-*O*-πρενυλο-2,4-διυδροξυ-4’-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC16) και της 4-*O*-,8-*C*-διπρενυλο-2,4-διυδροξυ-4’-χλωροδεοξυβενζοΐνης (SC17)

Σε μίγμα 106 mg (0,4 mmol) της δεοξυβενζοΐνης SC8 και 221 mg (1.6 mmol) ανθρακικού καλλίου (K_2CO_3) σε 4 mL ακετόνης, προστέθηκαν στάγδην 69.84 μl (0,6 mmol) πρενυλοβρωμιδίου ($(CH_3)_2C=CHCH_2Br$). Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 55 ^{0}C υπό συνεχή ανάδευση για 8 ώρες. Ακολούθησε επαναδιάλυση σε νερό και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με υδατικό διάλυμα NaOH 2N και απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης με απόσταξη υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc

αυξανόμενης πολικότητας από όπου παραλάβαμε δύο προϊόντα. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης ήταν η πρενυλιωμένη δεοξυβενζοΐνη **SC16**, ενώ η απόδοση παρασκευής της προσδιορίστηκε σε 57.0%. Αποτελεί το 4-*O*-πρενυλιωμένο παράγωγο της ένωσης SC8 και **μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC16 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 139.

Πίνακας 139: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC16

(SC16):(Me_2CO-d^6)

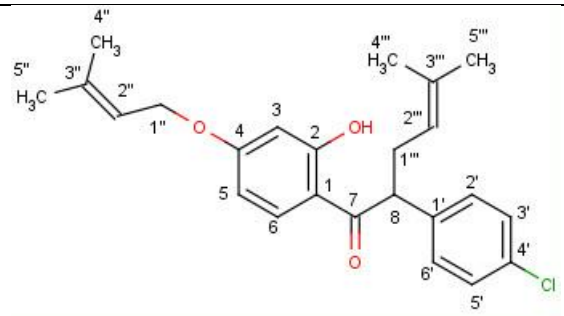


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	12.64 (1H, s, 2-OH)-	167.6
3	6.44 (1H, d, 2.6)	104.3
4	-	163.9
5	6.51 (1H, dd,8.6/ 2.6)	109.8
6	7.99 (1H, d, 8.6)	134.8
7a	-	204.0
7b	4.36 (2H, s, CH_2)	44.8
1’	-	132.6
2’/3’/5’/6’	7.36 (4H, s)	133-129
4’	-	163.2
4-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.64 (2H, d, 6.6)	66.6
2’’	5.45 (1H, m)	121.0
3’’	-	136.0
4’’	1.77 (3H, s)	26.0
5’’	1.75 (3H, s)	18.2

Το πρενυλιωμένο παράγωγο **SC17** προέκυψε από την αντίδραση παρασκευής του προιόντος **SC16**, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, ενώ η απόδοση σχηματισμού του προσδιορίσθηκε σε 23.2%. Το παράγωγο **SC17** διαφέρει από το προϊόν SC16 στην παρουσία μιας δεύτερης πρενυλομάδας, η οποία εντοπίζεται στη θέση C-8 της ενδιάμεσης αλυσίδας. **Μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC17 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 140.

Πίνακας 140: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC17

(SC17):(Me_2CO-d^6)



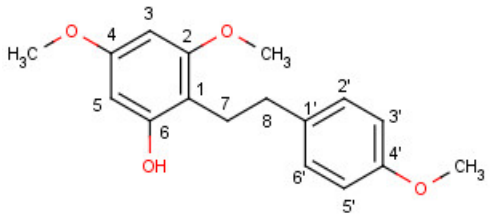
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	114
2	-	167.6
3	6.37 (1H, d, 2.5)	104.3
4	-	163.9
5	6.51 (1H, dd, 9.0 / 2.5)	109.8
6	7.83 (1H, d, 9.0)	134.8
7	-	204.0
78	4.65 (1H, t, 7.5)	56.8
1'	-	128.9
2'/6'	7.33 (2H, d, 8.7)	131.9
3'/5'	7.28 (2H, d, 8.7)	115.2
4'	-	164.0
OH-2	12.64 (1H, s)	-
4-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1''	4.64 (2H, d, 6.6)	66.6
2''	5.41 (1H, m)	121.0
3''	-	136.0
4''	1.77 (3H, s)	26.0
5''	1.75 (3H, s)	18.2
8-*C*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1'''a	2.77 (1H, m)	34.1
1'''b	2.45 (1H, m)	
2'''	5.07 (1H, m)	122.0
3'''	-	136.5
4'''	1.60 (3H, s)	26.0
5'''	1.53 (3H, s)	18.2

5.1.15 Σύνθεση του 2,4,4'-τριμεθοξυ-6-υδροξυδιυδροστιλβενίου ή 1-(6-υδροξυ-2,4-διμεθοξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-αιθανίου (SC18)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοίνης **SC11** (120 mg) σε EtOAc (15 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 80 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 60 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για $7_{1/2}$ ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 57.5 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 35.0%.

Δεδομένου πως η συγκεκριμένη ένωση αποτελεί το ανηγμένο παράγωγο της ουσίας SC11, όπως είναι αναμενόμενο παρατηρούνται αρκετές ομοιότητες στα φασματοσκοπικά τους δεδομένα. Η χαρακτηριστική διαφορά εντοπίζεται στην απώλεια της καρβονυλομάδας και την αντικατάστασή της από μια μεθυλενομάδα, η οποία συντονίζεται στα 2.80-2.75 ppm και εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή. Επίσης τα πρωτόνια της θέσης 7 εμφανίζονται πιο θωρακισμένα σε πεδιά 2.7-2.6 ppm προφανώς λόγω απώλεια της καρβονυλομάδας. **Το συγκεκριμένο παράγωγο μέχρι στιγμής, δεν έχει απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC18 προέκυψαν από τη μελέρη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και αποτυπώνονται στον πίνακα 141.

Πίνακας 141: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC18 **(SC18):(Me_2CO-d^6)**



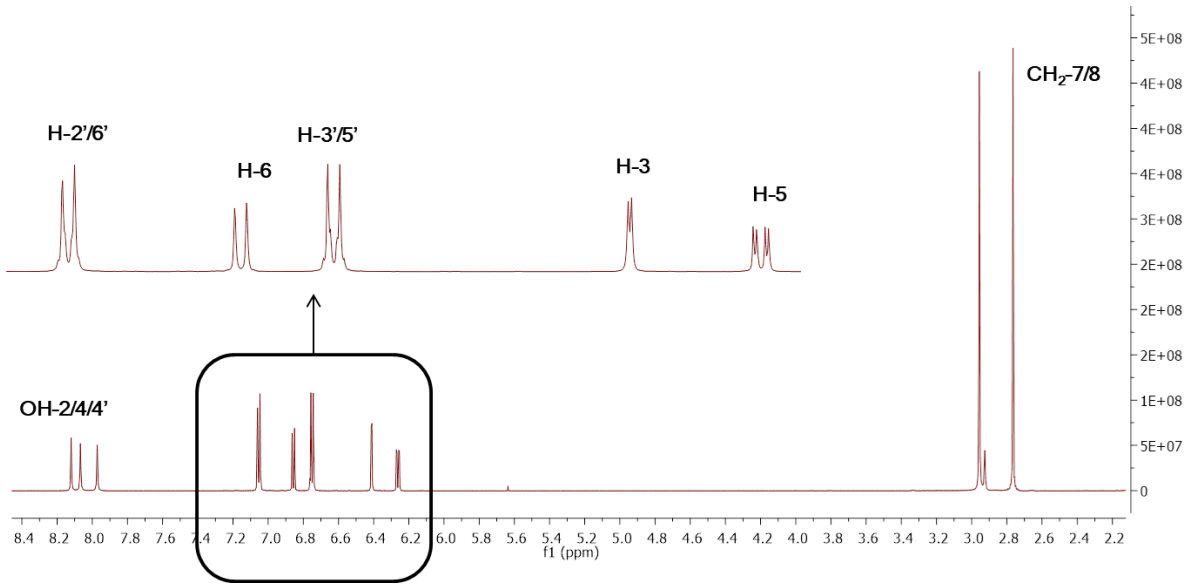
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.8
2	-	167.6
3	6.08 (1H, d, 2.3)	95.2
4	-	163.7
5	6.11 (1H, d, 2.3)	92.2
6	7.97 (1H, d, 8.2)	167.6
7	2.8-2.75 (2H, m)	37.3
8	2.7-2.65 (1H, m)	33.1
1’	-	128.9
2’/6’	7.13 (2H, d, 8.2)	131.9
3’/5’	6.82 (2H, d, 8.2)	115.2
4’	-	159.6
2-OCH_3	3.70 (3H, s)	56.4
4-OCH_3	3.75 (3H, s)	56.4
4’-OCH_3	3.76 (3H, s)	56.1

5.1.16 Σύνθεση του 2,4,4’-τριυδροξυ-διυδροστιλβενίου ή {1-(2,4-διυδροξυφαινυλ)-2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθανίου} (SC19)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοίνης SC1 100 mg σε EtOAc 5 ml προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 50 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2. Το μίγμα αναδεύτηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 50 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 54,26%.

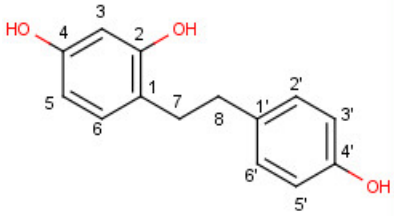
Το εν λόγω παράγωγο όπως και τα ακόλουθα διυδροστιλβενικά παράγωγα μέχρι σήμερα, δεν έχουν απομονωθεί από κάποια φυτική πηγή και έχουν συντεθεί για πρώτη φορά από την ερευνητική μας ομάδα. Επίσης *in vitro* αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δραστικότητα του ενζύμου της τυροσινάσης (βλ.κεφάλαιο 8) ανέδειξε το συγκεκριμένο διυδροστιλβένιο ως τον ισχυρότερο αναστολέα.

Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 136 τα πρωτόνια του δακτυλίου Α εμφανίζουν το κλασικό ABX σύστημα τρισυποκατάστασης με το Η-6 να συντονίζεται σε πιο θωρακισμένα πεδία σε σύγκριση με το αντίστοιχο δεοξυβενζοϊνικό παράγωγο SC1 λόγω αναγωγής της καρβονυλομάδας. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζονται ως διπλές κορυφές (J = 8.0 Hz) που η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και χαρακτρίζει την π-υποκατάσταση αρωματικού πυρήνα. Σημειώνεται πως τα μεθυλένια της ενδιάμεσης αλυσίδας των θέσεων C-7 και C-8 συντονίζονται στα 2.74 ppm ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4Η. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC19 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 142.



Εικόνα 136: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC19

Πίνακας 142 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC19 (SC19):(Me_2CO-d^6)



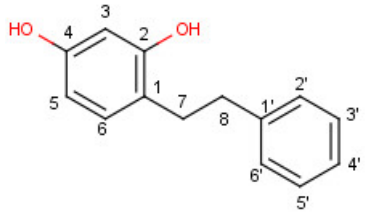
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.5
2	-	166.2
3	6.39 (1H, d, 2.0)	104.3
4	-	165.7
5	6.24 (1H, dd, 8.0 / 2.0),	107.6
6	6.38 (1H, d, 8.0)	131.9
7/8	2.74 (4H, s)	33.5
1’	-	126.8
2’/6’	7.03 (2H, d, 8.0)	130.9
3’/5’	6.72 (2H, d, 8.0)	116.9
4’	-	157.4

5.1.17 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυδιυδροστιλβενίου ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-φαινυλαιθανίου (SC20)

Σε διάλυμα της SC9 (100 mg) σε μίγμα EtOH (10 ml) και EtOAc (10 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (65 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση οπότε και παραλήφθηκε το προϊόν SC20 (94 mg) προιόντος με απόδοση 99.5%.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως στη συγκεκριμένη περίπτωση αναγωγής της 4’-χλώρο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης SC9 όπως και στην περίπτωση αναγωγής της 4’-βρωμο-2,4-διυδροξυδεοξυβενζοΐνης SC2, παραλάβαμε το προϊόν SC20 και όχι τα αντίστοιχα αλογονωμένα διυδριστιλβένια καθώς οι έντονες συνθήκες αναγωγής οδήγησαν στην απώλεια των αλογόνων (Xia, 2009). Επίσης, με τη χρήση ηπιότερων αναγωγικών συνθηκών δεν επιτεύχθηκε η παρασκευή των επιθυμητών αλογονωμένων παραγώγων.

Πίνακας 143: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC20

(SC20):(Me_2CO-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	113.5
2	-	157.8
3	6.40 (1H, brs)	104.3
4	-	157.3
5	6.24 (1H, brd, 8.8)	107.7
6	6.84 (1H, d, 8.8)	131.5
7	2.80-2.78 (2H, m)	32.8
8	2.84-2.82 (2H, m),	37.8
1’	-	131.5
2’/3’/4’/5'/6’/	7.25-7.18 (5H , m)	143.8-126
2-OH	8.13 (1H, s, 2-OH)	-
4-OH	7.95 (1H, s, 4-OH)	-

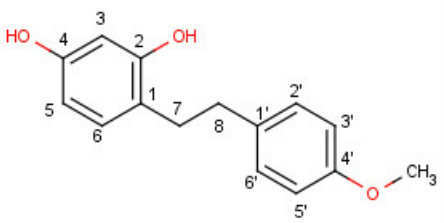
Στο παρελθόν έχει αναφερθεί η παρασκευή του παραγώγου SC20 μέσω της αναγωγής του διπλού δεσμού του στιλβενικού αναλόγου του. Διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα διυδροστιλβένια στην απουσία υποκαταστατών στο Β δακτύλιο, γεγονός που συντελεί στην εμφάνιση μιας πολλαπλής κορυφής που ολοκληρώνει για 5 πρωτόνια στα 7.25-7.18 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη SC19 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και αναφέρονται στον πίνακα 143.

5.1.18 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-4’-μεθοξυδιυδροστιλβενίου 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)αιθανίου (SC21)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοίνης SC4 (100 mg) σε EtOH (10 ml) προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (40 mg), 1 σταγόνα πυκνό HCl και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 52 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 40 mg του προϊόντος SC21 και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 43.1%. Στον πίνακα 144 περιλαμβάνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης SC21, οι οποίες καθορίστηκαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

Πίνακας 144: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC21

(SC21):(Me_2CO-d^6)

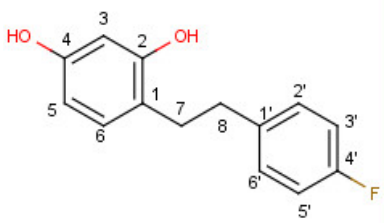


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	120.3
2	-	156.9
3	6.3 (1H, d, 2.7)	104.2
4	-	156.9
5	6.24 (1H, dd, 8.8 / 2.7),	107.9
6	6.84 (1H, d, 8.8)	132.1
7	2.77 (4H, s).	33.6
8		36.9
1’	-	135.8
2’/6’	7.12 (2H, d, 8.8)	131.1
3’/5’	6.81 (2H, d, 8.8)	115.3
4’	-	159.7
4’-OCH_3	3.75 (3H, s)	56.5
2-OH	8.10 (1H, s)	-
4-OH	7.93 (1H, s)	-

5.1.19 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-4’-φθοροδιυδροστιλβενίου ή 1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανίου (SC22)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοίνης SC7 (100 mg) σε μίγμα EtOH (10 ml) και EtOAc (10 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (55 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 53 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 51.5 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας και η απόδοση σχηματισμού της ένωσης SC22 υπολογίστηκε σε 62.0%.

Πίνακας 145: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC22 (SC22):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	119.7
2	-	156.6
3	6.40 (1H, d, 2.2)	104.3
4	-	156.1
5	6.25 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	107.5
6	6.82 (1H, d, 8.8)	132.1
7a	2.80-2.77 (2H, m)	33.60
7b	2.85-2.82 (2H, m)	36.98
1’	-	139.1
2’/6’	7.22 (2H, d, 8.8)	131.7
3’/5’	6.99 (2H, d, 8.8)	116.5
4’	-	161.8
2-OH	8.17 (1H, s)	-
4-OH	8.03 (1H, s)	-

Παρατηρώντας τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων στον πίνακα 145 διαπιστώνουμε ότι τα μεθυλενικά πρωτόνια της ενδιάμεσης αλυσίδας συντονίζονται στα 2.80-2.77 και 2.85-2.82 ppm ως δύο πολλαπλές κορυφές. Τα πλήρη φασματικά δεδομένα του μεταβολίτη SC22 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC).

5.1.20 Σύνθεση του 2,4-διυδροξυ-2’-χλωροδιυδροστιλβενίου ή {1-(2,4-υδροξυφαι-νυλ)- 2(2-χλρωφαινυλο)αιθανίου (SC23)

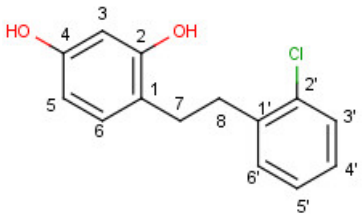
Σε διάλυμα της δεοξυβενζοίνης SC9 (100 mg) σε μίγμα EtOH (10 ml) και EtOAc (10 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (50 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση ήταν 54 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 56 mg του προϊόντος SC23 και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 60.0%.

Στην περίπτωση αυτή κατά την αντίδραση αναγωγής δεν σημειώθηκε απώλεια του αλογόνου όπως στις προηγούμενες περιπτώσεις και η παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώθηκε

από τη μελέτη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC). Οι χημικές μετατοπίσεις του προϊόντος SC23 που περιγράφονται στον πίνακα 146.

Πίνακας 146: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC23

(SC23):(Me_2CO-d^6)

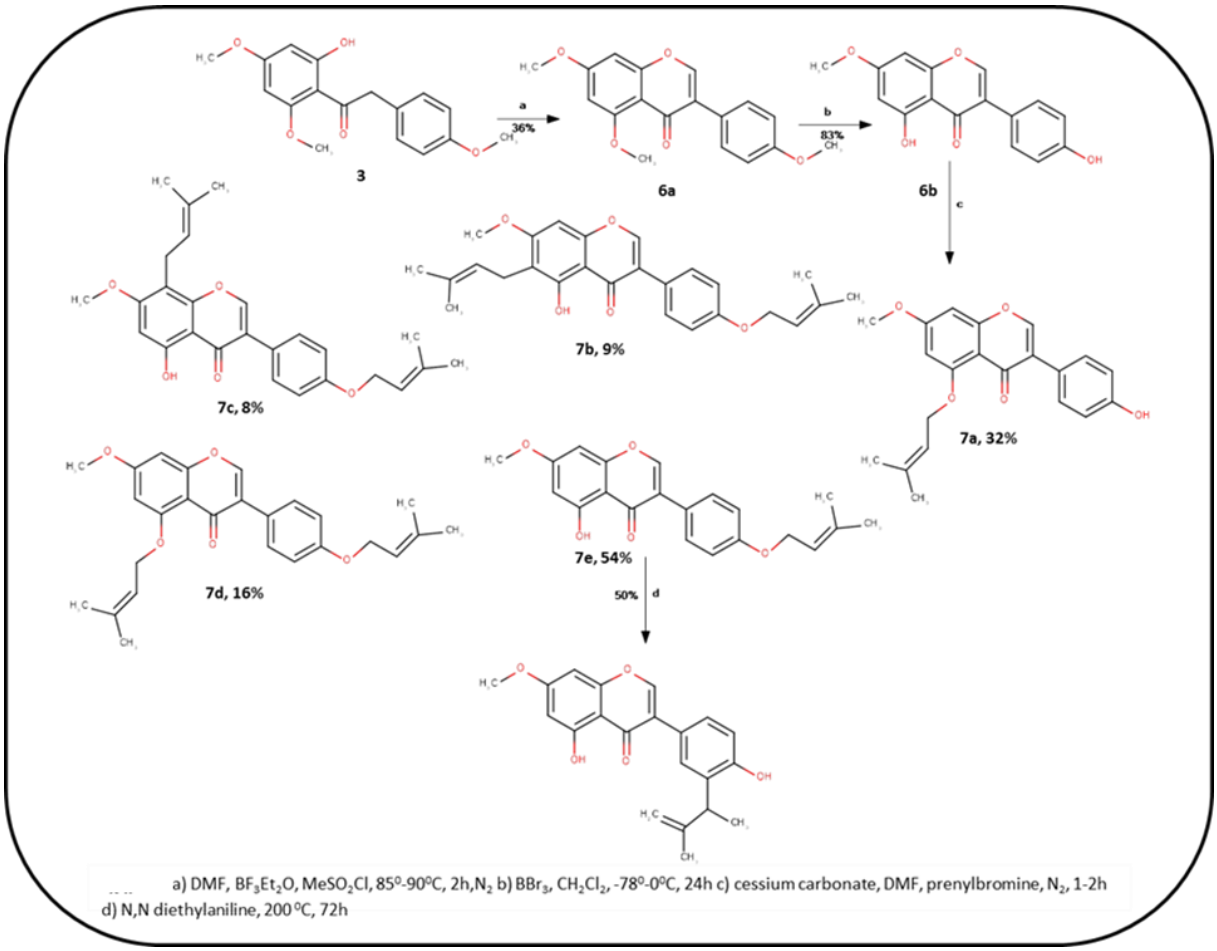


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	113.5
2	-	166.7
3	6.41 (1H, d, 2.2)	104.3
4	-	165.4
5	6.24 (1H, dd, 8.8 / 2.2)	107.9
6	6.84 (1H, d, 8.8)	132.05
7	2.81-2.78 (2H, m)	38.0
8	2.85-2.82 (2H, m)	33.6
1’	-	131.8
2’	-	143.6
3’		
4’	7.26-7.21 (4H, m)	129.95-127.37
5’		
6’		
2-OH	12.60 (1H, s)	2-OH

5.2 Συνθετική παρασκευή ισοφλαβονών

Οι ισοφλαβόνες, με κυριότερους εκπροσώπους τη γενιστεΐνη, τη ντανζεΐνη και τη βιοχανίνη, είναι γνωστό ότι αποτελούν μια από τις κυριότερες ομάδες φυτοοιστρογόνων, ενώ θεωρείται πως κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην πρόληψη ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων καθώς και καρδιαγγειακών νοσημάτων όταν προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής.

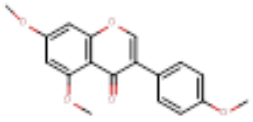
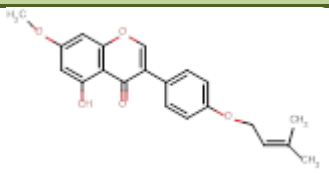
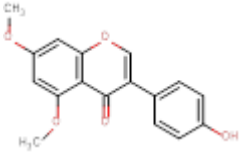
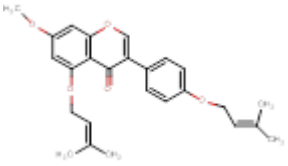
Με αφορμή την απομόνωση της 5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3’-πρενυλοισοφλαβόνης, σε προγενέστερη μελέτη του εργαστηρίου μας (Djiogue, *et al.*, 2009), αλλά και την ανάδειξη της αξιόλογης οιστρογονικής της δράσης, αποφασίστηκε η συνθετική παρασκευή παραγώγων της και η διερεύνησή της πιθανής οστεοπροστατευτικής τους δράσης. Σημαντικό στάδιο στη ακολοθούμενη συνθετική πορεία (σχήμα 12) αποτέλεσε η αντίδραση μετατροπής της δεοξυβενζοΐνης SC11 προς την αντίστοιχη ισοφλαβόνη, ενώ τα σχηματιζόμενα παράγωγα φαίνονται στον πίνακα 147.

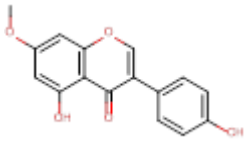
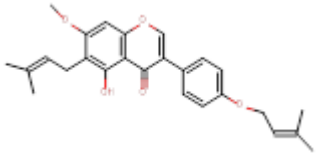
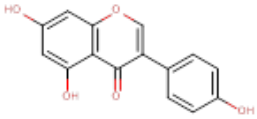
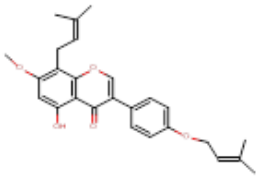
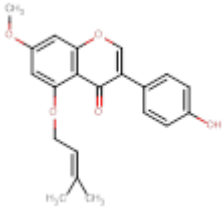
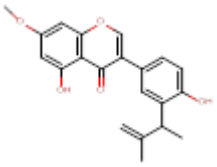
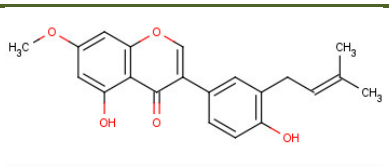


Σχήμα 12: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή αναλόγων ισοφλαβονών

Πιο συγκεκριμένα, το δεοξυβενζοϊνικό παράγωγο SC11 μετατράπηκε στην ισοφλαβόνη SC24, από την οποία μετά την επίδραση BBr_3 προέκυψαν τα απομεθυλιωμένα παράγωγα (SC25-SC27). Στο επόμενο στάδιο με αντιδράσεις πρενυλίωσης παρασκευάσθηκαν τα πρενυλιωμένα ισοφλαβονοειδή SC28-SC33.

Πίνακας 147: Δομές των ισοφλαβονών που συντέθηκαν

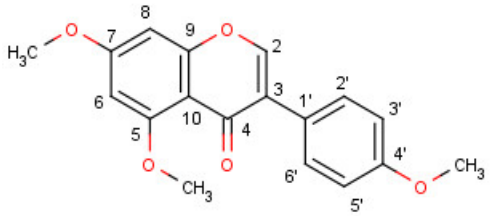
ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ			
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΔΟΜΗ**	**ΚΩΔΙΚΟΣ**	**ΔΟΜΗ**
SC24		**SC28**	
SC25		**SC29**	

SC26		**SC30**	
SC27		**SC31**	
SC32		**SC33**	
SC34			

5.2.1 Σύνθεση της 5,7,4΄-τριμεθοξυισοφλαβόνης (SC24)

Σε διάλυμα 400 mg (1,32 mmol) της δεοξυβενζοΐνης SC11 σε DMF (1,5 ml) προστέθηκε BF_3_Et_2O (0,5 ml)σε ατμόσφαιρα αργού (άνυδρες συνθήκες). Το μίγμα θερμάνθηκε αρχικά στους 50 ^oC για 10 λεπτά σε ελαιόλουτρο. Ακολούθησε προσθήκη $MeSO_2Cl$ (0,6 ml) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαινεται υπό ανάδευση στους 85^0C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, στο μίγμα της αντίδραση προστέθηκε παγόνερο και ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση, το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας και η απόδοση υπολογίσθηκε σε 36,4%.

Πίνακας 148: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC24 **(SC24) (Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	7.94 (1H, s)	151.6
3	-	124.4
4	-	176.3
5	-	163.7
6	6.45 (1H, d, 2.0)	95.2
7	-	167.6
8	6.54 (1H, d, 2.0)	92.4
1’	-	128.9
2’/6’	7.45 (2H, d, 8.8)	131.9
3’/5’	6.91 (2H, d, 8.8)	115.2
4’	-	159.6
5-OCH_3	3.88 (3H, s)	56.4
7-OCH_3	3.93 (3H, s,	56.4
4’-OCH_3	3.78 (3H, s)	56.1

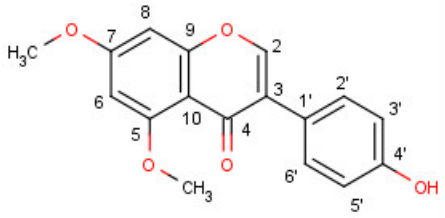
Η συγκεκριμένη ουσία έχει απομονωθεί από το φλοιό του φυτού *Ochna afzelii* (Pegnyemb, *et al.*, 2003) και το *Ouratea hexasperma* (Moreira, *et al.,* 1994), ενώ συνθετικά έχει ξαναπαρασκευαστεί μέσω μεθυλίωσης της γενιστεΐνης. Τα πλήρη φασματικά δεδομένα του προϊόντος SC24 προέκυψαν από τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 148. Χαρακτηριστικό είναι το σήμα του πρωτονίου H-2, το οποίο εμφανίζεται στα 7.94 ppm ως απλή κορυφή ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας εμφανίζεται στα 151.6 ppm.

5.2.2 Σύνθεση της 5,7-διμεθοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (SC25)

Το προϊόν SC25 παραλήφθηκε κατά την αντίδραση παρασκευής του προϊόντος SC26. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό παραλήφθηκαν 20 mg του SC25 και η απόδοση σχηματισμού του υπολογίστηκε σε 20,5%.

Η 5,7-διμεθοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη έχει απομονωθεί από το φλοιό του *Erythrina mildbraedii* (Na, *et al.*, 2006), ενώ τα πλήρη φασματικά δεδομένα της προέκυψαν από τη μελέτη υων φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 149.

Πίνακας 149: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC25 (SC25):(Me_2CO-d^6)



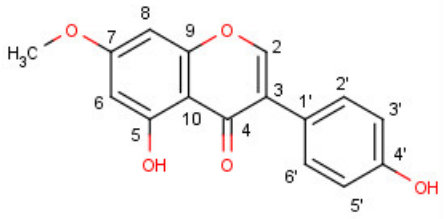
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	7.97 (1H, s)	151.5
3	-	126.1
4	-	174.4
5	-	163.2
6	6.48 (1H, d, 2.2)	97.6
7	-	164.7
8	6.57 (1H, d, 2.2)	93.6
9	-	160.4
10	-	110.5
1'	-	124.5
2'/6'	7.39 (2H, d, 8.5)	131.6
3'/5'	6.85 (2H, d, 8.5)	116.5
4'	-	158.1
5-OCH_3	3.88 (3H, s)	57.4
7-OCH_3	3.93 (3H, s)	56.3
4'-OH	8.54 (1H, s)	-

5.2.3 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνης ή προυνετίνης (SC26)

Διάλυμα της ισοφλαβόνης SC24 (65 mg, 0.21 mmol) σε 2 ml άνυδρου CH_2Cl_2 ψύχθηκε στους -78^{0}C υπό ατμόσφαιρα αργού, ακολούθησε σταδιακή προσθήκη διαλύματος 1M BBr3 σε CH_2Cl_2 (2,1 ml) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας του διαλύματος στους 0^{0}C όπου και παραμένει για 2 ώρες. Μετάα το πέρας των δύο ωρών, το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου και διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε ο

οργανικός διαλύτης με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Το προϊόν SC26 απομονώθηκε και η απόδοση σχηματισμού του υπολογίσθηκε σε 73,3%. Η ένωση SC26 είναι η ισοφλαβόνη προυνετίνη, η οποία έχει απομονωθεί από αρκετά είδη, όπως είναι είδη των γενών *Prunus* (Masao, *et al.*, 1957) και *Glycyrrhiza* (Fukai, *et al.*, 1990) (Hayashi, *et al.*, 1996), όπως επίσης και τα είδη *Crotalaria lachnophora* και *Trifolium pretense* (Drenin, *et al.*, 2008) κ.ά. Είναι γνωστό ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση (Wong, *et al.*, 2011,), ενώ θεωρείται αξιόλογος αλλοστερικός αναστολέας του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρογονάση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του εθισμού στο αλκοόλ (Sheikh, *et al.*, 1997). Η μελέτη πρόσδεσης ισοφλαβονών στον υποδοχέα οιστρογόνων έδειξε ότι σε σύγκριση με τη γενιστεΐνη και την 7-*O*-μεθυλογενιστεΐνη παρατηρείται ασθενέστερη σύνδεση (Morito, *et al.*, 2002). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης SC26 προέκυψαν έπειτα από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 150.

Πίνακας 150: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC26 **(SC26):(Me_2CO-d^6)**



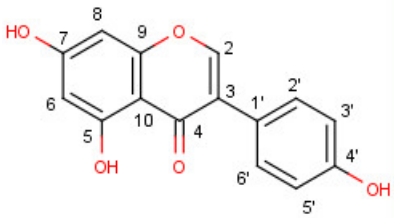
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.22 (1H, s)	155.1
3	-	123.7
4	-	181.9
5	-	163.5
6	6.35 (1H, d, 2.2)	99.9
7	-	166.9
8	6.55 (1H, d,2.2)	93.6
9	-	160.4
10	-	106.8
1’	-	122.9
2’/6’	7.45 (2H, d, 8.5)	132.3
3’/5’	6.9 (2H, d, 8.5)	116.7
4’	-	158.5
5-OH	13.00 (1H, s)	-
7-CH_3O	3.92 (1H, s)	57.4
4’-OH	8.67 (1H, s)	-

5.2.4 Σύνθεση της 7,5,4’-τριυδροξυισοφλαβόνης ή γενιστεϊνης (SC27)

Το προϊόν SC27 παραλήφθηκε κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος SC26 ως παραπροϊόν της αντίδρασης απομεθυλίωσης. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό

παραλήφθηκαν 10mg ένωσης SC27 και η απόδοση του σχηματισμού της υπολογίσθηκε ίση σε 16.0%. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της γενιστεϊνης αποτυπώνονται στον πίνακα 151.

Πίνακας 151: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC27 **(SC27):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8,17 (1H, s)	154.0
3	-	123.9
4	-	181.4
5	-	163.5
6	6.18 (1H, d, 2.4)	116
7	-	164.7
8	6.41 (1H, d, 2.4)	103.2
9	-	158.5
10	-	117.8
1’	-	123.4
2’/6’	7.45 (2H, d, 8.2)	131.2
3’/5’	6.90 (2H, d, 8.2)	115.2
4’	-	158.0
5-OH	6,27 (1H, s)	-

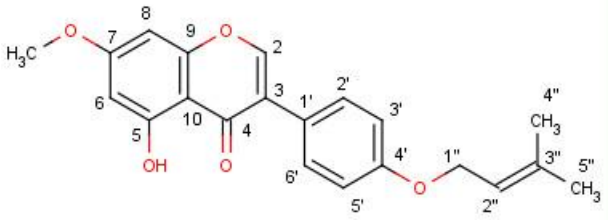
5.2.5 Σύνθεση της 5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυ-4’-*O*-πρενυλοισοφλαβόνης (SC28)

Σε μίγμα του προϊόντος SC26 (55mg, 0.2 mmol) και ανθρακικού κεσίου (195.5 mg, 0,6mmol) προστέθηκαν 2ml άνυδρου DMF, υπό ατμόσφαιρα αργού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 40^{0}C για μισή ώρα. Ακολούθησε στάγδην προσθήκη πρενυλοβρωμιδίου (46,8 μl, 0,4 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα επιπλέον. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε προσθήκη παγόνερου και έγιναν διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για το διαχωρισμό των προϊόντων. Παραλήφθηκαν 40mg προϊόντος SC28 και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 54,5%.

Η 5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυ-4’-O-πρενυλοισοφλαβόνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium* sp. ZZF60, ο οποίος απομονώθηκε από τα φύλλα του *Kandelia candel* (Huang, *et al.*, 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της φαίνονται στον πίνακα 152.

Πίνακας 152: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC28

(SC28):(Me_2CO-d^6)



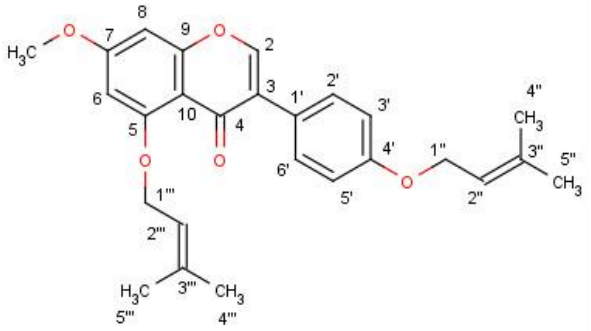
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.24 (1H, s)	155.4
3	-	123.9
4	-	181.6
5		163.6
6	6.35 (1H, d, 2.4)	99.5
7	-	166.6
8	6.54 (1H, d, 2.4)	93.5
9	-	159.1
10	-	107.3
1’	-	123.8
2’/6’	7.53 (2H, d, 8.8)	132.0
3’/5’	6.99 (2H, d, 8.8)	115.9
4’	-	159.5
7-OCH_3	3.92 (3H, s)	57.1
5-OH	12.97 (1H, s)	-
4’-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.60 (2H, d, 6.0)	66.2
2’’	5.48 (1H, m)	121.9
3’’	-	138.0
4’’	1.78 (3H, s)	25.9
5’’	1.76 (3H, s)	18.4

5.2.6 Σύνθεση της 5, 4’-*O*-διπρενυλοξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνης (SC29)

Το προϊόν SC29 σχηματίστηκε ως παραπροϊόν κατά την αντίδραση παρασκευής της ένωσης SC28 και απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ενώ η απόδοση σχηματισμού του υπολογίστηκε σε 16.0%. Από φασματοσκοπική άποψη, η πρενυλίωση στη θέση C-5 είχε ως αποτέλεσμα την αποθωράκιση του H-6 του δακτυλίου Α, το οποίο συντονίζεται στα 6.49 ppm, ενώ ταυτόχρονα διαπιστώνεται απουσία της κορυφής του OH της θέσης 5. **Η 5, 4’-O-διπρενυλοξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνη, ούτε έχει παρασκευστεί μέχρι σήμερα συνθετικά ούτε να έχει απομονωθεί από κάποια φυσική πηγή μέχρι στιγμής**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC), περιλαμβάνονται στον πίνακα 153.

Πίνακας 153: **Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC29**

(SC29):(Me_2CO-d^6)



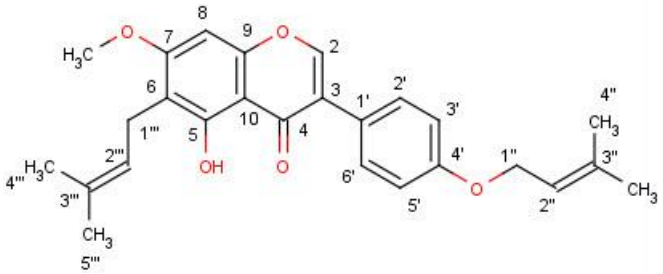
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	7.99 (1H, s)	151.5
3	-	124.5
4	-	174.5
5	-	161.7
6	6.49 (1H, d, 2.4)	98.7
7	-	164.4
8	6.56 (1H, d, 2.4)	94.1
9	-	160.6
10	-	110.7
1’	-	126.1
2’/6’	7.47 (2H, d, 8.8)	131.9
3’/5’	6.94 (2H, d, 8.8)	115.8
4’	-	159.5
7-OCH_3	3.92 (3H, s)	57.0
5-OH	12.97 (1H, s)	-
5-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.58 (2H, d, 6.6)	65.9
2’’	5.48 (1H, m)	122.2
3’’		137.6
4’’	1.78 (6H, s)	26.5
5’’	1.76 (6H, s)	18.8
4’-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’’	4.66 (2H, d, 6.6)	67.4
2’’’	5.53 (1H, m)	121.3
3’’’	-	137.2
4’’’	1.78 (6H, s)	26.5
5’’’	1.76 (6H, s)	18.8

5.2.7 Σύνθεση της 6-*C*-,4’-*O*-διπρενυλο-5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλα-βόνης (SC30)

Το προϊόν SC30 επίσης παραλήφθηκε ως παραπροϊόν κατά τη συνθετική παρασκευή της ένωσης SC28. Απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και η απόδοση σχηματισμούς του υπολογίστηκς σε 9%.

Πίνακας 154: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC30

(SC30):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	7.99 (1H, s)	155.0
3	-	124.2
4	-	181.6
5	-	159.5
6	-	112.8
7	-	164.4
8	6.58 (1H, s)	91.4
9	-	157.3
10	-	106.6
1’	-	123.8
2’/6’	7.54 (2H, d, 8.8)	131.9
3’/5’	6.99 (2H, d, 8.8)	115.8
4’	-	160.1
7-OCH_3	3.97 (3H, s)	57.4
4’-*O*–3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.61 (2H, d, 6.6)	65.8
2’’	5.48 (1H, m)	121.8
3’’	-	137.9
4’’	1.78 (3H, s)	22.3
5’’	1.76 (3H, s)	17,9
6-*C*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’’	3.34 (2H, d, 6.6)	22.7
2’’’	5.21 (1H, m)	123.5
3’’’	-	137.0
4’’’	1.77 (3H, s)	25.8
5’’’	1.64 (3H, s)	17,9

Η δομική διαφορά της ουσίας SC30 από την ουσία SC29 εντοπίζεται στη θέση σύνδεσης του πρενυλίου του δακτυλίου Α, το οποίο στην περίπτωση του SC30 συνδέεται στη θέση C-6. Στο φάσμα HMBC παρατηρείται η σύζευξη των μεθυλενικών πρωτονίων H-1’’’ με τον άνθρακα της θέσης C-6 του δακτυλίου Α. Μέχρι σήμερα **η συγκεκριμένη ουσία δεν έχει απομονωθεί ως φυσικό προϊόν από κάποια φυτική πηγή ούτε έχει παρασκευαστεί συνθετικά**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας SC30 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 154.

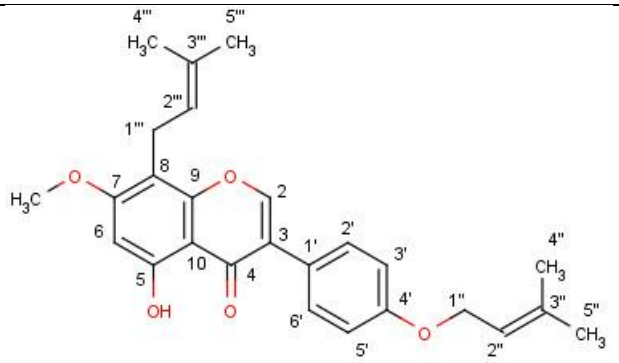
5.2.8 Σύνθεση της 8-*C*-,4’-*O*-διπρενυλο-5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλα-βόνης (SC31)

Το προϊόν SC31 παραλήφθηκε ως παραπροϊόν κατά τη συνθετική παρασκευή της ένωσης SC28, ενώ η απόδοση σχηματισμού του υπολογίστηκε σε 8.0%.

Η θέση σύνδεσης της πρενυλομάδας του δακτυλίου Α καθορίστηκε στη θέση C-8 με τη βοήθεια του φάσματος HMBC, ενώ ο άνθρακας C-1''' της συγκεκριμένης πρενυλομάδας συντονίζεται στα 22.7 ppm σε αντίθεση με τον αντίστοιχο άνθρακα της πρενυλομάδας του δακτυλίου Β ο οποίος συντονίζεται στα 66.7 ppm. **Το εν λόγω παράγωγο δεν συναντάται ούτε ως φυσικό ούτε ως συνθετικό προϊόν μέχρι σήμερα**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας SC31 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 155.

Πίνακας 155: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC31

(SC31):(Me_2CO-d^6)

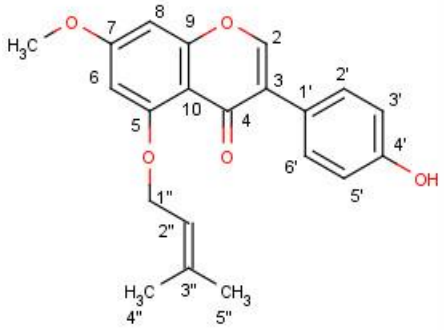


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.31 (1H, s)	155.5
3	-	123.4
4	-	182.1
5	-	162.8
6	6.50 (1H, s)	112.8
7	-	163.6
8	-	108.2
9	-	155.3
10	-	106.6
1’	-	123.9
2’/6’	7.55 (2H, d, 8.8)	131.9
3’/5’	7.00 (2H, d, 8.8)	115.9
4’	-	159.9
7-OCH_3	3.97 (3H, s)	57.4
4’-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.60 (2H, d, 6.6)	66.3
2’’	5.49 (1H, m)	121.9
3’’	-	138.1
4’’	1.78 (3H, s)	25.7
5’’	1.76 (3H, s)	18.8
8-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’’	3.43 (2H, d, 6.6)	22.7
2’’’	5.19 (1H, m)	123.2
3’’’	-	132.1
4’’’	1.8 (3H, s)	25.7
5’’’	1.64 (3H, s)	17.8

5.2.9 Σύνθεση της 5,4′-διυδροξυ-7-μεθοξυ-5-*O*-πρενυλοισοφλαβόνης (SC32)

Σε μίγμα του παραγώγου SC26 (35 mg, 0,13 mmol) και ανθρακικού καλίου (53,8 mg, 0,39 mmol) προστέθηκαν 2 ml άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 40^{0}C για μισή ώρα. Ακολούθησε στάγδην προσθήκη πρενυλοβρωμιδίου (30,2μl, 0,26 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για το διαχωρισμό των προϊόντων. Παραλήφθηκαν 15mg του προϊόντος SC32 και η απόδοση σχηματισμού του υπολογίστηκε σε 32.0%.

Πίνακας 156: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC32 **(SC32):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.22 (1H, s)	154.1
3	-	123.4
4	-	182.1
5	-	161.1
6	6.49 (1H, d, 2.0)	97.6
7	-	165.7
8	6.56 (1H, d, 2.0)	92.3
9	-	159.1
10	-	110.7
1’	-	123.1
2’/6’	7.46 (2H, d, 8.8)	130.4
3’/5’	6.90 (2H, d, 8.8)	115.1
4’	-	158.0
7-OCH_3	3.92 (3H, s)	55.7
5-*O*-3,3-διμεθυλαλλυλομάδα		
1’’	4.65 (2H, d, 6.6)	66.0
2’’	5.53 (1H, m)	120.1
3’’	-	137.2
4’’	1.77 (3H, s)	25.6
5’’	1.76 (3H, s)	18.1

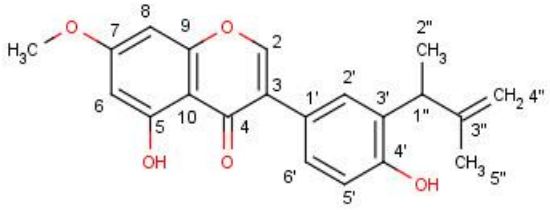
Το πρενυλιωμένο παράγωγο SC32 **δεν έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα ως φυσικό προϊόν, ούτε έχει αναφερθεί η συνθετική παρασκευή του.** Τα NMR φασματοσκοπικά δεδομένα του προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και παρουσιάζονται στον πίνακα 156.

5.2.10 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλοβουτ-3-εν-2-υλο)ισοφλαβόνης (SC33)

Διάλυμα του προϊόντος SC28 (20 mg) σε N,N-diethylaniline (2ml) αφέθηκε υπό ανάδευση σε ατμόσφαιρα αργού στους 200^{0}C για 72 ώρες και προέκυψε το προϊόν SC33.

Πίνακας 157: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC33

(SC33):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	8.19 (1H, s)	155.1
3	-	123.9
4	-	181.7
5	-	163.7
6	6.35 (1H, d, 2.0)	99.3
7	-	166.7
8	6.55 (1H, d, 2.0)	93.7
9	-	159.0
10	-	106.7
1'	-	123.1
2'	7.35 (1H, d, 2.0)	129.3
3'	-	116.6
4'	-	155.7
5'	6.92 (1H, d, 8.0)	132.3
6'	7.29 (1H, dd, 8.0/2.0)	129.8
7-OCH_3	3.92 (3H, s)	57.1
5-OH	13.06 (1H, s)	-
4'-OH	8.49 (1H, s)	-
3-μεθυλοβουτ-3-εν-2-υλομάδα		
1''	3.90 (1H, m)	39.1
2''	1.34 (3H, d, 7.0)	20.4
3''	-	149.5
4''	4.89 (1H, s) 4.86 (1H, s)	110.9
5''	1.68 (3H, s)	23.0

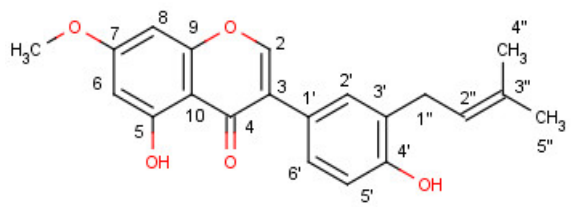
Η ένωση SC33 αποτελεί προϊόν μετάθεσης της πρενυλομάδας, η οποία στο προϊόν SC28 εντοπίζεται στη θέση C-4'. Η μετάθεση της πρενυλομάδας από την προαναφερόμενη θέση και η απελευθέρωση του αντίστοιχου υδροξυλίου, επιβεβαιώνεται αρχικά από το φάσμα ^{1}H-NMR της

ένωσης SC33, καθώς παρατηρούμε τις κορυφές των -OH των θέσεων C-5 και C-4 στα 13.06 και 8.49 ppm, αντίστοιχα. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η απουσία του π-υποκατεστημένου συστήματος του δακτυλίου Β, το οποίο απαντάται στην ένωση SC28. Αντίθετα, εμφανίζονται μία διπλή (J = 2.0 Hz) κορυφή σε δ 7.35, μία διπλή (J = 8.0 Hz) κορυφή σε δ 6.92 και μια διπλή διπλής (J = 8.0 / 2.0 Hz) κορυφή σε δ 7.29, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2', H-5' και H-6' του δακτυλίου Β του προϊόντος SC33. Στο φάσμα HMBC παρατηρείται η σύζευξη του πρωτονίου H-1'' (δ 3.90) της πρενυλομάδας με τον άνθρακα C-3' (δ 116.6). Η ιδιαίτερη διαμόρφωση της υποκατάστασης στη θέση C-3' από την πολλαπλή μορφή του πρωτονίου H-1'' και τα μεθυλενικά πρωτόνια H-4'' που συντονίζεται στα 4.89 και 4.86 ppm. Επίσης, ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 110.9 ppm, ενώ ο τεταρτοταγής ολεφινικός άνθρακας C-3'' εμφανίζεται στα 149.5 ppm. Τα μεθυλικά πρωτόνια της πρενυλικής αλυσίδας εμφανίζονται ως απλή κορυφή (H-5'') στα 1.68 ppm και ως διπλή κορυφή (H-2'') στα 1.34 ppm. **Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί ούτε ως φυσικό προϊόν, ούτε ως συνθετικό ανάλογο φυσικού προϊόντος.** Τα πλήρη NMR φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας SC33 προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και περιλαμβάνονται στον πίνακα 157.

5.2.11 Σύνθεση της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλβουτεν-2-υλο) ισοφλαβόνης (SC34)

Σε διάλυμα του προϊόντος SC28 (14 mg, 0.04 mmol) σε CH_3CN (0,5 ml) προστέθηκε καταλυτική ποσότητα τριφθορομεθανοσουλφονικού βισμουθίου ($Bi(OTf)_3$ (1.3 mg, 0.002 mmol). Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες και στη συνέχεια η θερμοκρασία της αντίδρασης ρυθμίστηκε στους 35^0C για 1,5 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ελλατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για την απομόνωση των παραγόμενων προϊόντων. Από την προαναφερόμενη διαδικασία προέκυψαν 6 mg του προϊόντος SC34 και η απόδοση υπολογίστηκε σε 42.0%.

Πίνακας 158: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC34 **(SC34):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	7.85 (1H, s)	152.7
3	-	123.9
4	-	180.9
5	-	162.7
6	6.38 (1H, d, 2.2)	98.2

7	-	165.5
8	6.40 (1H, d, 2.2)	92.4
9	-	157.9
10	-	106.3
1’	-	122.7
2’	7.22 (1H, *)	130.5
3’	-	127.1
4’	-	154.7
5’	6.86 (1H, d, 8.2)	115.9
6’	7.22 (1H, *)	128.2
7-OCH_3	3.88 (3H, s)	55.8
5-OH	12.88 (1H, s, 5-OH)	-
	3,3-διμεθυλαλλυλομάδα	
1’’	3.39 (2H, d, 7.0)	29.8
2’’	5.34 (1H, m)	121.5
3’’	-	135.0
4’’	1.79 (3H, s)	25.8
5’’	1.78 (3H, s)	17.9

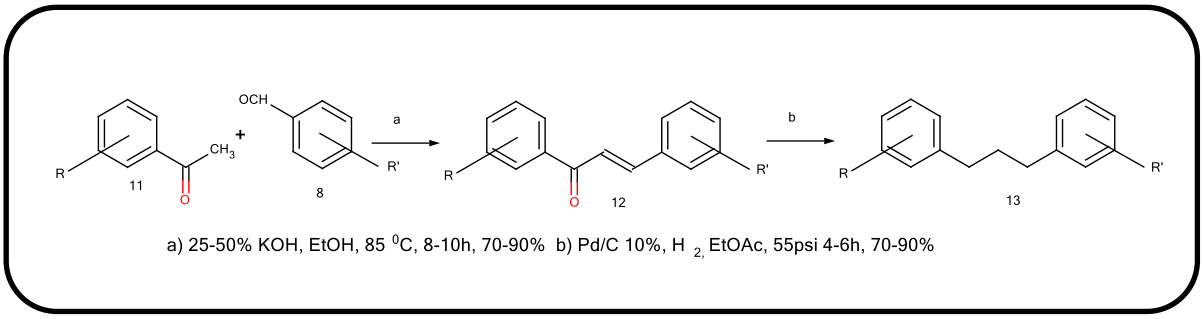
*Παρατηρείται αλληλεπικπάλυψη σημάτων

Η 5,4’-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3’-(3-μεθυλβουτεν-2-υλο) ισοφλαβόνη έχει απομονωθεί για πρώτη φορά από το φυτό *Erythrina poeppigiana*, έχει χαρακτηριστεί από υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα ERα (Djiogue, et al., 2009) και αποτέλεσε τη βάση για το σχεδιασμό των προαναφερόμενων ισοφλαβονικών παραγώγων. Τα πλήρη NMR φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας SC32 προέκυψαν από τη μελέτη φασμάτων 2D-NMR (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και αναγράφονται στον πίνακα 158.

5.3 Συνθετική παρασκευή χαλκονών και διαρυλοπροπανίων

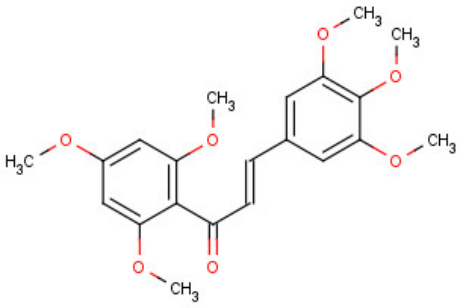
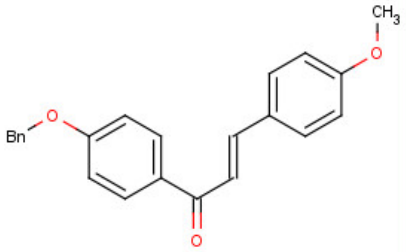
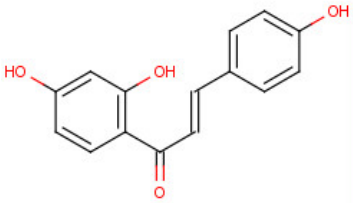
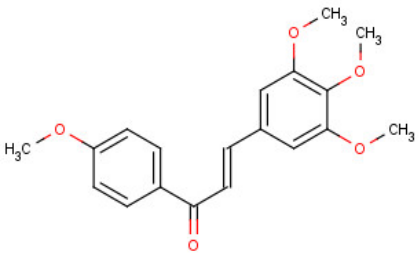
Με σκοπό την αξιολόγηση της πιθανής οιστρογονικής και οστεοπροστατευτικής τους δράσης, πραγματοποιήθηκε ενδεικτικά η συνθετική παρασκευή τεσσάρων χαλκονών (SC35, SC36, SC37, SC38) και των αντίστοιχων διαρυλοπροπανίων τους (SC39, SC40, SC41, SC42).

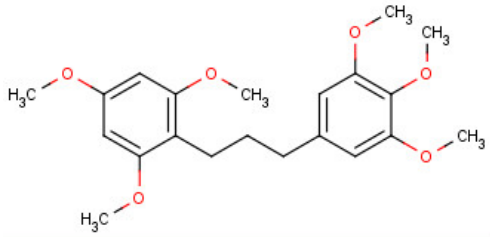
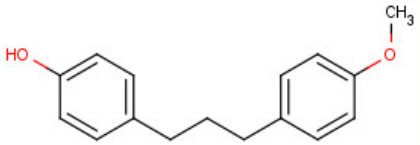
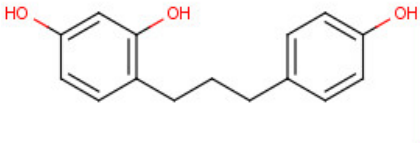
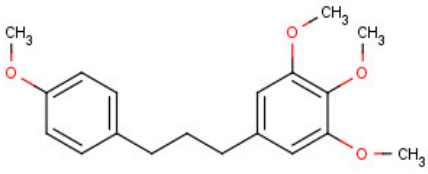
Οι χαλκόνες, παρασκευάστηκαν μέσω της αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης **Claisen-Shmitt**, μεταξύ των κατάλληλα υποκατεστημένων ακετοφαινονών και βενζαλδεϋδών σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια, από την καταλυτική υδρογόνωση των χαλκονών προέκυψαν τα αντίστοιχα παράγωγα διαρυλοπροπανίων.



Σχήμα 13: Συνθετικές πορείες για την παρασκευή χαλκονών και διαρυλοπροπανίων

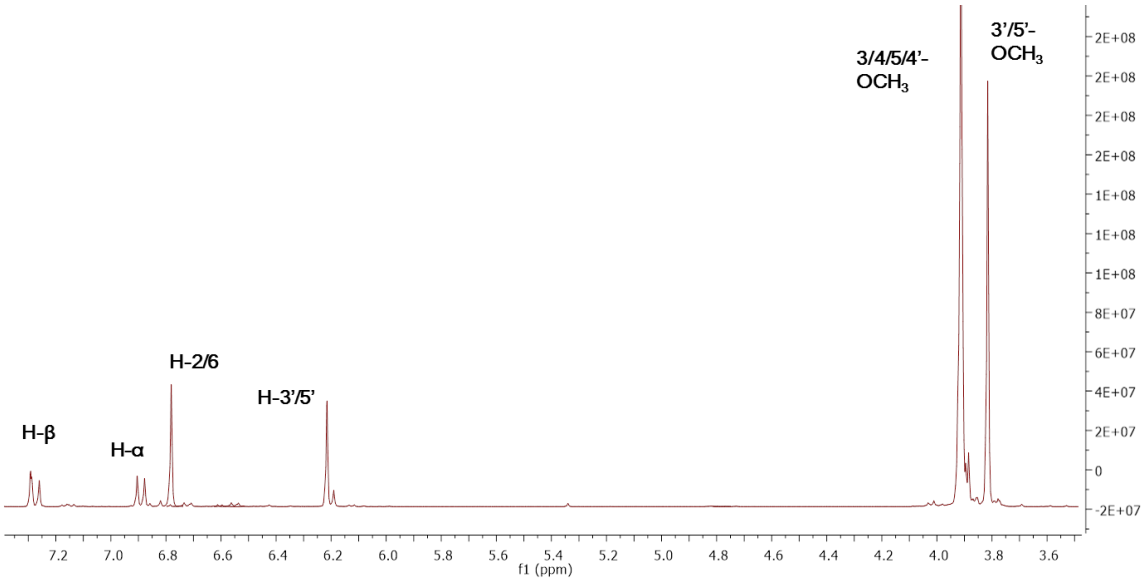
Πίνακας 159: Δομές των χαλκονών και διαρυλοπροπανίων

ΧΑΛΚΟΝΕΣ	
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΔΟΜΗ**
SC35	
SC36	
SC37	
SC38	
ΔΙΥΔΡΟΧΑΛΚΟΝΕΣ	

SC39	
SC40	
SC41	
SC42	

5.3.1 Σύνθεση της 2’,4’,6’,3,4,5-εξαμεθοξυχαλκόνης (SC35)

Σε διάλυμα της 2,4,6-τριμεθοξυακετοφαινόνης (500 mg, 2,38 mmol) και της 3,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεΰδης (1160 mg, 5.48 mmol) σε απόλυτη EtOH (40 ml), προστέθηκαν στάγδην σε θερμοκρασία δωματίου 1,7 ml υδατικού διαλύματος KOH (50%w/v). Το μίγμα αναδεύτηκε στους 80^{o} C για 5.5 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώθηκε με υδατικό διάλυμα HCl (10%). Ακολούθησε προσθήκη νερού στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παρελήφθησαν 1,02 g 2’,4’,6’,3,4,5,εξαμεθοξυχαλκόνης και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 93.0%



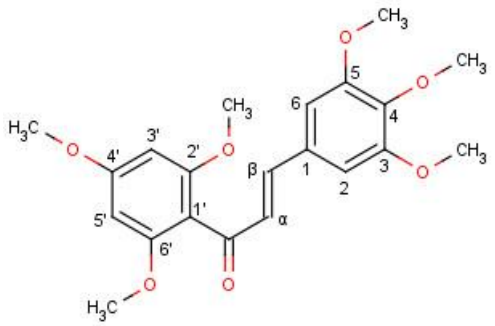
Εικόνα 137: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC35

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC35 παρατηρούμε τα πρωτόνια του διπλού δεσμού της ενδιάμεσης αλυσίδας (H-α και H-Β) ως δύο διπλές κορυφές σε *δ* 6.89 και 7.27, τα οποία εμφανίζονται αποθωρακισμένα καθώς γειτνιάζουν με την καρβονυλομάδα και με τους δύο αρωματικούς δακτυλίους. Η σταθερά σύζευξης της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο προαναφερόμενων πρωτονίων υπολογίστηκε στα 15.6 Hz, η οποία είναι χαρακτηριστική της *trans* διαμόρφωσης του διπλού δεσμού. Τα πρωτόνια των δακτυλίων Α και Β συντονίζονται ως απλές κορυφές σε *δ* 6.79 και 6.20, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία.

Η 2',4',6',3,4,5-εξαμεθοξυχαλκόνη έχει παρασκευασθεί συνθετικά στο παρελθόν, έχει αξιολογηθεί η κυτταροτοξική δράση της και μάλιστα έχει αναφερθεί ότι η 3,4,5,τριμεθοξυ υποκατάσταση του δακτυλίου Β είναι καθοριστική για την εκδήλωση δραστικότητας (Ducki, *et al.*, 2009).

Πίνακας 160: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC35

(SC35):($CDCl_3$-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	138.5
2/6	6.79 (2H, s)	105.9
3	-	153.5
4	-	136.7
5	-	153.5
C=O	-	188.3

α	6.89 (1H, d, 15.6)	128.5
β	7.27 (1H, d, 15.6)	145.0
1’	-	111.8
2’	-	159.7
3’/5’	6.20 (2H, s)	91.0
4’	-	159.7
6’	-	159.7
3-OCH_3 / 4’-OCH_3 / 5-OCH_3	3.90 (12H, *)	55.0
2’-OCH_3 / 6’-OCH_3	3.80 (6H, s)	56.0
4-OCH_3	3.90 (12H, *)	60.0

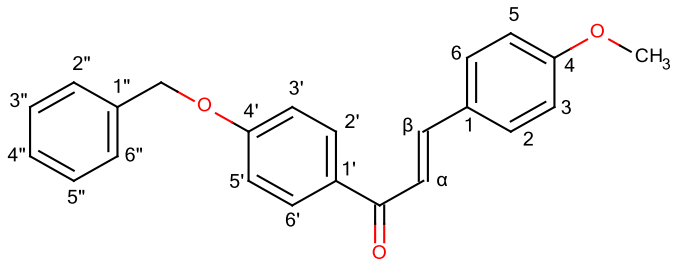
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

5.3.2 Σύνθεση της 4’-βενζυλοξυ-4-μεθοξυχαλκόνης (SC36)

Σε διάλυμα της 4-βενζυλοξυακετοφαινόνης (500 mg, 0.002 mol) και της 2-μεθοξυβενζαλδεϋδης (300.5 mg, 0.002 mol) σε απόλυτη EtOH (30 ml), προστέθηκαν στάγδην σε θερμοκρασία δωματίου 1.8 ml υδατικού διαλύματος KOH (50%). Το μίγμα αναδεύτηκε στους 80^o C για 4 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώθηκε με υδατικό διάλυμα HCl (10%). Ακολούθησε προσθήκη νερού στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παρελήφθησαν 650 mg 4’-βενζυλοξυ-4-μεθοξυχαλκόνης και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε ότι είναι 86.0%.

Η συνθετική παρασκευή της χαλκόνης SC36 έχει πραγματοποιηθεί μια φορά στο παρελθόν με σκοπό την αξιολόγηση αντικαρκινικής δράσης (Iftikhara, *et al.*, 2017).

Πίνακας 161: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC36 **(SC36):($CDCl_3$-d^6)**



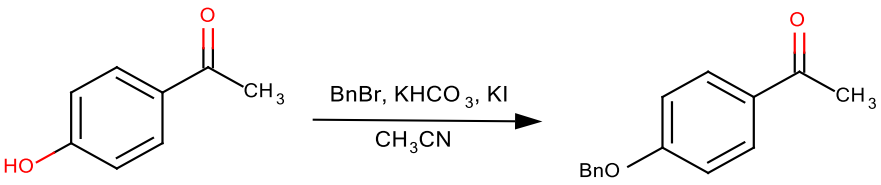
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	131.0
2/6	7.60 (2H, d, 8.7)	130.0
3/5	6.94 (2H, d, 8.8)	114.3
4	-	140.0
C=O	-	188.3
α	7.43 (1H, d, 15.6)	121.0
β	7.77 (1H, d, 15.6)	144
1’	-	131.4
2’/6’	8.03 (2H, d, 8.9)	130.5
3’/5’	7.05 (2H, d, 8.9)	114.5
4’	7.38 (1H, d, 8.2)	162.5
1’’	-	136.3

2''/6''	7.44 (2H, *)	131.4
3''/5''	7.44 (2H, *)	127.6
4''	7.38 (1H, t, 7.4)	128.6
CH_2	5.16 (2H, s)	70.1
4-OCH_3	3.84 (3H, s)	53.1
1	-	131.0
2/6	7.60 (2H, d, 8.7)	130.0

Η -*trans* διαμόρφωση της χαλκόνης επιβεβαιώνεται από τις κορυφές των πρωτονίων α και β που συντονίζονται στα 7.43 και 7.77 ppm αντίστοιχα, εμφανίζοντας χαρακτηριστική σύζευξη 15.6 Hz. Επίσης η ύπαρξη της βενζυλομάδας διαπιστώνεται από την κορυφή του μεθυλενίου στη θέση 4' στα 5.16 ppm, και τη σύζευξή του με τα αρωματικά πρωτόνια H2''/5'' του δακτυλίου της βενζυλομάδας και τον άνθρακα 4' του δακτυλίου Β.

❖ Παρασκευή 4-βενζυλοξυακετοφαινόνης

Συνήθως, οι ακετοφαινόνες και οι βενζαλδεΰδες που περιέχουν στο μόριό τους ομάδες υδροξυλίου, με σκοπό την παρασκευή χαλκονών μέσω αλδολικής συμπύκνωσης, υπόκεινται σε αντιδράσεις προστασίας των υδροξυλομάδων τους με βενζυλίωση ή μεθυλίωση με σκοπό τη σταθεροποίησή τους έναντι του ισχυρού βασικού περιβάλλοντος (Almeida, *et al.*, 1999). Έτσι, προχωρήσαμε στην βενζυλίωση της 4-υδροξυακετοφαινόνης, με σκοπό την αντίδραση παρασκευής του παραγώγου SC36.



Πιο συγκεκριμένα, σε μίγμα 4-υδροξυακετοφαινόνης (1 eq), όξινου ανθρακικού καλίου (1.15 eq) και ιωδιούχου καλίου (0.1 eq), προστέθηκε ακετονιτρίλιο. Το μίγμα αφέθηκε στους 60°C για 20' και εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην βενζυλοβρωμίδιο (1.3 eq). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία βρασμού (reflux) για 16 ώρες, υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη της οργανικής στιβάδας, υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε σε 75.0%.

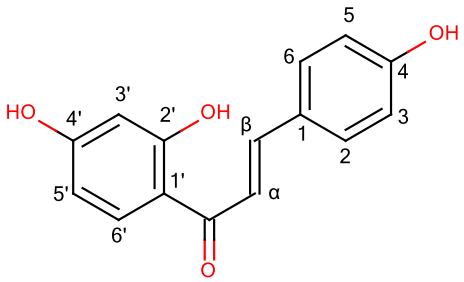
5.3.3 Σύνθεση της 4,2',4'-τριυδροξυχαλκόνης (SC37)

Σε διάλυμα της 2,4-διυδροξυακετοφαινόνης (200 mg, 0.001 mol) και της 4-υδροξυβενζαλδεϋδης (165 mg, 0.001 mol) σε απόλυτη EtOH (0.3 ml), προστέθηκαν στάγδην 1.3 mL υδατικού διαλύματος KOH (60%). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 100°C για 1.5 ώρα. Στη συνέχεια παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα προστέθηκε σε νερό πάγο (6 mL) και εξουδετερώνθηκε με διάλυμα πυκνού HCl μέχρι τιμή

pH=4. Το στερεό που σχηματίστηκε διηθήθηκε υπό κενό και ξηράνθηκε. Τέλος, μετά από ανακρυστάλλωση σε MeOH/H_2O ελήφθησαν 200 mg 4,2',4'-τριυδροξυχαλκόνης και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε ότι είναι 60%. Σημειώνεται πως στην περίπτωση αυτή η αλδολική συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε χωρίς προστασία των αρχικών αντιδρώντων.

Πίνακας 162: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC37

(SC37):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.3
2/6	7.74 (2H, d, 8.4)	132.6
3/5	6.93 (2H, d, 8.4)	117.6
4	-	161.8
C=O	-	193.8
α	7.76 (1H, d, 15.3)	119.1
β	7.83 (1H, d, 15.3)	146.1
1'	-	115.6
2'	-	167.6
3'	6.36 (1H, brs)	104.6
4'	-	166.7
5'	6.64 (1H, brd, 8.5)	109.6
6'	8.11 (1H, d, 8.5)	134.1
CH_2	5.16 (2H, s)	70.1
4-OH	9.67 (1H, brs)	-
2'-OH	13.63 (1H, s)	-
4'-OH	9.16 (1H, brs)	-

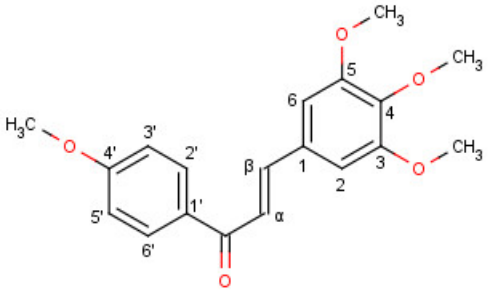
Η 4,2',4'-τριυδροξυχαλκόνη έχει συντεθεί στο παρελθόν, έχει επίσης απομονωθεί από αρκετές φυτικές πηγές όπως τα είδη *Glycyrrhiza glabra* (Gaur, *et al.*, 2014 ,) και *Sophora tonkinensis* (Hunseung, *et al.*, 2014), ενώ εμφανίζει αξιόλογες βιολογικές δράσεις.

5.3.4 Σύνθεση της 3,4,5-4'- τετραμεθοξυχαλκόνης (SC38)

Σε διάλυμα της 4-μεθοξυοξυακετοφαινόνης (150 mg, 0.001 mol) και της 3,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεϋδης (235 mg, 0.001 mol) σε απόλυτη EtOH (8ml), προστέθηκαν στάγδην 1.3 mL υδατικού διαλύματος KOH (50%). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 85C για 4 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώθηκε με υδατικό διάλυμα HCl (10%). Ακολούθησε προσθήκη νερού στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-

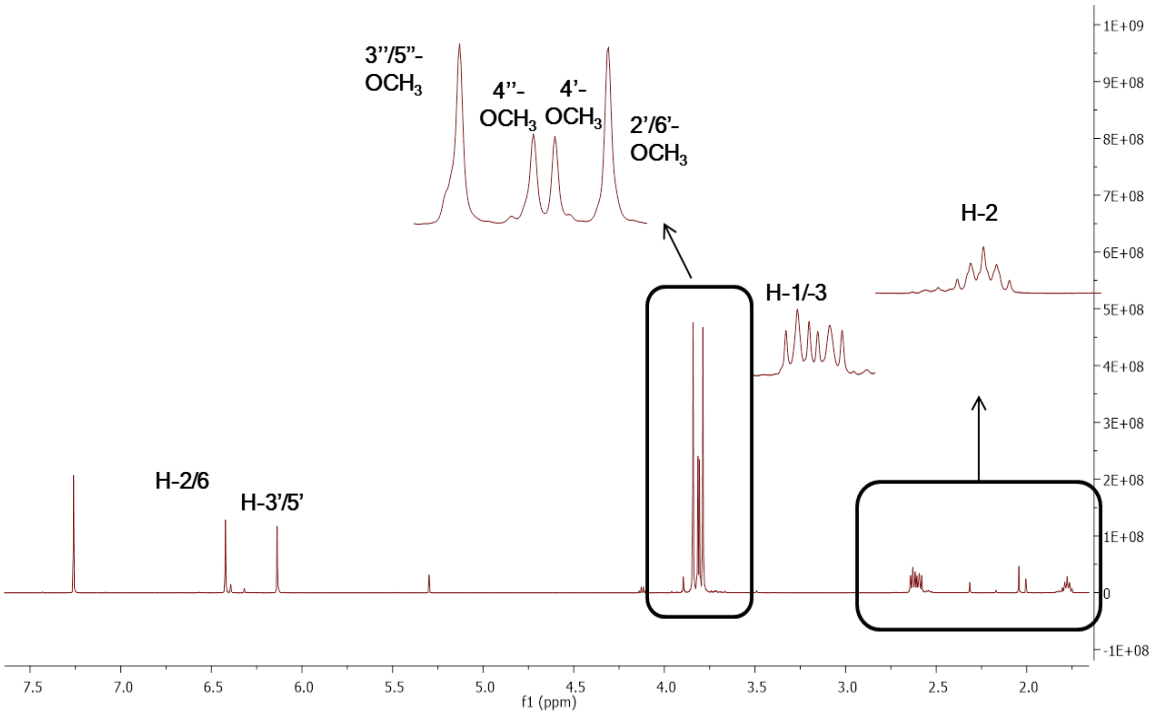
Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Το συγκεκριμένο παράγωγο έχει ξαναπαρασκευαστεί συνθετικά στο παρελθόν.

Πίνακας 163: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC38

(SC38):($CDCl_3$-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	130.2
2/6	6.87 (2H, s)	105.9
3/5	-	153.5
4	-	140.1
C=O	-	189.6
α	7.41 (1H, d, 16.3)	121.6
β	7.71 (1H, d, 16.3)	144.6
1’	-	130.8
2’/6’	7.92 (2H, d, 8.6)-	131.0
3’/5’	6.59 (2H, d, 8.6)-	115.0
4’	-	163.8
3-OCH_3/5-OCH_3	3.92 (6H, s)	56.4
4’-OCH_3	3.90 (3H, s)	55.6
4-OCH_3	3.90 (3H, s)	61.0

5.3.5 Σύνθεση του 2’,4’,6’,3”,4”,5”-διαρυλοπροπανίου (SC39)

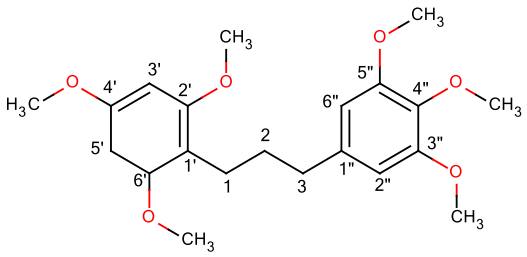
Σε διάλυμα 300 mg του προϊόντος SC35 (0.74 mmol) σε EtOAc (30 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 120 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 4.5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα συμπυκνώθηκε με απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παρελήφθησαν 272 mg 3-(4”-υδροξυφαινυλο)-1-(2',4',6'-τριμεθοξυφαινυλο) προπανίου με απόδοση 43% και 102 mg διυδροχαλκόνης με απόδοση 95%.



Εικόνα138: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC39

Πίνακας 164 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC39

(SC39):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
H-1	2.63 (2H, t, 7.4)	22.4
H-2	1.77 (2H, m)	30.7
H-3	2.59 (2H, t, 7.4)	36.4
1'	-	111.8
2'/4'/6'	-	159.7
3'/5'	6.13 (2H, s)	90.8
1''	-	138.5
2''/6''	6.42 (2H, s)	105.6
3''/5''	-	153.5
4''	-	136.7
2'-OCH_3/6'-OCH_3	3.79 (6H, s)	55.7
4'-OCH_3	3.82 (3H, s)	60.8
3''-OCH_3/5''-OCH_3	3.84 (6H, s)	56.0
4''-OCH_3	3.81 (3H, s)	60.8

Στο φάσμα ^{1}H-NMR παρατηρούμε μερικές διαφορές σε σύγκριση με το αντίστοιχο της χαλκόνης SC35. Αρχικά απουσιάζουν οι κορυφές του διπλού δεσμού, καθώς πλέον η πλευρική αλυσίδα αποτελείται από τρεις μεθυλενομάδες που συντονίζονται στα 2.63, 1.77 και 1.59 ppm.

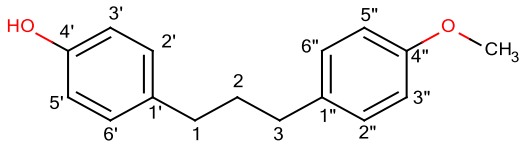
Τα πρωτόνια H2''/H-6'' συντονίζονται σε πιο θωρακισμένα πεδία ενώ οι μεθοξυλομάδες φαίνεται να διαχωρίζονται ελαφρώς μεταξύ τους σε σχέση με το SC35. Το 2',4',6',3'',4'',5''-διαρυλοπροπάνιο έχει παρασκευαστεί ημισυνθετικά στο παρελθόν, ενώ δεν υπάρχει αναφορά σχετικά με τις βιολογικές του ιδιότητες (Oshima, 1936).

5.3.6 Σύνθεση του 3-(4''-μεθοξυφαινυλο)-1-(4'-υδροξυφαινυλο) προπανίου (SC40)

Σε διάλυμα 150 mg του προϊόντος SC36 (0.43 mmol) σε EtOAc (30 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 75 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 61 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα συμπυκνώθηκε με απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-Hexane/ EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παρελήφθησαν 101 mg 3-(4''-μεθοξυφαινυλο)-1-(4'-υδροξυφαινυλο) προπανίου και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε ότι είναι 95%.

Πίνακας 165 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC40

(SC40):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
H-1/H-3	2.58 (4H, m)	34.1
H-2	1.89 (2H, quin, 7.6)	33.1
1'	-	111.8
2'/6'	7.05 (2H, d, 8.3)	129.1
3'/5'	6.76 (2H, d, 8.3)	114.4
4'	-	153.4
1''	-	138.5
2''/6''	7.11 (2H, d, 8.4)	129.1
3''/5''	6.84 (2H, d, 8.4)	114.1
4''	-	136.7
4''-OCH_3	3.80 (3H, s)	54.8
4'-OH	4.61 (1H, s)	-

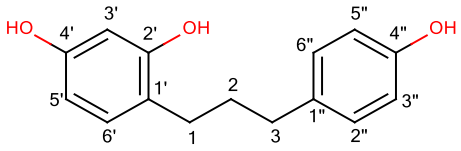
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα μεθυλένια των θέσεων 1 και 3 της ενδιάμεσης αλυσίδας εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια ενώ το μεθυλένιο της θέσης 2 συντονίζεται στα 1.89 ppm ως πενταπλή κορυφή. Η κορυφή του OH-4 στα 4.61 ppm επιβεβαιώνει την αποβενζυλίωση που έλαβε χώρα κατά την αντίδραση υδρογόνωσης.

5.3.7 Σύνθεση του 1-(2′,4′-διυδροξυφαινυλο)-3-(4″-υδροξυφαινυλο)προπανίου (SC41)

Σε διάλυμα 100 mg του προϊόντος SC37 (0.39 mmol) σε EtOAc (30 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (50 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 60 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα συμπυκνώθηκε με απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και παρελήφθησαν 38 mg 1-(2',4'-διυδροξυφαινυλο)-3-(4"-υδροξυφαινυλο)προπανίου. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε ότι είναι 40%.

Πίνακας 166 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC41

(SC41):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
H-1	2.54 (4H, t, 7.7)	30.7
H-2	1.80 (2H, quin, 7.7)	33.9
H-3	2.51 (4H, t, 7.7)	36.1
1'	-	111.8
2'	-	157.0
3'	6.30 (1H, d, 2.2)	104.1
4'	-	157.9
5'	6.26 (1H, dd, 8.1/2.2)	108.1
6'	6.85 (1H, d, 8.1)	131.9
1''	-	134.7
2''/6''	7.02 (2H, d, 8.3)	130.8
3''/5''	6.73 (2H, d, 8.3)	116.7
4''	4.61 (1H, s, -OH),	156.6
4''-OCH_3	3.80 (3H, s)	54.8
2'-OH	8.04 (1H, s)	-
4'-OH	7.95 (1H, s)	-

Το διαρυλοπροπάνιο SC41 έχει απομονωθεί ως φυσικό προϊόν από τη *Broussonetia papyrifera* (Lee, et al., 2001), ενώ η συνθετική του παρασκευή μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί παρά μόνο από το εργαστήριο μας στο παρελθόν

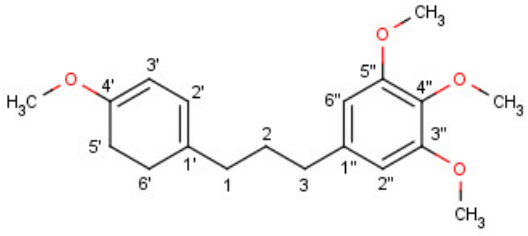
5.3.8 Σύνθεση του 4′,3″,4″,5″-τετραμεθοξυδιαρυλοπροπανίου (SC42)

Σε διάλυμα του προϊόντος SC36 (150 mg, 0.43 mmol) σε EtOAc (30 ml), προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 75 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 61 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται

κατανάλωση H_2. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα συμπυκνώθηκε με απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παρελήφθησαν 101 mg 4',3'',4'',5''-τετραμεθοξυδιαρυλοπροπανίου και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε ότι είναι 95.0%.

Πίνακας 167 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC42

(SC42):(Me_2CO-d^6)

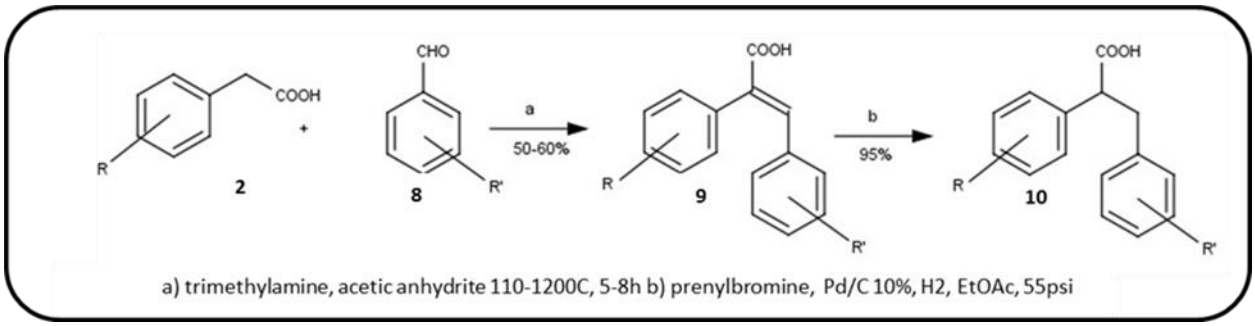


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
H-1	2.61 (2H, t, 7.4)	22.4
H-2	1.92 (2H, m)	30.7
H-3	2.59 (2H, t, 7.4)	36.4
1'	-	112.0
2'/6'	7.11 (2H, d, 8.6)-	131.0
3'/5'	6.84 (2H, d, 8.6)-	115.0
4'	-	163.8
1''	-	136.2
2''/6''	6.39 (2H, s)	105.9
3''/5''	-	153.5
4''	-	140.1
4''-OCH_3	3.90 (3H, s)	61.0
3''-OCH_3	3.79 (6H, s)	56.4
4'-OCH_3	3.83 (3H, s)	55.6
5''-OCH_3	3.85 (6H, s)	56.4

5.4 Συνθετική παρασκευή διφαινυλοπροπενικών και διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων

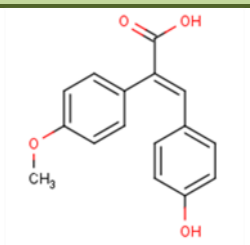
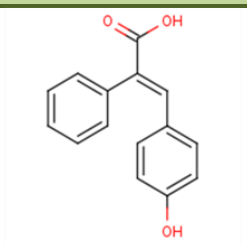
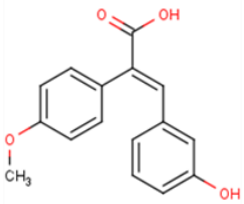
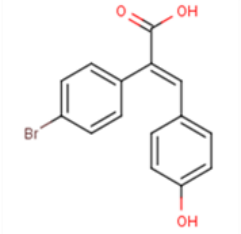
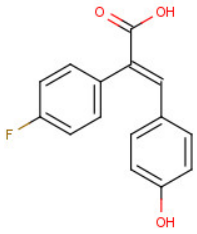
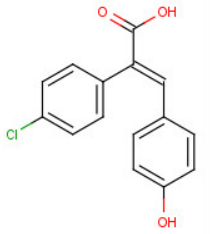
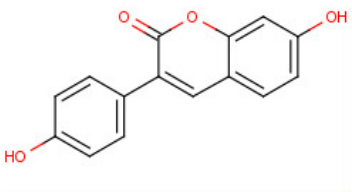
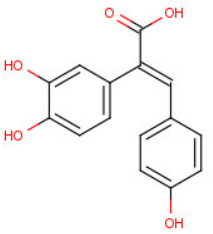
Μία κατηγορία φυσικών προϊόντων που παρουσιάζει δομική αναλογία με τις κατηγορίες των δεοξυβενζοϊνών και των διυδροστιλβενίων είναι αυτή των διφαινυλοπροπενικών ή στιλβενικών οξέων. Για την παρασκευή τους (**9**) εφαρμόσθηκε η αντίδραση συμπύκνωσης Perkins, η οποία λαμβάνει χώρα μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων φαινυλοξικών οξέων (**2**) και βενζαλδεϋδών (**8**) παρουσία τριεθυλαμίνης και οξικού ανυδρίτη, ενώ μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης των αντίστοιχων στιλβενικών οξέων επιτεύχθηκε η παρασκευή των υδρογωνομένων παραγώγων τους, τα οποία είναι γνωστά ως διφαινυλοπροπανοϊκά ή διυδροστιλβενικά οξέα (**10**). Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 14, τα παράγωγα τα οποία παρασκευάσθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ σημειώνεται ότι σε δύο περιπτώσεις σχηματίσθηκαν τα αντίστοιχα 3-αρυλοκουμαρινικά παράγωγα (SC49,

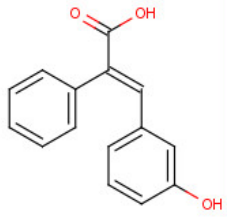
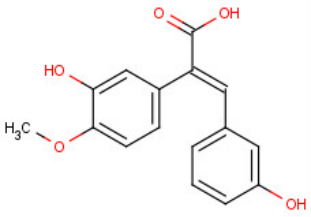
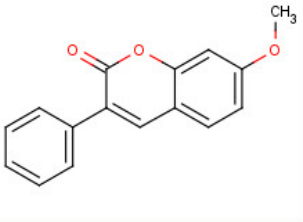
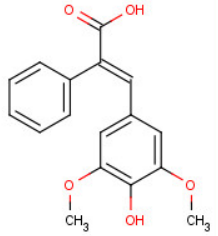
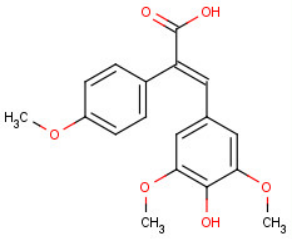
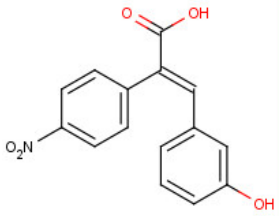
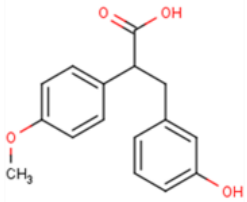
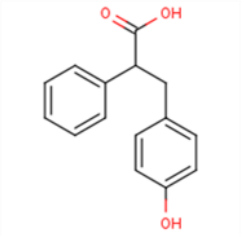
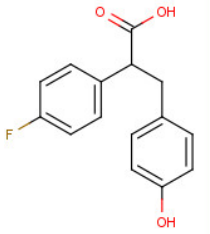
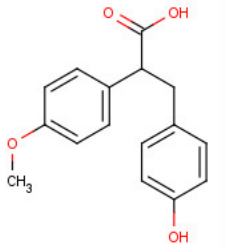
SC53) λόγω της παρουσίας ελεύθερων υδροξυλομάδων στη θέση 2 των αντιδρώντων βενζαλδεϋδών.



Σχήμα 14: Συνθετική πορεία για την παρασκευή διφαινυλοπροπενικών και διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων

Πίνακας 168 Συνθετικά παράγωγα διφαινυλοπροπενικών και διφαινυλοπροπανικών οξέων

ΔΙΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΕΝΙΚΑ ΟΞΕΑ			
ΚΩΔΙΚΟΣ	**ΔΟΜΗ**	**ΚΩΔΙΚΟΣ**	**ΔΟΜΗ**
SC43		**SC44**	
SC45		**SC46**	
SC47		**SC48**	
SC49		**SC50**	

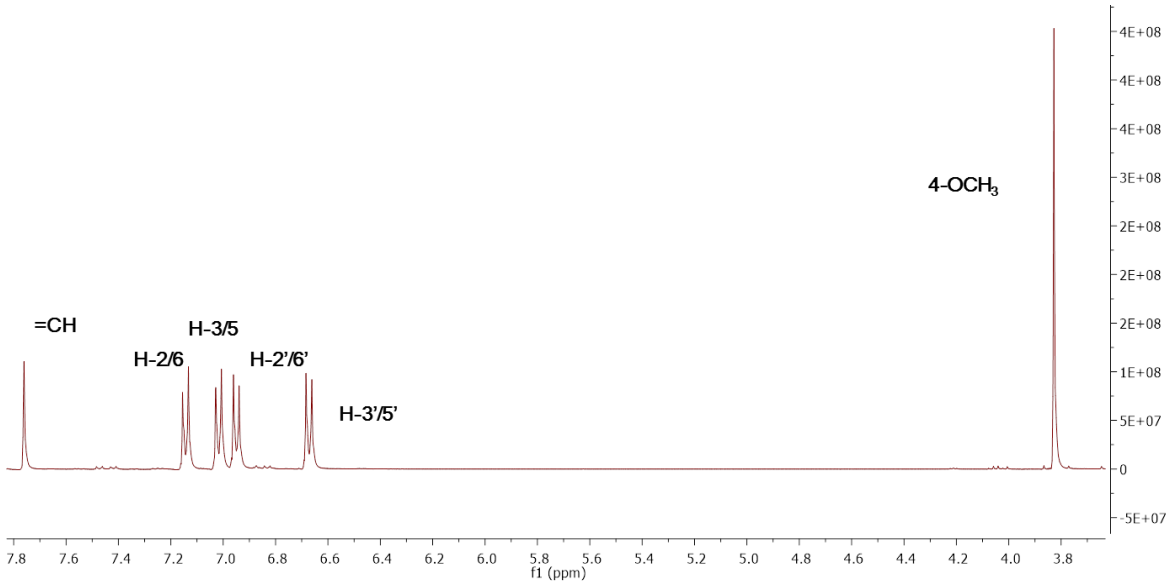
SC51		SC52	
SC53		SC54	
SC55		SC56	
ΔΙΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ			
SC59		SC60	
SC61		SC62	

5.4.1 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(4'-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC43)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης, (100 mg, 0.81 mmol) και του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (134 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.5 ml) και θερμοκρασία 110^{o}C, προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.14 ml, 1.215 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για $5^{1/2}$ ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία

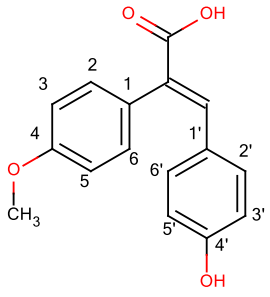
απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε στο 83.0%.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης SC43 (Εικόνα 139), παρατηρείται μία απλή κορυφή στα 7.16 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο της ενδιάμεσης αλυσίδας. Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (Xiao, *et al.*, 2012), η χημική μετατόπιση του προαναφερόμενου πρωτονίου είναι ενδεικτική της διαμόρφωσης (*E* ή *Z*) της ένωσης. Οι πιο αποθωρακισμένες τιμές χημικής μετατόπισης, όπως σε αυτή την περίπτωση, φανερώνουν την *E* διαμόρφωση, δηλαδή οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι βρίσκονται από την ίδια πλευρά και αντίθετα από την καρβοξυλομάδα. Άλλωστε, η αντίδραση Perkins ευνοεί συνήθως την παρασκευή των *E*-αναλόγων των διφαινυλοπροπενικών οξέων. Η συμπύκνωση των δύο αντιδρώντων και ο σχηματισμός του διφαινυλοπροπενικού οξέος επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC, στο οποίο φαίνεται η σύζευξη του ολεφινικού πρωτονίου της αλυσίδας τόσο με το καρβονυλικό άνθρακα της καρβοξυλομάδας όσο και με τους άνθρακες C-2' και C-6'.



Εικόνα 139: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC43

Πίνακας 169: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC43

(SC43):(Me_2CO-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR**	**^{13} C NMR**

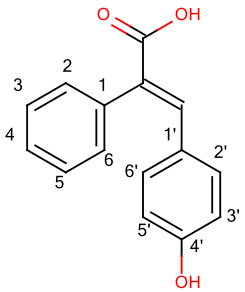
	δ σε ppm (*J* σε Hz)	δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.16 (2H, d, 8.6)	131.7
3/5	6.95 (2H, d, 8.6)	114.0
4	-	158.7
1’		126.0
2’/6’	7.01 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.67 (2H, d, 8.6)	115
4’	-	158.3
OCH_3-4	3.82 (3H,s)	55.5
CH=	7.76 (1H, s)	139.8
=CCOOH	-	130.8
COOH	-	167.9

Το παράγωγο SC43 έχει ξανασυντεθεί στο παρελθόν, ως πρόδρομη ένωση για την παρασκευή του αντίστοιχου στιλβενίου μέσω αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης (Szollosi, 2012). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές για τις βιολογικές του ιδιότητες.

5.4.2 Σύνθεση του (*E*)-2-(φαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC44)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης, (150 mg, 1.23 mmol) και του φαινυλοξικού οξέος (167.5 mg, 1.23 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.5 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.25 ml, 1.215 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για $6^{1/2}$ ώρες σε θερμοκρασία 110°C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 80.0%.

Πίνακας 170 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC44

(SC44):(Me_2CO-d^6)		
		
ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	138.2
2/6	7.23 (2H, dd, 8.6 / 2.1)	130.7
3		
4	7.39-7.36 (3H, m)	128.2/130.0
5		
1’		127.3

2'/6'	6.97 (2H, d, 8.6)	133.5
3'/5'	6.65 (2H, d, 8.6)	116.1
4'	-	159.6
CH=	7.79 (1H, s)	140.1
=CCOOH	-	138.0
COOH	-	169.4

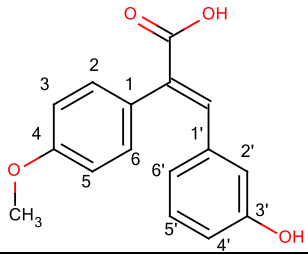
Η φασματοσκοπική μελέτη του SC44 επιβεβαιώνει την E διαμόρφωση του μορίου λόγω της ύπαρξης του πρωτονίου στα 7.79 ppm, ενώ διαφέρει από το ανάλογο SC43 στο γεγονός ότι δεν υπάρχει υποκατάσταση στο δακτύλιο A και τα πρωτόνιά του εμφανίζουν αυξημένη πολλαπλότητα. Στο παρελθόν έχει ξαναναφερθεί η συνθετική παρασκευή του (Solladie, *et al.*, 2003).

5.4.3 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC45)

Σε διάλυμα της 3-υδροξυβενζαλδεΰδης (200 mg, 1.64 mmol) και του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (272.5 mg, 1.64 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (1 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.35 ml, 1.215 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 7 ώρες σε θερμοκρασία 110°C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 78.0%, ενώ πρόσφατα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η συνθετική παρασκευή του παραγώγου SC45 (Huang, *et al.*, 2018).

Πίνακας 171 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC45

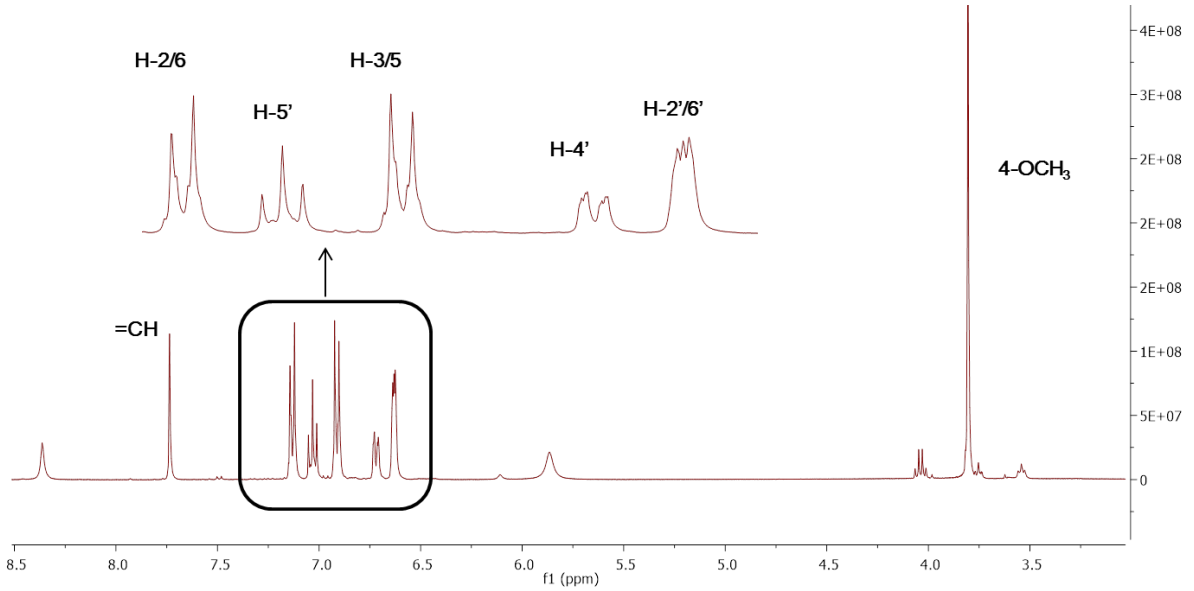
(SC45):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.6
2/6	7.14 (2H, d, 8.6)	131.7
3/5	6.92 (2H, d, 8.6)	114.0
4	-	160.0
1'		137.1
2'	6.73 (1H, *)	117.5
3'	-	115.0
4'	6.72 (1H, dt, 8.0 / 2.1)	116.7
5'	7.9 (1H, t, 8.0)	130.0
6'	6.73 (1H, *)	122.5

OCH_3-4	3.82 (3H,s)	55.5
CH=	7.74 (1H, s)	140.1
COOH		169.0
=CCOOH	-	133.2

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων



Εικόνα 140: Φάσμα ^{1}H -NMR της ένωσης SC45

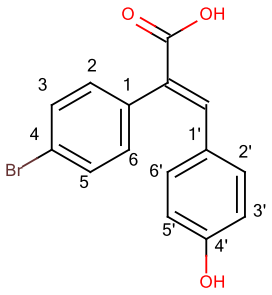
Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 140 το εν λόγω παράγωγο διαφοροποιείται από το ανάλογο SC43 ως προς την υποκατάσταση του δακτυλίου Β. Το πρωτόνιο 5' εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή με (J = 7.9 Hz), το H-4' εμφανίζεται ως dd κορυφή (J = 8.0 / 2.0 Hz), ενώ τα H-2'/H-6' λόγω ισοδυναμίας εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια.

5.4.4 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυβρωμοφαινυλοφαινυλ)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC46)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης, (171 mg, 1.4 mmol) και του 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος (300 mg, 1.4 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.5 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.35 ml, 1.215 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατική φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 'flash' με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 78.0%. **Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η συνθετική παρασκευή του συγκεκριμένου αναλόγου**.

Πίνακας 172 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC46

(SC46):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.56 (2H, d, 8.3)	131.7
3/5	7.14 (2H, d, 8.3)	114.0
4	-	122.7
1’		127.6
2’/6’	6.95 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.62 (2H, d, 8.6)	115.0
4’	-	158.3
CH=	7.83 (1H, s)	141.0
=CCOOH	-	130.8
COOH	-	167.9

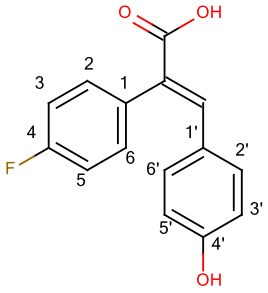
Το προϊόν SC46 από φασματοσκοπικής πλευράς παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το ανάλογο SC43, με τη διαφορά ότι στη θέση της μεθοξυλομάδας υπάρχει βρώμιο, γεγονός που εξηγεί γιατι τα πρωτόνια του δακτυλίου Α εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένα.

5.4.5 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-φθοροφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC47)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης (238mg, 1.95 mmol) και του 4-φθοροφαινυλοξικού οξέος (300 mg, 1.95 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (1 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.42 ml, 2.95 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για $4^{1/2}$ ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατική φάση διορθώθηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 83.0%.

Πίνακας 173: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC47

(SC47):(Me_2CO-d^6)

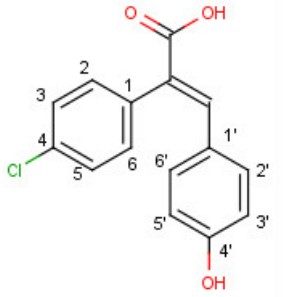


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.26 (2H, t 8.6)	131.7
3/5	7.17 (2H, t, 8.6)	114.0
4	-	162.7
1’		126.0
2’/6’	6.99 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.69 (2H, d, 8.6)	115.0
4’	-	158.3
CH=	7.81 (1H, s)	141.0
=CCOOH	-	130.8
COOH	-	167.9

5.4.6 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-χλωροφαινυλο)-3-(4’-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC48)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης (215mg, 1.75 mmol) και του 4-χλωροφαινυλοξικού οξέος (300 mg, 1.75 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (1 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.42 ml, 2.95 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατική φάση ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε στο 89.0%. Το συγκεκριμένο παράγωγο έχει συντεθεί στο παρελθόν (Jain, *et al.*, 2013) (Jain, *et al.*, 2015).

Πίνακας 174 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC48 (SC48):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.45 (2H, d, 8.3)	131.7
3/5	7.28 (2H, d, 8.3)	114.0
4	-	122.7
1’	-	126
2’/6’	6.95 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.72 (2H, d, 8.6)	115.0
4’	-	158.3
CH=	7.83 (1H, s)	141.3
=CCOOH	-	130.8
COOH	-	167.9

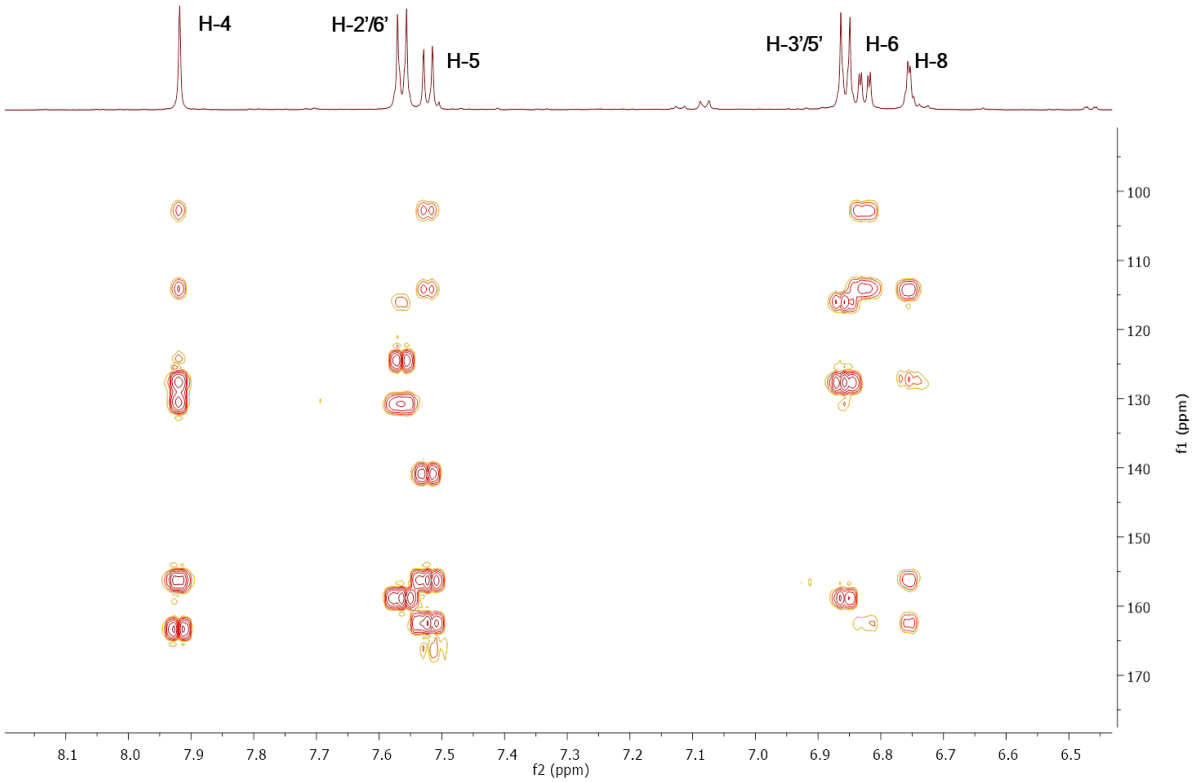
Από τη φασματοσκοπική μελέτη του μορίου φαίνεται πως η υποκατάσταση του χλωρίου επηρεάζει το χημικό περιβάλλον των πρωτονίων του δακτυλίου Α με τρόπο παρόμοιο με το Br, καθώς τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων SC46 και SC48 είναι σχεδόν πανομοιότυπα.

5.4.7 Σύνθεση της 7-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)κουμαρίνης (SC49)

Σε διάλυμα της 2,4-διυδροξυβενζαλδεΰδης (54mg, 0.39mmol) και του 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος (60 mg, 0.39 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.3 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.058 ml, 0.58 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 58.0%.

Το κουμαρινικό παράγωγο SC49 απαντάται μόνο ως συνθετικό προϊόν και με βάση θεωρητικές μελέτες προσομοίωσης φαίνεται να προσδένεται στον υποδοχέα οιστρογόνων ERα (Niinivehmas, et al., 2016). Σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση αντί να παραλάβουμε το (*E*)-2-(4-υδροξυφαινυλο)-3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)προπενικό οξύ, προέκυψε ένα παράγωγο 3-αρυλοκουμαρίνης και πιο συγκεκριμένα η 7-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)κουμαρίνη. Το γεγονός

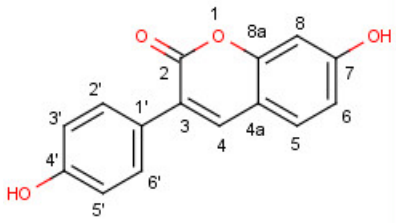
αυτό οφείλεται πιθανότατα σε ισομερισμό του σχηματιζόμενου ενδιάμεσου οξέος και επακόλουθη λακτονοποίηση μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας και του γειτονικού ορθο-υδροξυλίου ή της ορθο-ακετοξυλομάδας στην θέση 2 της αντιδρώσας βενζαλδεΰδης. Λόγω της κατάλληλης απόστασης μεταξύ της καρβοξυλομάδας και της υδροξυλομάδας/ακετοξυλομάδας, έλαβε χώρα ενδομοριακή κυκλοποίηση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ευνοικότερης ενεργειακά και στερεοχημικά 3-αρυλοκουμαρίνης.



Εικόνα 141: Φάσμα ^{1}H-NMR και HMBC της ένωσης SC49

Από φασματοσκοπική άποψη, χαρακτηριστικό είναι το πρωτόνιο της θέσης C-4 που συντονίζεται στα 7.98 ppm, δηλαδή σε ελαφρώς χαμηλότερα πεδία συγκρινόμενο με την περίπτωση των φαινυλοπροπενικών οξέων. Επίσης, το πρωτόνιο H-4 παρουσιάζει σύζευξη με τον οξυγωνομένο αρωματικό άνθρακα στα 156 ppm που αντιστοιχεί στη θέση C-8$^{\alpha}$, με τον οποίο παρουσιάζουν σύζευξη τα πρωτόνια H-5 και H-8.

Πίνακας 175: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC49 (SC49):(Me_2CO-d^6)



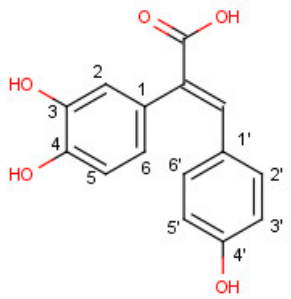
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	163.5
3	-	128.1
4	7.98 (1H,s)	141.0
4a	-	102.8
5	7.56 (H, d, 8.5)	130.7
6	6.82 1H, dd, 8.5 / 2.5)	95.9
7	-	162.5
8	6.76 (1H, d, 2.5)	103.2
8a	-	156.3
1’	-	113.7
2’/6’	7.56 (2H, d, 8.7)	131.0
3’/5’	6.85 (2H, d, 8.7)	116.2
4’	-	159.2

5.4.8 Σύνθεση του *(E)*-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC50)

Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΰδης (74.5mg, 0.61mmol) και του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος (102 mg, 0.61 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.5 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.127 ml, 0.91 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 10 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 78.0%.

Πίνακας 176 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC50

(SC50):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2	6.71 (1H, d, 2.1)	131.7
3	-	154.0
4	-	156.1
5	6.84 (H, d, 8.2)	121.5
6	6.55 (1H, dd, 8.2 / 2.1)	131.7
1’		126.0
2’/6’	7.05 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.68 (2H, d, 8.6)	115.0
4’	-	158.3
CH=	7.70 (1H, s)	139.1
=CCOOH	-	131.1
COOH	-	169.4

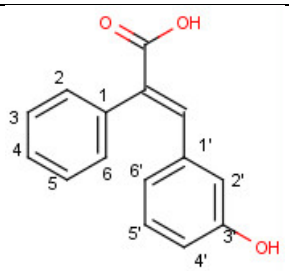
Και σε αυτή την περίπτωση το πρωτόνιο του διπλού δεσμού στα 7.70 ppm υποδηλώνει την *E*- διαμόρφωση του μορίου, ενώ τα πρωτόνια H-2, H-5 και H-6 εμφανίζονται ως μια διπλή με J = 2.1 Hz, μια διπλή με J = 8.2 Hz και μια διπλή διπλής με J = 8.2 / 2.1 Hz αντίστοιχα. Η συνθετική παρασκευή του προϊόντος SC50 έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Kimura, *et al.*, 1995).

5.4.9 Σύνθεση του (*E*)-2-(φαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC51)

Σε διάλυμα της 3-υδροξυβενζαλδεΰδης (250 mg, 1.83 mmol) και του φαινυλοξικού οξέος (224 mg, 1.83 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.518 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.400 ml, 2.745 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για $6^{1/2}$ ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 80.0%. Η συνθετική παρασκευή του αναλόγου SC51 έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Szollosi, 2012).

Πίνακας 177 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC51

(SC51):(Me_2CO-d^6)



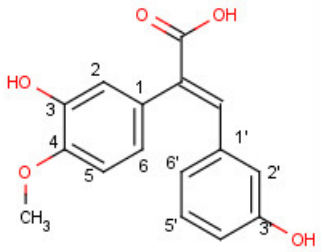
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.25 (2H, dd, 8.6/2.1)	130.7
3		
4	7.42-7.36 (3H,s)	129.39
5		
1’		136.8
2’	6.60 (1H, *)	118.0
3’	-	159.0
4’	6.73 (1H, dt, 8.0 / 2.1)	117.3
5’	7.02 (1H, t, 8.0)	130.6
6’	6.60 (1H, *)	122.8
CH=	7.82 (1H, s)	141.5
=CCOOH	-	132.0
COOH		169.0

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

5.4.10 Σύνθεση του (Ε)-2-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC52)

Σε διάλυμα της 3-υδροξυβενζαλδεΰδης (100 mg, 0.81 mmol) και του 3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (147.5 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.5 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.25 ml, 1.215 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για $6^{1/2}$ ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 80.0%. **Μέχρι σήμερα το προϊόν SC52 δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.**

Πίνακας 178: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC52 (SC52):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1		128.9
2	6.82 (1H, d, 2.0)	131.7
3	-	154
4	-	156.1
5	6.91 (1H, d, 8.9)	121.5
6	6.87 (1H, dd, 8.9 / 2.0)	131.7
1’	-	136.8
2’	6.62 (1H, *)	118.3
3’	-	159
4’	6.73 (1H, dt, 8.0 / 2.1)	118
5’	7.05 (1H, t, 8.0)	131
6’	6.62 (1H, *)	123
OCH_3	3.82 (3H,s)	55.5
CH=	7.72 (1H, s)	141.5
=CCOOH	-	131.4
COOH		169.0

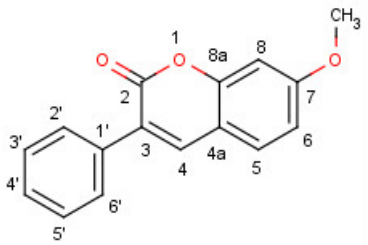
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

5.4.11 Σύνθεση της 3-φαινυλο-7-μεθοξυ-κουμαρίνης (SC53)

Σε διάλυμα της 4-μεθοξυ-2-υδροξυβενζαλδεΰδης (334.73 mg, 0.81 mmol) και του φαινυλοξικού οξέος (300 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.623 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.463 ml, 3.3 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 60.0%.

Σημειώνεται πως και στην περίπτωση αυτή (όπως και στου αναλόγου SC49) αντί του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο-3-υδροξυ)-3-(3-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος σχηματίστηκε η 6-μεθοξυ-3-φαινυλοκουμαρίνη (Xiao, *et al.*, 2012).

Πίνακας 179: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC53 **(SC53):(Me_2CO-d^6)**



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
2	-	160.8
3	-	124.8
4	7.76 (1H,s)	141.0
4a	-	113.4
5	7.01 (H, d, 8.7)	129.0
6	6.81 (1H, dd, 8.7 / 2.7)	112.0
7	-	162.5
8	6.32 1H, d, 2.7)	108.0
8a	-	155.3
1’		135.0
2’		
3’		
4’	7.65-7.35 (5H, m)	130.0-128.4
5’		
6’		
7-OCH_3	3.88 (3H,s)	56.0

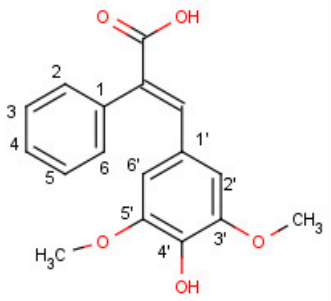
Το προϊόν SC53 μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί ούτε ως φυσικό ούτε ως συνθετικό παράγωγο.

5.4.12 Σύνθεση του (*E*)-2-φαινυλο-3-(3-5-διμεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC54)

Σε διάλυμα της 3-5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζαλδεΰδης (400.8 mg, 0.81 mmol) και του φαινυλοξικού οξέος (365 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.623 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.463 ml, 3.3 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 10 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 80.0%. Η συνθετική παρασκευή του προϊόντος SC54 συναντάται στη βιβλιογραφία (Sharma, *et al.*, 2012)

Πίνακας 180: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC54

(SC54):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	136.2
2/6	7.45 (2H, m)	131.7
3/5	7.28 (2H, m)	128.0
4	7.36 (1H, t, 7.6)	127.8
1’	-	129.3
2’/6’	6.44 (2H, s)	131.0
3’	-	157.0
4’	-	154.0
5’	-	158.0
3’/5’-OCH_3	3.54 (6H,s)	57.5
CH=	7.75 (1H, s)	141.3
=CCOOH	-	132.0

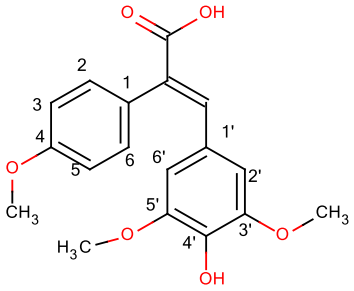
5.4.13 Σύνθεση του (*E*)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)προπενικού οξέος (SC55)

Σε διάλυμα της 3-5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζαλδεΰδης (400.8 mg, 0.81 mmol) και του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (187 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.623 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.463 ml, 3.3 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 9 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάση ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 86.0%.

Η δομική διαφορά του προϊόντος SC55 από το παράγωγο SC54 είναι η παρουσία 4-OCH_3 στο δακτύλιο A, γεγονός που εξηγεί την εμφάνιση δύο διπλών κορυφών (J = 8.6 Hz) σε δ 7.18 και 7.01, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό π-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Το συγκεκριμένο παράγωγο έχει ξανασυντεθεί στο παρελθόν (Davis, *et al.*, 2013).

Πίνακας 181 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC55

(SC55):(Me_2CO-d^6)

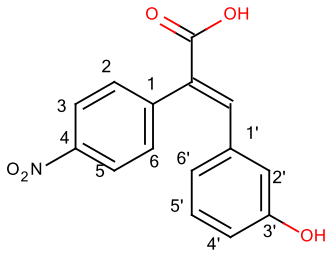


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.6
2/6	7.18 (2H, d, 8.6)	131.7
3/5	7.01 (2H, d, 8.6)	114.0
4	-	160.0
1’	-	129.3
2’/6’	6.46 (2H, s)	131.0
3’	-	157.0
4’	-	154.0
5’	-	158.0
4- OCH_3	3.82 (3H, s)	56.0
2’/5’-OCH_3	3.56 (6H,s)	57.5
CH=	7.73 (1H, s)	141.5
=CCOOH	-	132.1

5.4.14 Σύνθεση του (E)-2-(4-νιτροφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπενικού οξέος (SC56)

Σε διάλυμα της 3-υδροξυβενζαλδεΰδης (100.8 mg, 0.81 mmol) και του 4-νιτροφαινυλοξικού οξέος (148.5 mg, 0.81 mmol) σε οξικό ανυδρίτη (0.623 ml), προστέθηκε Et_3N στάγδην (0.463 ml, 3.3 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία 110^{o}C. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη διαλύματος K_2CO_3 10% (10 ml) και η αντίδραση αφέθηκε σε reflux για $1^{1/2}$ ώρα. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, και το pH της υδατικής φάσης ρυθμίστηκε σε τιμή 4 με προσθήκη HCl. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εν συνεχεία απομακρύνθηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης ‘flash’ με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 78.0%. Η συνθετική παρασκευή του προϊόντος SC56 συναντάται στη βιβλιογραφία (Buckles, *et al.*, 1951).

Πίνακας 182 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC56 (SC56):(Me_2CO-d^6)

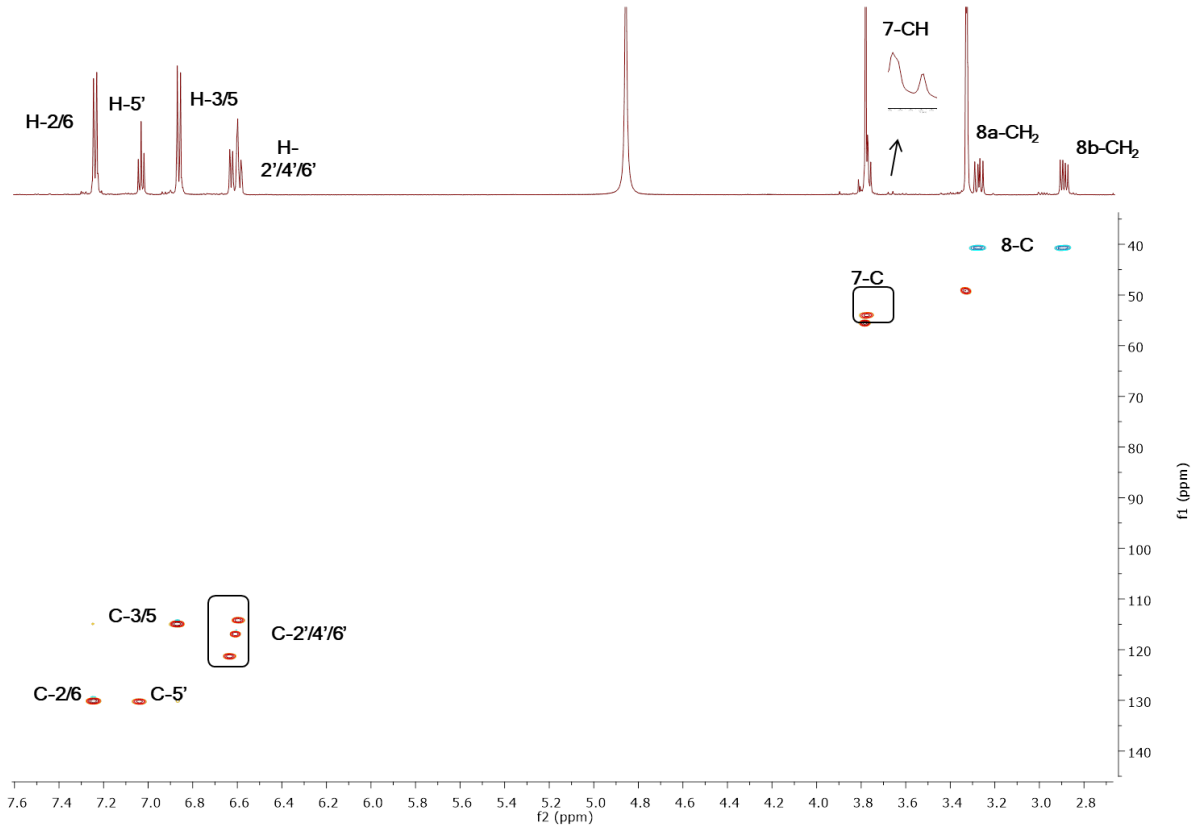


ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	129.6
2/6	8.27 (2H, d, 8.7)	131.7
3/5	7.54 (2H, d, 8.7)	114.0
4	-	148.0
1’	-	122.8
2’	6.56 (1H, brs)	117.0
3’	-	115.0
4’	6.77 (1H, d, 7.0)	122.3
5’	7.09 (1H, t, 7.0)	130.6
6’	6.65 (1H, d, 7.0)	118.1
CH=	7.90 (1H, s)	141.5
=CCOOH	-	132.0

Η νιτρουποκατάσταση στο δακτύλιο Α παρατηρούμε ότι προκαλλεί μεγάλη αποθωράκιση στα πρωτόνια Η-2/η-6 και Η-3/Η-5, τα οποία συντονίζονται σε *δ* 8.27 και 7.54, αντίστοιχα.

5.4.15 Σύνθεση του 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(3-υδροξυφαινυλο)-προπανοϊκού οξέος (SC59)

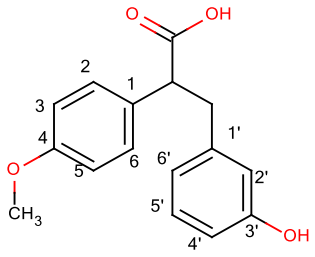
Σε διάλυμα του οξέος SC45 (100 mg) σε EtOAc (10 ml) προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (60 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 54 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 86.0%. **Μέχρι σήμερα το προϊόν SC59 δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.**



Εικόνα 142: Φάσμα1H -NMR και HSQC-DEPT της ένωσης SC59

Όπως αποτυπώνεται και στο φάσμα HSQC παρατηρούμε την ύπαρξη μεθυλενικού άνθρακα στα 40.7 ppm που αντιστοιχεί στη θέση C-8, γεγονός που συνάδει με την αναγωγή του διπλού δεσμού. Τα πρωτόνια H-8a και H-8b συντονίζονται με τη μορφή διπλών διπλών κορυφών (J=13.8/8.5 Hz και J=13.8/7.0 Hz), ενώ το H-7 συντονίζεται στα 3.77 ppm ως t κορυφή με J= 7.8 Hz, με τον αντίστοιχο οξυγονωμένο άνθρακα να συντονίζεται στα 54 ppm. Τα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου A συντονίζονται με τη μορφή διπλών κορυφών (J= 7.8 Hz) σε δ 7.24και 6.86, επιβεβαιώνοντας την π-υποκατάσταση στον προαναφερόμενο αρωματικό δακτύλιο. Η στροφική ικανότητα του προϊόντος SC59 υπολογίστηκε $[\alpha]_D$=+19 και με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι διαθέτει *S* στερεοχημεία (Camps, *et al.*, 1996)

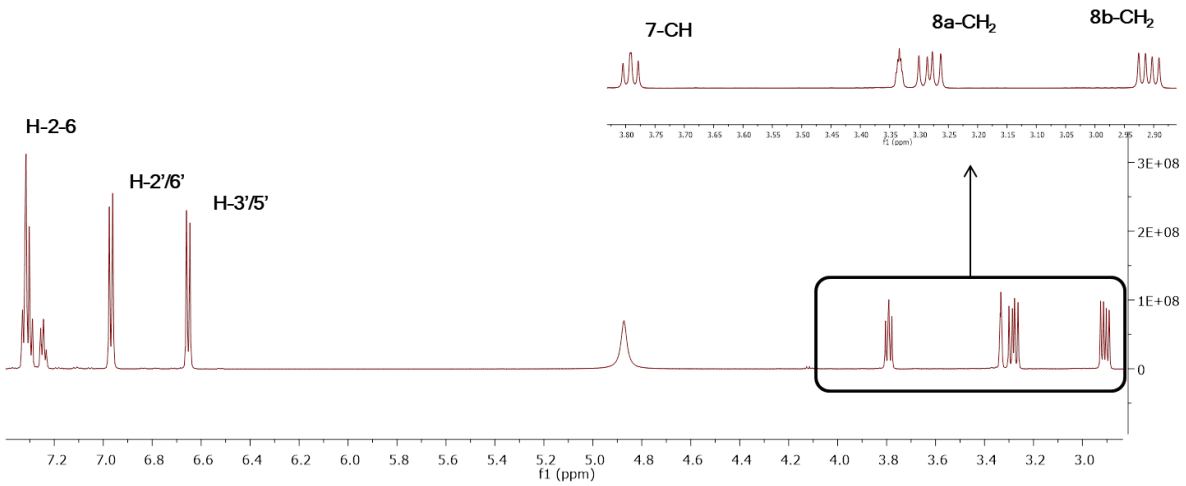
Πίνακας 183 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC59 (SC59):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.6
2/6	7.24 (2H, d, 8.6)	130.3
3/5	6.86 (2H, d, 8.6)	114.0
4	-	160.0
7	3.77 (1H, ~t, 7.8)	54.0
8	3.28 (1H, dd, 13.8 / 8.5) 2.90 (1H,dd, 13.8 / 7.0)	40.7
1’		137.1
2’	6.61 (1H, t, 2.0)	117.0
3’	-	158.0
4’	6.63 (1H, dt, 8.0 / 2.0)	121.4
5’	7.11 (1H, t, 8.0)	130.3
6’	6.60 (1H, dt, 8.0 / 2.0)	114.2
COOH	-	168.0

5.4.16 Σύνθεση του 2-φαινυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC60)

Σε διάλυμα του οξέος SC44 (80mg) σε 10 ml EtOAc προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 40 mg, και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 54 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 82.0%. Το ανάλογο SC60 έχει ξανασυντεθεί στο παρελθόν (Szollosi, 2012).

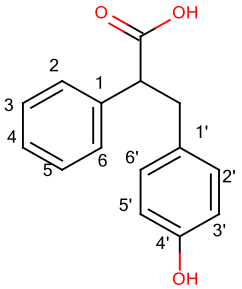


Εικόνα 143: Φάσμα1H -NMR και HSQC-DEPT της ένωσης SC60

Όπως παρατηρούμε τα μεθυλενικά πρωτόνια H-7 της ενδιάμεσης αλυσίδας του μεταβολίτη SC60 συντονίζονται στα 3.28 και 2.91 ppm, με τη μορφή διπλών διπλών κορυφών και το πρωτόνιο H-8 στα 3.79 ppm ως περίπου τριπλή κορυφή. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β εμφανίζουν το αναμενόμενο π-υποκατεστημένο σύστημα, ενώ τα πρωτόνια του Α δακτυλίου συντονίζονται στα 7.33-7.24 ppm. Η στροφική ικανότητα του προϊόντος SC60 προσδιορίσθηκε σε $[\alpha]_D$=+21.

Πίνακας 184 Φατοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC60

(SC60):(Me_2CO-d^6)



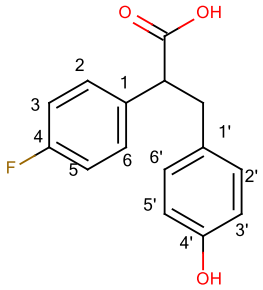
ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.6
2/6	7.33-7.29 (2H, m)	126.4
3/5	7.33-7.29 (2H, m)	
4	7.24 (1H, m)	131
7	3.79 (1H, t, 7.8)	54.1
8	3.28 (1H, dd, 13.9/8.7) 2.91 (1H,dd, 13.9/7.0)	41.0
1’	-	137.1
2’/6’	6.97 (2H, d, 8.8)	133.5
3’/5’	6.65 (2H, d, 8.8)	116.1
4’	-	156.4
COOH	-	168.0

5.4.17 Σύνθεση του 2-(4-φθοροφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC61)

Σε διάλυμα του οξέος SC47 (50mg) σε EtOAc(10 ml) προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (30 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 54 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 51 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκει σε 92.0% και η στροφική ικανότητα ήταν $[\alpha]_D$= -4.

Πίνακας 185: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC61

(SC61):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.9
2/6	7.35 (2H, d 8.3)	130.7
3/5	7.01 (2H, d 8.3)	114
4	-	162.7
7	3.8 (1H, t, 7.8)	54.1
8	3.27 (1H, dd, 13.8/8.5) 2.83 (1H,dd, 13.8/7.0)	40.7
1'		126.0
2'/6'	6.96 (2H, d, 8.6)	132.9
3'/5'	6.66 (2H, d, 8.6)	115.4
4'	-	158.3
COOH	-	169.1

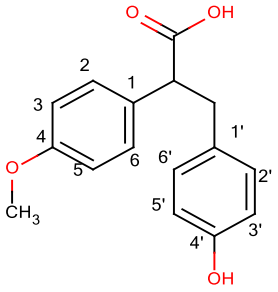
5.4.18 Σύνθεση του 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανικού οξέος (SC62)

Σε διάλυμα του οξέος SC43 (100mg) σε EtOAc (10 ml) προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C (60 mg) και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H_2 υπό πίεση 54 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H_2 και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με

σύστημα διαλυτών c-Hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίσθηκε σε 92.0 %, ενώ η συνθετική παρασκευή του παραγώγου συναντάται στη βιβλιογραφία (Szollosi, 2012).

Πίνακας 186 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης SC62

(SC61):(Me_2CO-d^6)



ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	128.6
2/6	7.24 (2H, d, 8.6)	131.7
3/5	6.86 (2H, d, 8.6)	115.1
4	-	160.0
7	3.77 (1H, t, 7.8)	54.0
8	3.28 (1H, dd, 13.8/8.5) 2.90 (1H,dd, 13.8/7.0)	40.7
1’		137.1
2’/6’	6.94 (2H, d, 8.6)	132.8
3’/5’	6.61 (2H, d, 8.6)	115.0
4’	-	158.3
COOH	-	168.0

6 *In vitro* βιολογική αξιολόγηση φυσικών και συνθετικών ενώσεων

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η βιολογική αξιολόγηση τόσο των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών από τα επιλεγμένα φυτικά είδη όσο και των συνθετικών ενώσεων, των οποίων ο σχεδιασμός και η παρασκευή αποφασίσθηκε με βάση τα αποτελέσματα της *in silico* μελέτης. Συνολικά ελέγχθηκαν **63 φυσικά προϊόντα** και **57 συνθετικές ενώσεις** ως προς τις οστεοπροστατευτικές τους ιδιότητες στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1 και RAW264.7, καθώς και για την πιθανή οιστρογόνο δράση τους στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7, όπως έγινε και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων.

6.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση

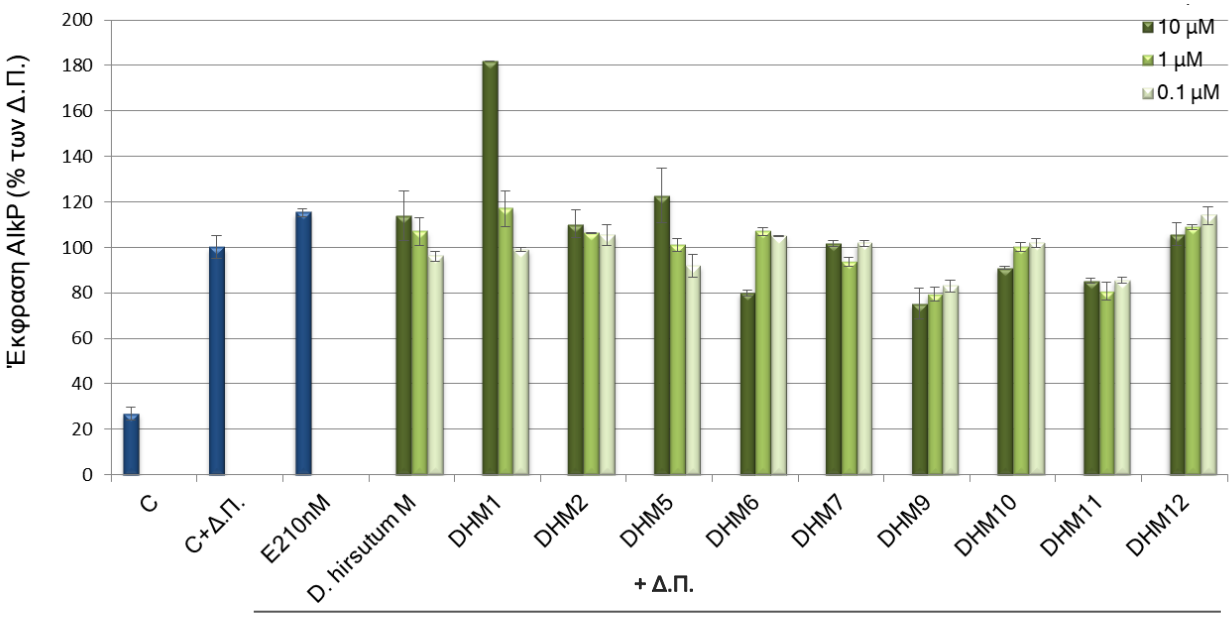
Η ικανότητα των δευτερογενών μεταβολιτών και των συνθετικών ενώσεων να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την προ-οστεοβλαστική κυτταρική σειρά MC3T3-E1 (βλ. § 1.4.2.4). Η διαφοροποίηση των MC3T3-E1 πιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως δείκτη διαφοροποίησης την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στο πρώιμο στάδιο ωρίμανσής τους. Τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία και παρουσία διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.) για διάστημα έξι ημερών και ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (E_2) σε συγκέντρωση 10 nM και η ραλοξιφαίνη (Ral) σε συγκέντρωση 0.1 μM. Η δραστικότητα της οιστραδιόλης, της ραλοξιφαίνης, αλλά και του αντιοιστρογόνου παράγοντα φουλβεστράνη (ICI) στα MC3T3-E1 έχει αναφερθεί στην § 3.2.1.3.1.)

6.1.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση

Η ικανότητα των ενώσεων να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 αξιολογήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις (10, 1 και 0.1 μM) και προσδιορίστηκε η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP). Η επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης εκφράστηκε ως % της έκφρασης AlkP παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.).

❖ Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων ***Dorycnium hirsutum*** **(DHM)** (§ 4.3.1.1) απομονώθηκαν 12 δευτερογενείς μεταβολίτες, στην

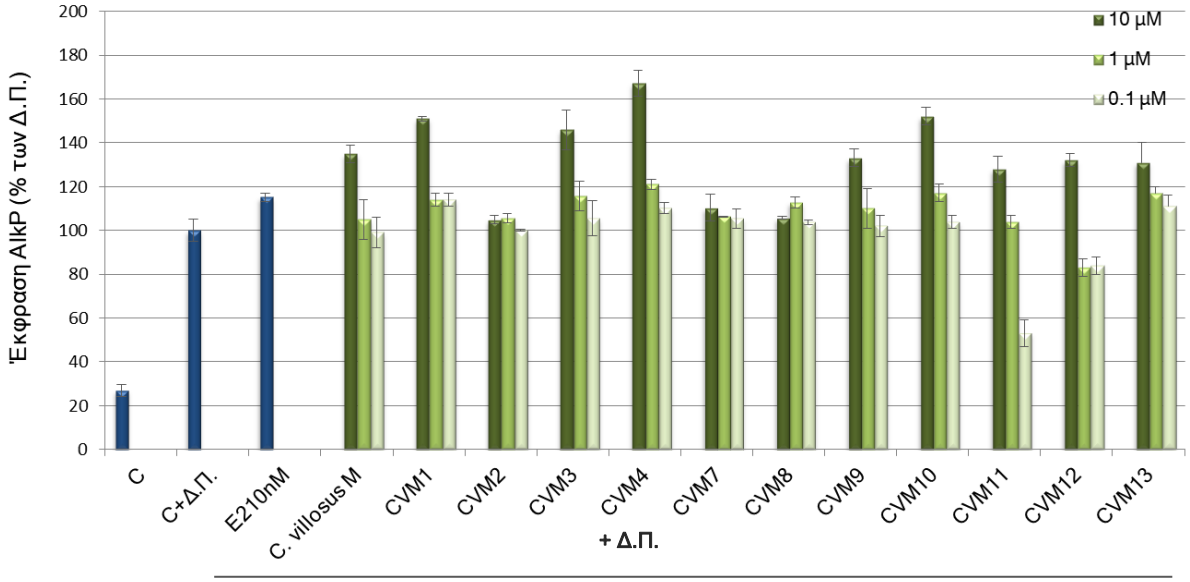
πλειοψηφία τους φαινολοξέα και φλαβονοειδή (γενίνες και γλυκοσιδικά τους παράγωγα) καθώς και ένα τριτερπένιο, ενώ οι 9 εξ' αυτών αξιολογήθηκαν βιολογικά στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 144: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Dorycnium hirsutum* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Πέντε από τους μεταβολίτες που ελέγχθηκαν κρίθηκαν ικανοί να επάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε οστεοβλάστες στη συγκέντρωση 10 μM, συγκρινόμενοι με τους Δ.Π. και δύο εξ αυτών παρουσίασαν δράση μεγαλύτερη της οιστραδιόλης (σε συγκέντρωση 10 nM). Η *β*-αμυρίνη **(DHM1)** φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε ποσοστό 82%, διατηρώντας την επαγωγική της επίδραση και στη συγκέντρωση 1 μM, με επαγωγή της έκφρασης της AlkP κατά 117% σε σύγκριση με το δείγμα διαφοροποίησης. Από άποψη δραστικότητας, ο επόμενος μεταβολίτης ήταν η κατεχίνη **(DHM5)**, η οποία στη συγκέντρωση 10 μM εμφανίστηκε δραστικότερη της οιστραδιόλης, επάγοντας τη διαφοροποίηση κατά 23%. Το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ **(DHM2)**, προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης της AlkP και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου (110%, 106% και 105% σε συγκέντρωση 10, 1 και 0.1 μM, αντίστοιχα), ενώ το 4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-*trans*-π-κουμαρικό οξύ **(DHM12)** παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής της AlkP στη συγκέντρωση 0.1 μM, με τιμή έκφρασης 114%. Το γαλλικό οξύ **(DHM6)** παρουσίασε επαγωγή στις συγκεντρώσεις 1 μM και 0.1 μM (7% και 5%, αντίστοιχα) αν και στη συγκέντρωση 10 μM εμφανίστηκε να δρα μερικώς κατασταλτικά επί της διαφοροποίησης. Χωρίς ουσιαστική ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης εμφανίστηκαν ο 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της κερκετίνης **(DHM7)** και ο 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης **(DHM10)**, ενώ και τα άλλα δύο ραμνοπυρανόσυλο- παράγωγα της καιμπφερόλης και της κερκετίνης, **DHM9** και **DHM11** αντίστοιχα, σημείωσαν μερική καταστολή της διαφοροποίησης σε ποσοστό περίπου 20%.

❖ Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του ***Cytisus villosus*** **(CVM)** (§ 4.3.2.1.) ταυτοποιήθηκαν 13 μεταβολίτες, στην πλειοψηφία τους φαινολοξέα και ισοφλαβονοειδή (γενίνες και γλυκοσιδικά τους παράγωγα), καθώς και μια στερόλη, ενώ ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες ελέγχθηκαν 11 εξ' αυτών.

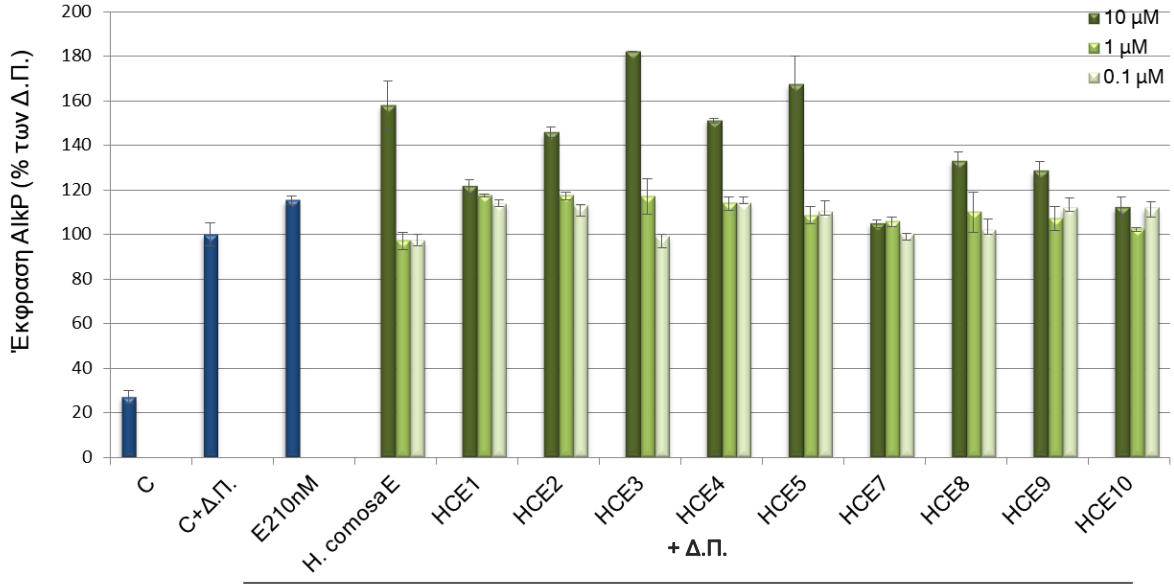


Εικόνα 145: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Cytisus villosus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όλοι οι μεταβολίτες που ελέγχθηκαν κρίθηκαν ικανοί να επάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε οστεοβλάστες στη συγκέντρωση 10 μM, με την πλειοψηφία τους να διατηρεί την επαγωγική ικανότητα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι 8 από τους 11 μεταβολίτες παρουσίασαν δραστικότητα μεγαλύτερη της οιστραδιόλης στη συγκέντρωση 10 μM. Αναλυτικότερα, το 3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ **(CVM4)** χαρακτηρίστηκε από την υψηλότερη ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης της τάξεως του 167%, διατηρώντας τη δραστικότητά του και στις συγκεντρώσεις 1 μM και 0.1 μM, με τιμή έκφρασης της AlkP 121% και 110%, αντίστοιχα. Σημειώνεται πως τα υπόλοιπα φαινολοξέα (**CVM7** και **CVM8**) εκδήλωσαν επαγωγική δράση και στις τρεις συγκεντρώσεις, συγκρινόμενα με τους Δ.Π., αλλά μικρότερη από το CVM4. Ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας χαρακτηρίστηκε και ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης **(CVM10)** με τιμή έκφρασης της AlkP στη συγκέντρωση 10 μM 152% και διατήρηση της επαγωγικής του ικανότητας και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Το διγλυκοσιδικό παράγωγο της γενιστεΐνης **CVM13** σημείωσε εξ' ίσου ικανοποιητική δράση με επαγωγική ικανότητα μεγαλύτερη της οιστραδιόλης στις συγκεντρώσεις 10 και 1 μM (133% και 117%, αντίστοιχα), ενώ η δραστικότητά του διατηρήθηκε και στα 0.1 μM (111%). Επιπλέον, η γενιστεΐνη **(CVM3)** στη συγκέντρωση 10 μM εμφάνισε ικανότητα επαγωγής της τάξεως του 45% σε σχέση με τους Δ.Π. Από τη σύγκριση με τη δράση του μεταβολίτη **CVM10** θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία γλυκόσης στη θέση 7 της γενίνης δε φαίνεται να επηρεάζει σε

σημαντικό βαθμό την επαγωγική ικανότητα. Η 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη **(CVM9)** ενίσχυσε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε όλες τις συγκεντρώσεις, με ποσοστό αύξησης της διαφοροποίησης κατά 33% στη συγκέντρωση 10 μM. Ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης **(CVM12)** σημείωσε ανάλογη ικανότητα διαφοροποίησης στην υψηλή συγκέντρωση με τιμή έκφρασης της AlkP 132%, όπως και ο μεταβολίτης **CVM11** (7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης) με τιμή έκφρασης της AlkP 128% στη συγκέντρωση 10 μM. Τέλος, η *β*-σιτοστερόλη **(CVM1)**, χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση σε ποσοστό 50% στη συγκέντρωση 10 μM και διατηρώντας την επαγωγική της επίδραση και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

❖ Από τη μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του ***Hippocrepis comosa*** **(HCE)** (§ 4.3.3.1) ταυτοποιήθηκαν 10 μεταβολίτες (2 στερόλες, 2 τριτερπένια, 2 κουμεστάνια, 3 αρυλοκουμαρίνες, 1 ισοφλαβόνη) ενώ 9 εξ αυτών αξιολογήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση.



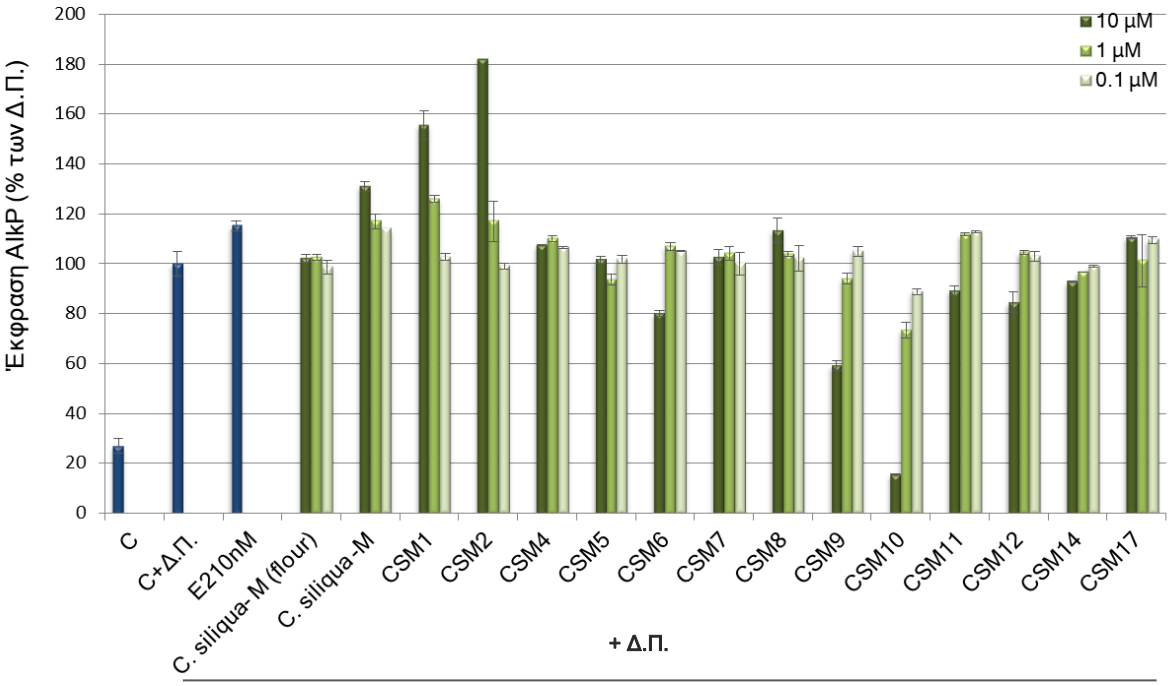
Εικόνα 146: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Hippocrepis comosa* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αξίζει να σημειωθεί πως όλοι τους κρίθηκαν ικανοί να επάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου. Αναλυτικότερα, όλα τα τερπενοειδή χαρακτηρίστηκαν ως ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες, επάγοντας την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, η *β*-αμυρίνη **(HCE3)** και η *β*-σιτοστερόλη **(HCE4)** σημείωσαν τη μεγαλύτερη επαγωγή στην έκφραση της AlkP στη συγκέντρωση 10 μM, με τιμές 182% και 151%, αντίστοιχα. Από άποψη δραστικότητας, ο επόμενος μεταβολίτης είναι η *β*-σιτοστερόνη **(HCE2)** με επαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 μεγαλύτερη κατά 46%, σε σχέση με τους Δ.Π., ενώ η Δ^1-λουπενόνη **(HCE1)** παρουσίασε ικανότητα διαφοροποίησης μεγαλύτερη της οιστραδιόλης στις

δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις ελέγχου. Επαγωγική ικανότητα υψηλότερη των Δ.Π. εκδήλωσε η φαινυλοκουμαρίνη 3-(2,4,-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη **(HCE10)**, η οποία έδειξε ότι επάγει τη διαφοροποίηση σε ποσοστό 112% στις συγκεντρώσεις 10 και 0.1 μM. Αξιοσημείωτο είναι πως και τα τρία κουμεστάνια που ελέγχθηκαν χαρακτηρίστηκαν από αξιόλογη δραστικότητα. Συγκεκριμένα, η ισοτριφολιόλη **(HCE9)** αύξησε τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών κατά 28% περισσότερο σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM, διατηρώντας την επαγωγική της επίδραση και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Η κουμεστρόλη **(HCE8)** χαρακτηρίστηκε δραστικότερη της οιστραδιόλης, προκαλώντας έκφραση της AlkP 133% στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ το πρενυλιωμένο της ανάλογο 6-(α,α,-διμεθυλαλλυλο)κουμεστρόλη **(HCE5)** κρίθηκε ως ο ικανότερος διαφοροποιητικός παράγοντας στη σειρά των κουμεστανίων επάγοντας τη διαφοροποίηση κατά 67% περισσότερο σε σύγκριση με τους Δ.Π. σε συγκέντρωση 10 μM και διατηρώντας την ενεργότητά του και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Τέλος, μικρή επαγωγική ικανότητα εκδήλωσε και η ισοφλαβόνη φορμονονετίνη **(HCE7)** με τιμή έκφρασης της AlkP της τάξης του 105%.

❖ Από τη φυτοχημική ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Ceratonia siliqua* **(CSM)** (§ 4.3.4.1) ταυτοποιήθηκαν 18 δευτερογενείς μεταβολίτες, στην πλειοψηφία τους παράγωγα του γαλλικού οξέος και φλαβονοειδή, ενώ απομονώθηκαν επίσης 1 στερόλη και 1 τερπένιο. Από τους προαναφερόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες επιλέχθηκαν 13, με βάση την καθαρότητά τους, ώστε να αξιολογηθούν ως προς τη βιολογική τους δράση.

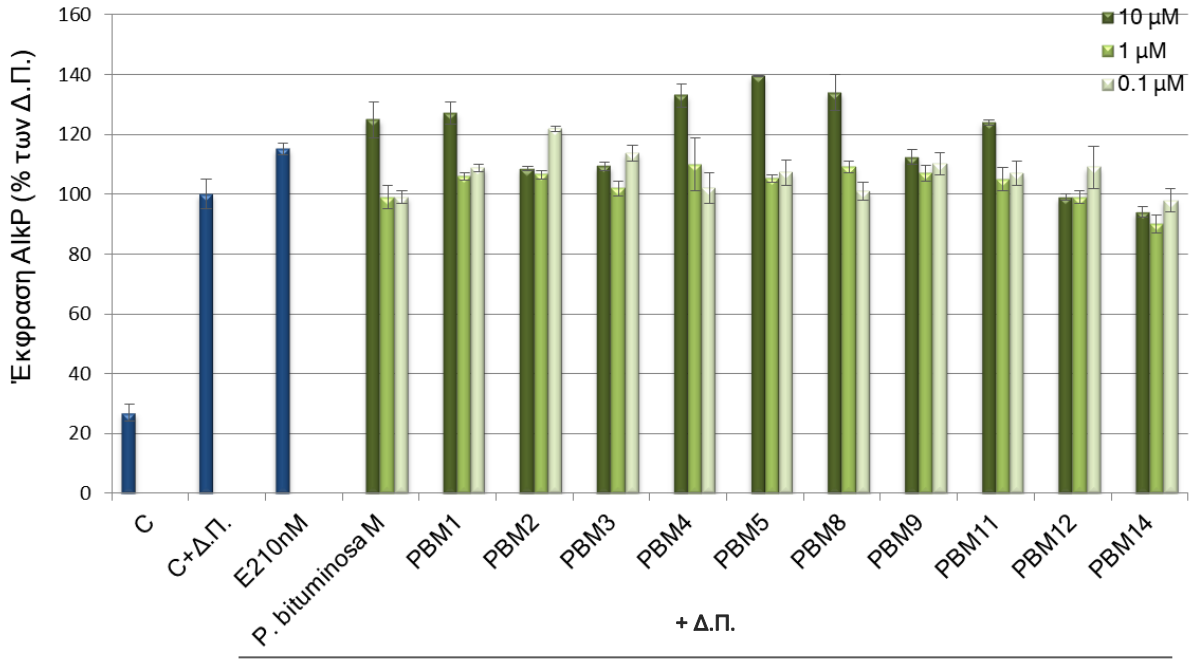
Συνολικά 7 από τους ελεγχόμενους μεταβολίτες χαρακτηρίστηκαν ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες στη συγκέντρωση 10 μM, με τα δύο κύρια τερπενοειδή του εκχυλίσματος *β*-σιτοστερόλη **(CSM2)** και λουπεόλη **(CSM1)** να σημειώνουν επαγωγή της διαφοροποίησης μεγαλύτερη της οιστραδιόλης στις συγκεντρώσεις των 10 μM και 1 μM. Ο μεταβολίτης 7-*O* -γλυκοπυρανοσίδης της 8-μεθοξυ-4'-*O*-μεθυλογενιστεΐνης **(CSM4)** επέδειξε μικρή ικανότητα διαφοροποίησης των MC3T3-E1 και στις τρεις συγκεντρώσεις, σημειώνοντας αύξηση της διαφοροποίησης από 7 έως 10% σε σχέση με τους Δ.Π. Η φλαβονόλη μυρικετίνη **(CSM8)** στη συγκέντρωση 10 μM παρουσίασε επαγωγή της έκφρασης της AlkP ανάλογη της οιστραδιόλης, διατηρώντας μικρή επαγωγική επίδραση και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Σημειώνεται δε ότι το γλυκοσιδικό της παράγωγο **CSM14** (3-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της μυρικετίνης) δεν εκδηλώνει αντίστοιχη επαγωγική ικανότητα. Το γαλλικό οξύ και οι γαλλικοί εστέρες της γλυκόσης, όπως έχει αναφερθεί, αποτελούν βασικούς μεταβολίτες του είδους *C. siliqua*. Στη συγκέντρωση 10 μM το γαλλικό οξύ **(CSM6)** φάνηκε να δρα μερικώς κατασταλτικά έναντι της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου (1 και 0.1 μM) σημείωσε μικρή επαγωγή (7% και 5%, αντίστοιχα).



Εικόνα 147: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από τη *Ceratonia siliqua* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ανάλογη δραστικότητα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της 1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόσης **(CSM11)** και της 1,2,3-τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόσης **(CSM12)**. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολίτης **CSM11** σημείωσε μεγαλύτερη επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης κατά 12% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM, και καταστολή της διαφοροποίησης κατά 10% στη συγκέντρωση 10 μM. Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε και στον μεταβολίτη **CSM12** με μικρότερη όμως επαγωγική ικανότητα στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM. Αξίζει να σημειωθεί πως ο έλεγχος της 1,2,3,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόσης **(CSM10)** ανέδειξε κυτταροτοξικότητα στη συγκέντρωση 10 μM, καθώς σημείωσε τιμή έκφρασης της AlkP 17%, ενώ στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM παρουσίασε καταστολή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τιμή έκφρασης AlkP 73% και 89%, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως η αύξηση των ομάδων γαλλικού οξέος στο σκελετό φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση της δραστικότητας, αλλά και κυτταροτοξικότητα αυξανομένης της συγκέντρωσης.

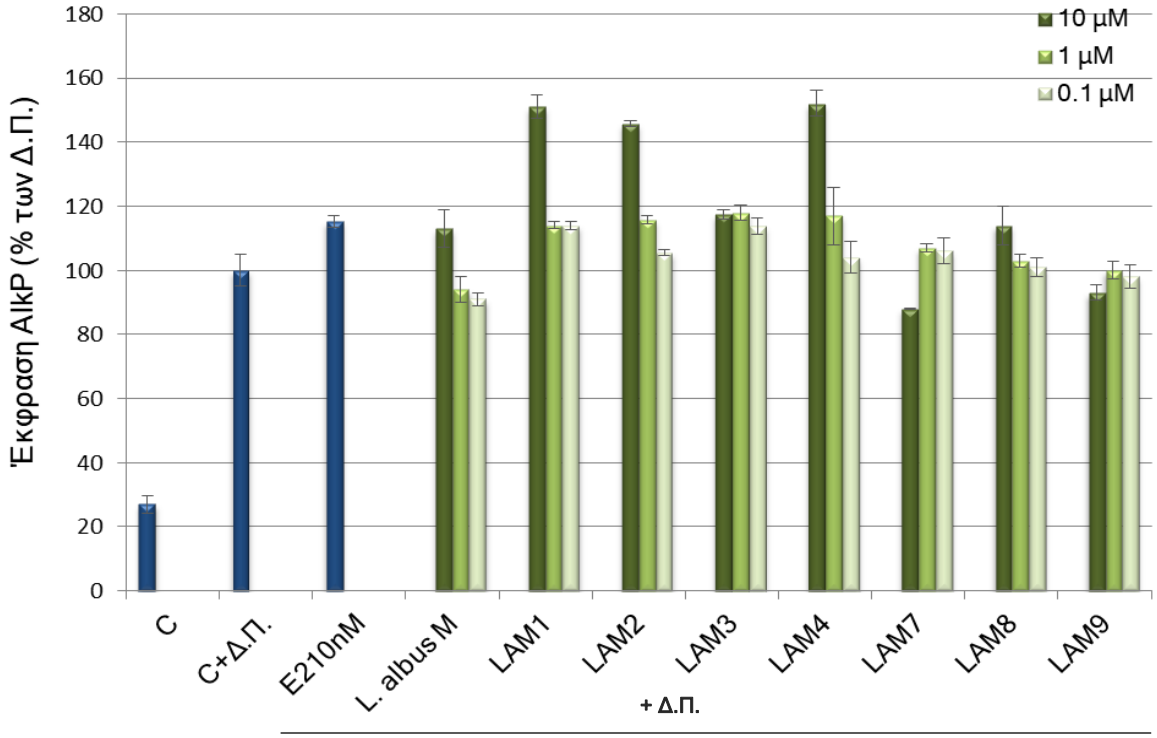
❖ Η φυτοχημική μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Psoralea bituminosa* (PBM) (§ 4.3.5.1) οδήγησε στην ταυτοποίηση 15 μεταβολιτών, 5 φλαβονοειδών, 5 κουμαρινών, 2 φαινολοξέων, 1 κουμεστανίου, 1 πτεροκαρπάνης και 1 τριτερπενικής σαπωνίνης, από τους οποίους 10 ελέγχθηκαν για τη βιολογική τους δράση.



Εικόνα 148: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από την *Psoralea bituminosa* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Από το σύνολο των μεταβολιτών που αξιολογήθηκαν, οι 8 σημείωσαν επαγωγική επίδραση στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου. Την υψηλότερη δραστικότητα εμφάνισε η ισοφλαβόνη νταντζεΐνη **(PBM5)**, με τιμή έκφρασης της AlkP 140% στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ το σακχαριδικό της ανάλογο **PBM8** (7-*O*- (6-*O*-ακετυλο-*β*-γλυκοπυρανοσυλο) νταντζεΐνη) παρουσίασε αντίστοιχη δραστικότητα με τιμή αλκαλικής φωσφατάσης 134%. Ικανός διαφοροποιητικός παράγοντας χαρακτηρίστηκε και η φαινυλοκουμαρίνη κουμεστρόλη **(PBM4)**, η οποία έδειξε επαγωγή της διαφοροποίησης μεγαλύτερη κατά 33% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM. Στη σειρά δραστικότητας ακολουθεί το πτεροκαρπάνιο μπιτουκαρπίνη Α **(PBM1)** αυξάνοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 27% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις σημειώνεται μικρότερη επαγωγική ικανότητα. Η 8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη **(PBM9)** αύξησε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 10% περίπου σε σύγκριση με τους Δ.Π. σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου. Οι φαινυλοκουμαρίνες ψωραλένιο **(PBM3)** και ισοψωραλένιο **(PBM2)** ενίσχυσαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, με το ισοψωραλένιο **(PBM2)** να σημειώνει υψηλότερη δράση έναντι της οιστραδιόλης στη συγκέντρωση 10 μM, με τιμή έκφρασης της AlkP 122%. Το γλυκοσιδικό παράγωγο **PBM12** (ψωραλενοσίδης) εκδήλωσε επαγωγική ικανότητα μόνο στη συγκέντρωση 0.1 μM της τάξεως του 10% και καθόλου δραστικότητα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επίσης, η 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλαπιγενίνη **(PBM11)** αύξησε τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 κατά 24% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στην υψηλή συγκέντρωση ελέγχου, σε αντίθεση με τη 6-*C*-*β*-D γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη **(PBM14)** που δεν παρουσίασε καμία δραστικότητα.

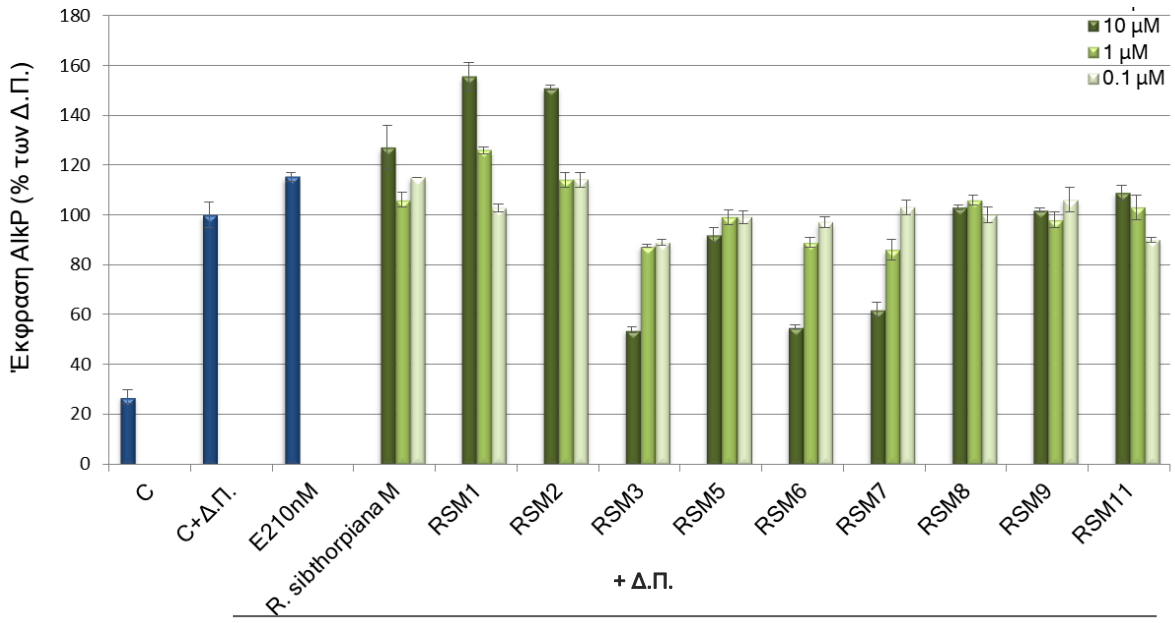
❖ Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του ***Lupinus albus*** **(LAM)** (§ 4.3.6.1) ταυτοποιήθηκαν 9 ενώσεις, εκ των οποίων 8 φλαβονοειδή και 1 στερόλη. Από τους προαναφερόμενους μεταβολίτες 7 απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή και ελέγχθηκαν για τη βιολογική τους δράση.



Εικόνα 149: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Lupinus albus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας αναδείχθηκε και σε αυτή την περίπτωση η *β*-σιτοστερόλη **(LAM1)**, ενώ από τις ισοφλαβόνες η γενιστεΐνη **(LAM2)** και ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης **(LAM4)** σημείωσαν αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης κατά περίπου 50% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM. Χαρακτηριστικός μεταβολίτης του γένους *Lupinus* είναι η 2'-υδροξυγενιστεΐνη **(LAM3)**, η οποία χαρακτηρίστηκε ως ικανότερος διαφοροποιητικός παράγοντας σε σύγκριση με την οιστραδιόλη στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελέγχου. Από τα γλυκοσιδικά της παράγωγα, η 5-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη **(LAM8)** εμφάνισε επαγωγική επίδραση και στις τρεις συγκεντρώσεις, ενώ η 7-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη **(LAM7)** μόνο στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM με ποσοστά αύξησης σε 7% και 6%, αντίστοιχα σε σύγκριση με τους Δ.Π.. Τέλος, ο μεταβολίτης 7,4'-δι-*O*- γλυκοπυρανοσυλολουτεόνη (LAM9) δεν φάνηκε να επιδρά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση.

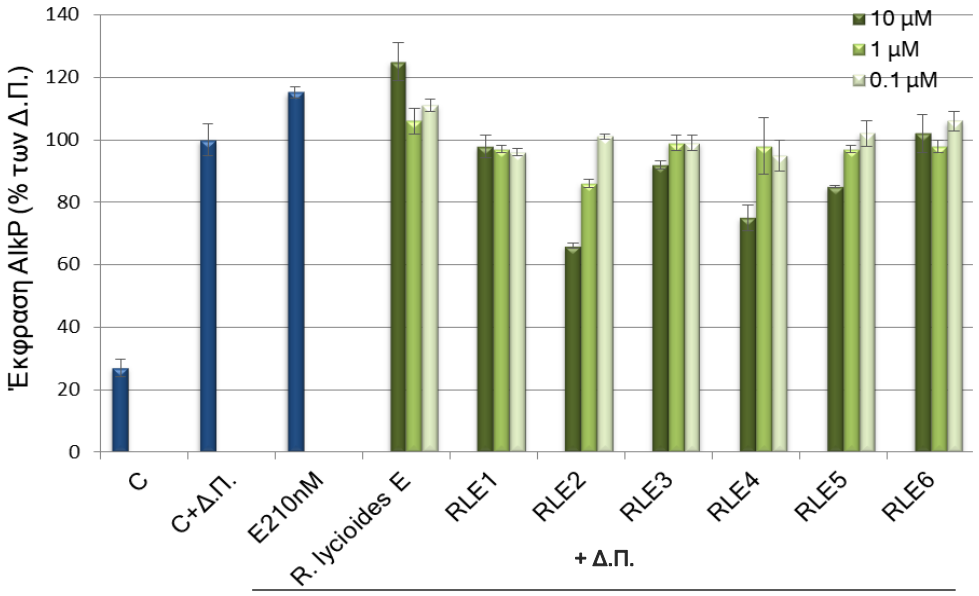
❖ Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM) (§ 4.3.7.1) ταυτοποιήθηκαν 13 μεταβολίτες, εκ των οποίων 9 αξιολογήθηκαν για τις βιολογικές τους ιδιότητες.



Εικόνα150: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus sibthorpiana* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Και σε αυτό το εκχύλισμα, η λουπεόλη **(RSM1)** και η *β*-σιτοστερόλη **(RSM2)** αποτελούν τα δύο κύρια τερπενοειδή του εκχυλίσματος, τα οποία χαρακτηρίζονται ως ισχυροί διαφοροποιητικοί παράγοντες. Μικρή επαγωγική ικανότητα εκδήλωσε η φλαβονόλη καιμπφερόλη **(RSM8)**, καθώς και το γλυκοσιδικό παράγωγό της 3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)-καιμπφερόλη **(RSM9)**, η οποία αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του εκχυλίσματος. Επίσης, το 7- μεθοξυ ανάλογό του μεταβολίτη RSM9, η 3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 3)-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο)ραμνοσιτρίνη **(RSM11)**, επέδειξε ελαφρώς υψηλότερη επαγωγική ικανότητα στη συγκέντρωση 10 μM με τιμή έκφρασης της AlkP 109%. Η φλαβανονόλη ταξιφολίνη **(RSM5)** δεν επηρέασε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ η αμπελοψίνη **(RSM7)** στις συγκεντρώσεις 10 και 1 μM φάνηκε να δρα ανασταλτικά σε ποσοστό 40% και 10%, αντίστοιχα. Τέλος, η ανθρακινόνη εμοδίνη **(RSM3)**, η οποία είναι χαρακτηριστικός μεταβολίτης του γένους *Rhamnus*, επέδειξε σημαντική αναστολή της διαφοροποίησης σε ποσοστό 50% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM, γεγονός το οποίο παρατηρείται σε μικρότερο βαθμό (περίπου 10%) και στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Ανάλογη συμπεριφορά από άποψη δραστικότητας εμφάνισε και ο 8-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-(1->6)-γλυκοπυρανοσίδης της τοραχρυσόνης **(RSM6).**

❖ Από τη μελέτη του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLE) (§ 4.3.8.1) απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση 6 μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των φλαβονοειδών.



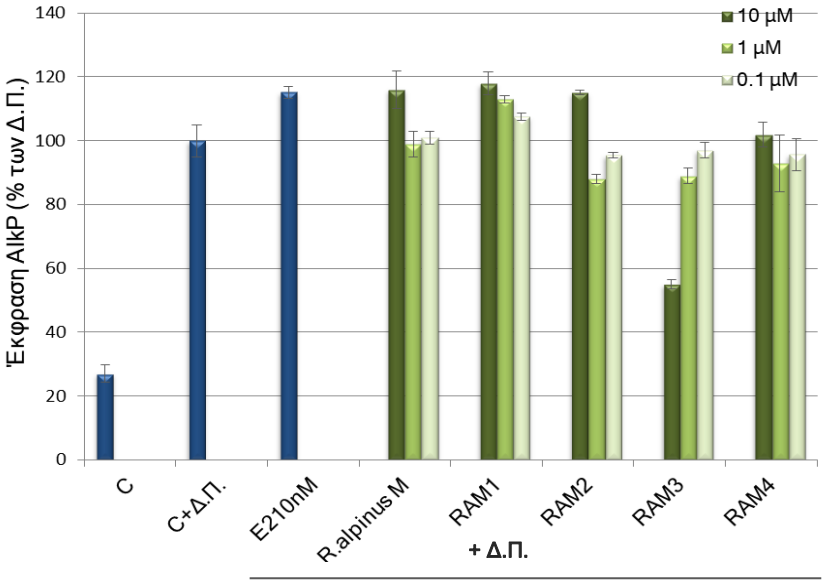
Εικόνα 151: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus lycioides* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η οριακή επαγωγική επίδραση που εκδήλωσε ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της καιμφερόλης **(RLE6)**, δεν φαίνεται να επαναλαμβάνεται τόσο από το μονοακέτυλο παράγωγό του **RLE5** (3-*O*-(*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 3)-4-O-ακετυλο-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→ 6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο) καιμπφερόλη), όσο και από το το τριακέτυλο παράγωγό του **RLE4** (3-*O*-(2,3-δι-*O*-ακετυλο-*α*-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-4-O-ακετυλο-*α*-ραμνοπυ-ρανοσυλο-(1→ 6)-*β*-γαλακτοπυρανοσυλο) καιμπφερόλη). Στη συγκέντρωση 10 μM, και στις δύο περιπτώσεις, σημειώνεται αναστολή της διαφοροποίησης με το μεταβολίτη RLE4 να σημειώνει αναστολή της τάξεως 25%. Βασιζόμενοι σε αυτά τα αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως η προσθήκη ακετυλομάδων στον βασικό σκελετό μειώνει την επαγωγική ικανότητα και πιθανόν ευθύνεται για την εκδήλωση ανασταλτικής επίδρασης στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η φλαβονόλη κερκετίνη **(RLE2)** ανέστειλε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση στις συγκεντρώσεις 10 και 1 μM και μάλιστα σε ποσοστό 34% και 14% αντίστοιχα, γεγονός που δεν παρατηρείται στη συγκέντρωση 0.1 μM, ενώ τέλος η 5,7,3′,5′-τετραϋδροξυφλαβανόνη **(RLE1)** δεν παρουσίασε καμία σημαντική επίδραση.

❖ Από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του ***Rhamnus alpinus*** **(RAM)** (4.3.9.1) απομονώθηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση 4 μεταβολίτες, εκ των οποίων 2 ανθρακινόνες, 1 ακετοφαινόνη και 1 ναφθόλη.

Ο μεταβολίτης 8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης (RAM1), παρουσίασε επαγωγική δράση ανάλογη της οιστραδιόλης στη μεγάλη συγκέντρωση ελέγχου (118%), ενώ φάνηκε να διατηρεί την επαγωγική του επίδραση και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Ο 8-*O*-*β*-ρουτινοσίδης της φυσιόνης **(RAM2)** προκάλεσε επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης κατά 15% μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους Δ.Π. μόνο στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ στις υπόλοιπες

συγκεντρώσεις δεν εκδήλωσε ουσιαστική δραστικότητα. Ο μεταβολίτης **RAM4** (4-*O*-μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη) φάνηκε πως δεν επιδρά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, όπως επίσης και ο ρουτινοσίδης της τοραχρυσόνης **(RAM3)**, οποίος όμως εμφάνισε σημαντική αναστολή της διαφοροποίησης σε ποσοστό 45% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM.

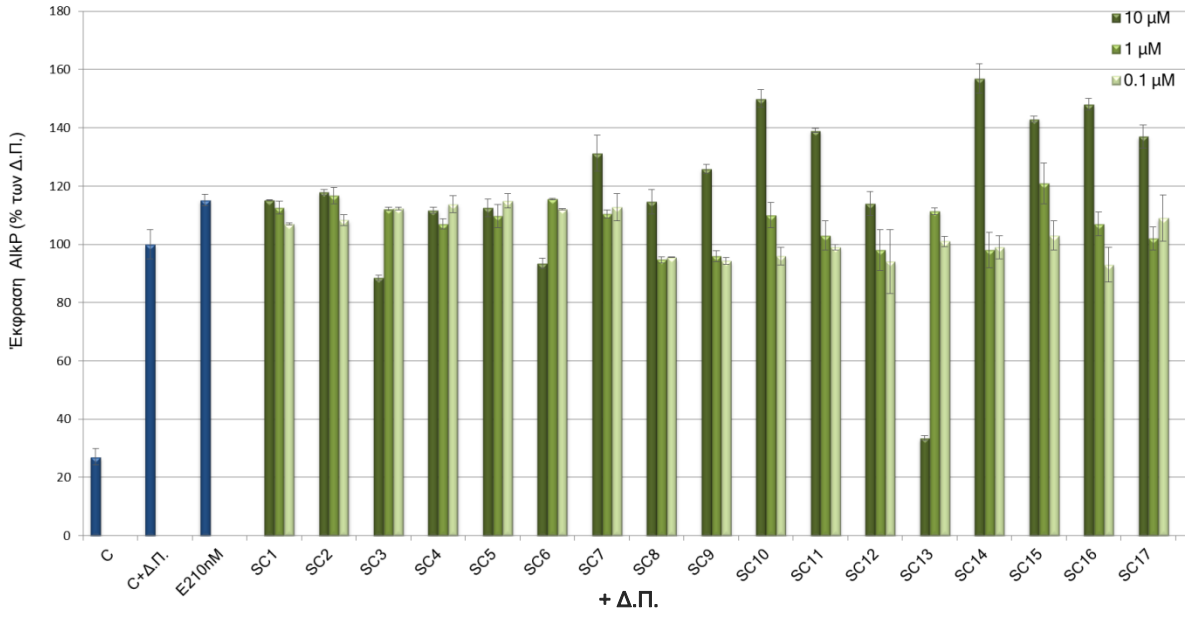


Εικόνα 152: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τις απομονωμένες ενώσεις από το *Rhamnus alpinus* (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

6.1.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση

Η ικανότητα των συνθετικών ανάλογων να επάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 αξιολογήθηκε, όπως και στην περίπτωση των φυσικών ενώσεων, σε τρεις συγκεντρώσεις (10, 1, 0.1 μM) και προσδιορίστηκε η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP). Η επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης εκφράστηκε ως ποσοστό (%) της επαγωγής της έκφρασης AlkP παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.).

❖ Όπως φαίνεται στην εικόνα 153 όλα τα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα που ελέγχθηκαν αποδείχτηκαν ικανά να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες, ενώ 9 από αυτά παρουσίασαν δραστικότητα μεγαλύτερη της οιστραδιόλης (10 nM) στη συγκέντρωση 10 μM.



Εικόνα 153: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα δεοξυβενζοϊνών (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

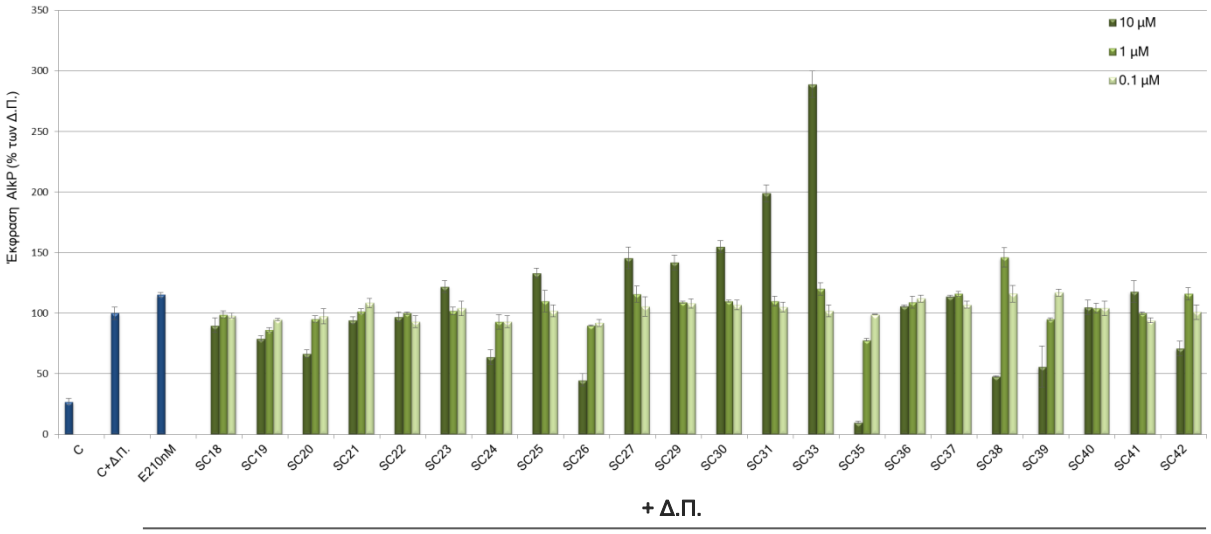
Πιο συγκεκριμένα, τα παράγωγα **SC1-SC17** είναι παράγωγα δεοξυβενζοϊνών που φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες και κρίθηκαν ικανά να επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε μια ή/και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου. Τα π-υδροξυ- και π-βρωμο-παράγωγα (**SC1** και **SC2**) παρουσίασαν δραστικότητα ανάλογη της οιστραδιόλης στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ για το π-νιτρο παράγωγο **SC3** και τη 3',4'-διυδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνη (**SC6**), παρατηρήθηκε υψηλότερη δραστικότητα στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (1 και 0.1 μM) σε σχέση με την συγκέντρωση 10 μM. Συγκρίνοντας το μεθοξυλιωμένο παράγωγο **SC4** με την ένωση **SC1** από την οποία προήλθε, παρατηρήθηκε μια

μικρή αύξηση της επαγωγικής του ικανότητας στη συγκέντρωση 0.1 μM, γεγονός που επισημάνθηκε και στην περίπτωση του αλογονωμένου παραγώγου **SC5**, με τιμές έκφρασης της AlkP 114% και 115%, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρούμε ότι η παρουσία φθορίου στο **SC7** επιφέρει σημαντική αύξηση της δραστικότητας, παρουσιάζοντας επαγωγή της διαφοροποίησης κατά 31% στη συγκέντρωση 10 μM σε σύγκριση με τους Δ.Π.

Ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας χαρακτηρίστηκε και η 3'-βρωμοδεοξυβενζοΐνη (**SC10**), η οποία προκάλεσε αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης κατά 50% στη συγκέντρωση 10 μM, με την πολυμεθοξυλιωμένη δεοξυβενζοΐνη **SC11** να ακολουθεί σε σειρά δραστικότητας με αύξηση της επαγωγής κατά 39% σε σύγκριση με τους Δ.Π. Στην περίπτωση του μονοπρενυλιωμένου αναλόγου **SC12** της ένωσης **SC11**, αλλά και του διπρενυλιωμένου παραγώγου **SC13**, παρατηρήθηκε μείωση της δραστικότητας στη συγκέντρωση 10 μM για την ένωση **SC12** και σημαντική αναστολή της διαφοροποίησης στην περίπτωση της **SC13** (τιμή έκφρασης AlkP 34%). Παρ' όλα αυτά, η ένωση **SC13** φάνηκε να παρουσιάζει επαγωγή της διαφοροποίησης σε συγκέντρωση 1 μM. Σημειώνεται δε, πως αντίθετα με τις προαναφερόμενες ενώσεις, τα πρενυλιωμένα ανάλογα **SC14** και **SC15** της π-φθοροδεοξυβενζοΐνης (**SC7**), εκδήλωσαν αυξημένη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης σε ποσοστό 57% και 43% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους Δ.Π., στη συγκέντρωση ελέγχου 10 μM. Βελτιωμένη δραστικότητα σημείωσαν και τα πρενυλιωμένα ανάλογα **SC16** και **SC17** της χλωριωμένης δεοξυβενζοΐνης **SC8**, προάγοντας περαιτέρω τη διαφοροποίηση κατά 48% και 37% συγκρινόμενα με τους Δ.Π. Από τα προαναφερόμενα αποτελέσματα γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η εισαγωγή πρενυλομάδων στο βασικό σκελετό των δεοξυβενζοϊνών, πιθανότατα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.

❖ Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των διυδροστιλβενίων (**SC18-23**), ισοφλαβονών (**SC24-SC33**), χαλκονών (**SC35-SC38**) και διαρυλοπροπανίων (**SC39-SC42**) (εικόνα 154).

Στο σύνολό τους τα διυδροστιλβένια δεν φάνηκαν ιδιαίτερα ικανά να επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Εξαίρεση αποτέλεσαν το παράγωγο **SC21**, το οποίο προκάλεσε μικρή επαγωγή της έκφρασης της AlkP στη συγκέντρωση 0.1 μM (108%) και το **SC23** που στη συγκέντρωση 10 μM εμφανίστηκε δραστικότερο της οιστραδιόλης, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση κατά 22% σε σύγκριση με τους Δ.Π. Η δράση αυτή ήταν ανάλογη της δεοξυβενζοΐνης **SC9** από την οποία προήλθε.



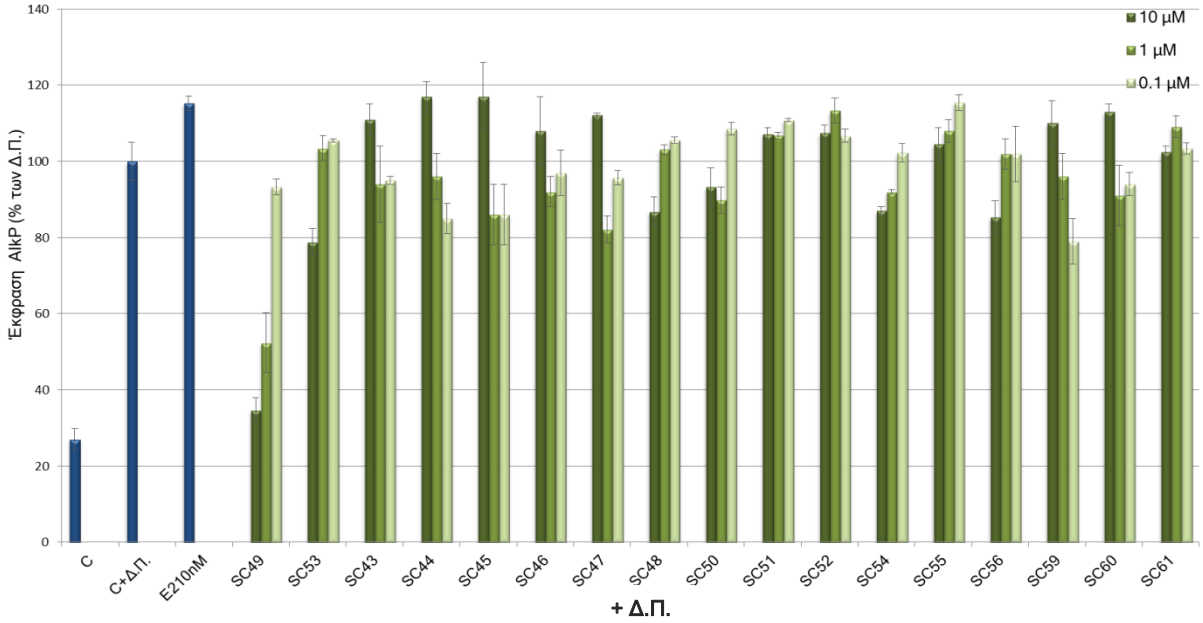
Εικόνα 154: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στην περίπτωση των μεθοξυλιωμένων ισοφλαβονών **SC24** και **SC26** δε σημειώθηκε επαγωγή της AlkP στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM, ενώ στη μεγάλη συγκέντρωση φάνηκε ότι οι προαναφερόμενες ενώσεις δρουν ανασταλτικά της διαφοροποίησης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η σταδιακή απομεθυλίωση των προαναφερόμενων παραγώγων αυξάνει τη δραστικότητα τους, καταλήγοντας στη γνωστή γενιστεΐνη (**SC27**) με ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης της τάξεως του 46% σε σύγκριση με τους Δ.Π. στη συγκέντρωση 10 μM. Όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση των δεοξυβενζοϊνών, η προσθήκη πρενυλομάδων στην ισοφλαβόνη **SC26**, φάνηκε πως συμβάλλει σε σημαντική αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, κυρίως στη συγκέντρωση 10 μM, με τα παράγωγα **SC29** και **SC30** να επάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 κατά περίπου 50% συγκρινόμενα με τους Δ.Π. Η ένωση **SC31**, η οποία φέρει δύο πρενυλομάδες, χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός παράγοντας διαφοροποίησης αυξάνοντας κατά 100% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ η πρενυλιωμένη ισοφλαβόνη **SC33** εμφανίστηκε ως το δραστικότερο συνθετικό ανάλογο με τιμή έκφρασης της AlkP 289% στη συγκέντρωση 10 μM, διατηρώντας την επαγωγική της ικανότητα και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Τα παράγωγα χαλκονών αναδείχθηκαν ικανά να επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, με την ένωση **SC38** να παρουσιάζει την υψηλότερη δραστικότητα στη συγκέντρωση 1 μM (146%), αν και στη μεγάλη συγκέντρωση παρουσίασε οριακή τοξικότητα, ενώ οι ενώσεις **SC36** και **SC37** προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου. Μολονότι η ένωση **SC35** δεν εμφάνισε δραστικότητα, αλλά αντίθετα στη συγκέντρωση 10 μM παρουσίασε τοξικότητα, το ανηγμένο διαρυλοπροπανικό παράγωγό της (**SC39**) ήταν λιγότερο τοξικό στην μεγάλη συγκέντρωση και παρουσίασε σημαντική επαγωγή της διαφοροποίησης (117%) στη συγκέντρωση 0.1 μM. Συγκρίνοντας αντίστοιχα τα διαρυλοπροπάνια **SC41** και **SC42** με τις χαλκόνες από τις οποίες προήλθαν (**SC37** και **SC38**,

αντίστοιχα), διαπιστώθηκε κυρίως μείωση της δραστικότητάς τους στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM, ενώ στη μεγάλη συγκέντρωση η ένωση **SC41** ήταν λίγο δραστικότερη της **SC37** και η **SC42** προκάλεσε μικρότερη αναστολή της διαφοροποίησης σε σχέση με την **SC38**.

❖ Από τα δύο κουμαρινικά παράγωγα (**SC49**, **SC53**), τα οποία συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν, μόνο το **SC53** εκδήλωσε μικρή ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης και αυτό στις συγκεντρώσεις 1 και 0.1 μM.



Εικόνα 155: Έκφραση Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε του υλικού αναφοράς (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) παρουσία μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.), αλλά και σε συνδυασμό με τα συνθετικά ανάλογα κουμαρινών, στιλβενικών και δυδροστιλβενικών οξέων (10 μM, 1 μM, 0.1 μM) για 6 ημέρες. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C+Δ.Π.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σχετικά με τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των στιλβενικών οξέων, παρατηρήθηκε πως στο σύνολό τους σημείωσαν μικρή επαγωγική ικανότητα, με δύο εξ αυτών (**SC44**, **SC45**) να εμφανίζουν δραστικότητα αντίστοιχη της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 10 μM. Πιο συγκεκριμένα, δραστικά χαρακτηριστήκαν τα παράγωγα **SC43** έως **SC47** στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ τα **SC51**, **SC52** και **SC55** διατήρησαν τη δραστικότητά τους και στις τρεις συγκεντρώσεις. Επίσης, παρατηρούμε πως η διαφορετική υποκατάσταση των δακτυλίων δεν επηρέασε την εκδήλωση δραστικότητας, ενώ η αναγωγή του διπλού δεσμού στην περίπτωση των διυδροστιλβενικών οξέων **SC59**, **SC60** και **SC61** φάνηκε να επιφέρει μικρή πτώση της δραστικότητας, συγκριτικά με τα αντίστοιχα στιλβενικά οξέα **SC45**, **SC44** και **SC47** στη συγκέντρωση 10 μM.

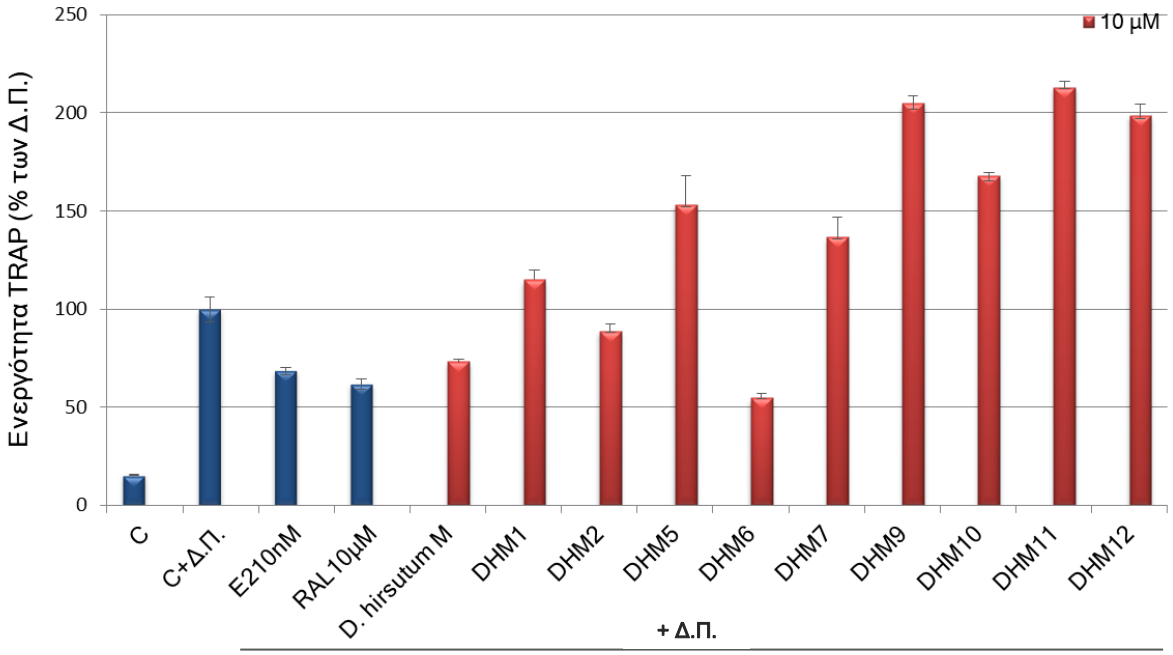
6.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης

Η ικανότητα των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών και των συνθετικών ενώσεων να επεμβαίνουν στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης αξιολογήθηκε στην κυτταρική σειρά RAW264.7. Η καταστολή της διαφοροποίησης των μακροφάγων RAW264.7 σε οστεοκλάστες προσδιορίζεται μέσω της μείωσης της έκφρασης της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP), η οποία εκκρίνεται από τους ώριμους οστεοκλάστες (βλ. § 1.4.2.5). Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία του διαφοροποιητικού παράγοντα (RANKL 50 mg/ml) και των υπό μελέτη ενώσεων για 4 ημέρες και η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε στα κύτταρα χρωματομετρικά, με προσθήκη διαλύματος φωσφορικής π-νιτροφαινόλης. Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (10 nM) και η ραλοξιφαίνη (10 μM).

6.2.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης

Όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση σε συγκέντρωση 10 μM και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τις εκατό της έκφρασης TRAP παρουσία του υλικού διαφοροποίησης.

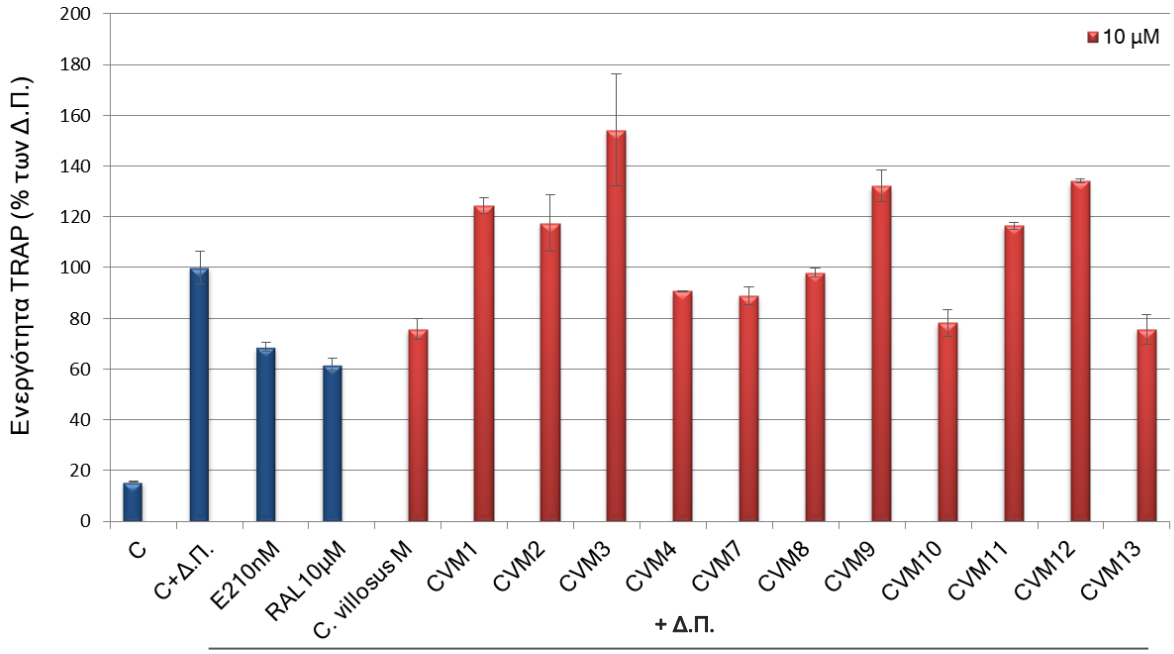
- Οι 9 μεταβολίτες που προήλθαν από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Dorycnium hirsutum*** **(DHM)** αξιολογήθηκαν και ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση, με το εκχύλισμα (DHM) να σημειώνει καταστολή της διαφοροποίησης 27% συγκρινόμενο με τους Δ.Π. Αν και η πλειοψηφία των μεταβολιτών που ελέγχθηκαν φάνηκε να επάγουν την οστεοκλαστογένεση, όπως παρατηρούμε στην εικόνα 156 τα φαινολικά οξέα αναδείχθηκαν ικανά να παρεμποδίζουν την δημιουργία οστεοκλαστών, με το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**DHM2**) να σημειώνει καταστολή σε ποσοστό 10% και το γαλλικό οξύ (**DHM6**) να σημειώνει αξιοσημείωτη καταστολή της τάξεως του 45%, η οποία ήταν μεγαλύτερη από την επίδραση της ραλοξιφαίνης.



Εικόνα156: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Λαμβάνοντας υπόψιν και την αξιολόγηση των μεταβολιτών στην κυτταρική σειρά των οστεοβλαστών, συμπεραίνουμε πως τα σακχαριδικά παράγωγα φλαβονολών (**DHM7**, **DHM9**, **DHM10** και **DHM11**) δεν διαθέτουν την επιθυμητή δραστικότητα τόσο τη διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης, όσο και εκείνη της οστεοκλαστογένεσης. Αντίθετα, τα φαινολικά οξέα (**DHM2** και **DHM6**), φάνηκε να ασκούν συνδυαστική δράση παρουσιάζοντας μικρή επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και μικρή έως σημαντική καταστολή της οστεοκλαστογένεσης. Τέλος, η *β*-αμυρίνη (**DHM1**) και η κατεχίνη (**DHM5**) παρά την υψηλή δραστικότητα στα MC3T3-E1, δεν εκδήλωσαν ικανότητα καταστολής της έκφρασης της TRAP.

❖ Το μεθανολικό εκχύλισμα του ***Cytisus villosus*** (**CVM**) κρίθηκε ικανό να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση κατά 25% και αρκετοί από τους μεταβολίτες του εκδήλωσαν ανάλογη δραστικότητα. Πιο συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση του *D. hirsutum*, τα φαινολικά οξέα σημείωσαν κατασταλτική επίδραση με το 3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**CVM4**) και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**CVM7**) να σημειώνουν καταστολή της τάξεως του 10%. Αν και τα περισσότερα παράγωγα ισοφλαβονών που ελέγχθηκαν σημείωσαν επαγωγική επίδραση, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα γλυκοσιδικά παράγωγα της γενιστεΐνης (**CVM10** και **CVM13**) φάνηκε να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση κατά περίπου 20%. Ανάλογη συμπεριφορά δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της 7-*O*-γλυκοπυρανοσυλονταντζεΐνης (**CVM11**) και της 7-*O*- γλυκοπυρανοσυλο-5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (**CVM12**).

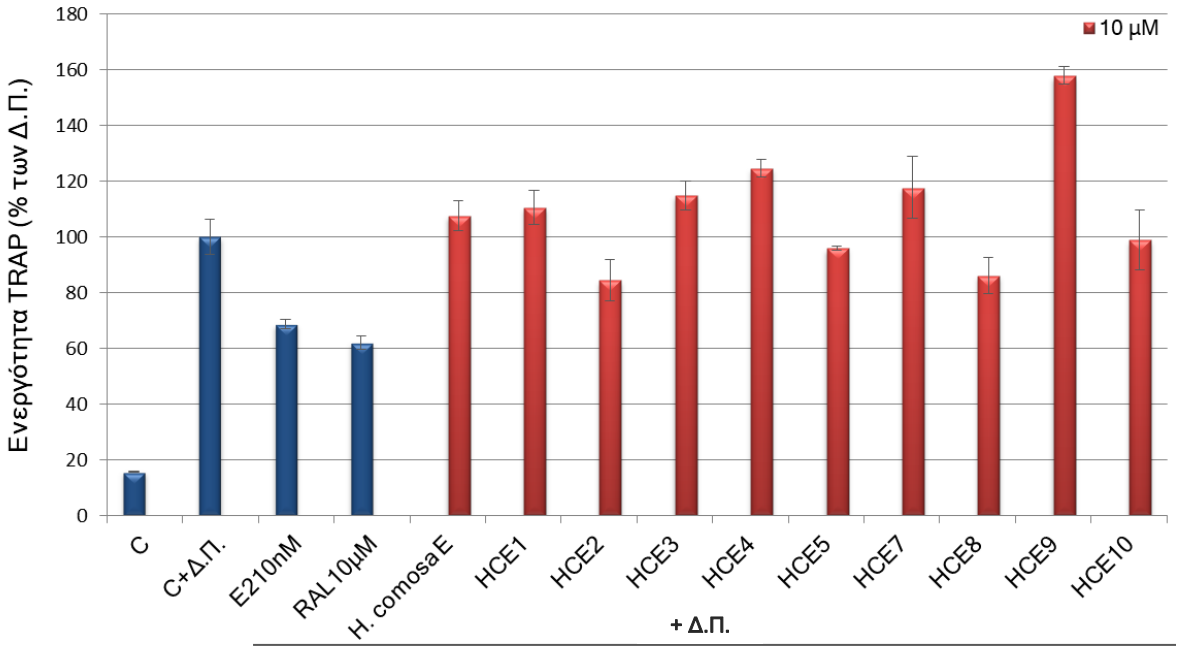


Εικόνα 157: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Cytisus villosus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Λαμβάνοντας υπόψιν και τον έλεγχο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, συμπεραίνουμε πως ιδιαίτερα αξιόλογοι οστεοπροστατευτικοί παράγοντες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν το 3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**CVM4**), το οποίο συνδυάζει υψηλή επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, καθώς και καταστολή της οστεοκλαστογένεσης, όπως επίσης και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**CVM7**), με λιγότερο αξιόλογη δραστικότητα. Πέρα από το γεγονός πως όλα τα παράγωγα ισοφλαβονών εκδήλωσαν επαγωγή της έκφρασης της AlkP στην κυτταρική σειρά των οστεοβλαστών, μόνο οι γλυκοσίδες της γενιστεΐνης (**CVM10** και **CVM13**) συνδύασαν την επιθυμητή δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τέλος, η *β*-σιτοστερόλη (**CVM1**), παρά το γεγονός ότι χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, δεν εμφάνισε την επιθυμητή επίδραση στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης.

❖ Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του ***Hippocrepis comosa*** (HCE) δεν κρίθηκε ικανό να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση, όπως και η πλειοψηφία των περιεχόμενων μεταβολιτών του. Από τους οκτώ μεταβολίτες που ελέγχθηκαν, μόνο τρεις φάνηκαν ικανοί να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολίτης *β*-σιτοστερόνη (**HCE2**) εμφάνισε μείωση της ενεργότητας TRAP κατά 15%. Λαμβάνοντας υπόψιν και τον έλεγχο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, όπου εκδήλωσε αξιόλογη επαγωγική επίδραση, ο εν λόγω μεταβολίτης μπορεί να χαρακτηριστεί ως δυνητικά οστεοπροστατευτικός παράγοντας.

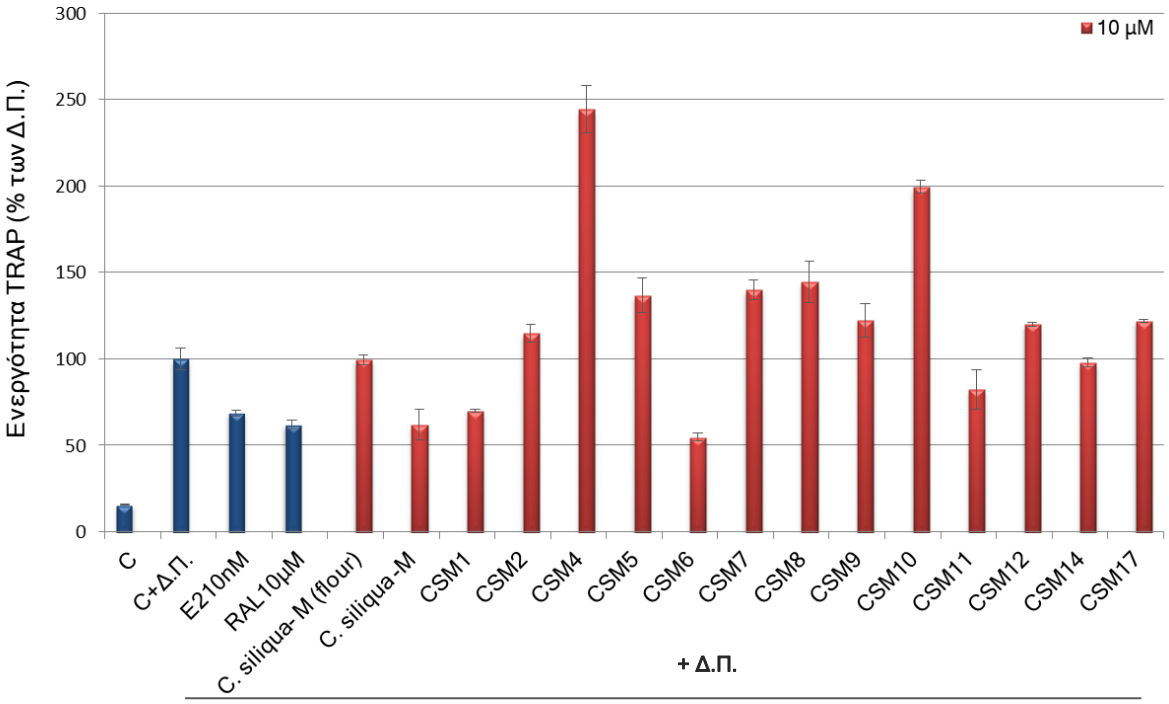


Εικόνα 158: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Hippocrepis comosa* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Μείωση της ενεργότητας TRAP παρατηρήθηκε και στις περιπτώσεις της κουμεστρόλης (**HCE8**) σε ποσοστό 14%, αλλά και της 6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)κουμεστρόλης (**HCE5**) σε μικρότερο ποσοστό, ενώ αντίθετα η ισοτριφολιόλη (**HCE9**) δεν παρουσίασε καμία δραστικότητα. Αξίζει να επισημανθεί πως τα κουμεστάνια **HCE5** και **HCE8**, εκτός της καταστολής της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης, προκάλεσαν ενίσχυση της οστεοβλαστογένεσης και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σημαντικοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες. Οι προηγούμενες παρατηρήσεις υποδεικνύουν την αρνητική συμβολή της πρενυλο- υποκατάστασης στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης, σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά MC3T3-E1 στην οποία φάνηκε να αυξάνει την επαγωγική δράση. Οι υπόλοιποι μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν προκάλεσαν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης, αν και είχαν σημειώσει σημαντική δραστικότητα στην κυτταρική σειρά των οστεοβλαστών.

❖ Από τον έλεγχο των 13 δευτερογενών μεταβολιτών, που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα της ***Ceratonia siliqua*** **(CSM),** μόνο τρεις κρίθηκαν ικανοί να καταστέλλουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, αν και το ίδιο το εκχύλισμα παρουσίασε σημαντική καταστολή της τάξης του 40%.

Αναλυτικότερα, η λουπεόλη (**CSM1**) σημείωσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της TRAP (30%) και σε συνδυασμό με την ικανότητά της να προάγει σε σημαντικό βαθμό την οστεοβλαστογένεση, την καθιστά ελπιδοφόρο οστεοπροστατευτικό παράγοντα. Επίσης, ως σημαντικός καταστολέας της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης χαρακτηρίστηκε το γαλλικό οξύ (**CSM6**), με τιμή ενεργότητας TRAP 55%.

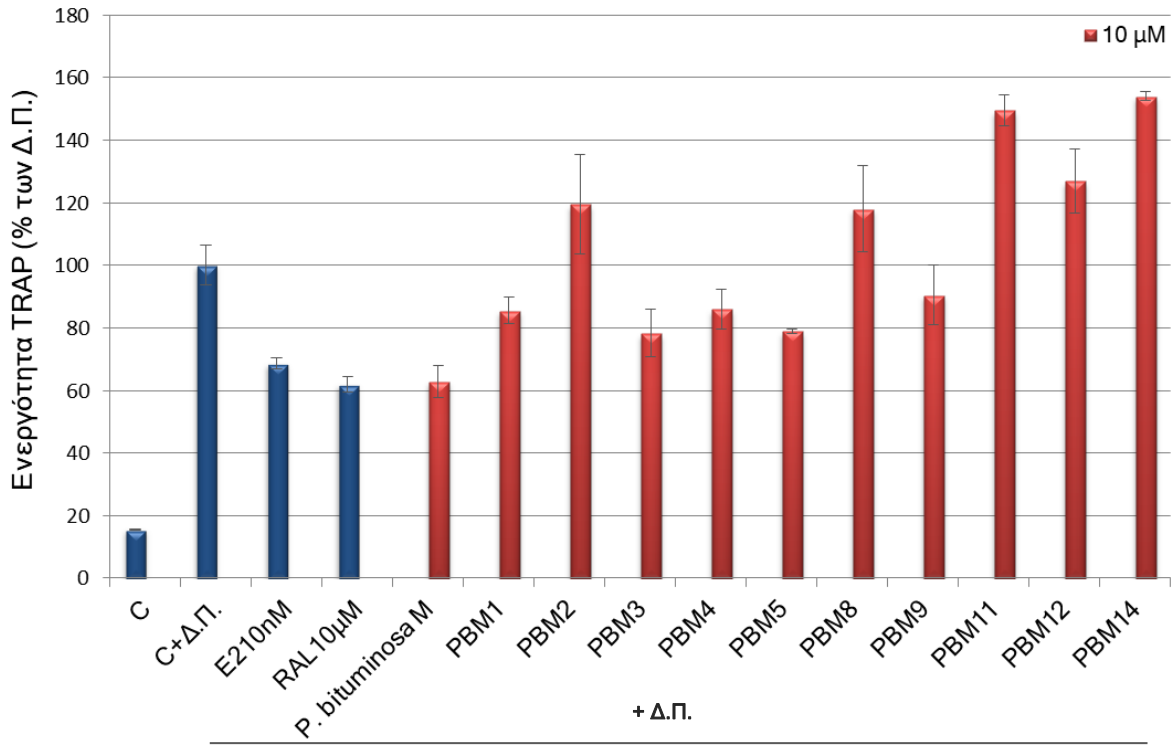


Εικόνα 159: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων της *Ceratonia siliqua* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Η 1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση (**CSM11**), εκδήλωσε επίσης κατασταλτική ικανότητα (έκφραση TRAP 82%), αν και μικρότερη από το γαλλικό οξύ, ενώ η 1,2,3-τρι-*O*-γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση (**CSM12**) φάνηκε να χάνει την κατασταλτική της επίδρασης προάγοντας την οστεοκλαστογένεση. Σημειώνεται δε πως στην περίπτωση της 1,2,3,4 -τετρα-*O*- γαλλοϋλο-*β*-D-γλυκοπυρανόσης (**CSM10**) παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα προαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως όπως και στα κύτταρα MC3T3-E1, έτσι και στην κυτταρική σειρά RAW164.7, η αύξηση του αριθμού των ομάδων γαλλικού οξέος στις προαναφερόμενες ενώσεις, είναι αντιστρόφως ανάλογη με την εκδήλωση της επιθυμητής δραστικότητας. Αναφορικά με τους λοιπούς μεταβολίτες, οι φλαβονόλες και τα σακχαριδικά τους παράγωγα (**CSM5**, **CSM7**, **CSM8** και **CSM9**) εκδηλώνουν επαγωγική τάση έναντι της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης.

❖ Το μεθανολικό εκχύλισμα της ***Psoralea bituminosa*** **(PBM)** μείωσε την οστεοκλαστική διαφοροποίηση κατά 37%, ενώ 5 από τους 10 μεταβολίτες του εκδήλωσαν επίσης κατασταλτική επίδραση.

Την υψηλότερη κατασταλτική δράση έναντι της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης παρουσίασαν οι μεταβολίτες ψωραλένιο (**PBM3**) και νταντζεΐνη (**PBM5**) με τιμή έκφρασης της ενεργότητας TRAP 78% και 79%, αντίστοιχα. Ακολουθούν με σειρά εκδήλωσης δραστικότητας η μπιτουκαρπίνη Α (**PBM1**) που εμφάνισε καταστολή 15% και η κουμεστρόλη (**PBM4**) με καταστολή 14%.



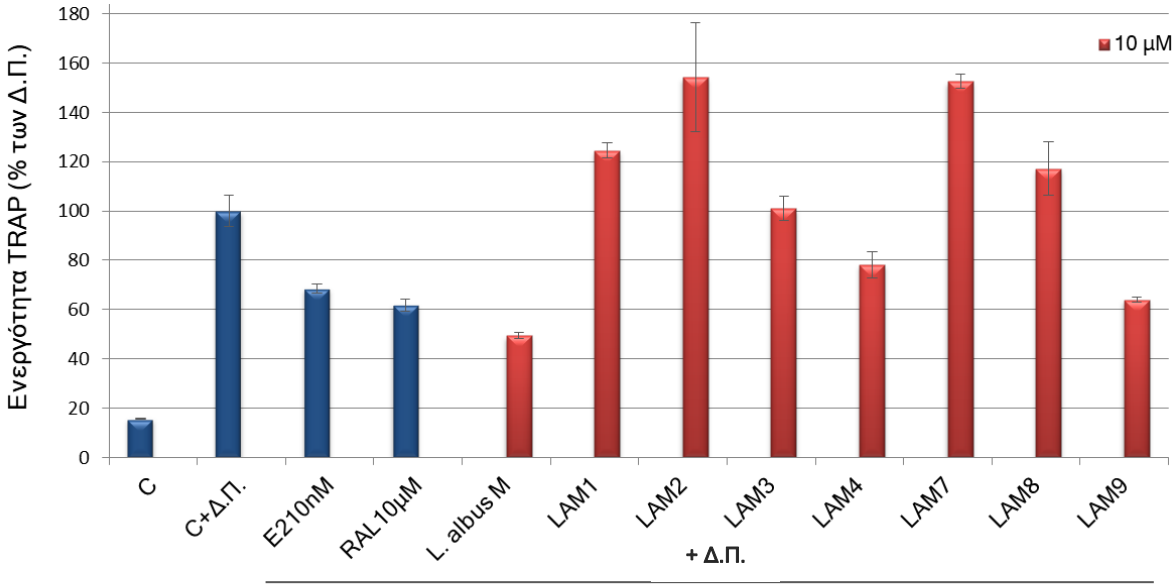
Εικόνα 160: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων της *Psoralea bituminosa* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Η 8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη (**PBM8**) επίσης εκδήλωσε κατασταλτική επίδραση, με τιμή έκφρασης της ενεργότητας TRAP 90%, σε σύγκριση με τους Δ.Π. Σημαντικό είναι το γεγονός πως όλοι οι προαναφερόμενοι μεταβολίτες προήγαγαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση συνδυάζοντας την επιθυμητή δραστικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές-στόχους. Τα γλυκοσιδικά παράγωγα φλαβονολών και ισοφλαβονών (**PBM7**, **PBM10** και **PBM14**) προήγαγαν την οστεοκλαστογένεση, όπως επίσης το ισοψωραλένιο (**PBM2**) και ο ψωραλενοσίδης (**PBM11**). Βασιζόμενοι στα προαναφερόμενα αποτελέσματα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως η γλυκοσυλίωση πιθανώς μειώνει την εκδήλωση της επιθυμητής δραστικότητας, ενώ καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η στερεοχημική διάταξη του εκάστοτε μεταβολίτη.

❖ Το μεθανολικό εκχύλισμα του ***Lupinus albus*** **(LAM)** ήταν ικανό να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση κατά 50%, ενώ από τους επτά μεταβολίτες του που αξιολογήθηκαν, μόνο οι δύο εκδήλωσαν σημαντική δραστικότητα.

Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν αξιόλογη μείωση της ενεργότητας της TRAP ήταν τα γλυκοσιδικά παράγωγα **LAM4** και **LAM9**. Συγκεκριμένα, ο 7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (**LAM4**) κατέστειλε την οστεοκλαστική διαφοροποίηση σε ποσοστό 22%, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στην αντίστοιχη γενίνη (**LAM2**, γενιστεϊνη) που χαρακτηρίστηκε από επαγωγή της έκφρασης της TRAP. Ομοίως, η 7,4'-δι-*O*-γλυκοπυρανοσυλολουτεόνη (**LAM9**) παρουσίασε καταστολή της τάξεως του 36%, ενώ η 2'-υδροξυγενιστεΐνη (**LAM3**) εμφανίστηκε αδρανής, ενώ τα γλυκοσιδικά της παράγωγα **LAM7** και **LAM8** προκάλεσαν επαγωγή της

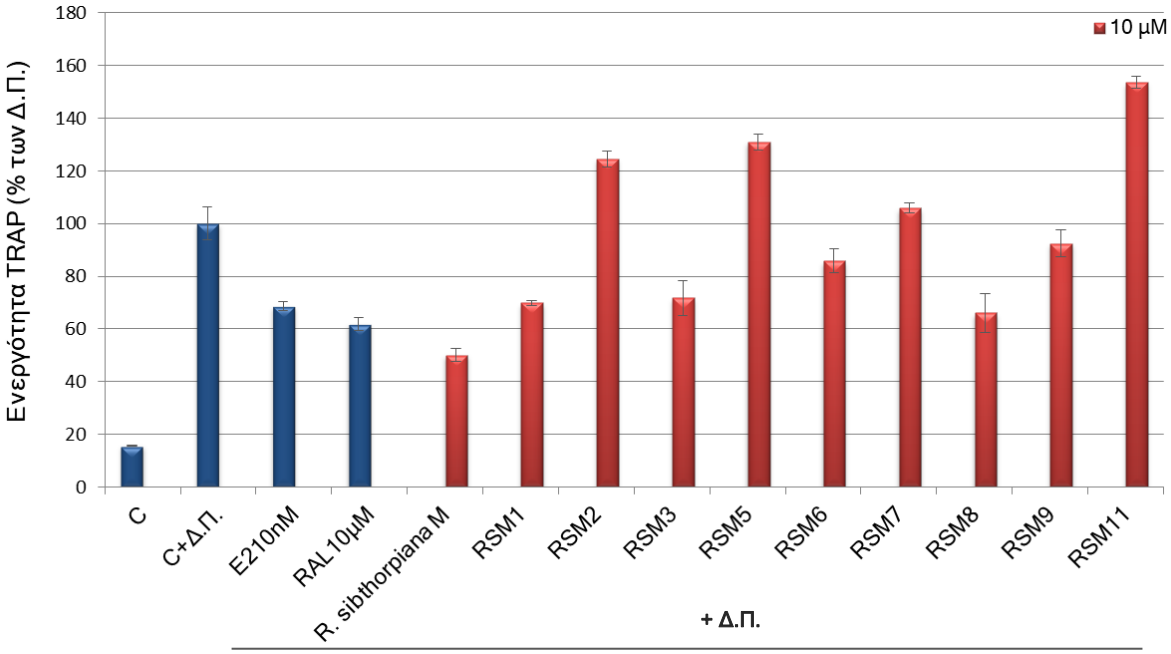
οστεοκλαστογένεσης. Παρ' όλο που όλοι οι μεταβολίτες, εκτός του **LAM9**, προήγαγαν την οστεβλαστική διαφοροποίηση, μόνο ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης **LAM4** χαρακτηρίστηκε από υψηλή επιθυμητή δραστικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές (MC3T3-E1 και RAW264.7).



Εικόνα 161: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Lupinus albus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

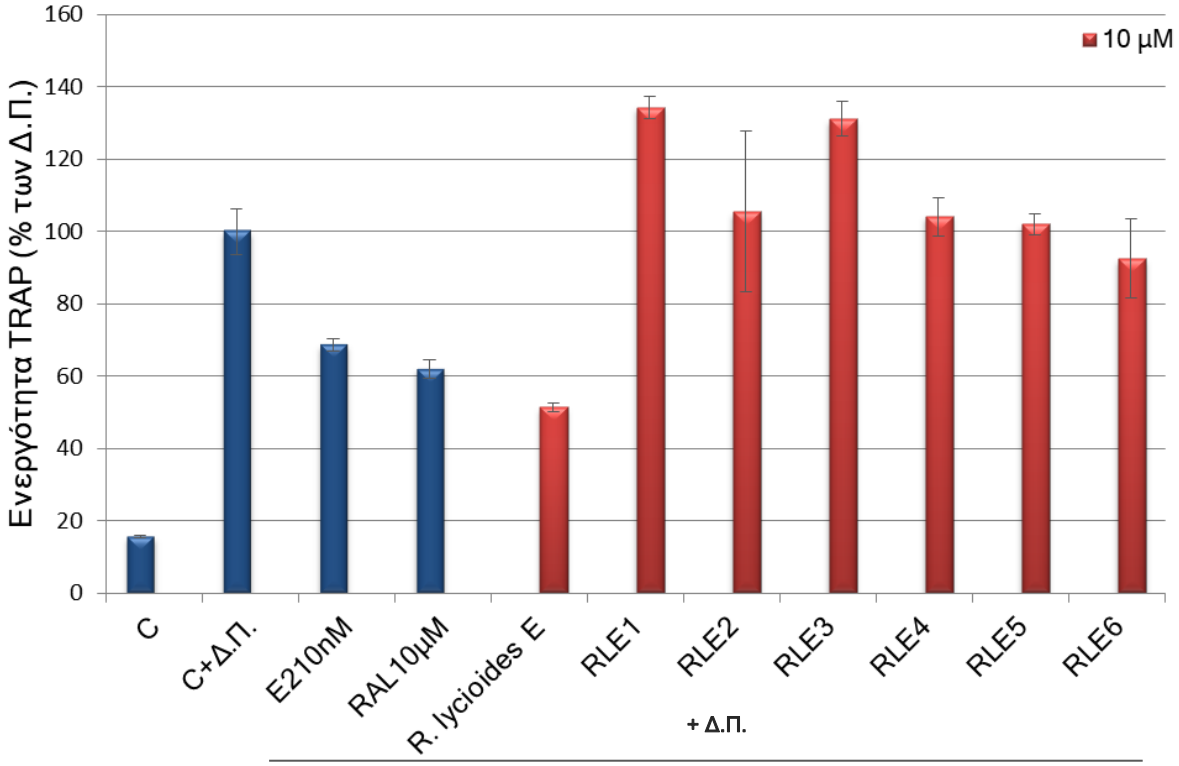
❖ Από τους εννέα μεταβολίτες του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Rhamnus sibthorpiana*** **(RSM)**, οι πέντε χαρακτηρίστηκαν ικανοί να καταστέλλουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, ακολουθώντας τη δράση του ολικού εκχυλίσματος, το οποίο προκάλεσε καταστολή της τάξης του 50%.

Αναλυτικότερα, σημαντική μείωση της ενεργότητας της TRAP, της τάξεως του 30%, εκδήλωσε η λουπεόλη (**RSM1**), η οποία παρουσίασε και σημαντική προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Η ανθρακινόνη εμοδίνη (**RSM3**) κατέστειλε σημαντικά την οστεοκλαστογένεση σε ποσοστό 30%, αλλά παράλληλα εμφανίστηκε να αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του 8-*O*-ραμνοπυρανοσυλο-(1->6)-γλυκοπυρανοσίδη της τοραχρυσόνης (**RSM6**) με μείωση της ενεργότητας TRAP κατά 14%, αλλά ο εν λόγω μεταβολίτης κατέστειλε και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η φλαβονόλη καιμπφερόλη (**RSM8**) χαρακτηρίστηκε ως ο δραστικότερος από τους απομονωμένους μεταβολίτες του εκχυλίσματος, προκαλώντας καταστολή της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης των μακροφάγων κυττάρων σε ποσοστό 34%. Μικρή κατασταλτική δράση εκδήλωσε και ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της καιμπφερόλης (**RSM9**), ενώ και οι δύο προαναφερόμενες ενώσεις (**RSM8** και **RSM9**) προκάλεσαν οριακή επαγωγή της έκφρασης της AlkP στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1.



Εικόνα 162: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

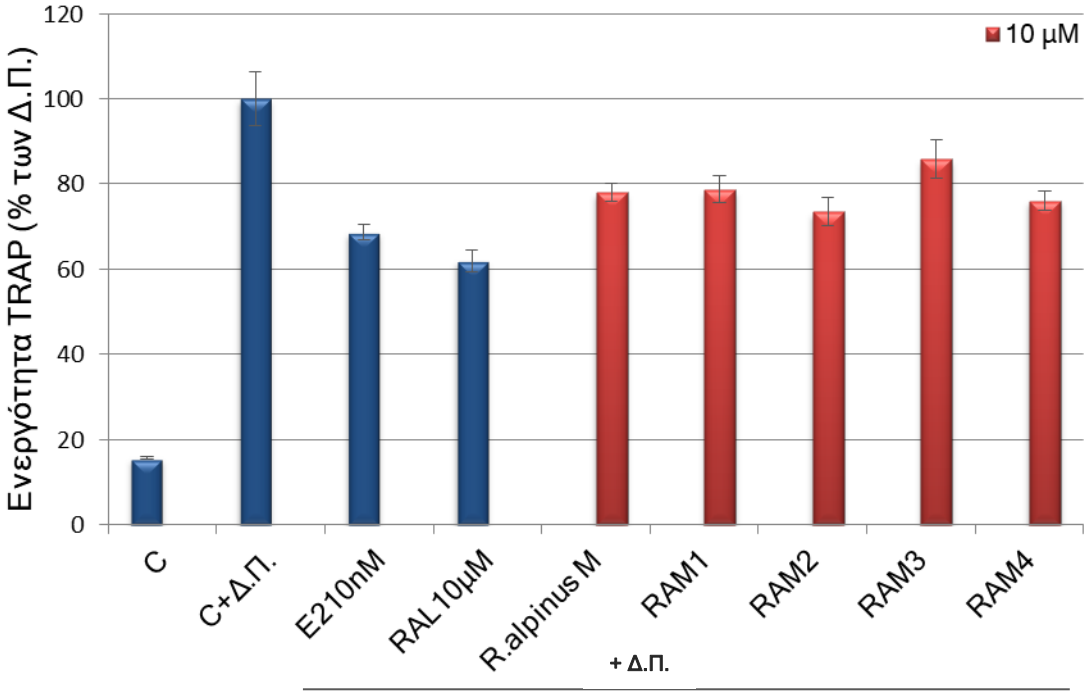
❖ Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του ***Rhamnus lycioides*** **(RLE)** ήταν ικανό να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση σε ποσοστό 50%.



Εικόνα 163: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus lycioides* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Παρόλα ταύτα, από τους έξι μεταβολίτες που ελέγχθηκαν ένας προκάλεσε μικρή καταστολή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης, τρεις κρίθηκαν αδρανείς, ενώ δύο προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης. Μείωση της ενεργότητας της TRAP παρουσίασε ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της καιμφερόλης (**RLE6**) κατά 8%, ενώ η προσθήκη ακετυλομάδων στις σακχαριδικές μονάδες του μεταβολίτη, φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά την εκδήλωση δραστικότητας, καθώς το μονακετυλιωμένο (**RLE5**) και το τριακετυλιωμένο παράγωγό του (**RLE4**) εμφανίστηκαν αδρανή.

❖ Η αξιολόγηση του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Rhamnus alpinus*** **(RAM)** αποκάλυψε την κατασταλτική του δράση στην οστεοκλαστογένεση με ποσοστό της τάξεως του 22%, δράση που εκδήλωσαν και οι τέσσερις μεταβολίτες του.



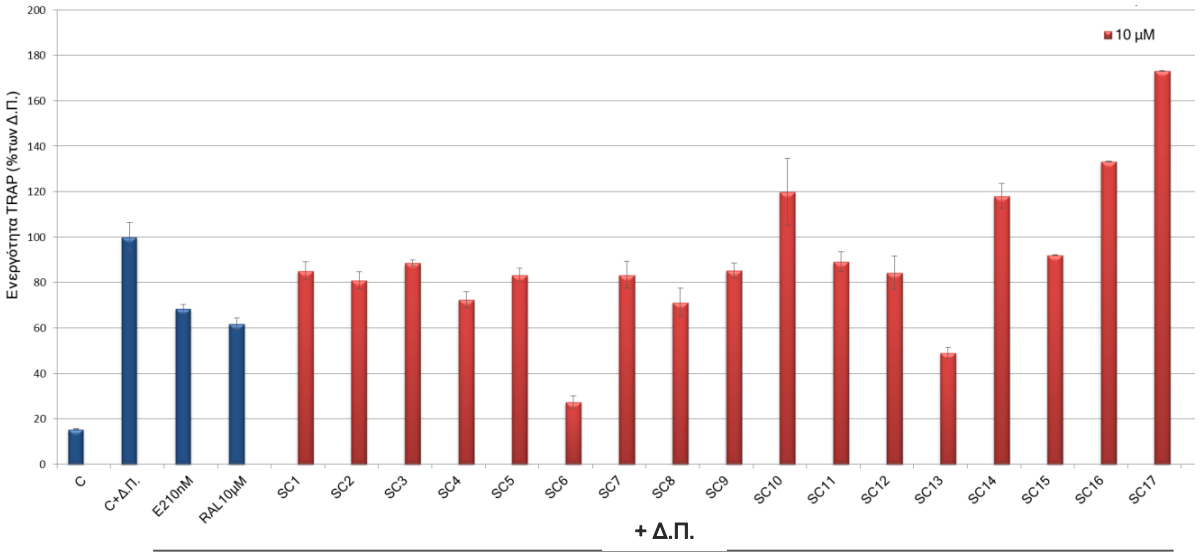
Εικόνα 164:Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων του *Rhamnus alpinus* (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Συγκεκριμένα, ο 8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης (**RAM1**) κατέστειλε την επαγόμενη από το RANKL διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων κατά 21%, συνδυάζοντας και επαγωγική επίδραση στην διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε οστεοβλάστες. Οι μεταβολίτες 8-*O*-*β*-ρουτινοσίδης της φυσιόνης (**RAM2**) και 4-*O*-μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη (**RAM4**), παρουσίασαν παρόμοια κατασταλτική ικανότητα (27% και 24%, αντίστοιχα), ενώ ο ρουτινοσίδης της τοραχρυσόνης (**RAM3**) εμφάνισε μικρότερη καταστολή της ενεργότητας TRAP (14%).

6.2.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης

Όλες οι συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 10 μM στην κυτταρική σειρά RAW264.7 και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τις εκατό της έκφρασης TRAP παρουσία του υλικού διαφοροποίησης (RANKL 50 ng/ml).

❖ Στην εικόνα 165 που ακολουθεί, αποτυπώνεται η ικανότητα των δεοξυβενζοϊνικών παραγώγων να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των RAW264.7 σε οστεοκλάστες. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, οι περισσότερες δεοξυβενζοΐνες σημείωσαν καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10%. Μεταξύ αυτών διακρίθηκαν οι ενώσεις **SC4** και **SC8**, οι οποίες φέρουν π-μεθοξυ- και π-χλωρο- υποκατάσταση του δακτυλίου Β αντίστοιχα και παρουσίασαν σημαντική καταστολή της τάξης του 30% σε σύγκριση με τους Δ.Π. Επιπλέον, σημαντική κατασταλτική επίδραση (κατά 72%) εκδήλωσε η ένωση **SC6**, της οποίας η δραστικότητα ήταν μεγαλύτερη της ραλοξιφαίνης.



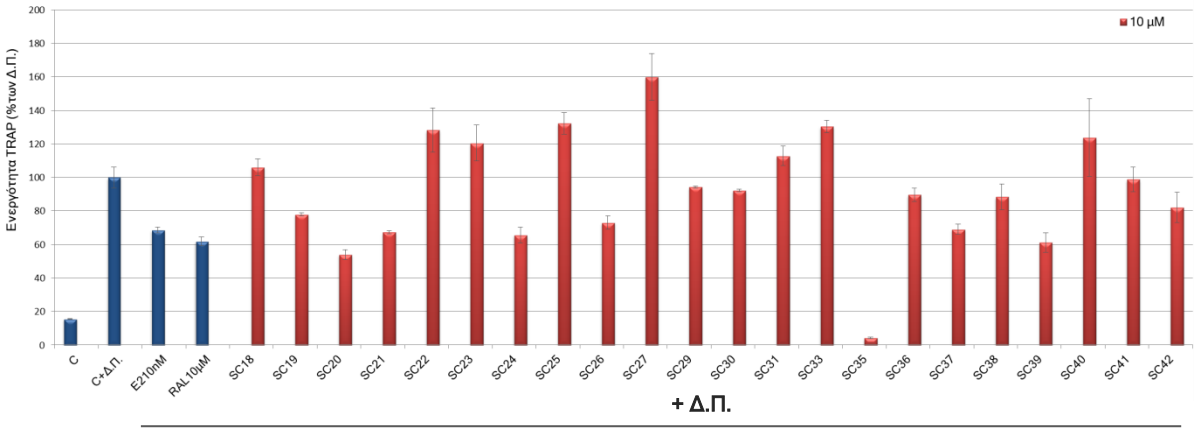
Εικόνα 165: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών δεοξυβενζοϊνικών παραγώγων(10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής)

Αντίθετα, οι δεοξυβενζοΐνες **SC10**, **SC14**, **SC16** και **SC17** φάνηκε να δρουν επαγωγικά στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα της **SC14** με την πρόδρομο ένωση **SC7**, διαπιστώνουμε ότι η εισαγωγή πρενυλομάδας στην συγκεκριμένη ένωση προκάλεσε μείωση της επιθυμητής δραστικότητας. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ενώσεων **SC16** και **SC17**, οι οποίες προήγαγαν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, σε αντίθεση με την πρόδρομη ένωση **SC8** που προκάλεσε καταστολή της τάξης του 30%. Παρόλα ταύτα, τα υπόλοιπα πρενυλιωμένα παράγωγα δεν φάνηκε να ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά και χαρακτηρίστηκαν δραστικότερα από τις πρόδρομες ενώσεις τους. Αναλυτικότερα, το διπρενυλιωμένο παράγωγο **SC13**, της 2,4,4'-τριμεθοξυβενζοΐνης **SC11**,

κατέστειλε σημαντικά την έκφραση της TRAP (51%), γεγονός που παρατηρήθηκε και για το μονοπρενυλιωμένο ανάλογο **SC12**, αλλά σε μικρότερο βαθμό (16%).

❖ Στη συνέχεια παρουσιάζεται η ικανότητα των παραγώγων των διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων να επιδρούν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση.

Από την ομάδα των διυδροστιλβενίων, οι ενώσεις **SC19**, **SC20** και **SC21** σημείωσαν αξιόλογη κατασταλτική επίδραση, με το π-μεθοξυδιυδροστιλβένιο (**SC21**) να εμφανίζει δράση ανάλογη της ραλοξιφαίνης και την ένωση **SC20** να παρουσιάζει καταστολή της έκφρασης TRAP της τάξης του 46%. Αντιθέτως, τα αλογονωμένα παράγωγα **SC22** και **SC23** προκάλεσαν επαγωγή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης.



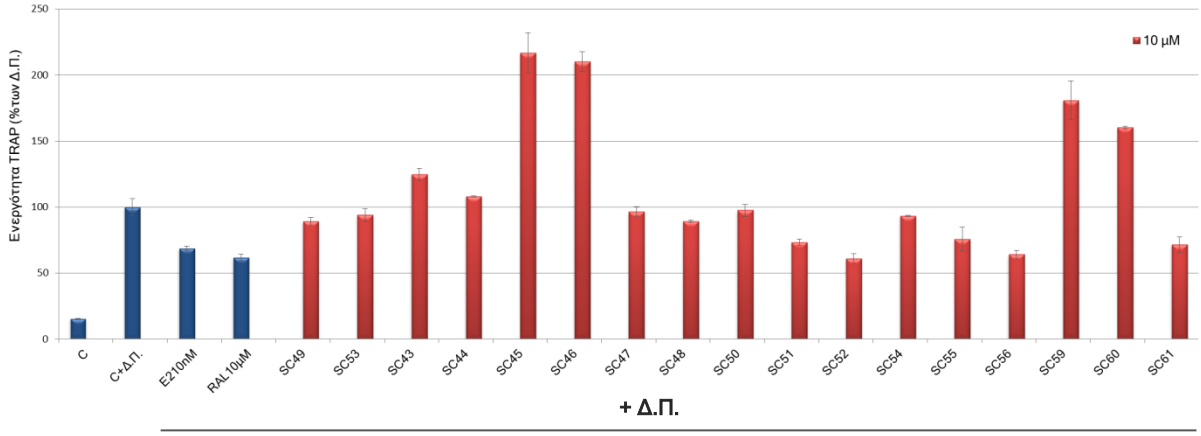
Εικόνα166: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Η μεθοξυλιωμένη ισοφλαβόνη **SC24** κρίθηκε ικανή να καταστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση σε ποσοστό 34%, αλλά δεν συνδύασε και επαγωγική δράση στην οστεοβλαστογενετική διαδικασία. Αναφορικά με τα παράγωγά της (**SC25-SC27**), η δραστικότητά τους φάνηκε να μειώνεται με τη σταδιακή απομεθυλίωσή τους. Επίσης, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των δεοξυβενζοϊνών, η εισαγωγή πρενυλομάδων δεν φάνηκε να ευνοεί την καταστολή της οστεοκλαστογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις **SC29** και **SC30** παροσίασαν εμφανώς μειωμένη ικανότητα καταστολής σε σχέση με την **SC24**, ενώ τα παράγωγα **SC31** και **SC33** εμφάνισαν επαγωγή της έκφρασης της TRAP (13% και 30%, αντίστοιχα) αναδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο της στερεοχημείας της εκάστοτε ένωσης.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως όλες οι χαλκόνες που ελέγχθηκαν κατέστειλαν την επαγόμενη από το RANKL διαφοροποίηση των κυττάρων RAW264.7, με τις ενώσεις **SC37** και **SC38** να παρουσιάζουν ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης κατά 31% και 46% αντίστοιχα, ενώ η **SC35** εκδήλωσε τοξικότητα στην συγκέντρωση 10 μM. Τα αντίστοιχα ανηγμένα διαρυλοπροπανικά τους παράγωγα παρέμειναν δραστικά, αν και παρατηρήθηκε μείωση της κατασταλτικής τους επίδρασης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της ένωσης **SC39**, η οποία προκάλεσε καταστολή κατά 40%, ενώ η αντίστοιχη χαλκόνη είχε κριθεί τοξική.

Παρόλα ταύτα, όλες οι προαναφερόμενες ενώσεις επέδειξαν σημαντική ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών.

❖ Από τις χημικές κατηγορίες των κουμαρινών και στιλβενικών οξέων, τα δύο κουμαρινικά ανάλογα **SC49** και **SC53** σημείωσαν μικρή κατασταλτική επίδραση στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση της τάξης του 10%. Μεταξύ των δώδεκα παραγώγων των στιλβενικών οξέων, τα έξι (**SC48, SC51, SC52, SC54, SC55, SC56**) εκδήλωσαν κατασταλτική επίδραση έναντι της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7, τα τρία (**SC44**, **SC47**, **SC50**) δεν παρουσίασαν καμία δράση, ενώ τα υπόλοιπα τρία (**SC43**, **SC45**, **SC46**) προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης.



Εικόνα167: Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο των συνθετικών αναλόγων κουμαρινών, στιλβενικών και διυδροστιλβενικών οξέων (10 μM). Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητά της εκφράστηκε ως % επί του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.) Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Την υψηλότερη καταστολή εκδήλωσε η ένωση **SC52** σημειώνοντας 40% μείωση της ενεργότητας της TRAP και ακολουθούν με σειρά δραστικότητας το νιτροπαράγωγο **SC56**, σημειώνοντας καταστολή της τάξης του 36% και η ένωση **SC51** με καταστολή 27%. Κοινό χαρακτηριστικό και των τριών αναλόγων είναι η 3-υδροξυ- υποκατάσταση του δακτυλίου Β, η οποία φαίνεται να συμβάλλει θετικά στην εκδήλωση της δράσης, με εξαίρεση την ένωση **SC45** η οποία προκάλεσε επαγωγή της διαφοροποίησης. Το τετραμεθοξυ- παράγωγο **SC55** κατέστειλε την οστεοκλαστική διαφοροποίηση σε ποσοστό 27%, ενώ η απομάκρυνση του μεθοξυλίου από το δακτύλιο Α φάνηκε να προκαλεί μείωση της δραστικότητας (**SC54**). Τέλος, η παρουσία υδροξυλίου στην θέση 4 του δακτυλίου Β φάνηκε να μην επιδρά θετικά στην καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, ανεξαρτήτως της ύπαρξης υποκαταστατών στον δακτύλιο Α, με εξαίρεση το χλωριωμένο παράγωγο **SC48**.

Τέλος, από την ομάδα των διυδροστιλβενικών οξέων το παράγωγο **SC61** εμφανίστηκε δραστικότερο του αρχικού στιλβενικού του οξέος **SC47**, καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση κατά 28%. Τα υπόλοιπα δύο παράγωγα εκδήλωσαν επαγωγική δράση έναντι της οστεοκλαστογένεσης δράση.

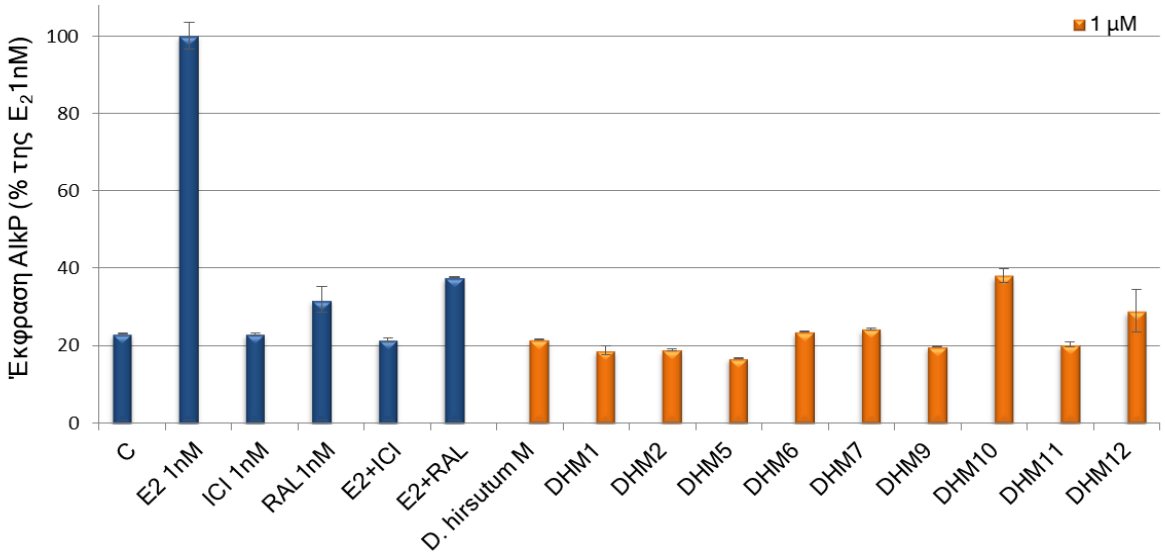
6.3 Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Η πιθανή οιστρογόνος δράση των απομονωμένων μεταβολιτών και συνθετικών παραγώγων προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 1 μM, μέσω της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην § 1.4.2.3 και ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (1 nM), η ραλοξιφαίνη (Ral) και η φουλβεστράνη (ICI) σε συγκέντρωση 1 μM, καθώς και οι συνδυασμοί των τελευταίων με την οιστραδιόλη.

6.3.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Συνολικά από τους 63 διαφορετικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη, μόνο οι επτά παρουσίασαν σημαντική οιστρογονικότητα (μερικός και ισχυρός αγωνισμός ως προς την E_2 1nM) στην συγκέντρωση ελέγχου (1 μM). Αναλυτικότερα:

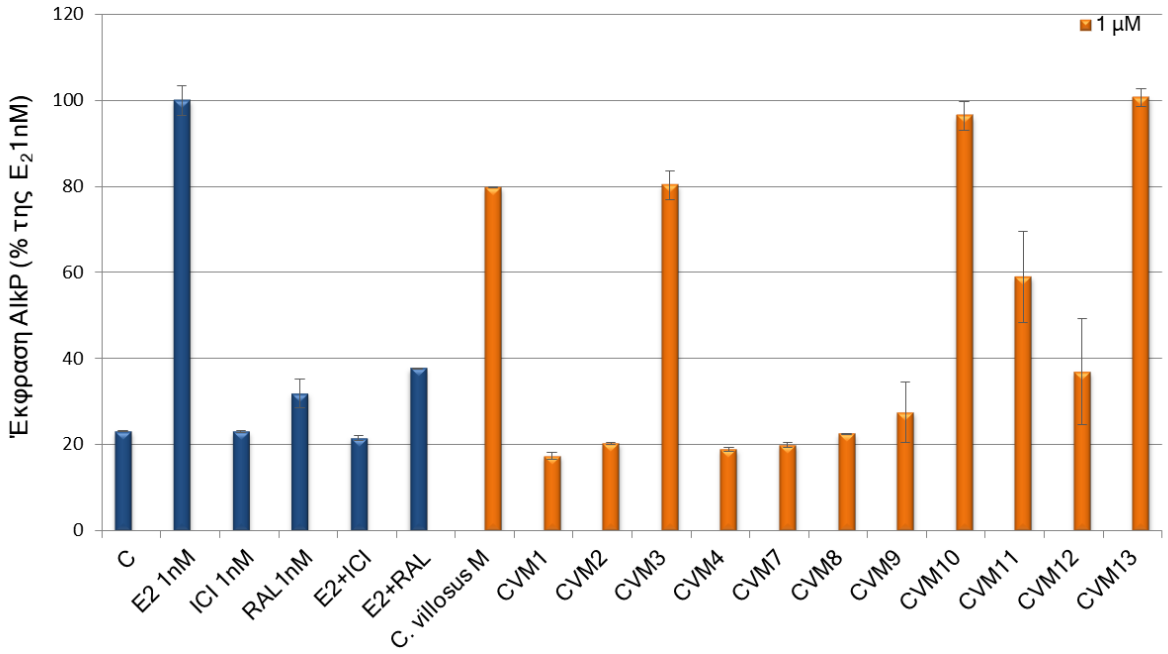
❖ Οι εννέα μεταβολίτες που προήλθαν από τη κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Dorycnium hirsutum*** **(DHM)** εξέφρασαν μηδαμινή οιστρογονικότητα, με εξαίρεση τον 7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδη της καιμπφερόλης (**DHM10**), που εκδήλωσε ασθενή αγωνισμό (12%).



Εικόνα 168: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

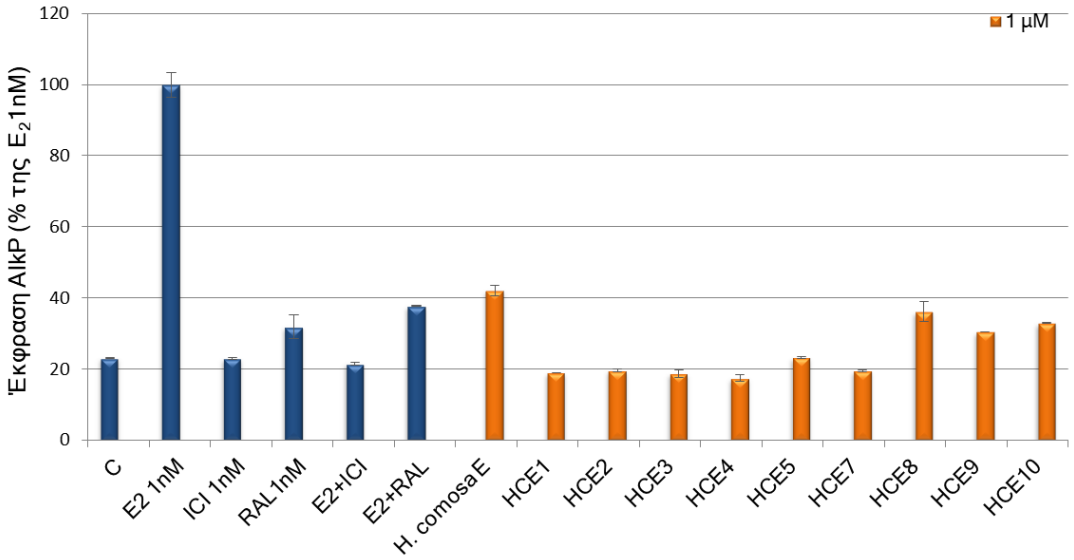
Στο ιστόγραμμα της εικόνας 168 παρουσιάζεται η επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης ως προς την οιστραδιόλη (1 nM) των απομονωμένων μεταβολιτών του εκχυλίσματος του *Dorycnium hirsutum* (1 μM) και στον πίνακα 187 ο αγωνισμός των εξεταζόμενων μεταβολιτών ως προς την οιστραδιόλη.

❖ Από το μεθανολικό εκχύλισμα του ***Cytisus villosus*** **(CVM)** ισχυρή οιστρογόνο δράση παρουσίασαν η γενιστεΐνη (**CVM3**) και τα γλυκοσιδικά της παράγωγα **CVM10** και **CVM13**, με τιμές αγωνισμού ως προς την οιστραδιόλη 76%, 91% και 96%, αντίστοιχα. Ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης (**CVM11**) χαρακτηρίστηκε ως μερικός αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων με αγωνισμό 41%, ενώ ο 7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (**CVM12**), σημείωσε ασθενή αγωνισμό της τάξης του 14%. Οι υπόλοιποι μεταβολίτες δεν εκδήλωσαν καθόλου οιστρογονικότητα και στο ιστόγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η δραστικότητα των μεταβολιτών ως έκφρασης της AlkP ως προς την οιστραδιόλη, ενώ ο αγωνισμός περιγράφεται στον πίνακα 187.



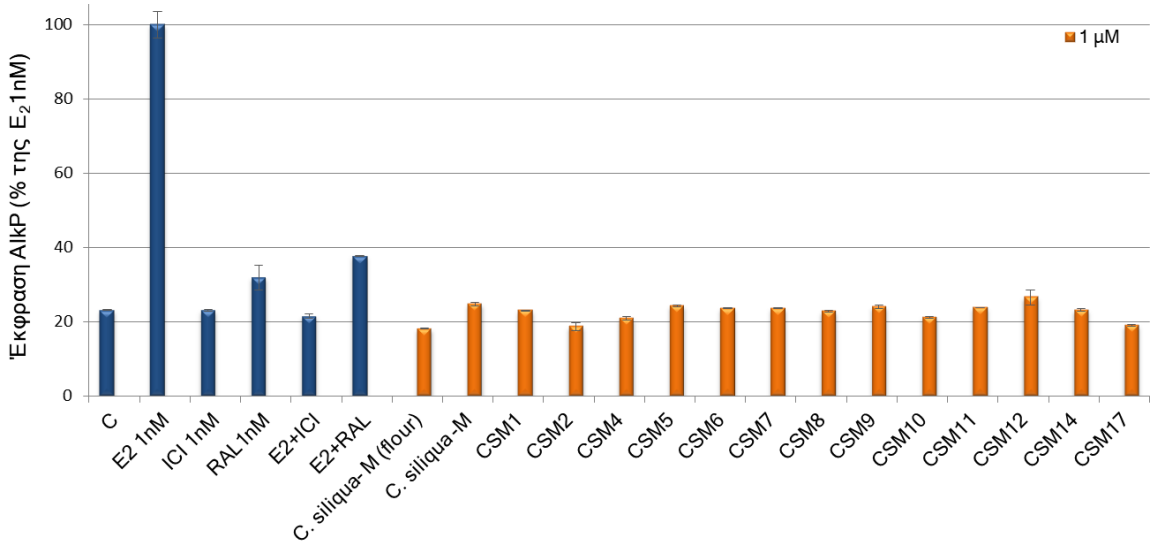
Εικόνα 169: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Cytisus villosus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του ***Hippocrepis comosa*** **(HCE)** ελέγχθηκαν εννέα απομονωμένοι μεταβολίτες, οι οποίοι εκδήλωσαν μηδαμινό αγωνισμό, εκτός από την ισοτριφολιόλη (**HCE9**), που χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων με τιμή αγωνισμού 12% (πίνακας 187).



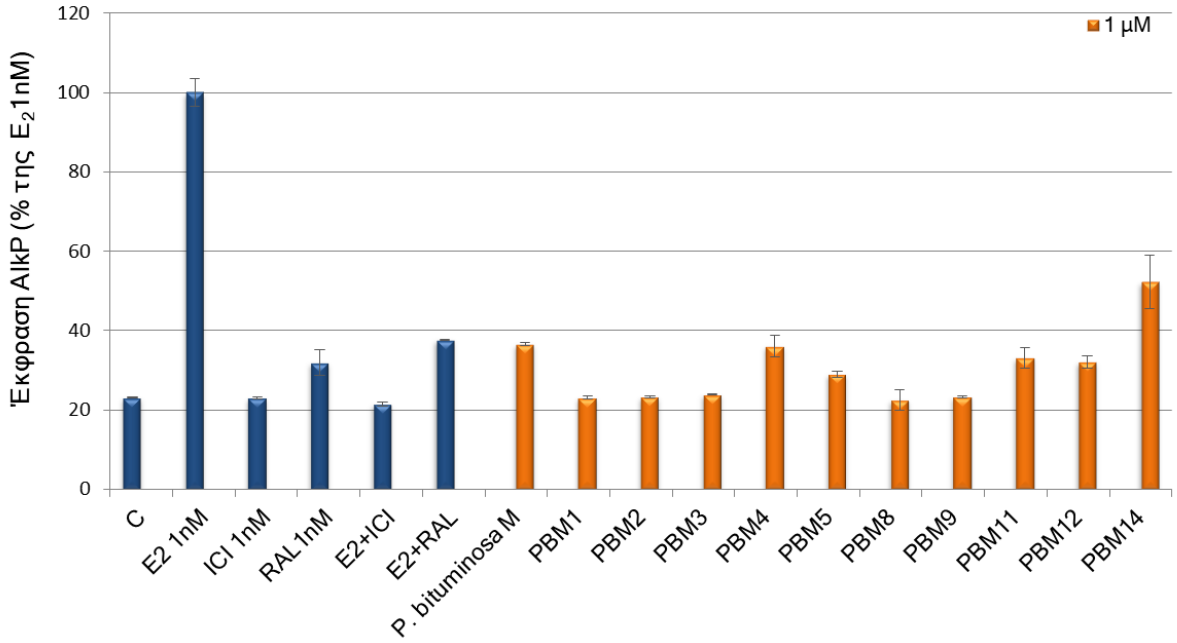
Εικόνα 170: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Hippocrepis comosa* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Από τον έλεγχο των δεκατριών μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος της ***Ceratonia siliqua*** **(CSM)** όλοι εξέφρασαν μηδαμινή οιστρογόνο δράση (εικόνα 171, πίνακας 187), επιβεβαιώνοντας την αντίστοιχη δράση του εκχυλίσματος.



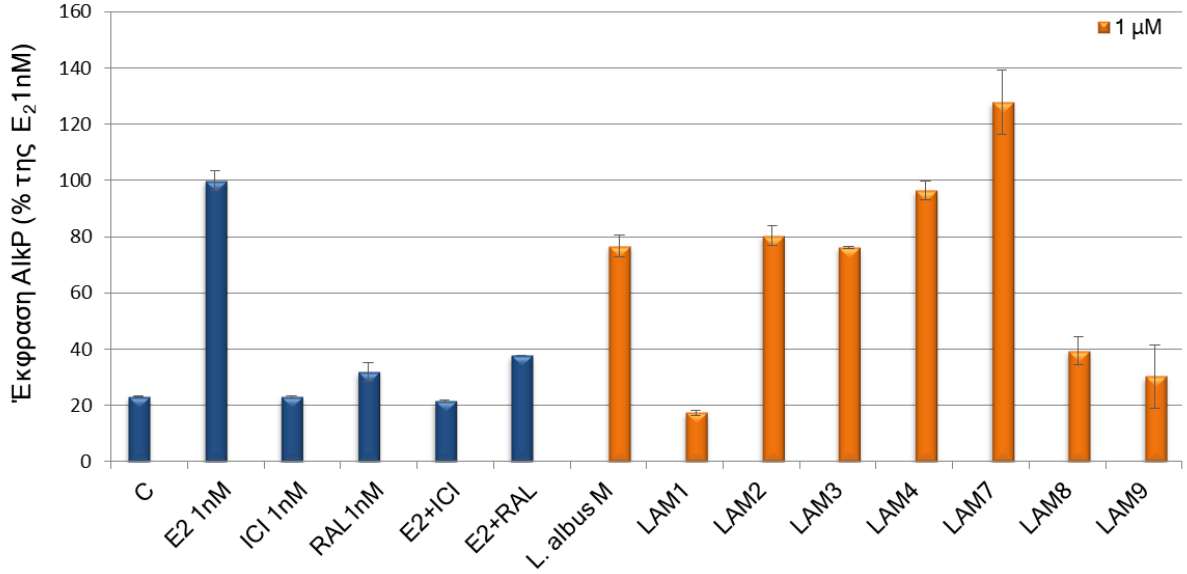
Εικόνα 171: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων της *Ceratonia siliqua* (1μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Οι δέκα μεταβολίτες, οι οποίοι αξιολογήθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα της ***Psoralea bituminosa*** **(PBM)** σημείωσαν μηδαμινό αγωνισμό, εκτός από την 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη (**PBM14**) που χαρακτηρίστηκε ως μερικός αγωνιστής με τιμή αγωνισμού 33% (πίνακας 187). Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης ως προς την οιστραδιόλη (1 nM) των απομονωμένων μεταβολιτών του εκχυλίσματος.



Εικόνα 172: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων της *Psoralea bituminosa* (1μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του ***Lupinus albus*** **(LAM)** η πλειοψηφία των μεταβολιτών χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί αγωνιστές του υποδοχέα των οιστρογόνων.

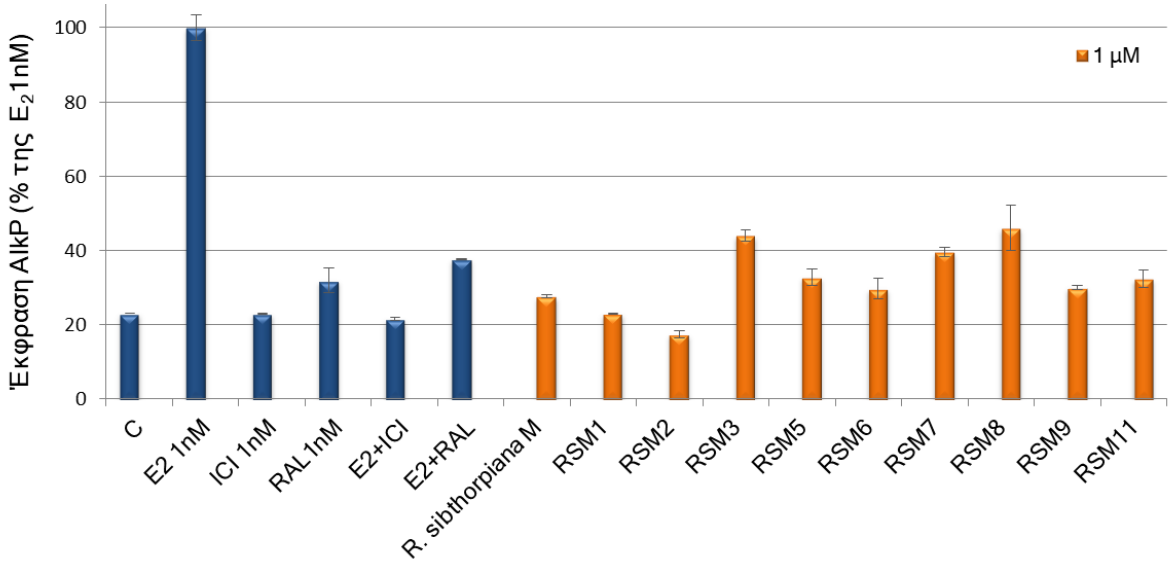


Εικόνα 173: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Lupinus albus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η συγκεκριμένη διαπίστωση συνάδει με τον φυτοχημικό χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος, στον οποίο διαπιστώθηκε η παρουσία κυρίως ισοφλαβονοειδών, τα οποία είναι γνωστά για τις φυτοοιστρογόνες ιδιότητές τους. Αναλυτικότερα, η γενιστεΐνη (**LAM2**) και ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (**LAM4**) χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί αγωνιστές, με τιμές αγωνισμού 76% και 91%, αντίστοιχα. Επίσης, η 2'-υδροξυγενιστεΐνη (**LAM3**) εμφάνισε ισχυρή οιστρογόνο δράση, όπως και ο αντίστοιχος 7-*O*-γλυκοσίδης της (**LAM7**). Τέλος, η 5-*O*-*β*-

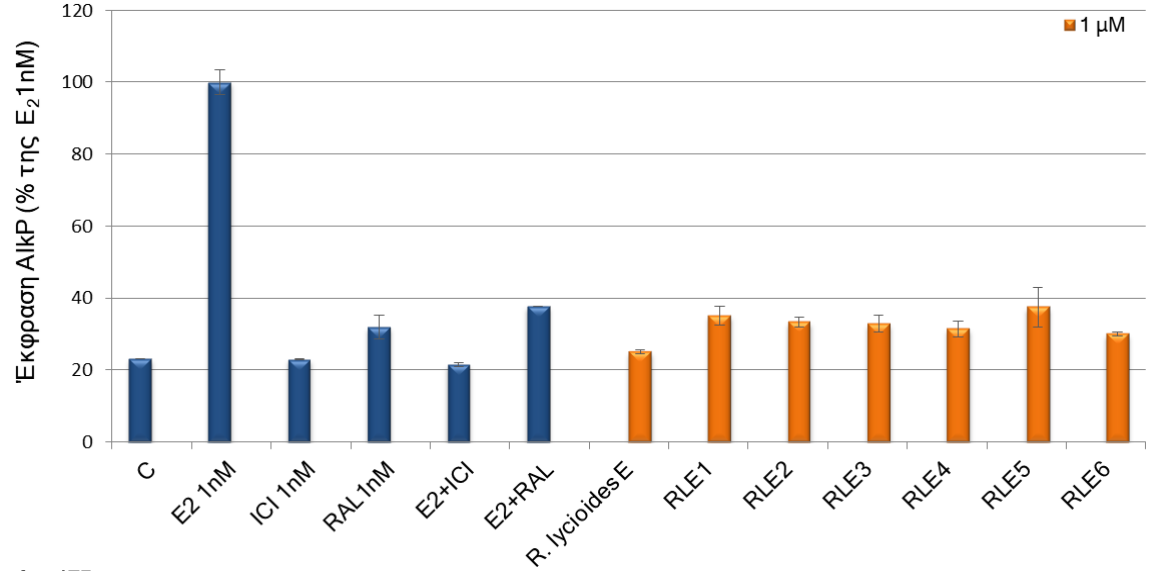
γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη (**LAM8**) χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων, ενώ οι υπόλοιποι μεταβολίτες επέδειξαν μηδαμινή οιστρογονικότητα (εικόνα 182. πίνακας 187).

❖ Η πλειοψηφία των δευτερογενών μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Rhamnus sibthorpiana*** **(RSM)** σημείωσαν μηδαμινή οιστρογονικότητα με την ταξιφολίνη (**RSM5**), την αμπελοψίνη (**RSM7**) και την καιμπφερόλη (**RSM8**) να χαρακτηρίζονται ως ασθενείς αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων (εικόνα 174, πίνακας 187).

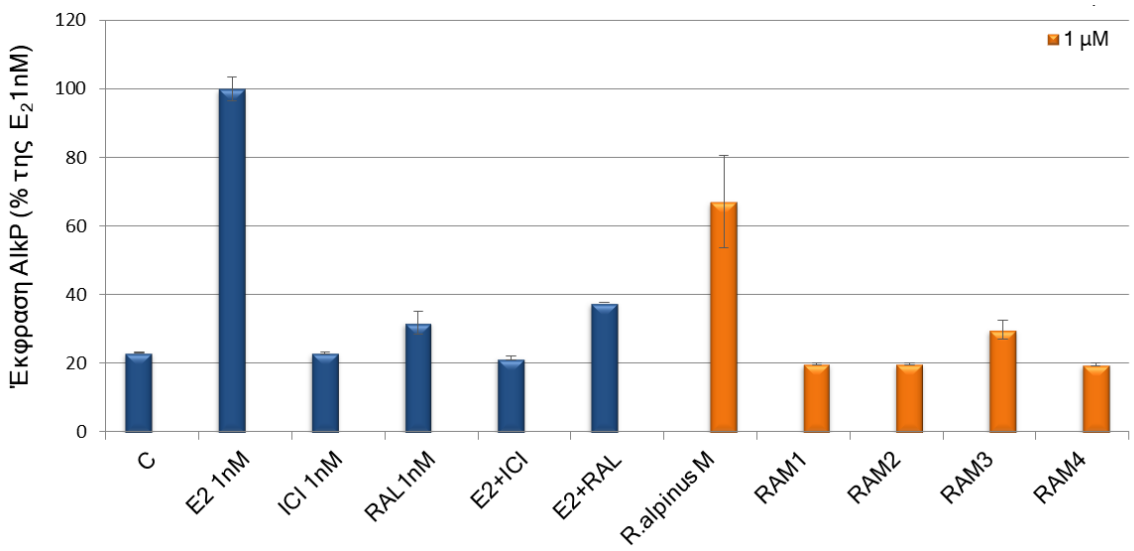


Εικόνα 174: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Στην περίπτωση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *Rhamnus lycioides* (RLE) και του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Rhamnus alpinus* (RAM), όλοι οι μεταβολίτες χαρακτηρίστηκαν από μηδαμινή οιστρογονικότητα (εικόνα 175-176, πίνακας 187).



Εικόνα 175: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus lycioides* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

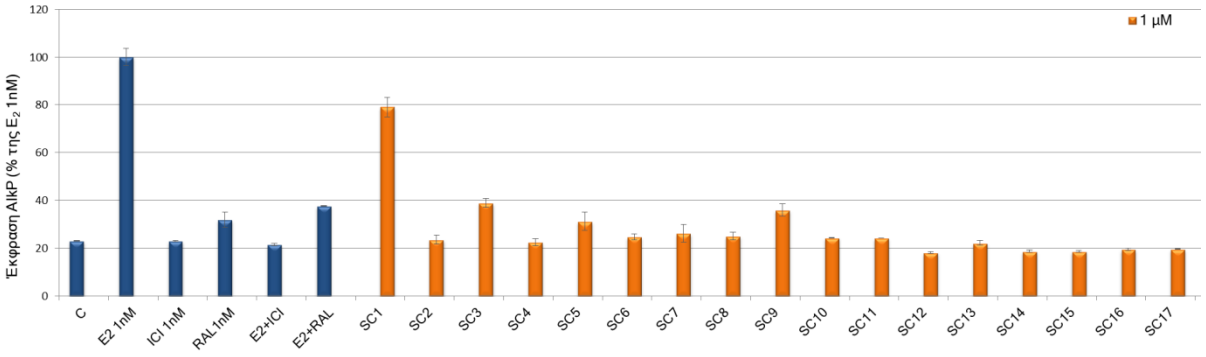


Εικόνα 176:: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των ενώσεων του *Rhamnus alpinus* (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

6.3.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Όλα τα συνθετικά ανάλογα ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 1 μM και η δραστικότητά τους παρουσιάζεται ως έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης ως προς την οιστραδιόλη (E_2 1 nM) στις εικόνες 177-179, ενώ ο αγωνισμός των εξεταζόμενων ενώσεων σε σχέση με εκείνον της E_2 1 nM φαίνεται στον πίνακα 188.

Από τα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα που ελέγχθηκαν μόνο η 2,4,4'-τετραυδροξυβενζοϊνη (**SC1**) παρουσίασε ισχυρή οιστρογόνο δράση με τιμή αγωνισμού 74%, ενώ τα υπόλοιπα παράγωγα χαρακτηρίστηκαν, είτε ως ασθενείς αγωνιστές, είτε δεν σημείωσαν καμία δραστικότητα.

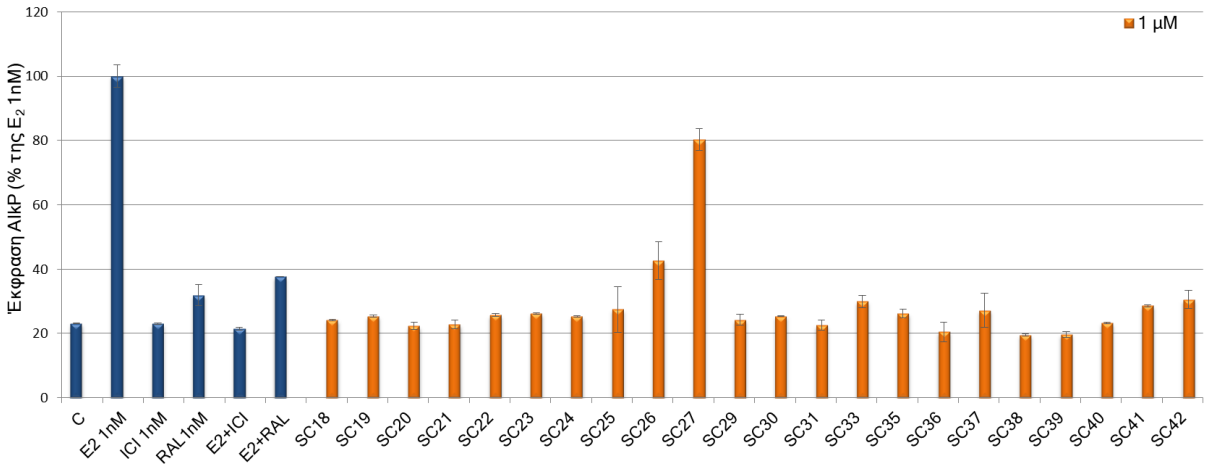


Εικόνα 177: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών δεοξυβενζοϊνικών αναλόγων (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, ανάμεσα στα παράγωγα που εκδήλωσαν ασθενή αγωνισμό συγκαταλέγονται οι ενώσεις **SC3**, **SC5**, **SC7** και **SC9**, με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη

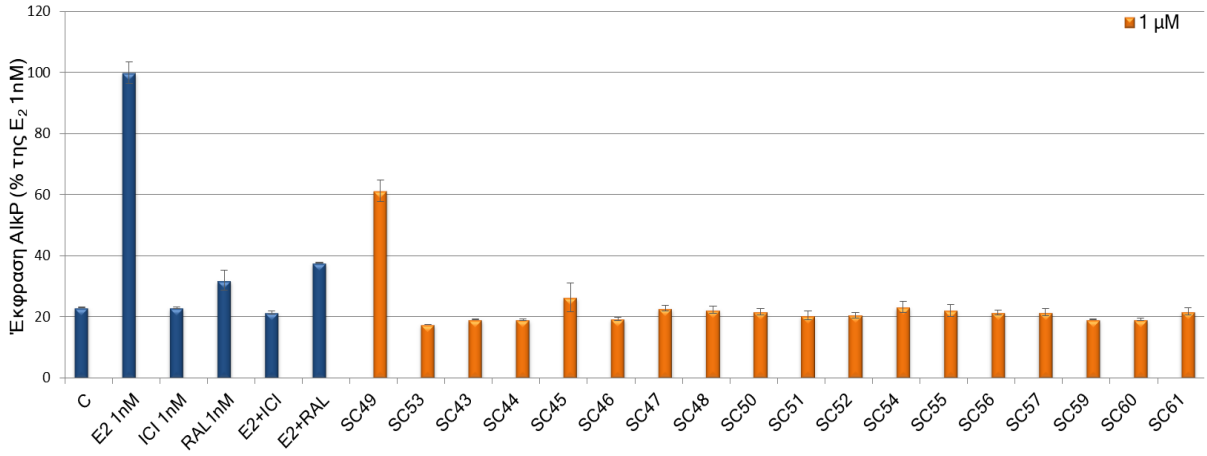
αλογόνου ως υποκατάσταση σε έναν από τους δύο δακτυλίους. Σημειώνεται πως η πρενυλίωση δεν φάνηκε να συνεισφέρει στην εκδήλωση οιστρογόνου δράσης στη συγκέντρωση 1μM.

❖ Από τα διυδροστιλβενικά παράγωγα κανένα δεν σημείωσε οιστρογονικότητα, ενώ από τις ισοφλαβόνες που ελέγχθηκαν, μόνο η γενιστεΐνη (SC27) χαρακτηρίστηκε ισχυρός αγωνιστής (76%) και οι ενώσεις SC26 και SC33 ως ασθενείς αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων. Επιπλέον, ούτε οι χαλκόνες συνοδεύτηκαν από εκδήλωση δραστικότητας στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, με εξαίρεση την τριυδροξυχαλκόνη SC37, η οποία εκδήλωσε ασθενή αγωνισμό. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των διαρυλοπροπανικών τους αναλόγων, τα οποία δεν εμφάνισαν σημαντική οιστρογονικότητα.



Εικόνα 178: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Τέλος, μεταξύ των δύο κουμαρινικών αναλόγων που συντέθηκαν, το SC49 χαρακτηρίστηκε ως μερικός αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων (45%), ενώ αξιοσημείωτο είναι πως κανένα από τα στιλβενικά παράγωγα δεν σημείωσε οιστρογονικότητα.



Εικόνα 179: Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικων αναλόγων κουμαρινών και στιλβενοειδών (1 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

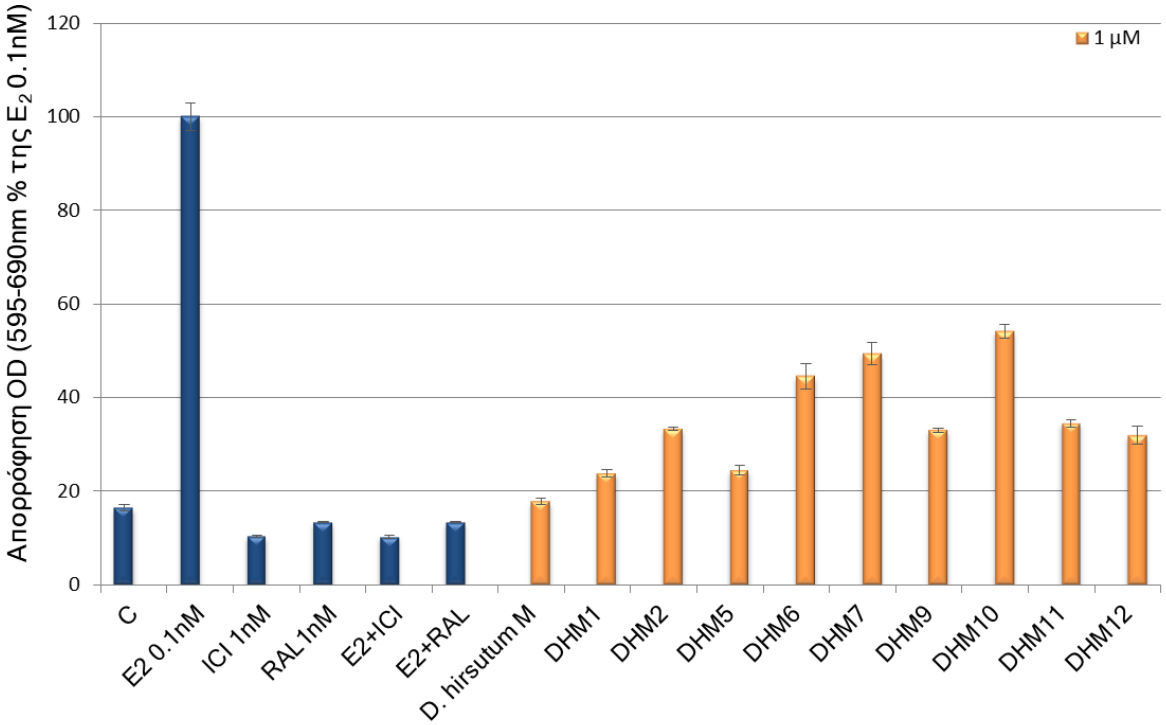
6.4 Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των φυσικών και συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7

Τέλος, αξιολογήθηκε η ικανότητα των φυσικών και συνθετικών ενώσεων να επάγουν των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 σε συγκέντρωση 1 μM. Ο πειραματικός σχεδιασμός έχει παρουσιαστεί αναλυτικά στην § 1.4.2.2 και συνοπτικά αναφέρεται πως ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (0.1 nM), η ραλοξιφαίνη (Ral) και η φουλβεστράνη (ICI) σε συγκέντρωση 1 μM, καθώς και οι συνδυασμοί των τελευταίων με την οιστραδιόλη.

6.4.1 Αξιολόγηση φυσικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7

Συνολικά από τους εξήντα τρεις απομονωμένους δευτερογενείς μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MCF7, οι δεκαοκτώ παρουσίασαν σημαντική οιστρογονικότητα (μερικός και ισχυρός αγωνισμός ως προς την E_2 1nM) στην συγκέντρωση ελέγχου (1 μM). Αναλυτικότερα:

- Όλοι οι μεταβολίτες που προήλθαν από τη κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του ***Dorycnium hirsutum*** (**DHM**) δεν εκδήλωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση.



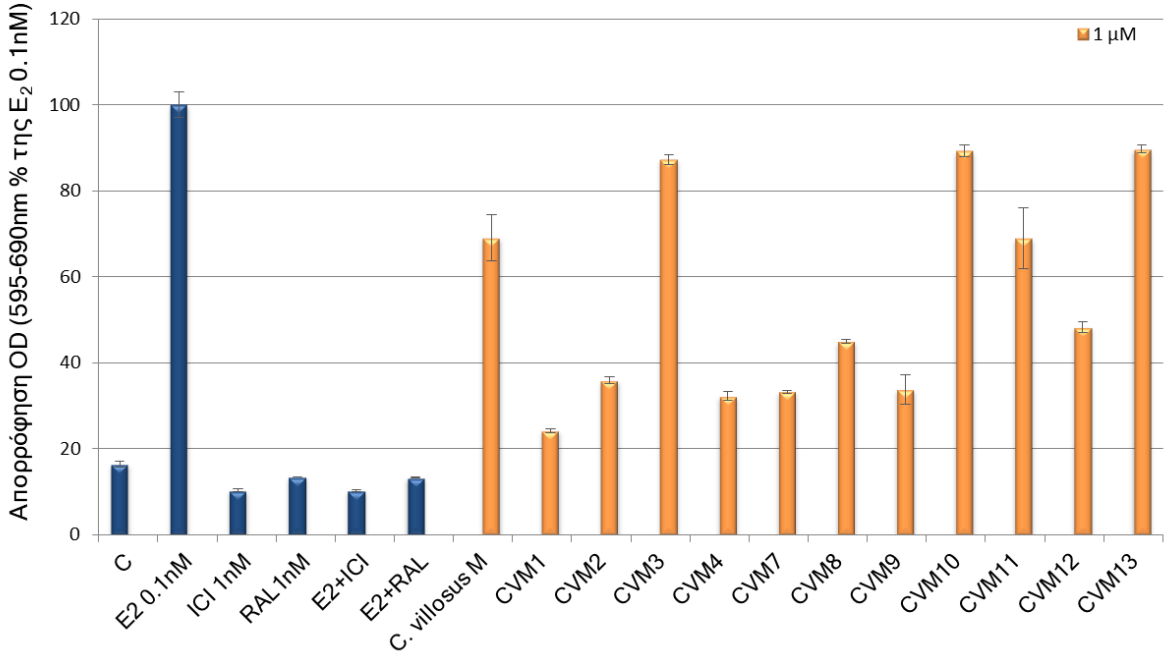
Εικόνα 180: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Dorycnium hirsutum* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ως ασθενείς αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων, χαρακτηρίστηκαν οι μεταβολίτες 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (**DHM10**), ο οποίος σημείωσε ανάλογη δραστικότητα

και στην κυτταρική σειρά Ishikawa, αλλά και το 4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-*trans*-π-κουμαρικό οξύ (**DHM12**) το οποίο στην προαναφερόμενη κυτταρική σειρά εξέφρασε μηδαμινή οιστρογόνο δράση (εικόνα 180, πίνακας 187).

❖ Μεταξύ των μεταβολιτών του ***Cytisus villosus*** που αξιολογήθηκαν στην παρούσα κυτταρική σειρά, αρκετοί εκδήλωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση. Αναλυτικότερα:

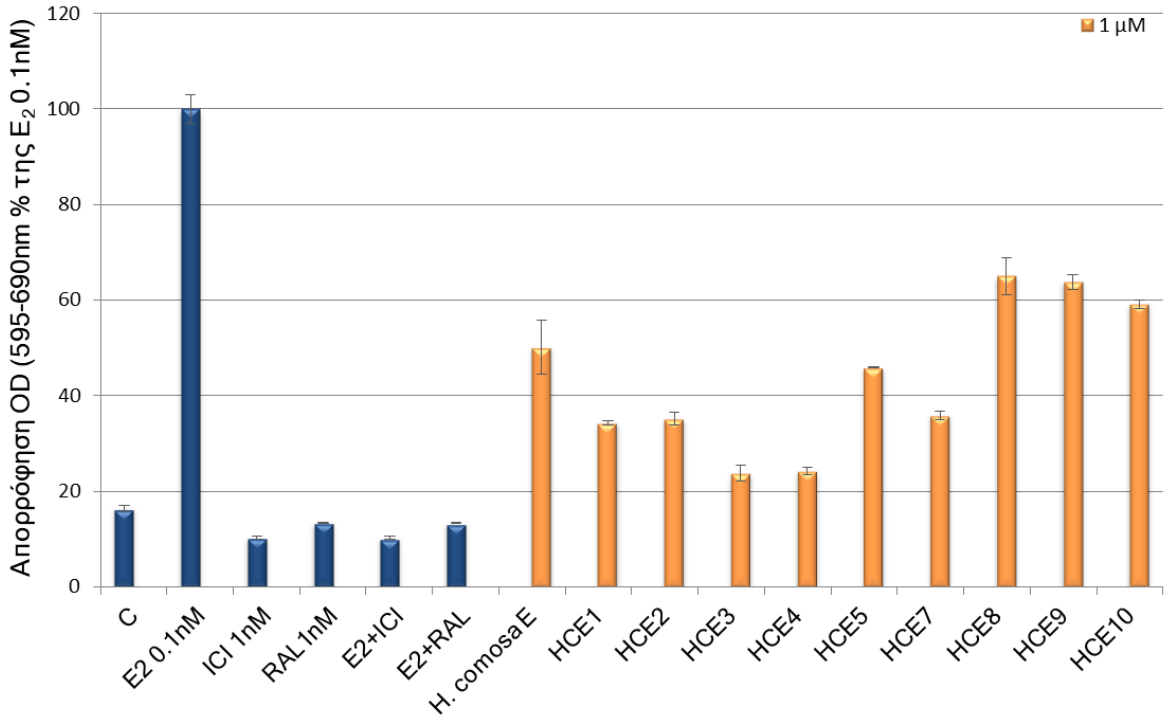
Η γενιστεΐνη (**CVM3**) και τα γλυκοσιδικά της παράγωγα (**CVM10** και **CVM13**) που



Εικόνα 181: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Cytisus villosus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

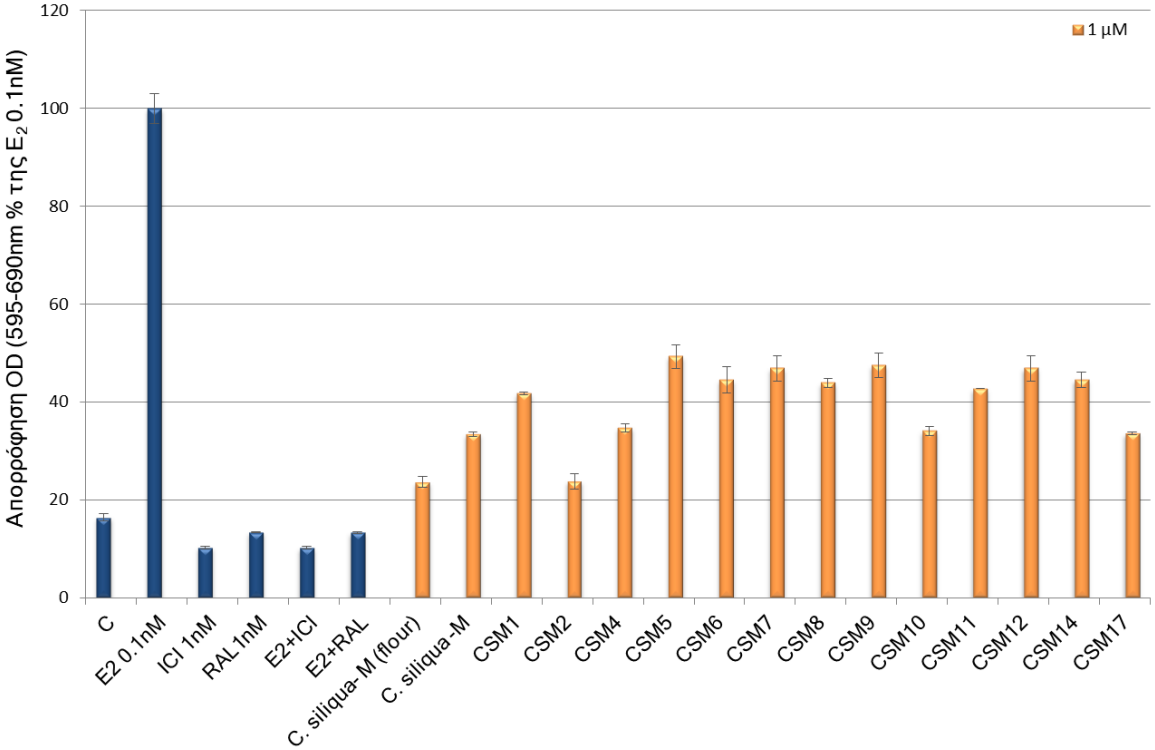
εκδήλωσαν ισχυρή οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa εξέφρασαν ανάλογη δραστικότητα και στην κυτταρική σειρά MCF-7 με τιμές αγωνισμού 83%, 84% και 85%, αντίστοιχα. Ως μερικός αγωνιστής χαρακτηρίστηκε ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης (**CVM11**), με τιμή αγωνισμού έναντι της οιστραδιόλης 58% και ο 7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (**CVM12**) με τιμή αγωνισμού 34%. Οι υπόλοιποι μεταβολίτες δεν παρουσίασαν οιστρογονικότητα, ενώ μόνο η 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη (**CVM9**) εκδήλωσε ασθενή αγωνισμό (εικόνα 181, πίνακας 187).

❖ Από τους εννέα απομονωμένους μεταβολίτες του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του ***Hippocrepis comosa*** (**HCE**), οι οποίοι αξιολογήθηκαν ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες, οι ενώσεις κουμεστρόλη (**HCE8**) και ισοτριφολιόλη (**HCE9**) χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές, επιδεικνύοντας παράλληλα μηδαμινό αγωνισμό στα κύτταρα Ishikawa. Η 3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη (**HCE10**), όπως και στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας, εκδήλωσε ασθενή αγωνισμό της τάξεως του 25% (εικόνα 182, πίνακας 187).



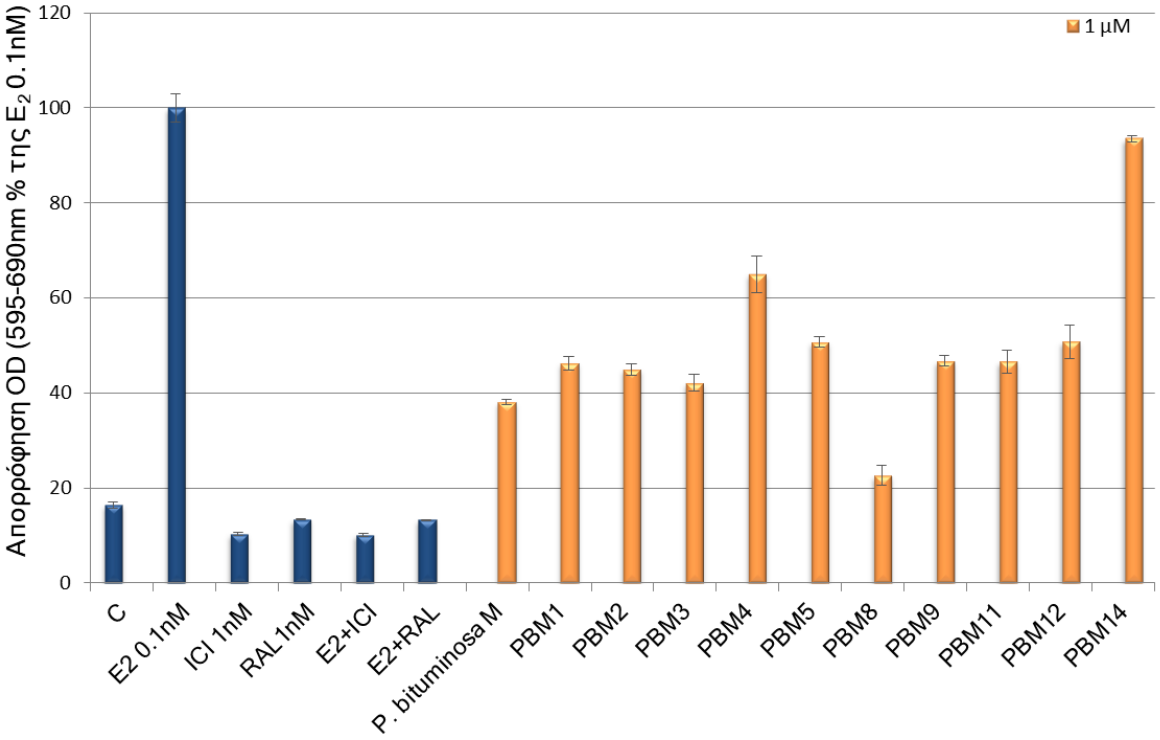
Εικόνα 182: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Hippocrepis comosa* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Ο έλεγχος και των δεκατριών απομονωμένων μεταβολιτών της ***Ceratonia siliqua*** **(CSM)** ανέδειξε την έλλειψη αγωνιστών μεταξύ αυτών, παρατήρηση που συνάδει και με την απουσία οιστρογονικότητας στο ολικό εκχύλισμα (εικόνα 183, πίνακας 187).



Εικόνα 183: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων της *Ceratonia siliqua* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

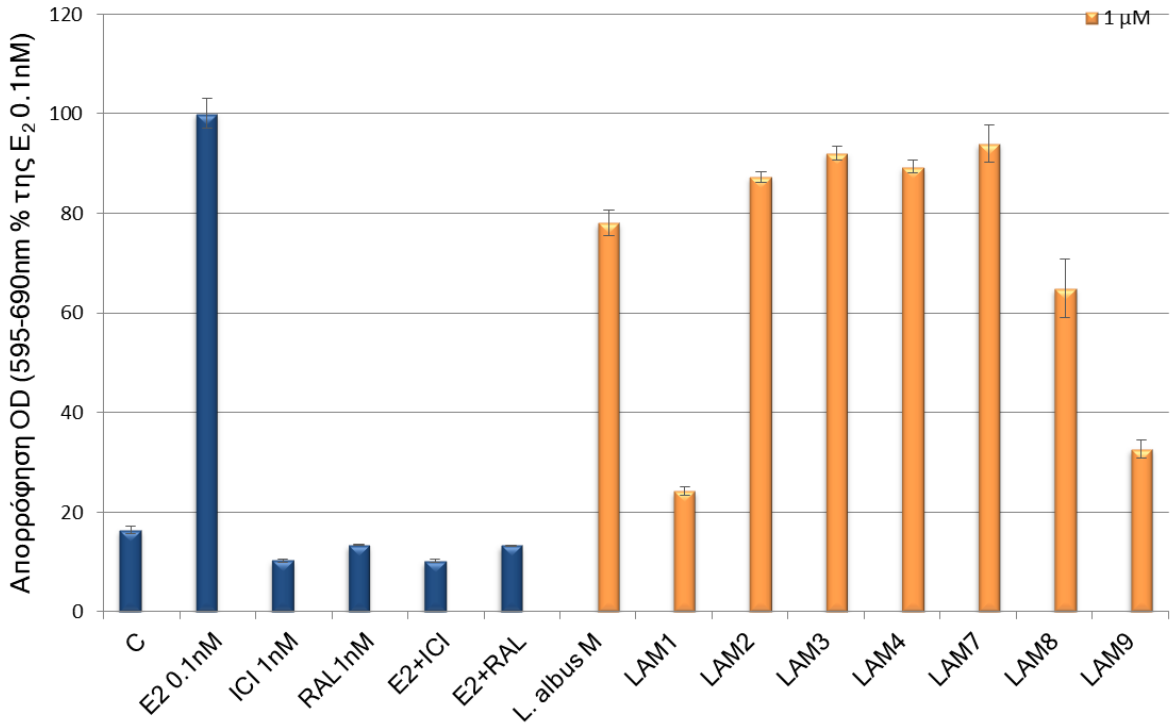
❖ Από το μεθανολικό εκχύλισμα της ***Psoralea bituminosa*** **(PBM),** η 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοαπιγενίνη (**PBM11**) και ο ψωραλενοσίδης (**PBM12**) ενίσχυσαν μερικώς τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 δίνοντας τιμές αγωνισμού 33% και 36% αντίστοιχα, παρόλο που στα κύτταρα Ishikawa παρουσίασαν μηδαμινό αγωνισμό. Η 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη (**PBM14**), η οποία είχε χαρακτηριστεί μερικός αγωνιστής στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας, στην κυτταρική σειρά MCF-7 επέδειξε ισχυρή οιστρογόνο δράση παρουσιάζοντας αγωνισμό της τάξης του 91% (πίνακας 187). Ακολουθεί η έκφραση της δραστικότητας των ενώσεων ως % του σχετικού αριθμού κυττάρων σε σύγκριση με την επίδραση της οιστραδιόλης E_2 0.1 nM.



Εικόνα 184 Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων της *Psoralea bituminosa* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

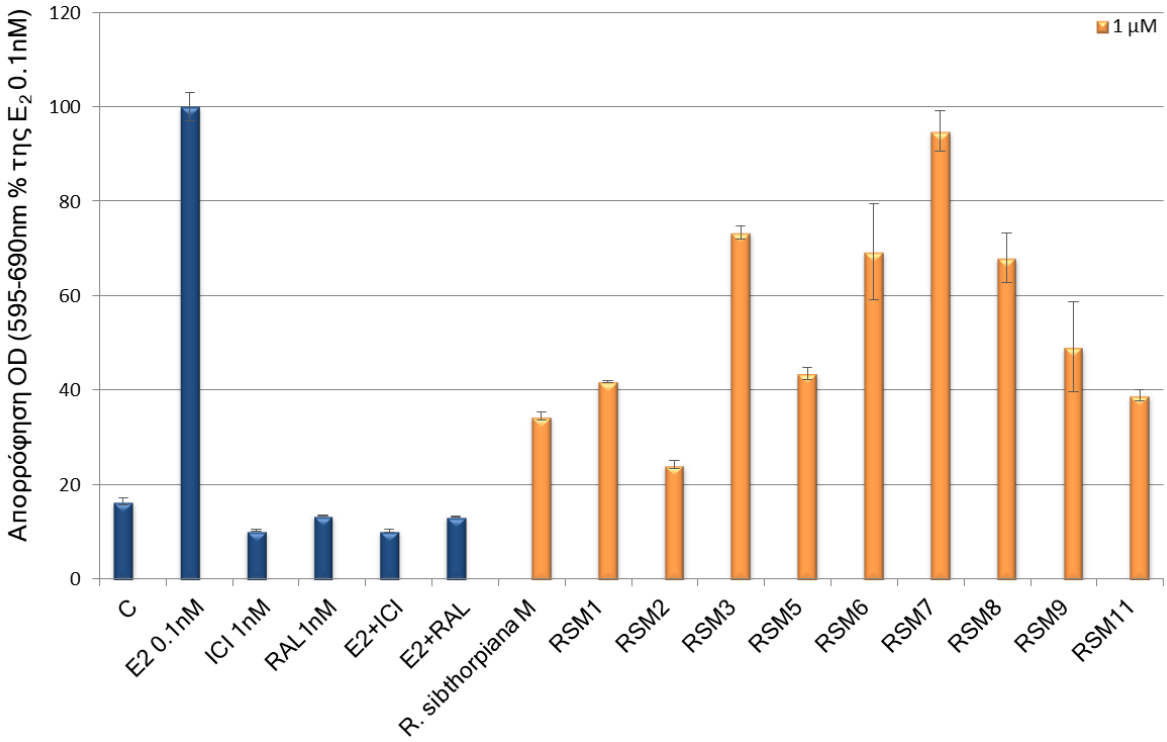
❖ Στην περίπτωση των μεταβολιτών που προήλθαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του ***Lupinus albus*** **(LAM)** διαπιστώθηκε σημαντική οιστρογονικότητα σχεδόν στο σύνολό τους.

Αναλυτικότερα, η γενιστεΐνη (**LAM2**) και η 2'-υδροξυγενιστεΐνη (**LAM3**) σημείωσαν ισχυρή οιστρογόνο δράση, με τιμές αγωνισμού 83% και 86% αντίστοιχα, όπως και τα γλυκοσιδικά τους παράγωγα **LAM4** και **LAM7** τα οποία επέδειξαν αγωνισμό σε ποσοστά 84% και 92% αυτού της οιστραδιόλης, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις προαναφερόμενες ενώσεις είχαν επιδείξει ισχυρή οιστρογονικότητα και στα κύτταρα Ishikawa. Μερική οιστρογόνο δράση παρουσίασε η 5-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη (**LAM8**) με τιμή αγωνισμού 51%, ενώ στην κυτταρική σειρά Ishikawa είχε εκδηλώσει ασθενή αγωνισμό (εικόνα 185, πίνακας 187).



Εικόνα 185: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Lupinus albus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

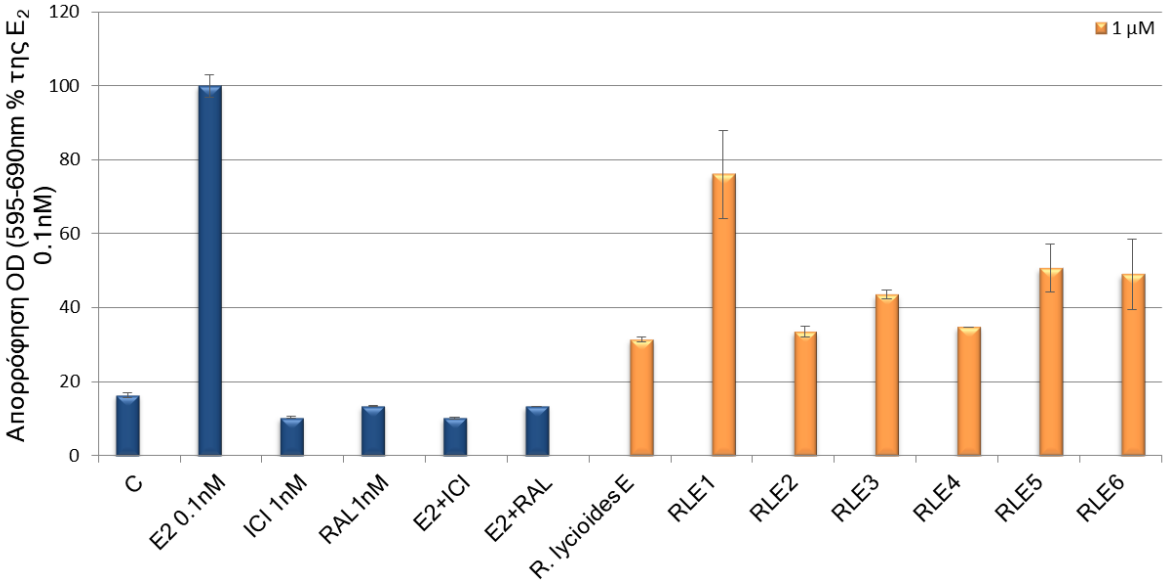
❖ Από τους μεταβολίτες του ***Rhamnus sibthorpiana*** **(RSM)** που αξιολογήθηκαν αρκετοί ήταν εκείνοι που παρουσίασαν σημαντική οιστρογόνο δράση.



Εικόνα 186: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus sibthorpiana* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αναλυτικότερα, ως ένωση με ισχυρή οιστρογόνο δράση χαρακτηρίστηκε η αμπελοψίνη (**RSM7**), με τιμή αγωνισμού 94%, η οποία όμως στα κύτταρα Ishikawa είχε επιδείξει ασθενή αγωνισμό. Μέτρια οιστρογόνο δράση παρουσίασαν η ανθρακινόνη **RSM3** (εμοδίνη) και η καιμπφερόλη (**RSM8**), παρόλο που στα κύτταρα Ishikawa είχαν εκδηλώσει ασθενή αγωνισμό. Επιπλέον ως μερικοί αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων στα κύτταρα MCF7 χαρακτηρίστηκαν και οι μεταβολίτες **RSM6** και **RSM9**, οι οποίοι στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας είχαν εκδηλώσει ασθενή οιστρογονικότητα. Τέλος, η ταξιφολίνη (**RSM5**) και ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της ραμνοσιτρίνης (**RSM11**) παρουσίασαν ασθενή αγωνισμό, ενώ η λουπεόλη (**RSM1**) και η *β*-σιτοστερόλη (**RSM2**) επέδειξαν μηδαμινή οιστρογονικότητα, όπως και στην κυτταρική σειρά Ishikawa (εικόνα186, πίνακας 187).

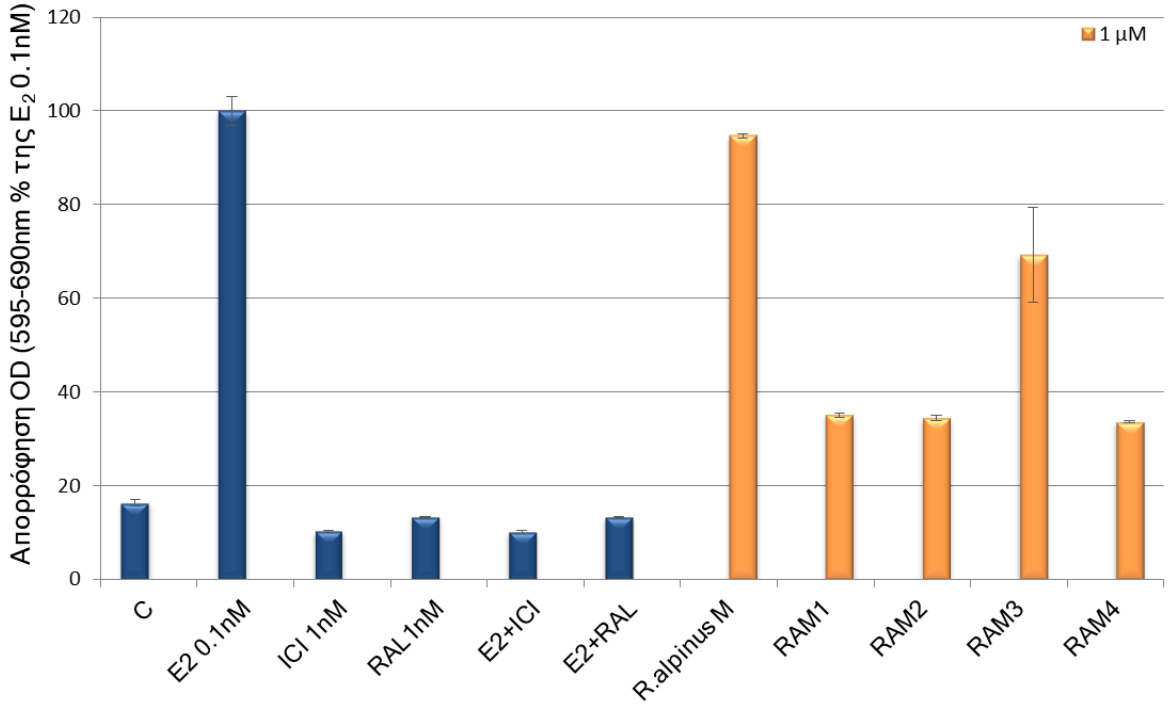
❖ Στην περίπτωση των μεταβολιτών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του ***Rhamnus lycioides*** **(RLE)** ως ασθενείς αγωνιστές χαρακτηρίστηκαν η κερκετίνη (**RLE2**), η ταξιφολίνη (**RLE3**) και ο τριακετυλοραμνινοσίδης της καιμπφερόλης (**RLE4**).



Εικόνα 187: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus lycioides* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ο μονοακετυλοραμνινοσίδης της καιμπφερόλης (**RLE5**) και ο 3-*O*-*β*-D-ραμνινοσίδης της καιμφερόλης (**RLE6**) εμφάνισαν μερικό αγωνισμό του υποδοχέα οιστρογόνων, ενώ η 5,7,3′,5′-τετραϋδροξυφλαβανόνη (**RLE1**) παρουσίασε ισχυρή οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά MCF7, με τιμή αγωνισμού 69%. Αξίζει να σημειωθεί πως όλοι οι προαναφερόμενοι μεταβολίτες στην κυτταρική σειρά Ishikawa σημείωσαν μηδαμινή οιστρογόνο δράση (εικόνα 187, πίνακας 187).

❖ Από την αξιολόγηση των μεταβολιτών του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Rhamnus alpinus* (RAM) διαπιστώθηκε ότι μόνο ο ρουτινοσίδης της τοραχρυσόνης (RAM3) παρουσίασε σημαντική οιστρογονικότητα με τιμή αγωνισμού 60%, ενώ όλοι οι υπόλοιποι μεταβολίτες εκδήλωσαν μηδαμινή οιστρογόνο δράση (εικόνα 188, πίνακας 187).



Εικόνα 188: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων του *Rhamnus alpinus* για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

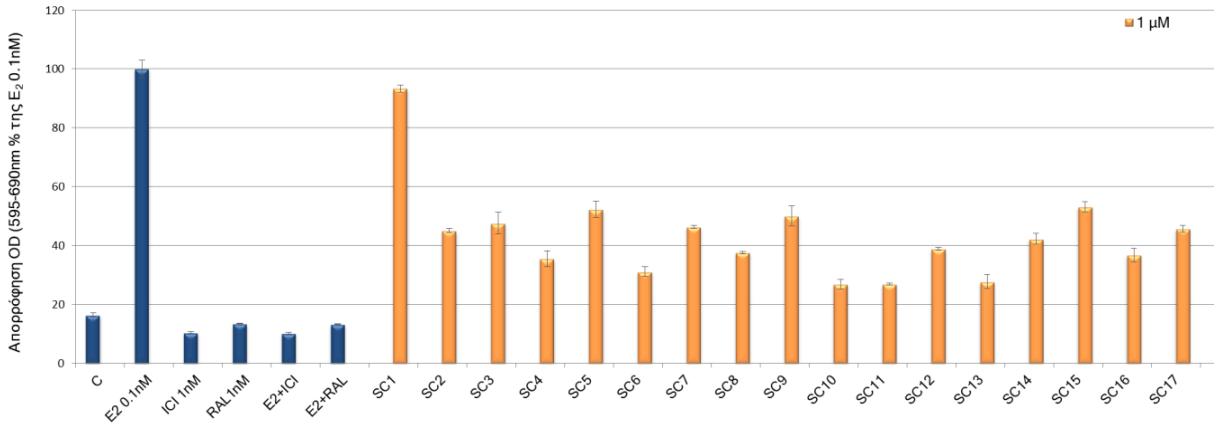
6.4.2 Αξιολόγηση συνθετικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά MCF-7

Όλες οι συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 1 μM, όπως και οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες ενώ η δραστικότητά τους εκφράστηκε ως % αγωνισμός σε σύγκριση με τον ανταγωνισμό της E_2 0.1 nM στον πίνακα 188. Ο σχετικός αριθμός κυττάρων, μετά την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών, παρουσιάζεται στα ιστογράμματα που ακολουθούν, ως ποσοστό επί του αριθμού των κυττάρων μετά την επίδραση της οιστραδιόλης 0.1 nM.

Συνολικά από τις πενήντα επτά συνθετικές ενώσεις που αξιολογήθηκαν, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MCF7, μόνο οι πέντε παρουσίασαν σημαντική οιστρογονικότητα (μερικός και ισχυρός αγωνισμός σε σύγκριση με την E_2 0.1nM) στην συγκέντρωση ελέγχου 1 μM.

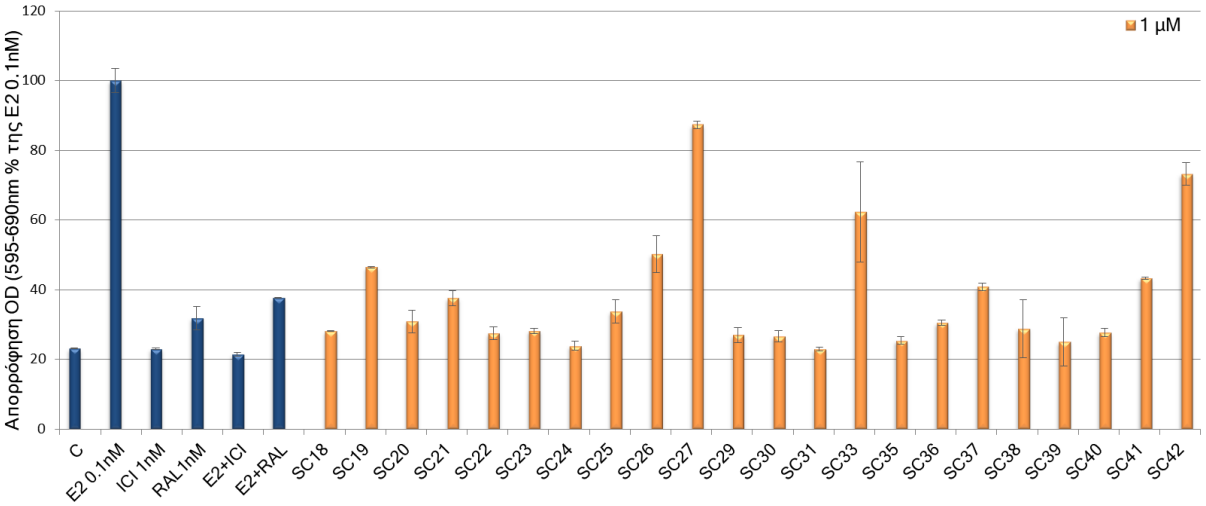
Αναλυτικότερα, ισχυρή οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά MCF-7 παρουσίασε η τριυδροξυβενζοΐνη (**SC1**), η οποία είχε χαρακτηριστεί ισχυρός αγωνιστής και στα κύτταρα

Ishikawa, ενώ όλα τα υπόλοιπα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα εκδήλωσαν ασθενή ή μηδαμινό αγωνισμό. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων και από τις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7) έδειξε ότι η πρενυλίωση των συγκεκριμένων παραγώγων δεν φαίνεται να συμβάλλει στην ενίσχυση της οιστρογονικότητας.



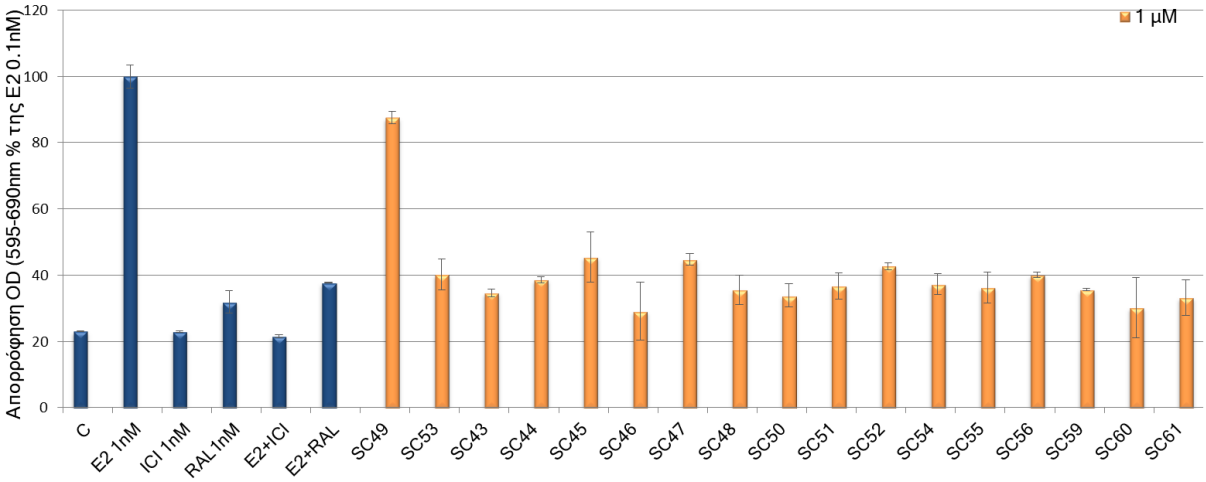
Εικόνα 189: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων δεοξυβενζοϊνών για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ Ο έλεγχος των διυδροστιλβενικών παραγώγων οδήγησε στη διαπίστωση ότι μόνο οι ενώσεις **SC19** και **SC21** θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ασθενείς αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων, ενώ τα υπόλοιπα παράγωγα δεν παρουσίασαν καμία οιστρογόνο δράση. Από τα παράγωγα ισοφλαβονών που αξιολογήθηκαν, τα **SC26** και **SC33** διατήρησαν την ασθενή και μερική οιστρογόνο δράση και στα κύτταρα MCF-7, όπως και στην πρίπτωση της κυτταρικής σειράς Ishikawa, με τιμές αγωνισμού 30% και 39%, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η γενιστεΐνη (**SC27**) διατήρησε την ισχυρή οιστρογονικότητα που επέδειξε και στα κύτταρα Ishikawa , καθώς αναδείχθηκε ως ισχυρός αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων (83%) και στη σειρά MCF-7.



Εικόνα 190: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Από τις υπόλοιπες χημικές κατηγορίες που συντέθηκαν, σημαντική οιστρογόνο δράση παρουσίασαν η κουμαρίνη **SC49**, η οποία χαρακτηρίστηκε ισχυρός αγωνιστής έναντι της οιστραδιόλης (77%) και το διαρυλοπροπάνιο **SC42**, το οποίο επέδειξε μερικό αγωνισμό (53%). Όλες οι υπόλοιπες ενώσεις επέδειξαν μικρή οιστρογόνος δράση ή στερούνταν οιστρογονικότητας (εικόνες 190 και 191, πίνακας 188).



Εικόνα 191: Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων διυδροστιλβενίων, ισοφλαβονών, χαλκονών και διαρυλοπροπανίων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των βιολογικών ελέγχων των δευτερογενών μεταβολιτών, συνολικά αξιολογήθηκαν 63 φυσικά προϊόντα προερχόμενα από εννέα φυτικά εκχυλίσματα, τόσο ως προς την πιθανή εκδήλωση οστεοπροστατευτικής δράσης σε δύο κυτταρικές σειρές (MC3T3–E1 και RAW264.7), όσο και ως προς την εκδήλωση οιστρογόνου δράσης στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7. Τα αποτελέσματα όλων των βιολογικών ελέγχων παρουσιάζονται στον πίνακα 187.

Στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων μήτρας (Ishikawa), 7 μεταβολίτες εκδήλωσαν σημαντική οιστρογονικότητα και πιο συγκεκριμένα, 2 (**PBM14**, **CVM11**) χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές και 5 (**CVM3**, **CVM10**, **CVM13**, **LAM3**, **LAM7**) ως ισχυροί αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων, ενώ 7 επέδειξαν ασθενή αγωνισμό (**CVM12**, **LAM8**, **RSM7**, **RSM8**, **RSM3**, **DHM10**, **HCE10**). Στην κυτταρική σειρά MCF-7, 18 μεταβολίτες εκδήλωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση και μεταξύ αυτών 10 χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές (**CVM11**, **CVM12**, **LAM8**, **RSM8**, **RLE5**, **RLE6**, **PBM11-12**, **RSM3**, **RAM3**) και 8 ισχυροί αγωνιστές (**CVM3**, **LAM3**, **CVM10**, **CVM13**, **LAM7**, **RLE1**, **RSM7**, **PBM14**) σε σύγκριση με την οιστραδιόλη (0.1 nM). Επιπλέον, 14 μεταβολίτες επέδειξαν ασθενή αγωνισμό (**CVM9**, **PBM5**, **LAM9**, **DHM12**, **RSM5**, **RLE2**, **CSM7**, **CSM5**, **DHM10**, **RLE4**, **RSM11**, **HCE8-10**), ενώ αξίζει να επισημανθεί ότι και οι 14 μεταβολίτες που χαρακτηρίστηκαν από κάποιου βαθμού οιστρογονικότητα στα κύτταρα Ishikawa, σημείωσαν δραστικότητα και στην κυτταρική σειρά MCF-7.

Από τη βιολογική αξιολόγηση στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών (MC3T3-E1) και σε συγκέντρωση 10 μM, 42 μεταβολίτες σημείωσαν επαγωγή της διαφοροποίησης (67% επί του συνόλου) και 23 μεταβολίτες σημείωσαν δραστικότητα μεγαλύτερη ή ίση με εκείνη της οιστραδιόλης στα 10 nM (36% επί του συνόλου). Στη συγκέντρωση 1 μM 40 μεταβολίτες έδωσαν επαγωγή της AklP (64% επί του συνόλου) και 9 μεταβολίτες σημείωσαν δραστικότητα υψηλότερη ή ίση εκείνης που επέδειξε η οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 10 nM. Στη μικρότερη συγκέντρωση ελέγχου (0.1 μM), αντίστοιχος αριθμός μεταβολιτών κρίθηκε ικανός να επάγει τη διαφοροποίηση, 44 από τους 63 μεταβολίτες (70% επί του συνόλου), αλλά μόλις 1 μεταβολίτης είχε μεγαλύτερη δράση σε σχέση με την οιστραδιόλη. Συνολικά, από τους 63 δευτερογενείς μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν, οι 52 προήγαγαν τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1, σε οποιαδήποτε συγκέντρωση ελέγχου (82% επί του συνόλου), και μεταξύ αυτών μόλις 6 μεταβολίτες χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων στα κύτταρα Ishikawa και 14 στα κύτταρα MCF-7.

Στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7 και στη συγκέντρωση 10 μM, 25 μεταβολίτες σημείωσαν καταστολή της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης (40% επί του συνόλου), 3 μεταβολίτες σημείωσαν καταστολή μεγαλύτερη από εκείνη της οιστραδιόλης (10 nM) και 1 μεταβολίτης κατέστειλε τη διαφοροποίηιση αποτελεσματικότερα από τη ραλοξιφαίνη (10 μM). Μεταξύ των 25 μεταβολιτών που κατέστειλαν την οστεοκλαστογένεση, μόλις δύο

χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa και έξι στην κυτταρική σειρά MCF-7.

Στην προσπάθεια να ομαδοποιηθούν οι φυσικές ενώσεις και με βάση τα αποτελέσματα της βιολογικής αξιολόγησής τους, θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε ως σημαντικούς οστεοπροστατευτικούς παράγοντες τους μεταβολίτες οι οποίοι συνδύασαν προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Έτσι, στη συγκέντρωση ελέγχου 10 μM, 19 μεταβολίτες (30% επί του συνόλου) σημείωσαν την επιθυμητή δραστικότητα, τόσο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, όσο και στην κυτταρική σειρά RAW264.7. Σημειώνεται πως το 45% των ενώσεων, οι οποίες αποδείχτηκαν επαγωγείς της οστεοβλαστογένεσης, επέδειξαν την επιθυμητή δραστικότητα και στην κυτταρική σειρά των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των κατασταλτικών ενώσεων στα κύτταρα RAW264.7 που συγχρόνως έκανε και επαγωγή της οστεοβλαστογένεσης είναι 76%. Λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα των ελέγχων οιστρογονικότητας, τέσσερις από τους προαναφερόμενους μεταβολίτες σημείωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7.

❖ Από την χημική κατηγορία των τερπενίων, δύο μεταβολίτες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σημαντικοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες. Η **λουπεόλη (CSM1/RSM1)** προήγαγε τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε ποσοστό 56% και κατέστειλε τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών κατά 30%. Η λουπεόλη δεν εκδήλωσε οιστρογονικότητα, υποδηλώνοντας πως η οστεοπροστατευτική της δράση δεν οφείλεται ουσιαστικά στη σύνδεση του μεταβολίτη με τους υποδοχείς οιστρογόνων, αλλά ίσως σε μηχανισμό που σχετίζεται με τη φλεγμονή, δεδομένου πως πρόκειται για ικανό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Lee, *et al.*, 2016). Πρόσφατα, ερευνητική μελέτη αποκάλυψε την *in vitro* και *in vivo* ικανότητα της λουπεόλης να αναστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (Im, *et al.,* 2016), ενώ το ακέτυλο παράγωγό της (lupeol acetate) αποδείχθηκε πως αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση *in vivo* μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών (Wang, *et al.*, 2016). Επίσης, έχει αναφερθεί η ικανότητά της να επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση αυξάνοντας την έκφραση AlkP (Omeje, *et al.*, 2014), ενώ έχει αποδειχτεί και η αντικαρκινική δράση της μέσω απόπτωσης των κυττάρων MCF-7. Το τερπένιο **β-σιτοστερόνη (HCE2)** ενίσχυσε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 46% και κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση κατά 16% εκδηλώνοντας οριακή οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Μέχρι σήμερα η *β*-σιτοστερόνη δεν είχε αξιολογηθεί για τις οστεοπροστατευτικές της ιδιότητες.

❖ Από τις ισοφλαβόνες, η **νταντζεΐνη (PBM5)** συνδύασε την αύξηση της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες (κατά 40%) και την καταστολή της ενεργότητας TRAP (κατά 21%), εκδηλώνοντας ασθενή οιστρογόνο δράση στα κύτταρα MCF-7. Πρόκειται για μια ισοφλαβόνη γνωστή για την κατασταλτική της επίδραση στην οστεοκλαστογένεση (Park, *et al.*, 2014) (Palacios, *et al.*, 2005) και την επαγωγική της επίδραση

στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε πως ο μηχανισμός της οστεοπροστασίας της στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή της με τους δύο τύπους υποδοχέων των οιστρογόνων (Jin, *et al.*, 2017) (Sun, *et al.*, 2016) και την αντιφλεγμονώδη δράση της (He, *et al.*, 2017). Σημειώνεται πως και τα δύο γλυκοσιδικά παράγωγα της γενιστεΐνης (**CVM10** και **CVM13**) συνδύασαν την επιθυμητή δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ο **7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (CVM10/LAM4)** ή γενιστίνη, αύξησε 52% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ κατέστειλε κατά 22% την οστεοκλαστογένεση εκδηλώνοντας ισχυρή οιστρογόνο επίδραση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ο **7, 4'-δι-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της γενιστεΐνης (CVM13)** προήγαγε κατά 31% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και κατέστειλε κατά 24% την οστεοκλαστογένεση, ενώ και αυτός χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων. Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η γλυκοσυλίωση δεν παρεμποδίζει την εκδήλωση δραστικότητας στα συγκεκριμένα παράγωγα γενιστεΐνης. Άλλωστε έχει αναφερθεί η οστεοπροστατευτική τους επίδραση, κυρίως του μεταβολίτη **CVM10** (Hooshmand, 2010), καθώς ακολουθούν τη δράση της γενιστεΐνης και περιέχονται σε υψηλά ποσοστά σε τροφές με γνωστή οστεοπροστατευτική δράση, όπως η σόγια (Ma, *et al.*, 2000) (Kalita, *et al.*, 2010).

❖ Τα φαινολικά οξέα φάνηκε να εκδηλώνουν την επιθυμητή δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές, χωρίς να συνδυάζουν την εκδήλωση οιστρογονικότητας σε καμία από τις κυτταρικές σειρές ελέγχου. Δραστικότερος παράγοντας χαρακτηρίστηκε το **3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM4),** επάγοντας τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 κατά 67% και καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση των μακροφάγων κατά 10%. Σημαντικό είναι το γεγονός πως έχει μελετηθεί για την οστεοπροστατευτική του δράση, ως το κύριο συστατικό κινεζικού σκευάσματος που χορηγείται για την οστεοπόρωση, και αποδείχθηκε πως ενεργοποιεί την οστεοβλαστική δραστηριότητα στην κυτταρική σειρά UMR 106, μέσω των MAP κινασών (Xiao, *et al.*, 2014). Το **π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM7/DHM2)** σημείωσε επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (10%) και καταστολή της οστεοκλαστογένεσης (11%) και μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την πιθανή οστεοπροστατευτική δράση του. Το **3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM8)** προήγαγε επίσης την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 6% και κατέστειλε κατά 2% τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί πολύ ικανό αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Stanikunaite, *et al.*, 2009) ακόμη δεν έχει μελετηθεί η οστεοπροστατευτική του ικανότητα.

❖ Απ' όλες τις φλαβόνες και φλαβονόλες που ελέγχθηκαν μόνο η **καιμπφερόλη (RSM8)** και ο **3-*O*-ραμνινοσίδης της (RLE6/RSM9)** εκδήλωσαν την επιθυμητή δραστικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η καιμπφερόλη προήγαγε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 3%, ενώ παρουσίασε κατασταλτική ικανότητα έναντι της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης στο αξιοσημείωτο ποσοστό 44%, η οποία είναι αντίστοιχη της ραλοξιφαίνης 10 μM. Καθώς η καιμπφερόλη στα κύτταρα Ishikawa χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων και στα MCF-7 εκδήλωσε μερικό αγωνισμό, μπορούμε να υποθέσουμε ότι πιθανώς

ένας από τους μηχανισμούς οστεοπροστατευτικής δράσης της, στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του μεταβολίτη με τον υποδοχέα οιστρογόνων (Guo, *et al.*, 2012) *(Prouillet, et al.*, 2004). Βιβλιογραφικά, η καιμπφερόλη έχει αποδειχθεί πως προάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Kim, *et al.*, 2016) (Yang, *et al.*, 2010), ενώ προστατεύει τα οστεοβλαστικά κύτταρα από οξειδωτική καταστροφή (Suh, *et al.*, 2009) (Choi, 2011). Η ικανότητά της να καταστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση επιβεβαιώνεται και μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της (Lee, *et al.,* 2014), ενώ η οστεοπροστατευτική της επίδραση αναδεικνύεται και από *in vivo* πειράματα (Nowak, *et al.*, 2017). Η δραστικότητα του μεταβολίτη **RLE6** στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 ήταν παρόμοια με εκείνη της γενίνης του, ενώ στα κύτταρα RAW264.7 εμφανίστηκε σαφώς μειωμένη, πετυχαίνοντας καταστολή μόλις της τάξης του 8%. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης δεν παρουσίασε οιστρογονικότητα.

❖ Στην κατηγορία των κουμεστανίων, το πρενυλοπαράγωγο **6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)κουμεστρόλη (HCE5)** χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας στα κύτταρα MC3T3-E1, προάγοντας την οστεοβλαστογένεση κατά 67%, επέδρασε στην οστεοκλαστογένεση καταστέλλοντάς την κατά 4% και στερήθηκε οιστρογονικότητας και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Μέχρι σήμερα η προαναφερόμενη ένωση δεν έχει αξιολογηθεί σε καμία από τις προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές, όμως το κουμεστάνιο **ψωραλιδίνη**, το οποιο αποτελεί δομικό ανάλογο του μεταβολίτη **HCE5**, έχει αποδειχθεί πως αυξάνει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών ROB (οστεοβλαστικά κύτταρα θόλου αρουραίων), καταστέλλοντας ταυτοχρόνως και την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Μάλιστα, στην ίδια μελέτη, η συγχορήγηση της ουσίας με το αντιοιστρογόνο ICI ανέστειλε την ευεργετική της επίδραση υποδηλώνοντας πως ο οστεοπροστατευτικός της μηχανισμός στηρίζεται στην αλληλεπίδραση με τους οιστρογονοϋποδοχείς (Zhai, *et al.*, 2017). Πρόσφατη *in vivo* μελέτη ανέδειξε την ικανότητα της ουσίας να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση, έπειτα από προκαλούμενη οστεόλυση με χορήγηση του φλεγμονώδους παράγοντα LPS, μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών (Kong, *et al.*, 2017). Τέλος, η **ψωραλιδίνη** εμφάνισε μεγαλύτερη ικανότητα οστεοπροστασίας από την κουμεστρόλη, γεγονός που αποδίδεται πιθανώς στην ύπαρξη της πρενυλομάδας (Zhai, *et al.*, 2018), όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση του μεταβολίτη **HCE5**. Ο μεταβολίτης **κουμεστρόλη (HCE8/PBM4)** προήγαγε την οστεοβλαστογένεση κατά 33%, χαρακτηρίστηκε από ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7 και κατέστειλε σε ποσοστό 14% την οστεοκλαστογένεση. Πράγματι, μελέτες έχουν αναδείξει την ικανότητά του να αναστέλλει την οστική απορρόφηση σε μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων (Tsutsumi, 1995), να επάγει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών (Sun, *et al.*, 2007) (Kanno, *et al.*, 2004) και να καταστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση *in vitro* (Kanno, *et al.*, 2004_b). Η οστεοπροστατευτική δράση της κουμεστρόλης, με τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη ικανότητα που εκφράζει (Yuk, *et al.*, 2017). Η **3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-**

μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη (HCE10) χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων, προήγαγε την οστεοβλαστογένεση σε ποσοστό 12%, ενώ σημείωσε οριακή κατασταλτική ικανότητα στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Σημειώνεται ότι μέχρι στιγμής ο εν λόγω μεταβολίτης δεν έχει απομονωθεί από κάποια άλλη φυσική πηγή. Αξιόλογη οστεοπροστατευτική δράση σημείωσε και η **μπιτουκαρπίνη Α (PBM1)** προάγοντας κατά 27% τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 και ταυτόχρονα καταστέλλοντας σε ποσοστό 14% τη διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων σε οστεοκλάστες. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των πτεροκαρπανών, από τις οποίες σε αρκετές αποδίδονται (αντι)-οιστρογονικές ιδιότητες (Simons, *et al.*, 2011) (Boue, *et al.*, 2011) (Khupe, *et al.*, 2011). Επίσης, μη πρενυλιωμένα δομικά ανάλογα της μπιτουκαρπίνης Α, η μεντικαρπίνη και η 9-διμεθοξυ-μεντικαρπίνη, έχουν χαρακτηριστεί ικανοί αντι-οστεοπορωτικοί παράγοντες σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες (Tyagi, *et al.*, 2010) (Kureel, *et al.*, 2014) (Bhargavan, *et al.*, 2012) (Goel, *et al.*, 2012) (Morgan, *et al.*, 2014) (Goel, *et al.*, 2015). Δεδομένου ότι ο εν λόγω μεταβολίτης δεν εκδήλωσε οιστρογονικότητα, πιθανολογείται ότι η οστεοπροστατευτική του δράση επιτυγχάνεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών πέραν της σύνδεσής του με τους οιστρογονοϋποδοχείς. Το **ψωραλένιο (PBM3),** επίσης χαρακτηρίστηκε από απουσία οιστρογονικότητας, ενώ σημείωσε σημαντική καταστολή της οστεοκλαστογένεσης σε ποσοστό 22% και άσκησε επαγωγική επίδραση κατά 9% στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, σε συγκέντρωση 10 μM. Σημειώνεται πως σε συγκέντρωση 0.1 μM αύξησε τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών κατά 14%, πλησιάζοντας την δράση της οιστραδιόλης 10 nM. Ως μεταβολίτης εντοπίζεται σε αρκετές δρόγες που χορηγούνται για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης και μελέτες έχουν αποδείξει ότι ενεργοποιεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση μέσω της ενεργοποίησης της μορφογενετικής πρωτεΐνης (BMP) (Tang, e*t al.*, 2011) (Wong, *et al.*, 2011). Με βάση τα αποτελέσματα μελετών επάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών (Li, *et al.*, 2017), παρεμποδίζει την απόπτωσή τους (Chen, *et al.*, 2017), ενώ αναστέλλει σε μικρό βαθμό την έκκριση παραγόντων από τους οστεοβλάστες που ενεργοποιούν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (Wang, *et al.*, 2010). Τέλος, *in vivo* μελέτη σε οστεοπορωτικό μοντέλο ωοθηκεκτομυθέντων επίμυων επιβεβαίωσε την οστεοπροστατευτική του επίδραση (Yang, *et al.*, 2012), όμως μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την επίδραση του μεταβολίτη στην διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων RAW264.7 σε οστεοκλάστες. Ο μεταβολίτης **8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη (PBM9),** στερούταν οιστρογόνου δράσης, προήγαγε την οστεοβλαστογένεση και κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση σε ποσοστό της τάξεως του 10% και στις δύο περιπτώσεις. Η εν λόγω κουμαρίνη απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή, αξίζει όμως να σημειωθεί πως η οσθόλη, η οποία ανήκει στην ίδια χημική κατηγορία, έχει αποδειχθεί πως προάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση *in vitro* (Tang, *et al.*, 2010) και αποκαθιστά την οστική απώλεια σε *in vivo* μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων ποντικών (Jia, *et al.*, 2016).

❖ Τέλος, από την ομάδα των ανθρακινονών, ο **8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της εμοδίνης (RAM1),** δεν παρουσίασε οιστρογόνο δράση και κατέστειλε την επαγόμενη από το RANKL διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων κατά 21%, συνδυάζοντας 18% επαγωγή της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα MC3T3-E1. Μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία δεν έχουν αποδοθεί οστεοπροστατευτικές ιδιότητες στον συγκεκριμένο μεταβολίτη, παρά μόνο στη γενίνη του (εμοδίνη), η οποία αναλύεται στη συνέχεια. Ο γλυκοσίδης της εμοδίνης αναφέρεται ως ικανός αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Lee, *et al.*, 2013) με μικρή ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 (Matsuda, *et al.*, 2001). Ο μεταβολίτης **8-*O*-*β*-ρουτινοσίδης της φυσιόνης (RAM2),** επίσης εκδήλωσε καταστολή της οστεοκλαστογένεσης κατά 27% και προήγαγε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 15%, χωρίς να εκδηλώνει οιστρογόνο επίδραση. Απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή, ενώ πρόσφατα σε *in vivo* μελέτη αποκαλύφθηκε η οστεοπροστατευτική επίδραση της γενίνης φυσιόνης (Joy, *et al.*, 2016). Τελευταίος μεταβολίτης ο οποίος χαρακτηρίστηκε δραστικός στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1 και RAW264.7 ήταν **η 4-*O*-μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη** (**RAM4),** η οποία κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση κατά 24%, παρουσίασε μικρή επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και στερούταν οιστρογονικότητας. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη βιολογική δραστικότητα της συγκεκριμένης ένωσης.

Από το σύνολο των μεταβολιτών που ελέγχθηκαν, 24 σημείωσαν δραστικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 στη συγκέντρωση 10 μM και δεν επηρέασαν ή δεν προήγαγαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Αναλυτικότερα:

❖ Από τη χημική κατηγορία των τερπενίων, η *β*-σιτοστερόλη (**CVM1/HCE4/LAM1/RSM2**), η *β*-αμυρίνη (**DHM1/HCE3/CSM2**) και η Δ^1-λουπενόνη (**HCE1**) προήγαγαν σημαντικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, είχαν επαγωγική δράση στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση, ενώ χαρακτηρίστηκαν από απουσία οιστρογόνου δράση στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Ισχυρότερος διαφοροποιητικός παράγοντας των κυττάρων MC3T3-E1 χαρακτηρίστηκε η **β-αμυρίνη** προκαλώντας 82% επαγωγή της έκφρασης της AlkP, ενώ στις μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με την οστεοπροστατευτική δράση του συγκεκριμένου μεταβολίτη. Ωστόσο, μελέτες έχουν αποδώσει στον εν λόγω μεταβολίτη αντιφλεγμονώδη ικανότητα (Shih, *et al.*, 2010) και ήπια αντικαρκινική δράση (El-Alfy, *et al.*, 2011). Η **β-σιτοστερόλη** εμφάνισε επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης σε ποσοστό 51%. Ανάλογα της *β*-σιτοστερόλης έχουν χαρακτηριστεί επαγωγείς της οστεοβλαστογένεσης, αυξάνοντας την έκφραση της AlkP (Pathomwichaiwat, et al., 2015), αλλά μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί ανάλογη ικανότητα για τη *β*-σιτοστερόλη. Ούτε και η **Δ^1-λουπενόνη** μέχρι στιγμής έχει αξιολογηθεί για την οστεοπροστατευτική της ικανότητα, παρ' όλο που το δομικό της ανάλογο λουπενόνη έχει φανεί ικανή να προάγει την διαφοροποίηση των MC3T3-E1 (Pathomwichaiwat, *et al.*, 2015).

❖ Η πλειοψηφία των ισοφλαβονοειδών που ελέγχθηκαν κρίθηκαν ικανά να προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Μεταξύ αυτών, εννέα μεταβολίτες σημείωσαν την επιθυμητή δραστικότητα στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, ενώ χαρακτηρίστηκαν και από επαγωγική επίδραση στα κύτταρα RAW264.7. Την υψηλότερη δραστικότητα σημείωσε η **γενιστεΐνη (CVM3/LAM2)**, η οποία είναι γνωστός SERM παράγοντας, με ισχυρή οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου (Ishikawa και MCF-7). Η οστεοπροστατευτική δράση της γενιστεΐνης μέσω της επίδρασής της στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Wang, *et al.*, 2007) (Niu, *et al.*, 2010) (Kim, *et al.*, 2018) έχει μελετηθεί εκτενώς, ενώ ο μηχανισμός δράσης της οφείλεται κυρίως στη σύνδεσή της με τους οιστρογονουποδοχείς (Yamaguchi, *et al.*, 2009) (Liao, *et al.,* 2014). Παρόλα ταύτα, η οστεοπροστατευτική της δράση πιθανόν να ενισχύεται και μέσω της υψηλής αντιοξειδωτικής της ικανότητας (Lee, *et al.*, 2001) (Choi, *et al.*, 2003). Ακολουθούν με σειρά δραστικότητας η **5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη (CVM9)** και ο **7-*O*- γλυκοπυρανοσίδης (CVM12),** οι οποίοι προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 33% και 34%, αντίστοιχα. Ο μεταβολίτης CVM9 δεν παρουσίασε οιστρογόνο δράση, ενώ ο CVM12 επέδειξε μέτρια οιστρογονικότητα στα κύτταρα MCF-7. Παρά το γεγονός ότι οι εν λόγω μεταβολίτες αποτελούν δομικά ανάλογα των ισοφλαβονών γενιστεΐνη και νταντζεΐνη, μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί η επίδρασή τους στις μελετούμενες κυτταρικές σειρές. Ο **7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης (CVM11)** ή νταντζίνη προήγαγε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 28%, ενώ χαρακτηρίστηκε ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Όπως και στην περίπτωση της γενιστίνης (**CVM10**), ο εν λόγω μεταβολίτης εμφανίζει ελαφρώς μειωμένη δραστικότητα σε σχέση με τη γενίνη του (νταντζεΐνη) και φαίνεται να μη διαθέτει ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης. Παρόλα ταύτα, η νταντζίνη περιέχεται σε αρκετές δρόγες που χορηγούνται για την αντιμετώπιση οστικών παθήσεων (Reppert, *et al.*, 2008) και φημίζεται για τη φυτοοιστρογόνο (Kalita, *et al.*, 2010) και οστεοπροστατευτική της ικανότητα (Feng, *et al.*, 2016) (Li, *et al.*, 2005). Ανάλογη δραστικότητα επέδειξε και η **7-*O*- (6-*O*-ακετυλο-β-γλυκοπυρανοσυλο) νταντζεΐνη (PBM8**), η οποία σημείωσε επαγωγή της έκφρασης της AlkP 34% και στερούταν οιστρογονικότητας. Η ισοφλαβόνη **2'-υδροξυγενιστεΐνη (LAM3**) χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων, αύξησε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 117%, ενώ φάνηκε να μην επιδρά στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Μολονότι ο εν λόγω μεταβολίτης δεν έχει αξιολογηθεί μέχρι σήμερα ως προς την οστεοπροστατευτική και οιστρογονική ικανότητά του, βασιζόμενοι στα προαναφερόμενα αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η οστεοπροστατευτική του επίδραση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής του με τους οιστρογονικούς υποδοχείς, όπως και στην περίπτωση της γενιστεΐνης. Παρόμοια ικανότητα επαγωγής σημείωσε και η **5-*O*-β-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη (LAM8),** με τη διαφορά ότι παρουσίασε ασθενή αγωνισμό στην κυτταρική σειρά Ishikawa και μερικό αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή και δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τις

βιολογικές ιδιότητές του. Χωρίς οιστρογόνο δράση και παρουσιάζοντας ικανότητα να επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (7%) χαρακτηρίστηκε η **ισοφλαβόνη 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της 8-μεθοξυ-4'-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (CSM4)**, η οποία έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *Iris germanica* var. *alba*, αλλά δεν έχει αξιολογηθεί στους συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους. Τέλος, η γνωστή ισοφλαβόνη **φορμονονετίνη (CVM2/HCE7)** αύξησε κατά 5% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, δεν παρουσίασε οιστρογόνο δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7), ενώ η οστεοπροστατευτική της επίδραση φαίνεται να επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά (Ha, *et al.*, 2010) (Kumar, *et al.*, 2017) (Han, *et al.*, 2011) (Gautam, *et al.*, 2017).

- Το **4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-*trans*-π-κουμαρικό οξύ (DHM12)** προήγαγε την οστεοβλαστογένεση κατά 6%, επιδεικνύοντας παράλληλα πολύ υψηλή επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης και ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7. Αξίζει να αναφερθεί πως η γενίνη του, το π-κουμαρικό οξύ, έχει εκδηλώσει οστεοπροστατευτική επίδραση *(Yamaguchi, et al.*, 2008), κυρίως αυξάνοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ πιθανότατα επιδρά οστεοπροστατευτικά και μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών (Yamaguchi, *et al.*, 2009,) (Neog, *et al.*, 2017).

- Το **3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκό οξύ (CSM17)** ενίσχυσε κατά 10% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, χωρίς να συνοδεύεται από εκδήλωση οιστρογονικότητας, ενώ φάνηκε να προάγει και την οστεοκλαστογένεση. Συγκρίνοντας τη δραστικότητα του μεταβολίτη με εκείνη της **1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόσης** (**CSM11**), φαίνεται πως η παρουσία της αλυσίδας, στην περίπτωση του μεταβολίτη CSM17, επέδρασε ενισχυτικά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ δεν συνεισέφερε στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης.

- Τα **σακχαριδικά παράγωγα της κερκετίνης** (**DHM7, CSM5**), της **μυρικετίνης (CSM7)** και της **ραμνοσιτρίνης (RSM11)** προήγαγαν σε μικρό βαθμό την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές στα κύτταρα MCF-7 και προήγαγαν και την οστεοβλαστογένεση. Η **6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλαπιγενίνη (PBM11)** χαρακτηρίστηκε μερικός αγωνιστής στα κύτταρα MCF-7 αυξάνοντας και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 24%. Βιολογική αξιολόγηση της εν λόγω ένωσης στην κυτταρική σειρά μακροφάγων κυττάρων RAW264.7, ανέδειξε την αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική της ικανότητα *(Lv, et al.*, 2016), η οποία πιθανότατα συνέβαλε στην εκδήλωση οστεοπροστασίας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η γενίνη του μεταβολίτη **PBM11** (απιγενίνη) έχει χαρακτηριστεί για τις οστεοπροστατευτικές της ιδιότητες επάγοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και καταστέλλοντας την διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης (Park, *et al.*, 2008) (Goto, *et al.,* 2015) (Bandyopadhyay, *et al.*, 2006) (Choi, 2007). Η **κατεχίνη (DHM5)** και η **μυρικετίνη (CSM8)** δεν παρουσίασαν οιστρογόνο δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ αύξησαν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 κατά 23% και 13% αντίστοιχα. Η μυρικετίνη έχει αναφερθεί ότι είναι ικανή να αναστέλλει την απόπτωση των οστεοβλαστικών κυττάρων μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών

(Kuo, 2005), να τα προστατεύει από το οξειδωτικό στρες μέσω της αντιοξειδωτικής της ικανότητας (Lee, *et al.*, 2008) και να επάγει τη διαφοροποίησή τους (Ying, *et al.*, 2014) (Hsu, *et al.*, 2007). Η κατεχίνη με τη σειρά της, έχει φανεί πως προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Choi, et al., 2003). Συγκεκριμένα, χορήγηση της κατεχίνης σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα MC3T3-E1 και καταστολή της έκφρασης των κυτταροοκινών (TNF-al και IL-6), οι οποίες ευθύνονται για την οστική απορρόφηση.

❖ Το **ισοψωραλένιο (PBM2),** το δομικό ανάλογο του ψωραλενίου (PBM3), αύξησε κατά 9% την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, αλλά η μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής του παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0.1 μM σημειώνοντας επαγωγή της έκφρασης της AlkP κατά 22%. Δεν εκδήλωσε οιστρογονικότητα σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου, ενώ φάνηκε να μην επηρεάζει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Το ισοψωραλένιο έχει αποδειχθεί πως ευνοεί την διαφοροποίηση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες και παρεμποδίζει τη διαφοροποίησή τους σε λιποκύτταρα (Wang, *et al.*, 2017). Επιπλέον, προάγει την διαφοροποίηση οστεοβλαστικών κυττάρων (Zhai, *et al.*, 2012) και πρόσφατα αναφέρθηκε πως ενεργοποιεί την παραγωγή κολλαγόνου από τα οστεοβλαστικά κύτταρα MC3T3-E1 μέσω αντιφλεγμονωδών μηχανισμών, ενισχύοντας την οστεοπροστατευτική του επίδραση *(Zhang, et al.*, 2017). Τέλος, το κουμεστάνιο **ισοτριφολιόλη (HCE9)** προήγαγε την οστεοβλαστογένεση κατά 28%, χαρακτηρίστηκε από ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7, ενώ φάνηκε να ενίσχυσε και την οστεοκλαστογένεση. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης δεν έχει αξιολογηθεί μέχρι σήμερα για την οστεοπροστατευτική του ικανότητα, ενώ μελέτες έχουν αναδείξει την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση του (Li, *et al.*, 2017).

Από το σύνολο των μεταβολιτών που ελέγχθηκαν, πέντε σημείωσαν δραστικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά RAW264.7 και σε συγκέντρωση 10 μM, ενώ δεν επηρέασαν ή κατέστειλαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.

❖ Το πρενυλιωμένο παράγωγο **7,4'-δι-*O*- γλυκοπυρανοσυλολουτεόνη (LAM9)** σημείωσε αξιοσημείωτη καταστολή της οστεοκλαστογένεσης της τάξης του 36%, εκδηλώνοντας ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7 και πολύ μικρή αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (7%).

❖ Από τα φαινολοξέα, το **γαλλικό οξύ (DHM6)** εκδήλωσε ισχυρή καταστολή (45%) της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης, στερούταν οιστρογονικότητας, αλλά στη συγκέντρωση 10 μM κατέστειλε και την οστεοβλαστογένεση, δράση όμως που δεν παρατηρήθηκε στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου, στις οποίες προήγαγε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Αρκετά ανάλογα του γαλλικού οξέος έχουν αποδειχθεί ικανοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες (Baek, *et al.*, 2017) (Jin, *et al.*, 2015), ενώ το ίδιο το γαλλικό οξύ αποτελεί συστατικό αρκετών δρογών με κατασταλτική δράση έναντι της οστεοκλαστογένεσης *(Shim, et al.*, 215) (Shim, e*t al.,* 2015). Παρ' όλα αυτά μέχρι στιγμής το γαλλικό οξύ δεν έχει αξιολογηθεί για τις οστεοπροστατευτικές του ικανότητες στις μελετώμενες κυτταρικές σειρές.

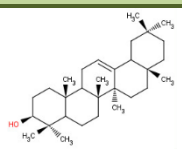
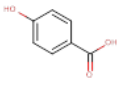
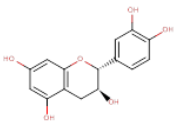
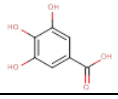
❖ Η **1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση (CSM11)** κατέστειλε κατά 18% την διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων σε οστεοκλάστες, δεν εκδήλωσε οιστρογόνο δράση σε καμία κυτταρική σειρά, ενώ κατέστειλε και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση μόνο στη συγκέντρωση 10 μM.

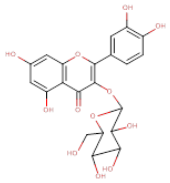
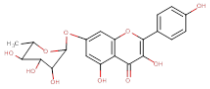
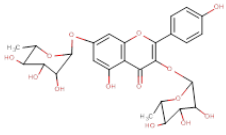
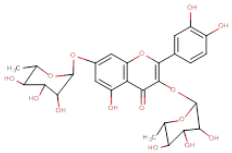
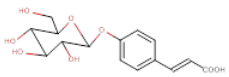
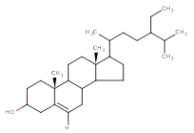
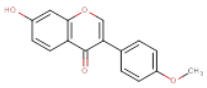
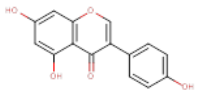
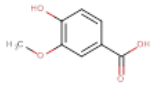
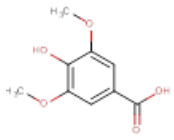
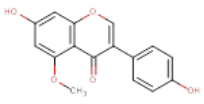
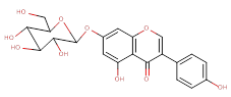
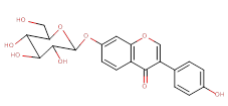
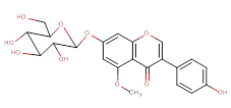
❖ **3-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (CSM14)** κατέστειλε μόλις 2% την οστεοκλαστογένεση, στερούταν οιστρογονικότητας, ενώ εκδήλωσε πολύ μικρή καταστολή της οστεοβλαστογένεσης σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου. Βιολογικά έχει αξιολογηθεί η γενίνη **(CSM8)**, όπως αναφέρεται παραπάνω.

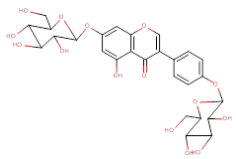
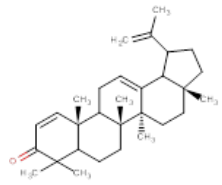
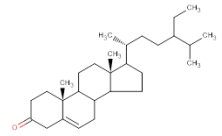
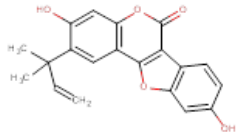
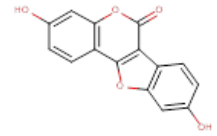
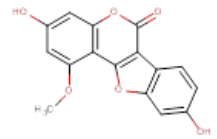
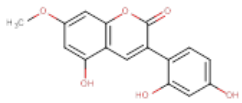
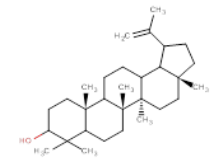
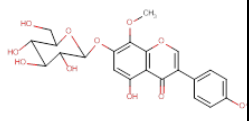
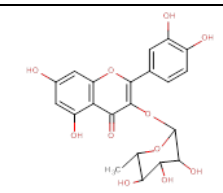
❖ Τέλος, η ανθρακινόνη **εμοδίνη (RSM3)** επέδρασε κατασταλτικά στην οστεοκλαστογένεση (28%) και σημείωσε ασθενή και μερικό αγωνισμό στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, αντιστοίχως. Στα κύτταρα MC3T3-E1 σημείωσε κατασταλτική επίδραση. Για την εμοδίνη, μελέτες αναφέρουν πως καταστέλλει την επαγόμενη από το κάδμιο οστεοπόρωση, αναστέλλοντας το σχηματισμό των οστεοκλαστών (Chen, *et al.*, 2017), ενώ απέτρεψε την οστική απορρόφηση σε *in vivo* μοντέλο ποντικών έπειτα από LPS επαγόμενη οστεοπόρωση (Kang, *et al.*, 2014) (Kim, *et al.*, 2014). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση ενεργοποιώντας την κινάση PI3K και την έκφραση της πρωτεΐνης BMP-2 σε συγκέντρωση 5μM στην προ-οστεοβλαστική κυτταρική σειρά MC3T3-E1 (Lee, *et al.*, 2008).

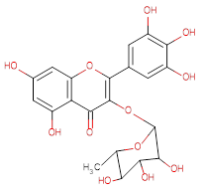
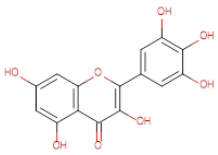
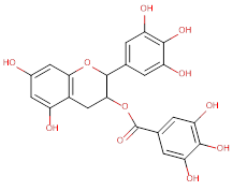
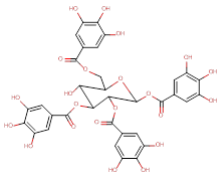
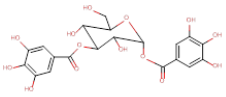
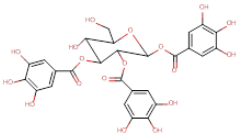
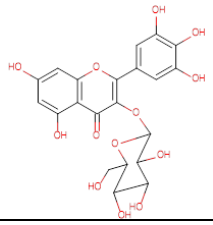
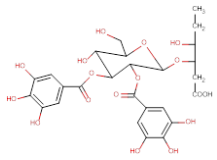
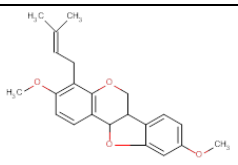
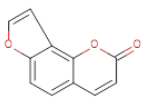
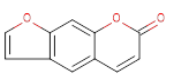
Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι δραστικότητες όλων των δευτερογενών μεταβολιτών και στις τέσσερις κυτταρικές σειρές ελέγχου.

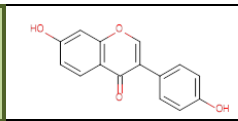
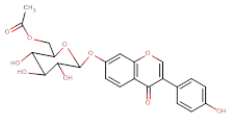
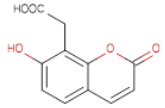
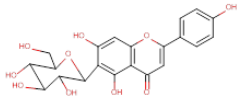
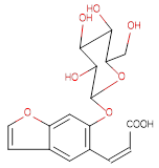
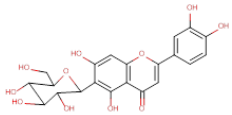
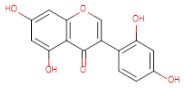
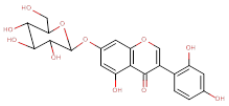
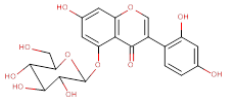
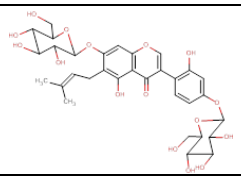
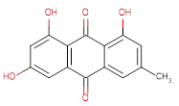
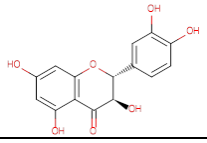
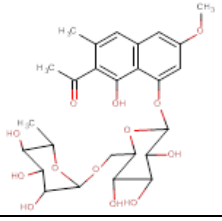
Πίνακας 187: Συνοπτικός πίνακας της δραστικότητας των φυσικών ενώσεων στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

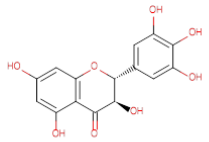
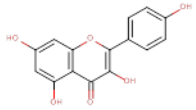
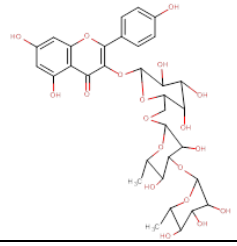
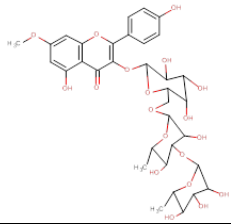
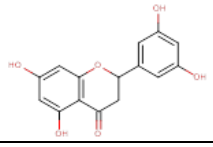
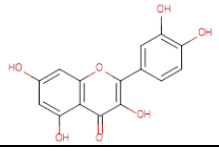
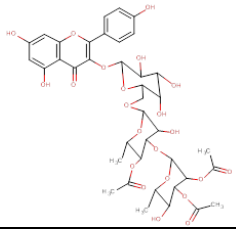
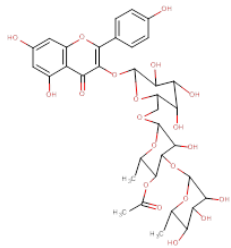
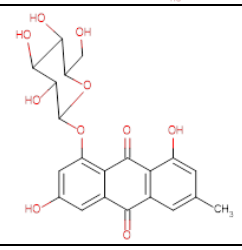
		Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.) MC3T3-E1			Ενεργότητα TRAP (% C+Δ.Π.) RAW264.7	Αγωνισμός % της$E_2$1 nM Ishikawa	Αγωνισμός % της E_2 0.1 nM MCF-7
ΔΟΜΗ		**10 μg/ml**	**1 μg/ml**	**0.1 μg/ml**	**10 μg/ml**	**1 μg/ml**	**1 μg/ml**
DHM1 HCE3 CSM2		182 ± 0	117 ± 8	99 ± 1	115 ± 5	NA	M
DHM2 CVM7		110 ± 3	106 ± 0	105 ± 4	89 ± 4	M	M
DHM5		123 ± 12	101 ± 3	92 ± 5	153 ± 15	NA	M
DHM6 CSM6		80 ± 1	107 ± 2	105 ± 0	55 ± 2	M	M

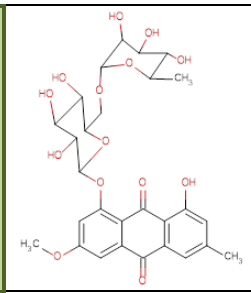
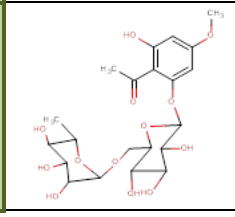
DHM7		104 ± 3	97 ± 2	103 ± 3	130 ± 8	M	M
DHM9		75 ± 7	79 ± 3	83 ± 3	205 ± 4	M	M
DHM10		91 ± 1	100 ± 2	102 ± 2	168 ± 1	W (12 ± 8)	W (12 ± 7)
DHM11		85 ± 1	81 ± 4	86 ± 1	213 ± 3	M	M
DHM12		106 ± 5	109 ± 1	114 ± 4	198 ± 6	M	W (13 ± 3)
CVM1 HCE4 CSM2 LAM1 RSM2		151 ± 1	114 ± 3	114 ± 3	125 ± 3	NA	M
CVM2 HCE7		105 ± 2	106 ± 2	100 ± 0	118 ± 11	M	M
CVM3 LAM2		146 ± 9	116 ± 7	106 ± 8	160 ± 14	F (76 ± 4)	F (83 ± 2)
CVM4		167 ± 6	121 ± 2	110 ± 2	91 ± 0	NA	M
CVM8		106 ± 1	113 ± 3	104 ± 1	98 ± 2	M	M
CVM9		133 ± 4	110 ± 9	102 ± 5	132 ± 6	M (3 ± 3)	W (15 ± 3)
CVM10 LAM4		152 ± 4	117 ± 4	104 ± 3	78 ± 5	F (91 ± 1)	F (84 ± 3)
CVM11		128 ± 6	104 ± 3	53 ± 6	116 ± 1	P (41 ± 5)	P (58 ± 7)
CVM12		132 ± 3	83 ± 4	84 ± 4	134 ± 1	W (14 ± 7)	P (34 ± 1)

CVM13		131 ± 9	117 ± 3	111 ± 5	76 ± 6	F (96 ± 4)	F (85 ± 1)
HCE1		122 ± 3	117 ± 1	114 ± 2	110 ± 6	M	M
HCE2		146 ± 2	117 ± 2	113 ± 1	84 ± 7	M	M
HCE5		167 ± 13	108 ± 4	110 ± 5	96 ± 1	M	M
HCE8 PBM4		133 ± 4	110 ± 9	102 ± 5	86 ± 7	M (3 ± 3)	W (33 ± 0)
HCE9		128 ± 5	107 ± 5	112 ± 5	158 ± 3	M	W (32 ± 0)
HCE10		112 ± 5	102 ± 1	112 ± 3	99 ± 11	W (12 ± 0)	W (25 ± 0)
CSM1 RSM1		156 ± 6	126 ± 1	103 ± 2	70 ± 1	M	NA
CSM4		107 ± 0	110 ± 1	106 ± 0	245 ± 13	M	M
CSM5		102 ± 1	94 ± 2	102 ± 2	137 ± 10	M	W (11 ± 4)

CSM7		103 ± 3	104 ± 3	100 ± 5	140 ± 6	M	W (11 ± 1)
CSM8		113 ± 5	104 ± 1	102 ± 5	145 ± 12	M	M
CSM9		59 ± 2	94 ± 2	105 ± 2	122 ± 10	M	M
CSM10		17 ± 0	73 ± 3	89 ± 1	199 ± 4	M	M
CSM11		89 ± 2	112 ± 1	113 ± 0	82 ± 12	M	M
CSM12		85 ± 4	105 ± 1	103 ± 2	120 ± 1	M	M
CSM14		93 ± 0	97 ± 0	99 ± 1	98 ± 3	M	M
CSM17		111 ± 1	101 ± 11	110 ± 2	122 ± 1	NA	M
PBM1		127 ± 4	106 ± 1	109 ± 1	86 ± 4	M	M
PBM2		109 ± 1	107 ± 1	122 ± 1	102 ± 16	M	M
PBM3		109 ± 1	102 ± 3	114 ± 3	78 ± 8	M	M

PBM5		140 ± 0	105 ± 1	107 ± 4	79 ± 1	M	W (11 ± 2)
PBM8		134 ± 6	109 ± 2	101 ± 3	118 ± 14	NA	M
PBM9		112 ± 2	107 ± 3	110 ± 4	90 ± 10	M	M
PBM11		124 ± 1	105 ± 4	107 ± 4	150 ± 5	M	P (33 ± 3)
PBM12		99 ± 1	99 ± 2	109 ± 7	127 ± 10	NA	P (36 ± 3)
PBM14		94 ± 2	30 ± 3	98 ± 4	154 ± 1	P (33 ± 7)	F (91 ± 1)
LAM3		117 ± 8	118 ± 3	114 ± 0	101 ± 5	F(69 ± 0)	F (86 ± 2)
LAM7		88 ± 4	107 ± 5	106 ± 2	153 ± 3	F (140 ± 17)	F (92 ± 5)
LAM8		114 ± 4	103 ± 3	101 ± 1	117 ± 11	W (14 ± 3)	P (51 ± 6)
LAM9		93 ± 2	100 ± 6	98 ± 3	64 ± 1	M (5 ± 4)	W (14 ± 3)
RSM3		54 ± 1	88 ± 1	89 ± 1	72 ± 7	W (31 ± 2)	P (61 ± 2)
RSM5 RLE3		92 ± 3	99 ± 3	99 ± 3	131 ± 3	M (5 ± 1)	W (26 ± 0)
RSM6 RAM3		55 ± 1	89 ± 2	97 ± 2	86 ± 4	M	P (60 ± 12)

RSM7		62 ± 3	86 ± 4	103 ± 3	106 ± 2	W (14 ± 0)	F (94 ± 6)
RSM8		103 ± 1	106 ± 2	100 ± 3	66 ± 7	W (27 ± 9)	P (57 ± 8)
RSM9 RLE6		102 ± 1	98 ± 3	106 ± 5	92 ± 5	M	P (34 ± 11)
RSM11		109 ± 3	103 ± 5	90 ± 1	154 ± 2	M	W (20 ± 0)
RLE1		98 ± 5	97 ± 0	96 ± 1	134 ± 2	M	F (69 ± 15)
RLE2		66 ± 1	86 ± 4	101 ± 3	105 ± 1	M	W (13 ± 0)
RLE4		75 ± 3	98 ± 2	95 ± 5	104 ± 4	M	W (14 ± 2)
RLE5		85 ± 1	97 ± 2	102 ± 3	102 ± 11	M	P (36 ± 7)
RAM1		118 ± 2	113 ±	108 ± 3	79 ± 3	M	M

RAM2		115 ± 1	88 ± 3	96 ± 1	73 ± 3	M	M
RAM4		102 ± 4	93 ± 1	96 ± 3	76 ± 2	M	M

Οι 57 συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν, όπως και οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, σε δύο κυτταρικές σειρές (MC3T3–E1 και RAW264.7) ως προς την πιθανή οστεοπροστατευτική τους ικανότητα και σε δύο κυτταρικές σειρές ως προς την οιστρογόνο δράσης τους (Ishikawa και MCF-7). Τα αποτελέσματα όλων των βιολογικών ελέγχων παρουσιάζονται στον πίνακα 188.

Στην κυτταρική σειρά Ishikawa, τρεις ενώσεις εκδήλωσαν σημαντική οιστρογονικότητα (μερικό ή ισχυρό αγωνισμό) και πιο συγκεκριμένα μία (**SC49**) χαρακτηρίστηκε μερικός αγωνιστής και δύο (**SC1**, **SC27**) ισχυροί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων, ενώ οκτώ ενώσεις (**SC3**, **SC5**, **SC7**, **SC9**, **SC26**, **SC33**, **SC37**, **SC42**) παρουσίασαν μικρή οιστρογονικότητα. Στην κυτταρική σειρά MCF-7, σημαντική οιστρογονικότητα εκδήλωσαν πέντε ενώσεις και αναλυτικότερα δύο (**SC33**, **SC42**) αναδείχθηκαν ως μερικοί αγωνιστές και τρεις (**SC1**, **SC27**, **SC49**) ως ισχυροί αγωνιστές των οιστρογονοϋποδοχέων. Επιπλέον, 18 συνθετικά παράγωγα (**SC2**, **SC3**, **SC4**, **SC7**, **SC9**, **SC14**, **SC15**, **SC17**, **SC19**, **SC21**, **SC25**, **SC26**, **SC37**, **SC41**, **SC45**, **SC47**, **SC51** και **SC52**) παρουσίασαν ασθενή αγωνισμό ως προς την οιστραδιόλη 0.1 nM. Σημειώνεται πως και οι 11 ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν από κάποια οιστρογόνο δράση στα κύτταρα Ishikawa, σημείωσαν δραστικότητα και στην κυτταρική σειρά MCF-7.

Στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 και στη συγκέντρωση 10 μM, 36 ενώσεις (64% επί του συνόλου) σημείωσαν επαγωγή της έκφρασης της AlkP συγκρινόμενες με τους διαφοροποιητικούς παράγοντες, με τις 20 εξ αυτών (34% επί του συνόλου) να εμφανίζουν δραστικότητα μεγαλύτερη ή/και ίση με εκείνη της οιστραδιόλης. Στη συγκέντρωση 1 μM 33 συνθετικά παράγωγα (59% επί του συνόλου) σημείωσαν δραστικότητα μεγαλύτερη των Δ.Π. και 8 ενώσεις είχαν δραστικότητα μεγαλύτερη ή/και ίση με εκείνη της E_2. Τέλος, στη συγκέντρωση 0.1 μM, 33 ενώσεις (59% επί του συνόλου) κρίθηκαν ικανές να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, με 3 εξ αυτών να έχουν δραστικότητα καλύτερη ή ίση με την οιστραδιόλη. Επίσης, σημειώνεται ότι από τις 36 δραστικές συνθετικές ενώσεις σε συγκέντρωση 10 μM στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, οι δύο χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογόνο δράση στην

κυτταρική σειρά Ishikawa και τρεις στην κυτταρική σειρά MCF-7. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως από τις 57 συνθετικές ενώσεις που αξιολογήθηκαν, οι 48 (86% επί του συνόλου) προήγαγαν τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1, σε μία ή/και περισσότερες από τις συγκεντρώσεις ελέγχου, και μεταξύ αυτών μόλις οι τρεις χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων στα κύτταρα Ishikawa και οι πέντε στα κύτταρα MCF-7.

Στην κυτταρική σειρά RAW264.7 και σε συγκέντρωση 10 μM, 38 συνθετικές ενώσεις (68% επί του συνόλου) σημείωσαν καταστολή της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης, εννέα ενώσεις σημείωσαν καταστολή μεγαλύτερη της οιστραδιόλης (31%) και έξι καταστολή μεγαλύτερη από εκείνη της ραλοξιφαίνης 10 μM (38%). Να σημειωθεί ότι από τις 38 ενώσεις που κατέστειλαν την οστεοκλαστογένεση, οι δύο χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa και τρεις στην κυτταρική σειρά MCF-7.

Στους πλέον αξιόλογους οστεοπροστατευτικούς παράγοντες θα μπορούσαν να ενταχθούν εκείνοι που συνδυάζουν την προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και την καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Στη συγκέντρωση 10 μM, 20 συνθετικές ενώσεις (36% επί του συνόλου) σημείωσαν την επιθυμητή δραστικότητα, τόσο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, όσο και στα κύτταρα RAW264.7. Σημειώνεται πως το 57% των δραστικών ενώσεων σε συγκέντρωση 10 μM στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 εμφάνισαν και κατασταλτική επίδραση στην οστεοκλαστογένεση, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην κυτταρική σειρά RAW264.7 ήταν 52% επί των δραστικών ενώσεων. Λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα των οιστρογονικών ελέγχων, μόλις ένα συνθετικό παράγωγο από τα προαναφερόμενα σημείωσε σημαντική οιστρογόνο δράση στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7.

❖ Από την κατηγορία των **δεοξυβενζοϊνών,** 10 ενώσεις σημείωσαν την επιθυμητή δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η 2,4,4'-τριυδροξυβενζοΐνη (**SC1**) αύξησε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 15%, ενώ κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση επίσης κατά 15%. Ο έλεγχος της οιστρογόνου δράσης στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7 αποκάλυψε πως πρόκειται για ισχυρό αγωνιστή των υποδοχέων οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ο πιο πιθανός μηχανισμός της οστεοπροστατευτικής δράσης της είναι η σύνδεσή της με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Ο *in silico* έλεγχος έχει προβλέψει την αγωνιστική της δράση έναντι του υποδοχέα οιστρογόνου ERα (Cao, *et al.*, 2013) ενισχύοντας την υπόθεσή μας. Ανάλογη δραστικότητα εκδήλωσαν και οι ενώσεις **SC2** και **SC5**. Στο συνθετικό ανάλογο **SC2** έχει αποδοθεί αγωνιστική δράση στο σκελετικό ιστό, αυξάνοντας την οστεοβλαστική δραστηριότητα και ανταγωνιστική δράση έναντι του υποδοχέα ERβ, καθιστώντας το ικανό SERM παράγοντα (Papoutsi, *et al.*, 2007). Οι δεοξυβενζοΐνες **SC4** και **SC8** προήγαγαν κατά 11% και 15% αντίστοιχα την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ενώ κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση (27%), χωρίς να σημειώνουν οιστρογόνο δράση. Μέχρι σήμερα δεν είχε αξιολογηθεί η οστεοπροστατευτική τους επίδραση, ενώ το γεγονός πως το συνθετικό ανάλογο **SC4** χαρακτηρίζεται ως ικανός

αντιοξειδωτικός παράγοντας (Lu, *et al.*, 2010) θα μπορούσε να συνδεθεί με την προστατευτική του δράση έναντι της οστεοπόρωσης. Αυξημένη ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης των MC3T3-E1, μεγαλύτερη εκείνης της οιστραδιόλης 10 nM, εκδήλωσαν οι δεοξυβενζοΐνες **SC7**, **SC9** και **SC11** (31%, 26% και 39%, αντίστοιχα) καταστέλλοντας επίσης την οστεοκλαστογένεση κατά 17%, 15% και 11%, αντίστοιχα. Μεταξύ αυτών, μόνο τα αλογονωμένα παράγωγα **SC7** και **SC9** σημείωσαν ασθενή οιστρογόνο δράση και στις δύο μελετώμενες κυτταρικές σειρές. Το μονοπρενυλιωμένο παράγωγο **SC12** δεν εξέφρασε οιστρογονικότητα, ενώ προήγαγε την οστεοβλαστογένεση και κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση κατά 14% και 16%, αντίστοιχα. Το διπρενυλοφθοροπαράγωγο **SC15** αύξησε σημαντικά τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 κατά 43% στην συγκέντρωση 10 μM, διατηρώντας τη δραστικότητά του και στις μικρότερες συγκεντρώσεις, κατέστειλε τη διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7 και χαρακτηρίστηκε από μικρή οιστρογονικότητα στα κύτταρα MCF-7. Μέχρι σήμερα κανένα από τα προαναφερόεμνα ανάλογα δεν είχε αξιολογηθεί στους συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους, ενώ η συνθετική παρασκευή των αναλόγων **SC12** και **SC15** συναντάται για πρώτη φορά.

❖ Από τα **ισοφλαβονοειδή** μόνο τα πρενυλιωμένα ανάλογα **SC29** και **SC30** συνδύασαν την επιθυμητή δράση στις κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Χαρακτηρίστηκαν ικανοί επαγωγείς της έκφρασης AklP στα κύτταρα MC3T3-E1, με δράση μεγαλύτερη από την οιστραδιόλη (42% και 55%, αντίστοιχα), κατέστειλαν την οστεοκλαστογένεση κατά 6% και 8% αντίστοιχα και στερήθηκαν οιστρογόνου δράσης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Όπως παρατηρείται από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η πλειοψηφία των ισοφλαβονών επέδειξαν υψηλή ικανότητα προαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, με την υποκατάσταση των πρενυλομάδων να φαίνεται σημαντική στην εκδήλωση της δραστικότητας. Η συνθετική παρασκευή των προαναφερόμενων πρενυλιωμένων ισοφλαβονών περιγράφεται για πρώτη φορά.

❖ Οι **χαλκόνες SC36** και **SC37** αποδείχτηκαν ικανότεροι καταστολείς της οστεοκλαστογένεσης (10% και 30%, αντίστοιχα), παρά επαγωγείς της οστεοβλαστογένεσης (6% και 14%, αντίστοιχα). Η χαλκόνη **SC37** σημείωσε την υψηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με την **SC36** και χαρακτηρίστηκε από ασθενή οιστρογόνο δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίσης, το διαρυλοπροπανικό της ανάλογο **SC41** εμφάνισε ελαφρώς μεγαλύτερη επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (18%), πολύ μικρή καταστολή της οστεοκλαστογένεσης (1%), ενώ στα κύτταρα MCF-7 χαρακτηρίζεται ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων. Τα εν λόγω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από βιβλιογραφικές αναφορές, στις οποίες οι χαλκόνες συνδέονται με την εκδήλωση οστεοπροστασίας (Adhikari, 2008) (Kwang, *et al.*, 2013) (Ortolan, *et al.*, 2014) (Park, *et al.,* 2008).

❖ Από την ομάδα των **2,3-διφαινυλ-προπενικών οξέων ή στιλβενικών οξέων,** πέντε ανάλογα προήγαγαν τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 και κατέστειλαν εκείνη των RAW264.7, ενώ όλες οι ενώσεις της κατηγορίας ουσιαστικά στερούταν οιστρογόνου δράσης και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Αξίζει να επισημανθεί πως τα ανάλογα **SC51**, **SC52** και

SC55 κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση σε ποσοστά 27%, 39% και 24%, αντίστοιχα, ενώ εξίσου σημαντική καταστολή της οστεοκλαστογένεσης (28%) εκδήλωσε και το διυδροστιλβενικό οξύ **SC61**. Η συγκεκριμένη κατηγορία αναλόγων εξετάζεται πρώτη φορά ως προς τις οστεοπροστατευτικές της ιδιότητες.

Από το σύνολο των 57 ενώσεων που συντέθηκαν, 16 σημείωσαν δραστικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ δεν επηρέασαν ή προήγαγαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Αναλυτικότερα:

- Από την κατηγορία των **δεοξυβενζοϊνών,** το 3'-βρωμο- ανάλογο **SC10** αύξησε σημαντικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά 50% και δεν παρουσίασε οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7). Αντίστοιχη δραστικότητα παρουσίασε το μονοπρενυλιωμένο φθόρο- ανάλογο **SC14**, το οποίο σημείωσε σημαντική αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, ενώ εκδήλωσε ασθενή οιστρογονικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά MCF-7. Στην περίπτωση των πρενυλιωμένων παραγώγων **SC16** και **SC17** της 4'-χλωροδεοξυβενζοϊνης, παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές έκφρασης της AlkP (148% και 137%, αντίστοιχα), ενώ μεταξύ των δύο μόνο το διπρενυλιωμένο παράγωγο **SC17** χαρακτηρίστηκε ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η συνθετική παρασκευή των ενώσεων **SC14** έως **SC17** περιγράφεται για πρώτη φορά.
- Από τα συνθετικά παράγωγα των **διυδροστιλβενίων,** το 2'-χλωροδιυδροστιλβένιο (**SC23**) σημείωσε επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1 κατά 22%, ενώ δεν εμφάνισε οιστρογόνο δράση σε καμία κυτταρική σειρά ελέγχου.
- Από την ομάδα των **ισοφλαβονών**, η γενιστεΐνη (**SC27**) παρουσίασε 46% επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και χαρακτηρίστηκε από υψηλή οιστρογονικότητα στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Το διμεθοξυ- ανάλογό της **SC25** ήταν λιγότερο δραστικό σημειώνοντας έκφραση της AlkP 133% και ασθενή οιστρογονικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα πρενυλιωμένα ισοφλαβονικά παράγωγα **SC31** και **SC33** χαρακτηρίστηκαν ως οι ισχυρότεροι διαφοροποιητικοί παράγοντες στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, σημειώνοντας την υψηλότερη τιμή επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης κατά 99% και 189%, αντίστοιχα. Η εισαγωγή πρενυλίων στις συγκεκριμένες ισοφλαβόνες φάνηκε να δρα ενισχυτικά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, γεγονός που παρατηρήθηκε και σε άλλες χημικές κατηγορίες της παρούσας διατριβής, αλλά και συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα (Zhai, *et al.*, 2018). Μεταξύ των πρενυλιωμένων ισοφλαβονονών δεν παρατηρήθηκε οιστρογόνος δράση και μόνο το παράγωγο **SC33** σημείωσε ασθενή οιστρογόνο δράση στα κύτταρα Ishikawa και μερικό αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7. Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία, η συνθετική παρασκευή των προαναφερόμενων ενώσεων δεν έχει περιγραφεί.
- Από τα διαρυλοπροπάνια, η ένωση **SC40** σημείωσε επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα MC3T3-E1, αλλά και της οστεοκλαστογένεσης στα

κύτταρα RAW264.7, μη ασκώντας ουσιαστικά οιστρογονική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7).

❖ Από τα τέσσερα παράγωγα **στιλβενικών οξέων** (**SC43** έως **SC46**), τα οποία προκάλεσαν επαγωγή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης, την μεγαλύτερη επαγωγική ικανότητα στα κύτταρα MC3T3-E1 επέδειξαν οι ενώσεις **SC44** και **SC45** αυξάνοντας τη διαφοροποίηση κατά 17%. Επιπλέον, από τις προαναφερόμενες τέσσερις ενώσεις, μόνο η ένωση **SC45** εμφάνισε μικρή οιστρογονικότητα και χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τέλος, τα ανηγμένα παράγωγα **SC59** και **SC60**, τα οποία προήλθαν από τα **SC45** και **SC44**, παρουσίασαν αντίστοιχη συμπεριφορά, μιας και προήγαγαν μόνο την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κατά περίπου 10%, χωρίς να συνοδεύονται από εκδήλωση οιστρογόνου δράσης.

Στην κυτταρική σειρά RAW264.7 δεκαεννέα ανάλογα εκδήλωσαν δραστικότητα μόνο στην εν λόγω κυτταρική σειρά στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ δεν επηρέασαν ή κατέστειλαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.

❖ Από τα **δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα,** τρία σημείωσαν την επιθυμητή δράση μόνο στα κύτταρα RAW264.7, αλλά όχι στην κυτταρική σειρά των οστεοβλαστών. Την υψηλότερη δραστικότητα σημείωσε η πολυυδροξυλιωμένη 5-χρωροδεοξυβενζοϊνη **SC6** καταστέλλοντας την έκφραση της TRAP κατά 72%, ενώ δεν προκάλεσε επαγωγή της οστεοβλαστογένεσης στη συγκέντρωση 10 μM και στερήθηκε οιστρογονικότητας στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Η δεοξυβενζοϊνη **SC3** σημείωσε μικρότερη καταστολή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης (12%) και χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Τέλος, ισχυρός κατασταλτικός παράγοντας στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης, με μηδαμινή οιστρογόνο δράση, χαρακτηρίστηκε το διπρενυλομεθοξυ-παράγωγο **SC13** μειώνοντας κατά 50% την έκφραση της TRAP. Αξίζει όμως να σημειωθεί, πως και οι τρεις προαναφερόμενες ενώσεις, όταν αξιολογήθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση στα κύτταρα MC3T3-E1, αποδείχτηκαν ικανές να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών κατά περίπου 10%, μολονότι στην υψηλή συγκέντρωση δρούσαν κατασταλτικά στη διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης.

❖ Από την ομάδα των **διυδροστιλβενίων,** τρεις ενώσεις (**SC19**, **SC20** και **SC21**) κατέστειλαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, ενώ έδρασαν κατασταλτικά και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Μεταξύ αυτών, η ένωση **SC20** εκδήλωσε την υψηλότερη δραστικότητα με 46% καταστολή και παρουσίασε μηδαμινή οιστρογόνο δράση. Το διυδροστιλβένιο **SC21** σημείωσε 32% καταστολή της οστεοκλαστογένεσης και χαρακτηρίστηκε ασθενής αγωνιστής στα κύτταρα MCF-7. Μικρότερη κατασταλτική ικανότητα σημείωσε η ένωση **SC19,** μειώνοντας την ενεργότητα της TRAP κατά 22% και σημειώνοντας ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7. Μολονότι η ικανότητα των διυδροστιλβενίων και διαρυλοπροπανίων να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση δεν είχε αξιολογηθεί συστηματικά μέχρι σήμερα, στη

διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την αντιφλεγμονώδη ικανότητά τους (Jang, *et al.*, 2016) που πιθανώς να συνεισφέρει στην εκδήλωση της οστεοπροστατευτικής δράσης τους.

❖ Η τριμεθοξυ- **ισοφλαβόνη SC24** κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση κατά 34% εκδηλώνοντας μηδαμινή οιστρογόνο δράση, ενώ η μονομεθοξυ- **ισοφλαβόνη SC26** σημείωσε λίγο μικρότερη κατασταλτική επίδραση (27%) και χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7).

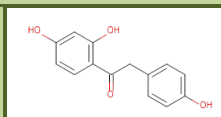
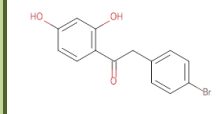
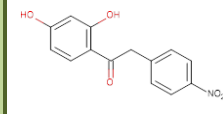
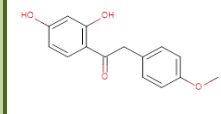
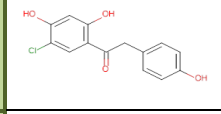
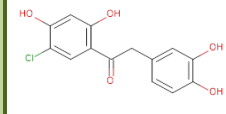
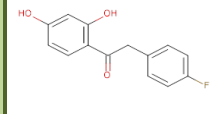
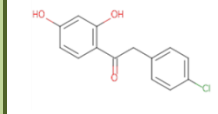
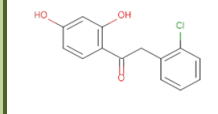
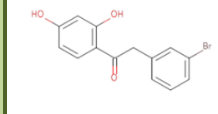
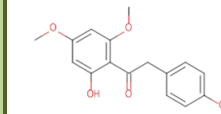
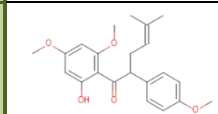
❖ Η **χαλκόνη SC38** σημείωσε 12% καταστολή της έκφρασης της TRAP και στερήθηκε οιστρογόνου δράσης. Μολονότι στη συγκέντρωση 10 μM κατέστειλε τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, στις μικρότερες συγκεντρώσεις εκδήλωσε την επιθυμητή δραστικότητα επάγοντας την έκφραση της AlkP. Τέλος, η χαλκόνη **SC35** στην συγκέντρωση των 10 μM παρουσίασε τοξικότητα τόσο στην κυτταρική σειρά των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7, όσο και στα κύτταρα MC3T3-E1.

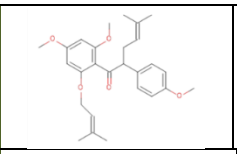
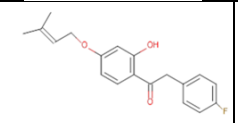
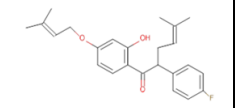
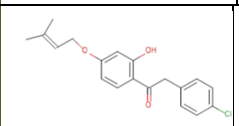
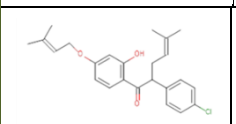
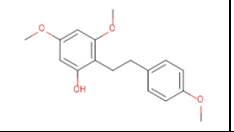
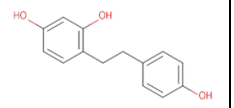
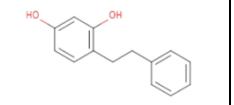
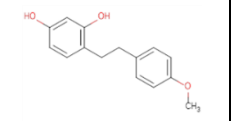
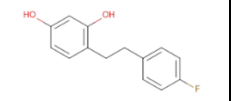
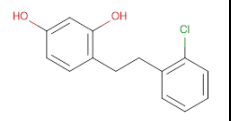
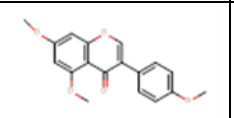
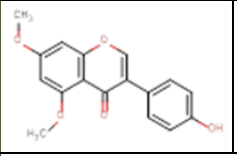
❖ Τα **διαρυλοπροπάνια SC42** και **SC39**, τα οποία προέκυψαν από τις χαλκόνες **SC38** και **SC35**, σημείωσαν μικρότερη ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης μειώνοντας την έκφραση της TRAP κατά 20% και 40% αντίστοιχα. Και οι δύο ενώσεις στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 κατέστειλαν τη διαφοροποίηση όταν χορηγήθηκαν σε συγκέντρωση 10 μM, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες. Επιπλέον, το διαρυλοπροπάνιο **SC42** εκδήλωσε μικρή οιστρογονικότητα στην κυτταρική σειρά Ishikawa και μέτρια στα κύτταρα MCF-7, ενώ η ένωση **SC39** στερήθηκε οιστρογονικότητας.

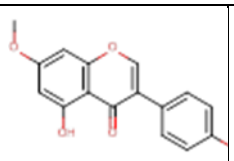
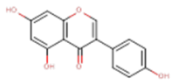
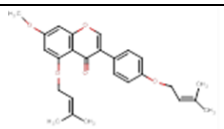
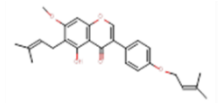
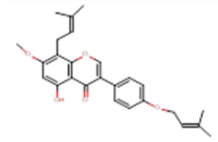
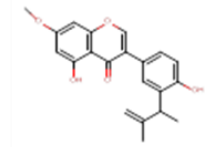
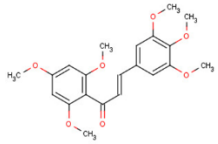
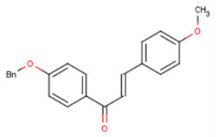
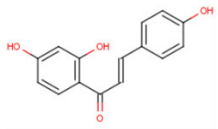
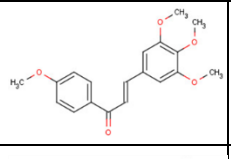
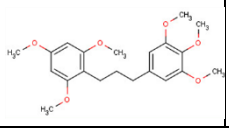
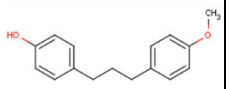
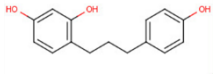
❖ Από τα δύο **κουμαρινικά παράγωγα** που συντέθηκαν, 10% καταστολή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης παρουσίασε η κουμαρίνη **SC49** και επιπλέον χαρακτηρίστηκε από σημαντική οιστρογόνο δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Η κουμαρίνη **SC53** σημείωσε μικρότερη καταστολή της έκφρασης της TRAP της τάξης του 7%, ενώ δεν παρουσίασε οιστρογονικότητα.

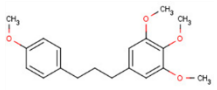
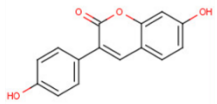
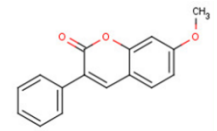
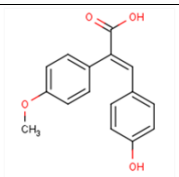
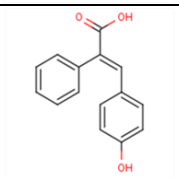
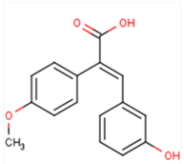
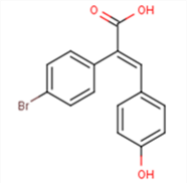
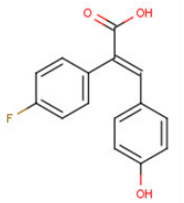
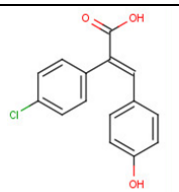
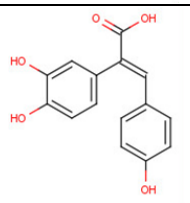
❖ Τέλος, από τα τέσσερα **2,3-διφαινυλ-προπανικά οξέα ή διυδροστιλβενικά οξέα** (**SC48**, **SC50**, **SC54**, **SC56**) που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, ισχυρότερη καταστολή της διαφοροποίησης των κυττάρων RAW264.7 σε οστεοκλάστες παρουσίασαν τα **SC56** (36%) και **SC48** (11%, ενώ κανένα από αυτά δεν συνοδεύτηκε από οιστρογόνο δράση.

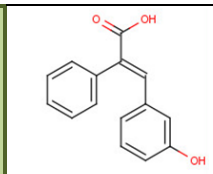
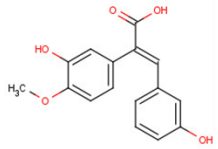
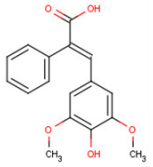
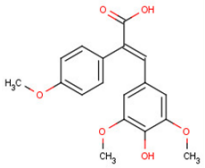
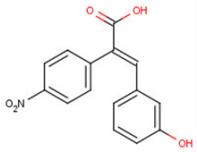
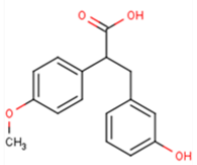
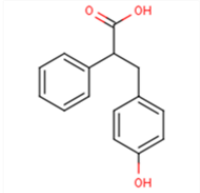
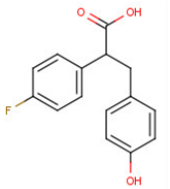
Πίνακας 188: Συνοπτικός πίνακας της δραστικότητας όλων των συνθετικών αναλόγων στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

			Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.) MC3T3-E1			Ενεργότητα TRAP (% C+Δ.Π.) RAW264.7	Αγωνισμός (% of E_2 1 nM) ISHIKAWA	Αγωνισμός (% of E_2 0.1 nM) MCF-7
ΚΩΔΙΚΟΣ		**ΔΟΜΗ**	**10 μM**	**1 μM**	**0.1 μM**	**10 μM**	**1 μM**	**1 μM**
ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	**SC1**		115 ± 0	113 ± 2	107 ± 0	85 ± 4	F (74 ± 5)	F (90 ± 2)
	SC2		118 ± 1	117 ± 3	108 ± 2	81 ± 4	M	W (16 ± 1)
	SC3		89 ± 1	112 ± 1	112 ± 1	89 ± 1	W (23 ± 2)	W (24 ± 3)
	SC4		112 ± 1	107 ± 2	114 ± 3	72 ± 4	M	M
	SC5		113 ± 3	110 ± 4	115 ± 2	83 ± 3	W (13 ± 4)	W (27 ± 4)
	SC6		94 ± 2	116 ± 0	112 ± 0	28 ± 3	M	M
	SC7		131 ± 6	110 ± 1	113 ± 5	83 ± 6	W (13 ± 1)	W (22 ± 3)
	SC8		115 ± 4	95 ± 1	96 ± 0	71 ± 6	M	M
	SC9		126 ± 2	96 ± 2	94 ± 1	85 ± 3	W (27 ± 7)	W (19 ± 3)
	SC10		150 ± 3	110 ± 4	96 ± 3	120 ± 15	M	M
	SC11		139 ± 0	103 ± 5	99 ± 1	89 ± 4	M	M
	SC12		114 ± 4	98 ± 7	94 ± 11	84 ± 7	NA	M

	SC13		34 ± 0	111 ± 1	101 ± 2	49 ± 2	M	M
	SC14		157 ± 5	98 ± 6	99 ± 4	118 ± 5	NA	W (10 ± 3)
	SC15		143 ± 1	121 ± 7	103 ± 5	92 ± 0	NA	W (27 ± 3)
	SC16		148 ± 2	107 ± 4	93 ± 6	133 ± 0	NA	NA
	SC17		137 ± 4	102 ± 4	109 ± 8	173 ± 0	NA	W (16 ± 2)
ΔΙΥΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΑ	SC18		90 ± 6	99 ± 3	98 ± 2	106 ± 5	M	M
	SC19		79 ± 2	86 ± 2	95 ± 0	78 ± 1	M	W (22 ± 3)
	SC20		67 ± 3	95 ± 3	97 ± 6	54 ± 3	M	M
	SC21		94 ± 3	101 ± 2	108 ± 4	67 ± 1	M	W (10 ± 4)
	SC22		97 ± 4	100 ± 1	93 ± 5	128 ± 13	M	M
	SC23		122 ± 5	102 ± 3	104 ± 6	121 ± 11	M	M
ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΙΚΑ	SC24		64 ± 6	93 ± 6	93 ± 5	66 ± 5	M	M
	SC25		133 ± 4	110 ± 9	102 ± 5	132 ± 6	M	W (16 ± 7)

	SC26		45 ± 5	90 ± 0	92 ± 3	73 ± 4	W (26 ± 6)	W (30 ± 5)
	SC27		146 ± 9	116 ± 7	106 ± 8	160 ± 14	F (76 ± 4)	F (83 ± 2)
	SC29		142 ± 6	109 ± 1	108 ± 4	94 ± 1	M	M
	SC30		155 ± 5	110 ± 1	107 ± 4	92 ± 1	M	M
	SC31		199 ± 7	110 ± 4	105 ± 4	113 ± 6	M	NA
	SC33		289 ± 11	120 ± 5	102 ± 5	130 ± 4	W (9 ± 1)	P (39 ± 11)
ΧΑΛΚΟΝΕΣ	**SC35**		10 ± 1	78 ± 1	99 ± 0	4 ± 1	M	M
	SC36		106 ± 1	109 ± 5	112 ± 3	90 ± 4	NA	M
	SC37		114 ± 1	116 ± 2	107 ± 3	69 ± 3	W (9 ± 4)	W (23 ± 1)
	SC38		48 ± 0	146 ± 8	116 ± 7	88 ± 8	NA	NA
ΔΙΑΡΥΛΟΠΡΟΠΑΝΙΑ	**SC39**		56 ± 17	95 ± 1	117 ± 3	61 ± 6	M	NA
	SC40		105 ± 6	104 ± 4	104 ± 6	124 ± 23	M	M
	SC41		118 ± 9	100 ± 1	94 ± 2	99 ± 7	M	W (26 ± 1)

	SC42		71 ± 6	116 ± 5	101 ± 6	82 ± 9	W (13 ± 4)	P (53 ± 1)
ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ	SC49		35 ± 3	52 ± 8	93 ± 2	89 ± 3	P (45 ± 6)	F (77 ± 4)
	SC53		79 ± 4	103 ± 3	106 ± 0	94 ± 5	NA	M
ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΣΤΙΛΒΕΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	SC43		111 ± 4	94 ± 10	95 ± 1	125 ± 5	NA	NA
	SC44		117 ± 4	96 ± 6	85 ± 4	108 ± 1	NA	M
	SC45		117 ± 9	86 ± 8	86 ± 8	217 ± 16	M	W (25 ± 7)
	SC46		108 ± 9	92 ± 4	97 ± 6	210 ± 8	NA	NA
	SC47		112 ± 0	82 ± 4	96 ± 2	96 ± 4	M	W (12 ± 1)
	SC48		87 ± 4	103 ± 1	106 ± 1	89 ± 1	M	M
	SC50		93 ± 5	90 ± 4	109 ± 2	98 ± 5	M	M

	SC51		107 ± 2	107 ± 1	111 ± 0	73 ± 3	M	W (10 ± 4)
	SC52		108 ± 2	113 ± 3	107 ± 2	61 ± 4	M	W (13 ± 2)
	SC54		87 ± 1	92 ± 1	102 ± 2	93 ± 0	M	M
	SC55		105 ± 4	108 ± 3	115 ± 2	76 ± 9	M	M
	SC56		85 ± 4	102 ± 4	102 ± 7	64 ± 3	M	M
	SC59		110 ± 6	96 ± 6	79 ± 6	181 ± 15	NA	NA
	SC60		113 ± 2	91 ± 8	94 ± 3	160 ± 1	NA	NA
	SC61		102 ± 2	109 ± 3	103 ± 2	72 ± 6	M	M

7 *In vivo* αξιολόγηση σε μοντέλο αρουραίων

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν δύο εκχυλίσματα για την αξιολόγηση της οστεοπροστατευτικής τους δράσης σε πειραματικό πρότυπο θηλυκών ωοθηκεκτομημένων επίμυων. Αναλυτικότερα, αξιολογήθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Glycyrrhiza glabra* καθώς και οι κονιοποιημένοι καρποί του είδους *Ceratonia siliqua* (χαρουπάλευρο), στο πόσιμο νερό και την τροφή των πειραματοζώων, αντίστοιχα.

Όπως περιγράφεται στην παρούσα εργασία, τα εκχυλίσματα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* έδειξαν επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Λαμβάνοντας υπ' όψιν και αποτελέσματα προηγούμενων μελετών μας αναφορικά με την οστεοπροστατευτική δράση των περιεχόμενων μεταβολιτών τους (κυρίως φλαβάνια, κουμαρίνες και λιγνάνια), επιλέξαμε το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* της οικογένειας Leguminosae για την *in vivo* αξιολόγησή του σε μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων.

Το επόμενο φυτό που επιλέξαμε ήταν οι καρποί του φυτού *Ceratonia siliqua,* τα γνωστά χαρούπια. Όλα τα μελετώμενα εκχυλίσματα του φυτού *Ceratonia siliqua,* καθώς και οι απομονωμένοι μεταβολίτες του που αξιολογήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, ενώ στην πλειοψηφία τους δεν χαρακτηρίστηκαν από οιστρογόνο δράση. Βασιζόμενοι στα προαναφερόμενα αποτελέσματα, επιλέξαμε το χαρουπάλευρο (καρποί της *Ceratonia siliqua*) με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής οστεοπροστατευτικής του δράσης στο προαναφερόμενο οστεοπορωτικό μοντέλο επίμυων. Τα χαρούπια περιέχουν σάκχαρα και θρεπτικές ουσίες και χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα στη διατροφή του ανθρώπου, ενώ οι αλεσμένοι καρποί αποτελούν εξαιρετική τροφή για πολλά οικόσιτα θηλαστικά ζώα. Χρησιμοποιούνται επίσης σε ποικίλα προϊόντα ατομικής υγιεινής και περιποίησης, τόσο ως πρωτεύον, όσο και ως δευτερεύον συστατικό, καθώς επίσης και στην παρασκευή εδώδιμου χαρουπάλευρου, με χαμηλά ποσοστά γλουτένης.

7.1 *Glycyrrhiza glabra*

7.1.1 Παρασκευή εκχυλίσματος

Προκειμένου να χορηγηθεί το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* στα πειραματόζωα για διάστημα έξι μηνών, κρίθηκε απαραίτητη η παρασκευή του σε μεγάλη κλίμακα. Για το σκοπό αυτό οι κονιοποιημένες ρίζες του φυτού εκχυλίστηκαν με μεθανόλη χρησιμοποιώντας υπερήχους. Αναλυτικότερα, σε 500 g δρόγης προστέθηκε μεθανόλη και ακολούθησε εκχύλιση, χωρίς θέρμανση σε υδατόλουτρο υπερήχων και σε τρεις κύκλους των 30 λεπτών ο καθένας. Στη συνέχεια το παραγόμενο εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού υπό κενό και ακολούθησε ζύγιση του τελικού ξηρού εκχυλίσματος (απόδοση ~12%).

Με σκοπό τη χορήγηση του εκχυλίσματος στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων, το ξηρό μεθανολικό εκχύλισμα διαλύθηκε σε πόσιμο νερό σε συγκέντρωση 2 mg/ml. Σκοπός μας ήταν να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση χορήγησης 200 mg / kg / ημέρα, δεδομένου ότι οι επίμυες καταναλώνουν περίπου 30 ml νερού την ημέρα.

Αναλυτικότερα, το εκχύλισμα της *Glycyrrhiza glabra* χορηγήθηκε στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων της ομάδας OVX+GG, αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή και δύο φορές ημερησίως πραγματοποιούνταν ανακίνηση του περιέκτη για αποφυγή δημιουργίας ιζήματος. Η κατανάλωση του υδατικού εκχυλίσματος και του νερού των ομάδων ελέγχου, καταγράφονταν δύο φορές την εβδομάδα και πραγματοποιούνταν ανασύσταση εκχυλίσματος και νερού στους αντίστοιχους περιέκτες. Από την καταγραφή επιβεβαιώθηκε ότι ο μέσος όρος κατανάλωσης εκχυλίσματος και νερού ήταν πράγματι περίπου 30 ml / ζώο /ημέρα και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των ομάδων, τόσο στην κατανάλωση νερού, όσο και τροφής. Ο μέσος όρος πρόσληψης εκχυλίσματος μέσω του πόσιμου νερού μετά τις καταγραφές, προσδιορίστηκε σε 200 mg / kg / ημέρα, όπως αρχικά είχε υπολογιστεί.

7.1.2 Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας (BMD) των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας συσκευή απορροφησιομετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ (Dual Energy X-ray Absorptiometry/DEXA) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην § 1.5.1.1.

❖ **Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας**

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν στην κνήμη των πειραματοζώων αμέσως πριν την ωοθηκεκτομή, καθώς και τον 3ο και 6ο μήνα του πειράματος με τη χρήση συσκευής απορροφησιομετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ (DEXA). Οι τιμές υπολογίστηκαν σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό (g/cm^2) και παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης ανέδειξαν σημαντική αύξηση στην ομάδα ελέγχου (Control), τόσο στους τρεις όσο και στους έξι μήνες σε σχέση με την αρχική μέτρηση, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο στην ομάδα OVX διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας στους τρεις, αλλά και στους έξι μήνες μετά την ωοθηκεκτομή. Η ομάδα πειραματοζώων που λάμβανε το εκχύλισμα της Γλυκύρριζας (OVX+GG) παρουσίασε αύξηση της οστικής πυκνότητας στους τρεις πρώτους μήνες αντίστοιχη με την ομάδα ελέγχου, η οποία ναι μεν δεν διατηρήθηκε μέχρι την λήξη του πειράματος, αλλά παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με την αρχική μέτρηση (Πίνακας 189). Η προαναφερόμενη παρατήρηση υποδεικνύει την οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος και οδηγεί στο συμπέρασμα πως η χορήγηση της Γλυκύρριζας προκαλεί μια ταχεία αύξηση της οστικής πυκνότητας τους τρεις

πρώτους μήνες και είναι ικανή να διατηρήσει την οστική πυκνότητα σε φυσιολογικά επίπεδα μέχρι τη λήξη του πειράματος.

Πίνακας 189: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * p<0.05 σε σχέση με το Control.

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης (g/cm²)				
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**	**6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**
Control	10	0.204 ± 0.01	0.215 ± 0.01	0.228 ± 0.015
OVX	10	0.225 ± 0.015	0.204 ± 0.007	0.195 ± 0.009 *
OVX + GG	10	0.209 ± 0.013	0.215 ± 0.016	0.206 ± 0.017 *

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης, δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές σε σύγκριση με τις μετρήσεις σε όλη την κνήμη. Και σε αυτή την περίπτωση, η ομάδα Control σημείωσε σταθερή αύξηση της οστικής πυκνότητας τόσο στους τρεις, όσο και στους έξι μήνες, ενώ στην ομάδα OVX διαπιστώθηκε σημαντική απώλεια οστικής μάζα και στις δύο μετρήσεις (0.332 g/cm^2 και 0.293 g/cm^2 αντίστοιχα) σε σχέση με την αρχική (0.407 g/cm^2). Ουσιαστικά η ομάδα OVX έχασε περίπου το 30% της οστικής της μάζας στην περιοχή του σπογγώδους οστού, με την λήξη του πειράματος. Αντίθετα, η ομάδα πειραματοζώων στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα (OVX+GG) παρουσίασε αύξηση της οστικής της πυκνότητας στους τρεις μήνες, αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου και διατήρησε την οστική της μάζα σε φυσιολογικά επίπεδα μέχρι την λήξη του πειράματος (Πίνακας 190). Συγκρίνοντας τις τιμές οστικής πυκνότητας μεταξύ των ομάδων OVX+GG και OVX τον 3^ο και 6^ο μήνα, διαπιστώνουμε στατιστικά σημαντική διαφορά και στις δύο περιπτώσεις, γεγονός που αναδεικνύει την σημαντική οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος, κυρίως στο σπογγώδες τμήμα του οστού.

Πίνακας 190: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * p<0.05 σε σχέση με το Control, $^+$ p<0.05 σε σχέση με το OVX

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης (g/cm²)				
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**	**6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**
Control	10	0.390 ± 0.025	0.410 ± 0.019	0.427 ± 0.025
OVX	10	0.407 ± 0.02	0.332 ± 0.019 *	0.293 ± 0.011 *
OVX + GG	10	0.394 ± 0.035	0.406 ± 0.073 $^+$	0.390 ± 0.082 $^+$

❖ **Ποσοστιαίες αλλαγές της οστικής πυκνότητας**

Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, οι απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας που προέκυψαν με τη μέθοδο DEXA, μετατράπηκαν σε ποσοστιαίες μεταβολές, μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η σύγκριση των ποσοστιαίων αλλαγών της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης, μεταξύ των ωοθηκεκτομημένων επίμυων (OVX) και εκείνων της ομάδας ελέγχου (Control) ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας της ομάδας OVX στους τρεις και έξι μήνες (-8.9% έναντι 5.3% και -13% έναντι 11.6% αντίστοιχα), όπως ήταν αναμενόμενο. Κατά την σύγκριση των ομάδων OVX+GG και OVX παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην οστική πυκνότητα κυρίως στους τρεις (3,.3% έναντι -8.9%, p<0,0005), αλλά και στους έξι μήνες (-0.8% έναντι -13.0%, p<0.05), γεγονός που υποδεικνύει την οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος στην κνήμη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στην περίπτωση του σπογγώδους οστού της εγγύς μετάφυσης της κνήμης, τα αποτελέσματα ήταν ακόμη πιο ενθαρρυντικά, καθώς η ομάδα OVX+GG χαρακτηρίστηκε από στατιστικά σημαντική διαφορά, συγκρινόμενη με εκείνη που δεν λάμβανε το εκχύλισμα (OVX), τόσο στους τρεις μήνες (2.6% έναντι -18.4%, p<0.005), όσο και κατά την λήξη του πειράματος (-0.8% έναντι -27.9%, p<0.0005). Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας τόσο ολόκληρης της κνήμης, όσο και του σπογγώδους οστού μεταξύ της ομάδας που λάμβανε το εκχύλισμα και της ομάδας ελέγχου (Control) και στις δύο μετρήσεις του πειράματος.

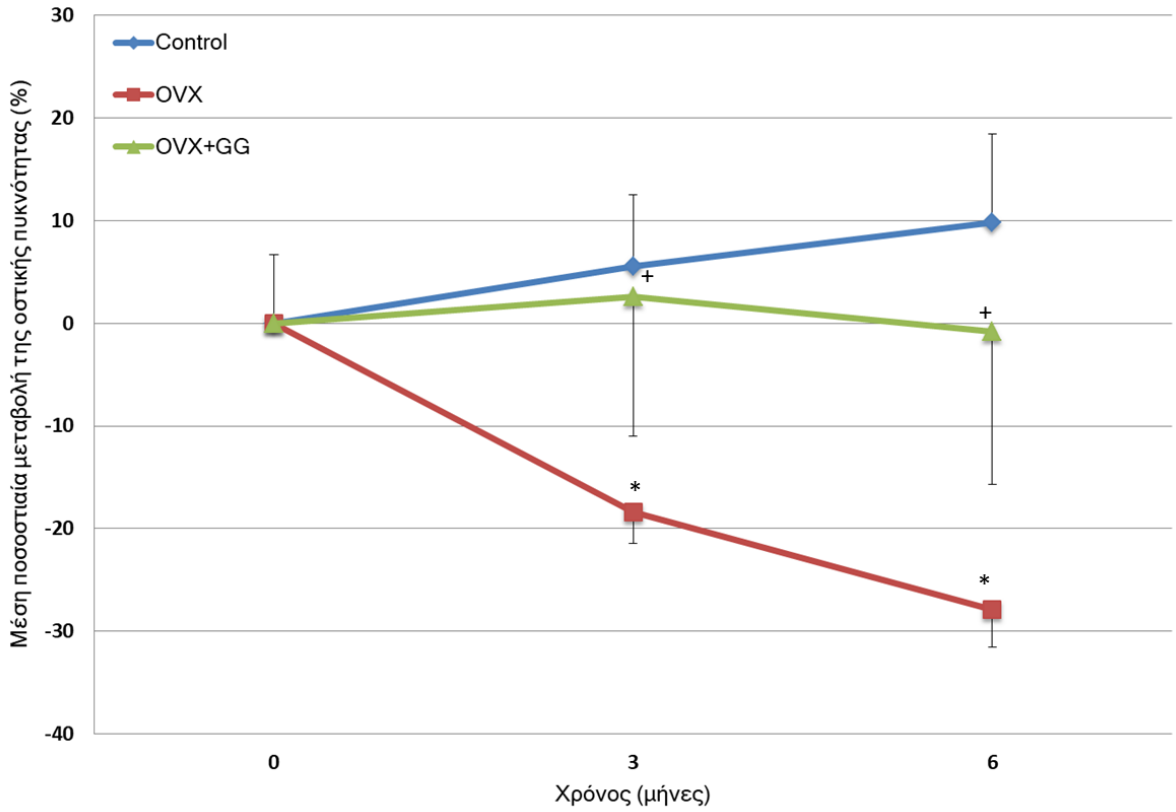
Πίνακας 191: Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας (%)					
		CONTROL	**OVX**	**OVX + GG**	**Τιμή p μεταξύ των ομάδων**
Πυκνότητα κνήμης	**0-3 μήνες**	5.31 ± 4.75	-8.87 ± 3.80	**3.30 ± 6.31**	0.003
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		5.58 ± 6.92	-18.42 ± 3.05	**2.61 ± 13.62**	<0.0005
Πυκνότητα κνήμης	**0-6 μήνες**	11.59 ± 9.12	-13.03 ± 5.11	**-0.84 ± 7.63**	<0.0005
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		9.84 ± 8.63	-27.86 ± 3.69	**-0.81 ± 14.85**	<0.0005

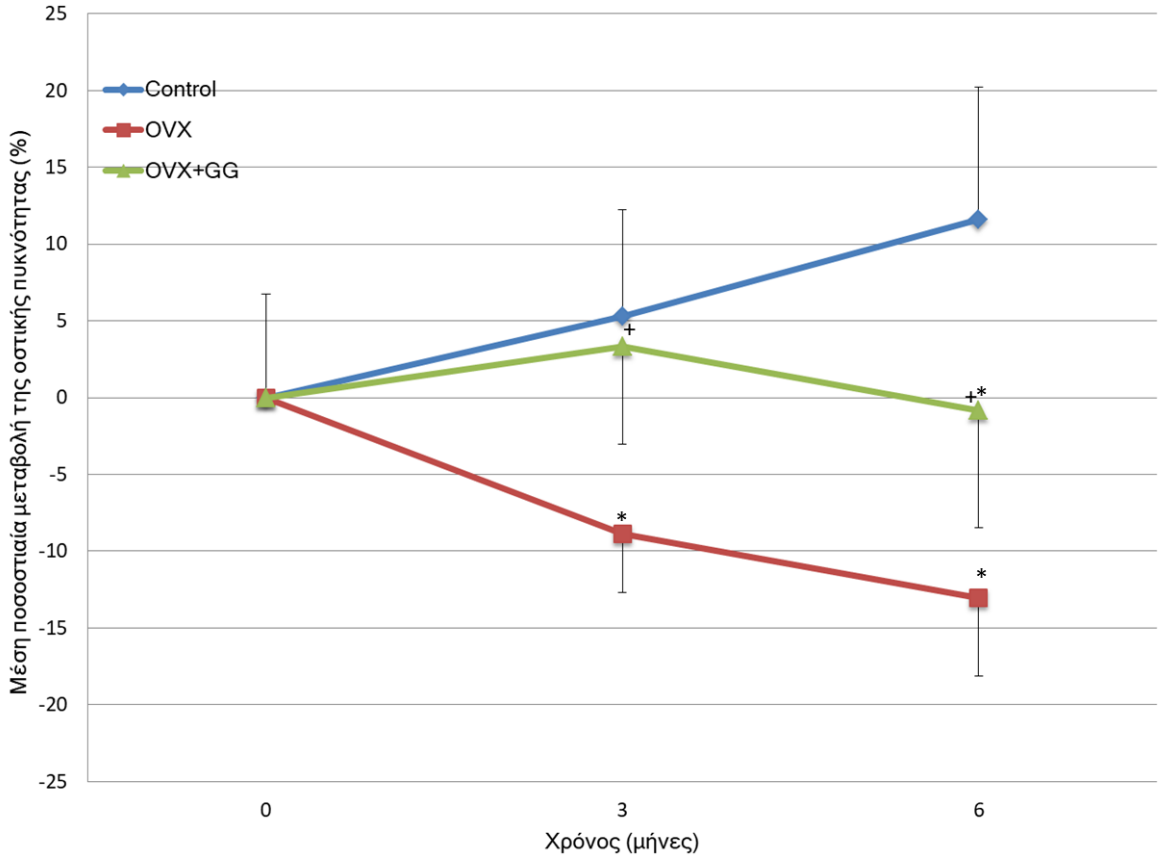
Πίνακας 192: Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών της οστικής πυκνότητας.

Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών DEXA				
		CONTROL vs OVX	CONTROL vs *Glycyrrhiza*	OVX vs *Glycyrrhiza*
Πυκνότητα κνήμης	0-3 μήνες	<0.0005	1.000	<0.0005
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		<0.0005	1.000	<0.0005
Πυκνότητα κνήμης	0-6 μήνες	<0.0005	0.116	<0.0005
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		<0.0005	0.006	0.004

Οι ποσοστιαίες μεταβολές που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA, τόσο στο σύνολο της κνήμης, όσο και στην εγγύς μετάφυση της κνήμης παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Εικόνα 192: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της οστικής πυκνότητας της εγγύς μετάφυσης της κνήμης: * $p<0.05$ σε σχέση με το Control και $^{+}p<0.005$ σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.



Εικόνα 193: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: * $p<0.05$ σε σχέση με το Control και $^{+}p<0.005$ σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Συνοψίζοντας, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην οστική πυκνότητα τόσο όλης της κνήμης, όσο και του σπογγώδους τμήματός της, μεταξύ της ομάδας ελέγχου (Control) και εκείνης των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων που λάμβαναν το εκχύλισμα (OVX+GG) καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+GG σε όλη την κνήμη κυρίως στους πρώτους τρεις μήνες του πειράματος, η οποία στο σπογγώδες τμήμα του οστού διατηρήθηκε μέχρι την λήξη του πειράματος.

Συμπερασματικά, η χορήγηση του εκχυλίσματος της Γλυκύρριζας ήταν ικανή όχι μόνο να αντισταθμίσει τη μείωση της οστικής απώλειας που προκλήθηκε από την ωοθηκεκτομή στους επίμυες, αλλά και να διατηρήσει την οστική μάζα σε φυσιολογικά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο, οι μετρήσεις στην άπω μετάφυση της κνήμης ανέδειξαν την ικανότητα του εκχυλίσματος να ασκεί την οστεοπροστατευτική του δράση κυρίως στο σπογγώδες τμήμα του οστού.

7.1.3 Σωματικά βάρη- Βάρη οργάνων

❖ **Μέτρηση σωματικών βαρών**

Κατά την διάρκεια του *in vivo* πειράματος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση νερού και εκχυλίσματος μεταξύ των τριών ομάδων και δεν διαπιστώθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια στους επίμυες που λάμβαναν το εκχύλισμα. Κατά την έναρξη του πειράματος τα πειραματόζωα μοιράστηκαν τυχαία σε ομάδες και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα σωματικά βάρη μεταξύ τους. Η σύγκριση των σωματικών βαρών στους τρεις και έξι μήνες του πειράματος έδειξε μικρές διαφορές τόσο εντός της κάθε ομάδας, όσο και μεταξύ των ομάδων. Αναλυτικότερα, η ομάδα ελέγχου είχε μια μικρή αύξηση στο σωματικό βάρος της κατά την τρίμηνη και εξάμηνη μέτρηση (10% και 13% αντίστοιχα) σε σχέση με την αρχική, η οποία στην ομάδα των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων ήταν λίγο μεγαλύτερη, της τάξης του 13% και 21% αντίστοιχα. Όσον αφορά την ομάδα πειραματοζώων που λάμβανε το εκχύλισμα, διαπιστώθηκε αύξηση του βάρους τους κατά 17.5% στους τρεις μήνες, η οποία και διατηρήθηκε μέχρι την λήξη του πειράματος, μη ακολουθώντας την τάση της ομάδας που δεν λάμβανε το εκχύλισμα (πίνακας 193).

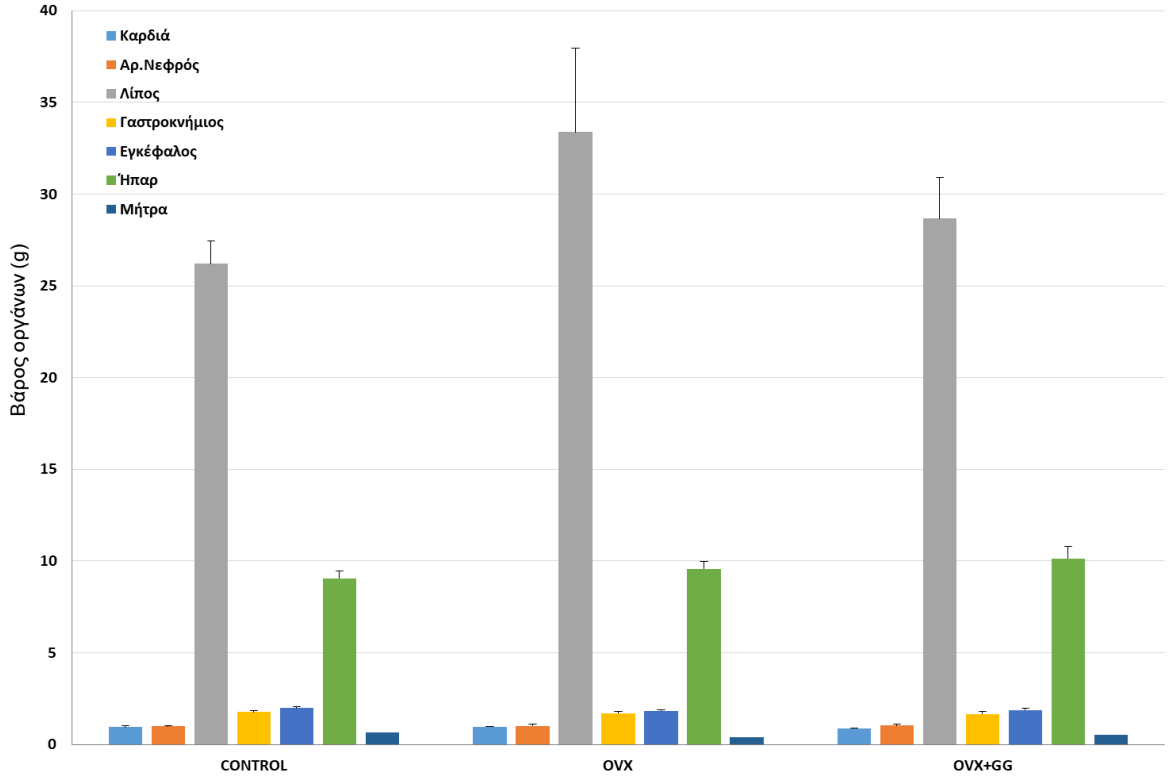
Πίνακας 193: Σωματικά βάρη των επίμυων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας, στην έναρξη του πειράματος καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Σωματικά βάρη						
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**Τρίμηνη μέτρηση**	**Εξάμηνη μέτρηση**	**% μεταβολή 0-3 μήνες**	**% μεταβολή 0-6 μήνες**
CONTROL	10	299.4 ± 24.0	329.8 ± 43.4	338.4 ± 36.3	9.8 ± 7.2	13.0 ± 7.1
OVX	10	315.9 ± 37.1	356.8 ± 55.0	383.4 ± 62.2	12.6 ± 7.6	20.9 ± 9.1
OVX + GG	10	308.9 ± 25.4	361.4 ± 27.0	362.5 ± 28.0	17.5 ± 11.3	17.8 ± 10.0

❖ **Μέτρηση βάρους οργάνων πειραματοζώων**

Κατά την νεκροψία δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στα πειραματόζωα όλων των ομάδων. Μετά την ευθανασία ακολούθησε συλλογή και ζύγιση συγκεκριμένων οργάνων από τα πειραματόζωα όλων των ομάδων (καρδιά, αριστερό νεφρό, εγκέφαλος, γαστροκνήμιος μυς, ήπαρ, ενδοκοιλιακό λίπος και μήτρα). Η σύγκριση του βάρους όλων των οργάνων δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, ενώ μόνο το βάρος της μήτρας φάνηκε να μειώνεται στατιστικώς σημαντικά στα ωοθηκεκτομηθέντα ζώα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0.37 ± 0.07g έναντι 0.63 ± 0.04g αντίστοιχα). Όσον αφορά την ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX + GG), το βάρος της μήτρας ήταν μικρότερο συγκρινόμενο με την ομάδα ελέγχου (0.53 ± 0.07g έναντι 0.63 ± 0.04g αντίστοιχα) και μεγαλύτερο από την ομάδα που δεν λάμβανε το εκχύλισμα (0.53 ± 0.07g έναντι 0.37 ± 0.07g αντίστοιχα), αλλά χωρίς εικόνα υπερτροφίας. Από το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμπεραίνουμε ότι το εκχύλισμα ασκεί κάποια δράση στον ιστό της μήτρας, γεγονός αναμενόμενο, μιας και οι ρίζες της γλυκύρριζας είναι γνωστό ότι περιέχουν

αρκετές φυτοοιστρογόνες ουσίες. Στην εικόνα 194 αποτυπώνονται συγκριτικά σε μορφή ραβδογράμματος τα βάρη των οργάνων για κάθε ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 194: Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του αριστερού νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λίπους και της μήτρας των πειραματοζώων που ελήφθησαν κατά την νεκροψία. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, *p<0.05 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, $^{+}$p<0.05 σε σχέση με την ομάδα OVX

7.2 Χαρούπι (καρποί του είδους *Ceratonia siliqua*)

7.2.1 Παρασκευή τροφής

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, λόγω αδυναμίας διάλυσης του παρασκευάσματος στο πόσιμο νερό, τα πειραματόζωα έλαβαν το χαρούπι μέσω της τροφής τους. Έτσι, προσαρμόζοντας την ημερήσια κατανάλωση του ανθρώπου σε εκείνη του αρουραίου (αναφορά για άνθρωπο, τύπο για ζώο) καταλήξαμε στην χορήγηση 900 mg χαρουπιού/αρουραίο/ημέρα (3.08 gr/kg/ημέρα). Συνυπολογίζοντας πως το κάθε ζώο (10 συνολικά) τρέφεται με περίπου 20 gr ανά ημέρα, παρασκευάστηκαν 40 kg ζωοτροφής για την ολοκλήρωση του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, αλέστηκαν 38.2 kg ζωοτροφής στερούμενης φυτοοιστρογόνων, στο μίγμα ενσωματώθηκαν 1800 gr χαρουπιού με χρήση κατάλληλου αναμικτήρα και τελικά με τη χρήση ειδικής μηχανής σύμπηξης, η τροφή μετατράπηκε στην αρχική της μορφή (pellets). Η εμπλουτισμένη με χαρούπι ζωοτροφή χορηγήθηκε στα πειραματόζωα της ομάδας OVX+CHA αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή και η κατανάλωση τόσο τροφή, όσο και νερού καταγράφονταν δύο φορές την εβδομάδα. Ο μέσος όρος κατανάλωσης τροφής ήταν πράγματι περίπου 20 gr / ζώο /ημέρα και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των ομάδων, τόσο στην κατανάλωση νερού, όσο και τροφής.

7.2.2 Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας (BMD) των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο απορροφησιομετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ (Dual Energy X-ray Absorptiometry/DEXA) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην § 1.5.1.1.

- **Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας**

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας της κνήμης των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκαν αμέσως πριν την ωοθηκεκτομή, τον 3ο και τον 6ο μήνα του πειράματος με τη χρήση συσκευής απορροφησιομετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-Χ (DEXA). Οι τιμές υπολογίστηκαν σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό (g/cm^2) και παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Από τα αποτελέσματα για την οστική πυκνότητα όλης της κνήμης (πίνακας 194) διαπιστώθηκε μια μικρή αύξηση στους τρεις μήνες για την ομάδα ελέγχου (Control), η οποία και διατηρήθηκε μέχρι την λήξη του πειράματος. Αντίθετα, όπως ήταν αναμενόμενο, στην ομάδα των ωοθηκεκτομημένων επίμυων (OVX) παρατηρήθηκε μείωση της οστικής πυκνότητας στους τρεις (0.220 g/cm^2) και στους έξι μήνες (0.205 g/cm^2) σε σχέση με την αρχική (0.248 g/cm^2). Μείωση της οστικής πυκνότητας διαπιστώθηκε και στην ομάδα των πειραματοζώων που λάμβανε το χαρούπι (OVX+CHA), στους τρεις (0.236 g/cm^2) και στους έξι μήνες (0.226 g/cm^2) σε σχέση με την αρχική (0.251 g/cm^2), αλλά δεν ήταν τόσο μεγάλη συγκρινόμενη με την ομάδας OVX.

Πίνακας 194: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης (g/cm^2)				
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**	**6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**
Control	10	0.243 ± 0.012	0.256 ± 0.011	0.256 ± 0.011
OVX	10	0.248 ± 0.010	0.220 ± 0.012	0.205 ± 0.007
OVX + CHAR	10	0.251 ± 0.020	0.236 ± 0.014	0.226 ± 0.010

Πίνακας 195: Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης (g/cm^2)				
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**	**6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή**
Control	10	0.412 ± 0.020	0.419 ± 0.021	0.425 ± 0.027
OVX	10	0.405 ± 0.024	0.290 ± 0.026	0.256 ± 0.021
OVX + CHAR	10	0.414 ± 0.019	0.367 ± 0.019	0.354 ± 0.017

Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα που αφορούν το σπογγώδες οστό (πίνακας 195), αλλά σε αυτή την περίπτωση η απώλεια οστικής μάζας ήταν πολύ μεγαλύτερη στην ομάδα OVX, ενώ η ομάδα που λάμβανε το χαρούπι φάνηκε να αντισταθμίζει μερικώς την προαναφερόμενη απώλεια.

❖ Ποσοστιαίες αλλαγές της οστικής πυκνότητας

Όπως και στην περίπτωση του εκχυλίσματος της Γλυκύρριζας, έτσι και στο Χαρούπι, οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας μετατράπηκαν σε ποσοστιαίες μεταβολές μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ποσοστιαίων αλλαγών όλης της κνήμης ανέδειξαν σημαντικές διαφορές σχεδόν μεταξύ όλων των ομάδων. Αναλυτικότερα, η σύγκριση της ομάδας OVX+CHA με την ομάδα CONTROL, ανέδειξε την στατιστικά σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας τόσο στους τρεις (-6.1% έναντι 1.6%), όσο και στους έξι μήνες (-8.1% έναντι 2.1%). Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως η επίδραση του χαρουπιού δεν ήταν αρκετά αποτελεσματική, ώστε να αντισταθμίσει την προκαλούμενη από την ωοθηκεκτομή οστική απώλεια. Παρόλα ταύτα, η ύπαρξη μιας μικρής διαφοράς στην τρίμηνης σε σχέση με την αρχική μέτρηση μεταξύ των ομάδων OVX+CHA και OVX (-6.1% έναντι -10.9%), η οποία έγινε στατιστικώς σημαντική στους έξι μήνες του πειράματος (-8.1% έναντι -15.7%) αναδεικνύει την οστεοπροστατευτική ικανότητα του χαρουπιού.

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα των μετρήσεων στο σπογγώδες οστό της εγγύς μετάφυσης της κνήμης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων και στις δύο μετρήσεις. Όσον αφορά την σύγκριση μεταξύ

των ομάδων OVX+CHA και OVX, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο στους τρεις (-14.0% έναντι -26.3%), όσο και στους έξι μήνες (-21.3% έναντι -35.4%), οδηγώντας μας στη διαπίστωση πως το χαρούπι επιδρά κυρίως σπογγώδες οστό.

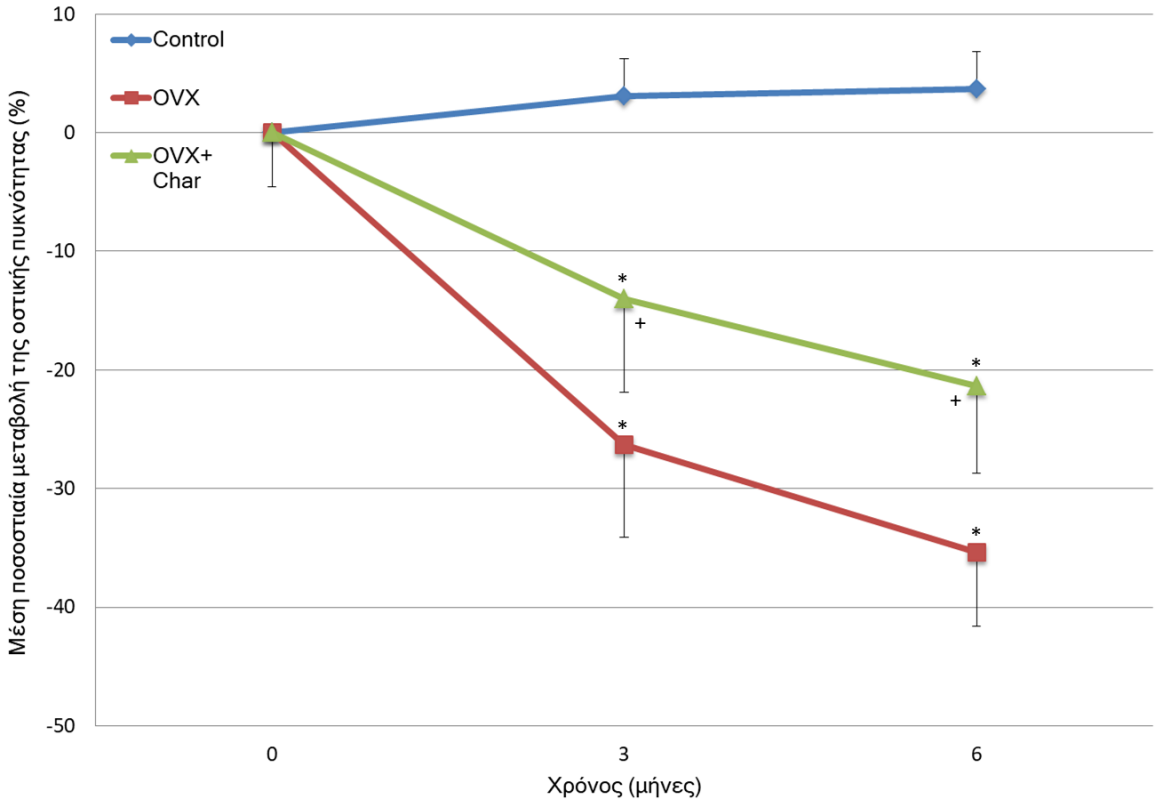
Πίνακας 196: Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής

Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας (%)				
		CONTROL	OVX	OVX + CHAR
Πυκνότητα κνήμης	0-3 μήνες	1.61±2.99	-10.93±6.62	**-6.11±6.61**
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		3.06±3.14	-26.29±7.81	**-14.02±7.85**
Πυκνότητα κνήμης	0-6 μήνες	2.11±3.87	-15.71±7.74	**-8.7±6.26**
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		3.67±3.18	-35.42±6.20	**-21.33±7.35**

Πίνακας 197: Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών της οστικής πυκνότητας.

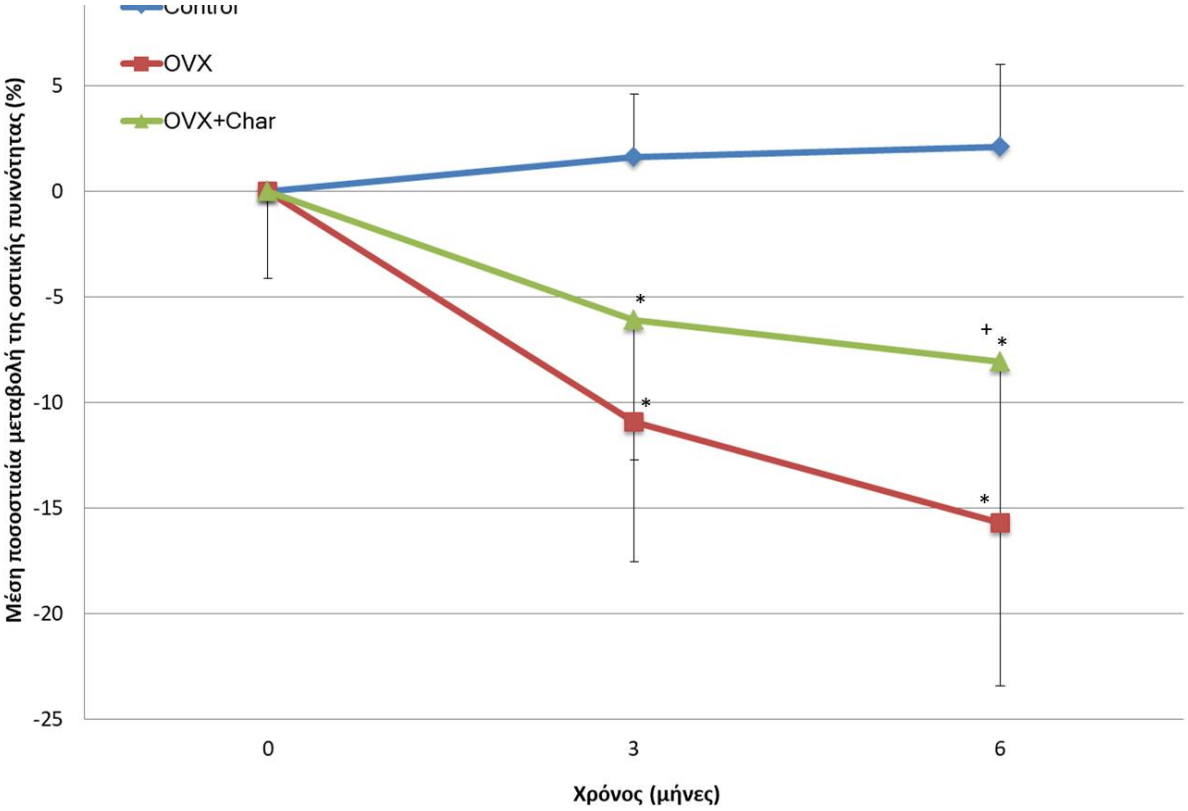
Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών DEXA				
		CONTROL vs OVX	CONTROL vs OVX+CHAR	OVX vs OVX+CHAR
Πυκνότητα κνήμης	0-3 μήνες	<0.0005	0.015	0.309
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		<0.0005	<0.0005	0.001
Πυκνότητα κνήμης	0-6 μήνες	<0.0005	0.003	0.030
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης		<0.0005	<0.0005	<0.0005

Συμπερασματικά, η χορήγηση χαρουπιού αν και δεν ήταν ικανή να αντισταθμίσει πλήρως την προκαλούμενη από την ωοθηκεκτομή οστική απώλεια, κατάφερε να την μειώσει σε σχέση με την ομάδα που δεν λάμβανε καμία παρέμβαση, κυρίως στους έξι μήνες χορήγησης και δρώντας ικανοποιητικότερα στο σπογγώδες τμήμα του οστού.



Εικόνα 195: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της οστικής πυκνότητας της εγγύς μετάφυσης της κνήμης: * p<0.05 σε σχέση με το Control και +p<0.005 σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Εικόνα 196: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής. * p<0.05 σε σχέση με το Control και +p<0.05 σε σχέση με το OVX. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.



7.2.3 Σωματικά βάρη- Βάρη οργάνων

❖ **Μέτρηση σωματικών βαρών**

Όπως και στην περίπτωση της γλυκύρριζας, έτσι και στο πείραμα στο οποίο χορηγήθηκε χαρούπι, γινόταν καταμέτρηση της κατανάλωσης νερού και τροφής καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση νερού και τροφής μεταξύ των τριών ομάδων και δεν διαπιστώθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια στους επίμυες που λάμβαναν το χαρούπι. Κατά την έναρξη του πειράματος τα πειραματόζωα μοιράστηκαν τυχαία σε ομάδες και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα σωματικά τους βάρη.

Η σύγκριση των σωματικών βαρών στους τρεις και έξι μήνες του πειράματος έδειξε μικρές διαφορές τόσο εντός της κάθε ομάδας, όσο και μεταξύ των ομάδων. Αναλυτικότερα, η ομάδα ελέγχου είχε μια μικρή αύξηση στο σωματικό βάρος της κατά την τρίμηνη μέτρηση (4%), η οποία όμως ήταν μεγαλύτερη στους έξι μήνες (13%) σε σχέση με την αρχική. Η αύξηση του σωματικού βάρους ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων τόσο στους τρεις (26%), όσο και στους έξι μήνες (34%) συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά την ομάδα πειραματοζώων που λάμβανε το χαρούπι ενσωματωμένο στην τροφή τους, διαπιστώθηκε αύξηση του βάρους τους κατά 26% στους τρεις μήνες και κατά 32% με τη λήξη του πειράματος, λίγο μικρότερη συγκρινόμενη με την ομάδα που δεν λάμβανε χαρούπι (πίνακας 198).

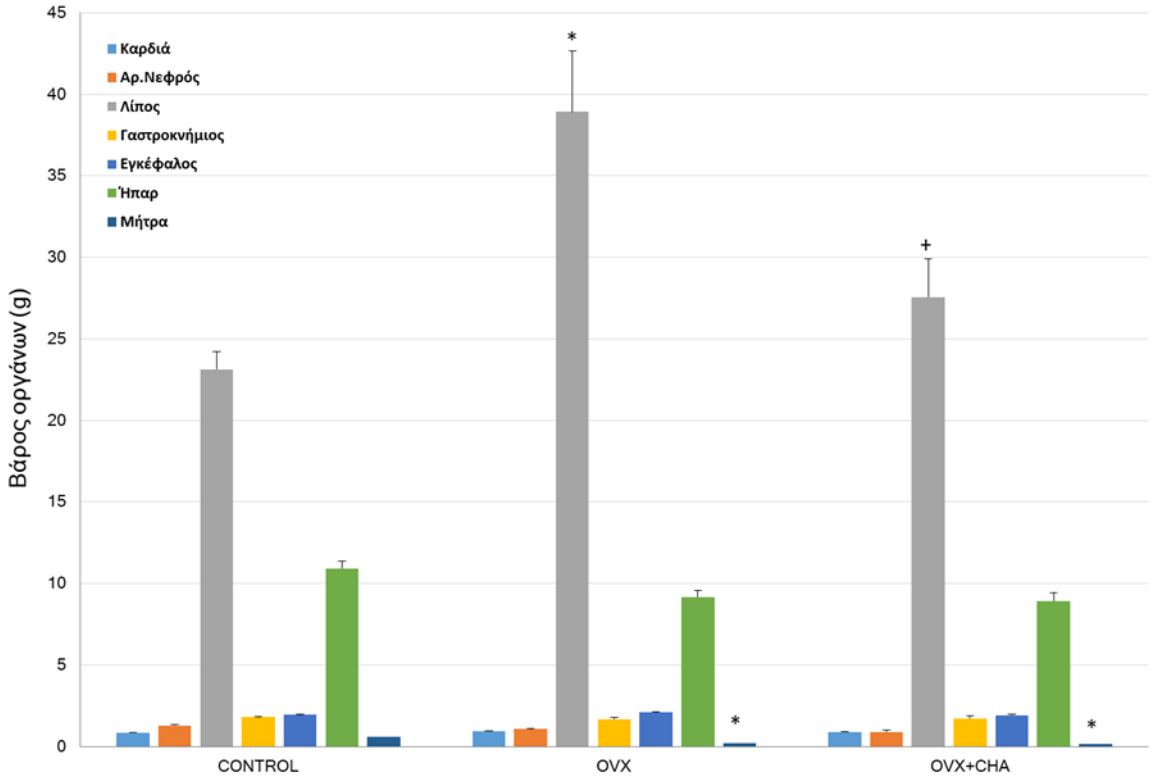
Πίνακας 198: Σωματικά βάρη των επίμυων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής

Σωματικά βάρη						
ΟΜΑΔΕΣ	**No**	**Αρχική μέτρηση**	**Τρίμηνη μέτρηση**	**Εξάμηνη μέτρηση**	**% μεταβολή 0-3 μήνες**	**% μεταβολή 0-6 μήνες**
CONTROL	10	292.5±6.8	304.0±9.0	352.9±9.0	3.8±3.3	20.8±6.6
OVX	10	300.6±10.2	380.8±19.1	406.5±18.1	26.3±9.3	34.5±13.5
OVX + CHAR	10	286.4±9.1	360.5±11.3	380.0±1.30	26.0±5.8	32.8±8.7

❖ **Μέτρηση βάρους οργάνων**

Κατά την νεκροψία δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στα πειραματόζωα όλων των ομάδων και ακολούθησε συλλογή και ζύγιση συγκεκριμένων οργάνων από όλα τα πειραματόζωα (καρδιά, αριστερό νεφρό, εγκέφαλος, γαστροκνήμιος μυς, ήπαρ, ενδοκοιλιακό λίπος και μήτρα). Η σύγκριση του βάρους των περισσοτέρων οργάνων δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, εκτός από τις περιπτώσεις της μήτρας και του ενδοκοιλιακού λίπους. Αναλυτικότερα, όσον αφορά το βάρος της μήτρας, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην ομάδα OVX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0.20 ± 0.02g έναντι 0.57 ± 0.03g), η οποία ήταν ακόμη μεγαλύτερη στην περίπτωση των πειραματοζώων που λάμβαναν το χαρούπι

(0.12±0.01g έναντι 0.57±0.03g). Επιπλέον, κατά την νεκροψία οι μήτρες των ομάδων OVX και OVX + Char ήταν εμφανώς ατροφικές, επιβεβαιώνοντας την μη δραστικότητα του χαρουπιού στον ιστό της μήτρας και οδηγώντας μας στη διαπίστωση της προφυλακτικής δράσης του χαρουπιού έναντι υπερπλασίας της μήτρας και κατ' επέκταση πιθανής καρκινογένεσης. Όσον αφορά στο βάρος του ενδοκοιλιακού λίπους των πειραματοζώων, στην ομάδα των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (38.91 ± 3.55g έναντι 23.14±1.04g), η οποία όμως δεν παρατηρήθηκε στα πειραματόζωα που λάμβαναν το χαρούπι. Αντίθετα, το ενδοκοιλιακό λίπος της ομάδας που λάμβανε το χαρούπι ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα και μειωμένο στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την ομάδα OVX (27.56±2.36g έναντι 38.91±3.55g). Η τελευταία παρατήρηση αναδεικνύει την ικανότητα του χαρουπιού να προφυλάσσει τα πειραματόζωα από την προκαλούμενη λόγω ωοθηκεκτομής, αύξηση του λίπους και κατ' επέκταση από τις επακόλουθες ανεπιθύμητες συνέπειες. Στην εικόνα 197 αποτυπώνονται συγκριτικά σε μορφή ραβδογράμματος τα βάρη των οργάνων για κάθε ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 197: Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του αριστερού νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λίπους και της μήτρας των πειραματοζώων που ελήφθησαν κατά την νεκροψία. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, *$p<0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, $^{+}p<0.05$ σε σχέση με την ομάδα OVX

8 Αξιολόγηση των συνθετικών ενώσεων στη διαδικασία της μελανογένεσης

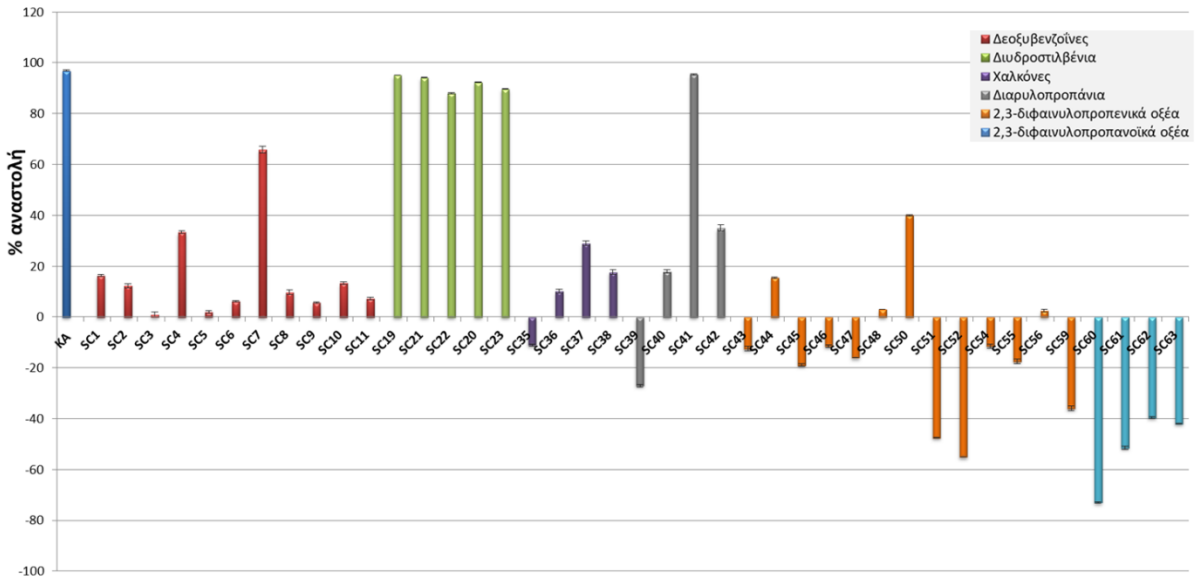
Όπως προαναφέρθηκε (§ 1.2.1), η πτώση των επιπέδων οιστρογόνων που σημειώνεται την περίοδο της εμμηνόπαυσης διαταράσσει την παραγωγή της μελανίνης, με συνέπεια την εμφάνιση καφέ κηλίδων (πανάδες ή σημάδια γήρατος) σε σημεία του δέρματος (πρόσωπο, λαιμός, χέρια, μπράτσα και στήθος) που έχουν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία επί σειρά ετών. Σε δεύτερο επίπεδο λοιπόν, διερευνήθηκε ο διττός ρόλος των συνθετικών ουσιών με σκοπό την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, ως μια δευτερεύουσα διαταραχή της εμμηνόπαυσης. Το ένζυμο κλειδί, όπως αναλύεται παρακάτω, στη βιοσύνθεση της μελανίνης είναι η τυροσινάση. Έτσι, 41 συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν *in vitro* και ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να επάγουν τη δράση του ενζύμου τυροσινάση. Τα χαρακτηριστικότερα συνθετικά παράγωγα αξιολογήθηκαν και σε *in silico* δοκιμασία ως προς την ικανότητα σύνδεσή τους με τον υποδοχέα του ενζύμου, καθώς και ως προς την ικανότητά τους να μεταβάλλουν την ενεργότητα της τυροσινάσης και την παραγόμενη μελανίνη σε δύο κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων.

Σημείο αναφοράς για την αξιολόγηση των παραπάνω αναλόγων αποτέλεσε προηγούμενη ερευνητική μας μελέτη, κατά την οποία διυδροστιλβενικά παράγωγα χαρακτηρίστηκαν ικανοί λευκαντικοί παράγοντες, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου. Η δομική αναλογία / ομοιότητα των μελετώμενων χαλκονών, διυδροχαλκονών, 2,3-διφαινυλοπροπενικών και 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων, με τις δεοξυβενζοΐνες και τα διυδροστιλβένια και το γεγονός ότι αποτελούν παραπλήσιες χημικές κατηγορίες, ενισχύουν την πιθανότητα να επιδρούν στη δραστικότητα του ενζύμου, γεγονός που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά (§ 4.3 – 4.4).

8.1 Αξιολόγηση των συνθετικών ενώσεων έναντι του ενζύμου τυροσινάση

Για τον έλεγχο της δραστικότητας των ουσιών έναντι του ενζύμου τυροσινάση, προσδιορίστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν / επάγουν την οξείδωση της 3,4-διυδροξυφαινυλανανίνης (L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine) σε ντοπακινόνη (dopaquinone) παρουσία του ενζύμου και κατ' επέκταση να μειώνουν / αυξάνουν τα μόρια της τελικά μετρούμενης καφέ χρωστικής (dopachrome). Στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Masuda *et al.* με πολύ μικρές τροποποιήσεις (Masuda, *et al.*, 2008) όπως περιγράφεται αναλυτικά στην § 1.6.1. Το υπόστρωμα της αντίδρασης ήταν η L-DOPA, ενώ ως πρότυπος αναστολέας της τυροσινάσης χρησιμοποιήθηκε το κοζικό οξύ (kojic acid). Όλα τα συνθετικά παράγωγα αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 100 μg/ml, ενώ οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν μόνο για τις πιο δραστικές ενώσεις.

Η ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν ή να επάγουν τη δραστικότητα του ενζύμου παρουσιάζεται στην εικόνα 198 και η % αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου στον πίνακα 199.



Εικόνα 198: Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της δραστικότητας της τυροσινάσης. Τα συνθετικά ανάλογα και το κοζικό οξύ (KA) αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 100 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η επί της % αναστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

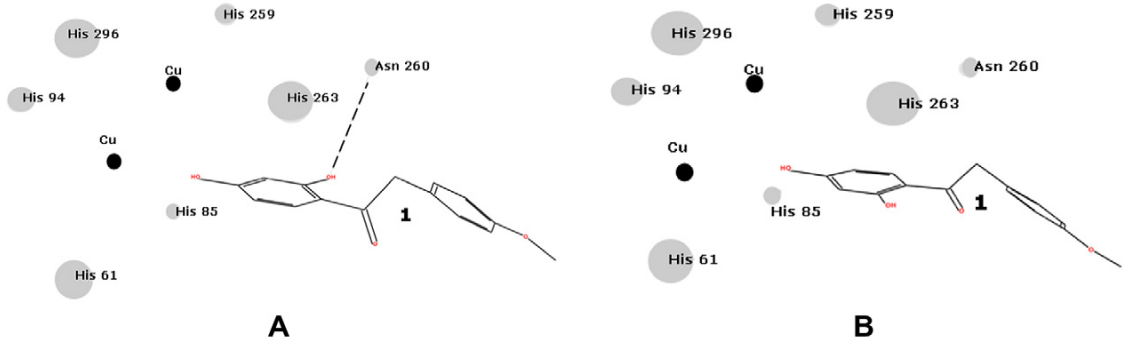
Όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα, μεταξύ των παραγόμενων συνθετικών ενώσεων αρκετές επέδρασαν ανασταλτικά έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης, αλλά υπήρχαν και ενώσεις που είτε ήταν αδρανείς, είτε προκάλεσαν επαγωγή της δραστικότητας του ενζύμου. Ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα, διαπιστώνουμε πως οι δεοξυβενζοΐνες στην πλειοψηφία τους ανέστειλαν ή δεν επέδρασαν στην ενζυμική δραστικότητα, ενώ τα διυδροστιλβένια στο σύνολό τους αναδείχθηκαν ως ικανοί αναστολείς. Οι χαλκόνες στην πλειοψηφία τους σημείωσαν μικρή ανασταλτική δράση, ενώ από τα διαρυλοπροπανικά ανάλογα μόνο ένα χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός αναστολέας του ενζύμου. Τέλος, τόσο τα 2,3-διφαινυλοπροπενικά οξέα, όσο και τα ανηγμένα παράγωγά τους 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκά οξέα, προκάλεσαν επαγωγή της δραστικότητας της τυροσινάσης.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των δεοξυβενζοϊνών η προσθήκη διαφόρων υποκαταστατών στον βασικό σκελετό δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την ικανότητά τους να επιδρούν στην ενζυμική δραστικότητα και μόνο η δεοξυβενζοΐνη **SC7** εμφάνισε μέτρια ανασταλτική ικανότητα της τάξεως του 66%.

Τα διυδροστιλβένια που προέκυψαν από την αναγωγή της καρβονυλομάδας των αντίστοιχων δεοξυβενζοϊνών, εμφάνισαν σημαντική ικανότητα αναστολής της δραστικότητας της τυροσινάσης (από 88 έως και 95%) και μάλιστα αντίστοιχη εκείνης του πρότυπου αναστολέα (Kojic acid) στην ίδια συγκέντρωση ελέγχου (97%). Συνεπώς θα μπορούσαμε να υποθέσουμε, ότι η αναγωγή της καρβονυλομάδας είναι εκείνη που σχετίζεται με την σημαντική αύξηση της δραστικότητάς τους. Για το παράγωγο **SC19** που επέδειξε σημαντική δραστικότητα,

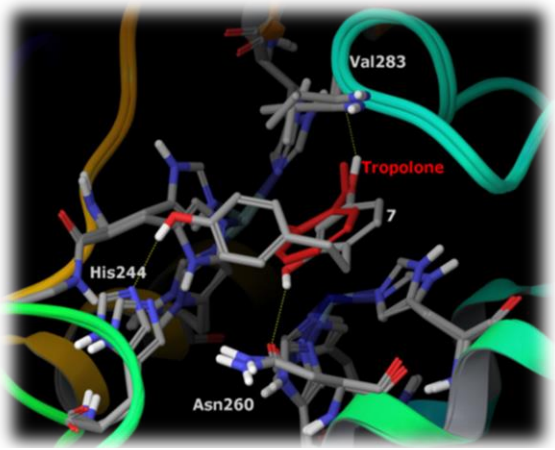
υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} του 8.44 μg/ml αναδεικνύοντάς το σε ικανότατο αναστολέα συγκρινόμενο ακόμα και με το κοζικό οξύ με τιμή IC_{50} 9.96 μg/ml.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την αρνητική επίδραση της καρβονυλικής ομάδας στην εκδήλωση δραστικότητας, πραγματοποιήθηκε θεωρητική *in silico* μελέτη πρόσδεσης του δεοξυβενζοϊνικού αναλόγου **SC4** με τον υποδοχέα του ενζύμου της τυροσινάσης. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 199, η προσομοίωση αποκάλυψε δύο πιθανούς τρόπους σύνδεσης της δεοξυβενζοΐνης με τον υποδοχέα. Στη Β διαμόρφωση, φαίνεται πως η δημιουργία ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου και του υδροξυλίου της θέσης 2 πιθανώς εμποδίζει την αλληλεπίδραση του εκάστοτε μορίου με τον υποδοχέα του ενζύμου, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη δραστικότητα (Vontzalidou, *et al.*, 2012).



Εικόνα 199: Σχηματική αναπαράσταση των δύο πιθανών τρόπων δέσμευσης της ένωσης SC19 όπως προέρχεται από εικονική διαλογή, που απεικονίζει πιθανή αλληλεπίδραση με την ασπαραγίνη (Asn26).

Είναι έκδηλο πως η απομάκρυνση της καρβονυλομάδας επιφέρει αξιοσημείωτη αύξηση της ανασταλτικής επίδρασης, όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στη μελέτη πρόσδεσης του διυδροστιλβενίου **SC19** με τον υποδοχέα της τυροσινάσης (εικόνα 200). Για τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική διαμόρφωση του υποδοχέα με τον αναστολέα τροπολόνη, ο οποίος αντικαταστάθηκε από το ανάλογο SC19, το οποίο προσδέθηκε στην είσοδο του ενεργού κέντρου με παρόμοιο τρόπο. Αναδείχθηκε ισχυρή πρόσδεση υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 2 του δακτυλίου Α, έτσι ώστε να αλληλεπιδρά με το αμινοξύ ασπαραγίνη Asn260

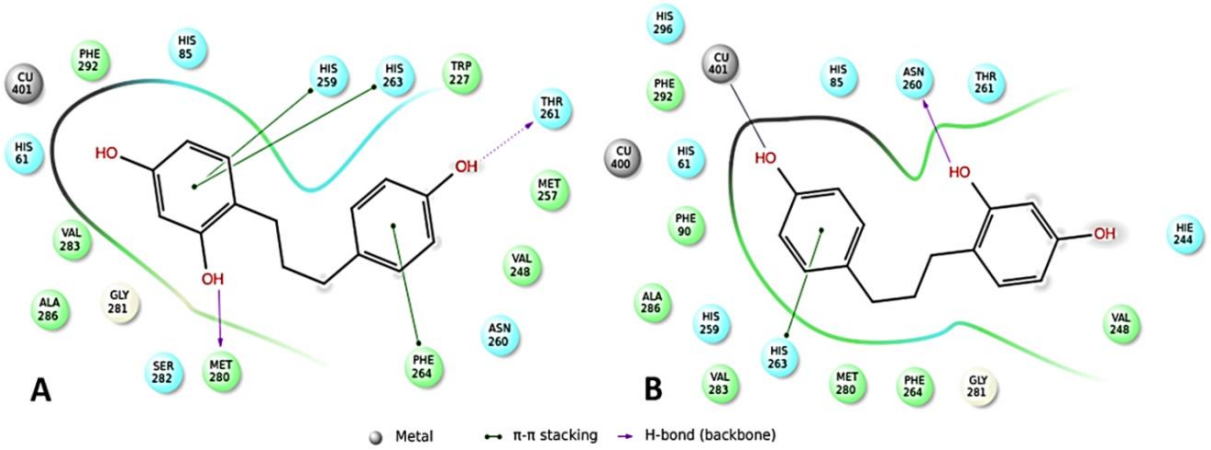


Εικόνα 200: Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου σε σύμπλοκο με το tropolone (κόκκινο) και το ανάλογο SC19 (γκρι). Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται με κίτρινες λεπτές γραμμές

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός 3 δεσμών υδρογόνου, του ΟΗ της θέσης 2 με το καρβονύλιο του ασπαρτικού οξέος (Asn260), του ΟΗ της θέσης 4 με την καρβονυλική ομάδα της βαλίνης (Val283) και του ΟΗ της θέσης 4’ με το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης (His244). Η πρόσδεση του μορίου στον υποδοχέα οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ΟΗ της θέσης 2 με την ασπαραγίνη (Asn260) στην είσοδο του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Το γεγονός αυτό εξηγεί και τη μη εκδήλωση δραστικότητας των δεοξυβενζοϊνών, καθώς δεν φέρουν διαθέσιμο υδροξύλιο για να αλληλεπιδράσει με την ασπαραγίνη (Asn260), λόγω του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται με το καρβονύλιο της ενδιάμεσης αλυσίδας. Σε δεύτερο στάδιο, ο δεσμός υδρογόνου του ΟΗ της θέσης 4’ με την ιστιδίνη (His244) συνέβαλε στην υψηλή αναστολή που επέδειξε το ανάλογο SC19.

Τα παράγωγα χαλκονοειδών (SC35-SC38), ακολουθώντας το μοτίβο των δεοξυβενζοϊνών, δεν σημείωσαν ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου, πιθανώς λόγω της ύπαρξης καρβονυλομάδας στην ενδιάμεση αλυσίδα και της απουσίας ελεύθερων υδροξυλομάδων ικανών να αλληλεπιδράσουν με τα αμινοξέα του ενζύμου. Το ανάλογο **SC37** παρά την ύπαρξη του δραστικού σκελετού της ρεσορκινόλης στο δακτύλιο Α και την υδροξυλομάδα στη θέση 4’ του δακτυλίου Β, σημείωσε αναστολή μόλις 28.9%, προφανώς λόγω της δημιουργίας δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στην καρβονυλομάδα και το υδροξύλιο τηςθέσης 2, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του δεοξυβενζοϊνικού παραγώγου **SC1**. Όπως ήταν αναμενόμενο, το ανηγμένο παράγωγό του, το διαρυλοπροπάνιο **SC41**, σημείωσε εντυπωσιακά αυξημένη ανασταλτική δράση σε ποσοστό 95.4% και με τιμή IC_{50} 8.7 μg/ml, ανάλογη του δραστικού διυδροστιλβενίου **SC19**.

In silico μελέτη ως προς την ικανότητα σύνδεσης του παραγώγου **SC41** με τον υποδοχέα της τυροσινάσης, αποκάλυψε πως και αυτό μπορεί να προσδεθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους με τα αμινοξέα, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή εκδήλωση αναστολής στον *in vitro* έλεγχο. Τα άλλα διαρυλοπροπανικά παράγωγα δε σημείωσαν αναστολή πιθανώς λόγω της μη ύπαρξης ελεύθερων υδροξυλομάδων.

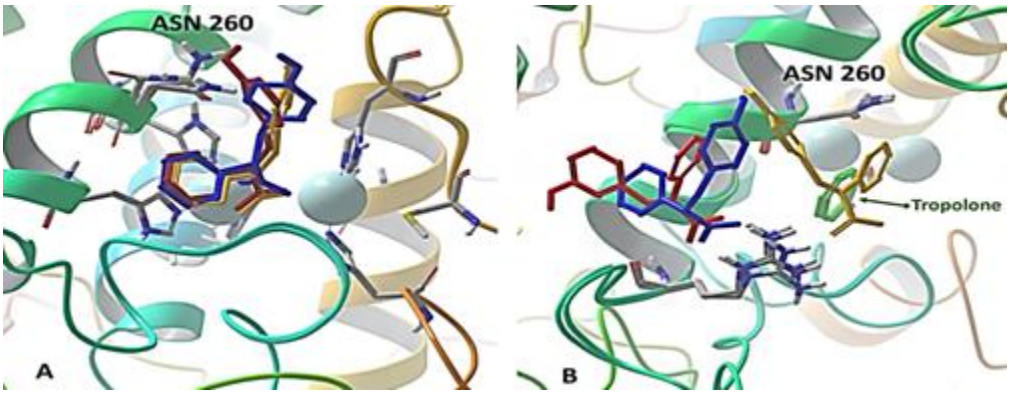


Εικόνα 201: Σχηματική αναπαράσταση των δύο πιθανών τρόπων δέσμευσης της ένωσης SC41 όπως προέρχεται από εικονική διαλογή, που απεικονίζει πιθανή αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα του ενζύμου

Η ομάδα των 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων (SC4-SC56) διαφέρει από τα υπόλοιπα παράγωγα στην ύπαρξη μιας καρβοξυλικής ομάδας στην ενδιάμεση αλυσίδα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως σχεδόν όλα τα εν λόγω παράγωγα σημείωσαν επαγωγική δράση έναντι του ενζύμου, μιας και χαρακτηρίστηκαν από αρνητικές τιμές αναστολής. Ο καλύτερος επαγωγικός παράγοντας από τη συγκεκριμένη ομάδα αναδείχθηκε το ανάλογο **SC51,** το οποίο φέρει υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου Α.

Με την αναγωγή του δεσμού της ενδιάμεσης αλυσίδας παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της επαγωγικής δραστικότητας των αναλόγων. Πιο συγκεκριμένα, το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ **SC59** σημείωσε επαγωγή 36%, ενώ το αντίστοιχο 2,3-διφαινυλοπροπενικό του οξύ **SC45** 19%. Το ανηγμένο παράγωγο **SC62** προκάλεσε επαγωγή της δραστικότητας του ενζύμου κατά 40%, ενώ η πρόδρομη ένωσή του **SC43** σημείωσε αναστολή 12%. Αντίστοιχα, η ένωση **SC63** επήγαγε κατά 42% την δράση της τυροσινάσης, ενώ το το αντίστοιχο 2,3-διφαινυλοπροπενικό του οξύ SC46 μόλις κατά 12%. Επιπλέον, σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου σημείωσε το παράγωγο **SC61** (52%) συγκρινόμενο με την πρόδρομη ένωσή του SC47 (16%). Τη σημαντικότερη επαγωγή εκδήλωσε η ένωση **SC60** της τάξεως του 73%, έναντι 15.5% του πρόδρομου μορίου του SC44. Προφανώς η μεταβολή της δραστικότητας ανάμεσα στις δύο κατηγορίες οφείλεται στην αναγωγή του διπλού δεσμού της ενδιάμεσης αλυσίδας, γεγονός που μπορεί να επιτρέπει καλύτερη ή διαφορετική πρόσδεση των αναλόγων με τον υποδοχέα της τυροσινάσης. Η μεταβολή της δραστικότητας μεταξύ των παραγώγων των 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων οφείλεται πιθανώς στη διαφορετική υποκατάσταση των αρωματικών τους δακτυλίων, με την υποκατάσταση υδροξυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου Α να ευνοεί σε μικρό βαθμό την αύξηση της δραστικότητας.

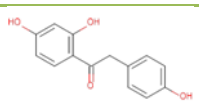
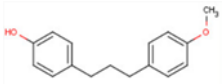
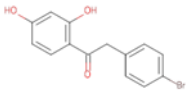
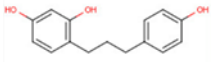
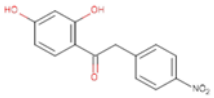
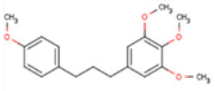
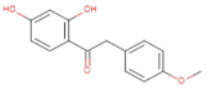
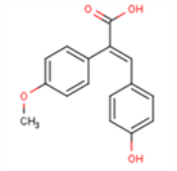
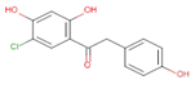
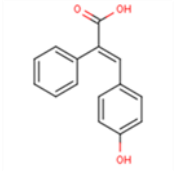
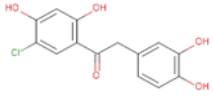
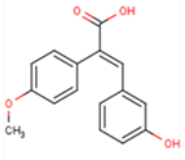
Με σκοπό και σε αυτή την περίπτωση, να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος σύνδεσης των μορίων με τον υποδοχέα του ενζύμου, προχωρήσαμε σε μελέτη μοριακής προσομοίωσης των αναλόγων **SC44**, **SC51** και **SC60**. Απουσία υποκαταστάτη και τα τρία παράγωγα εισήλθαν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με τρόπο παρόμοιο με το tropolone δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα (εικόνα 202_Α).

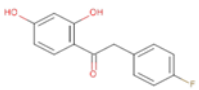
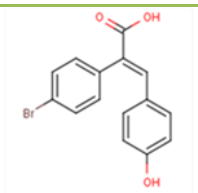
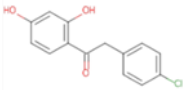
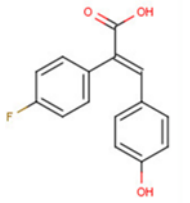
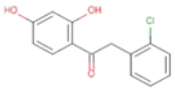
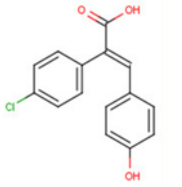
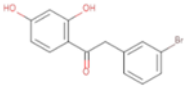
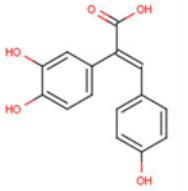
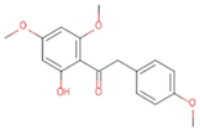
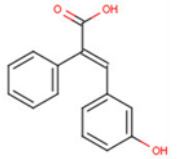
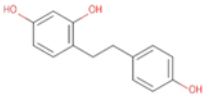
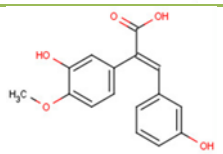
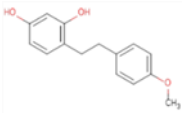
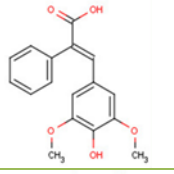
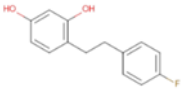
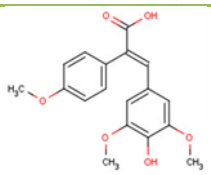
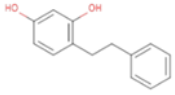
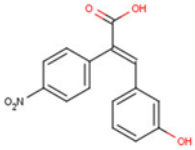
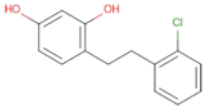
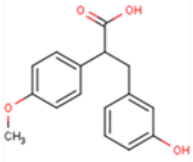


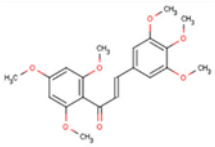
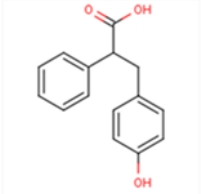
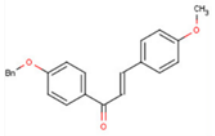
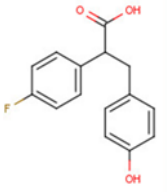
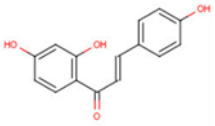
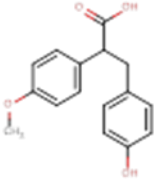
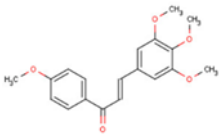
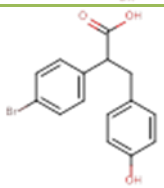
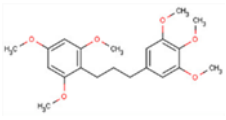
Εικόνα 202: Ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων SC44 (πορτοκαλί χρώμα), SC51 (κόκκινο χρώμα), SC60 (μπλε χρώμα) χρησιμοποιώντας την κρυσταλλική δομή της τυροσινάσης (PDY 2Y9X) απουσία (σχήμα 4Α) ή την παρουσία (σχήμα 4Β) του κρυσταλλογραφικού συνδέτη.

Η καρβοξυλομάδα φάνηκε να τοποθετείται ανάμεσα στα ιόντα χαλκού της πρωτεΐνης, δημιουργώντας μια γέφυρα αλάτων σχηματίζοντας ισχυρή σύνδεση και στις τρεις περιπτώσεις, όπου και αναμέναμε εκδήλωση αναστολής της ενζυμικής δραστικότητας. Στην περίπτωση της κρυσταλλογραφίας παρουσία τροπολόνης (εικόνα 202_B) το ανάλογο **SC44 (πορτοκαλί χρώμα)** προσανατολίστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να μπλοκάρει σε ένα βαθμό την είσοδο στο ενεργό κέντρο, γεγονός που συνάδει με τη μικρή εκδήλωση αναστολής, όπως αναδείχθηκε από την *in vitro* αξιολόγηση. Όμως, τα συνθετικά ανάλογα **SC51 (κόκκινο χρώμα)** και **SC60 (μπλε χρώμα)** φάνηκε να συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με την αργινίνη και τη λυσίνη σε σημείο έξω από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το γεγονός αυτό πιθανώς να επέδρασε ενισχυτικά στην πρόσδεση της τυροσίνης, του φυσικού υποστρώματος του ενζύμου, αιτιολογώντας και την επαγωγική δράση που διαπιστώθηκε κατά τον *in vitro* έλεγχο. Πιθανότατα δημιουργία π-π αλληλεπιδράσεων (stacking effect) μεταξύ της πρωτεΐνης και των αναλόγων, κατά κάποιο τρόπο σταθεροποιεί τη δομή του υποδοχέα με αποτέλεσμα είτε να επιταχύνεται η αντίδραση είτε να προσδένεται καλύτερα το υπόστρωμα με συνέπεια την επαγωγή της δραστικότητας του ενζύμου.

Πίνακας 199: Αναστολή της δραστικότητας του ενζύμου της τυροσινάσης. Τα συνθετικά ανάλογα αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 100 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η επί της % αναστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων

ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ					
ΚΩΔΙΚΟΣ	ΔΟΜΗ	%ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΔΟΜΗ	%ΑΝΑΣΤΟΛΗ
SC1		16.3 ± 0.4	**SC40**		17.9 ± 0.6
SC2		12.3 ±0.7	**SC41**		95.4 ± 0.3
SC3		1.0 ± 0.9	**SC42**		35 ± 3
SC4		33.3 ± 0.6	**SC43**		-12.5 ± 1.2
SC5		2.0 ±0.5	**SC44**		15.5 ± 0.9
SC6		6.2 ± 0.34	**SC45**		-19 ± 0.3

SC7		65.8 ±1.24	**SC46**		-11.5 ± 0.6
SC8		9.7 ± 1	**SC47**		-16 ± 0.5
SC9		5.7 ±0.3	**SC48**		3 ± 0.1
SC10		13.3 ± 0.5	**SC50**		40.1 ± 0.2
SC11		7.2 ± 0.5	**SC51**		-47.5 ± 0.2
SC19		95.1 ± 0.1	**SC52**		-55 ± 0.1
SC21		94.2 ±0.1	**SC54**		-11.5 ± 0.7
SC22		88 ± 0.2	**SC55**		-17.5 ± 0.9
SC20		92.3 ± 0.1	**SC56**		2.5 ± 0.6
SC23		89.7 ± 0.1	**SC59**		-36 ± 1

SC35		-11 ± 0.5	**SC60**		-73 ± 0.2
SC36		10.2 ± 0.7	**SC61**		-51.5 ± 0.6
SC37		28.9 ± 0.9	**SC62**		-39.6 ± 0.5
SC38		17.6 ± 1	**SC63**		-42 ± 0.1
SC39		-27 ± 0.6			

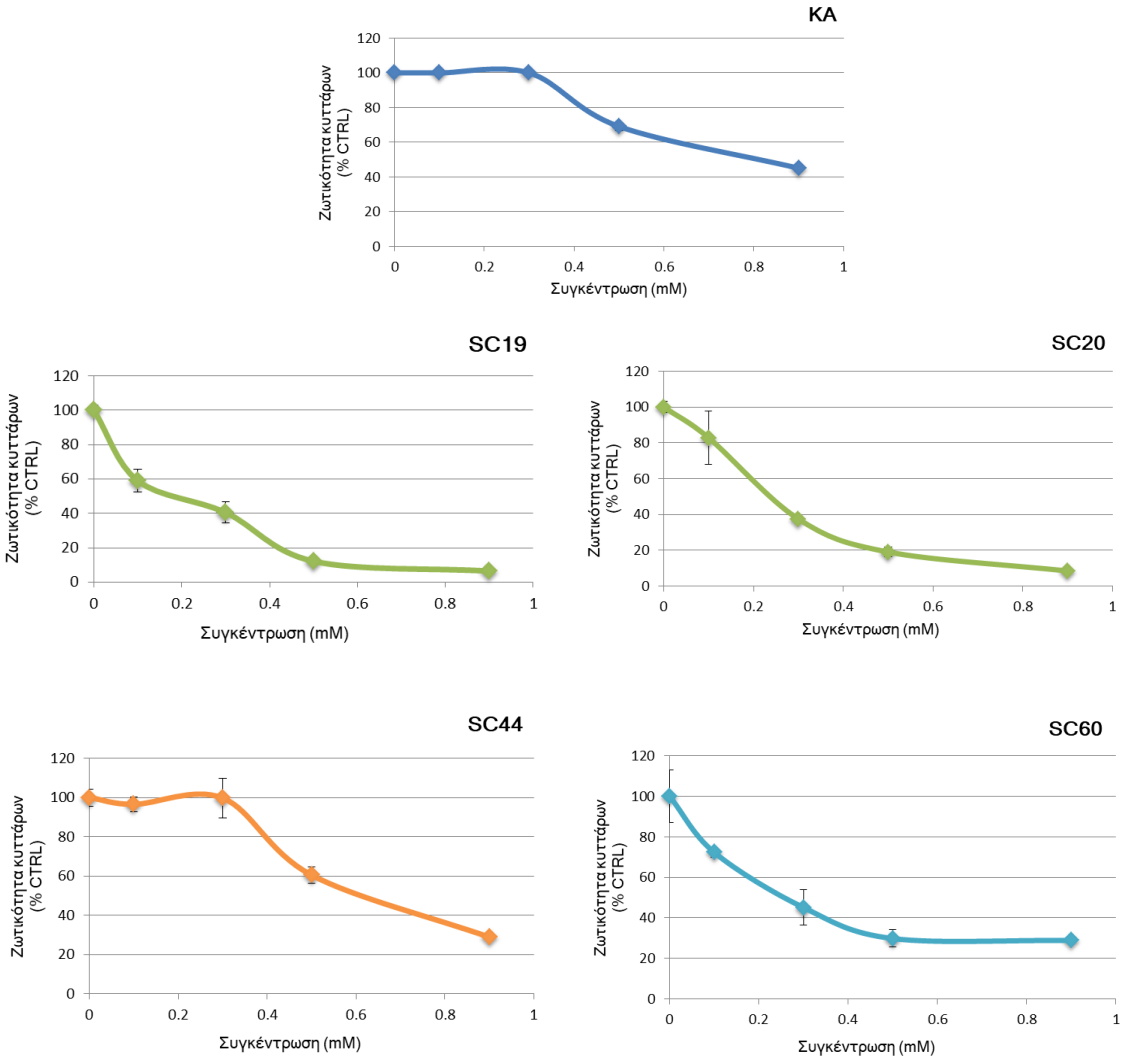
8.2 *In vitro* αξιολόγηση χαρακτηριστικών συνθετικών αναλόγων σε μελανοκύτταρα

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα της *in vitro* ενζυμικής αξιολόγησης, προχωρήσαμε στην περαιτέρω διερεύνηση της δραστικότητας αντιπροσωπευτικών συνθετικών παραγώγων. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τα διτδροστιλβένια **SC19** και **SC20** ως χαρακτηριστικοί αναστολείς της δραστικότητας της τυροσινάσης, το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ **SC60** ως αντιπροσωπευτικός επαγωγέας, καθώς και η πρόδρομη ενωσή του **SC44** προκειμένου να αξιολογηθούν σε κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα μελανοκύτταρα B16F1 και B16F10, τα οποία είναι ικανά να παράγουν και να εκκρίνουν μελανίνη, ενώ διαφοροποιούνται στην μεταστατική τους ικανότητα.

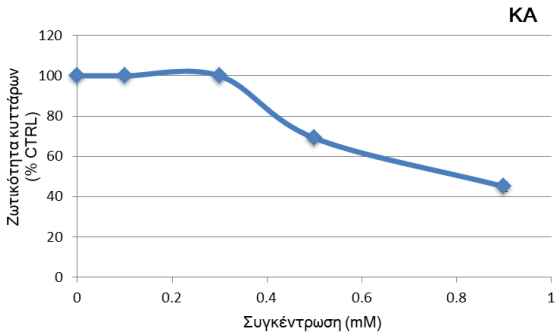
8.2.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές B16F1 και B16F10

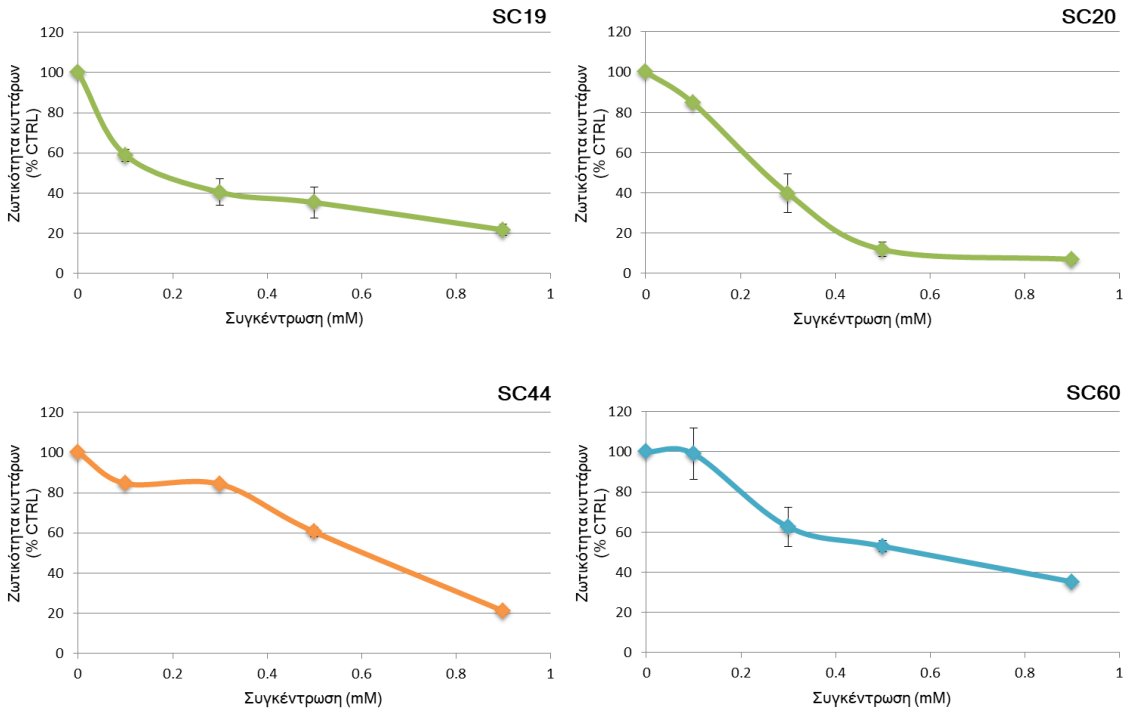
Η κυτταροτοξικότητα των ενώσεων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων κυττάρων, όπως περιγράφεται στην § 1.6.2. Οι επιλεγμένες ενώσεις, αλλά και ο πρότυπος αναστολέας κοζικό οξύ (KA) αξιολογήθηκαν σε

διάφορες συγκεντρώσεις και στις δύο κυτταρικές σειρές (B16F1 και B16F10) προκειμένου να προσδιοριστεί εκείνη που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% (IC_{50}). Όλες οι εξεταζόμενες ενώσεις επέδειξαν μηδαμινή τοξικότητα με τιμές $IC_{50} \geq 100$ μM και στις δύο κυτταρικές σειρές όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 200. Η επίδραση των υπό εξέταση ενώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων απεικονίζεται στις εικόνες 203-204.



Εικόνα 203: Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των μελανοκυττάρων B16F1. Κύτταρα B16F1 επωάστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (KA) για 48 ώρες. Ο σχετικός αριθμός ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο MTT και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL).





Εικόνα 204: Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των μελανοκυττάρων B16F10. Κύτταρα B16F10 επωάστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (Kojic acid) για 48 ώρες. Ο σχετικός αριθμός ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο MTT και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL).).

Πίνακας 200: Τιμές IC50 των συνθετικών αναλόγων και του κοζικού οξέος (Kojic acid) στις κυτταρικές σειρές B16F1 και B16F10 με τη μέθοδο MTT.

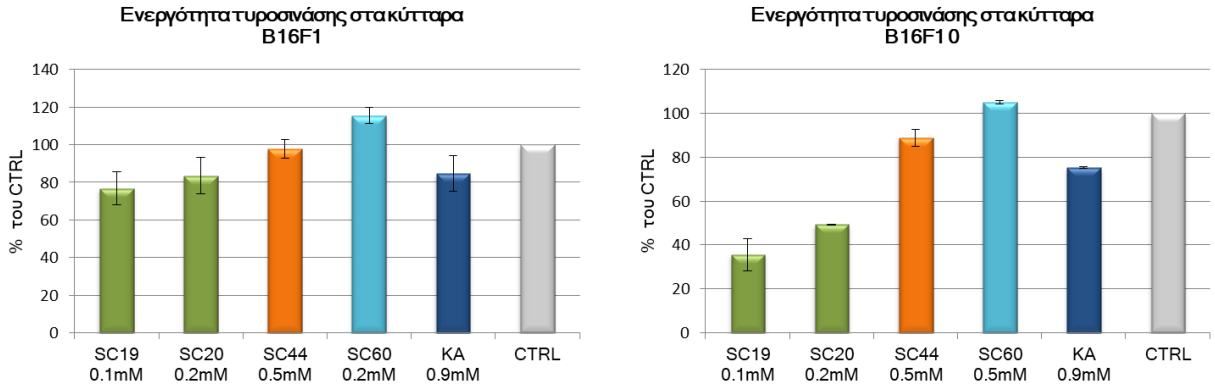
Ενώσεις	B16F1	B16F10
SC19	0.1 mM	0.1 mM
SC20	0.2 mM	0.2 mM
SC44	0.5 mM	0.5 mM
SC60	0.2 mM	0.5 mM
KA	0.9 mM	0.9 mM

8.2.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας της τυροσινάσης και της παραγόμενης μελανίνης στα κύτταρα B16F1 και B16F10

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (κεφ. 5), κατά την διαδικασία της μελανογένεσης το αμινοξύ τυροσίνη επιδρά με το ένζυμο τυροσινάση και μετατρέπεται σε L-3,4-διυδροφαινυλαλανίνη (L-DOPA), η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρώντας με άλλα ένζυμα καταλήγει στην παραγωγή μελανίνης. Τα κύτταρα B16F1 και B16F10 αποτελούν κύτταρα μελανώματος δέρματος ποντικού και είναι ικανά να συνθέτουν μελανίνη μέσω της προαναφερόμενης βιοσυνθετικής διαδικασίας. Μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, τα B16F10 συνθέτουν μεγαλύτερη ποσότητα μελανίνης και έχουν μεγαλύτερη μεταστατική ικανότητα και αντοχή σε χημειοθεραπευτικά σε σχέση με τα B16F1. Λόγω των προαναφερόμενων διαφοροποιήσεων χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο κυτταρικές σειρές.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα χαρακτηριστικών συνθετικών παραγώγων να επιδρούν στην δραστικότητα της τυροσινάσης και κατ' επέκταση στην ποσότητα της παραγόμενης μελανίνης. Τα πρωτοκόλλα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης μελανίνης και της δραστικότητας της τυροσινάσης και στις δύο κυτταρικές σειρές περιγράφονται στις παραγράφους 1.6.2.3 και 1.6.2.2 αντίστοιχα.

Τόσο στην κυτταρική σειρά B16F1, όσο και στην B16F10 προσδιορίστηκε η ικανότητα των συνθετικών αναλόγων να επιδρούν στην ενεργότητα της τυροσινάσης στην συγκέντρωση IC_{50} της κάθε ουσίας στην εκάστοτε κυτταρική σειρά. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 205 όλα τα συνθετικά ανάλογα επέδειξαν καλύτερη ανασταλτική δράση στην κυτταρική σειρά B16F10 παρά στην B16F1.

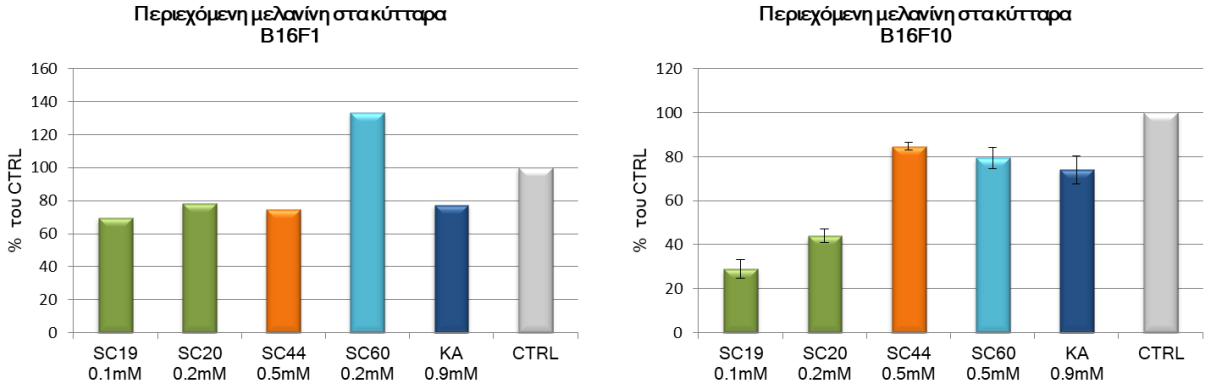


Εικόνα 205: Ενεργότητα τυροσινάσης στα κύτταρα B16F1 και B16F10. Τα κύτταρα B16F1 και B16F10 επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (KA: Kojic acid) για 48 ώρες. Η ενεργότητα της τυροσινάσης προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων..

Αναλυτικότερα, το διυδροστιλβένιο **SC19** αναδείχθηκε ως ο σημαντικότερος αναστολέας της τυροσινάσης, ο οποίος σε συγκέντρωση 0.1 mM μείωσε την ενεργότητα του ενζύμου κατά 23% στα κύτταρα B16F1 και κατά 75% στα B16F10 σε σχέση με τον μάρτυρα (CTRL). Ακολούθησε το ανάλογο της ίδιας χημικής κατηγορίας **SC20**, το οποίο σε συγκέντρωση 0.2 mM κατέστειλε την δραστικότητα του ενζύμου κατά 17% στην κυτταρική σειρά B16F1 και κατά 50% στην B16F10, δράση καλύτερη του πρότυπου αναστολέα κοζικό οξύ. Το 2,3-διφαινυλοπροπενικό οξύ **SC44** σε συγκέντρωση 0.5 mM δεν φάνηκε να επιδρά στην δραστικότητα του ενζύμου στα κύτταρα B16F1, ενώ την κατέστειλε μερικώς στα κύτταρα B16F10 (82% σε σχέση με τον μάρτυρα). Τέλος, η μόνη ένωση η οποία προκάλεσε επαγωγή της δραστικότητας της τυροσινάσης και στις δύο κυτταρικές σειρές ήταν το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ **SC60**. Αναλυτικότερα, στα κύτταρα B16F1 σε συγκέντρωση 0.2 mM και στα B16F10 σε συγκέντρωση 0.5 mM η ενεργότητα του ενζύμου ήταν 115% και 105% αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως τα προαναφερόμενα αποτελέσματα ταυτίζονται με τα αποτελέσματα της *in vitro* ελεύθερης κυττάρων ενζυμικής διαδικασίας.

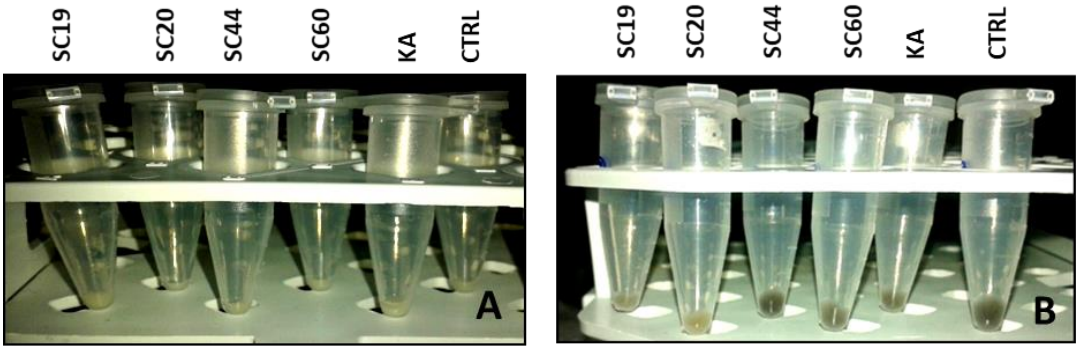
Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης μελανίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές υπό την επίδραση των συνθετικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε, όπως και στην περίπτωση της τυροσινάσης, στην συγκέντρωση IC_{50} της κάθε ουσίας στην εκάστοτε κυτταρική σειρά. Όπως

φαίνεται στην εικόνα 206 όλα τα συνθετικά ανάλογα επέδειξαν και σε αυτή την περίπτωση, καλύτερη ανασταλτική δράση στην κυτταρική σειρά B16F10 παρά στην B16F1.



Εικόνα 206: : Περιεχόμενη μελανίνη στα κύτταρα B16F1 και B16F10. Τα κύτταρα B16F1 και B16F10 αντίστοιχα, επωάστηκαν παρουσία των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (KA: Kojic acid) για 48 ώρες. Η περιεχόμενη μελανίνη προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και εκφράστηκε ως % επί του εκδόχου (CTRL). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων στην περίπτωση των B16F10 και ενός στην περίπτωση των B16F1.

Το διυδροστιλβένιο **SC19** σημείωσε τη μεγαλύτερη κατασταλτική επίδραση, μειώνοντας το ποσοστό της περιεχόμενης μελανίνης κατά 30% στα κύτταρα B16F1 και κατά 72% στα B16F10 σε σχέση με τον μάρτυρα. Η ένωση **SC20** μείωσε κατά 56% την περιεχόμενη μελανίνη στην κυτταρική σειρά B16F10, ικανοποιητικότερα και από το κοζικό οξύ (26% καταστολή), ενώ στα κύτταρα B16F1 η δραστικότητά της ήταν ανάλογη του κοζικού οξέος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το 2,3-διφαινυλοπροπενικό οξύ **SC44**, αν και δεν επίδρασε κατασταλτικά στην ενεργότητα της τυροσινάσης στα κύτταρα B16F1, κατέστειλε την παραγόμενη μελανίνη κατά 25%, ενώ φάνηκε λιγότερο δραστικό στα κύτταρα B16F10**.** Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ **SC60,** το οποίο προκάλεσε επαγωγή της ενεργότητας της τυροσινάσης και στις δύο κυτταρικές σειρές, προήγαγε σημαντικά την παραγωγή μελανίνης κατά 33% στα κύτταρα B16F1, αλλά την κατέστειλε κατά 20% στα B16F10. Ο αποχρωματισμός και των δύο τύπων μελανοκυττάρων υπό την επίδραση των συνθετικών αναλόγων παρουσιάζεται στην εικόνα 207.



Εικόνα 207: Φωτογραφική απεικόνιση του ιζήματος των κυττάρων B16F1 και B16F10. Κύτταρα B16F1 (A) και B16F10 (B) επωάστηκαν παρουσία όνο του εκδόχου (CTRL), των συνθετικών αναλόγων ή του κοζικού οξέος (KA: Kojic acid) για 48 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρησή τους για την παραλαβή του ιζήματος (pellet).

Συνοψίζοντας, όσον αφορά την δραστικότητα των ενώσεων έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης κατά τον *in vitro* ελεύθερο κυττάρων προσδιορισμό, επτά συνθετικά ανάλογα (SC19 έως SC23 και SC41) χαρακτηρίστηκαν ικανοί αναστολείς της τυροσινάσης σημειώνοντας αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου μεγαλύτερη από 70%. Τα διυδροστιλβένια (SC19 - SC23) αναδείχθηκαν ως η δραστικότερη χημική κατηγορία, καθώς όλα τα ανάλογα σημείωσαν αναστολή της τάξεως του 90%. Από τα διαρυλοπροπάνια (SC39 – SC42) μόνο το SC40 σημείωσε ισχυρή αναστολή (95%), ανάλογη του διυδροστιλβενίου SC19, ενώ μέτρια ανασταλτική ικανότητα παρουσίασαν δύο ανάλογα προκαλώντας αναστολή από 40% εώς 69%. Τα υπόλοιπα παράγωγα δεοξυβενζοϊνών (SC1 - SC11), χαλκονών (SC35 - SC38) καθώς και το διαρυλοπροπάνιο SC40 σημείωσαν ασθενή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου. Μέτρια επαγωγική επίδραση εκδήλωσαν δύο ανάλογα από τις κατηγορίες των 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων (SC51, SC61), ενώ το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ SC60 σημείωσε υψηλή επαγωγή της τάξεως του 73% χαρακτηρίζοντάς το σημαντικό επαγωγέα του ενζύμου. Τα υπόλοιπα ανάλογα των προαναφερόμενων χημικών κατηγοριών σημείωσαν ασθενή επαγωγική ικανότητα.

Βασιζόμενοι στα προαναφερόμενα αποτελέσματα, προχωρήσαμε στην επιλογή τεσσάρων χαρακτηριστικών συνθετικών αναλόγων προκειμένου να αξιολογηθεί η δραστικότητά τους σε κυτταρικό επίπεδο. Επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του *in vitro* ελεύθερου κυττάρων ελέγχου, το διυδροστιλβένιο SC19 αναδείχθηκε ως ο σημαντικότερος αναστολέας τόσο της ενεργότητας της τυροσινάσης, όσο και της παραγόμενης μελανίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου (B16F1, B16F10), ακολουθούμενος από το διυδροστιλβένιο SC20. Το 2,3-διφαινυλοπροπενικό οξύ SC44 δεν προκάλεσε σημαντική καταστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης, ενώ φάνηκε να προκαλεί μερική καταστολή της παραγόμενης μελανίνης της τάξης του 20% και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ SC60 φάνηκε να δρα ως ενεργοποιητής της τυροσινάσης και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ η επίδρασή του στην παραγωγή μελανίνης ήταν επαγωγική στα κύτταρα B16F1 και μερικώς κατασταλτική στα B16F10.

Συνολικά, η ποικιλία υποκαταστατών και οι διαφορετικές χημικές κατηγορίες των συνθετικών αναλόγων που αξιολογήθηκαν, θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάδειξη των βέλτιστων δομών και τη δημιουργία δραστικών αναλόγων, μελετώντας τη σχέσης δομής δράσης τους. Τα παράγωγα με ανασταλτική επίδραση έναντι του ενζύμου θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη λευκαντικών παραγόντων με εφαρμογή στην καλλυντική βιομηχανία ή τη βιομηχανία τροφίμων. Επιπλέον, δεδομένου ότι η τυροσινάση εμπλέκεται στην παραγωγή ντοπαμίνης, η σύνθεση ενώσεων με επαγωγική επίδραση έναντι του ενζύμου θα μπορούσαν να αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό και τη μελέτη αναλόγων με πιθανή ευεργετική επίδραση σε σχετικές παθήσεις όπως η νόσος του Parkinson.

Συμπεράσματα - Προοπτικές

Βασικό άξονα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η προσπάθεια ανεύρεσης φυσικών προϊόντων και η ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων τους με σκοπό την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, ως την κύρια συνέπεια της εμμηνόπαυσης. Αναλυτικότερα, αξιοποιώντας προγενέστερα ερευνητικά αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας, αναφορικά με την οιστρογόνο δράση ενός σημαντικού αριθμού ενώσεων της χημειοθήκης του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων (ΕΦΧΦΠ), πραγματοποιήθηκε *in silico* αξιολόγησή τους, με σκοπό την ανάδειξη αξιόλογων δομικών σκελετών (scaffolds) ως προς την εκδήλωση φυτοοιστρογονικότητας. Έτσι, τα δομικά χαρακτηριστικά των χαλκονοειδών, των στιλβενοειδών, των ισοφλαβονών, των δεοξυβενζοϊνών, των φλαβονών και των φλαβονολών, τα οποία αναδείχθηκαν από τη μελέτη, αποτέλεσαν βασικό κριτήριο επιλογής των μελετώμενων φυτικών ειδών και ελήφθησαν υπόψιν στο σχεδιασμό των συνθετικών αναλόγων που αναπτύχθηκαν. Η επιλογή των φυτικών δρογών βασίσθηκε σε πληροφορίες παραδοσιακής θεραπευτικής και σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα, σχετικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, ενώ δεξαμενή για την αναζήτηση των μελετώμενων ειδών αποτέλεσε η ελληνική χλωρίδα σε μια συνολικότερη προσπάθεια ανάδειξής της ως μια πλούσια πηγή βιοδραστικών παραγόντων με οστεοπροστατευτικές ιδιότητες.

Ως αντικείμενο της παρούσας διατριβής επιλέχθηκαν συνολικά 39 δρόγες, οι οποίες προέρχονται από είδη που ανήκουν στις οικογένειες Labiatae (8), Leguminosae (23), Liliaceae (1), Rhamnaceae (3), Rosaceae (1), Iridaceae (1), Rutaceae (1) και Vitaceae (1). Η πλειοψηφία των προαναφερόμενων φυτικών πρώτων υλών προήλθε από τη συλλογή του ΕΦΧΦΠ, ενώ σε μερικές περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν συλλογές σύμφωνα με τους κανόνες ορθής βοτανικής πρακτικής. Παρασκευάσθηκαν 75 φυτικά εκχυλίσματα, με τη χρήση κυρίως της τεχνικής της επιταχυνόμενης εκχύλισης (A.S.E) και διαλύτες τον οξικό αιθυλεστέρα και τη μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο με τις μεθόδους της υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων 'Diode Array Detector' (HPLC-DAD), της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), καθώς και της συζευγμένης τεχνικής της Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (LC-HRMS). Στην πλειοψηφία τους εντοπίστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν σε κατηγορίες φυσικών προϊόντων που είναι γνωστά ως φυτοοιστρογόνα (π.χ. ισοφλαβόνες, κουμαρίνες, κουμεστάνια κ.α.).

Στη συνέχεια, τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς τις οιστρογονικές και οστεοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Η αξιολόγηση της οιστρογόνου δράσης τους πραγματοποιήθηκε στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για αυτόν τον σκοπό. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά Ishikawa είναι κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου, τα οποία παρουσία οιστρογόνου

παράγουν αλκαλική φωσφατάση (AlkP), ενώ η κυτταρική σειρά MCF-7 είναι ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου μαστού, τα οποία πολλαπλασιάζονται παρουσία οιστρογόνου. Οι οστεοπροστατευτικές ιδιότητες όλων των παρασκευασμάτων, αξιολογήθηκαν στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, η οποία είναι πρώιμα οστεοβλαστικά κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες, παράγοντας αλκαλική φωσφατάση ως πρώιμο δείκτη διαφοροποίησης. Τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων ελέγχων έδειξαν ότι το 64% των εκχυλισμάτων (48 από τα 75 που ελέγχθηκαν) σε συγκέντρωση 10 μg/ml ήταν ικανά να προάγουν την οστεοβλαστογένεση στην οστεοβλαστική σειρά MC3T3-E1 και επιπρόσθετα το 49% (36 από τα 75) προκάλεσαν επαγωγή μεγαλύτερη ή ίση της οιστραδιόλης (10 nM). Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δραστικότητα μεγαλύτερη της οιστραδιόλης επέδειξαν οχτώ εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 1 μg/ml, καθώς και τέσσερα στη μικρότερη συγκέντρωση ελέγχου (0.1 μg/ml). Από τα 48 εκχυλίσματα που προήγαγαν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 στη συγκέντρωση ελέγχου 10 μg/ml, τα δεκατρία χαρακτηρίστηκαν και ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7), ενώ τα υπόλοιπα παρουσίασαν ασθενή ή καθόλου οιστρογόνο δράση. Τα δραστικότερα εκχυλίσματα προήλθαν από τα είδη *Chamaecytisus austriacus, Chamaecytisus triflorus*, *Cytisus villosus, Teline monspessulana, Hippocrepis comosa, Glycyrrhiza glabra, Genista hassertiana, Lupinus albus, Ceratonia siliqua, Psoralea bituminosa,* καθώς και από όλα τα είδη του γένους *Rhamnus* που μελετήθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της πρωταρχικής μελέτης του φυτοχημικού προφίλ και των βιολογικών ιδιοτήτων τους επιλέχθηκαν τα παρακάτω 9 εκχυλίσματα για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη: τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Dorycnium hirsutum*, *Cytisus villosus, Ceratonia siliqua, Psoralea bituminosa, Lupinus albus, Rhamnus sibthorpiana, Rhamnus alpinus*, τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Hippocrepis comosa* και *Rhamnus lycioides* sbsp. *graecus*, καθώς και το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* και οι κονιοποιημένοι καρποί της *Ceratonia siliqua* (χαρουπάλευρο) για την *in vivo* αξιολόγησή τους σε μοντέλο ωοθηκεκτομηθέντων αρουραίων. Στην πλειοψηφία τους τα επιλεγμένα εκχυλίσματα κατέστειλαν την οστεοκλαστογένεση, με εξαίρεση το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Hippocrepis comosa* και το μεθανολικό εκχύλισμα της *Glycyrrhiza glabra*.

Με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων βιοδραστικών μεταβολιτών, τα επιλεγμένα φυτικά εκχυλίσματα κλασματώθηκαν με χρήση της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (FCPC). Τα προκύπτοντα κλάσματα επεξεργάστηκαν περαιτέρω με χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως είναι η χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (CC, Sephadex LH-20), η υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (CC, Silica flash) και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep-TLC), ενώ η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Dorycnium hirsutum* (DHM) απομονώθηκαν 12 μεταβολίτες: ένα τριτερπένιο (DHM1) / τρία φαινολοξέα (DHM2,

DHM6, DHM12) και οχτώ φλαβονοειδή (DHM3, DHM4, DHM5, DHM7-DHM11). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Cytisus villosus* (CVM) ταυτοποιήθηκαν 13 μεταβολίτες: μια στερόλη (CVM1) / πέντε φαινολοξέα (CVM4-CVM8) και επτά ισοφλαβονοειδή (CVM2, CVM3, CVM9-CVM13). Από τη μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του *Hippocrepis comosa* (HCE) απομονώθηκαν 10 μεταβολίτες: δύο στερόλες (HCE2, HCE4) / δύο τριτερπένια (HCE1, HCE3) / τρία κουμεστάνια (HCE5, HCE8, HCE9) / δύο αρυλοκουμαρίνες (HCE6, HCE10) και μία ισοφλαβόνη (HCE7). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Ceratonia siliqua* (CSM) ταυτοποιήθηκαν 18 μεταβολίτες: μία στερόλη (CSM2) / ένα τριτερπένιο (CSM1) / έξι φλαβονοειδή (CSM3-CSM5, CSM7, CSM8, CSM14) και δέκα παράγωγα γαλλικού οξέος (CSM6, CSM9-CSM13, CSM15-CSM18). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Psoralea bituminosa* (PBM) απομονώθηκαν 15 μεταβολίτες: μία πτεροκαρπάνη (PBM1) / ένα κουμεστάνιο (PBM4) / πέντε κουμαρίνες (PBM2, PBM3, PBM9, PBM12, PBM13) / δύο φαινολοξέα (PBM6, PBM7) / πέντε φλαβονοειδή (PBM5, PBM8, PBM10, PBM11, PBM14) και μία τριτερπενική σαπωνίνη (PBM15). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lupinus albus* (LAM) απομονώθηκαν 9 μεταβολίτες: μία στερόλη (LAM1) / έξι ισοφλαβονοειδή (LAM3, LAM4, LAM7-LAM9) και δύο γλυκοσίδες φλαβονολών (LAM5, LAM6). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Rhamnus sibthorpiana* (RSM) απομονώθηκαν 13 μεταβολίτες, μία στερόλη (RSM2) / ένα τριτερπένιο (RSM1) / μία ανθρακινόνη (RSM3) / μία ακετοφαινόνη (RSM6) / δύο βενζοφουρανόνες (RSM10, RSM13) / τέσσερις φλαβανόλες (RSM4, RSM5, RSM7, RSM12) και τρεις φλαβονόλες (RSM8, RSM9, RSM11). Από τη μελέτη του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *Rhamnus lycioides* (RLE) απομονώθηκαν 6 μεταβολίτες: μία φλαβονόλη (RLE2) / μία φλαβανόνη, (RLE1) / μία φλαβανονόλη (RLE3) και τρεις γλυκοσίδες φλαβονολών (RLE4-RLE6). Από τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Rhamnus alpinus* (RAM) απομονώθηκαν 4 μεταβολίτες: δύο ανθρακινόνες (RAM1, RAM2) / μία ακετοφαινόνη (RAM4) και μία ναφθόλη (RAM3).

Συνολικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 101 μεταβολίτες (84 διαφορετικοί μεταξύ τους και 17 από περισσότερα του ενός εκχυλίσματα), οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενίων, φαινολοξέων, φλαβονοειδών (ισοφλαβονών, φλαβονολών, φλαβαναλών, φλαβονών), κουμαρινών, κουμεστανίων, πτεροκαρπανών, ακετοφαινονών, βενζοφουρανονών, ανθρακινονών και γλυκοσιδικών παραγώγων τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε και την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων των φυσικών προϊόντων, 10 μεταβολίτες (DHM3, HCE7, HCE11, CSM11, PBM8, LAM8, RSM4, RSM6, RLE4, RAM2) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

Από τις προαναφερόμενες φυσικές ενώσεις, 63 αξιολογήθηκαν ως προς τις οιστρογονικές και οστεοπροστατευτικές τους ιδιότητες στις κυτταρικές σειρές Ishikawa/MCF-7 και MC3T3-E1/RAW264.7, αντίστοιχα. Γενικότερα, ως σημαντικοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται οι μεταβολίτες, οι οποίοι συνδυάζουν την ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και την κατασταλτική επίδραση έναντι της διαφοροποίησης

των οστεοκλαστών. Με βάση τα προαναφερόμενα, στη συγκέντρωση ελέγχου 10 μM, 19 μεταβολίτες (30% επί του συνόλου) εμφάνισαν τις επιθυμητές ιδιότητες, τόσο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, όσο και στην κυτταρική σειρά RAW264.7. Λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα των ελέγχων οιστρογονικότητας στις σειρές Ishikawa και MCF-7, τέσσερις από τους προαναφερόμενους μεταβολίτες σημείωσαν σημαντική οιστρογόνο δράση. Αναλυτικότερα, από την χημική κατηγορία των τερπενίων, η λουπεόλη (CSM1 / RSM1) και η *β*-σιτοστερόνη (HCE2) χαρακτηρίστηκαν σημαντικοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες, καθώς έδειξαν αξιοσημείωτη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση και δε σημείωσαν οιστρογονικότητα. Από την κατηγορία των φαινολοξέων δραστικότερος παράγοντας χαρακτηρίστηκε το 3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM4), εκδηλώνοντας την επιθυμητή δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές (επαγωγή MC3T3-E1, καταστολή RAW264.7), χωρίς να συνδυάζει την εκδήλωση οιστρογονικότητας σε καμία από τις κυτταρικές σειρές ελέγχου, με το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM7 / DHM2) και το 3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (CVM8) να ακολουθούν σε σειρά δραστικότητας. Από τις ισοφλαβόνες η νταντζεΐνη (PBM5) συνδύασε την αύξηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και την καταστολή της οστεοκλαστογένεσης, εκδηλώνοντας ασθενή οιστρογόνο δράση στα κύτταρα MCF-7. Από την άλλη μεριά, τα γλυκοσιδικά παράγωγα της γενιστεΐνης (CVM10, CVM13), ενώ προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και καταστολή εκείνης των οστεοκλαστών, παρουσίασαν σημαντική οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Απ' όλες τις φλαβόνες και φλαβονόλες που ελέγχθηκαν, μόνο η καιμπφερόλη (RSM8) και ο 3-*O*-ραμνινοσίδης της (RLE6 / RSM9) εκδήλωσαν την επιθυμητή δραστικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές, με υψηλότερη την ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης. Στην κατηγορία των κουμεστανίων, το πρενυλοπαράγωγο 6-(α,α-διμεθυλαλλυλο)κουμεστρόλη (HCE5) χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας στα κύτταρα MC3T3-E1, κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση και στερούταν οιστρογονικότητας και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Οι μεταβολίτες κουμεστρόλη (HCE8 / PBM4) και η 3-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-5-υδροξυκουμαρίνη (HCE10) συνδύασαν την επιθυμητή δραστικότητα στις δύο σειρές οστεοκυττάρων (επαγωγή MC3T3-E1, καταστολή RAW264.7) και χαρακτηρίστηκαν ασθενείς αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων. Αξιόλογοι οστεοπροστατευτικοί παράγοντες χαρακτηρίστηκαν επίσης η μπιτουκαρπίνη Α (PBM1), το ψωραλένιο (PBM3) και η 8-καρβοξυμεθυλοκουμαρίνη (PBM9), προάγοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση, ενώ δεν παρουσίασαν οιστρογονικότητας. Ανάλογη δραστικότητα παρατηρήθηκε και για τον 8-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδη της εμοδίνης (RAM1), τον 8-*O*-*β*-ρουτινοσίδη της φυσιόνης (RAM2) και τη 4-*O*-μεθυλο-2-*O*-ρουτινοσυλο-2,4,6-τριυδροξυακετοφαινόνη (RAM4).

Ανάμεσα στους εικοσιτέσσερις μεταβολίτες που προήγαγαν μεν σημαντικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, αλλά είχαν επαγωγική δράση στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση, περιλαμβάνονται η *β*-σιτοστερόλη (CVM1 / HCE4 / LAM1 / RSM2), η *β*-αμυρίνη

(DHM1 / HCE3 / CSM2) και η Δ^1-λουπενόνη (HCE1), οι οποίες συνοδεύτηκαν από απουσία οιστρογόνου δράσης στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7. Τα ισοφλαβονοειδή που ελέγχθηκαν κρίθηκαν ικανά να προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, επάγοντας όμως και την οστεοκλαστογένεση. Η γενιστεΐνη (CVM3 / LAM2) και τη 2'-υδροξυγενιστεΐνη (LAM3) να χαρακτηρίζονται από υψηλή οιστρογονικότητα, ενώ οι τις υπόλοιπες ισοφλαβόνες ((7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (CVM12), 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της νταντζεΐνης (CVM11), γενιστίνη (CVM10), 5-*O*-*β*-γλυκοπυρανοσυλο-2'-υδροξυγενιστεΐνη (LAM8)), να σημειώνουν μέτρια οιστρογονική δράση. Επιπλέον, η 7-*O*-(6-*O*-ακετυλο-β-γλυκοπυρανοσυλο) νταντζεΐνη (PBM8), ο 7-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της 8-μεθοξυ-4'-*O*-μεθυλογενιστεΐνης (CSM4), η 5-*O*-μεθυλογενιστεΐνη (CVM9) και η φορμονονετίνη (CVM2 / HCE7) δεν σημείωσαν οιστρογονικότητα. Το 4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-*trans*-π-κουμαρικό οξύ (DHM12) προήγαγε την οστεοβλαστογένεση επιδεικνύοντας παράλληλα πολύ υψηλή επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης και ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7. Το 3-*O*-(2,3-δι-*O*-γαλλοϋλογλυκοπυρανοσυλο)-3,5-διϋδροξυεξανοϊκό οξύ (CSM17) ενίσχυσε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, χωρίς να συνοδεύεται από εκδήλωση οιστρογονικότητας, ενώ φάνηκε να προάγει την οστεοκλαστογένεση. Τα σακχαριδικά παράγωγα της κερκετίνης (DHM7, CSM5), της μυρικετίνης (CSM7) και της ραμνοσιτρίνης (RSM11) προήγαγαν σε μικρό βαθμό την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς αγωνιστές στα κύτταρα MCF-7, ενώ και αυτά προήγαγαν την οστεοκλαστογένεση. Η 6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλαπιγενίνη (PBM11) χαρακτηρίστηκε μερικός αγωνιστής στα κύτταρα MCF-7 αυξάνοντας και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η κατεχίνη (DHM5) και η μυρικετίνη (CSM8) δεν παρουσίασαν οιστρογόνο δράση σε καμία κυτταρική σειρά, ενώ αύξησαν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1. Το ισοψωραλένιο (PBM2), αύξησε την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, δεν εκδήλωσε οιστρογονικότητα σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου, ενώ φάνηκε να μην επηρεάζει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Η ισοτριφολιόλη (HCE9) προήγαγε την οστεοβλαστογένεση, χαρακτηρίστηκε από ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7, ενώ ενίσχυσε και την οστεοκλαστογένεση.

Από το σύνολο των μεταβολιτών που ελέγχθηκαν, πέντε σημείωσαν δραστικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά RAW264.7, ενώ δεν επηρέασαν ή κατέστειλαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η 7,4'-δι-*O*- γλυκοπυρανοσυλολουτεόνη (LAM9) σημείωσε αξιοσημείωτη καταστολή της οστεοκλαστογένεσης εκδηλώνοντας ασθενή αγωνισμό στα κύτταρα MCF-7, ενώ το γαλλικό οξύ (DHM6) και η 1,3-δι-*O*-γαλλοϋλο-*α*-D-γλυκοπυρανόση (CSM11) εκδήλωσαν ισχυρή καταστολή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης, στερούταν οιστρογονικότητας και κατέστειλαν την οστεοβλαστογένεση μόνο στη συγκέντρωση 10 μM. Η ανθρακινόνη εμοδίνη (RSM3) επίδρασε κατασταλτικά στην οστεοκλαστογένεση και σημείωσε ασθενή και μερική αγωνιστική δράση στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, αντίστοιχα. Τέλος, ο 3-*O*-γλυκοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (CSM14) κατέστειλε οριακά την οστεοκλαστογένεση, δεν

εμφάνισε οιστρογονικότητα, ενώ εκδήλωσε και πολύ μικρή κατασταλτική δράση έναντι της οστεοβλαστογένεσης σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου.

Όσον αφορά τα συνθετικά ανάλογα των φυσικών προϊόντων, παρασκευάσθηκαν 11 δεοξυβενζοΐνες (SC1-SC11), από τις οποίες με αντίδραση πρενυλίωσης προέκυψαν 6 πρενυλιωμένα παράγωγά τους (SC12-SC17), ενώ εφαρμόζοντας καταλυτική υδρογόνωση, μέσω αναγωγής του καρβονυλίου σε μεθυλένιο, παραλάβαμε τα 6 αντίστοιχα διυδροστιλβενικά παράγωγα (SC18-SC23). Φορμυλίωση του δεοξυβενζοϊνικού παραγώγου SC11 και επακόλουθες αντιδράσεις απομεθυλίωσης οδήγησαν στην παραλαβή 4 ισοφλαβονών (SC24-SC27), ενώ σε επόμενο στάδιο με αντιδράσεις πρενυλίωσης οδηγηθήκαμε στην παραλαβή 6 πρενυλιωμένων ισοφλαβονικών αναλόγων (SC28-SC33). Επίσης, πραγματοποιήθηκε η συνθετική παρασκευή 4 χαλκονών (SC35-SC38), μέσω αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης Claisen-Shmitt, καθώς και των αντίστοιχων διαρυλοπροπανίων τους μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης (SC39-SC42). Τέλος, μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης Perkins παρασκευάστηκαν 12 παράγωγα 2,3-διαρυλοπροπενικών οξέων (SC43-SC52, SC54-SC56), καθώς και 2 παράγωγα 3-αρυλοκουμαρινών (SC49, SC53), ενώ μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης οδηγηθήκαμε στην παραλαβή των αντίστοιχων 2,3-διαρυλοπρποπανικών οξέων (SC59-SC62).

Συνολικά παρασκευάστηκαν 60 συνθετικές ενώσεις, οι οποίες ανήκουν στις κατηγορίες των δεοξυβενζοϊνών, των διυδροστιλβενίων, των ισοφλαβονών, των χαλκονών, των διαρυλοπροπανίων, των 2,3-διφαινυλοπροπενικών και των 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκών οξέων. Επίσης, 15 από τις προαναφερόμενες ενώσεις (SC12-SC18, SC29-SC33, SC46, SC52, SC59), με βάση όσα έχουν προκύψει από την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων, συντέθηκαν για πρώτη φορά.

Οι πενήντα επτά συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν, όπως και οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, σε δύο κυτταρικές σειρές (MC3T3–E1 και RAW264.7) ως προς την πιθανή οστεοπροστατευτική τους ικανότητα και σε δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7) ως προς την οιστρογόνο δράση τους. Ως ελπιδοφόροι οστεοπροστατευτικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδυάζουν την προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και την καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, αναγνωρίστηκαν 20 συνθετικές ενώσεις. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται 10 παράγωγα από την κατηγορία των δεοξυβενζοϊνών (SC1, SC2, SC4, SC5, SC7, SC8, SC9, SC11, SC12, SC15), τα οποία εκδήλωσαν την επιθυμητή δραστικότητα χωρίς να παρουσιάζουν οιστρογονική δράση, ενώ από τα ισοφλαβονοειδή μόνο τα πρενυλιωμένα ανάλογα SC29 και SC30 συνδύασαν την επιθυμητή δράση στις κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Οι χαλκόνες SC36 και SC37 και το διαρυλοπροπανικό ανάλογο SC41 αποδείχτηκαν ικανότεροι καταστολείς της οστεοκλαστογένεσης, παρά επαγωγείς της οστεοβλαστογένεσης. Από την ομάδα των 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων, τα παράγωγα SC51, SC52, SC55 και SC61 προήγαγαν τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 και κατέστειλαν εκείνη των RAW264.7, ενώ όλες οι ενώσεις της κατηγορίας ουσιαστικά στερούνταν οιστρογόνου δράσης και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Επιπλέον, 16

συνθετικές ενώσεις σημείωσαν δραστικότητα μόνο στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ δεν επηρέασαν ή προήγαγαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Από την κατηγορία των δεοξυβενζοϊνών, τα παράγωγα SC10, SC14, SC16 και SC17 αύξησαν σημαντικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, χωρίς να συνοδεύονται από αξιόλογη οιστρογόνο δράση. Από τα συνθετικά παράγωγα των διυδροστιλβενίων, το SC23 παρουσίασε επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1, ενώ δεν εμφάνισε οιστρογόνο δράση σε καμία κυτταρική σειρά ελέγχου. Οι ισοφλαβόνες SC27 και SC25 παρουσίασαν επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και εκδήλωσαν οιστρογονικότητα. Τα πρενυλιωμένα ισοφλαβονικά παράγωγα SC31 και SC33 αναδείχθηκαν ως ισχυροί διαφοροποιητικοί παράγοντες στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, χωρίς να σημειώνουν αξιόλογη οιστρογονικότητα. Το διαρυλοπροπάνιο SC40 σημείωσε επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα MC3T3-E1, αλλά και της οστεοκλαστογένεσης στα κύτταρα RAW264.7, μη ασκώντας ουσιαστικά οιστρογονικότητα σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7). Τέσσερα παράγωγα 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων (SC43-SC46), προκάλεσαν επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, με τις ενώσεις SC44 και SC45 να εκφράζουν την μεγαλύτερη επαγωγική ικανότητα στα κύτταρα MC3T3-E1. Ασθενής αγωνιστής στην κυτταρική σειρά MCF-7 χαρακτηρίστηκε μόνο η ένωση SC45, ενώ ανάλογη δραστικότητα και απουσία οιστρογόνου δράσης επέδειξαν τα 2,3-διφαινυλοπροπενοϊκά οξέα SC59 και SC60.

Στην κυτταρική σειρά RAW264.7, 19 ανάλογα εκδήλωσαν δραστικότητα μόνο στην εν λόγω κυτταρική σειρά στη συγκέντρωση 10 μM, ενώ δεν επηρέασαν ή κατέστειλαν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Τα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα SC6, SC13 χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί καταστολείς της οστεοκλαστογένεσης και στερούταν οιστρογονικότητας, ενώ η δεοξυβενζοΐνη SC3 σημείωσε μικρότερη καταστολή της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης και χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Οι τρεις προαναφερόμενες ενώσεις, όταν αξιολογήθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, αποδείχτηκαν ικανές να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Από την ομάδα των διυδροστιλβενίων, τρεις ενώσεις (SC19, SC20 και SC21) κατέστειλαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, ενώ έδρασαν κατασταλτικά και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Μεταξύ αυτών, η ένωση SC20 εκδήλωσε την υψηλότερη δραστικότητα με μηδαμινή οιστρογόνο δράση. Τα διυδροστιλβένια SC19 και SC21 εμφάνισαν καταστολή της οστεοκλαστογένεσης και χαρακτηρίστηκαν ασθενείς αγωνιστές στα κύτταρα MCF-7. Η τριμεθοξυ- ισοφλαβόνη SC24 κατέστειλε την οστεοκλαστογένεση εκδηλώνοντας μηδαμινή οιστρογόνο δράση, ενώ η μονομεθοξυ- ισοφλαβόνη SC26 σημείωσε λίγο μικρότερη κατασταλτική επίδραση και χαρακτηρίστηκε ως ασθενής αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa και MCF-7). Η χαλκόνη SC38 επίσης κατέστειλε την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και στερούταν οιστρογόνου δράσης. Αξίζει όμως να αναφερθεί, ότι μολονότι η συγκεκριμένη χαλκόνη στη συγκέντρωση 10 μM κατέστειλε τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, στις μικρότερες συγκεντρώσεις εκδήλωσε την επιθυμητή

δραστικότητα επάγοντας την έκφραση της AlkP. Τέλος, η χαλκόνη SC35 στη συγκέντρωση 10 μM παρουσίασε τοξικότητα τόσο στην κυτταρική σειρά των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7, όσο και στα κύτταρα MC3T3-E1. Τα διαρυλοπροπάνια SC42 και SC39, σημείωσαν μικρότερη ικανότητα καταστολής της οστεοκλαστογένεσης καταστέλλοντας και τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε συγκέντρωση 10 μM, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ικανοί διαφοροποιητικοί παράγοντες. Μόνο το διαρυλοπροπάνιο SC42 εκδήλωσε μικρή οιστρογονικότητα στην κυτταρική σειρά Ishikawa και μέτρια στα κύτταρα MCF-7, ενώ η ένωση SC39 στερούταν οιστρογονικότητας. Και τα δύο κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν (SC49, 53) κατέστειλαν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, με την κουμαρίνη SC49 να χαρακτηρίζεται από σημαντική οιστρογόνο δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου. Τέλος, από τα τέσσερα 2,3-διφαινυλοπροπανικά οξέα (SC48, SC50, SC54, SC56), ισχυρότερη καταστολή της διαφοροποίησης των κυττάρων RAW264.7 σε οστεοκλάστες παρουσίασαν τα SC56 και SC48, ενώ κανένα από αυτά δεν συνοδεύτηκε από οιστρογόνο επίδραση.

Δεδομένου ότι η μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων, που σημειώνεται την περίοδο της εμμηνόπαυσης, διαταράσσει την παραγωγή της μελανίνης, με συνέπεια την εμφάνιση καφέ κηλίδων - πανάδων στο δέρμα, σε δεύτερο επίπεδο εξερευνήσαμε το διττό ρόλο των συνθετικών ουσιών έναντι της προαναφερόμενης διαταραχής. Έτσι, 41 συνθετικές ενώσεις αξιολογήθηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να επάγουν τη δράση του ενζύμου τυροσινάση, ως το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδικασία της μελανογένεσης. Στη συνέχεια, επιλεγμένα συνθετικά παράγωγα ελέγχθηκαν περαιτέρω σε κυτταρικές σειρές μελανοκυττάρων B16F1 και B16F10 ως προς την ικανότητά τους να μεταβάλλουν τη δραστικότητα του ενζύμου και να επηρεάζουν την παραγωγή μελανίνης, ενώ πραγματοποιήθηκε και *in silico* μελέτη της πρόσδεσής τους με τον υποδοχέα του ενζύμου της τυροσινάσης.

Ο *in vitro* ελεύθερος κυττάρων έλεγχος, ανέδειξε έξι συνθετικά ανάλογα (SC19-SC23, SC41) ως ικανούς αναστολείς της τυροσινάσης, επιδεικνύοντας αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου μεγαλύτερη από 70%. Τα διυδροστιλβένια (SC19-SC23) χαρακτηρίστηκαν ως η δραστικότερη χημική κατηγορία, σημειώνοντας αναστολή της τάξεως του 90%. Από τα διαρυλοπροπάνια (SC39-SC42) μόνο το SC40 παρουσίασε ισχυρή αναστολή (95%), ανάλογη του διυδροστιλβενίου SC19, ενώ μέτρια δράση παρουσίασαν δύο ανάλογα προκαλώντας αναστολή από 40% έως 69%. Τα υπόλοιπα παράγωγα δεοξυβενζοϊνών (SC1-SC11) και χαλκονών (SC35-SC38), καθώς και το διαρυλοπροπάνιο SC40 σημείωσαν ασθενή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου. Μέτρια επαγωγική επίδραση εκδήλωσαν δύο ανάλογα από τις κατηγορίες των 2,3-διφαινυλοπροπενικών οξέων (SC51, SC61), ενώ το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ (SC60) σημείωσε υψηλή επαγωγή της τάξεως του 73%, χαρακτηρίζοντάς το σημαντικό επαγωγέα του ενζύμου. Τα υπόλοιπα ανάλογα των προαναφερόμενων χημικών κατηγοριών σημείωσαν ασθενή επαγωγική ικανότητα.

Ο *in vitro* κυτταρικός έλεγχος των επιλεγμένων συνθετικών ενώσεων στις σειρές B16F1 κα B16F10, ανέδειξε επίσης το διυδροστιλβένιο SC19 ως το σημαντικότερο αναστολέα τόσο

της ενεργότητας της τυροσινάσης, όσο και της παραγόμενης μελανίνης, με το διυδροστιλβένιο SC20 να ακολουθεί σε σειρά δραστικότητας. Το 2,3-διφαινυλοπροπενικό οξύ SC44 δεν προκάλεσε σημαντική καταστολή της ενεργότητας της τυροσινάσης, ενώ εμφάνισε μερική καταστολή της παραγόμενης μελανίνης (της τάξης του 20%) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τέλος, το 2,3-διφαινυλοπροπανοϊκό οξύ SC60 φάνηκε να δρα ως ενεργοποιητής της τυροσινάσης και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ η επίδρασή του στην παραγωγή μελανίνης ήταν επαγωγική στα κύτταρα B16F1 και μερικώς κατασταλτική στα B16F10.

Επόμενο στάδιο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η *in vivo* αξιολόγηση της οστεοπροστατευτικής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *Glycyrrhiza glabra* και του χαρουπιού (καρπός της *Ceratonia siliqua*) σε μοντέλο οστεοπόρωσης. Στην περίπτωση της *Glycyrrhiza glabra*, το εκχύλισμα χορηγήθηκε για έξι μήνες σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες (δόση 200 mg/kg/ημέρα) και αντιστάθμισε τη μείωση της οστικής απώλειας που προκλήθηκε από την ωοθηκεκτομή, ενώ συνετέλεσε στη διατήρηση της οστικής μάζας σε φυσιολογικά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο, οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας στην άπω μετάφυση της κνήμης ανέδειξαν την ικανότητα του εκχυλίσματος να ασκεί την οστεοπροστατευτική του δράση κυρίως στο σπογγώδες τμήμα του οστού. Μικρή αύξηση στο βάρος της μήτρας των πειραματοζώων παρατηρήθηκε συγκριτικά με την ομάδα που δεν λάμβανε το εκχύλισμα, αλλά χωρίς εικόνα υπερτροφίας, συμπεραίνοντας ότι το εκχύλισμα ασκεί κάποια δράση στον ιστό της μήτρας, γεγονός αναμενόμενο, μιας και οι ρίζες της γλυκύρριζας είναι γνωστό ότι περιέχουν φυτοοιστρογόνες ουσίες.

Στην περίπτωση του χαρουπιού, ο καρπός της *Ceratonia siliqua* ενσωματώθηκε στην τροφή των πειραματοζώων και χορηγήθηκε για έξι μήνες σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες (δόση 900 mg χαρουπιού/αρουραίο/ημέρα). Συμπερασματικά, η χορήγηση του χαρουπιού αν και δεν ήταν ικανή να αντισταθμίσει πλήρως την προκαλούμενη από την ωοθηκεκτομή οστική απώλεια, κατάφερε να την μειώσει σε σχέση με την ομάδα που δεν λάμβανε καμία παρέμβαση, κυρίως στους έξι μήνες χορήγησης και μάλιστα επιδρώντας ικανοποιητικότερα στο σπογγώδες τμήμα του οστού. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του βάρους της μήτρας των πειραματόζωων που λάμβαναν το εκχύλισα, επιβεβαιώνοντας την μη δραστικότητα του χαρουπιού στον συγκεκριμένο ιστό και οδηγώντας μας στη διαπίστωση της προφυλακτικής δράσης του χαρουπιού έναντι υπερπλασίας της μήτρας και κατ' επέκταση πιθανής καρκινογένεσης, κυρίως σε περιπτώσεις χορήγησής του σε ομάδες υψηλού κινδύνου εμφάνισης νεοπλασιών.

Συνολικά η εν λόγω διατριβή αποτελεί την πρώτη συστηματική προσπάθεια ανεύρεσης νέων φυσικών και συνθετικών προϊόντων με ευεργετική επίδραση στις διαταραχές που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση και ειδικότερα την οστεοπόρωση. Αναδείχθηκε η σημαντικότητα της αξιοποίησης αρχαίων και σύγχρονων πληροφοριών σχετιζόμενων με την ελληνική χλωρίδα για την ανεύρεση οστεοπροστατευτικών παραγόντων. Από το σύνολο των

φυτικών ειδών που μελετήθηκαν, αναδείχτηκε για πρώτη φορά η ευεργετική τους επίδραση αρκετών εκχυλισμάτων έναντι της οστεοπόρωσης και προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το φυτοχημικό περιεχόμενο τριών εξ αυτών. Προέκυψαν δέκα νέα φυσικά προϊόντα και παρασκευάσθηκαν δεκαπέντε νέα συνθετικά, τα οποία αξιολογήθηκαν ως πιθανοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες. Σημαντικό γεγονός αποτελεί η γνώση που αποκτήθηκε ως προς τις δομικές απαιτήσεις για την εκδήλωση SERM δραστικότητας και την αξιοποίησή της για την ανεύρεση νέων φυσικών ή / και την ανάπτυξη ελπιδοφόρων συνθετικών παραγόντων. Τέλος, από την παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά συγκεκριμένα συνθετικά παράγωγα με αξιόλογη ανασταλτατική (διυδροστιλβένια) ή επαγωγική δράση (διφαινυλοπροπανοϊκά οξέα) έναντι του ενζύμου τυροσινάση, με προοπτική αξιοποίησής τους στην ανάπτυξη νέων λευκαντικών παραγόντων ή παραγόντων που εμπλέκονται στην αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων.

Στους απώτερους στόχους της ερευνητικής μας ομάδας περιλαμβάνονται:

- Η αναζήτηση περισσότερων πληροφοριών παραδοσιακής θεραπευτικής, αναφορικά με την αντιμετώπιση διαταραχών που συνδέονται με την εμμηνόπαυση, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία μιας ευρύτερης βάσης δεδομένων
- Η συλλογή και άλλων φυτών, κυρίως εδώδιμων της οικογένειας Leguminosae και άλλων ειδών της ελληνικής χλωρίδας, για τα οποία έχουν ανευρεθεί σημαντικά δεδομένα σχετικά με πιθανή φυτοοιστρογόνο / οστεοπροστατευτική δράση
- Η παρασκευή εκχυλισμάτων με σύγχρονες φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές και η φυτοχημική και βιολογική τους αξιολόγηση
- Η αξιολόγηση των φυσικών μεταβολιτών και συνθετικών αναλόγων και σε άλλους βιολογικούς στόχους που σχετίζονται με τις συνέπειες της εμμηνόπαυσης
- Η φυτοχημική μελέτη και άλλων εκχυλισμάτων, τα οποία αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και έχουν δείξει αξιοσημείωτη οστεοπροστατευτική δράση
- Η αναζήτηση του μηχανισμού δράσης των δραστικών φυσικών και συνθετικών ενώσεων σε κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και οστεοκλαστών
- Η πραγματοποίηση *in vivo* αξιολόγησης των δραστικότερων παραγόντων σε μοντέλο οστεοπόρωσης θήλεων ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων
- Η περαιτέρω αξιοποίηση των δεδομένων για τη διεξαγωγή σαφών συμπερασμάτων σχέσεων δομής δράσης αναφορικά με την οστεοπροστατευτική επίδραση
- Ο σχεδιασμός νέων δραστικότερων συνθετικών αναλόγων αναφορικά με την επίδρασή τους στο ένζυμο τυρασινάση και η περαιτέρω αξιολόγησή τους σε σειρές μελανοκυττάρων.

Βιβλιογραφία

1. Abbasi, M.A., Rehman, A.U., Hussain, G., Ahmad, V.U., 2017. *In silico* study of furocoumarins from *Caryopteris odorata*: Moderate inhibitors of butyrylcholinesterase and lipoxygenase. Asian J. Chem. 29, 758-762.

2. Abdel-Hamid, R.A., Abilov, Z.A., Rhoss, S.A., Sultanova, N.A., 2016. Flavonoids and Sterols from *Zygophyllum fabago*. Chem. Nat. Compd. 52, 318-319.

3. Abdou, H.M., Yousef, M.I., El Mekkawy D.A., Al-Shami, A., 2016. Prophylactic neuroprotective efficiency of co-administration of *Ginkgo biloba* and *Trifolium pretense* against sodium arsenite-induced neurotoxicity and dementia in different regions of brain and spinal cord of rats. Food Chem. Toxicol. 94, 112-127.

4. Abe, E., Marians, R.C., Yu, W., Wu, X.B., Ando, T., Li, Y., Iqbal, J., Eldeiry, L., Rajendren, G., Blair H.C., 2003. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. Cell 115, 151-162.

5. Abreu, A.C., Coqueiro, A., Sultan, A.R., Lemmens, N., Kim, H.K., Verpoorte, R., Wammel, J.B., Simoes, M., Choi, Y.H., 2017. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: Isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. Sci. Rep. 7, 1-16.

6. Adhikari, A., Devkota, H.P., Takano, A., Masuda, K., Nakane, T., Basnet, P., Skalko-Basnet, N., 2008. Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition. Int J Cosmet Sci. 30, 353-360.

7. Aguiar, R.M., David, J.P., David, J.M., 2005. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. Phytochemistry 66, 2388-2392.

8. Aguirre, F.J.S., Milesi, V., Anon, M.C., 2007. Effect of Extraction and Precipitation Conditions During Soybean Protein Isolate Production on the Genistein Series Content. J Amer Oil Chem Soc. 84, 305-314.

9. Ah Reum, J., Kim, J.H., Yang, S.Y., Kim, Y.H., 2016. Soluble epoxide hydrolase inhibitory components from *Rheum undulatum* and *in silico* approach. J Enzyme Inhib Med Chem. 31, 70-78.

10. Ahmadu, O., Ebeshi, B.U., 2011. Isolation of antibacterial flavonoids from the aerial parts of *Indigofera secundiflora*. Pharmacogn J. 3, 25-28.

11. Ahmed, A.F., Saad, H.A.E., El-Karim, E.M.A., 2014. Two Polycyclic Geranylhydroquinone-Derived Metabolites from Roots of *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. Molecules 19, 5940-5951.

12. Ahn, S.J., M. Koketsu, H., Ishihara, S.M., Lee, S.K., Ha, K.H., Lee, T.H., Kang, S.Y., Kima, H., 2006. Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates. Chem. Pharm. Bull. 54, 281-286.

13. Ahn, S.M., Kim, H.N., Kim, Y.R., Choi, Y.W., Kim, C.M., Shin, H.K., Choi, B.T., 2016. Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia. J Ethnopharmacol. 188, 13-20.

14. Aissani, N., Coroneo, V., Fattouch, H., Caboni, P., 2012. Inhibitory Effect of Carob (*Ceratonia siliqua*) Leaves Methanolic Extract on *Listeria monocytogenes*. J. Agric. Food Chem. 60, 9954−9958.

15. Aisyah, S., Vincken, J.P., Andini, S., Mardiah, Z., Gruppen, H., 2006. Compositional changes in (iso) flavonoids and estrogenic activity of three edible *Lupinus* species by germination and Rhizopus-elicitation. Phytochemistry 122, 65-75.

16. Aisyah, S., Gruppen, H., Andini, S., Bettonvil, M., Severing, E., Vincken, J.P., 2016. Variation in accumulation of isoflavonoids in Phaseoleae seedlings elicited by *Rhizopus*. Food Chem. 196, 694-701.

17. Ait-KaciAourahoun, K., Fazouane, F., Benayache, S., 2015. Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent . Pharm Lett 5, 104-110.

18. Akhtar, M.N., Sakeh, N.M.A., Zareen, S., Gul, S., MunLo, K., Ahmad, S., 2015. Design and synthesis of chalcone derivatives as potent tyrosinase inhibitors and their structural activity relationship. J Mol Struct 10, 97-103.

19. Alam, F., Khan, G.N., Asad, M.H., 2018. *Psoralea corylifolia* L: Ethnobotanical, biological, and chemical aspects: A review. Phytother Res. 32, 597-615.

20. Al-Anazi, A.F., Qureshi, V.F., Javaid, K., Qureshi, S., 2011. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. J Nat Sc Biol Med. 2, 154-163.

21. Albright, J.A., Skinner, H.C.W., 1987. Bone: structural organization and remodeling dynamics, in: Albright, J.A., Brand, R.A. (Eds), The scientific basis of orthopaedics. Appleton and Lange, Norwalk, CT, pp. 161-198.

22. Albright, F., Bloomberg, E., Smith, P.H., 1940. Postmenopausal osteoporosis. Trans. Assoc. Am. Physicians. 55, 298 – 305.

23. Alder A.L., 1970. The History of Penicillin Production, first ed. American Institute of Chemical Engineers, New York.

24. Alemayehu, G., Abegaz, B., Snatzke, G., Duddeck, H., 1993. Bianthrones from *Senna longiracemosa*. Phytochemistry 32, 1273-1278.

25. Alexander-Lindo, R.L., Morrison, S.A., Nair, M.G., 2004. Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). Phytother Res. 18, 403-407.

26. Alexi, X., Kasiotis, K.M., Fokialakis, N., Lambrinidis, G., Meligova, A.K., Mikros, E., Haroutounian, S.A., Alexis, M.N., 2009. Differential estrogen receptor subtype

modulators: assessment of estrogen receptor subtype-binding selectivity and transcription-regulating properties of new cycloalkyl pyrazoles. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 117, 159-167.

27. Ali, A. A., El-Emary, N. A., Darwish, F. M., 1993. Studies on the constituents of two *Iris species*. Bull. Pharm. Sci. 16, 159-162.

28. Allen, O.N., Allen, E.K, 1981. The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison.

29. Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J., Helferich, W.G., 2001. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. Carcinogenesis 22, 1667-73.

30. Almeida, P. A., Fraiz, S.V., Braz-Filho, R., 1999. Synthesis and structural confirmation of natural 1,3-diarylpropanes. J Brazil Chem. 10, 347-353.

31. Amesty, A., Burgueño-Tapia, E., Joseph-Nathan, P., Ravelo, A.G., Estévez-Braun, A., 2011. Benzodihydrofurans from *Cyperus teneriffae*. J. Nat. Prod. 74, 1061 – 1065.

32. Amico, F.P., Sorce, E.G., 1997. Medical plants and phytotherapy in Mussomeli area (Caltanisetta, Sicily, Italy). Fitoterapia 68, 143-159.

33. Amit, S., Poonam, D., Kshitiz, K.S. Singh, S. Tejovathi, G., 2012, Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β-Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. Sci. Sec. J. 1, 9-13.

34. Ammar, R. B., Kilani, S., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Ghehidra, L., Ghehidra, K., 2005. *In vitro* mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activity of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) extracts. Pak. J. Biol. Sci. 8, 439 – 45.

35. Ammar, R.B., Kilani,S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Sghaier, M.B., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2008. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. Drug Chem.Toxicol. 31, 61-80.Ammosov, A.S., Litvinenko, V.I., 2007. Phenolic compounds of the genera *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. et Mey. (review). Pharm. Chem. J. 41, 30-52.

36. Antri, A.E, Messouri, I., Bouktaib, M., El Alami, R., Bolte, M., ElBali, B., Lachkar, M., 2004. Isolation and x-ray crystal structure of a new isoquinoline-N-oxide alkaloid from *Calycotome villosa* subsp. intermedia. Fitoterapia 75, 774-778.

37. Antri, A.E, Messouri, I., Bouktaib, M., El Alami, R., Bolte, M., ElBali, B., Lachkar, M., 2004. Isolation and X-ray crystal structure of tetrahydroisoquinoline alkaloids from Calycotome villosa subsp. intermedia. Molecules 9, 650-657.

38. Antri, A.E., Lackhar, N., El Hajjaji, H., Gaamoussi, F., Lyoussi, B., ElBali, B., Morel, N., Allouchi, H., Lackhar, M., 2010. Structure elucidation and vasodilator activity of methoxy flavonols from *Calycotome villosa* subsp. intermedia. Arab. J. Chem. 3, 173-178.

39. Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Uribe, J.A., López-Pacheco, F., Alvarez, M.M, Serna-Saldívar, S., 2015. *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. Ind Crops Prod. 16, 803-808.

40. Aourahoum, K., Aissaoui, M., Fazouane, F., Larit, F., Chalard, P., Chalchat, J.C., Figueredo, A., 2013. Essential oil of *Cytisus triflorus* L' Her. Pharm Lett 5, 276-279.

41. Arao, T., Idzu, T., Kinjo, J., Nohara, T., Isobe, R., 1996. Oleanene-Type Triterpene Glycosides from *Puerariae Radix.* III.Three New Saponins from *Pueraria thomsonii*. Chem Pharm Bull. 44, 1970-1972.

42. Arao, Tomonori, Udayama, M., Kinjo, J., Nohara, T., Funakoshi, T., Kojima, S., 1997. Preventive effects of saponins from *Puerariae* Radix (the root of *Pueraria lobata* OHWI) on *in vitro* immunological injury of rat primary hepatocyte cultures. Biol.Pharm.Bull. 20, 988-991.

43. Archila, A.G., Cuca Suarez, L.E., 2018. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudata* from Colombia. Nat Prod Res. 32, 195-201.

44. Arcorac, V., Atteritano, M., Squadrito, F., D'Anna, R., Marini, H., Santoro, D., Minutoli, L., Messina, S., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Antiosteoporotic Activity of Genistein Aglycone in Postmenopausal Women: Evidence from a Post-Hoc Analysis of a Multicenter Randomized Analysis of a Multicenter Randomized Controlled Trial. Nutrients 9, 1-7.

45. Arlot, M.E., Jiang, Y., Genant, H.K., Zhao, J., Burt-Pichat, B., Roux, J.P., 2008. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. J Bone Miner Res. 23, 215-222.

46. Armelagos, G.J., Kolbacher, K., Collins, K., Cook, J., Krafeld-Daugherty, M., 2001. Tetracycline consumption in prehistory, in Nelson M., Hillen W., Greenwald R.A. (Eds), Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine, Birkhäuser, Basel, pp. 219-236.

47. Ashmawy, N.S., Ashour, M.L., Wink, M., El-Shazly, M., Chang, F,R, Swilam, N., Abdel-Naim, A,B, Ayoub, N., 2016. Polyphenols from *Erythrina crista-galli*: Structures, molecular docking and phytoestrogenic activity. Molecules 21, 1-14.

48. Ateba, S.B., Njamen, D., Gatterer, C., Scherzer, T., Zehl, M., Kählig, H., Krenn, L., 2016. Rare phenolic structures found in the aerial parts of *Eriosema laurentii* De Wild. Phytochemistry 128, 5-11.

49. Aubin, J.E., 2001. Regulation of osteoblast formation and function. Rev. Endocr. Metab. Disord. 2, 81-94.

50. Aubin, J.E., 1998. Advances in the osteoblast lineag. Biochem. Cell Biol. 76, 899 – 910.

51. Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, M., 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. J. Food Compos. Anal. 10, 166-172.

52. Avallone, R., Cosenza, F, Farina, F., Baraldi, C., Baraldi, M., 2002. Extraction and purification from *Ceratonia siliqua* of compounds acting on central and peripheral benzodiazepine receptors. Fitoterapia 73, 390-396.

53. Ayaz, F.A., Torun, H., Ayaz, S., Correira, P.J., Alaiz, M., Sanz, C., Gruz, J., Strnad, M., 2007. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. J. Food Quality 30, 1040 – 1055.

54. Azzouzi, S., Zaabat, N., Medjroubi, K., Akkal, S., Benlabed, K., Smati, F., Dijoux-Franca, M.G., 2014. Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae). Asian Pac J Trop Med. 7, 481-484.

55. Bae, U.J., Song, M.U., Jang, H.U., Lim, J.M., Lee, S.U., Ryu, J.H., Park, B.H., 2015. Emodin isolated from *Rheum palmatum* prevents cytokine-induced β-cell damage and the development of type 1 diabetes. J Funct Foods 16, 9-19.

56. Baek, J.M., Kim, J.Y., Lee, C.H., Yoon, K.H., Lee, M.S., 2017. Methyl gallate inhibits osteoclast formation and function by suppressing Akt and Btk-PLCγ2-Ca2+ signaling and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss. Int J Mol Sci.18, 1-14.

57. Baek, Y.S., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ha, T.J., Rengasamy, R., Yang, M.S., Park, K.H., 2009. Tyrosinase inhibitory effects of 1,3-diphenylpropanes from *Broussonetia kazinoki*. Bioorg Med Chem. 17, 35-41.

58. Balaban, M., 2004. Identification of the Main Phenolic Compounds in Wood of *Ceratonia siliqua* by GC-MS. Phytochem. Anal. 15, 385–388.

59. Balasubramanian, S., Ward, D.L., Nair, M.G., 2000. The first isolation and crystal structure of a boron difluoro complex (isoflavone yellow). Biologically active intermediates produced during isoflavone synthesis. J Chem Soc Perkin Trans. 1 31, 567-569.

60. Balkan, I.A., Gören, A.C., Kırmızıbekmez, H., Yeşilada, E., 2017. Evaluation of the *in vitro* Anti-inflammatory Activity of *Nerium oleander* L. Flower Extracts and Activity-Guided Isolation of the Active Constituents. Rec. Nat. Prod. 12, 128-141.

61. Bandeira Reidel, R.V., Giovanelli, S., Pipitone, A., Minissale, P., Pistelli, L., 2017. Phytochemical study of *Bituminaria basaltica* aerial parts, an Italian endemism. Nat. Prod. Res. 31, 2375 – 2380.

62. Bandyopadhyay, S., Lion, J.M., Mentaverri, R., Ricupero, D.A., Kamel, S., Romero, J.R., Chattopadhyay, N., 2006. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. Biochem. Pharmacol. 72, 184-197.

63. Barend, B., Brandt, E.V, Ferreira, D., 1986. Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. Phytochemistry 26, 531 – 535.

64. Barrett-Connor, E., Bush, TL., 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. JAMA 265, 1861-1867.

65. Barrett-Connor, E., Mosca, M., Collins, P., Geiger, M.J., Grady, D., Kornitzer, M., McNabb, M., Wenger, N., 2006. Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. N Engl J Med. 355, 125–137.

66. Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C., Santos-Buelga, C., 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. Food Chem Toxicol. 50, 1576–1582.

67. Bashir, A., Hamburger, M., Msonthi, J., Hostettmann, K., 1992. Isoflavones and xanthones from *Polygala virgata*. Phytochemistry 31, 309-311.

68. Bastian, B.C., 2014. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu. Rev. Pathol. 9, 239-271.

69. Basu, A., SundarDas, A., Sharma, M., Pathak, M.P., Chattopadhyay, P., Biswas, K., Mukhopadhyay, R., 2017. STAT3 and NF-κB are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. Biochem Biophys Rep. 12, 54-61.

70. Batista, M.T., Gomes, E.T., 1993. C-Glycosylflavones from *Ceratonia siliqua* cotyledons. Phytochemistry, 34, 1191-193.

71. Battaini, G., Monzani, E., Casella, L., 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. J Biol Inorg Chem. 5, 262–268.

72. Baydar, N.G., Baydar, H., 2013. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. Ind Crops Prod. 41, 375–380.

73. Baylink, D.J., Finkelman, R.D., Mohan, S., 1993. Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res. 8, 565-572.

74. Baytop, T., 1984. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), first ed. Istanbul University Publication, Istanbul.

75. Beale, C.M., Collins, P., 1996. The menopause and the cardiovascular system. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 10, 483-513.

76. Bednarek, P., Frański, R., Kerhoas, L., Einhorn, J., Wojtaszek, P., Stobiecki, M., 2001. Profling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. Phytochemistry 56, 77-85.

77. Bell, L.W, Moore, G.A, Ryan, M.H, Ewing, M.A., 2006. Comparative water use of *Dorycnium hirsutum*, lucerne- and annual legume-based pastures in the wheatbelt of Wes. Aust J Agric Res. 57, 857–865.

78. Bell, L., Ewing, M.A., Ryan, M., Moore, G., 2008. Prospects for three *Dorycnium* species as forage plants in agricultural systems: a review of their agronomic characteristics. Aust. J. Chem Exp. Agric. 48, 467–479.

79. Benchiha, W., Mahroug, S., Aoued, L., Bouterfas, K., 2017. Antihepatoxic activity of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) leaves extracts. Phytothérapie, 15, 10-15.

80. Bendich, A., Leader, S., Muhuri, P., 1999. Supplemental calcium for the prevention of hip fracture: potential health-economic benefits. Clin Ther. 21, 1058-1072.

81. Bernard, P., Berthon, J.Y., 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. Int J Cosmet Sci., 22, 219-226.

82. Berroukche, A., Miloud, S., Khaled, K., Ammour, K., 2015. Hepatoprotective effects of the decoction and macerated leaves of *Rhamnus alaternus* L. on rats exposed to carbon tetrachloride. J. Pharmacognosy Phytother 7, 253-262.

83. Bertoli, A., Menichini, F., Noccioli, C., Morelli, I., Pistelli, L., 2004. Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa.* L. Flavour Fragr. J. 19, 166–171.

84. Beutler, J.A., 2010. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. Curr Protoc Pharmacol. 46, 1-30.

85. Bharathi, R., Rajendiran, V., Kasinathan, N.K., Venkatabalasubramanian, S., Murali, M.R., Devaraj, H., Devaraj, S., 2017. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. Food Chem Toxicol. 106, 92-106.

86. Bhargavan, B., Singh, D., Gautam, A.K., Mishra, J.S., Kumar, A., Goel, A., Dixit, M., Pandey, R., Manichavasagam, L., Dwivedi, S.D., Chakravarti, B., Jain, G.K., Ramachandran, R., Maurya, R., Trivedi, A., Chattopadhyay, N., Sanyal, S., 2012. Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and propromotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor b mediated osteogenic action of medicarpin. Nutr. Biochem. 23, 27-38.

87. Bhat, B.A., Dhar, K.L., Puri, S.C., Saxena, A.K., Shanmugavel, M., Qazi, G.N., 2005. Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. Bioorganic Med. Chem. Lett. 12, 3177-3180.

88. Bhouri, W., Sghaier, M.B., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Ghedira, L.C., 2011. Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-β-isorhamninoside. Food Chem. Toxicol. 49, 1167-1173.

89. Bhouri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2012. Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-β-isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. S. Afr. J. Bot. 80, 57-62.

90. Bianco, G., Pascale, R., Carbone, C.F., Acquavia, M.A., Cataldi, T.R.I., Schmitt-Kopplin, P., Buchicchio, A., Russo, D., Milella, L., 2018. Determination of soyasaponins in Fagioli di Sarconi beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by LC-ESI-FTICR-MS and evaluation of their hypoglycemic activity. Anal Bioanal Chem. 410, 1561-1569.

91. Bilezikian, J.P., Rubin, M.R., Finkelstein, J.S., 2005. Parathyroid hormone as an anabolic therapy for women and men. J Endocrinol Invest. 28, 41-49.

92. Binkley, N., Bone, H., Gilligan, J.P., Krause, D.S., 2014. Efficacy and safety of oral recombinant calcitonin tablets in postmenopausal women with low bone mass and increased fracture risk: a randomized, placebo-controlled trial. Osteoporos Int. 25, 2649-2656.

93. Biondi, D., Rocco, C., Ruberto, G., 2005. Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* leaves. J Nat Prod. 38, 1099-1102.

94. Birari, R.B., Bhutani, K.K., 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug Discov. 12, 879-889.

95. Birari, R.B., Gupta, S., Mohan, C.G., Bhutani, K.K., 2011. Antiobesity and lipid lowering effects of *Glycyrrhiza* chalcones: Experimental and computational studies. Phytomedicine 18, 795-811.

96. Bisio, A., Fraternale, D., Schito, A.M., Parricchi, A., DalPiaz, F., Ricci, D., Giacomini, M., Ruffoni, B., De Tommasi, N., 2016. Establishment and analysis of *in vitro* biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. Phytochemistry 122, 276-285.

97. Black, D.M., Thompson, D.E., Bauer, D.C., Ensrud, K., Musliner, T., Hochberg, M.C., Nevitt, M.C., Suryawanshi, S., Cummings, S.R., 2000. Fracture risk reduction

with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. J Clin Endocrinol Metab. 85, 4118-4124.

98. Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J., 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Integrative Medicine Communications, Newton.

99. Bo, L., Yang, N., Ling-Juan, Z., Feng-Bo, W., Fei, Y., Xue, Z., Xin-Sheng, Y., 2015. Flavonoids from *Matteuccia struthiopteris* and Their Anti-influenza Virus (H1N1) Activity. J. Nat. Prod. 78, 987-995.

100. Boardley, M., Stirton, H.C., Harborne, J.B.A., 1986. Chemotaxonomic Survey of the Tribe Psoraleeae in Africa. Biochem Syst Ecol. 14, 603-613.

101. Bolognia, J.L., Sodi, S.A., Osber, M.P., Pawelek, J.M., 1995. Enhancement of depigmenting effect of hydroquinone by cystamine and buthionine sulfoximine. Br J Dermatol 133, 49-57.

102. Bonaventure, J., Domingues, M.J., Larue, L., 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells.Pigment Cell Melanoma Res. 26, 316-325.

103. Booth, N.L., Piersen, C.E., Banuvar, S., Geller, S.E., Shulman, L.P., Farnsworth, N.R., 2006. Clinical studies of red clover (*Trifolium pratense*) dietary supplements in menopause: A literature review. Menopause 13, 251-264.

104. Botanical.com - A Modern Herbal, 1995. Liquorice. https://www.botanical.com/botanical/mgmh/l/liquor32.html (accessed 21 November 2016).

105. Botanical Names, 2003. calflora.net (accessed 21 November 2016).

106. Bouattour, E., Affes, M., Fakhfakh, J., Jarraya, J., 2017. Chemical Constituents of *Echinops spinosus* from Tunisia. Chem. Nat. Compd. 53, 984-987.

107. Boulet, M.J., Oddens, B.J., Lehert, P., Vemer, H.M., Visser, A., 1994. Climacteric and menopause in seven south-east Asian countries. Maturita*s* 19, 157-176.

108. Boué, S.M., Burow, M.E., Wiese, T.E., Shih, B.Y., Elliott, S., Carter-Wientjes, C.H., McLachlan, J.A., Bhatnagar, D., 2011. Estrogenic and Antiestrogenic Activities of phytoalexins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food Chem. 59, 112-120.

109. Boumaza, O., Seghiri, R., Mekkiou, R., Benayache, F., 2006. Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata.* Chem. Nat. Compd. 42, 730-731.

110. Bourgaud, F., Bouque, V., Guckert, A., 1999. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. 56, 97-104.

111. Bouzaiene, N.N., Chaabane, F., Sassi, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2016. Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Life Sci. 144, 80–85.

112. Brandli, A., Simpson, J.S., Ventura, S., 2010. Isoflavones isolated from red clover (*Trifolium pratense*) inhibit smooth muscle contraction of the isolated rat prostate gland. Phytomedicine 17, 895-901.

113. Bremnera, P., Riverab, D., Calzadoc, M.A., Obónd, C., Inocenciob, C., Beckwitha, C., Fiebiche, B.L., Mu˜nozc E., Heinricha, M., 2009. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. J. Ethnopharmacol. 124, 295–305.

114. Brenner, M., Hearing, V.J., 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochem. Photobiol. 84, 539–549.

115. Briancon, D., Meunier, P.J., 1981. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. Orthop. Clin. North Am. 12 629-648.

116. Briganti, S, Camera, E, Picardo, M., 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. Pigment Cell Res. 16, 101-110.

117. Brown, D.L., Buchbinder, M., 1996. Incidence, predictors, and consequences of coronary dissection following high-speed rotational atherectomy. Am J Cardiol. 78, 1416-1419.

118. Bruneton, J., 2001. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, second ed. Lavoisier Tec &Doc, Paris.

119. Brzozowski, A. M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature 389, 753-758.

120. Buckingham, J., 1994. Phytochemical dictionary of the Leguminosae / Ildis, International Legume Database and Information Service and CHCD, first ed. Chapmann & Hall, London; New York.

121. Buckle, D.R., Arch, J.R.S., Boering, N.E., Foster, K.A., Taylor, J.F., Taylor, S.G., 1993. Relaxation effect of potassium channel activators BRL 38227 and Pinacidil on guinea-pig and human airway smooth muscle, and blockade of their effects by Glibenclamide and BRL 31660. Pulm Pharmacol. 6, 77-86.

122. Buckles, R.E., Bellis, M.P. Coder, W., 1951. Amine-catalyzed condensations of benzaldehydes with phenylacetic acids. J. Am. Chem. Soc. 73, 4972-4974.

123. Bulama, J.S., Dangoggo, S.M., Mathias, S.N., 2015. Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of Terminalia. J Sci Res. 5, 8-10.

124. Burger, H.G., Dudley, E.C., Robertson, D.M., Dennerstein, L., 2002. Hormonal Changes in the Menopause Transition. Recent Prog Horm Res. 57, 257 – 275.

125. Burt, V.L., Whelton, P., Roccella, E.J., Brown, C., Cutler, J.A, Higgins, M., Horan, M.J., Labarthe, D., 1995. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1991. Hypertension 25, 305-313.

126. Barton, D.L., Loprinzi, C.L., Quella, S.K., Sloan, J.A., Veeder, M.H., Egner, J.R., Fidler, P., Stella, P.J., Swan, D.K., Vaught, N.L., Novotny, P., 1998. Prospective evaluation of vitamin E for hot flushes in breast cancer survivors. J Clin Oncol. 16, 495-500.

127. Butkute, B., Dagilyte, A., Benetis, R., Padarauskas, A., Ceseviliene, J., Olšauskaite, V., Lemeziene, N., 2018. Mineral and Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Herbal Material from Two Temperate *Astragalus* Species. BioMed Res Int. 2018, 1-11.

128. Button, B., Patel, N.W., 2004. Phytoestrogens for Osteoporosis. Clin Rev Bone Miner Metab. 2, 341-356.

129. Byun, M.R., Jeong, H., Bae, S.J., Kim, A.R., Hwang, E.S., Hong, J.H., 2012. TAZ is required for the osteogenic and anti-adipogenic activities of kaempferol. Bone 50, 364-372.

130. Cai, Y.X., Zhang, J.Y., 2009. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on bone metabolism in ovariectomized osteoporotic rats. CRTER 13, 268-271.

131. Calderon Montano, M., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. Mini Rev Med Chem. 11, 298-344.

132. Campos, F. M., Couto, J. A., Hogg, T. A., 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii.* J Appl Microbiol. 94, 167-174.

133. Canalis, E., McCarthy, T.L., 1989. Centrella, M. The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrinol Metab Clin North Am. 18, 903-918.

134. Canalis, E., Delany, AM., 2002. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. Ann N Y Acad Sci. 73-81.

135. Canalis, E., McCarthy, T.L., Centrella, M.,1989. The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrinol Metab Clin North Am. 18, 903-918.

136. Cao, P.C., Xiao, W.X., Yan, Y.B., Zhao, X., Liu, S., Feng, J., Zhang, W., Wang, J., Feng, Y.F., Lei, W., 2014. Preventive Effect of Crocin on Osteoporosis in an Ovariectomized Rat Model. Evid Based Complement Alternat Med. 1-11.

137. Cao, X., Jiang, J., Zhang, S., Zhu, L., Zou, J., Diao, Y., Xiao, W., Shan, L., Sun, H., Zhang, W., Huang, J., Li, H., 2013. Discovery of natural estrogen receptor

modulators with structure-based virtual screening. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 3329 – 3333.

138. Carr, M.C., 2003. The emerge of the metabolic syndrome with menopause. J Clin Endroclinol Metab. 88, 2404-11.

139. Castro, V., 2001. Chromium and zinc in a series of plants used in Portugal in theherbal treatment of non-insulinized diabetes. Acta Alimentaria 30, 333-342.

140. Cavalieri, E.L., Li, K.M., Balu, N., Saeed, M., Devanesan, P., Higginbotham, S., Zhao, J., Gross, M.L., Rogan, E.G., 2002. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. Carcinogenesis 23, 1071 – 1077.

141. Cenci, S., Weiltzmann, M.N., Gentile, M.A., Aisa, M.C., Pacifici, R., 2000.M-CSF Neutralization and egr-1 Deficiency Prevent Ovariectomy-Induced Bone Loss. J Clin Invest 105, 1279-1287.

142. Ceresuela, J.L., González Andrés, F., 1998. Chemical composition of some Iberian Mediterranean leguminous shrubs potentially useful for forage in seasonally dry areas. New Zeal. J. Agr. Res. 41, 139-147.

143. Chad, L., Claus, C., 1993. Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 94, 646 – 650.

144. Chae, H.J., Chae, S.W., Yun, D.H., Keum, K.S., Yoo, S.K., Kim, H.R., 2004. Prevention of bone loss in ovariectomized rats: the effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts. Immunopharmacol Immunotoxicol. 26, 135-144.

145. Chaita, E., Lambrinidis, G., Cheimonidi, C., Agalou, A., Beis, D., Trougakos, I., Mikros, E., Skaltsounis, A.L., Aligiannis, N., 2017. Anti-Melanogenic Properties of Greek Plants. A Novel Depigmenting Agent from *Morus alba* Wood. Molecules 22, 1-14.

146. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y, Komoto, M, Ichihashi, M., 1998. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Res. 11, 206-212.

147. Champavier, Y., Allais, D.P., Chulia, A.J., Kaouadji, M., 2000. Acetylated and non-acetylated flavonol triglycosides from *Galega officinalis*. Chem. Pharmacol. Bull. 48, 281 – 282.

148. Chang, T.S., Ding, H.Y., Tai, S.K., Wu, C.Y., 2007. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. Food Chem. 105, 1430-1438.

149. Chao, N., Adila, T., Gen Li, Madina, K., Dong, C., Aisa, H.A., 2017. Design, synthesis and bioactivity of chalcones and its analogues. Chin. Chem. Lett. 1533-38.

150. Charkoudian, N., 2003. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. Mayo Clin Proc. 78, 603-612.

151. Chaturvedi, P.K., Bhui, K., Shukla, Y., 2008. Lupeol: connotations for chemoprevention. Cancer Lett. 263, 1 -13.

152. Chaves, E.A., Santos de Barros, S., Oliveira, M.C.C, Sant'Anna, S.M.R., Ferreira, A.B.B., Silva, F.A., Cesarin-Sobrinho, D., Netto-Ferreira, J.C., 2017. Biological interactions of fluorinated chalcones: Stimulation of tyrosinase activity and binding to bovine serum albumin. J. Fluorine Chem. 199, 30–38.

153. Chekalina, N., Burmak, Y., Petrov, Y., Borisova, Z., Manusha, Y., Kazakov, Y., Kaidashev, I., 2018. Quercetin reduces the transcriptional activity of NF-kB in stable coronary artery disease. Indian Heart J. in press.

154. Chen H.Y., Lin Y.H., Wu J.C., Chen Y.C., Yang S.H., Chen J.L. Chen T.J., 2011. Prescription patterns of Chinese herbal products for menopausal syndrome: Analysis of a nationwide prescription database. J. Ethnopharmacol. 137, 1261-1266.

155. Chen, G., Guo, M., 2017. Screening for natural inhibitors of topoisomerases i from Rhamnus davurica by affinity ultrafiltration and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. Front Plant Sci. 8, 1-11.

156. Chen, G., Li, X., Saleri, F., Guo, M., 2016. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. Molecules 21, 1-14.

157. Chen, K.M., Ge, B.F., Ma, HP, Liu, XY, Bai, MH, Wang, Y., 2005. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. Pharmazie 60, 939 – 942.

158. Chen, M., Liu, L., Chen, X., 2014. Preparative isolation and analysis of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis* root using ultrafiltration combined with high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography. J Sep Sci. 37, 1546 – 1551.

159. Chen, S., Wang, Y., Yang, Y., Xiang, T., Liu, J., Zhou, H., Wu, X., 2017. Psoralen Inhibited Apoptosis of Osteoporotic Osteoblasts by Modulating IRE1-ASK1-JNK Pathway. BioMed Res Int. 1-9.

160. Chen, T., Chen, C., Li, Y., Sun, J. 2013. Preparation method for chemical reference substances of anthraquinone glucoside and stibene glucoside in rheum officinale medicinal material. Europena Patent Office. CN103408613.

161. Chen, X., Garner, S.C, Quarles, L.D, Anderson, J.J., 2003. Effects of genistein on expression of bone markers during MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation. J Nutr Biochem. 14, 342-9.

162. Chen, X., Zhang, S., Chen, X., Hu, Y., Wu, J., Chen, S., Chang, J, Wang, G., Gao, Y., 2017. Emodin promotes the osteogenesis of MC3T3- E1 cells via BMP-

9/Smad pathway and exerts a preventive effect in ovariectomized rats. Acta Biochim Biophys Sin. 49, 867 – 878.

163. Chen, Y., Lv, L., Pi, H., Qin, W., Chen, J., Guo, D., 2016. Dihydromyricetin protects against liver ischemia/reperfusion induced apoptosis via activation of FOXO3a-mediated autophagy. Oncotarget. 7, 76508-76522.

164. Chen, Y.J., Cai, W.X., Xu, B.J., 2017. Phytochemical Profiles of Edible Kudzu (*Pueraria thomsonii* Benth) Grown in China as Affected by Thermal Processing. J Food Process Preserv. 41, 1-7.

165. Chen, H.Y. and Lin Y.H., Wu J.C., Chen Y.C., Yang S.H., Chen J.L. Chen T.J., 2011. Prescription patterns of Chinese herbal products for menopausal syndrome: Analysis of a nationwide prescription database. J Ethnopharmacol. 137, 1261-1266.

166. Chen, X., Ren, S., Zhu, G., Wang, Z., Wen, X., 2017. Emodin suppresses cadmium-induced osteoporosis by inhibiting osteoclast formation. Environ Toxicol Pharmacol. 54, 162-168.

167. Cheng, S., Tylavsky, F, Carbone, L., 1997. Utility of ultrasound to assess risk of fracture. J Am Geriatr Soc. 45, 1382-1394.

168. Cherkasov, A., Shi, Z., Fallahi, M., Hammond, G.L., 2005. Successful *in Silico* Discovery of Novel Nonsteroidal Ligands for Human Sex Hormone Binding Globulin. J. Med. Chem. 48, 3203-3213.

169. Canadian NHP Market: Headed In The Right Direction, 2012. http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2012-11/view_features/canadian-nhp-market-headed-in-the-right-direction (accessed 21 November 2016)

170. Chesnut, C.H., Silverman S., Andriano K., Genant H., Gimona A., Harris S., Kiel D., LeBoff M., Maricic M., Miller P., Moniz C., Peacock M., Richardson P., Watts N., Baylink D., 2000. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. Am. J. Med. 109, 267-276.

171. Chia, Y., Rajbanshi, R., Calhoun, C., Chiu, R.H., 2010. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of Toona sinensis leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. Molecules 15, 8377-8389.

172. Chiavaroli, A., La, VD, Orlando, G, Menghini, L, Epifano, F, Grenier, D., 2008. *Rhamnus alpinus* Leaf Extract Suppresses Lipopolysaccharide-Induced, Monocyte-Derived Macrophage Chemokine Secretion. Inflammation 31, 313-318.

173. Chin, Y.W, Balunas, M.J., Chai, H.B, Kinghorn, A.D., 2006. Drug Discovery From Natural Sources. AAPS J. 8, 239 – 253.

174. Chkadua, N.F., Alaniya, M.D., Kemertelidze, E.K., 1996. Flavonoid glycosides of the leaves of *Pueraria hirsuta*. Chem. Nat. Compd. 32, 921-921.

175. Chlebowski, R.T., Anderson, G.L., Gass, M., Lane, D.S., Aragaki, A.K., Kuller, L.H., Manson, J.E., Stefanick, M.L., Ockene, J., Sarto, G.E., Johnson, K.C., Wactawski-Wende, J., Ravdin, P.M., Schenken, R., Hendrix, S.L., Rajkovic, A., Rohan, T.E., Yasmeen, S., Prentice, R.L., 2010. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. JAMA 304, 1684-1692.

176. Cho, H.J., Jeong, S.G., Park, J.E., Kang, H.R., Lee, D., Song, M.J., 2013. Antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses. Antiviral Research. 100, 75-83.

177. Choi, C., Cho, H., Park, J., Cho, C., Song, Y., 2003. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFκB activation in RAW 264.7 macrophages. Biosci Biotechnol Biochem. 67, 1916-1922.

178. Choi, E.M., 2011. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. Food Chem. Toxicol. 49, 1800-1805.

179. Choi, E.M., 2005. The licorice root derived isoflavan glabridin increases the function ofosteoblastic MC3T3-E1cells. Biochem.Pharmacol. 70, 363 – 368.

180. Choi, E.M., Hwang, J.K., 2003. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. Biol. Pharm. Bull. 26, 523 – 526.

181. Choi, E. M., 2011. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. Food Chem. Toxicol. 49, 1800-1805.

182. Choi, E. M., 2012. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Exp Toxicol Pathol. 64, 211-216.

183. Choi, E.M., Hwang, J.K., 2003. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. Biol Pharm Bull 26, 523-526.

184. Choi, E.M., 2007. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-α-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Pharmazie 62, 216-220.

185. Choi, J., Kang, H.J., Kim, S.Z., Kwon, T.O., Jeong, S.I., Jang, S.I., 2013. Antioxidant effect of astragalin isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. Arch Pharm Res. 36, 912-917.

186. Choi, S.J., Hong, Y.D., Lee, B., Park, J.S., Jeong, H.W., Kim, W.G., Shin, S.S., Yoon, K.D., 2015. Separation of Polyphenols and Caffeine from the Acetone Extract of Fermented Tea Leaves (*Camellia sinensis*) Using High-Performance Countercurrent Chromatography. Molecules 20, 13216-13225.

187. Choi, Y.H., Hong, S.S., Shin, Y.S, Hwang, B.Y., Park, S.Y, Lee, D., 2010. Phenolic Compounds from *Pueraria lobata* Protect PC12 Cells against Aβ-induced toxixcity. Arch Pharm Res. 33, 1651-1654.

188. Chong, C.P., 2011. Effects of *Crocus Sativus* Extract on Treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. Master thesis.

189. Chopra, B., Dhingra, A.K., Dhar, K.L., 2013. *Psoralea corylifolia* L. (Buguchi) – folklore to modern evidence. Fitoterapia 90, 44 – 56.

190. Chou, H.C., Chen, J.J., Duh, C.Y., Huang, T.F., Chen, I.S., 2005. Cytotoxic and Anti-Platelet Aggregation Constituents from the Root Wood of *Melicope semecarpifolia*. Planta Med. 71, 1078-1081.

191. Christiansen, C., 1991. Consensus Development Conference: Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. Am J Med. 90, 107-110.

192. Clarke, D.J., Robinson, R.S., 2002. Synthesis of thio- and oxo-analogues of isopsoralen. Tetrahedron 58, 2831-2837.

193. Co§kun, M., Satake, T., Hori, K., Saiki, Y., Tanker, M., 1990. Anthraquinone glycosides from *Rhamnus libanoticus*. Phytochemistry 29, 2018-2020.

194. Cohen, M.M., 2006. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinicalcorrelates. Am J Med Genet Part A. 140, 2646 – 2706.

195. Cohick, W.S., Clemmons, D.R., 1993. The insulin-like growth factors. Ann Rev Physiol. 55, 131-53.

196. Colegate, S.M., Molyneux, R.J., 2008. Bioactive Natural Products Detection, Isolation and Structural Determination, second ed. CRC Press, Boca Raton.

197. Compston, J.E., 1990. Osteoporosis. Clin. Endocrinol. 33, 653-682.

198. Compston, J.E., 2001. Sex steroids and bone. Physiol Rev. 81, 419-7.

199. Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F., 2009. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. Fitoterapia 80, 62-67.

200. Conserva, L.M., Gottlieb, M., Yoshida O.R., 1990. Diarylpropanes from *Iryanthera ulei.* Phytochemistry 29, 3986-3988.

201. Cook, C.L., Siow, Y., Taylor, S., Fallat, M.E., 2000. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. Fertil Steril. 73, 859 – 61.

202. Cooper, A., 1824. Treatise on dislocations and on fractures of the joints, fourth ed. Longman, London.

203. Cornish, J., Callon, K.E., Bava, U., Lin, C., Naot, D., Hill, B.L., Grey, A.B., Broom, N., Myers, D.E., Nicholson, G.C., 2002. Leptin directly regulates bone cell function *in vitro* and reduces bone fragility *in vivo*. J Endocrinol. 2, 405-15.

204. Corona, G.L., Arbasino, M., 1963. Chemical and pharmacopharmacological research on *Rhamnus alpina.* Filoterapia 34, 73 – 78.

205. Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., Baraldi, M., 2002. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. Fitoterapia 73, 674 – 684.

206. Coskun, M., 1992. HPLC analysis of the anthroquinones from *Rhamnus* species growing in Turkey. Int. J. Pharmacogn. 30, 151-156.

207. Coskun, M., Tanker, N., Sakushima, A., Kitagawa, S., Nishibe, S., 1984. Studies on constituents of *Rhamnus pallasii*. Part 2. An anthraquinone glycoside from *Rhamnus pallasii*. Phytochemistry 23, 1485-1487.

208. Costin, G.E., Hearing, V.J., 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. FASEB J. 21, 976 – 994.

209. Cottiglia, F., Casu, L., Bonsignore, L., Casu, M., Floris, C., Leonti, M., Gertsch, J., Heilmann, J., 2005. New cytotoxic prenylated isoflavonoids from *Bituminaria morisiana.* Planta Med. 71, 254-260.

210. Coudrier, E., 2007. Myosins in melanocytes: to move or not to move. Pigment Cell Res. 20, 153-156.

211. Cragg, G.M., Newman, D.J., 2001. Natural product drug discovery in the next millennium. Pharm. Biol. 39, 8-17.

212. Crespo, I., García-Mediavilla, M.V, Almar, M., González, P, Tuñón, M.J, Sánchez-Campos, S, González-Gallego, J., 2008. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. Food Chem. Toxicol. 46, 1555-1569.

213. Cristofolini, G., Troia, A.,2006. A reassessment of the sections of the genus. Taxon. 55, 733-746.

214. Cui, L., Zou, L.Y., Liu, Y., Al-Chun, M., Wu, T., Wu, Y., 2004. Preventing cancellous bone loss insteroid-treated rats and stimulating boneformation by water extract of *Salvia miltiorrhixa* and danshensu. Chin Pharm Bull. 20, 286-291.

215. Cui, N., Kinjo, N., 1993. Chemical constituents of *Astragali Semen*. Chem Pharm Bull. 41, 178-182.

216. Çulhaoğlu, B., Hatipoğlu, S.D., Dönmez, A.A., Topçu, G., 2015. Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada.* Med. Chem. Res. 24, 3831 – 3837.

217. Cummings, S.R., San Martin, J., McClung, M.R., Siris, E.S., Eastell, R., Reid, I.R., Delmas, P., Zoog, H.B., Austin, M., Wang, A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati,C., Siddhanti, S., Christiansen, C., 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N. Engl. J. Med. 361, 756-765.

218. Cummings, S.R., Black, DM, Nevitt, M.C, Browner, W., Cauley, J., Ensrud, K., Genant, H.K., Palermo, L., Scott, J., Vogt, T.M., 1993. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Lancet. 341, 72-75.

219. Cuoco, G., Mathe, C. and Vieillescazes, C., 2014. Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. Microchem. J. 115, 130 – 137.

220. Cushman, M., Nagarathnam, D., Burg, D.L., Geahlen, R.L., 1991. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. J. Med. Chem. 34, 798 – 806.

221. Custódio, L., Escapa, A.L., Patarra, J., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F, Romano, A., 2013. Sapwood of Carob Tree (*Ceratonia siliqua L.*) as a Potential Source of Bioactive Compounds. Rec. Nat. Prod. 7, 225-229.

222. Dabkeviciene, G., Butkute, B., Lemeziene, N., Jakstas, V., Vilcinskas, E., Janulis, V., 2012. Distribution of formononetin, daidzein and genistein in *Trifolium* species and their aerial plant parts. Chemija 23, 306-311.

223. D'Abrosca, B., Buommino, E., D'Angelo, G., Coretti, L., Scognamiglio, M., Severino, V., Pacifico, S., Donnarumma, G., Fiorentino, A., 2013. Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*. Bioorg Med Chem. 21, 7038-7046.

224. D'Agostina, A., Boschin, G., Resta, D., Annicchiarico, P., Arnoldi, A., 2008. Changes of isoflavones during the growth cycle of *Lupinus albus*. J Agric Food Chem, 56, 4450-4456.

225. Dalmagr, A.P., Camargo, A. and Bertarello Zeni, A.L., 2017. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. Metab Brain Dis. 32, 1963 – 1973.

226. Damilakis, J., Maris, T.G., Karantanas, A.H., 2007. An Update on the assessment of osteoporosis using radiologic techniques. Eur Radiol. 17, 1591-1602.

227. D'Angiolillo, F., Noccioli, C, Ruffoni, B, Scarpato, R, Pistelli, L., Pistelli, L., 2017. Daidzein production and HeLa cytotoxicity of *Bituminaria bituminosa* hairy root cultures. Nat Prod Commun. 12, 1733-1736.

228. D'Angiolillo, F., Pistellia, L., Noccioli, C., Ruffoni, B., Piaggi, S., Scarpato, R., Pistelli, L., 2014. *In vitro* cultures of *Bituminaria bituminosa*: Pterocarpan, furanocoumarinand isoflavone production and cytotoxic activity evaluation. Nat Prod Commun. 9, 477-480.

229. Das, A.S., Pistellia, L, Noccioli, C, Ruffoni, B, Piaggi, S, Scarpato,R, Pistelli, L., 2005. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (Rattus norvegicus) model of osteoporosis. Life Sci. 77, 3049-57.

230. United States Department of Agriculture, Plants Database 2016. http://www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=CYVI8 (accessed 21 November 2016).

231. Proceedings of 11th Australian Agronomy Conference, 2003. http://www.regional.org.au/au/asa/2003 (accessed 21 November 2016).

232. Davis, M.C, Parrish, D.A., Harvey, B.J., 2013. A Triflate Hydrodeoxygenation Route to Resveratrol from Syringaldehyde. Org. Prep. Proced. Int. 45, 304 – 313.

233. Davis, S.R., Lambrinoudaki, I., Lumsden, Mishra G.D., Pal L., Rees M., Santoro N., Simoncini T., 2015. Menopause. Nat Rev Dis Primers. 15004

234. De Leo, M., Braca, A., Sanogo, R., Cardile, V., DeTommasi, R., Russo, A., 2006. Antiproliferative Activity of *Pteleopsis suberosa* Leaf Extract and its Flavonoid Components in Human Prostate Carcinoma Cells. Planta Med. 72, 604-610.

235. De Smet P.A., 2005. Herbal medicine in Europe—relaxing regulatory standards. N Engl J Med. 352, 1176 – 1178.

236. De Vet, A., Laven, J.S., De Jong, F.H., Themmen, A.P, Fauser, B.C., 2002. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril. 77, 357 – 62.

237. Decker, H., Tuczek, F., 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. Trends Biochem Sci. 25, 392-7.

238. Deepha, V., Praveena, R., Sivakumar, R., Sadasivam, K., 2014. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*. Mol Biomol Spectrosc. 121, 737-745.

239. Degtjareva, G.V., Kramina, T.E., Sokoloff, D.D., Samigullin, T.H., Valiejo-Roman, C.M, Antonov, A.S., 2006. Phylogeny of the genus *Lotus* (Leguminosae, Lotae): evidence from nrITS sequences and morphology. Can. J. Bot. 84, 813-830.

240. Dehghan, H., Sarrafi, Y., Salehi, P., Ebrahimi, S.N., 2017. α-Glucosidase inhibitory and antioxidant activity of furanocoumarins from *Heracleum persicum*. Med. Chem. Res. 26, 849-855.

241. Delaisse, J.M., Eeckhout, Y., Vaes, G., 1986. Inhibition of bone resorption in culture by (+)-catechin. Biochem. Pharmacol. 35, 3091-3094.

242. Delmas, P.D., Bjarnason, N., Mitlak, B., 1997. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. N. Engl. J. Med. 337, 1641-1647.

243. Delmas, P.D., Hardy, P, Garnero, P, Dain M., 2000. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. Bone 26, 553-60.

244. Demo, A., Petrakis, C., Kefalas, P., Boskou, D., 1998. Nutrient Antioxidants in some herbs and Mediterranean Plant Leaves. Food Research International. 31, 351-354.

245. Di Giorgio, C., Delmas, F., Tueni, M., Cheble, E., Khalil, T., Balansard, G., 2008. Alternative and complementary antileishmanial treatments: Assessment of theantileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. J Altern Complement Med. 14, 157-162.

246. Diamantoglou, S., Mitrakos, K, 1981. Leaf Longevity in Mediterranean Evergreen Sclerophylls, in: Margaris N.S., Mooney H.A. (Eds), Tasks for Vegetation Science, Dr W. Junk publishers, The Hague/Boston/London, pp 17-21.

247. Diantini, A., Subarnas, A., Lestari, K., Halimah, E., Susilawati, Y., 2012. Kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. Oncol Lett. 3, 1069 – 1072.

248. Dilshara, M.G., Jayasooriya, R.G., Lee, S., Choi, Y.H., Kim, G.Y., 2016. Morin downregulates nitric oxide and prostaglandin E2 production in LPS-stimulated BV2 microglial cells by suppressing NF-κB activity and activating HO-1 induction. Environ Toxicol Pharmacol. 44, 62-68.

249. Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A. & Tzanoudakis D., 2016. Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. Willdenowia. 46, 301 – 347

250. Dioscourides 2000. De Materia Medica, first ed. IBIDIA Press, Johanesburg.

251. Djiogue, S., Halabalaki, M., Alexi, X., Njamen, D., Fomum, Z.T., Alexis, M.N., Skaltsounis, A.L., 2009. Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: Evaluation of Their Binding Affinity for the Estrogen Receptor. J.Nat. Prod. 72, 1603 – 1607.

252. Dominquez, E., 1976. Revision de las espicies anuales del genero *Hippocrepis* L. Lagascalia 5, 225-261.

253. Dong, L., Guo, W., Zhou, L.L., Xu, J., 2017. Chemical Constituents of *Polygonum cuspidatum*. Chem. Nat. Compd. 53, 368 – 370.

254. Dong, T.T., Zhao, K.J., Gao, Q.T., Ji, Z.N., Zhu, T.T., Li J., Duan, R., Cheung, A.W., Tsim, K.W., Chemical and biological assessment of a chinese herbal decoction containing *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis:* Determination of drug ratio in having optimized properties. J Agric Food Chem. 54, 2767-2774.

255. Dontas, I.A., Lelovas, P.P., Kourkoulis, S.K., Aligiannis, N., Paliogianni, A., Mitakou, S., Galanos, A., Kassi, E., Mitousoudis, A., Xanthos, T.T., Papaioannou, N.,

Lyritis, G.P., 2011. Protective effect of *Sideritis euboea* extract on bone mineral density. Menopause 18, 915-922.

256. Dontas, I., Halabalaki, M., Moutsatsou, P., Mitakou, S., Papoutsi, Z., Khaldi, L., Galanos, A., Lyritis, G.P., 2006. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. Maturitas 53, 234-242.

257. Dooley, T.P, Gadwood, R.C., Kilgore, K., Thomasco, L.M., 1994. Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. Skin Pharmacol. 7, 188 – 200.

258. Doppalapudi, S., Jain, A., Chopra, D.K., Khan, W., 2017. Psoralen loaded liposomal nanocarriers for improved skin penetration and efficacy of topical PUVA in psoriasis. Eur. J. Pharm. Sci. 96, 515-529.

259. Dounchi, T., Matsuo, T., Uto, H., 2003. Lean body mass and bone mineral density in physically exercising postmenopausal women. Maturitas 45, 185-190.

260. Drake, M.T., Clarke, B.L., Oursler, M.J., Khosla, S., 2017. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. Endocr Rev. 38, 325-350.

261. Drake, M.T., Clarke, B.L., Khosla, S., 2008. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. Mayo Clin Proc. 83, 1032 – 1045.

262. Drenin, A.A., Botirov, E.K., Turov, Y.P., 2011. A new isoflavone glycoside from *Trifolium pratense* L.. Russ J Bioorgan Chem. 37, 862-865.

263. Drenin, A., Botirov, E., Petrulyak, E.V., 2008. New genistein monogalactoside from the aerial part of *Trifolium pratense*. Chem. Nat. Compd. 44, 178-181.

264. Drira, R., Sakamoto, K., 2015. Isosakuranetin, a 4′-O-methylated flavonoid, stimulates melanogenesis in B16BL6 murine melanoma cells. Life Sci. 143, 43 – 49.

265. Du, X., Zhang, K., Hu, Z., Lan, H., Luo, J., Jin, Y., 1999. The effects of lower intensity anticoagulation therapy on coagulation system in patients with mechanical prosthetic valves. J Tongji Med Univ. 19, 56-58.

266. Du, S.Z., Wang, Z.C., Liu, Y., Zhan, R., Chen, Y.G., 2017. Diarylpropanes and lignans from *Horsfieldia tetratepala*. Phytochem Lett. 19, 98-100.

267. Du, K., Li, Z., Fang, X., Cao, T., Xu, Y., 2017. Ferulic acid promotes osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inhibiting microRNA-340 to induce β-catenin expression through hypoxia. Eur J Cell Biol 96, 496 – 503.

268. Duan, D., Li, Z., Luo, H., Zhang, W., Chen, L., Xu, X., 2004. Antiviral compounds from traditional Chinese medicines Galla Chinese as inhibitors of HCV NS3 protease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 6041-6044.

269. Ducki, S., Rennison, D., Woo, M., Kendall, A., Chabert, J.F., McGown, A.T., Lawrence, N.J., 2009. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivascular activity. Bioorg. Med. Chem. 17, 7698 – 7710.

270. Ducy, P., Karsenty, G., 1998. Genetic Control of Cell Differentiation in the Skeleton. Curr. Opin. Chem. Bio. 10, 614-619.

271. Duong, L., Rodan, G.A., 2001. Regulation of osteoclast formation and function. Rev. Endocr. Metab. Disord. 2, 95-104.

272. Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., Scarafoni, A., 2008. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. Food Sci. Technol. Int. 19, 624-633.

273. Pons-Fuster L. E., Wang, Q.T., Wei, W., López Jornet, P., 2017. Potential chemotherapeutic effects of diosgenin, zoledronic acid and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral squamous cancer cell line. Arch Oral Biol. 82, 141-146.

274. Egnatios, D., Dupree, L., Williams, C., 2010. Performance improvement in practice: managing urinary incontinence in home health patients with the use of an evidence based guideline. Home Healthc Nurse 28, 620-628.

275. El Bouzdoudi, B., Ammouri, N., Joly, N., Martin, P., Saïdi, R., Nejjar, E.A.Z., Bouras, M., Badoc, A., Lamarti, A., 2017. Total Polyphenols and Gallic Acid Contents in Domesticated Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Pods and Leaves. Int. J. Pure App. Biosci. 5, 22-30.

276. El-Alfy, T.S., Ezzatm, S.M., Hegazym, A.K., Amer, A.M., Kamel, G.M., 2011. Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. (family: Moringaceae) growing in Egypt. Phcog Mag. 7, 109-115.

277. Eldahshan, O.A., 2011. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of Carob Leaves grown in Egypt. Current Research Journal of Biological Sciences 3, 52 -55.

278. Elefteriou, F.,Takeda, S., Ebihara, K., Magre, J., Patano, N., Kim, C.A., Ogawa, Y., Liu, X., Ware, S.M., Craigen, W.J., 2004. Serum leptin level is a regulator of bone mass. Proc Natl Acad Sci. 9, 3258-3263.

279. El-Kader, A.M., El-Readi, M.Z., Ahmed, A.S., Nafady, A.M., Wink, M., Ibraheim, Z.Z., 2013. Polyphenols from aerial parts of *Polygonum bellardii* and their biological activities. Pharmac. Biol. 51, 1026-1034.

280. El-Shenawy, S.M.A., Yassin, N.A.Z., Badary, O.A., El-moneem, M.A., Al-shafeiy, H.M., 2013. Study of the effect of *Allium porrum* on osteoporosis induced in rats. Pharm Lett 5, 188-198.

281. Enerstvedt, K.H., Lundberg, A., Jordheim, M., 2018. Characterization of polyphenolic content in the aquatic plants *Ruppia cirrhosa* and *Ruppia maritima* –A source of nutritional natural products. Molecules 23, 1-16.

282. Eng, Q.Y., Thanikachalam, P.V., Ramamurthy, S., 2017. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. J Ethnopharmacol. 10, 296-310.

283. Erbas, M., Certel, M., Uslu, M.K., 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). Food Chem. 89, 341-345.

284. Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect. 109, 69-75.

285. Falahati-Nini, A., Riggs, B.L., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Eastell, R., Khosla, S., 2000. Relative contributions of testosterone and estrogen in normal elderly men. J Clin Invest. 12, 1553-1560.

286. Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., Gong, D., 2017. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. Food Res Int. 100, 226-233.

287. Fang, X., Wu, C.F., Zhang, Y., 2005. Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* in ovariectomized rats. Biol Pharm Bull. 28, 1879 – 1885.

288. Farag, M.A., Al-Mahdy, D.A., Salah, El Dine, R., Fahmy, S., Yassin, A., Porzel, A., Brandt, W., 2015. Structure-activity relationships of antimicrobial gallic acid derivatives from Pomegranate and *Acacia fruit* extracts against potato bacterial Wilt pathogen. Chem Biodivers. 12, 955-962.

289. Farhath, S., Manoj, K.N., MahaboobKhan, R., 2017. Targeted delivery of morin, a dietary bioflavanol encapsulated mannosylated liposomes to the macrophages of adjuvant-induced arthritis rats inhibits inflammatory immune response and osteoclastogenesis. Eur. J. Pharm. Biopharm. 115, 229-242.

290. Farnsworth, N.R. Ethnobotany and the search for new drugs. New York: Wiley, 1994.

291. Horseshoe Vetch 2004. http://www.glaucus.org.uk/Hippocrepis_comosa.html (accessed 21 November 2016)

292. Fei, Y., Wang, J., Peng, B., Peng, J., Hu, J.H., Zeng, Z.P., Chen, J., Li, Q.E., Gao, Z.P., Yan, X.L., 2017. Phenolic constituents from *Rheum nobile* and their antioxidant activity. Nat. Prod. Res. 31, 2842-2849.

293. Feng, W., Liu, M., Li, C., Tian, Y., Zhao, L.J., Niu, B., Wang, X.G., Niu, L.Y., 2016. Chemical constituents of *Semen sojae* praeparatum and their proliferation activity on rat osteoblasts. Chinese Pharmaceutical Journal 51, 203-206.

294. Feng, X., McDonald, J.M., 2011. Disorders of bone remodeling. Annu. Rev. Pathol. 6, 121 -145.

295. Feng, X., Song, H., Dong, B., Yang, Y., Yao, S., 2017. Sequential extraction and separation using ionic liquids for stilbene glycoside and anthraquinones in *Polygonum multiflorum*. J Mol Liq. 241, pp. 27-36.

296. Fernandes, F.H.A., Salgado, H.R.N., 2015. Gallic Acid: review of the methods of determination and quantification. Crit. Rev. Anal. Chem. 46, 257-265.

297. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M.A. Del-Canto-Pingarrón, M., Blanco-Jerez, L., 2004. Physiological bases of bone regeneration II.The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 11, 151-157.

298. Ferreira, M.S., Pires, D.A.T., Figueroa-Villar, J.D., 2015. Evaluation of tetraketones and xanthenediones as tyrosinase inhibitors or activators. J Pharm Sci Pharmacol. 4, 1705-1718.

299. Fico, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., 2003. Flavonol glycosides from *Aconitum vulparia*. Fitoterapia 74, 420-422.

300. Filho, R.B., Da Silva, M.S., Gottlie, O.R., 1980. Flavonoids *from Iryanthera laevis.* Phytochemistry 19, 1195-1197.

301. Fink, E., Cormier, C., Steinmetz, P., Kindermans, C., Le Bouc, Y., Souberbielle, J.C., 2000. Differences in the capacity of several biochemical markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. Int.Osteoporos. 11, 295-303.

302. Fiorelli, G., Brandi, M.L., 1999. Skeletal effects of estrogens. J Endocrinol Invest. 22, 589 – 593.

303. Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N., 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project p-1 study. J Natl Cancer Inst. 90, 1371 – 1388.

304. Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzæ.* J. Exp. Pathol. 10, 226-236

305. Fokialakis, N., Lambrinidis, G., Mitsiou, D. J., Aligiannis, N., Mitakou, S., Skaltsounis, A. L., Pratsinis, H., Mikros, E., Alexis, M.N., 2004. A new class of phytoestrogens: Evaluation of the estrogenic activity of deoxybenzoins. Chem Biol. 11, 397 – 406.

306. Folador, P., Cazarolli, L.H., Gazola, A.C., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., Silva, F.R., 2010. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin

isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. Fitoterapia 81, 1180-1187.

307. Foo, L.Y., Lu, Y., Molan, A.L., Woodfield, D.R., McNaab, W.C., 2000. The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. Phytochemistry 54, 539-554.

308. Forte, L., Torricelli, P., Boanini, E., Gazzano, M., Rubini, K., Fini, M., Bigi, A., 2016. Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An *in vitro* osteoblast–osteoclast–endothelial cell co-culture study. Acta Biomater. 32, 298-308.

309. Francezon, N., Meda, N.R., Stevanovic, T., 2017. Optimization of bioactive polyphenols extraction from *Picea mariana* Bark. Molecules 22, 1-15.

310. Franski, R., Bednarek, P., Wojtaszek, P., Stobiecki, M., 1999. Identification of flavonoid diglycosides in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) with mass spectrometric techniques. J. Mass Spectrom. 34, 486-495.

311. Freemont, A.J., 1993. Basic Bone Cell Biology. Int. J. Exp. Path. 74, 411-416.

312. Freitas, F.I., Mateus, M.G., 2013. Plantas E Seus Usos Tradicionais first ed. Parque Natural da Madeir, Madeira.

313. Friedman, M., 1996. Food Browning and Its Prevention: An Overview. J. Agric. Food Chem. 44, 631 – 653.

314. Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F.S., Cui, S., 2005. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. J. Agric. Food Chem. 53, 7408 – 7414.

315. Fukai, T., Nomura, T., Wang, Q.H., Inami, R., 1990. Structures of prenylated dihydrochalcone, gancaonin j and homoisoflavonone, gancaonin k from *Glycyrrhiza pallidiflora*. Heterocycles 31, 643-650.

316. Fukutake, M., Takahashi, M, Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 1996. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food Chem Toxicol. 34, 457-461.

317. Gabaston, J., Richard, T., Cluzet, S., Palos Pinto, A., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Mérillon, J.M., 2017. *Pinus pinaster* Knot: A source of polyphenols against *Plasmopara viticola*. J. Agric. Food Chem. 65, 8884–8891.

318. Gadetskaya, A.V., Tarawneh, A.H., Zhusupova, G.E., Gemejiyeva, N.G., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2015. Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. Fitoterapia 104, 80-85.

319. Gadetskaya, A.V., Zhusupova, G.E., Abilov, Z.A., Murzakhmetova, M., Aralbaeva, A.N., Turumbetova, Z.Z., Ross, S.A. Phytochemical studies on *Limonium myrianthum* growing in Kazakhstan. Planta Med. 80, 56.

320. Gandy, S., 2003. Estrogen and neurodegeneration. Neurochem Res 28, 1003-8.

321. Ganesan, K., Xu, B., 2017. Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. Int. J. Mol. Sci. 18, 1525.

322. Gao, H., Kuroyanagi, M., Wu, L., Kawahara, N., Yasuno, T., Nakamura, Y., 2002. Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. Biol Pharm Bull 25, 1241-1243.

323. Gao, L., Xu, X., Yang, J., 2013. Chemical constituents of the roots of *Rheum officinale*. Chem. Nat. Compd. 49, 603–605.

324. Gao, Z., Lu, Y., Halmurat, U., Jing, J., Xu, D., 2013. Study of osteoporosis treatment principles used historically by ancient physicians in Chinese Medicine. Chin.J. Integr. Med. 19, 862–868.

325. Garcia Palacios, V., Robinson, L.J., Borysenko, C.W., Lehmann, T., Kalla, S.E., Blair, H.C., 2005. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens. J. Bio. Chem. 280, 13720-13727.

326. Gasca, C.A., Castillo, W.O., Takahashi, C.S., Fagg, C.W., De Oliveira e Magalhães, P., Fonseca-Bazzo, Y.M., Silveira, D., 2017. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. Food Chem. Toxicol. 109, 996-1002.

327. Gasparotto, A., Gasparotto, F.M., Lourenço, E.L., Crestani, S., Stefanello, M.E., Salvador, M.J., Da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C., Kassuya, C.A., 2011. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. J. Ethnopharmacol. 134, 363-372.

328. Gaukroger, K., Hadfield, J.A., Hepworth, L.A., Lawrence, N.J., McGown, A.T., 2001. Novel syntheses of *cis* and *trans* isomers of combretastatin A-4. J. Org. Chem 66, 8135–8138.

329. Gaultier, F., Ejeil, A.L., Dridi, S.M., Godeau, G., Gogly, B., 2005. *Lupinus albus*, a novel vegetable extract with metalloproteinase inhibitory properties: A potential periodontal therapy. J Periodontol. 76, 1329-1338.

330. Gaur, R., Yadav, K.S., Verma, R.K., Yadav, N.P., Bhakuni, R.S., 2014. In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. Phytomedicine. 21, 415-422.

331. Gautam, A.K., Bhargavan, B., Tyagi, A.M., Srivastava, K., Yadav, D.K., Kumar, M., Singh, A., Mishra, J.S., Singh, A.B., Sanyal, S., Maurya, R., Manickavasagam, L., Singh, S.P., Wahajuddin, W., Jain, G.K., Chattopadhyay, N., Singh, D., 2011. Differential effects of formononetin and cladrin on osteoblast function, peak bone mass achievement and bioavailability in rats. J Nutr Biochem 22, 318–327.

332. Gautam, J., Khedgikar, V., Kushwaha, P., Choudhary, D., Nagar, G.K., Dev, K., Dixit, P., Singh, D., Maurya, R., Trivedi, R., 2017. Formononetin, an isoflavone, activates AMP-activated protein kinase β-catenin signalling to inhibit adipogenesis and rescues C57BL/6 mice from high-fat diet-induced obesity and bone loss. Br J Nutr 117, 645-661.

333. Gautam, R., Karkhile, K.V., Bhutani, K.K., Jachak, S.M., 2010. Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory, and free radical scavenging effects of *Rumex nepalensis*. Planta Med. 76, 1564-1569.

334. Geetha, T., Varalakshmi, P., 1999. Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats. Mol Cell Biochem. 201, 83-87.

335. Geetha, T., Varalakshmi, P.J., 2001. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. J. Ethnopharmacol. 76, 77-80.

336. Genant, H.K., Engelke, K., Fuerst, T, Gluer, C.C, Grampp, S, Harris, S.T., 1996. Noninvasive assessment of bone mineral structure: State of the art. J Bone Miner Res 11, 707-730.

337. Genovese, S., Tammaro, F., Menghini, L., Carlucci, G., Epifano, F., Locatelli, M., 2010. Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones aloe-emodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione in the bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae). Phytochem Anal. 21, 261-7.

338. Gerstenfeld, L.C, Sacks, D.J., Pelis, M., Mason, Z.D., Graves, D.T., Barrero, M., 2009. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on mumurine fracture healing. J Bone Miner Res 24, 196-208.

339. Gerstenfeld, L.C., Sacks, D.J., Pelis, M., Mason, Z.D., Graves, D.T., Barrero, M., 2009. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on mumurine fracture healing. J Bone Miner Res 24, 196-208.

340. Gerwick, W.H., 2013. Plant sources of drugs and chemicals, in: Levin, S.A. (Eds), Encyclopedia of biodiversity, Elsevier, San Diego, pp 129-139.

341. Ghareeb, M.A., Saad, A.M., Abdou, A.M., Refahy, L. A.G., Ahmed, W.S., 2016. A new kaempferol glycoside with antioxidant activity from *Chenopodium ambrosioides* growing in Egypt. Oriental Journal of Chemistry 32, 3053-3061.

342. Gião, M.S., González-Sanjosé, M.L., Rivero-Pérez, M.D., Pereira, C., Pintado M.E., Malcata, F.X., 2007. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependenceof final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. J Sci Food Agric. 87, 2638-2647.

343. Gibhard, L., Pravin, K., Abay, E., Wilhelm, A., Swart, K., Lawrence, N., Khoury, R., Westhuizen, J., Smith, P., Wiesnera, L., 2016. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetics of aminoalkylated diarylpropanes NP085 and NP102. Antimicrob Agents Chemother 60, 3065–3069.

344. Glazier, M.G., Bowman, M.A., 2001. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. Arch Intern Med 161, 1161-1172.

345. Goedecke, T., Kaloga, M., Kolodziej, H. A., 2005. A Phenol glucoside, uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. Z. Naturforsch. 60b, 677-682.

346. Goel, A., Raghuvanshi, A., Kumar, A., Gautam, A., Srivastava, K., Kureel, J., Singh, D., 2015. 9-Demethoxy-medicarpin promotes peak bone mass achievement and has bone conserving effect in ovariectomized mice: positively regulates osteoblast functions and suppresses osteoclastogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. 411, 155-166.

347. Goel, A., Kumar, A., Hemberger, Y., Raghuvanshi, A., Jeet, R., Tiwari, G., Knauer, M., Kureel, J., Singh, A.K., Gautam, A., Trivedi, R., Singh, D., Bringmann, G., 2012.Synthesis optical resolution, absolute configuration, and osteogenic activity of *cis* pterocarpans. Org. Biomol. Chem. 10, 9583-9592.

348. Gohar, A., Gedara, S.R., Baraka, H.N., 2009. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. J Med Plant Res 3, 424- 428.

349. Goldblatt, P., 1981. Cytology and the phylogeny of the Leguminosae, in: Polhill, R.M., Raven, P.H., (Eds), Advances in Legume Systematics Vol 2, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 427-464.

350. Goltzman D., 2002. Discoveries, Drugs and Skeletal Disorders. Nature 1, 784-796.

351. Gonçalves, R.S., Silva, E.L., Hioka, N., Nakamura, C.V., Bruschi, M.L., Caetano, W., 2018. An optimized protocol for anthraquinones isolation from *Rhamnus frangula* L. Nat. Prod. Res 32, 366-369.

352. González Andrés, F., José Luis, C., 1998. Chemical composition of some Iberian Mediterranean leguminous shrubs potentially useful for forage in seasonally dry areas. New Zeal. J. Agr. Res. 41, 139-147.

353. González-Andrés, P.A., Redondo, R., Pescador, B. Urbano, M., 2004. Management of *Galega officinalis* L. and preliminary results on its potential for milk production improvement in sheep. New Zeal. J. Agr. Res. 47, 233-245.

354. Goodman J.W., Walsh, V., 2001. The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug, first ed. Cambridge University Press, Cambridge / New York.

355. Gordon, T., Sorlie, P., Kannel, W.B., 1976. Problems in the assessment of blood pressure: the Framingham Study. Int J Epidemiol 5, 327-34.

356. Goto, H., Terao, Y., Akai, S., 2009. Synthesis of various kinds of isoflavones, isoflavanes, and biphenyl-ketones and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging. Chem Pharm Bull 57, 346-360.

357. Goto, T., Hagiwara, K., Shirai, N., Yoshida, K., Hagiwara, H., 2015. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice. Cytotechnology 67, 357-365.

358. Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M.V., Mavromoustakos, T., Tzakos, A.G., 2016. Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. Int J Mol Sci 17, 1875.

359. Grabley, S., Thiericke, R., 2000. Drug Discovery from Nature, first ed. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

360. Grady, D., Ettinger, B., Moscarelli, E., Plouffe, L., Sarkar, S., Ciaccia, A., 2004. Safety and adverse effects associated with raloxifene: multiple outcomes of raloxifene evaluation. Obstet. 104, 837-844.

361. Graf, E., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radic Biol Med 13, 435-448.

362. Grau, A., Nieto, C., Ortega, R., 2003. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Bioversity International, ISBN 9290433280, 9789290433286.

363. Greek Flora 2016. http://www.greekflora.gr/el/flowers/1220/Cytisus-villosus (accessed 21 November 2016).

364. Greek Flora, 2011. *Rhamnus sibthorpiana*. http://www.greekflora.gr/el/flowers/1848/Rhamnus-sibthorpiana-Schult-in-ROEMER-SCHULTES-1819 (accessed 21 November 2016).

365. Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G.E., Hearing, V.J., Clarimon, J., Singleton, A., Eerola, J., Hellström, O., Tienari, P.J., Miller, D.W., Beilina, A., Bubacco, L., Cookson, M.R., 2005. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. J. Neurochem. 93, 246-256.

366. Gregory C.A., Gunn W.G., Peister A., Prockop D.J., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal. Biochem. 329, 77-84.

367. Grimaldi, F., Vescini, F., 2012. PTH 1-84ng as a target for the therapy of severe osteoporosis. Clin Cases Miner Bone Metab 9, 31-36.

368. Guan, X., Yu, S.P., Liao, Z.G., Zhu, W.F., Zhao, G.W., Luo, Y., Liang, X.L., 2015. Effects of 10 furanocoumarins in *Angelica dahurica* on intestinal transport of vincristine. Chin. Tradit. Herbal Drugs 46, 2117-2121.

369. Guarrera, P.M., 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. J Ethnopharmacol. 68, 183–192.

370. Guarrera, P.M., Forti G., Marignoli S., 2005. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). J Ethnopharmacol. 96, 429–444.

371. Guo, A.J., Choi, R.C., Zheng, K.Y., Chen, V.P., Dong, T.T., Wang, Z.T., Vollmer, G., Lau, D.T., Tsim, K.W., 2012. Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation via estrogen receptor signaling. Chin. Med. 7

372. Guo, T., Tang, X.F., Chang, J., Wang, Y., 2017. A new lignan glycoside from the stems of *Zanthoxylum armatum* DC. Nat. Prod. Res. 31, 16-21.

373. Gupta, B.K., Gupta, G.K., Dhar, K.L., Atal, C.K., 1980. A C-formylated chalcone from *Psoralea corylifolia*. Phytochemistry, 19, 2034-2035.

374. Gupta, S.G., Rai, V., 2018. Role of emodin in chemosensitization of cancer, in: Bharti, A.C., Aggarwal, B.B., Role of nutraceuticals in cancer chemosensitization, Academic Press, Cambridge, pp. 241-257.

375. Gurr, M.I., 1992. Dietary lipids and coronary heart disease: old evidence, new perspective. Prog Lipid Res 31, 195-243.

376. Guyton, A., 1992. Ιατρική φυσιολογία, Γ τόμος, 8η έκδοση. Παρισιάνου, Αθήνα.

377. Hiroyuki, H., Nobukazu, Y., Harumi, I., Yukiyoshi, T., Kenji, M., Takeshi, K., 2002. Protection of mitochondrial functions against oxidative stresses by isoflavans from *Glycyrrhiza glabra.* J. Pharm.Pharmacol. 52, 219-233.

378. Ha, H., Lee, H.Y., Lee, J.H., Jung, D., Choi, J., Song, K.Y., Jung, H.J., Choi, J.S., Chang, S.I., Kim, C., 2010. Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats. Arch Pharm Res. 33, 625- 632.

379. Haber, B., 2002. Carob fibre benefits and applications. Cereal Foods. 47, 365-369.

380. Habermann, B., Kafchitsas, K., Olender, G., Augat, P., Kurth, A., 2010. Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. Calcif Tissue Int. 86, 82-89.

381. Hadacek, F., 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. Crit. Rev. Plant Sci. 21, 273 - 322.

382. Hajaji, E., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherr, Y., Farah, A., Ennabili, A., El Bali, B., Lachkar, M., 2010. Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. Rec. Nat. Prod. 4, 193-204.

383. Hajipour, S., Sarkaki, A., Farbood, Y., Eidi, A., Mortazavi, P., Valizadeh, Z., 2016. Effect of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies. Basic Clin Neurosci. 7, 97- 106.

384. Halabalaki, M., Urbain, A., Paschali, A., Mitakou, S., Tillequin, F., Skaltsounis, A.L. Quercetin and Kaempferol 3-O-[α-l-Rhamnopyranosyl-(1→2)-α-l-arabinopyranoside]-7-O-α-l-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae*: Structure Determination and Conformational Studies. J. Nat. Prod. 74, 1939–1194.

385. Halimah, E., Diantini, A., Destiani, D.P., Pradipta, I.S., Sastramihardja, H.S., Lestari, K., Subarnas, A., Abdulah, R., Koyama, H., 2015. Induction of caspase cascade pathway by kaempferol-3-O-rhamnoside in LNCaP prostate cancer cell lines. Biomed. Rep. 3, 115 - 117.

386. Hamama, A., Bhardwaj, H.L., 2004. Phytosterols, triterpene alcohols, and phospholipids in seed oil from white lupin. J. Am. Oil Chem. Soc. 81, 1039 - 1044.

387. Hamed, A.I., Springuel, I.E.E., Nasr, A., Mitome, H., Yamada, Y. A phenolic cinnamate dimer from *Psoralea plicata.* Phytochemistry 45, 1257 - 1261.

388. Hamed, M.M., Refahy, L.A., Abdel-Aziz, M.S., 2015. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds isolated from *Rhamnus cathartica* L. Orient J Chem. 31, 1133 - 1140.

389. Han, F., Lee, I.S., 2016. A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Epimedium koreanum nakai*. Nat. Prod. Res., 31, 320-325.

390. Han, G.Q., Wang, M.G, Chen, K.M., Ge, B.F., Ma, H.P., Zhou, J., Ming, L.G. Zhu, R. Q., 2011. Protective effect of formononetin on hypoxic injuries of osteoblasts *in vitro.* Chin. Pharmacol. Bull. 27, 671 - 677.

391. Handy, M., 2000. Herbs of special interest to women. J Am Pharm Assoc. 40, 234-242.

392. Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N. 2010a. LC/MS analysis of isoflavones from Fabaceae species extracts. Farmacia 58, 177-183.

393. Hanganu, D., Vlase, L., Olah, N., 2010b. Phytochemical analysis of isoflavones from some Fabaceae species extracts. Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca. 38, 57-60.

394. Hanganu, D., Filip, L., Olah, N.K., Mocan, A., Vlase, L., Raita, O., Oniga, I., Benedec, D., 2016. Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity for *Cytisus nigricans* and *Cytisus albus*. Farmacia 64, 863 - 867.

395. Hao, B., Caulfield, J.C., Hamilton, M.L., Pickett, J.A., Midega, C.A., Khan, Z.R., Wang, J.7., Hooper, A.M., 2016. Biosynthesis of natural and novel *C*-glycosylflavones utilising recombinant *Oryza sativa* C-glycosyltransferase (OsCGT) and *Desmodium incanum* root proteins. Phytochemistry 125, 73-87.

396. Harborne, J.B., Ingham, J.L., King, L., Payne, M., 1976. The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectional antifungal agent in the genus *Lupinus*. Phytochemistry 15, 1485-1487.

397. Hardcastle, A.C., Aucott, L., Reid, D.M., MacDonald, H.M., 2011. Associations between dietary flavonoid intake and bone health in a Scottish population. J. Bone Miner. Res. 26, 941-947.

398. Hartmann, T., 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. Entomol. Gen. Appl. 80, 175 – 242.

399. Harvey, A.L., Clark, R.L., Mackay, S.P., Johnston, B.F., 2010. Current strategies for drug discovery through natural products. Expert. Opin. Drug. Discov. 5, 559-568.

400. Harvey, S., Hull, K.L., 1998. Growth hormone: A paracrine growth factor? Endocrine 7, 267-279.

401. Hasegawa, T., 2010. Tyrosinase-expressing neuronal cell line as *in vitro* model of Parkinson's disease. Int. J. Mol. Sci. 11, 1082-1089.

402. Hashmi, M., Khan, A., Ayub, K. Farooq, U., 2014. Spectroscopic and density functional theory studies of 5,7,3′,5′-tetrahydroxyflavanone from the leaves of *Olea ferruginea.* Spectrochim. Acta A. 128, 225-230.

403. Hashomoto, T., Tori, M., Asakawa, Y., 1988. A highly efficient preparation of lunularic acid and some biological activities of stilbene and dihydrostilbene derivatives. Phytochemistry 27, 109-113.

404. Hassanzadeh, P., Arbabi, E., Atyabi, F., Dinarvand, R., 2017. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. Life Sci. 179, 9-14.

405. Hatano, T., Aga, Y., Shintani, Y., Ito, H., Okuda, T., Yoshida, T., 2000. Minor flavonoids from licorice. Phytochemistry 55, 959-963.

406. Hawse, J.R., Subramaniam, M., Monroe, D.G., Hemmingsen, A.H., Ingle, J.N., Khosla, S., Oursler, M.J., Spelsberg, T.C., 2008. Estrogen receptor beta isoform-specific induction of transforming growth factor beta-inducible early gene-1 in human osteoblast cells: an essential role for the activation function 1 domain. Mol. Endocrinol. 22, 1579-1595.

407. Hayashi, H., Yasuma, M., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Yamamoto, H., Yesilada, E., Sezik, E., Honda, G., Tabata, M., 1996. Flavonoid variation in the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. Phytochemistry 42, 701-704.

408. Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L., 2008. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. Toxicol. In Vitro. 22, 567 - 581.

409. Hayes, W.C., Gerhart, N., 1985. Biomechanics of bone: applications for assessment of bone strength. J Bone Miner Res. 3, 259-294.

410. He, Y., Zhang, S.F., Zhu, J., Ding, Y., Zou, S.E., 2017. Suppression of NFκB related signal transduction pathway by daidzein in MC3T3-E1 cells. Int J Clin Exp Med. 10, 8950 - 8955.

411. Hearing, V.J., Tsukamoto, K., 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J. 5, 2902 - 2909.

412. Heeb, M.J., Paganini-Hill, A., Griffin, J.H., Fisher, M., 2002. Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. Blood Cells Mol Dis. 29, 139-44.

413. Hegde, V., Jo, J.E., Andreopoulou, P., Lane, J.M., 2016. Effect of osteoporosis medications on fracture healing. Osteoporos Int. 27, 861-871.

414. Heinke, R., Franke, K., Porzel, A., Wessjohann, L.A., Ali, N.A., Schmidt, J., 2011. Furanocoumarins from *Dorstenia foetida*. Phytochemistry 72, 929 - 934.

415. Henderson, V.W., 2006. The neurology of menopause. Neurologist. 12, 149-159.

416. Hendrix, S.L., 2003. Long term use of hormone therapy foe urogenital complaints: is there a role? Med Clin North Am. 87, 1029-1037.

417. Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., 2013. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 8, 2-115.

418. Hertog, M., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. Lancet 342, 1007 – 1011.

419. Heywood, V.H., 1971. The Leguminosae: a systematic purview, in: Harborne J.B., Boulter D., Turner B.L., (Eds), The chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London / New York, pp. 1-29.

420. Hill, PA., Reynolds, J.J., Meikle, M.C., 1995. Osteoblasts mediate insulin-like gowth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. Endocrinol. 136, 124-131.

421. Hillcoat, D.G., Verdcourt, L.B., 1980. A new species of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinoideae) from Arabia and the Somali Republic. Kew Bull. 35, 261 - 271.

422. Hirakawa, T., Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., 2000. A new oleanene glucuronide obtained from the aerial parts of *Melilotus officinalis.* Chem Pharm Bull (Tokyo). 48, 286-287.

423. Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., 1999. Estrogen stimulates gene expresion and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinol. 140, 4367-4370.

424. Hohman, E. E., Weaver, C., 2015. A grape-enriched diet increases bone calcium retention and cortical bone properties in ovariectomized rats. J Nutr. 145, 253-259.

425. Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M.S., Cunha, G.M.A., Chaves, M.H., Santos, F.A. Rao, V., 2008. Anti-inflammatory effect of α,β-amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. Inflammopharmacology 16, 48-52.

426. Honda, H., Nagai, Y., Matsunaga, T., Okamoto, N., Watanabe, Y., Tsuneyama, K., Hayashi, H., Fuji, I7., Ikutani, M., Hirai, Y., Muraguchi, A., Takatsu, K., 2017. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. J Leukoc Biol. 96, 1087 - 1100.

427. Hong, J.T., Yen, J.H., Wang, L., Lo, Y.H., Chen, Z.T., Wu, M.J., 2009. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 237, 59-68.

428. Hong, Q., Ma, Z.C., Huang, H., Wang, Y.G., Tan, H.L., Xiao, C.R., Liang, Q.D., Zhang, H.T., Gao, Y., 2016. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. Eur J Pharmacol. 777, 1-8.

429. Hooshmand, S., Juma, S., Arjmandi, B.H., 2010. Combination of genistin and fructooligosaccharides prevents bone loss in ovarian hormone deficiency. J Med Food. 13, 320 - 325.

430. Horcajada, M.V., Crespy, L.L.E., 2000. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. J Bone Miner Res. 15, 2251-2225.

431. Horie, T., Shibata, K., Yamashita, K., Fuji, K., Tsukayama, M., Ohtsuru, Y., 1998. Studies of the selective o-alkylation and dealkylation of flavonoids. XXIV. A

convenient method for synthesizing 6- and 8-methoxylated 5, 7-dihydroxyisoflavones. Chem. PharmBull. 46, 222 - 230.

432. Horowitz, M., 2003. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblasts function and bone formation. Calcif Tissue Int. 72, 5-7.

433. Hosny, M., Rosazza, J.P.N., 2002. New isoflavone and triterpene glycosides from soybeans. J. Nat. Prod. 65, 805-813.

434. Hou, X. L., Tong, Q., Wang, W. Q., Shi, C. Y., Xiong, W., Chen, J., Liu, X., Fang, J.G., 2015. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin, a flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via inhibiting the activation of NF-kappaB and MAPK signaling pathways. J. Nat. Prod. 78, 1689–1696.

435. Hsu, S.C., Chung, J.G., 2012. Anticancer potential of emodin. BioMedicine. 2, 108-116.

436. Hsu, Y.L., Chang, J.K., Tsai, C.H., Chien, T.T., Kuo, P.L., 2007. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Biochem. Pharmacol. 73, 504 - 514.

437. http://www.glaucus.org.uk/Hippocrepis_comosa.html. 2016. (accessed 21 November 2016).

438. Hu, J., Guo, X., Yang, L., 2018. Morin inhibits proliferation and self-renewal of CD133+ melanoma cells by upregulating miR-216a. J. Pharmacol. Sci. 163, 114–120.

439. Huang, D.Y., Dai, Z.R., L.I, W.M., Wang, R.G., Yang, S.M., 2018. Inhibition of EGF expression and NF-κB activity by treatment with quercetin leads to suppression of angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. Saudi J Biol Sci. 25, 826-831.

440. Huang, X., Liu, J., Sheng, J., Song, X., Du, Z., Li, M., Zhang, X., Zou, Y., 2018. Decarboxylation of α,β-unsaturated aromatic lactones: synthesis of *E*-ortho-hydroxystilbenes from 3-arylcoumarins or isoaurones. Green Chem. 20, 804-808. .

441. Huang, Y.C., Liu, K.C., Chiou, Y.L., 2012. Melanogenesis of murine melanoma cells induced by hesperetin, a *Citrus* hydrolysate-derived flavonoid. Food Chem. Toxicol. 50, 653–659.

442. Huang, Y.T., Chi, Z.L., Wang, S.M., Wu, H.Q., Qin, K.M., Li, W.D., 2017. Research progress on Licorice flavonoids and their antitumor activities. Chinese Journal of New Drugs 26, 13, 1532 - 1537.

443. Huang, Z., Yang, J., She, Z., Lin, Y., 2012. A new isoflavone from the mangrove endophytic fungus *Fusarium* sp. (ZZF60). Nat. Prod. Res. 26, 11–15.

444. Huh, J.H., Lee, W.I., Kang, J.W., Nam, D., Choi, D.Y., Park, D.S., Lee, S.H., Lee, JD., 2014. Formononetin attenuates osteoclastogenesis via suppressing the RANKL-induced activation of NF-κB, c-Fos, and Nuclear Factor of Activated T-Cells Cytoplasmic 1 Signaling pathway. J. Nat. Prod. 77, 2423–2431.

445. Hunseung, Y., Hee-Sung, C., Young-Mi, K., Minseok, K., Keun, R., Ho, Ahn, Hee, A., Yoon, C., Dong, K., Young-Won, C., Jinwoong, K., 2014. Flavonoids and arylbenzofurans from the rhizomes and roots of *Sophora tonkinensis* with IL-6 production inhibitory activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 5644 - 5647.

446. Hurrel, R.F., Finot, P.A., 1984. Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidised polyphenolic acids. Adv Exp Med Biol. 177, 423-35.

447. Hwang, C.K.W., Chun, H.S., 2012. Isoliquiritigenin isolated from Licorice *Glycyrrhiza uralensis*prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in dopaminergic neurons. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 536-543.

448. Hwang, J.H., Lee, B.M., 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-dopa oxidation, and melanin synthesis. J Toxicol Environm Health A. 70, 393-407.

449. Hynes, R.O.H., 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell 69, 11-25.

450. Hyun, S.K., Lee, W.H., Jeong, D.M., Kim, Y., Choi, J.S., 2008. Inhibitory effect of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. Biol. Pharm. Bull. 31, 154-158.

451. Iftikhara, S., Khan, S., Bilal, A., Manzoor, S., Abdullah, M., Emwas, A.H., Sioud, S., Gao, X., Chotana, G.A., Faisal, A., Saleem, R.S.Z., 2017. Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 27, 4101-4106.

452. Im, N.K., Lee, D.S., Lee, S.R., Jeong, G.S., 2016. Lupeol isolated from *Sorbus commixta* suppresses 1α, 25-(oh)2d3-mediated osteoclast differentiation and bone loss *in vitro* and *in vivo.* J. Nat. Prod. 79, 412 – 420.

453. Iñiguez-Franco, F., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Ayala-Zavala, J.F., Auras, R., Gámez-Meza, N., 2012. Antioxidant activity and diffusion of catechin and epicatechin from antioxidant active films made of poly (L-lactic acid). J. Agric Food Chem. 60, 6515-6523.

454. Innocenti, G., Dall'Acqua, S., Viola, G., Loi, M.C., 2006. Cytotoxic constituents from *Anagyris foetida* leaves. Fitoterapia 77, 595-597.

455. Inzerillo, AM., Zaidi M., 2002. Osteoporosis: Trends and Intervention. Mt Sinai J Medicine 69, 220-231.

456. Iozumi, K., Hoganson, G.E., Pennella, R., Everett, M.A., Fuller, B.B., 1993. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. J. Invest. 100, 6, 806-811.

457. Isik, E., Sabudak, T., Oksuz, S., 2007. Flavonoids from *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. Chem. Nat. Compd. 43, 614 – 615.

458. Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, N., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K., 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. Food Chem. 114, 466-471.

459. Ito, S., 2003. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. Pigment Cell Res. 16, 230 – 236.

460. Ito, S., Wakamatsu, K., 2008. Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. Photochem. Photobiol. 84, 582 – 592.

461. Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., Tamesada, M., Yagi, K., 2010. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. Biol. Pharm. Bull. 33, 983 – 987.

462. Ivarson, T., Spetz, AC., Hammer, M., 1998. Physical exercise and vasomotor symptoms in postmenopausal women. Maturitas 29, 139-146.

463. Jabeen, E., Janjua, N.K., Ahmed, S., Murtaza, I., Ali, T., Masood, N., Rizvi, A.S., Murtaza, G., 2017. DFT predictions, synthesis, stoichiometric structures and anti-diabetic activity of Cu (II) and Fe (III) complexes of quercetin, morin, and primuletin. J Mol Struct. 1150, 459-468.

464. Jacobsen, B.K., Nilssen, S., Heuch, I., Kvåle, G., 1997. Does age at natural menopause affect mortality from ischemic heart disease? J Clin Epidemiol. 50, 475-479.

465. Jain, D. K., Jain, N., Patel, V., Singhal, S., Jain, S.K., 2015. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel substituted cis-stilbene derivatives. World J Pharm Pharm Sci. 4, 1473 1491.

466. Jain, N., Singhal, S., Jain, S.K., 2013. Synthesis, Characterization of Novel *E*-3-(phenyl)-2-(phenyl) prop-2-enoic acid derivatives. Am. J. Pharm. Tech. Res. 3, 360-369.

467. Jang, H.Y., Park H.J., Damodar, K., Kim, J.K., Jun, J.G., 2016. Dihydrostilbenes and diarylpropanes: Synthesis and in vitro pharmacological evaluation as potent nitric oxide production inhibition agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 26, 5438 – 5443.

468. Jantaratnotai, N., Utaisincharoen, P., Sanvarinda, P., Thampithak, A., Sanvarinda, Y., 2013. Phytoestrogens mediated anti-inflammatory effect through suppression of IRF-1 and pSTAT1 expressions in lipopolysaccharide-activated microglia. Int J Immunopharmacol. 17, 483 – 488.

469. Jarić, I., Živanović, J., Miler, M., Ajdžanović, V., Blagojević, D., Ristić, N., Milošević, V., Nestorović, N., 2018. Genistein and daidzein treatments differently affect uterine homeostasis in the ovary-intact middle-aged rats. Toxicol Appl Pharmacol. 339, 73-84.

470. Jayaprakasha, G.K., Mandadi, K.K., Poulose, S.M., Jadegoud, Y., Nagana, Gowda G.A., Patil, B.S., 2007. Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Bioorg. Med. Chem. 15, 4923.–.4932.

471. Jeffreys, D., 2004. Aspirin: The Remarkable Story of a Wonderdrug, first ed. Bloomsbury Publishing Plc, New York.

472. Jenis, J., Kim, J.Y., Uddin, Z., Song, Y.H., Lee, H.H., Park, K.H., 2017. Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Limonium michelsonii* Lincz. J Nat Med. 71, 650-658.

473. Jenseng, G.F., Christiansec, C., Boesen J., Hegedus, V., Transboli, I., 1983. Relationship between bone mineral content and frequency of postmenopausal fractures. Acta Med Scand. 213, 61-63.

474. Jeon, H.Y., Seo, D.B., Shin, H.J., Lee, S.J., 2012. Effect of *Aspergillus* oryzae-challenged germination on soybean isoflavone content and antioxidant activity. J Agric Food Chem. 60, 2807 – 2814.

475. Jeong, J.C., Lee, B.T., Yoon, C.H., Kim, H.M., Kim, C.H., 2005. Effects of *Drynariae rhizoma* on the proliferation of human bone cells and immunomodulatory activity. Pharmacol Res. 51, 125-136.

476. Jeong, J.C., Yoon, C.H., Jeong, C.W., Lee, Y.C., Chang, Y.C., Kim, C.H., 2004. Inhibitory activity of *Drynariae rhizoma* extracts on cathepsin having bone resorption activity. Immunopharmacol Immunotoxicol. 26, 373 - 385.

477. Jeong, T.S., Park, H.Y., Park, K.H., 2013. Pterocarpan compound or pharmaceutically acceptable salt there of and pharmaceutical composotion for prevention or treatment of metabolic disease or complication there of or for antioxidant containing the same as an active ingredient. US20130303602A1. United States Patent Application

478. Ji, S., Li, Z., Song, W., Wang, Y., Liang, W., Li, K., Tang, S., Wang, Q., Qiao, X., Zhou, D., Yu, S., Ye, M., 2016. Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (Licorice): Discovery of the effective components of a traditional herbal medicine. J. Nat. Prod. 79, 281-292.

479. Jia, M., Li, Y., Xin, H.L., Hou, T.T., Zhang, N.D., Xu, H.T., Zhang, Q.Y., Qin, L.P., 2016. Estrogenic activity of osthole and imperatorin in MCF-7 cells and their osteoblastic effects in Saos-2 cells. Chin J Nat Med. 14, 413-420.

480. Jia, M.W., 1990. Studies on flavonoid constituents isolated from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Acta Pharm Sin. 25, 758-762.

481. Jian, D., Jiang, D., Su, J., Chen, W., Hu, X., Kuang, Y., Xie, H., Li, J., Chen, X., 2011. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-

regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. Steroids 76, 1297 – 1304.

482. Jiang, L., Zhang, S., Xuan, L., 2007. Oxanthrone C-glycosides and epoxynaphthoquinol from the roots of *Rumex japonicus*. Phytochemistry 68, 2444-2449.

483. Jiang, Z., Xu, J., Long, M., Tu, Z., Yang, G., He, G.,2009. 2, 3, 5, 4′-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. Life Sci. 85, 345 – 350.

484. Jiménez-Atiénzar, M., Escribano, J., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2005. Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase. Plant Physiol Biochem. 43, 866 – 873.

485. Jin, A., Ozga, J.A., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., Reinecke, D.M., 2012. Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. Food Res. Int. 46, 528-535.

486. Jin, H. Z., Chen, G. L., Xue F., Shen, Y.H., Yan, S. K., Zhang, L., Yang, M., Zhang, W.D., 2009. Flavonoids from *Rhododendron decorum*. Chem. Nat. Compd. 45, 85-86.

487. Jin, P., Liao, L., Lin, X., Guo, Q., Lin, C., Wu, H., Zheng, L., Zhao, J., 2015. Stimulating effect of a novel synthesized sulfonamido-based gallate ZXHA-TC on primary osteoblasts. Medical Journal 56, 760-771.

488. Jin, X., Sun, J., Yu, B., Wang, Y., Sun, W.J., Yang, J., Huang, S.H., Xie, W.L., 2017. Daidzein stimulates osteogenesis facilitating proliferation, differentiation, and antiapoptosis in human osteoblast-like MG-63 cells via estrogen receptor-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation. Nutrition Research 42, 20-30.

489. Jin, Z.X. Qu, Z.Y., 2008. Study on the hydrolyzable tannin components of *Juglans regia*. China journal of Chinese materia medica 33, 1705-1707.

490. Jobke, B., Milovanovic, P., Amling, M., Busse, B., 2014. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. Bone 59, 37-43.

491. Jódar Gimeno, E., Muñoz-Torres, M., Escobar-Jiménez, F., Quesada Charneco, M., Luna del Castillo, J.D., Olea, N., 1997. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hypertiroidism: Role of biological markers of bone turn-over. Calcif Tissue Int. 61, 370-360.

492. Joffe, H., Hall, J.E., Gruber, S., Sarmiento, I.A., Cohen, L.S., Yurgelun-Todd, D., 2006. Estrogen therapy selectively enhances prefrontal cognitive processes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with functional magnetic

resonance imaging in perimenopausal and recently postmenopausal women. Menopause 13, 411 – 422.

493. Johnell, O., Kanis, J.A., 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 17, 17-26.

494. Jolly, E.E., Bjarnason, N.H., Neven, P., Plouffe, L. Johnston, C.C., Watts, S.D., Arnaud, C.D., Mason, T.M., Crans, G., Akers, R., Draper, M.W., 2003. Prevention of osteoporosis and uterine effects in postmenopausal women taking raloxifene for 5 years. Menopause 10, 337-344.

495. Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q., Orndorff, S., 2002. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. Pigment Cell Res. 15, 335 – 340.

496. Jordan, VC., 2003. Antiestrogen and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. Clinical considerations and new agents. J Med Chem. 46, 1081-1111.

497. Joshi, G., Perluigi, M., Sultana, R., Agrippino, R., Calabrese, V., Butterfield, D.A., 2006. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethylester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH) orFe(2þ)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative. Neurochem.Int. 48, 318 – 327.

498. Joy, A., Chaitra, N., Ashok, M., Handral, M., 2016. Antiosteoporotic activity of anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* fruits in rats. Asian J Pharm Clin Res. 9, 209-213.

499. Jung, E., Kim, J.H., Kim, M.O., Jang, S., Kang, M., Oh, S.W., Nho, Y.H., Kang, S.H., Kim, M.H., Park, S.H., Lee, J., 2016. Afzelin positively regulates melanogenesis through the p38 MAPK pathway. Chem Biol Interact. 254, 167-172.

500. Kachlicki, P., Marczak, L., Kerhoas, L., Einhorn, J., Stobiecki, M., 2005. Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. J. Mass Spectrom. 40, 1088 – 1103.

501. Kaczmarczyk-Sedlak, I., Wojnar, W., Zych, M., Ozimina-Kaminska, E., Taranowicz, J., Siwek, A., 2013. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. J*. Evid. Based Complementary Altern*. 2013, Article ID 457052, 10 pages.

502. Kakkar, V., Kaur, D., Chopra, K., Kaur, A., Kaur, I.P., 2007. Assessment of the variation in menopausal symptoms with age, education and working/non-working status in north-Indian sub population using menopause rating scale. Maturitas 57, 306-314.

503. Kalani, K., Kushwaha, V., Verma, R., Murthy, P.K., Srivastava, S.K., 2013. Glycyrrhetinic acid and its analogs: A new class of antifilarial agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 2566-2570.

504. Kalita, J.C., Milligan, R., 2010. *In vitro* estrogenic potency of phytoestrogen-glycosides and some plant flavanoids. Indian J Sci Technol. 3, 1142-1147.

505. Kamal, M., Youssef, E., Moshera, M.E., Hend, M.A., 2013. Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of Carob (*Ceratonia siliqua* L.). Food Public Health 3, 304-308.

506. Kaman, N.A., Volynets, A.P., 1974. Isoflavones of the roots of *Lupinus luteus*. Chem Nat Compd. 10, 175 – 177.

507. Kamel, M.S., 2003. Flavone C-glycosides from *Lupinus hartwegii*. Phytochemistry 63, 449–452.

508. Kang, D.M., Kang, D.M., Yoon, K.H., Kim, J.Y., Oh, J.M., Lee, M., Jung, S.T., Juhng, S.K., Lee, Y.H., 2014. CT Imaging Biomarker for Evaluation of Emodin as a Potential Drug on LPS-mediated Osteoporosis Mice. Acad Radiol 21, 457-462.

509. Kanis, J.A., Johansson, H., Oden, A., Johnell, O., de Laet, C., Melton, III L.J., Tenenhouse, A., Reeve, J., Silman, A.J., Pols, H.A., Eisman, J.A., McCloskey, E.V., Mellstrom, D., 2004. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. J Bone Miner Res 6, 893-899.

510. Kanis, J.A., Melton, .LJ. 3rd, Christiansen, C., Johnston, C.C., Khaltaev, N., 1994. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 9, 1137-1141.

511. Kanno, S., Hirano, S., Katama, F., 2004. Effects of the phytoestrogen coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. Toxicology 203, 211-220.

512. Kanno, S., Hirano, S. Kayama, F., 2004. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Toxicology 196, 137-145.

513. Kanok-on, R., Chanisara, N., Pittaya, T., 2012. New phenolics from the wood of *Casearia grewiifolia*. Phytochem Lett 5, 59-62.

514. Karan, S.K., Mishra, S.K., Pal, D., Mondal, A., 2012. Isolation of β- sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan induced diabetic mice with reference to in-vitro antioxidant activity. Med. Plant Res 6, 1219-1223.

515. Karthik, G., Angappan, M., VijayaKumar, A., Natarajapillai, S., 2014. Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos. Biomedicine & Preventive Nutrition 4, 203-208.

516. Karuppiah, P.M., Tan Kwong, H.B., Daiwen, Y., 2005. Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. Phytochemistry 66, 2304-2308.

517. Käss, E., Wink, M., 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS 1 and 2). Mol Phylogenet Evol 8, 65-88.

518. Kass-Annese, B., 2000. Alternative therapies for menopause. Clin Obstet Gynecol 43, 162-183.

519. Kassi, E., Papoutsi, Z., Fokialakis, N., Messari, I., Mitakou, S., Moutsatsou, P., 2004. Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. J Agric Food Chem 52, 6956-6961.

520. Katagiri, Y., Ibrahim, R., Tahara, S., 2000. HPLC Analysis of White Lupin Isoflavonoids. Biosci Biotechnol Biochem 64, 1118-1125.

521. Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toshiya, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T., 2000. Suppressive Effects of Dietary Genistin and Daidzin on Rat Prostate. Jpn. J. Cancer Res 91, 786-791.

522. Kaufman, J.J., Einhorn, T.A, 1993. Ultrasound assessment of bone. J Bone Miner Res 8, 517-525.

523. Kaundun, S.S., Lebreton, P., Fady, B., 1998. Genetic variation in the needle flavonoid composition of *Pinus brutia* var. *brutia* populations. Biochem Syst Ecol 26, 485-494.

524. Kaur, P., Kumar, M., Singh, B., Kumar, S., Kaur, S., 2012. Amelioration of oxidative stress induced by oxidative mutagens and COX-2 inhibitory activity of umbelliferone isolated from *Glycyrrhiza glabra* L. Asian Pac J Trop Biomed 2, 120-126.

525. Kaur, P., Kaur, S., Kumar, N., Singh, B., Kumar, S., 2009. Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza glabra* L. Toxicol in Vitro 23, 680-686.

526. Ke, H.Z., Paralkar, V.M., Grasser, W.A., Crawford, D.T., Qi, H., Simmons, H.A., Pirie, C.M., Chidsey-Frink, K.L., Owen, T.A., Smock, S.L., Chen, H.K., Jee, W.S., Cameron, K.O., Rosati, R.L., Brown, T.A., Dasilva-Jardine, P., Thompson, D.D., 1998. Effects of CP-336,156, a new, nonsteroidal estrogen agonist/antagonist, on bone, serum cholesterol, uterus and body composition in rat models. Endocrinology 139, 2068-2076.

527. Ke, Y.Q., Liu, C., Hao, J.B., Lu, L., Lu, N.N., Wu, Z.K., Zhu, S.S., Chen, X.L., 2016. Morin inhibits cell proliferation and fibronectin accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. Biomed Pharmacother 84, 622-627.

528. Nihei, K., Shibata, K., Kubo, I., 2002. (+)-2,3-Dehydro-10-oxo-a-isosparteine in Uresiphita reversalislarvae fed on *Cytisus monspessulanus* leaves. Phytochemistry 61, 987–990.

529. Kerkatou, M., Redouane-Salah, A., León, F., Brouard, I., Mosset, P., Menad, A., Ameddah, S., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F., 2016. Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze Extracts. Asian J. Chem. 28, 2695-2700.

530. Khair, M., El-Shatnawi, J., Ereifej, K. I., 2001. Chemical composition and livestock ingestion of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. J. Range Manage 54, 669−673.

531. Khalaf, I., Vlase, L., Lazar, D., Corciova, A., Ivanescu, B., Lazar, M.I., 2010. HPLC-MS study of phytoestrogens from *Glycyrrhiza glabra*. Farmacia 58, 89-94.

532. Khalatbary, A.R., Ahmadvand H., 2011. Anti-inflammatory effect of the epigallocatechin gallate following spinal cord trauma in rat. Iran. Biomed. J. 15, 31-37.

533. Khan, N.A., 2011. Two antifungal active triterpenoid saponins from the seeds of Lathyrus plants. Nat. Prod. Res. 25, 1687-1694.

534. Khanahmadi, M., Badi, N.H., Akhondzadeh S., Khalighi-Sigaroodi F., Mehrafarin, A., Shahriari, S., Hajiaghaee, R. A., 2014. analytical review on methods for the isolation and determination of glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza glabra*. J Med Chem 13, 1-10.

535. Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S., Vaya, J., 2005. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. Bioorg Med Chem 13, 433-441.

536. Khedgikar, V., Kushwaha, P., Gautam, J., Sharma, S., Verma, A., Choudhary, D., Mishra, P.R., Trivedi, R., 2016. Kaempferol targets Krt-14 and induces cytoskeletal mineralization in osteoblasts: A mechanistic approach. Life Sci 151, 207-217.

537. Khole, S., Chatterjee, S., Variyar, P., Sharma, A., Devasagayam, T.P.A., Ghaskadbi, S., 2014. Bioactive constituents of germinated fenugreek seeds with strong antioxidant potential. J Funct Foods 6, 270-279.

538. Khouzani, O.K., Heidarian, E., Amini, S.A., 2017. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. Pharmacol Rep 69, 830-835.

539. Khupse, R.S., Sarver, J.G., Trendel, J.A., Bearss, N.R., Reese, M.D., Wiese, T.E., Boue, S.M., Burow, M.E., Cleveland, T.E., Bhatnagar, D., Erhardt, P.W., 2011. Biomimetic syntheses and antiproliferative activities of racemic, natural (-), and unnatural (þ) glyceollin I. J. Med. Chem.. 54, 3506-3526.

540. Kim, M.H., Ryu, S.Y., Choi, J.S., Min, Y.K., Kim, S.H., 2009. Saurolactam inhibits osteoclast differentiation and stimulates apoptosis of mature osteoclasts. J. Cell Physiol. 221, 618-628.

541. Kim, C., Ha, H., Lee, J.H., KiM, J.S., Song, K., Park, S.W., 2003. Herbal extract prevents bone loss in ovariectomized rats. Pharm. Res. 26, 917-924.

542. Kim, D.S., Kim, S.Y., Park, S.H., Choi, Y.G., Kwon, S.B., Kim, M.K., Na, J.I., Youn, S.W., Park, K.C., 2005. Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis. Biol Pharm Bull 28, 2216–2219.

543. Kim, H.H., Kim, J. H., Kwak, H.B., Huang, H., Han, S.H., Ha, H., Lee, S.W., Woo, E.R., Lee, Z.H., 2004. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Biochem Pharmacol 67, 1647–1656.

544. Kim, H.H., Kim, D.H., Kim, M.H., Oh, M.H., Kim, S.R., Park, K.J., Lee, M.W.,2013. Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. Arch Pharm Res 36, 1533–1540.

545. Kim, I.R., Kim, S.E., Baek, H.S., Kim, B.J., Kim, C.H., Chung, I.K., Park, B.S., Shin, S.H., 2016. The role of kaempferol-induced autophagy on differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. BMC Complement Altern Med. 16, 1-10.

546. Kim, J.H., Kim, H.Y., Kang, S.Y., Kim, J.B., Kim, Y.H., Jin, C.H., 2018. Chemical constituents from *Apios americana* and their inhibitory activity on tyrosinase. Molecules 23, 1-11.

547. Kim, J.M., Ko, R.K., Jung, D.S., Kim, S.S., Lee, N.H., 2010. Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of Maackia fauriei. Phytother. Res. 24, 70-75.

548. Kim, J.Y., Cheon, Y.H., Kwak, S.C., Baek, J.M., Yoon, K.H., Lee, M.S., Oh, J., 2014. Emodin Regulates Bone Remodeling by Inhibiting Osteoclastogenesis and Stimulating Osteoblast Formation. J Bone Miner Res. 29, 1541-1553.

549. Kim, M.H., Ryu, S.Y., Cho, J.S., Min, Y.K., Kim, S.H., 2009. Saurolactam inhibits osteoclast differentiation and stimulates apoptosis of mature osteoclasts. J. Cell Physiol. 221, 618-628.

550. Kim, M., Lim, J., Lee, J.H., Lee, K.M., Kim, S., Park, K.W., Nho, C.W., Cho, Y.S., 2018. Understanding the functional role of genistein in the bone differentiation in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 by RNA-seq analysis. Sci Rep. 8, 1-12.

551. Kim, S.J., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 2003. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from Sophora flavescens. Biol. Pharm. Bull. 26, 1348-1350.

552. Kim, Y., 2007. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. Biol. Pharm. Bull. 30, 1052-1055.

553. Kim, Y.H., Kim, J., Park, H., Kim, H.P., 2007. Anti-inflammatory Activity of the Synthetic Chalcone Derivatives: Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase-

Catalyzed Nitric Oxide Production from Lipopolysaccharide-Treated RAW 264.7 Cells. Biol. Pharm. Bull. 30, 1450—1455.

554. Kim, Y.M., Yun, J., Lee, C.K., Lee, H., Min, K.R., Kim, Y., 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase nd mechanism of action. J. Biol. Chem. 277, 16340–16344.

555. Kimura, H., Tokuyama, S., Ishihara, T., Ogawa, S., Yokota, K., 2015. Identification of new flavonol O-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. J Pharm Biomed Anal. 108, 102-112.

556. Kimura, Y., Okuda, H., Kubo, M., 1995. Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. J Ethnopharmacol. 45, 131-139.

557. Kinghorn, A.D., Chin, Y.W., Swanson, S.M., 2009. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. Curr Opin Drug Discov. 12, 189-96.

558. Kiss, B., Popa, D.S., Paltinean, R., Loghin, F., 2012. A high-throughput UPLC-MS/MS for the simultaneous analysis of six phytoestrogens from *Genista* tinctoria extracts. J. Liq. Chrom. Relat. Tech. 35, 2735-2752.

559. Kiuchi, F., Chen, X., Tsuda, Y., 1990. Four new phenolic constituents from licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). Heterocycles 31, 629-636.

560. Ko, S.Y., 2012. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells. Arch Oral Biol 57, 1623-1632.

561. Kong, L., Ma, R., Yang, X., Zhu, Z., Guo, H., He, B., Wang, B., Hao, D., 2017. Psoralidin suppresses osteoclastogenesis in BMMs and attenuates LPS-mediated osteolysis by inhibiting inflammatory cytokines. Int Immunopharmacol. 51, 31-39.

562. Kopa, T.K., Tane, P., Wabo, H.K., Tala, M.F., Tchinda, A.T., Zofou, D., Tan, N.H., 2016. In vitro antiplasmodial activity of the isolated compounds from the stem bark of *Vitex thyrsiflora*. Comptes Rendus Chimie. 19, 807-811.

563. Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., Zovko Končić, M., 2013. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. Food Chem. 136, 335-341.

564. Koshino, H., Masaoka, Y., Ichihara, A., 1993. A benzofuran derivative released by Fe-deficient *Medicago sativa*. Phytochemistry 33, 1075-1077.

565. Kosyakov, D.S., Ul'yanovskii, N.V., Falev, D.I., 2014. Determination of triterpenoidsfrom birch bark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Anal. Chem. 69, 1264–1269.

566. Koysomboon, S., Altena, I., Kato, S., Chantrapromma, K., 2006. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. Phytochemistry 67, 1034–1040.

567. Krieg, M.A., Barkmann, R., Gonnelli, S., Stewart, A., Bauer, D.C., Del Rio Barquero. L., Kaufman, J.J., Lorenc, R., Miller, P.D., Olszynski, W.P., Poiana, C., Schott, A.M., Lewiecki, E.M., Hans, D., 2008. Quantitative ultrasound in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions. J Clin Densitom. 11, 163-187.

568. Kshirsagar, U.A., Parnes, R., Goldshtein, H., Ofir, R., Zarivach, R., Pappo, D., 2013. Aerobic Iron-Based Cross-Dehydrogenative Coupling Enables Efficient Diversity-Oriented Synthesis of Coumestrol-Based Selective Estrogen Receptor Modulators. Chem. Eur. J. 19, 13575-13583.

569. Kubo, I., Murai, Y., Soediro, I., Soetarno, S., Sastrodihardjo, S., 1992. Cytotoxic anthraquinones from *Rheum pulmatum*. Phytochemistry 31, 1063-1065.

570. Kubo, I., Nitoda, T., Nihei, K., 2007. Effects of quercetin on mushroom tyrosinase and B16-F10 melanoma cells. Molecules 12, 1045-1056.

571. Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K., 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (*Glycine max* MERRILL). Agric. Biol.Chem. 55, 2227-2233.

572. Kumar, A., Gupta, G.K., Khedgikar, V., Gautam, J., Kushwaha, P., Changkija, B., Nagar, G.K., Gupta, V., Verma, A., Dwivedi, A.K., Chattopadhyay, N., Mishra, P.R., Trivedi, R., 2012. *In vivo* efficacy studies of layer-by-layer nano-matrix bearing kaempferol for the conditions of osteoporosis: A study in ovariectomized rat model. Eur J Pharm Biopharm. 82, 508-517.

573. Kumar, S., Prahalathan, P., Raja, B., 2014. Vanillic acid: A potential inhibitor of cardiac and aortic wall remodeling in l-NAME induced hypertension through upregulation of endothelial nitric oxide synthase. Environ Toxicol Pharmacol. 38, 643-652.

574. Kumar, S., Sreepriya, M., 2017. Phytoestrogens Formononetin and Biochanin A stimulate osteoblast proliferation and influences osteogenesis *in vitro*. Res J Pharm Biol Chem Sci. 8, 1223-1231.

575. Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., 2007. Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. Phytother. Res. 21, 615–621.

576. Kumari, S., Singh, R., Walia, R.K., 2014. Synthesis and Bioevaluation of 3-(substitutedphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propen-1-ones and their Carbamate Derivatives against Root-Knot Nematode. OJC. 30, 1293-1302.

577. Kumari, A., Yadav, S.K., Pakade, Y.B., Kumar, V., Singh, B., Chaudhary, A., Yadav, S.C., 2011. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 82, 224-232.

578. Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M.S., Nakayama. T., 2002. Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. J. Agric. Food Chem. 50, 373-377.

579. Kuniyoshi, S., Seiji, Y., Ryuichiro, K., 2003. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. Chem. Pharm. Bull. 51, 318–319.

580. Kuo, P.L., 2005. Myricetin inhibits the induction of anti-Fas IgM-, tumor necrosis factor-α- and interleukin-1 β-mediated apoptosis by Fas pathway inhibition in human osteoblastic cell line MG-63. Life Sci. 77, 2964-2976.

581. Kuo, Y.C., Meng, H.C., Tsai, W.J., 2001. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. Inflamm Res. 50, 73–82.

582. Kuo, Y.C., Yang, L.M., Lin, L.C., 2004. Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. Planta Med. 70, 1237-1239.

583. Kuo, Y.H., Wu, T.R., Cheng, M.C., Wang, Y., 1990. Five new compounds from the heartwood of *Juniperus formosana* HAYATA. Chem Pharm Bull. 38, 3195-3201.

584. Kureel, J., Dixit, M., Tyagi, A.M., Mansoori, M.N., Srivastava, K., Raghuvanshi, A., Maurya, R., Trivedi, R., Goel, A., Singh, D., 2014. miR-542e3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. Cell Death Dis. 5, 1-11.

585. Kuroyanagi, G., Otsuka, T., Kondo, A., Matsushima-Nishiwaki, R., Mizutani, J., Kozawa, O., Tokuda, H., 2013. (-)-Epigallocatechin gallate amplifies interleukin-1-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Biochimie. 95, 1933-1938.

586. Kuroyanagi, G., Tokuda, H., Yamamoto, N., Kainuma, S., Fujita, K., Ohguchi, R., Kawabata, T., Sakai, G., Matsushima-Nishiwaki, R., Harada, A., Kozawa, O., Otsuka, T., 2017. (-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E2-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. Prostaglandins & Other Lipid Mediat. 128, 27-33.

587. Suh, K.S., Rhee, S.Y., Kim, Y.S., Lee, Y.S., Choi, E.M., 2013. Xanthohumol modulates the expression of osteoclast-specific genes during osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Food Chem Toxicol. 62, 99-106.

588. Kwon, O.J., Bae, J.S., Lee, H.Y., Hwang, J.Y., Lee, E.W., Ito, H., Kim, T.H., 2013. Pancreatic lipase inhibitory gallotannins from Galla Rhois with inhibitory effects on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Molecules. 18, 10629-10638.

589. Kyekyeku, J.O., Kusari, S., Adosraku, R.K., Zühlke, S., Spiteller, M, .2016. Prenylated 2-arylbenzofuran derivatives with potent antioxidant properties from *Chlorophora regia* (Moraceae). Fitoterapia. 108, 41-47.

590. Lall, N., Kishore, N., Momtaz, S., Hussein, A., Naidoo, S., Nqephe, M., and Crampton, B., 2015. Extract from *Ceratonia siliqua* Exhibits Depigmentation Properties. Phytotherapy Research. 29, 1729-1736.

591. Laghari, A.Q., Memon, S., Nelofar, A., Laghari, A.H., 2013. *Tecomella undulata* G. Don: A rich source of flavonoids. Ind Crops Prod. 43, 213-217.

592. Lagharia, A.H., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K.M. 2011. *Alhagi maurorum*: aconvenient source of lupeol. Indus. Crops Prod. 34, 114–1145.

593. Lai, J.N., Wu, C.T., Wang, J.D., 2012. Prescription pattern of Chinese herbal products for breast cancer in Taiwan: a population-based study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 12, 891-893.

594. Lai, Y.L., Yamaguchi, M., 2006. Phytocomponent p-hydroxycinnamic acid stimulates bone formation and inhibits bone resorption in rat femoral tissues *in vitro*. Molecular and cellular biochemistry. 292, 45-52.

595. Lall, N., Kishore, N., Momtaz, S., Hussein, A., Naidoo, S., Nqephe, M., Crampton, B., 2015. Extract from *Ceratonia siliqua* exhibits depigmentation properties. Phytotherapy Research. 29, 1729-1736.

596. Lan, X., Deng, K., Zhao, J., Chen, Y., Xin, X., Liu, Y., Khan, I.A., Yang, S., Wang, T., Xu, Q., 2017. New Triterpenoid Saponins from Green Vegetable Soya Beans and Their Anti-Inflammatory Activities. J Agric Food Chem. 2017, 65, 11065-11072.

597. Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H.B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K., Jana, M., 2001. Antibacterial Activity of Some Moroccan Medicinal Plants. Phytother. Res. 15, 250–252.

598. Larit, F., Nael, M.A., Benyahia, S., Radwan, M., León, F., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Wieczorek, D., Benayache, F., Benayache, S., Wieczorek, P., Cutler, S., 2018. Secondary metabolites from the aerial parts of *Cytisus villosus* Pourr. Phytochemistry Letters. 24, 1-5.

599. Larsen, E., Kharazmi A., Christensen L.P., Christensen, S.B., 2003. An antiinflammatory galactolipid from Rose Hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. J Nat Prod. 66, 994-995.

600. Latté, K.P., Ferreira, D., Venkatraman, M.S., Kolodziej, H., 2002. O-Galloyl-C-glycosylflavones from *Pelargonium reniforme*. Phytochemistry. 59, 419-424.

601. Lauwaet, T., Andersen, Y., Van de Ven, L., Eckmann, L., Gillin, F.D., 2010. Rapid detachment of *Giardia lamblia* trophozoites as a mechanism of antimicrobial action of the isoflavone formononetin. J Antimicrob Chemother. 65, 531-534.

602. Lazennec, G. and Bresson D., Lucas A., Chauveau C., Vignon, F., 2001. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. Endocrinology 142, 4120-30.

603. Lee, S.C., Chang, S.J., Tsai, L.Y., 2004. Effects of traditional Chinese medicines on serum lipid profiles and homocysteine in the ovariectomized rats. J Chin Med. 32, 541-550.

604. Lee, S.C., Wu, S.H., Hsiao, T.H., Yang, Y.C., Tien, Y.C., Chen, B.H., Ma, H., Yeh, F.L., Wu, S.Y., Tsai, L.Y., 2005. Effects of Chia-wei-hsiao-yao-san on bone loss in ovariectomized rats. J. Food Drug Anal. 13, 232-238.

605. Lee, S.H., Jin, N., Paik, D.J., Kim, D.Y., Chung, I.M., Park, Y., 2011. Consumption of legumes improves certain bone markers in ovariectomized rats. Nutr. Res. 31, 397-403.

606. Lee, C., Lee, J.W., Seo, J.Y., Hwang, S.W., Im, J.P., Kim, J.S., 2016. Lupeol inhibits LPS-induced NF-kappa B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis. Life Sci. 146, 100-108.

607. Lee, Y.S., Chen, X., Anderson, J.B., 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Nutr Res 21, 1287-1298.

608. Lee, D., Bhat, K.P., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2001. Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. J. Nat. Prod. 64, 1286-1293.

609. Lee, S.H., Takashi, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I., 1991. Tannins and related compounds. CV. Monomeric and dimeric hydrolyzable tannins having a dehydrohexahydroxydiphenoyl group, supinanin, euphorscopin, euphorhelin and jolkianin, from *Euphorbia* species. Chem. Pharm. Bull. 39, 630-638.

610. Lee, G., Na, H.J., Namkoong, S., Jeong Kwon, H., Han, S., Ha, K.S., Kwon, Y.G., Lee, H., Kim, Y.M., 2006. 4-O-methylgallic acid down-regulates endothelial adhesion molecule expression by inhibiting NF-κB-DNA-binding activity. Eur. J. Pharmacol. 551, 143-151.

611. Lee, G.H., Lee, S.J., Jeong, S.W., Kim, H.C., Park, G.Y., Lee, S.G., Choi, J.H., 2016. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 143, 511-517.

612. Lee, J., Jang, D.S., Kim, N.H., Lee, Y.M., Kim, J., Kim, J.S., 2011. Galloyl Glucoses from the Seeds of *Cornus officinalis* with Inhibitory Activity against Protein

Glycation, Aldose Reductase and Cataractogenesis *ex Vivo*. Biol Pharm Bull. 34, 443-446.

613. Lee, J.H., Lee, B.W., Kim, J.H., Jeong, T.S., Kim, M.J., Lee, W.S., Park, K.H., 2006. LDL-Antioxidant Pterocarpans from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. J. Agric. Food Chem. 54, 2057-2063.

614. Lee, K.H., Choi, E.M., 2008. Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-d-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Eur J Pharmacol. 591, 1-6.

615. Lee, N.J., Choi, J.H., Koo, B.S., Ryu, S.Y., Han, Y.H., Lee, S.I., Lee, D.U., 2005. Antimutagenicity and Cytotoxicity of the Constituents from the Aerial Parts of *Rumex acetosa*. Biol Pharm Bul. 28, 2158-2161.

616. Lee, S.C., Chang, S.J., Tsai, L.Y., 2004. Effects of traditional Chinese medicines on serum lipid profiles and homocysteine in the ovariectomized rats. J Chin Med. 32, 541-550.

617. Lee, S.C. and Wu S.H., Hsiao T.H., Yang Y.C., Tien Y.C., Chen B.H., Ma H., Yeh F.L., Wu S.Y., Tsai L.Y., 2005. Effects of Chia-wei-hsiao-yao-san on bone loss in ovariectomized rats. J. Food Drug Anal. 13, 232-238.

618. Lee, S.H., Jin, N., Paik, D.J., Kim, D.Y., Chung, I.M., Park, Y., 2011. Consumption of legumes improves certain bone markers in ovariectomized rats. Nutr. Res. 31, 397-403.

619. Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I., 1990. Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*. Phytochemistry 29, 3621-3625.

620. Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I., 2004. Structure and Biogenesis of Jolkinin, a Highly Oxygenated Ellagitannin from *Euphorbia jolkinii*. J. Nat. Prod. 67, 1018-1022.

621. Lee, S.H., Kim, J.K., Jang, H.D., 2014. Genistein Inhibits Osteoclastic Differentiation of RAW 264.7 Cells via Regulation of ROS Production and Scavenging. Int. J. Mol. Sci. 15, 10605-10621.

622. Lee, S.U., So, Y.J., Shin, M.S., Cho, J.Y., Lee, J., 2014. Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals. Molecules. 19, 3173-3180.

623. Lee, S.U., Shin, H.K., Min, Y.K., Kim, S.H., 2008. Emodin accelerates osteoblast differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase activation and bone morphogenetic protein-2 gene expression. Int Immunopharmacol. 8, 741-747.

624. Lee, S.Y., Choi, D.Y., Woo, E.R., 2005. Inhibition of osteoclast differentiation by tanshinones from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Arch Pharmacol Res. 28, 909-913.

625. Lee, W., Ku, S.K., Kim, T.H., Bae, J.S., 2013. Emodin-6-O-β-d-glucoside inhibits HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. Food Chem. Toxicol. 52, 97-104.

626. Lee, W.S., Lee, E.G., Sung, M.S., Yoo, W.H., 2014. Kaempferol inhibits IL-1β-stimulated, RANKL-mediated osteoclastogenesis via downregulation of MAPKs, c-Fos, and NFATc1. Inflammation. 37, 1221-1230.

627. Lei, T.C., Virador, V., Yasumoto, K.I., Vieira, W.D., Toyofuku, K., Hearing, V.J., 2002. Stimulation of melanoblast pigmentation by 8-methoxypsoralen: the involvement of microphthalmia-associated transcription factor, the protein kinase a signal pathway, and proteasome-mediated degradation. J. Investig. Dermatol. 119, 1341–1349.

628. Lemouchia, R., Selles, C., Medjdoubc, H., Tabti, B., 2015. Assessment of possible efficacy of aqueous leaves extract of *Psoralea bituminosa* L. for anti-hyperglycaemic activity. Asian Pac J Trop Dis. 5, 299-307.

629. Lemouchi, R., Selles, C., Dib, M., Benmansour, N., Allal, A., Tabti, B., uali, K., 2017. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Hydrosol Extract Obtained by Hydrodistillation (HY) and Liquid-Liquid Extraction (LLE) of *Psoralea bituminosa*. J Herbs Spices Med Plants. 23, 299-307.

630. Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., Mimica-Dukić N., 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. J Funct Foods. 40, 68-75.

631. Leu, Y.L., Chan, Y.Y., Wu, T.S., 1998. Sodium aristolochate derivatives from leaves of *Aristolochia foveolata*. Phytochemistry. 48, 743-745.

632. Levey, M., 1956. Babylonian chemistry: a study of Arabic and second millenium B.C. perfumery. Osiris. 12, 376–389.

633. Lewiecki, EM. 2010. Treatment of osteoporosis with denosumab. Maturitas. 66, 182-186.

634. Lewis, M.D., Blake, G.M., Fogelman, I., 1994. Patient dose in dual X-ray absorptiometry. Osteoporosis Int. 4, 15.

635. Lewis, M.D., Blake, G.M., Fogelman, I., 1994. Patient dose in dual X-ray absorptiometry. Osteoporosis Int. 4, 15.

636. Li, H.Q., Luo, Y., Song, R., Li, Z.L., Yan, T., Zhu, H.L., 2010. Design, Synthesis, and Immunosuppressive Activity of New Deoxybenzoin Derivatives. Chem Med Chem. 5, 1117 – 1122.

637. Li, B., Ni, Y., Zhu, L.J., Wu, F.B., Yan, F., Zhang, X., Yao, X.S., 2015. Flavonoids from *Matteuccia struthiopteris* and their anti-influenza virus (H1N1) activity. J Nat Prod. 78, 987-995.

638. Li, C.W., Dong, H.J., Cui, C.B., 2015. The Synthesis and Antitumor Activity of Twelve Galloyl Glucosides. Molecules 20, 2034-2060.

639. Li, F., Liang, D., Yang, Z., Wang, T., Wang, W., Song, X., Guo, M., Zhou, E., Li, D., Cao, Y., Zhang, N., 2013. Astragalin suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model. Int J Immunopharmacol. 17, 478-482.

640. Li, F., Li, Q., Huang, X., Wang, Y., Ge, C., Qi, Y., Guo, W., Sun, H., 2017. Psoralen stimulates osteoblast proliferation through the activation of nuclear factor-κB-mitogen-activated protein kinase signaling. Exp Ther Med. 14, 2385-2391.

641. Li, G., Ju, H.K., Chang, H.W., Jahng, Y., Lee, S.H., Son, J.K., 2003. Melanin biosynthesis inhibitors from the bark of *Machilus thunbergii*. Biol. Pharm. Bull. 26, 1039–1041.

642. Li, H. Q., Xue, J. Y., Shi, L., Gui, S. Y., Zhu, H. L., 2008. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of deoxybenzoin derivatives from genistein. Eur. J. Med. Chem. 43, 662–667.

643. Li, H., Yoon, J.H., Won, H.J., Ji, H.S., Yuk, H.J., Park, K.H., Park, H.Y., Jeong, T.S., 2017. Isotrifoliol inhibits pro-inflammatory mediators by suppression of TLR/NF-κB and TLR/MAPK signaling in LPS-indued RAW264.7 cells. Int Immunopharmacol 45, 110-119.

644. Li, K., Ji, S., Song, W., Kuang, Y., Lin, Y., Tang, S., Cui, Z., Qiao, X., Yu, S., Ye, M., 2017. Glycybridins A-K, Bioactive Phenolic Compounds from *Glycyrrhiza glabra*. J. Nat. Prod. 80, 334-346.

645. Li, L., Zhou, Y., Shao, X., Liu, Y., Wang, R., Wang, D., 1996. Keto-salvia preventing postmenopausal osteoporosis. Chin J Osteoporos. 2, 78-81.

646. Li, N., Zhang, P., Wu, H., Wang, J., Liu, F., Wang, W., 2015. Natural flavonoids function as chemopreventive agents from Gancao (*Glycyrrhiza inflata* Batal). J Funct Foods. 19, 563-574.

647. Li, N., Wang, Y., Li, X., Zhang, H., Zhou, D., Wang, W., Li, W., Zhang, X., Li, X., Hou, Y., Meng, D., 2016. Bioactive phenols as potential neuroinflammation inhibitors from the leaves of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. Bioorg Med Chem Lett. 26, 5018-5023.

648. Li, T., Liu, J., Zhang, X., Ji, G., 2007. Antidiabetic activity of lipophilic (−)-epigallocatechin-3-gallate derivative under its role of α-glucosidase inhibition. Biomed. Pharmacother. 61, 91–96.

649. Li, T., Wong, V.K., Jiang, Z. H., Jiang, S.P., Liu, Y., Wang, T.Y., 2015. Mutation of cysteine 46 in IKK-beta increases inflammatory responses. Oncotarget. 6, 31805-31819.

650. Li, X., Ni, H., Wang, Y., 2017. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. Biomed. Pharmacother. 89, 1136-1141.

651. Li, X.H., Zhang, J.C., Sui, S.F., Yang, M.S., 2005. Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic transdifferentiation of osteoblasts. Acta Pharmacol Sin. 2005, 26, 1081-1086.

652. Li, Y., Yili, A., Liu, Y., Kawuli, A., Aisa, H.A., 2014. Chemical Constituents of *Hippophae rhamnoides* subsp. *turkestanica* Fruits. Chem. Nat. Compd. 50, 352–354.

653. Li, Z.J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H.G., Aibai, S., 2017. Antifungal Activity of Gallic Acid *In Vitro* and *In Vivo*. Phytother Res. 7, 1039-1045.

654. Liang, C.Z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y., Tao, L., Yang, Z., Zhou, X., Shi, Z., Tao, H., 2012. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. Cancer Biother. & Radio. 27, 701-710.

655. Liang, H.X., Dai, H.Q., Fu, H.A., Dong, X.P., Adebayo, A.H., Zhang, L.X., Cheng, Y.X., 2010. Bioactive compounds from *Rumex* plants. Phytochem Lett. 3, 181-184.

656. Liao, M.H., Tai, Y.T., Cherng, Y.G., Liu, S.H., Chang, Y.A., Lin, P.I., Chen, R.M., 2014. Genistein induces oestrogen receptor-I gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF-I B/ activator protein-1 and promotes cell mineralisation. Br J Nut. 111, 55-63.

657. Liao, S.G., Zhang, L.J., Sun, F., Wang, Z., He, X., Wang, A.M., Li, Y.J., Huang, Y., Lan, Y.Y., Zhang, B.L., Wang, Y.L., 2013. Identification and Characterisation of Phenolics in *Polygonum capitatum* by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry. Phytochem. Anal. 24, 556-568.

658. Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. Current Science. 94, 44-52.

659. Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B., Ploypradith, P., 2006. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 5650–5653. .

660. Lim, S.H., Ha, T.Y., Kim, S.R., Ahn, J., Park, H.J., Kim, S., 2008. Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent bakuchiol reduce bone loss in ovariectomised Sprague–Dawleyrats. Br.J.Nutr. 19, 1–9.

661. Lin, H.Y., Harris, T.L., Flannery, N.S., 1991. Expression Cloning of an Adenylate Cyclase-coupled Calcitonin Receptor. Science. 254, 1022-1024.

662. Lin, C.F., Liu, Y.W., Kuo, Y.H., Shen, C.C., Chiou, W.F., Chen, C.C., 2016. Flavonoids and bis-coumarin from the tubers of *Apios taiwanianus*. Phytochem Lett. 15, 164-167.

663. Lin, C.F., Liu, Y.W., Kuo, Y.H., Chen, C.C., 2016. Two new isoflavones from the tubers of *Apios taiwanianus*. Phytochem Lett. 15, 164-167.

664. Lin, C.N., Chung, M.I., Lu, C.M., 1990. Anthraquinones from *Rhamnus formosana*. Phytochemistry. 29, 3903-3905.

665. Lin, H.Y., Chang, S.T., 2012. Kaempferol glycosides from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* and their nitric oxide production inhibitory activities. Carbohydr. Res. 364, 49-53.

666. Lin, X., Chen, Y., Lv, S., Tan, S., Zhang, S., Huang, R., Zhuo, L., Liang, S., Lu, Z., Huang, Q., 2015. *Gypsophila elegans* isoorientin attenuates CCl4-induced hepatic fibrosis in rats via modulation of NF-κB and TGF-β1/Smad signaling pathways. Int Immunopharmacol. 28, 305-312.

667. Lincha, V.R., Zhao, B.T., Woo, M.H., Yang, I.J., Shin, H.M., 2016. Effects of Constituent Compounds of *Smilax china* on Nicotine-Induced Endothelial Dysfunction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Biol. Pharm. Bull. 39, 984-992.

668. Lind, L., Skoog, G., Mälstam, J., 1993. Relations between mixed venous oxygen saturation and hemodynamic variables in patients subjected to abdominal aortic aneurysm surgery and in patients with septic shock. Ups J Med Sci. 98, 83-7.

669. Littlefield, B.A., Gurpide, E., Markiewicz, L., McKinley, B., Hochberg, R. B., 1990. A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids. Endocrinology. 127, 2757-2762.

670. Litvinenko, V.I., Ammosov A.S., 2007. Phenolic compounds of the genera *Glycyrrhiza* and *Meristotropis* Fisch. et Mey. (review). Pharm Chem J. 41, 372-395.

671. Liu, Z.P., Li, W.X., Yu, B., Huang, J., Sun, J., Huo, J.S, Liu, C.X., 2005. Effects of transresveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. J Med Food. 8, 14-19.

672. Liu, B., Kongstad, K.T., Qinglei, S., Nyberg, N.T., Jäger, A.K., Staerk, D., 2015. Dual High-Resolution α-Glucosidase and Radical Scavenging Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of Minor and Major Constituents Directly from the Crude Extract of *Pueraria lobata*. J. Nat. Prod. 78, 294-300.

673. Liu, C.L., Chen, Y.S., Yang, J.H., Chiang, B.H., 2008. Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* moench) buckwheat sprouts. J Agric Food Chem. 56, 173-178.

674. Liu, F., Sun, G.Q., Gao, H.Y., Li, R.S., Soromou, L.W., Chen, N., Deng, Y.H., Feng, H.H., 2013. Angelicin regulates LPS-induced inflammation via inhibiting MAPK/NF-κB pathways. J Surg Res. 185, 300-309.

675. Liu, J.C., Hsu, F.L., Tsai, J.C., Chan, P., Liu, J.Y., Thomas, G.N., Tomlinson, B., Lo, M.Y., Lin, J.Y., 2003. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiontensin converting enzyme. Life Sci. 73, 1543-1555.

676. Liu, M., Yang, S., Jin, L., Hu, D., Wu, Z., Yang, S., 2012. Chemical Constituents of the Ethyl Acetate Extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC Roots and Their Antitumor Activities. Molecules 17, 6156-6169.

677. Liu, S., Ai, Q., Feng, K., Li, Y., Liu, X., 2016. The cardioprotective effect of dihydromyricetin prevents ischemia-reperfusion-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* via the PI3K/Akt and HIF-1alpha signaling pathways. Apoptosis. 21, 1366–1385.

678. Liu, S., Xu, F., Liu, L., Ma, D., 2015. A convenient synthesis of Lupeol from Betulin. Ind Crops Prod. 74, 494-496.

679. Liu, Y., Ba, W.J., 2015. Chemical constituents of *Salvia roborowskii*. Chem. Nat. Compd. 51, 590-591.

680. Liu, Y., Fang, J., Lei, T., Wang, W., Lin, A., 2003. Anti-endotoxic effects of syringic acid of Radix Isatidis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 23, 206-208.

681. Liu, Y., Liu, J.P., Xia, Y., 2014. Chinese herbal medicines for treating osteoporosis. Cochrane Database Syst Rev. 3, CD005467.

682. Liu, Y., Zang, H., Zhang, H., Chen, J., 2005. Effect of Herba Epimedii flavone on expression of OPG and RANKL in rat osteoblasts. Zhong Yao Cai. 28, 1076 –1078.

683. Liu, Y., Nielsen, M., Staerk, D., Jäger, A.K., 2014. High-resolution bacterial growth inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antibacterial constituents in Chinese plants used to treat snakebites. J Ethnopharmacol. 155, 1276-1283.

684. Liu, Y., Staerk, D., Nielsen, M.N., Nyberg, N., Jäger, A.K., 2015. High-resolution hyaluronidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of anti-necrosis constituents in Chinese plants used to treat snakebite. Phytochemistry 62, 62-69.

685. Liu, Z.P., Li, W.X., Yu, B., Huang, J., Sun, J., Huo, J.S, Liu, C.X., 2005. Effects of transresveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. J Med Food. 8, 14-19.

686. Llorent-Martínez, E.J., Spinola, V., Gouveia-Figueira, S., Castilho, P.C., 2015. HPLC-ESI-MS characterization of phenolic compounds, terpenoidsaponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. Ind Crops Prod. 60, 80–90.

687. Locatelli, M., Tammaro, L., Menghini, L., Carlucci, G., Epifano, F., Genovese, S., 2009. Anthraquinone profile and chemical fingerprint of *Rhamnus saxatilis* L. from Italy. Phytochem Lett. 2, 223-226.

688. Lock, M. 1994. Menopause in cultural context. Exp Gerontology. 3, 307-317.

689. Longo, R. 1965. Distinctive chromatographic identification of the bark of *Rhamnus frangula*, *Rhamnus purshiana*, *Rhamnus alpina* and *Rhamnus fallax*. Boll. Chim. Farm. 104, 828–833.

690. Looker, A.C. Johnston, C.C. Jr, Wahner, H.W., Dunn, W.L., Calvo, M.S., Harris, T.B., Heyse, S.P., Lindsay, R.L., 1995. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. women from NHANES III. Bone Miner Res. 10, 796-802.

691. Lotito, S.B., Fraga, C.G., 1999. (+)-Cathechin as antioxidant: Mechanisms preventing human plasma oxidation and activity in red wines. BioFactors. 10, 125-130.

692. Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rastrelli, L., 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. J Agric Food Chem. 58, 2209-2213.

693. Lu, H., Kraut, D., Gerstenfeld, L.C., Graves, D.T., 2003. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. Endocrinology 1, 346-352.

694. Lu, J., Jin, Y., Liu, G., Zhu, N., Gui, M., Yu, A., Li, X., 2010. Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*. Chem. Nat. Compd. 46, 205-208.

695. Lu, T.M., Ko, H.H., 2016. A new anthraquinone glycoside from *Rhamnus nakaharai* and anti-tyrosinase effect of 6-methoxysorigenin. Nat Prod Res. 30, 1-7.

696. Lu, T.M., Kuo, D.H., Ko, H.H., Ng, L.T., 2010. Synthesis and Structure−Activity Relationship Study of Deoxybenzoins on Relaxing Effects of Porcine Coronary Artery. J. Agric. Food Chem. 58, 10027–10032.

697. Luis, A., Domingues, F., Gil, C., Duarte, A. P., 2009. Antioxidant activity of extract of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. J. Med. Plants Res. 3, 886-893.

698. Lukert, B.P., Kream, B.E., 1996. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone, in: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Eds), Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, pp. 533-548.

699. Luo, Y., Li, H.Q., Zhou, Y., Li, Z.L., Yan, T., Zhu, H.L., 2010. Metronidazole-Deoxybenzoin Derivatives as AntiHelicobacter Agents with Potent Inhibitory Activity against HPE-Induced Interleukin-8. ChemMed Chem. 5, 1110 – 1116.

700. Luyen, B.T., Tai, B.H., Thao, N.P., Cha, J.Y., Lee, H.Y., Lee, Y.M., Kim, Y.H., 2015. Anti-inflammatory components of *Chrysanthemum indicum* flowers. Bioorganic Med. Chem. Lett. 25, 266-269.

701. Lv, H., Yu, Z., Zheng, Y., Wang, L., Qin, X., Cheng, G., Ci, X., 2016. Isovitexin exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPK and NF-κB and activating HO-1/Nrf2 pathways. Int J Biol Sci. 12, 72-86.

702. Ma, Z.J., Shimanuki, S., Igarashi, A., Kawasaki, Y., Yamaguchi, M., 2000. Preventive effect of dietary fermented soybean on bone loss in ovariectomized rats: Enhancement with isoflavone and zinc supplementation. J Health Sci. 46, 263 - 268.

703. Ma, W.G., Fukushi, Y., Hostettmann, K., Tahara, S., 1998. Isoflavonoid glycosides from *Eriosema tuberosum*. Phytochemistry 49, 251 - 254.

704. Ma, Z., Piao, T., Wang, Y., Liu, J., 2013. Astragalin inhibits IL-1β-induced inflammatory mediators production in human osteoarthritis chondrocyte by inhibiting NF-κB and MAPK activation. Int J Immunopharmacol. 17, 478-482.

705. Macıas, F.A., Simonet, A.M., Galindo, J.C.G., Castellano, D., 1999. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. Phytochemistry 50, 35-46.

706. Madan, S., Singh, G.N., Kohli, K., Ali, M., Kumar, Y., Singh, R.M., Prakash, O., 2009. Isoflavonoids from *Flemingia strobilifera* (L) R. Br. roots. Acta Pol Pharm. 66, 297 - 303.

707. Magalhaes, A.F., Tozzi, A.M.G.A., Magalhaes, E.G., Souza-Neta, L.C., 2006. New prenylated metabolites from *Degulia longeracemosa* and evaluation of their antimicrobial potential. Planta Med. 72, 358-363.

708. Magalhães, A.F., Tozzi, A.M., Magalha, E.G., de Souza Moraes, V.R., 2001. Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. Phytochemistry 57, 77-89.

709. Mahapatra, .D.K., Bharti, S.K., 2016. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. Life Sci. 148, 154-172.

710. Mai, L.P., Guéritte, F., Dumontet, V., Tri, M.V., Hill, B., Thoison, O., Guénard, D., Sévenet, T., 2001. Cytotoxicity of rhamnosylanthraquinones and rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. J. Nat. Prod. 64, 1162-1168.

711. Makena, P.S., Chung, K.T., 2007. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity. Food Chem. Toxicol. 45, 1899-1909.

712. Makhmudov, R.R., Abdulladzhanova, N.G., Kamaev, F.G., 2011. Phenolic compounds from *Plantago major* and *P. lanceolata*. Chem. Nat. Compd. 47, 288 - 289.

713. Makino, T., Inagaki, T., Komatsu, K.I., Kano, Y., 2005. Pharmacokinetic interactions between Japanese traditional kampomedicine and modern medicine (IV). Effect of Kamisyoyosan and Tokisyakuyakusan on the pharmacokinetics of etizolam in rats. Biol. Pharm. Bull. 28, 280-284.

714. Makino, T., Kanemaru, M., Okuyama, S., Shimizu, R., Tanaka, H., Mizukami, H., 2013. Antiallergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (α-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside), quercetin 3-O-glucoside, α-oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. J. Nat. Med. 67, 881–886.

715. Mandadi, K., Ramirez, M., Jayaprakasha, J., Faraji, B., Lihono, M., Deyhim, F., Patil, B., 2009. Citrus bioactive compounds improve bone quality and plasma antioxidant activity in orchidectomized rats. Phytomed. 16, 513-520.

716. Manolagas, S.C., 2000. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 21, 115-137.

717. MarArriero, M.S.M., Monjo, M., Ramis, J.M., 2013. Quercitrin and Taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Biochem Pharmacol. 86, 1476-1486.

718. Marc, B., Nelly, A., Annick, D.D., Frederic, D., 2008. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. J Ethnopharmacol. 120, 315–334.

719. Halabalaki, M., Urbain, A., Paschali, A., Mitakou, S., Tillequin, F., Skaltsounis, A.L., 2011. Quercetin and Kaempferol 3-O-[α-l-Rhamnopyranosyl-(1→2)-α-l-arabinopyranoside]-7-O-α-l-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae*: Structure Determination and Conformational Studies. J. Nat. Prod. 74, 1939–194.

720. Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H., Gurpide, E. 1993. *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 45, 399-405.

721. Martin, R.B., Burr, D.B., 1989. Structure, function, and adaptation of compact bone. Raven Press, New York.

722. Martin, T., Gooi, J.H., Sims, N.A., 2009. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 19, 73–88.

723. Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., 2012. The effects of soil amendments on the growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in heavy metal-contaminated soils. Water Air Soil Pollut. 223, 63–72.

724. Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero-Espinar, P., Flores, P., del Río, J.A., 2011. Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. J.Plant Physiol. 168, 2206–2211.

725. Marwan, M.M., Jiang, J., Castrucci, A.M., Hadley M.E., 1990. Psoralens stimulate mouse melanocyte and melanoma tyrosinase activity in the absence of ultraviolet light. Pigment Cell Res. 3, 214-224.

726. Marzouk, M.S., El-Toumy, A.A., Merfort, I., Nawwar, M., 1999. Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. Phytochemistry. 152, 943 - 946.

727. Masamoto, Y., Murata, Y., Baba, K., Shimoishi, Y., Tada, M. Takahata, K., 2004. Inhibitory Effects of Esculetin on Melanin Biosynthesis. Biol. Pharm. Bull. 27, 422-425.

728. Masao, H., Teruo, S., 1957. Flavonoids of Various *Prunus* Species. V. The Flavonoids in the Wood of *Prunus verecunda*. J. Am. Chem. Soc. 79, 450–452.

729. Masson, P. 1948. Pigment cells in man, in: Miner R.W., Gordon M. (Eds), The biology of melanomas, New York Academy of Sciences, New York, pp. 15-51.

730. Masuda, T., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K., Kuninaga, H., 2008. Identification of geranic acid, a Tyrosinase inhibitor in lemongrass *Cymbopogon citratus*. J. Agri. Food Chem. 56, 597–601.

731. Mathiesen, E.B., Joakimsen, O., Bonaa, K.H., 2000. Intersonographer reproducibility and intermethod variability of ultrasound measurements of carotid artery stenosis: The Tromso Study. Cerebrovasc Dis. 10, 207-213.

732. Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Solujić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, M., 2013. Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop. and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 755, 81-89.

733. Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M., 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. J. Biol. Chem. 281, 8981–8990.

734. Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T., Yoshikawa, M., Phytoestrogens from the Roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): Structure-Requirement of Hydroxyanthraquinones for Estrogenic Activity. Bioorg Med Chem Lett. 11, 1839–1842.

735. Matsuo, K., Kobayashi, M., Takuno, Y., Kuwajima, H., Ito, H., Yoshida, T., 1997. Anti-tyrosinase activity constituents of *Arctostaphylos* uva-ursi. Yakugaku Zasshi. 117, 1028 - 1032.

736. Matthaus, B., Özcan, M., 2011. Lipid evaluation of cultivated and wild carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed oil growing in Turkey. Sci Hortic. 130, 181-184.

737. Maude, R.J., Woodrow, C.J., White, L.J., 2010. Artemisinin Antimalarials: Preserving the “Magic Bullet”. Drug Dev Res. 71, 12–19.

738. Maurich, T., Iorio, M., Chimenti, D., Turchi, G. 2006. Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpans purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and -deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. Chem Biol Interact. 159, 104–116.

739. Mayer, AM., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? Phytochemistry 67, 2318–31.

740. Mazaki, T., Mazakia, T., Kitajimac, T., Shiozaki, Y., Sato, M., Mino, M., Yoshida, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Tanaka, M., Ozakia, T., Matsukawa, A., Ito, Y., 2014. *In vitro* and *in vivo* enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells. J Funct Foods. 6, 241-247.

741. McKinlay, S.M., Brambilla, D.J., Posner, J.G., 1992. The normal menopause transition. Maturitas. 14, 103-115.

742. McLachlan, J.A., Simpson, E., Martin, M., 2006. Endocrine disrupters and female reproductive health. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 63-75.

743. Mellstrom, D.D., Sorensen, O.H., Goemaere, S., Roux, C., Johnson, T.D., Chines, A.A., 2004. Seven years of treatment with risedronate in women with postmenopausal. Calcif Tissue Int. 75, 462-468.

744. Melo, C.M., Carvalho, K.M.M.B., Neves, J.C.S., Morais, T.C., Rao, V.S., Santos, F.A., Carvalho, K.M.M.B., de Castro Brito, G.A., Chaves, M.H., 2010. α,β-amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginne-induced acute pancreatitis in rats. World J Gastroenterol. 16, 4272-4280.

745. Melton, J., Kan, S.H., Wahnerh, W., Riggs, B.L., 1988. Lifetime fracture risk: an approach to hip fracture risk assessment based on bone mineral density and age. J Clin Epidemiol. 41, 985-994.

746. Melton, L.J. 3rd, Chrischilles, E.A., Cooper, C., Lane, A.W., Riggs, B.L., 2005. How many women have osteoporosis? J Bone Miner Res. 20, 886-92.

747. Melton, L.J. 3rd, Atkinson, E.J., O'Connor, M.K., 1998. Bone density and fracture risk in men. J Bone Miner Res. 13, 19-15.

748. Melton, LJ. 3rd, Chrischilles, E.A., Cooper, C., 1992. Perspective. How many women have osteoporosis? J Bone Miner Res. 7, 1005-1010.

749. Mendes-Silva, W., Assafim, M., Ruta, B., Monteiro, R.Q., Guimarães, J.A., Zingali, R.B., 2003. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. Thromb Res. 112, 93–98.

750. Meng, F.H., Li, Y.B., Xiong, Z.L., Jiang, Z.M., Li, F.M., 2005. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. Phytomedicine 12, 189–193.

751. Mengeaud, V., Ortonne, J.P., 1994. Regulation of melanogenesis induced by 5-methoxypsoralen without ultraviolet light in murine melanoma cells. Pigment Cell Res. 7, 145-254.

752. Mhaisen, A. 1991. Carob tree. Agricultural Enginee. 43, 90-91.

753. Mikkola, T.S., Clarkson, T.B., 2002. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. Cardiovasc Res. 53, 605-619.

754. Millán-Linares, M.D.C., Millán, F., Pedroche, J., Yust, M.D.M., 2015. A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. J. Funct. Foods. 18, 358-367.

755. Millán-Linares, Mdel. C., Yust, Mdel M., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F., Pedroche, J., 2014. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. J. Food Chem. 151, 141-147.

756. Min, B.S., Tomiyama, M., Ma, C.M., Nakamura, N., Hattori, M., 2001. Kaempferol acetylrhamnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. Chem Pharm Bull. 49, 546 - 550.

757. Min, H.J., Lee, M.S., Kim, Y.K., Bae, Y.S., 2017. Evaluation of biological activity on the hydrolyzable tannins of Katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*). Journal of the Korean Wood Science and Technology. 2017, Vol. 43, 3, pp. 250 - 257.

758. Mishra, P.K., Singh, N., Ahmad, G., Dube, A., Maurya, R., 2005. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. Bioorganic Med. Chem. Lett. 15, 4543 - 4546.

759. Modelska, K. Cummings, S., 2002. Tibolone for postmenopausal women: systematic review of randomized trials. J Clin Endocrinol Metab. 87, 16-23.

760. Moellering, R.C. Jr., 1995. Past, present, and future of antimicrobial agents. Am. J. Med. 99, 11-18.

761. Mohammadi, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Shafiee, A., 2010. Two new coumarins from the chloroform extract of *Angelica urumiensis* from Iran. Chem. Pharm. Bull. 58, 546 - 548.

762. Mohan, S., Baylink, D.J., 1991. Bone growth factors. Clin Orthop. 263, 30-48.

763. Molla, Y., Nedi, T., Tadesse, G., Alemayehu, H., Shibeshi, W., 2016. Evaluation of the in vitro antibacterial activity of the solvent fractions of the leaves of *Rhamnus prinoides* L'Herit (Rhamnaceae) against pathogenic bacteria. BMC Complementary Altern Med. 16, 287.

764. Molyneux, R.J., Lee, S.T., Gardner, D.R., Panter, K.E., James, L.F., 2007. Phytochemicals: The good, the bad and the ugly. Phytochemistry 68, 2973–2985.

765. Moon, K.Y., Ahn, K.S., Lee, J., Kim, Y.S. 2001. Kojic acid, a potential inhibitor of NF-kappaB activation in transfectant human HaCaT and SCC-13 cells. Arch Pham Res. 24, 307-311.

766. Moosophon, P., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., 2011. Diarylpropanes and an Arylpropyl Quinone from Combretum griffithii. J Nat Prod. 74, 2216-2218.

767. Morello, K.C., Wurz, G.T., DeGregorio, M.W., 2003. Pharmakokinetics of selective receptor modulators. Clin Pharmacokinet. 42, 361-372.

768. Morgan, A.M., Lee, H.W., Lee, S.H., Lim, C.H., Jang, H.D., Kim, Y.H., 2014. Anti-osteoporotic and antioxidant activities of chemical constituents of the aerial parts of *Ducrosia ismaelis*. Bioor Med Chem Lett. 24, 3434-3439.

769. Morikawa, T., Wang, L.B., Ninomiya, K., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O., Wu, L.J., Yoshikawa, M., 2009. Medicinal flowers. XXX. Eight new glycosides, everlastosides F-M, from the flowers of *Helichrysum arenarium*. Chem. Pharm. Bull. 57, 853 - 859.

770. Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., Masamune, Y., 2002. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors alpha and beta. Biol. Pharm. Bull. 25, 48—52.

771. Mosley, JR., 2000. Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. J Rehabil Res Dev. 37, 189–199.

772. Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L.B., Dahmouse, F., Madani, K., Chibane, M., 2015. HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. Ind Crops Prod. 74, 858 - 866.

773. Mu, H., Bai, Y.H., Wang, S.T., Zhu, Z.M., Zhang, Y.W., 2009. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). Phytomedicine 16, 314-319.

774. Mühlbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A., Felix, R., 2003. Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. Bone 32, 372-380.

775. Muhlbauer, R.C., Lozano, A., Reinli, A., Wetli, H., 2003. Various selected vegetables, fruits, mushrooms and red wine residue inhibit bone resorption in rats. J Nutr. 133, 3592–7.

776. Mukherjee, M., Das, A.S., Das, D., Mukherjee, S., Mitra, S., Mitra, C., 2006. Role of Oil Extract of Garlic (*Allium sativum* Linn) on Intestinal Transference of Calcium

and Its Possible Correlation with Preservation of Skeletal Health in an Ovariectomized Rat model of osteoporosis. Phytother Res. 415, 408–415.

777. Mukherjee, M., Das, A.S., Mitra, S., Mitra, C., 2004. Prevention of Bone Loss by Oil Extract of Garlic (*Allium sativum* Linn) in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. Phytother Res. 394, 389–394.

778. Mulinacci, N., Vincieria, F.F., Baldia, A., Bambagiotti-Alberti, M., Sendl, A., Wagner, H., 1995. Flavonol glycosides from *Sedum telephium* subspecies Maximum leaves. Phytochemistry 38, 531-533.

779. Muramatsu, M., Inoue, S., 2000. Estrogen Receptors: How Do They Control Reproductive and Nonreproductive Functions? Biochem Biophys Res Commun. 270, 1-10.

780. Murkies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J., Wilcox, G., Burger, H.G., Morton, M.S., 1995. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. Maturitas. 21, 189-195.

781. Mutai, P., Heydenreich, M., Thoithi, D., Mugumbate, G., Chibale, K., Yenesewa, A., 2013. 3-Hydroxyisoflavanones from the stem bark of *Dalbergia melanoxylon*: Isolation, antimycobacterial evaluation and molecular docking studies. Phytochemistry Lett. 6, 671-675.

782. Muthukumaran, J., Srinivasan, S., Venkatesan, R.S., Ramachandran, V., Muruganathan, U., 2013. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. J Acute Dis. 2, 304-309.

783. Na, M., Jang, J., Njamen, D., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Kim, B.Y., Oh, W.K., Ahn, J.S., 2006. Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibitory Activity of Isoprenylated Flavonoids Isolated from from *Erythrina mildbraedii*. J. Nat. Prod. 69, 1572-1576.

784. Nadeem, S., Jain, S., Raj, C., Chouhan, K., Nandi, P., 2011. Ameliorative effects *of Alpinia calcarata* in alloxan-induced diabetic rats. Dig J Nanomater Bios. 6, 991-997.

785. Nagaraj, M., Sunitha, S., Varalakshmi, P. J., 2001. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. Appl.Toxicol. 20, 413–417.

786. Nakashima, K., de Crombrugghe, B., 2003. Transcriptional mechanisms. Trends Genet. 19, 458–466.

787. The Free Dictionary 2016. Natural Product. https://www.thefreedictionary.com/Natural+product (accessed 09 December 2016).

788. Nawwar, M.A.M., Souleman, A.M.A., Buddrus, J., Bauer, H., Linscheid, M., 1984. Polyphenolic constituents of the flowers of *Tamarix nilotica*: The structure of nilocitin, a new digalloylglucose. Tetrahedron Lett. 25, 49-52.

789. Nawwar, M.A.M., Hussein, S.A.M. and Merfort, I., 1994. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. Phytochemistry 36, 793-798.

790. Nayer, J, Fouzia, F.O., Praveen, A., Meera, E., 2014. Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. J Midlife Health, 5, 38-40.

791. Neog, M.K., Joshua Pragasam, S., Krishnan, M., Rasool, M., 2017. p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. BioFactors. 43, 698 - 717.

792. Nesar, A., Noorul, H., Khalid, M., Juber, A., Mujahid, M., Badruddin Anuradha, M.,Nazma, K., 2016. *Glycyrrhiza glabra*: for traditional uses and pharmacological actions. Adv J Pharm Life Sci Res. 4, 23-32.

793. Nettles, K.W., Bruning, J.B., Gil, G., O'Neill, E.E., Nowak, J., Guo, Y., Kim, Y., DeSombre, E.R., Dilis, R., Hanson, R.N., Joachimiak, A., Greene, G.L., 2007. Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. Embo Rep. 8, 563-568.

794. Ng, L. T., Ko, H. H., Lu, T. M., 2009. Potential antioxidants and tyrosinase inhibitors from synthetic polyphenolic deoxybenzoins. Bioorg. Med. Chem. 17, 4360-4366.

795. Ng, L.T., Lin, C.C., Lu, C.M., 2007. Antioxidative effects of 6-methoxysorigenin and its derivatives from *Rhamnus nakaharai*. Chem Pharm Bull. 55, 3, 382-4.

796. Nicholson, P.H., Müller, R., Cheng, X.G., Rüegsegger, P., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Boonen, S., 2001. Quantitative ultrasound and trabecular architecture in the humancalcaneus. J Bone Miner Res. 16, 1886-1892.

797. NIH, 2000. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Consens Statement Online 17, 1-36.

798. NIH, 2015. Osteoporosis: Peak Bone Mass in Women. National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center.

799. NIH, 1994. Consensus development panel on optimal calcium intake. Consens Statement Online 12, 1-31.

800. Niiho, Y., Nakajima, Y., Yamazaki, T., Okamoto, M., Tsuchihashi, R., Kodera, M., Kinjo, J., Nohara, T., 2010. Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in Pueraria flowers using HPLC coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside. J Nat Med. 64, 313-320.

801. Niinivehmas, S.P., Manivannan, E., Rauhamäki, S., Huuskonen, J., Pentikäinen, O.T., 2016. Identification of estrogen receptor α ligands with virtual screening techniques. J Mol Graph Model. 64, 30-39.

802. Nikuni, J., 1942. The components of the bark of *Rhamnus japonica*. VI. The chemical structures of α-sorinin and α-sorigenin. Bull. Chem. Soc. Jpn. 18, 41-43.

803. Nirmal, J., Nirmal, J., Babu, C.S., Harisudhan, T., Ramanathan M., 2008. Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed tochronic unpredictable mild stress. BMC Complement Altern Med. 8, 1-8,

804. Niu, Y.B., Li, Y.H., Huang, H.T., Kong, X.H., Mei, Q.B., 2010. Effect and mechanism of genistein on the proliferation of MC3T3-E1 cells. Chinese Pharmacological Bulletin 26, 1309-1312.

805. Niwa, K., Hashimoto, M., Morishita, S., Yokoyama, Y., Mori, H., Tamaya, T., 1999. Preventive effects of glycyrrhizae radix extract on estrogen-related endometrial carcinogenesis in mice. Jpn J Cancer Res. 90, 726–732.

806. Njeh, C.F., Boivin, C.M., Langton, C.M., 1997. The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis: A review. Osteoporos. Int. 7, 7-22.

807. Njeh, C.F., Boivin, C.M., Langton, C.M., 1997. The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis: A review. Osteoporos Int. 7, 7-22.

808. No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., Yokozawa, T., Chung, H.Y., 1999. Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Sci. 65, 241-246.

809. Noccioli, C., Meini, L., Loi, M.C., Potenza, D., Pistelli, L., 2011. A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. Phytochem Lett. 4, 342 - 344.

810. Noccioli, C., Luciardi, L., Barsellini, S., Favro, C., Bertoli, A., Bader, A., Loi, M.C., Pistelli, L., 2012. Flavonoids from two Italian *Genista* species: *Genista cilentina* and *Genista sulcitana*. Chem. Nat. Compd. 48, 672 - 673.

811. Noccioli, C., Bertoli, A., Agus, E., De Logu, A., Pistelli, L., 2014. HPLC-DAD-MS Analysis and Antiviral Activity of Different Extracts and Isolated Constituents from *Bituminaria bituminosa*. Chem Nat Compd. 50, 726–729.

812. Nomura, T., Fukai, T., Akiyama, T., 2002. Chemistry of phenolic, compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities. Pure Appl Chem 74, 1199–1206.

813. Nonaka, G., Nakayama, S., Nishioka, I., 1989. Tannins and Related Compounds. LXXXIII. Isolation and Structures of Hydrolyzable Tannins, Phillyraeodins A-E from *Quercus phillyraeoides*. Chem. Pharm. Bull. 37, 2030 - 2036.

814. Norman, A.W., Okamura, W.H., Bishop, J.E., Henry, H.L., 2002. Update on biological actions of 1alpha, 25(OH)(2)-vitamin D(3) (rapid effects) and 24R,25(OH)(2)-vitamin D(3). Mol Cell Endocrinol. 29, 1-13.

815. Nowak, B., Matuszewska, A., Nikodem, A., Filipiak, J., Landwójtowicz, M., Sadanowicz, E., Jędrzejuk, D., Rzeszutko, M., Zduniak, K., Piasecki, T., Kowalski, P., Dziewiszek, W., Merwid-Ląd, A., Trocha, M., Sozański, T., Kwiatkowska, J., Bolanowski, M., Szeląg, A., 2017. Oral administration of kaempferol inhibits bone loss in rat model of ovariectomy-induced osteopenia. Pharmacol Rep. 69, 1113 - 1119.

816. Nowakowska, Z., 2007. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. Eur J Med Chem. 42, 125-137.

817. Numonov, S., Edirs, S., Bobakulov, K., Qureshi, M.N., Bozorov, K., Sharopov, F., Setzer, W.N., Zhao, H., Habasi, M., Sharofova, M., Aisa, H.A., 2017. Evaluation of the Antidiabetic Activity and Chemical Composition of *Geranium collinum* Root Extracts—Computational and Experimental Investigations. Molecules 22, 983.

818. Núñez, M.J., Reyes, C.P., Jiménez, I.A., Moujir, L., Bazzocchi, I.L., 2005. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. J. Nat. Prod. 68, 1018 - 1021.

819. Nwafor, S.V., Akah, P.A., Okoli, C.O., 2001. Potentials of plant products as anticancer agents J Nat Remedies 1, 75 - 88.

820. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US) 2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45522/ (accessed 15 Septmeber 2017).

821. O'Neill, S., Eden, J., 2012. The pathophysiology of menopausal symptoms. Obstet Gynaecol Reprod Med 22, 63-69.

822. Ohguchi, K., et al., 2003. Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from genus *Gnetum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 663-665.

823. Okoye, F.B., Sawadogo, W.R., Sendker, J., Aly, A.H., Quandt, B., Wray, V., Hensel, A., Esimone, C.O., Debbab, A., Diederich, M., Proksch, P., 2015. Flavonoid glycosides from *Olax mannii*: Structure elucidation and effect on the nuclear factor kappa B pathway. J. Ethnopharmacol. 176, 27-34.

824. Oldenhave, A., Jaszmann, L.J., Haspels, A.A., Everaerd, WT., 1993. Impact of climacteric on well-being: a survey based on 5213 women 39-60 years old, Am J Obstet Gynecol. 168, 772-780.

825. Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., Tankhaeva L.M., 2015. Iridoids and Flavonoids of Four Siberian Gentians: Chemical Profile and Gastric Stimulatory Effect. Molecules. 20, 19172-19188.

826. Oliveira, T., Figueiredo, C.A., Brito, C., Stavroullakis, A., Ferreira, A.C., Nogueira-filho, G., Prakki, A., 2015. *Allium cepa* L .and Quercetin Inhibit RANKL / Porphyromonas gingivalis LPS-Induced Osteoclastogenesis by Downregulating NF-κB Signaling Pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2015, 1-11.

827. Olonode, E.T., Aderibigbe, A.O., Adeoluwa, O.A., Eduviere, A.T., Ben-Azu, B., 2017. Morin hydrate mitigates rapid eye movement sleep deprivation-induced neurobehavioural impairments and loss of viable neurons in the hippocampus of mice. Behav Brain Res. in press.

828. Omeje, E.O., Khan, M.P., Osadebe, P.O., Tewari, D., Khan, M.F., Den, K., Maurva, R., Chattopadhyay, N., 2014. Analysis of constituents of the eastern Nigeria mistletoe, *Loranthus micranthus* linn revealed presence of new classes of osteogenic compounds. J. Ethnopharmacol. 151, 643-651.

829. Ong, K.C., Khoo, H.E., 1997. Biological effects of myricetin. Gen. Pharmacol. 29, 121-126.

830. Oozeki, H., Tajima, R., Nihei, K., 2008. Molecular design of potent tyrosinase inhibitors having the bibenzyl skeleton. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 5252–5254.

831. Orhan, I.E., Tosun, F., Tamer, U., Duran, A., Alan, B., Kok, F., 2011. Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity. J. Serb. Chem. Soc. 76, 35 - 42.

832. Ortega, N., Macia, A., Romaro, M.P., Trullois, E., Morello, J.R., Angles, N., Motilva, M.J., 2009. Rapid Determination of Phenolic Compounds and Alkaloids of Carob Flour by Improved Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 57, 7239–7244.

833. Ortolan, X.R., Fenner, B.P., Mezadri, T.J., Tames, D.R., Corrêa, R., de Campos Buzzi, F., 2014. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. J Craniomaxillofac Surg. 42, 520-524.

834. Oshima, Y., 1936. Chemical studies on the tannin substance of formosan tea leaves. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 12, 103-109.

835. Owen, M., 1988. Marrow stromal stem cells. J. Cell Sci. Suppl. 10, 63–76.

836. Owen, R.W., Haubner, R., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Haber, B., 2003. Isolation and structure elucidation of the major polyphenols in carob fibre. Food Chem Toxicol. 41, 1727–1738.

837. Ozipek, M., Caliş, I., Ertan, M., Rüedi, P., 1994. Rhamnetin 3-p-coumaroylrhamninoside from *Rhamnus petiolaris*. Phytochemistry 37, 249 - 253.

838. Pak, C.Y., Sakhaee, K., Piziak V., 1994. Slow-release sodium fluoride in the management of post menopausal osteoporosis. A randomized controlled trial. Ann. Intern. Med. 120, 625-632.

839. Pandey, M.B., Singh, J.P., Singh, U., Pandey, V.B., 2006. Constituents of *Rhamnus nipalensis*. J. Indian Chem. Soc. 83, 389 - 390.

840. Pang, J.L., Ricupero, D.A., Huang, S., Fatma, N., Singh, D.P., Romero, J.R., Chattopadhyay, N., 2006. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. Biochem Pharmacol. 71, 818-826.

841. Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R., 2004. Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua L.*) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MS. J. Agric. Food Chem. 52, 3784-3791.

842. Papoutsi, Z., Kassi, E., Fokialakis, N., Mitakou, S., Lambrinidis, G., Mikros, E., Moutsatsou, P., 2007. Deoxybenzoins are novel potent selective estrogen receptor modulators. Steroids. 72, 693–704.

843. Parajuli, P., Pandey, R.P., Nguyen, T.T.H., Shrestha, B., Yamaguchi, T., Sohng, J.K., 2017. Biosynthesis of natural and non-natural genistein glycosides. RSC Adv. 7, 16217-16231.

844. Parfitt, A.M., 2000. The Mechanism of Coupling: A Role for the Vasculature. Bone 26, 319-323.

845. Parfitt, AM., 2002. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone. 30, 5–7.

846. Parfitt, A.M., 2001. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. J Bone Miner Res. 16, 1583–1585.

847. Parfitt, A.M., 1982. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. Metab Bone Dis Relat Res. 4, 1-6.

848. Park, C.K., Lee, Y., Chang, E.J., Lee, M.H., Yoon, J.H., Ryu, J.H., Kim, H.H., 2008. Bavachalcone inhibits osteoclast differentiation through suppression of NFATc1 induction by RANKL. Biochem Pharmacol. 75, 2175-2182.

849. Park, J.A., Ha, S.K., Kang, T.H., Oh, M.S., Cho, M.H., Lee, S.Y., Park, J.H., Kim, S.Y., 2008. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. Life Sci. 82, 1217 - 1223.

850. Park, K., Ju, W.C., Yeo, J.H., Kim, J.Y., Seo, H.S., Ushida, Y., Cho, Y., 2014. Increased OPG/RANKL ratio in the conditioned medium of soybean-treated

osteoblasts suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. Int J Mol Med. 33, 178 - 184.

851. Park, S.H., Kim, D.S., Park, S.H., 2008. Inhibitory effect of p-coumaric acid by *Rhodiola sachalinensis* on melanin synthesis in B16F10 cells. Pharmazie 63, 290-5.

852. Pathomwichaiwat, T., Ochareon, P., Soonthornchareonnon, N., Ali, Z., Khan, I.A., Prathanturarug, S., 2015. Alkaline phosphatase activity-guided isolation of active compounds and new dammarane-type triterpenes from *Cissus quadrangularis* hexane extract. J. Ethnopharmacol. 160, 52-60.

853. Pecetti, L., Tava, A., Pagnotta, M.A., Russi, L., 2007. Variation in forage quality and chemical composition among Italian accessions of *Bituminaria bituminosa* (L.). Stirt. J. Sci. Food Agric. 87, 985-991.

854. Pepalla, S., Jammula, S.R., Telikepalli, H., Bhattiprolu, K.R., Rao, K.V.J., 1991. A naphtalene glucoside lactone from *Rhamnus wightii*. Phytochemistry 30, 4193 - 4194.

855. Pereira O.R., Silva A.M.S., Domingues M.R.M., Cardoso, S.M., 2012. Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. Food Chem. 131, 652-659.

856. Pereira, O.R., Macias, R.I.R., Perez, M.J., Marin, J.J.J., Cardoso, S.M., 2013. Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. J Funct Foods 5, 1170-1179.

857. Pereira, S.C., Parente, J.M., Belo, V.A., Mendes, A.S., Gonzaga, N.A., do Vale, G.T., Ceron, C.S., Tanus-Santos, J.E., Tirapelli, C.R., Castro, M.M., 2018. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. Atherosclerosis. 270, 146-153.

858. Pérez, A.J., Simonet, A.M., Pecio, L., Kowalczyk, M., Calle, J.M., Macías, F.A., Oleszek, W.and Stochmala, A., 2015. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Trifolium argutum* Sol. and their phytotoxic evaluation. Phytochem Lett. 13 165-170.

859. Perez-Olleros, L., Garcia-Cuevas, M., Ruiz-Roso, B. and Requejo, A., 1999. Comparative study of natural carob fiber and psyllium husk in rats. Influence on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia. J. Sci. Food Agric. 79, 173-178.

860. Perez-Olleros, L., Garcia-Cuevas, M. and Ruiz-Roso, B., 1999. Note: Influence of pulp and natural carob fiber on some aspects of nutritional utilization and cholesterolemia in rats. Food SciTechnol. 5, 425-430.

861. Perumal, N., Perumal, M., Kannan, A., Subramani, K., Halagowder, D., Sivasithamparam N., 2017. Morin impedes Yap nuclear translocation and fosters apoptosis through suppression of Wnt/β-catenin and NF-κB signaling in Mst1 overexpressed HepG2 cells. Exp Cell Res 335, 124-141.

862. Pieroni, A., Dibra, B., Grishai, G., Grishai, I. and Gion Macai, S., 2005. Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe, Northern Albanian Alps Fitoterapia 76, 379– 399.

863. Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engström, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.A., Carlquist, M., 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. EMBO J. 18, 4608-4618.

864. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.H., 2017. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. Drug Discov. Today. 22, 282–298.

865. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.H., 2015. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009–2014). Expert Opin. Ther. Pat. 25, 775–788.

866. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.H., 2017. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. Cellular Signal. 40, 99-115.

867. Pistelli, L., Noccioli, C., Martera, M., Giamperi, L., Bucchini, A., Fraternale, D., Ricci, D., 2006. Antioxidant flavonol glycosides from *Dorycnium hirsutum*. Chem Nat Compd. 42, 281-284.

868. Pistelli, L., Fiumi, C., Morelli, I., Giachi I., 2003. Flavonoids from *Calicotome villosa*. Fitoterapia 74, 417–419.

869. Pistelli, L., Nocciolia C., Appendinob G., Bianchib, F., Sternerc O., Ballerod M., 2003. Pterocarpans from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. Phytochemistry 64, 595–598.

870. Pistelli, L., Spera, K., Flamini G., Mele, S., Morelli, S., 1996. Isoflavonoids and chalcones from *Anthyllis hermanniae.* Phytochemistry 42 1455-1458.

871. Pistelli, L., Giachi, I., Potenza, D., Morelli, I., 2000. A New Isoflavone from *Genista corsica*. J. Nat. Prod. 63, 504–506.

872. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells Science 284, 143-147.

873. Plantlist, 2016. www.theplantlist.org/browse/A/Leguminosae/Hippocrepis/ (accessed 19 September 2017).

874. Plassman, BL., Langa, KM., Fisher, G.G., Heeringa, S.G., Weir, D.R., Ofstedal, M.B., 2007. Prevalence of dementia in the United States: The aging, demographics, and memory study. Neuroepidemiology 29, 125-132.

875. Plonka, P.M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D.J., Shibahara, S., Thomas, A., Slominski, A., Kadekaro, A.L., Hershkovitz, D., Peters, E., Nordlund, J.J., Abdel-

Malek, Z., Takeda, K., Paus, R., Ortonne, J.P., Hearing, V.J., Schallreute, K.U., 2009. What are melanocytes really doing all day long …? Exp. Dermatol. 18, 799–819.

876. Plouvier, V., 1962. The cyclitols in some botanical groups, L-inositol of the composites and D-pinitol of the legumes. Compt. Rend. 225, 1770–1772.

877. Polo-Kandola, P., 2003. Sex steroids and sleep: sleep disturbancesin menopause. Ann Endocrinol. 64, 152-156.

878. Prestwood, K.M., Pilbeam C.C., Raisz L.G., 1995. Treatment of osteoporosis. Annu. Rev. Med. 1995, 46, 249-56.

879. Prestwood, K.M., Pilbeam, C.C., Burleson, J.A., Woodiel, F.N., Delmas, P.D, Deftos, L.J., Raisz, L.G., 1994. The short-term effects of conjugated estrogen on bone turnover in older women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 79, 366–371.

880. Prieto, J.M., Bader, A., Martini, F., Ríos, J.L., Morelli, I., 2005. Screening of some rare endemic Italian plants for inhibitory activity on 5-lipoxygenas. Fitoterapia. 76, 725-727.

881. Prouillet, C., Mazière, J., Mazière, C., Wattel, A., Brazier, M., Kamel, S.I., 2004. Stimulatory effect of naturally occurrin flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. Biochem. Pharmacol. 67, 1307 - 1313.

882. Przybylak J., K., Ciesiołka, D., Wysocka, W., Garc´ıa-López, P., M., Ruiz-López M., A., Wysocki W., Gulewicz K., 2005. Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and an effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annuum* L.). Ind Crops Prod. 21, 1-7.

883. Puapairoj, P., Naengchomnong, W., Kijjoa, A., Pinto, M.M., Pedro, M., Nascimento, M.S., Silva, A.M., Herz, W., w., 2005. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. Planta Med. 71, 208 - 213.

884. Putnam, S.E., Scutt, A.M., Bicknell, K., Priestlev C.M., Williamso, E.M., 2007. Natural Products as Alternative Treatments for Metabolic Bone Disorders and for Maintenance of Bone Health. Phytother. Res. 21, 99–112.

885. Qiao, C.F., Han, Q.B., Mo, S.F., Song, J.Z., Xu, L.J., Chen, S.L., Yang, D.J., Kong, L.D., Kung, H.F., Xu, H.X., 2006. Psoralenoside and Isopsoralenoside, Two New Benzofuran Glycosides from *Psoralea corylifolia*. Chem Pharm Bull. 54, 714-716.

886. Raggatt, L.J., Partridge, N.C., 2010. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. J. Biol. Chem. 285, 25103 – 25108.

887. Rahman, M.M., Sarker, S.D., Byres, M., Gray, A.I., 2004. New Salicylic Acid and Isoflavone Derivatives from *Flemingia paniculata*. J. Nat. Prod. 67, 402-406.

888. Raine-Fenning, N.J., Brincat, M.P., Muscat-Baron, Y., 2003. Skin aging and menopause: implications for treatment. Am J Clin Dermatol. 4, 371-378.

889. Raisz, LG., 1993. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. J Bone Miner Res. 8, 457-465.

890. Raja, S., Ahamed, K., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P.K., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. J. Ethnopharmacol. 109, 41–47.

891. Rakhimov, R.N., Abdulladzhanova, N.G., Kamaev, F.G., 2011. Phenolic compounds from *Euphorbia canescens* and *E. franchetii*. Chem. Nat. Compd. 47, 286–287.

892. Rakib, E.M., Chicha, H., Abouricha, S., Alaoui, M., Bouli, A.A., Hansali, M., Owen, R.W., 2010. Determination of Phenolic Composition of Carob pods Grown in Different Regions of Morocco. J. Nat. Prod. 3, 134 – 140.

893. Ramaswamy, B., Shapiro, C.L., 2003. Osteopenia and osteoporosis in women with breast cancer. Semin Oncol. 30, 763-775.

894. Ranabahu, P., Harborne, J.B., 1993. The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparison of flavonoid patterns within the tribe vicieae. Biochem. Syst. Ecol. 21, 715-722.

895. Ranilla, L. G., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. J Food Compost Anal. 22, 397 – 404.

896. Rao, S.D., Devi, S., Rao, K., 2017. Isolation of Lupeol, Design and Synthesis of Lupeol Derivatives and their Biological Activity. Oriental Journall of Chemistry 33, 173-180.

897. Raper, H.S., 1928. The aerobic oxidases. Physiol Rev. 8, 245-282.

898. Rapuri, P.B., Gallagher, J.C., Haynatzki, G., 2004. Endogenous levels of serum estradiol and sex hormone binding globulin determine bone mineral density, bone remodeling, the rate of bone loss, and response to treatment with estrogen in elderly women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 4954-4962.

899. Rassi, C.M., Lieberherr, M., Chaumaz, G., Pointillart A., Cournot G., 2005. Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin. Cell Tissue Res. 2005, 319, 383–393.

900. Reddy, R.K., 2007. Silymarin for the Treatment of Chronic Liver Disease. Gastroenterol Hepatol. 11, 825–826.

901. Rees, K.A., Bermudez, C., Edwards, D.J., Elliott, A.G., Ripen, J.E., Seta, C., Huang, J.X., Cooper, M.A., Fraser, J.A., Yeo, T.C., Butler, M.S., 2015. Flemingin-Type Prenylated Chalcones from the Sarawak Rainforest Plant Desmodium congestum. J. Nat. Prod. 78, 2141-2144.

902. Rees, M.C., Barlow, D.H., 1988. Abscence of sustained reflex vasoconstrictionin women with menopausal flushes. Hum Reprod. 3, 823-825.

903. Regos, I., Urbanella, A., Treutter, D., 2009. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). J. Agric. Food Chem. 57, 5843-5852.

904. Rehman, N.U., Ahmad, N., Hussain, J., Ali, L., Hussain, H., Bakht, N., Harrasi, A.A., Shinwari, Z.K., 2017. One New Phthalate Derivative from *Nepeta kurramensis*. Chem. Nat. Compd. 53, 426–428.

905. Reinhard, H., Rupp, H., Sager, F., Streule, M., Zoller, O., 2006. Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food . J Chromatogr A. 21, 353 – 360.

906. Ren, Z.Y., Qi, H.Y., Shi, Y.P., 2008. Phytochemical investigation of *Anaphalis lactea*. Planta Med. 74, 859-863.

907. Reppert, A., Yousef, G.G., Rogers, R.B., Lila, M.A., 2008. Isolation of Radiolabeled Isoflavones from Kudzu (*Pueraria lobata*) Root Cultures. J Agric Food Chem. 56, 7860–7865.

908. Requejo Marco, A.M., Ruiz-Rosa Calvo De Mora, B., Sanjuan Diaz, C., 1994. Natural carob fibre and a procedure for its production. EP 0616780 B1, Eur. Patent Specification.

909. Reyes, C.P., Núñez, M.J., Jiménez, I.A., Busserolles, J., Alcaraz, M.J., Bazzocchi, I.L., 2006. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. Bioorg Med Chem. 14, 1573-1579.

910. Rho, H.S., Ghimeray, A.K., Yoo, D.S., Ahn, S.M., Kwon, S.S., Lee, K.H., Cho, D.H., Cho, J.Y., 2011. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. Molecules. 16, 3338-3344.

911. Rho, H.S., Ahn, S.M., Lee, B.C., Kim, M.K., Ghimeray, A.K., Jin, C.W., Cho, D.H., 2010. Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. Bioorg Med Chem Lett. 20, 7534-7536.

912. Riess-Mauer, I., Wagner, H., 1982. Struktur und synthese von flavonol-triosiden aus rhamnus-arten. Tetrahedron. 38, 1269-1278.

913. Rigat, M., Bonet, M.A., Garcia, S., Garnatje, T., Vallès, J., 2007. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). J Ethnopharmacol. 113, 267–277.

914. Riggs B.L. & Meltonl, J., 1983. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. Am J Med. 75, 899-901.

915. Riggs, B.L., Melton, Iii L.J. 3rd, Robb, R.A., Camp, J.J., Atkinson, E.J., Peterson, J.M., Rouleau, P.A., McCollough, C.H., Bouxsein, M.L., Khosla, S., 2004. Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. J Bone Miner Res. 19, 1945-1954.

916. Riggs, B.L., Wahner, H.W., Seeman, E., Offord, K.P., Dunn, W.L., Mazess, R.B., Johnson, K.A., Melton, III L. J., 1982. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. J. Clin. Invest. 70, 716-723.

917. Riggs, B.L., 2000. Are biochemical markers for bone turnover clinically useful for monitoring therapy in individual osteoporotic patients? Bone 26, 551-2.

918. Riss, P., Kargl, J., 2011. Quality of life and urinary incontinence in women. Maturitas 68, 137-142.

919. Rivera, D., Obón, C., 1995. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. J Ethnopharmacol. 46, 73-93.

920. Rivera-Piza, A., An, Y.J., Kim, D.K., Lee, S.H., Kim, J.B., Choi, J.S., Lee, S.J., 2017. Protocatechuic Acid Enhances Osteogenesis, but Inhibits Adipogenesis in C3H10T1/2 and 3T3-L1 Cells. J Med Food. 20, 309-319.

921. Robinson, D., Cardozo, L.D., 2003_A. The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. Urology 62, 45-51.

922. Robinson, D., Cardozo, L.D., 2003_B. Themenopause and HRT. Urogenital effects of hormone therapy. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 17, 91-104.

923. Robiquet, P.J., 1817. Observations sur le Mémoire de M. Sertuerner Relatif à l'Analyse de l'Opium. Ann. Chim., Phys., 5, 275-278.

924. Rodan, G.A., Martin, T.J., 2000. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. Science. 289, 1508-1514.

925. Rodiaki. 2013. http://www.rodiaki.gr/article/262553/loypinos-o-leykos-lupinus-albus (accessed 15 September 2016).

926. Rodríguez, P., González-Mujica, F., Bermúdez, J., Hasegawa, M., 2010. Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O-α-rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. Fitoterapia. 81, 1220-1223.

927. Rollinger, J.M., Langer, T., Stuppner, H., 2006. Strategies for Efficient Lead Structure Discovery from Natural Products. Curr Med Chem. 13, 1491-1507.

928. Rood, B., 2013. Nature's Own Pharmacy, first ed. Protea Boekhuis, South Africa.

929. Roodman, G. D., 1999. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol. 27, 1229-1241.

930. Roodman, G.D., Kurihara, N., Ohsaki, Y., Kukita, A., Hosking, D., Demulder, A., 1992. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget´s disease of bone. J Clin Invest. 89, 46-52.

931. Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farach-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L., Cheresh, D.A., 1993. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. J Biol Chem. 268, 9901-9907.

932. Rubin, C.T., Gross, T.S., McLeod, K.J., Bain, S.D., 1995. Morphologic stages in lamellar bone formation stimulated by lamellar bone formation stimulated by. J Bone Miner Res. 10, 488-495.

933. Rubin, M.R., Bilezikian, J.P., 2005. Parathyroid hormone as an anabolic skeletal therapy. Drugs. 65, 2481-2498.

934. Rubin, M.R., Cosman, F., Lindsay, R., Bilezikian, J.P., 2002. The anabolic effects of parathyroid hormone. Osteoporos Int. 13, 267-77.

935. Rude, R.K., Olerich, M., 1996. Magnesium deficiency: possible role in osteoporosis associated with gluten-sensitive enteropathy. Osteoporos Int. 6, 453-461.

936. Ruggiero, S.L., Mehrotra, B., Rosenberg, T.J., Engroff, S.L., 2004. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg. 62, 527-534.

937. Russell, R.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Mechanisms of action of biphosphonates: similarities and differences and their potential influences of clinical efficacy. Osteoporos Int. 19, 733-759.

938. Ryu, Y.B., Kim, J.H., Park, S.J., Chang, J.S., Rho, M.C., Bae, K.H., Park, K.H., Lee, W.S., 2010. Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. Bioorg Med Chem Lett. 20, 971-974.

939. Saag, K., 2003. Glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 32, 135-157.

940. Sadgrove, N., Gonçalves-Martins, M., Jones, G.L., 2014. Chemogeography and antimicrobial activity of essential oils from *Geijera parviflora* and *Geijera salicifolia* (Rutaceae): Two traditional Australian medicinal plant. Phytochemistry. 104, 60-71.

941. Saejueng, K., Panthama, N., 2015. Radical scavenging activities of flavonoids from roots of *Akschindlium godefroyanum*. Nat. Prod. Res. 29, 1177-1179.

942. Sagar, T., Rantlha, M., Kruger, M.C., Coetzee, M., Deepak, V., 2016. Ferulic acid impairs osteoclast fusion and exacerbates survival of mature osteoclasts. Cytotechnology. 68, 1963-1972.

943. Sahar S. Abd El-Rahman, Gehan Shehab, Heba Nashaat. 2017. Epigallocatechin-3-Gallate: The Prospective Targeting of Cancer Stem Cells and Preventing Metastasis of Chemically-Induced Mammary Cancer in Rats. The American Journal of the Medical Sciences. 354, 54-63.

944. Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., Szekeres, T., 2008. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fud? Mutat Res. 658, 68-94.

945. Sakushima, A., Coskun, M., Hisada, S., Nishibe, S., 1983. Flavonoids from *Rhamnus pallasii.* Phytochemistry 22, 1677–1678.

946. Salem, M. A., Williams, J.M., Wainwright, S.J., Hipkin, C.R., 1995. Nitroaliphatic Compounds in *Hippocrepis Comosa* and other legumes in the European flora. Phytochemistry 40, 89-91.

947. Salwa, F., Takaya, Y., Niwa, M., 2009. Stilbene glucosides from the bulbs of *Iris tingitana*. Phytochem Lett. 2, 148-151.

948. Sammartino, A., Cirillo, D., Mandato, V.D., Di Carlo, C., Nappi, C., 2005. Osteoporosis and cardiovascular disease: benefit-risk of hormone replacement therapy. J Endocrinol Invest. 28, 80-4.

949. Sampath, C., Sang, S., Ahmedna, M., 2016. *In vitro* and *in vivo* inhibition of aldose reductase and advanced glycation end products by phloretin, epigallocatechin 3-gallate and [6]-gingerol. Biomed. Pharmacother. 84, 502-513.

950. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1247, 1-11.

951. Sandell, M., Sandell, M., Laaksonen, O., Järvinen, R., Rostiala, N., Pohjanheimo, T., Tiitinen, K., Kallio, H., 2009. Orosensory profiles and chemical composition of black currant (ribes nigrum) juice and fractions of press residue. J Agric Food Chem. 57, 3718 - 3728.

952. Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Uren, M.C., Ceylan, O., Orenc, T., Tepoe, B., 2016. Phenolic composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activity of *Bituminaria bituminosa*. Food Sci Biotechnol. 25, 1299 - 1304.

953. Sarjit, A, Wang, Y., Dykes, G., 2015. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic Campylobacter is strain specific and associated with a loss of calcium ions. Food Microbiol. 46, 227-233.

954. Sassa, S., Kikuchi, T., Shinoda, H., Suzuki, S., Kudo, H., Sakamoto, S., 2003. Preventive effect of ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats. *In vivo*. 17, 277-280.

955. Satake, T., Hori, K., Kamiya, K., Saiki, Y., Fujimoto, Y., Kimura, Y., Maksut, C., Mekin, T., 1993. Studies on the constituents of Turkish plants I. flavonol triglycosides from the fruit of *Rhamnus thymifolius*. Chem. Pharm. Bull. 41, 1743 - 1745.

956. Satake, T., Coşkun, M., Hori, K., Saiki, Y., Tankers, M., 1991. An acetophenone and three naphthalides from turkish *Rhamnus libanoticus*. Phytochemistry 30, 4191-4192.

957. Satpathy, S., Patra, A., Hussain, M.D., Ahirwar, B., 2017. Simultaneous estimation of genistein and daidzein in *Pueraria tuberosa* (Willd.) DC by validated high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) densitometry method. J Liq Chromatogr Relat Technol. 40, 499-505.

958. Satue, M., Arriero, Mdel, M., Monjo, M., Ramis, J.M., 2013. Quercitrin and Taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Biochem Pharmacol. 86, 1476 - 1486.

959. Satu-Maarit, H., 2006. Identification of Isoflavonoid Metabolites in Humans. Helsinki : University of Helsinki, 2006.

960. Scarafoni, A., Ronchi, A., Prinsi, B., Espen, L., Assante, G., Venturini, G., Duranti, M., 2013. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. FEBS J. 280, 1443-59.

961. Schapira, D., Schapira, C., 1992. Osteoporosis: the evolution of a scientific term. Osteoporos. Int. 2, 164-167.

962. Scharbert, S., Holzmann, N., Hofmann, T., 2004. Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. J. Agric. Food Chem. 52, 3498-3508.

963. Schiff, P.L., 2002. Opium and its alkaloids. Am. J. Pharm Educ. 66, 188-196.

964. Schmidt, J.W., Wollner, D., Curcio, J., Riedlinger, J., Kim, L.S., 2006. Hormone replacement therapy in menopausal women: Past problems and future possibilities. Gynecol Endocrinol. 22, 564-77.

965. Schmitz, R., 1983. Sertürner und die Morphiumentdeckung, Pharmazeut. 128, 1350.

966. Schwartsmann, G., 2011. Marine organisms and other novel natural sources of new cancerdrugs. Annals of oncology. 3, 235-43.

967. Scott, R., 2003. Liquid Chromatography Detectors. Library for Science.vol pp. 41-59

968. Seeman, E., 2003. Pathogenesis of osteoporsis. J Appl Physiol. 95, 2142-51.

969. Seeman, E., 2003. Periosteal bone formation—a neglected determinant of bone strength. N Engl J Med. 4, 320-323.

970. Sehmisch, S., Hammer, F., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke D., Tezval, M., Wuttke, W., Stuermer, K.M., Stuermer, E.K., 2008. Comparison of the Phytohormones Genistein, Resveratrol and 8-Prenylnaringenin as Agents for Preventing Osteoporosis. Planta Med. 74, 794–801.

971. Seiberg, M., 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. Pigment Cell Res. 14, 236–242.

972. Semwal, D.K., Semwal, R.B., Combrinck, S., VilJoen, A., 2015. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. Nutrients. 16, 1-31.

973. Senthilkumara, K., Venkatesana, J., Kim, S.K., 2014. Marine derived natural products for osteoporosis. Biomed Prev Nutr. 4, 1-7.

974. Seong, S.H., Rov, A., Jung, H.A., Jung, H.J, Choi, J.S., 2016. Protein tyrosine phosphatase 1B and α-glucosidase inhibitory activities of *Pueraria lobata* root and its constituents. J Ethnopharmacol. 194, 706-716.

975. Sexton, P.M., Findlay, D.M., Martin, TJ., 1999. Calcitonin. Curr Med Chem. 6, 1067-93.

976. Shabani, F., Sariri, R., 2010. Increase of Melanogenesis in the Presence of Fatty Acids. Pharmacologyonline. 1, 314-323.

977. Shakeri, A., Masullo, M., D'Urso, G., Iranshahi, M., Montoro, P., Pizza, C., Piacente, S., 2018. In depth chemical investigation of Glycyrrhiza triphylla Fisch roots guided by a preliminary HPLC-ESIMSn profiling. Food Chem. 248, 128 - 136.

978. Shalaby, N.M.M., Abd-Alla, H.I., Ahmed, H.H., Basoudan, N., 2011. Protective effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* against osteoporosis and their phytochemical constituents. J Med. Plants Res. 5, 579-588.

979. Shanis, N.N., Mohamed, M., 2017. Nano-sized titanium dioxide toxicity in rat prostate and testis: Possible ameliorative effect of morin. Toxicol Appl Pharmacol. 334, 129-141.

980. Sharma, S.H., Kumar, J.S., Chellapan, D.R., Nagarajan S., 2018. Molecular chemoprevention by morin – A plant flavonoid that targets nuclear factor kappa B in experimental colon cancer. Biomed Pharmacother. 100, 367–373.

981. Sharma, S.H., Thulasingam, S., Chellappan, D.R., Chinnaswamy, P., Nagarajan, S., 2017. Morin and Esculetin supplementation modulates c-myc induced energy metabolism and attenuates neoplastic changes in rats challenged with the procarcinogen 1,2 - dimethylhydrazine. Eur J Pharmacol. 796, 20-31.

982. Sharma, U.K., Sharma, N., Salwan, R., Kumar, R., Kasana, R.C., Sinha, A.K., 2012. Efficient synthesis of hydroxystyrenes via biocatalytic decarboxylation/deacetylation of substituted cinnamic acids by newly isolated Pantoea agglomerans strains. J Sci Food Agric. 92, 617-618.

983. Sharmila, R., Sindhu, G., 2017. Modulation of Angiogenesis, Proliferative Response and Apoptosis by β-Sitosterol in Rat Model of Renal Carcinogenesis. Indian J Clin Biochem. 32, 142 - 152.

984. Sharp, H., Latif, Z., Bartholomew, B., Thomas, D., Thomas, B., Sarker, S.D., Nash, R.J., 2001. Emodin and syringaldehyde from *Rhamnus pubescens* (Rhamnaceae). Biochem. Syst. Ecol. 29, 113–115.

985. Sheikh, S., Weiner, S., 1997. Allosteric inhibition of human liver aldehyde dehydrogenase by the isoflavone prunetin. Biochem. Pharmacol. 53, 471-478.

986. Shen, C.L., Wang, P., Guerrieri, J., Yeh, J.K., Wang, J.S., 2008. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. Osteoporos Int. 19, 979–990.

987. Sherwin, B.B., 2003. Steroid hormones and cognitive functioning in aging men: a mini review. J Mol Neurosci. 20, 385-393.

988. Shevde, N.K., Bendixen, A.C., Dienger, K.M., 2000. Estrogens Suppress Rank ligand induced Osteoclast Differentiation Via a Stromal Cell Independent Mechanism Involving c-Jun Repression. Proc Natl Acad Sci. 97, 7829-7834.

989. Shi, C., Sun, Y., Zheng, Z., Zhang, X., Song, K., Jia, Z., Chen, Y., Yang, M., Liu, X., Dong, R., Xia, X., 2016. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane. Food Chem. 197, 100-106.

990. Shiau, A. K. Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.Cell. 95, 927-937.

991. Shih, M.F., Cheng, Y.D., Shen, C.R., Cherng, J.Y., 2010. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of Euphorbia hirta L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. J Nat Med. 64, 330–335.

992. Shim, K.S., Ha, H., Kim, T., Lee, C.J., Ma, J.Y., 2015. *Orostachys japonicus* suppresses osteoclast differentiation by inhibiting NFATc1 expression. Am J Chin Med. 43, 1013 – 1030.

993. Shim, K.S., Kim, T., Ha, H., Lee, C.J., Lee, B., Kim, H.S., Park, J.H., Ma, J.Y., 2015. Water extract of *Magnolia officinalis* cortex inhibits osteoclastogenesis and bone resorption by downregulation of nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1. Integr Med Res. 4, 102 - 111.

994. Shin, S.W., Jung, E., Kim, S., Kim, J.H., Kim, E.G., Lee, J., Park, D., 2013. Antagonizing Effects and Mechanisms of Afzelin against UVB-Induced Cell Damage. PLoS ONE, 8, 1-18.

995. Short, M., 2003. Menopause mood and management. Climacteric. 6, 33-36.

996. Shrestha, S., Lee, D.Y., Park, J.Y., Cho, J.G., Lee, D.S., Li, B., Kim, Y.C., Kim, G.S., Bang, M.H., Baek, N.I., 2013. Phenolic components from Rhus parviflora fruits and their inhibitory effects on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Nat Prod Res. 27, 2244 - 2247.

997. Shults, E., Shakirov, M., Pokrovsky, M., Petrova, T., Pokrovsky, A., Gorovoy, P., 2017. Phenolic compounds from *Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim. and their cytotoxic activity. Nat Prod Res. 31, 445-452.

998. Shulʹts, E.E., Ganbaatar, Z., Petrova, T.N., Shakirov, M.M., Bagryanskaya, I.Y., Taraskin, V.V., Radnaeva, L.D., Otgonsuren, D., Pokrovskii, A.G., Tolstikov, G.A., 2012. Plant coumarins. IX.* Phenolic compounds of *Ferulopsis hystrix* growing in Mongolia. Cytotoxic activity of 8,9-dihydrofurocoumarins. Chem Nat Compd. 48, 211-217.

999. Shumaker, S.A., Legault, C., Rapp, S.R., Thal, L., Wallace, R.B., Ockene, J.K., Hendrix, S.L., Jones, B.N., Assaf, A.R., Jackson, R.D., Kotchen, J.M., Wassertheil-Smoller, S., Wactawski-Wende, J., 2003. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA. 289, 2651-62.

1000. Sibai, T., Morgan, E.F., Einhorn, T.A., 2011. Anabolic agents and bone quality. Clin Orthop Relat Res. 469, 2215-2224.

1001. Šibul, F., Orciq, D., Vasic, M., Anackov, G., Nadpal, J., Savic, A., Mimica-Dukic, N., 2016. Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb and root extracts of seven selected legumes. Ind Crops Prod. 83, 641 - 653.

1002. Siddique, H.R., Saleem, M., 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: areview of preclinical studies. Life Sci. 88 pp. 285-293.

1003. Siddiqui, J.A., Sharan, K., Swarnkar, G., Rawat, P., Kumar, M., Manickavasagan, L., Maurya, R., Pierroz, D., Chattopadhyay, N., 2011. Quercetin-6-C-b-Dglucopyranoside isolated from *Ulmus wallichiana* planchon is more potent than quercetin in inhibiting osteoclastogenesis and mitigatand mitigating ovariectomy-induced bone loss in rats. Menopause. 18, 198-207.

1004. Sigurdsson, G., Aspelund, T., Chang, M., Jonsdottir, B., Sigurdsson, S., Eiriksdottir, G., Gudmundsson, A., Harris, T.B., Gudnason, V., Lang, T.F., 2006. Increasing sex difference in bone strength in old age: The Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik study (AGES-REYKJAVIK). Bone. 39, 644-651.

1005. Simonet, W.S., Lacey, D.L, Dunstan, C.R, Kelley, M., Chang, M.S, Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L, Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-

Gegg, L., Hughes, T.M, Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 89, 309-319.

1006. Simonet, A.M., Stochmal, A., Oleszek, W., Macias, F.A., 1999. Saponins and polar compounds from *Trifolium resupinatum*. Phytochemistry. 51, 1065-1067.

1007. Simons, R., Vincken, J.P., Roidos, N., Bovee T.F.H., Van Iersel, M., Verbruggen, M.A., Gruppen, H., 2011. Increasing soy isoflavonoid content and diversity by simultaneous malting and challenging by a fungus to modulate estrogenicity. J. Agric. Food Chem. 59, 6748-6758.

1008. Sims, N.A.,Martin, T.J., 2014. Coupling process in bone remodeling. Bone KEy Reports. 481page .

1009. Singh, K.B., Dixit, M., Dev, K., Maurya, R., Singh, D., 2017. Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect. Br J Nutr. 117, 1511-1522.

1010. Singh, S., Pandey, M.B., Singh, A.K., Singh, U., Pandey, V.B., 2008. A new chalcone glycoside from *Rhamnus nipalensis*. Nat Prod Res. 22, 1657 - 1659.

1011. Siracusa, L., Saija, A., Cristani, M., Cimino, F., D'Arrigo, M., Trombetta, D., Rao, F., Ruberto, G., 2011. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves - Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. Fitoterapia 82, 546 - 556.

1012. Sivakumaran, S., Molan, A.L., Meagher, L.P., Kolb, B., Foo, L.Y., Lane, G.A., Attwood, G.A., Fraser, K., Tavendale, M., 2004. Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from *Dorycnium rectum* against rumen bacteria. Phytochemistry 65, 2485 - 2497.

1013. Skalicka-Woźniak, K., Głowniak, K., 2012. Pressurized Liquid Extraction of Coumarins from Fruits of *Heracleum leskowii* with Application of Solvents with Different Polarity under Increasing Temperature. Molecules. 17, 4133-4141.

1014. Slimestad, R., Andersen, O. M., Francis, G. W., 1994. Ampelopsin 7-glucoside and other dihydroflavonol 7-glucosides from needles of *Picea abies*. Phytochemistry 35, 550-2.

1015. Smith, M.R., Egerdie, B., Toriz, N.H., Feldman, R., Tammela, T.L.J., Saad, F., Heracek, J., Szwedowski, M., Ke, C., Kupic, A., Leder, B.Z, Goessl, C., 2009. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. N. Engl. J. Med. 361, 745-754.

1016. Sogawa, S., Nihro, Y., Ueda, H., Izumi, A., Miki, T., Matsumoto, H., Satoh T.,1993. 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. J. Med. Chem. 36, 3904–3909.

1017. Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., Ghanem, G., 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Res. 19, 550-571.

1018. Solladie, G., Pasturel-Jacope, Y., Maignan, J., 2003. A re-investigation of resveratrol synthesis by Perkins reaction. Application to the synthesis of aryl cinnamic acids. Tetrahedron 59, 3315–3321.

1019. Sommerfeldt, D.W., Rubin, C.T., 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur Spine J. 10, 86-95.

1020. Son, J.K., Park, J.S., Kim, J. A., Kim, Y.,Chung, S.R., Lee, S.H., 2003. Prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* with tyrosinase inhibitory activity. Planta Med. 69, 559-561.

1021. Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food Chem Toxicol. 43, 985-1015.

1022. Spelsberg, T.C., Subramaniam, M., Riggs, B.L., Khosla, S., 2008. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. Mol. Endocrinol. 13, 819-828.

1023. Speroff, L., 2005. Alternative therapies for postmenopausal women. Int J Feril Womens Med. 50, 101-114.

1024. Srinivasan, S., Muthukumaran, J., Muruganathan, U., Venkatesan, R.S., Jalaludeen, A.M., 2014. Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats. Biomedicine & Preventive Nutrition. 4, 595-602.

1025. Srinivasan, B., Rodrigues, J.V, Tonddast-Navaei, S., Shakhnovich, E., Skolnick, J., 2017. Rational Design of Novel Allosteric Dihydrofolate Reductase Inhibitors Showing Antibacterial Effects on Drug-Resistant Escherichia coli Escape Variants. ACS Chem. Biol. 12, 1848–1857.

1026. Srivastava, R., Kulshreshtha, D.K., 1988. Triterpenoids from *Glochidion heyneanum*. Phytochemistry 11, 3575-3578.

1027. Stagi, S., Cavalli, L., Cavalli, T, de Martino, M., Brandi, M.L., 2016. Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for the assessment of bone strength in most of bone affecting conditions in developmental age: a review. Ital J Pediatr. 42, 2-20.

1028. Stamler, J., Stamler, R., Riedlinger, W.F., Algera, G., Roberts, R.H., 1976. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. JAMA. 235, 2299-306.

1029. Stanely Mainzen Prince, P., Rajakumar, S., Dhanasekar, K., 2011. Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram lipid peroxidation, antioxidants,

proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. Eur. J. Pharmacol. 668, 223-240.

1030. Stanikunaite, R., Khan, S.I., Trappe, J.M, Ross, S.A., 2009. Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. Phytother Res. 23, 575 - 578.

1031. Stavropoulou, M.I., Angelis, A., Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitakou, S., Duke., S.O., Fokialakis, N., 2017. Phytotoxic triterpene saponins from *Bellis longifolia*, an endemic plant of Crete. Phytochemistry 144, 71-77.

1032. Steinmetz, A.C., Renaud, J.P., Moras, D., 2001. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30, 329-359.

1033. Stergiou, G.S., Thomopoulou, G.C., Skeva, I.I., Mountokalakis, T.D., 1999. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in Greece: the Didima study. Am J Hypertens. 10, 959-65.

1034. Sternberg, M., Gishri, N., Mabjeesh, S.J., 2006. Effects of grazing on *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton: a potential forage crop in mediterranean grasslands. J. Agron. Crop Sci. 192, 399–407.

1035. Stevens A., Lowe J., 1998. Παθολογική Ανατομική. [μεταφρ.] Παναγιώτης Δάβαρης. Εκδόσεις Πασχαλίδης.

1036. Stevens A., Lowe J., 1993. Ιστολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδης.

1037. Stewart, A.F., 2002. Hyperparathyroidism, humoral hypercalcemia of malignancy, and the anabolic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein on the skeleton. J Bone Miner Res. 17, 758-762.

1038. Stobiecki, M., Staszków, A., Piasecka, A., Garcia-Lopez, P.M., Zamora-Natera, F., Kachlicki, P., 2010. LC-MSMS profiling of flavonoid conjugates in wild mexican lupine, *Lupinus reflexus*. J.Nat. Prod. 73, 1254 - 1260.

1039. Strada, C.L., Lima, K., DaSilva, V., Ribeiro, R.V., Dores, E., Dall'Oglio, E.L., Schmeda-Hirschmann, G., Carollo, C.A., Martins, D.T.O., Teixeira deSousa, P., 2017. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. Rev. Bras. Farmacogn. 27, 619-626.

1040. Strid, A., 1995. The Greek mountain flora, with speeial referenee to the Central European

1041. element. -Boeeonea 5, 99-112.

1042. Su, H.I., Freeman, E.W., 2009. Hormone changes associated with the menopausal transition. Minerva Ginecol. 61, 483–489.

1043. Sudheer, A.R., Chandran, K., Marimuthu, S., Menon, V.P., 2005. Ferulicacid modulates alteredlipidprofiles and prooxidant/antioxidant status in circulation during nicotine-inducedtoxicity: adose-dependentstudy. Toxicol.Mech. Methods. 15, 375–381.

1044. Sugai, T., 1992. Clinical effects of arbutin in patients with chloasma. Skin. Res., 34, 522 -529.

1045. Sugimoto, E., Yamaguchi, M., 2000. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Int. J. Mol. Med. 5, 515-520.

1046. Sugimoto, E., Yamaguchi, M., 2000. Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biochem. Pharmacol. 59, 471-475.

1047. Sugimoto, E., Yamaguchi, M., 2000. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Int J Mol Med. 5, 515-520.

1048. Sugiyama, Y., Sakurai, Y., Hirota, A., 2010. Isolation of 2,4,4-trihydroxydeoxybenzoin and 3-hydroxydaidzein from soybean miso. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 1293–1294.

1049. Suh, K.S., Choi, E.M., Kwon, M., Chon, S., Oh, S., Woo, J.T., Kim, S.W., Kim, J.W., Kim, Y.S., 2009. Kaempferol attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative cell damage in MC3T3-E1 osteoblastic cells. Biol Pharm Bull. 32, 746 - 9.

1050. Sukito, A., Tachibana, S., 2014. Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. Pak. J. Biol. Sci. 17, 999–1006.

1051. Sultana, R., Ravagna, A., Mohmmad-Abdul, H., Calabrese, V., Butterfield, D.A., 2005. Ferulic acid ethylester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. J. Neurochem. 92, 749–758.

1052. Sumiyoshi, M., Taniguchi, M., Baba, K., Kimura, Y., 2015. Antitumor and antimetastatic actions of xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots through the inhibited activation and differentiation of M2 macrophages. Phytomedicine 22, 759-67.

1053. Sun, H.Y., Xiao, C.F., Cai, Y.C., Chen, Y., Wei, W., Liu, X.K., Lv, Z.L., Zou, Y., 2010. Efficient synthesis of natural polyphenolic stilbenes: resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol. Chem. Pharm. Bull. 58, 1492 - 1496.

1054. Sun, J.M., Yang, J.S., Zhang, H., 2007. Two new flavanone glycosides of *Jasminum lanceolarium* and their antioxidant activities. Chem. Pharm. Bull. 55, 474 - 476.

1055. Sun, J.S., Li, Y.Y., Liu, M.H., Sheu, S.Y., 2007. Effects of coumestrol on neonatal and adult mice osteoblasts activities. J Biomed Mater Res. 81, 214-223.

1056. Sun, J., Sun, W.J., Li, Z.Y., Li, L., Wang, Y., Zhao, Y., Wang, C., Yu, L.R., Li, L.Z., Zhang, Y.L., 2016. Daidzein increases OPG/RANKL ratio and suppresses IL-6 in MG-63 osteoblast cells. Int. Immunopharmacol. 40, 32 - 40.

1057. Sun, Y.N., Li, W., Kim, J.H., Yan, X.T., Kim, J.E., Yang, S.Y., Kim, Y.H., 2015. Chemical constituents from the root of *Polygonum multiflorum* and their soluble epoxide hydrolase inhibitory activity. Arch Pharm Res. 38, 998–1004.

1058. Sun, Y.N., Cui, L., Li, W., Yan, X.T., Yang, S.Y., Kang, J.I., Kang, H.K., Kim, Y.H., 2013. Promotion effect of constituents from the root of *Polygonum multiflorum* on hair growth. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 4801 - 4805.

1059. Sundararajan, R., Haja, N.A., Venkatesan, K., Mukherjee, K., Saha, B.P., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P.K., 2006. *Cytisus scoparius* link-a natural antioxidant. Complement Altern Med. 6, 1-7.

1060. Suzuki, A., Kagawa, D., Fujii, A., Ochiai, R., Tokimitsu, I., Saito, I., 2002. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensiverats. Am.J.Hypertens. 15, 351–357.

1061. Suzuki, K., Miyakoshi, N., Tsuchida, T., Kasukawa, Y., Sato, K., Itoi, E., 2003. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone (1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. Bone, 33, 108-114.

1062. Suzuki, A., Sekiguchi, S., Asano, S., Itoh, M., 2008. Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. J Pharmacol Sci. 106, 530-535.

1063. Sviderskaya, E.V., Hill, S.P., Balachandar, D., Barsh, G.S., Bennett, D.C., 2001. Agouti sigsignaling protein and other factors modulating differentiation and proliferation of immortal melanoblasts. Dev. Dyn. 221, 373–379.

1064. Swamminathan R., 2001. Biochemical Markers of Bone Turnover. Clin Chim Acta. 313, 95-105.

1065. Syed, A.S., Jeon, J.S., Kim, C.Y., 2017. A new diacetylated flavonol triglycoside from the aerial parts of *Actinidia polygama*. Nat. Prod. Res. 13, 1501 - 1508.

1066. Szollosi, G., 2012. Heterogeneous Enantioselective Hydrogenation of Hydroxysubstituted (*E*)-2,3-diphenylpropenoic Acids over Pd/Al2O3 Modified by Cinchonidine. Catal Lett. 142, 345–351.

1067. Szulc, P., Bouxsein M.L. Vertebral Fracture Initiative, Part I. Overview of osteoporosis:Epidemiology and clinical management. International Osteoporosis Foundation.

1068. Tachakittirungrod, S., Ikegami, F., Okonogi, S., 2007. Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava*grown in Thailand. Sci. Pharm. 75, 179-193.

1069. Tacherfiout, M., Petrov, P.D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M.L., Khettal, B., 2018. Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract in Triton-induced hyperlipidemic rats and human HepG2 cells. Biomed. Pharmacother. 101, 501 - 509.

1070. Tada, M., 2000. Biological activities of antioxidants from herbs in Labiateae. FFIJ.184, 33-39.

1071. Tahara S., Ingham J.L., Mizutani J., 1986. New coumaronochromones from white lupin, *Lupinus albus* L. (Leguminosae). Agric. Biol. Chem. 49, 1775-1783.

1072. Tahara, S., Katagiri Y., Ingham J.L., 1994. Mizutani, J., Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. Phytochemistry 36, 1261-71.

1073. Tahara, S., Hashidoko, Y., Ingham, J.L., Mizutani, J., 1986. New 5-O-Methylisoflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L. cv. Barpine). Agric. Biol.Chem. 50, 1809-1819.

1074. Tahsin, T., Wansi, J.D., Al-Groshi, A., Evans, A., Nahar, L., Martin, C., Sarker, S.D., 2017. Cytotoxic properties of the stem bark of *Citrus reticulata*blanco (Rutaceae). Phytother Res. 31, 1215-1219.

1075. Tajuddeen, N., Isah, M.B., Suleiman, M.A., Van Heerden, F.R., Ibrahim, M.A., 2017. The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniases: a review. Int J Antimicrob Agents. 51, 311-318.

1076. Takahashi, S., Hori, K., Shinbo, M., Hiwatashi, K., Gotoh, T., Yamada, S., 2008. Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor in soybean. Biosci Biotechnol Biochem. 72, 3232 - 3236.

1077. Takahashi, T., Okiura, A., Saito, K., Kohno, M., 2014. Identification of phenylpropanoids in fig (*Ficus carica* L.) Leaves. J. Agric. Food Chem. 62, 10076-10083.

1078. Tanaka, R., Kinouchi, Y., Wada, S., Tokuda, H., 2004. Potential anti-tumor promoting activity of lupane-type triterpenoids from the stem bark of *Glochidion zeylanicum* and *Phyllanthus flexuosus.* Planta Med., 70, 1234 - 1236.

1079. Tanaka, T., 2003. A novelanti-dysmenorrhoea therapy with cyclicadministration of two Japanese herbals. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 30, 95-98.

1080. Tanaka, Y., Yanagida, A., Komeya, S., Kawana, M., Honma, D., Tagashira, M., Kanda, T., Shibusawa, Y., 2014. Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). J. Agric. Food Chem. 62, 2198 - 2206.

1081. Tanenbaum, D.M., 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5998-6003.

1082. Tang W., Eisenbrand G., 1992. Chinese drugs of plant origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern MedicineSpringer-Verlag Berlin Heidelberg,

1083. Tang, D., Shen, Y.B., Wang, Z.H., He, B., Xu, Y.H., Nie, H., Zhu, Q., 2018. Rapid analysis and guided isolation of *Astragalus* isoflavonoids by uhplc-dad-msn and their cellular antioxidant defense on high-glucose-induced mesangial cell dysfunction. J. Agric. Food.Chem. 66, 1105-1113.

1084. Tang, D.J., Hou, W., Zhou, Q., Zhang, M., Holz, J., Sheu, T.J., Li, T.F., Cheng, S.D., Shi, Q., Harris, S.E., Chen, D., Wang, Y.J., 2010. Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of β-catenin-BMP signaling. J Bone Miner Res., 25, 1234-1245.

1085. Tang, D.Z., Yang, F., Yang, Z., Huang, J., Shi, Q., Chen, D., Wang, Y.J., 2011. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling. Biochem Biophys Res Commun. 405, 256-261.

1086. Tang, Y., Lou, F., Wang, J., Zhuang, S., Four new isoflavone triglycosides from *Sophora japonica*. *J*. Nat. Prod. 64, 1107 - 1110.

1087. Tang, L., Zhang, L., WaJ, M.Q., 2006. Research of the active ingredient myricetin in *Myrica rubra* Sieb. Zucc. Chin. Tradit. Pat. Med., 28, 121-122.

1088. Tang, W., Eisenbrand, G., 1992. Chinese drugs of plant origin. Berlin: Springer-Verlag.

1089. Tang, Y., Yang, R., Duan, J.A., Shang, E., Su, S., Zhu, M., Qian, D., 2008. Isoflavone tetraglycosides from *Sophora japonica* Leaves. J. Nat. Prod., 71, 448-450.

1090. Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., 2009. TGF-β1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. Nat. Med. 15, 757-65.

1091. Tao, W.W., Duan, J.A, Yang, N.Y., Tang, Y.P., Liu, M.Z., Qian, Y.F., 2012. Antithrombotic phenolic compounds from *Glycyrrhiza uralensis.* Fitoterapia. 83, 422-425.

1092. Tava, A., Pecetti, L., Ricci, M., Pagnotta, M.A., Russi, L., 2007. Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. Flavor Fragance. 22, 363-370.

1093. Tava, A., Mella, M., Avato, P., Biazzi, E., Pecetti, L., Bialy, Z., Jurzysta, M., 2009. New triterpenic saponins from the aerial parts of *Medicago arabica* (L.) Huds. J. Agric. Food Chem. 57, 2826-2835.

1094. Tava, A., Pecetti, L., Romani, M., Mella, M., Avato, P., 2011. Triterpenoid glycosides from the leaves of two cultivars of *Medicago polymorpha*. L. J. Agric. Food Chem. 59, 6142-6149.

1095. Teitelbaum, S.L., Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am. J. Pathol. 170, 427- 435.

1096. Teitelbaum, S.I., 2000. Bone resorption by osteoclasts. Science. 289, 1504-1508.

1097. Teitelbaum, S.L., 2000. Osteoclasts, Integrins and Osteoporosis. J Bone Miner. 18, 344-349.

1098. Terencio, M.C., SanZ, M.J., Paya, M., 1991. Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. J. Ethnopharmacol. 31, 109-114.

1099. Terencio, M.C., Sanz, M.J. and Paya, M., 1990. A Hypotensive procyanidin-g,ycoside from *Rhamnus lycioides* ssp.*lycioides.* J. Ethnopharmacol. 30, 205-214.

1100. Tessari, I., Bisaglia, M., Valle, F., Samorì, B., Bergantino, E., Mammi, S., Bubacco, L., 2008. The reaction of-synuclein with tyrosinase. Possible implications for Parkinson disease. J. Biol. Chem. 283, 6808-6817.

1101. Thangarajan, S., Vedagiri, A., Somasundaram, S., Sakthimanogaran, R., Murugesan, M., 2018. Neuroprotective effect of morin on lead acetate- induced apoptosis by preventing cytochrome c translocation via regulation of Bax/Bcl-2 ratio. Neurotoxicol Teratol. 66, 35-45.

1102. Thongnest, S., Boonsombat, J., Prawat, H., Mahidol, C., Ruchirawat, S., 2017. Ailanthusins A-G and nor-lupane triterpenoids from *Ailanthus triphysa*. Phytochemistry 134, 98 - 105.

1103. Tian, X., Guo, S., He, K., Roller, M., Yang, M., Liu, Q., Zhang, L., Ho, C.T., Bai, N., 2018. Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents of Ptychopetalum olacoides Benth. Nat. Prod. Res. 32, 354-357.

1104. Tian, Y., Shi, R., Gao, M., Wang, H., Du, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, M., 2017. Differentiation of furanocoumarin isomers with ratio of relative abundance of characteristic fragment ions and application in *Angelicae dahuricae* Radix. Chromatographia, 80, 1401 - 1410.

1105. Tosun, F., Akyuz Kizilay, C., 2009. Flavonoids and isoflavonoids from *Genista sessilifolia* dc. growingin Turkey. Chem. Nat. Compd. 45, 83 - 84.

1106. Tosun, F., Erdem, C.K. and Eroğlu, Y., Determination of genistein in the Turkish *Genista* L. species by LC-MS. Pharmazie 58, 549-50.

1107. Toth, A., Toth, G., Kery, A., 2014. Polyphenol composition and antioxidant capacity of three lysimachia species. Nat. Prod. Comm. 9, 1473 - 1478.

1108. Tous, J., Romero, A., Hermose, J.F., Ninot, A., Plana, J., Battle, I., 2009. Agronomic and commercial performance of four Spanish cultivars. Hort technology. 19, 465-470.

1109. Tousen, Y., Ishiwata, H., Takeda, K., Ishimi, Y., 2015. Assessment of safety and efficacy of perinatal or peripubertal exposure to daidzein on bone development in rats. Toxicol. Rep. 2, 429-436.

1110. Treloar, A.E., 1981. Menstrual cyclicity and the pre-menopause. Maturitas, 3, 249-264.

1111. Trivedi, R., Kumar S., Kumar A., Siddiqui J.A., Swarnkar G., Gupta V., Kendurker A., Dwivedi A.K., Romero J.R., Chattopadhyay N., 2008. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. Mol Cell Endocrinol. 289, 85 - 93.

1112. Tropicos Database. 2016. tropicos.org (accessed 15 September 2016).

1113. Truong, V., Nam, T.D., Hung, T.N., Ng, N.T., Quan, P., Chinh, L.V., Jung, S.H., 2015. Synthesis and anti-proliferative activity of novel azazerumbone conjugates with chalcones. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015, 25, 5182-5185.

1114. Tsai, M., Huang, G.S., Hung, Y.C., Bin, L., Liao, L.T., Lin, L.W., 2007. *Psoralea corylifolia* extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats. J. Chin. Med. 35, 669.

1115. Tsuji, M., Yamamoto, A., Sato, T., Mizuha, Y., 2009. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. J Bone Miner Metab. 27, 673-81.

1116. Tsutsumi, N., 1995. Effects of coumestrol on bone metabolism in organ culture. Biol.Pharm.Bull. 18, 1012-1015.

1117. Tsutsumi, N., Kawashima, K., Arai, N., Nagata, H., Kojima, M., Ujiie, A., Endo, H., 1994. *In vitro* effect of KCA-098, a derivative of coumestrol, on bone resorption of fetal rat femurs. Bone Miner. 24, 201-209.

1118. Tucker, S.C., 1992. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua.* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). Am. J. Bot. 79, 318-327.

1119. Tutin, G.T., Heywood, V., Burges, N.A., 1972. In Flora Europaea. Cambridge: University Pres, 2, 127.

1120. Tyagi, A.M., Gautam, A.K., Kumar, A., Srivastava, K., Bhargavan, B., Trivedi, R., Saravanan, S., Yadav, D.K., Singh, N., Pollet, R., Brazier, C., Mentaverri, M., Maurya, R., Chattopadhyay, N., Goel, A., Singh, D., 2010. Medicarpin inhibits osteoclastogenesis and has nonestrogenic bone conserving effect in ovariectomizedmice. Mol. Cell Endocrinol. 325, 101-109.

1121. Ullman, D., 1998. Discovering homeopathy: Medicine for the 21st century. Berkeley, CA, North Atlantic Books.

1122. Unver, N., Freyschmidt-Paul, P., Horster, S., Wenck, H., Stäb, F., Blatt, T., Elsässer, H.P., 2006. Alterations in the epidermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. Br. J. Dermatol. 155, 119–128.

1123. Urdang, G J., 1951. The Antibiotics and Pharmacy. History Med. 6, 388.

1124. US Congress, office of technology assessment, 1994. Hip fracture outcomes in people 50 and over - background paper, publication OTA - BP - H - 120. Washington DC: US government printing office, 1994.

1125. USDA. 2015, [Ηλεκτρονικήπηγή]. http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_lual22.pdf (assessed 18 May 2018).

1126. USDA, 2016. Plants database. http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CYVI8 (assessed 18 June 2018).

1127. Horcajada-molteni, V., Crespy, L.E., 2000. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. J. Bone Miner Res. 15, 2251-225.

1128. Van der Schouw, Y.T., Van der Graaf, Y., Steyerberg, E.W., Eijkemans, J.C., Banga, J.D., 1996. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. Lancet. 16, 714-8.

1129. Van Gorp, T., Neven, P., 2002. Endometrial safety of hormone replacement therapy: review of literature. Maturitas 42, 93-104.

1130. Van Pttelgergh, I., Goemaere, S., Zmierczak, H., Kaufman, J.M., 2004. Perturbed sex steroid status in men with idiopathic osteoporosis and their sons. J. Cin. Endocrinol. Metab. 89, 4949-4953.

1131. Vavilis, D., Maloutaw, S., Nasioutziki, M., Boni, E., Bontis, J., 1995. Conjuctiva is an estrogen sensitive epithelium. Act Obstet Gynaicol Scand. 74, 799-802.

1132. Vaya, J., Mahmood, S., 2006. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus)* L. BioFactors 28, 169 - 175.

1133. Vayaa, J., Belinkya, P., Aviramb, M., 1997. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. Free Radic Biol Med. 23, 302-313.

1134. Veeresham, C., 2012. Natural products derived from plants as a source of drugs. J Adv Pharm Technol Res. 3, 200- 201.

1135. Velika, B., Kron, I., 2012. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. Free Radicals and Antioxidants. 2, 62-67.

1136. Venditti, A., Guarcini, L., Altieri, A., Bianco, A., 2013. Phytochemical pattern of *Gentiana* species of Appennino in Central Italy. Nat Prod Res. 27, 2063-2065.

1137. Vestergaard, P., Mosekilde, L., 2002. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: A nationwide follow-up study in 16,249 patients. Thyroid. 12, 411-419.

1138. Viegi L., Pieroni A., Guarrera P. M., Vangelisti R., 2003. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. J Ethnopharmacol. 89, 221–244.

1139. Vielhaber, G., Vielhaber, G., Schmaus, G., Jacobs, K., Franke, H., Lange, S., Herrmann, M., Joppe, H., Koch, O., 2007. 4-(1-Phenylethyl)1,3-benzenediol: a new, highly efficient lightening agent. Int. J. Cosmet. Sci. 29, 65–66.

1140. Vijaya Bhaskar Reddy, M., Hung, H.Y., Kuo, P.C., Huang, G.J., Chan, Y.Y., Huang, S.C., Wu, S.J., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H., Wu, T.S., 2017. Synthesis and biological evaluation of chalcone, dihydrochalcone, and 1,3-diarylpropane analogs as anti-inflammatory agents. Bioorg Med Chem Lett. 2017, 27, 1547-1550

1141. Villar, A., Pay, M., Terencio, M.C., 1986. Plants with antihypertensive action. Fitoterapia 57, 131- 145.

1142. Villar, A., Terencio, M.C., Pay, M., 1986. Hypotensive effect of *Rhamnus lycioides* extracts. J. Ethnopharmacol. 16, 269-273.

1143. Viswanathan, M., Byrappa, G., Sathish, K., Perumal J.A., Jesu, D., 2012. Antimicrobial activity of bioactive compounds and leaf extracts in *Jatropha tanjorensis*. Fitoterapia 83, 1153 - 1159.

1144. Volterrani, M., Rosano, G., Goats, A., C., Beale, Collins, P., 1995. Estrogen actually increases eripheral blood flow i postmenopausal women. Am J Med. 99, 119-22.

1145. Von Baer, D., Saelzer, R., Vega, M., Ibieta, P., Molina, L., Von Baer, E., Ibanez, R., Hashagen, U., 2006. Isoflavones in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*: Quantitative determination by capillary zone electrophoresis, evolution of their concentration during plant development and effect on anthracnose causing fungus Colletotrichum lupini. J. Chil. Chem. Soc., 51, 1025 - 1029.

1146. Vontzalidou, A., Zoidis, G., Chaita, E., Makropoulou, M., Aligiannis, N., Lambrinidis, G., Mikros, E., Skaltsounis, A.L., 2012. Design, synthesis and molecular simulation studies of dihydrostilbene derivatives as potent tyrosinase inhibitors. Bioorg. Med Chem Lett. 22, 5523–5526.

1147. Waghorn, G.C., Douglas, G.B., Niezen, J.H., McNabb, W.C., Foote, A.G., 1998. Forages with condensed tannins their management and nutritive value for ruminants. Proc N Z Grassl Assoc. 60, 89–98.

1148. Waghorn, G.C., Molan, A.L., 2001. Effect of condensed tannins in *Dorycnium rectum* on its nutritive value and on the development of sheep parasite larvae. Proc N Z Grassl Assoc. 63, 273–277.

1149. Wagner, C., Fachinetto, R., Dalla Corte, C.L., Brito, V.B., Severo, D., de Oliveira Costa Dias, G., Morel, A.F., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2006. Quercitrin, a

glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. Brain Res. 1107, 192-198.

1150. Wahala, K., Hase, T.A., 1991. Expedient synthesis of polyhydroxyisoflavonoids. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3005-3008.

1151. Walker, A., KhanabLarry, A., AgnihotriaHala, V.A., ElSohlyaShabana, N., KhanaTroy, I., SmillieaIkhlas, J., 2008. Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers. Phytochemistry 69, 2061-2066.

1152. Wang, J., Zhou, J., Cheng, C.M, Kopchick, J.J, Bondy, C.A., 2004. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. J Endocrinol. 2, 247-55.

1153. Wang, C., Zhang, D., Ma, H., Liu, J., 2007. Neuroprotective effects of emodin-8-*O*-*β*-d-glucoside *in vivo* and *in vitro*. Europ. J. Pharmacol. 577, 58-63.

1154. Wang, C.M., Yeh, K.L., Tsai, S.J., Jhan, Y.L., Chou, C.H., 2017. Anti-proliferative activity of triterpenoids and sterols isolated from alstonia scholaris against non-small-cell lung carcinoma cells. Molecules. 22, 2119

1155. Wang, D.Li, F., Jiang, Z., 2001. Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia* extracts and two of its flavonoids. Planta Med. 67, 748-9.

1156. Wang, D., Mu, Y., Dong, H., Yan, H., Hao, C., Wang, X., Zhang, L., 2018. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from diaphragma juglandis fructus and their inhibitory activity on nitric oxide production *in vitro*. Molecules. 23, 1-12.

1157. Wang, H.M., Chen, C.Y., Wen, Z.H., 2011. Identifying melanogenesis inhibitors from *Cinnamomum subavenium* with *in vitro* and *in vivo* screening systems by targeting the human tyrosinase. Exp Dermatol.Mar., 20, 242-8.

1158. Wang, J., Matsuzaki, K. and Kitanaka, S., 2006. Stilbene derivatives from *Pholidota chinensis* and their anti-inflammatory activity. Chem. Pharm. Bull. 54, 1216 - 1218.

1159. Wang, J., Li, S.F., Wang, T., Sun, C.H., Wang, L., Huang, M.J., Chen, J., Zheng, S.W., Wang, N., Zhang, Y.J., Chen, T.Y., 2017. Isopsoralen-mediated suppression of bone marrow adiposity and attenuation of the adipogenic commitment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Int J Mol Med., 39, 527 - 538.

1160. Wang, J., Guo, M., Zheng, L., Wang, Z., 2010. Effects of psoralen on osteoporogeterin and receptor activator nuclear factor kappa B ligand mRNA expression in rat osteoblasts. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research. 14, 6927 - 6930.

1161. Wang, J., Shang, F., Liu, L., Wang, S., Wang, J., Mei, Q., 2007. *In vivo* and *in vitro* activity of genistein in osteoporosis. Indian J Pharmacol. 39, 103 - 106.

1162. Wang, L., Li, X., Zhang, S., Lu, W., Liao, S., Liu, X., Shan, L., Shen, X., Jiang, H., Zhang, W., Huang, J., Li, H., 2012. Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. Bioorganic Med. Chem. 20, 4164-4171.

1163. Wang, L.Y., Chen, M.H., Wu, J., Sun, H., Liu, W., Qu, Y.H., Li, Y.C., Wu, Y.Z., Li, R., Zhang, D., Wang, S.J., Lin, S., 2017. Bioactive glycosides from the twigs of *Litsea cubeba. J*. Nat. Prod. 80, 1808 - 1818.

1164. Wang, M., Hu, G., Tian, Y., Zhang, Z., Song, R., 2016. Influence of wine-processing on the pharmacokinetics of anthraquinone aglycones and glycosides from rhubarb in hyperlipidemic hamsters. RSC Advances. 6, 25047-25055.

1165. Wang, Q., Qiao, X., Qian, Y., Liu, C.F., Yang, Y.F., Ji, S., Li, J., Guo, D.A., Ye, M., 2015. Metabolites identification of glycyrin and glycyrol, bioactive coumarins from licorice. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 983-984, 39 - 46.

1166. Wang, S., Shi, P., Qu, L., Ruan, J., Yang, S., Yu, H., Zhang, Y., Wang, T., 2017. Bioactive constituents obtained from the seeds of *Lepidium apetalum* Willd. Molecules. 22, 540.

1167. Wang, S., Yang, Z., Peng, N., Zhou, J., Yong, X., Yuan, H., Zheng, T., 2018. Optimization of ionic liquids-based microwave-assisted hydrolysis of puerarin and daidzein derivatives from Radix *Puerariae Lobatae* extract. Food Chem. 256, 149 - 155.

1168. Wang, T., Liu, Y., Li, X., Xu, Q., Feng, Y., Yang, S., 2018. Isoflavones from green vegetable soya beans and their antimicrobial and antioxidant activities. J Sci Food Agric. 98, 2043 - 2047.

1169. Wang, W.H., Chuang, H.Y., Chen, C.H., Chen, W.K., Hwang, J.J., 2016. Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment. Biomed Pharmacother. 79, 231-240.

1170. Wang, X., Cheng, K., Han, Y., Zhang, G., Dong, J., Cui, Y., Yang, Z., 2016. Effects of psoralen as an anti-tumor agent in human breast cancer MCF-7/ADR cells. Biol Pharm Bull. 39, 815 - 822.

1171. Wang, X., Schröder, H.C., Feng, Q., Diehl-Seifert, B., Grebenjuk, V.A., Müller, W.E., 2014. Isoquercitrin and polyphosphate co-enhance mineralization of human osteoblast-like SaOS-2 cells via separate activation of two RUNX2 cofactors AFT6 and Ets1. Biochem.Pharmacol. 89, 413-421.

1172. Wang, X.F., Yu, L., Hao, W.J., Fu, X.U., 2016. Chemical constituents of *Aconitum flavum*. Chem. Nat. Compd. 52, 769–770.

1173. Wang, Y., Zhang, G., Yan, J., Gong, D., 2014. Inhibitory effect of morin on tyrosinase: Insights from spectroscopic and molecular docking studies. Food Chem. 163, 226-233.

1174. Wang, Z., Li, Y., Zhou, F., Piao, Z., Hao, J., 2016. Effects of statins on bone mineral density and fracture risk. a prisma-compliant systematic review and meta-analysis. Medicine. 95, 30-42.

1175. Wang, Z., Ma, C., Tang, S., Xiao, H., Kakiuchi, N., Kida, H., Hattori, M., Qualitative and quantitative analysis of *swertia* herbs by high performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). Chem Pharm Bull. 56, 413-417.

1176. Wang, Z.B., Zhai, Y.D., Ma, Z.P., Yang, C.J., Pan, R., Yu, J.L., Wang, Q.H., Yang, B.Y., Kuang, H.X., 2015. Triterpenoids and flavonoids from the leaves of *Astragalus membranaceus* and their inhibitory effects on nitric oxide production. Chem Biodivers. 12, 1575-1584.

1177. Wani, M.C, Taylor, H.L, Wall, M.E, Coggon, P., McPhail, A.T., 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 93, 2325-2327.

1178. Wanjiku, J., Mead, D.J., Goh, K.M., Gadgil, R.L., 1997. Biological nitrogen fixation by three legumes in coastal sand-dune forest, estimated by an isotope dilution technique. New Zeal. J. For. Sci., 27, 39 –50.

1179. Warren, M.P., Shortle, B. and Dominguez, J.E., 2002. Use of alternative therapies in menopause. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 16, 411-448.

1180. Watanabe, K., Kinjo, J., Nohara, T., 1993. Three New Isoflavonoid Glycosides from *Lupinus luteusand L. polyphyllus×arboreus*. Chem Pharm Bull. 41, 394–396.

1181. Wattel, A., Kamel S., Mentaverri, R., Lorget, F., 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. Biochem Pharmacol. 65, 35-42.

1182. Weeds, 2016_α. Weeds in Australia. (http://www.environment.gov.au/cgibin/biodiversity/invasive/weeds/weeddetails.pl?taxon_id) (assed 16 May 2018)

1183. Weeds, 2016_b. Weeds in Australia. (http://www.environment.gov.au/cgibin/biodiversity/invasive/weeds/weeddetails.pl?taxon_id) (assed 10 May 2018)

1184. Wei, X., Yang, S.J., Liang, N., Hu, D.Y., Jin, L.H., Xue, W., Yang, S., 2012. Syringic Acid Extracted from Herba dendrobii Prevents Diabetic Cataract Pathogenesis by Inhibiting Aldose Reductase Activity. J Evid Based Complementary Altern Med. 2018, 1-13.

1185. Wei, X.H., Yang, S.J., Liang, N., Hu, D.Y., Jin, L.H., Wei, W. and Yang, S., 2013. Chemical Constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston. Molecules. 18, 325-1336.

1186. Wetli, H.A., Brenneisen, R., Tschudi, I., Langos, M., Bigler, P., Sprang, T., Schürch, S., Mühlbauer, R.C., 2005. A γ -Glutamyl Peptide Isolated from Onion (*Allium cepa* L) by Bioassay-Guided Fractionation Inhibits Resorption Activity of Osteoclasts. J. Agric. Food Chem. 53, 3408 – 3414

1187. Whelan, A.M., Jurgens, T.M. and Bowles, S.K., 2006. Natural health products in the prevention and treatment of osteoporosis: Systematic review of randomized controlled trials. Ann Pharmacother. 40, 836-49.

1188. WHO., 1996. Research on the Menopause in the Technical report.

1189. Wikipedia https://en.wikipedia.org/wiki/Cytisus. (assed 10 November 2017)

1190. Wills, B.J., Begg, J.S.C. and Foote, A.G., 1989. *Dorycnium* species – two new legumes witη potential for dryland pasture rejuvenation and resource conservation. Proc N Z Grassl Assoc. 50, 169-174.

1191. Wink M., Meibner C., Witte L., 1994. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus.* Phytochemistry 38, 139-153.

1192. Winther, K., Apel, K., Thamsborg, G., 2005. A powder made from seeds and shells of a rose-hip subspecies (*Rosa canina*) reduces symptoms of knee and hip osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Scand J Rheumato. 34, 302-308.

1193. Wochesländer, R., Harper, R.J., Sochacki, S.R., Ward, P.R., Revell, C., 2016. Tagasaste (*Cytisus proliferus* Link.) reforestation as an option for carbon mitigation in dryland farming systems. Ecol Eng. 97, 610-618.

1194. Wojakowska, A., Piasecka, A., García-López, P.M., Zamora-Natera, F., Krajewski, P., 2013. Marczak Ł, Kachlicki P, Stobiecki M. Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC-MS techniques. Phytochemistry 92, 71 - 86.

1195. Woldemichael, G.M., Wink, M., 2002. Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. Phytochemistry 60, 323-327.

1196. Woldemichael, G.M., Montenegro, G. and Timmermann, B.N., 2003. Triterpenoidal lupin saponins from the Chilean legume *Lupinus oreophilus* Phil. Phytochemistry 63, 853-857.

1197. Won, T. H., Song, I.H., Kim, K.H., Yang, W.Y., Lee, S.K., Oh, D.C., Oh, W.K., Oh, K.B., Shin, J., 2015. Bioactive metabolites from the fruits of *Psoralea corylifolia*. J. Nat. Prod. 78, 666-673.

1198. Wong, R., Rabie, W.K., Bakr, A.M., 2011. Effect of psoralen on bone formation. J. Orthop. Res. 29, 158 - 164.

1199. Wong, S.L., Chang, H.S., Wang, G.J., Chiang, M.Y., Huang, H.Y., C.H., Chen., Tsai, S.C., Lin, C.H., Chen, I.S., 1999. Secondary Metabolites from the Roots of Neolitsea daibuensis and Their Anti-inflammatory Activity. J. Nat. Prod. 74, 2489–2496.

1200. Woodgate, K., Maxted, N., Bennett, S.J., 1999. A generic conspectus of the forage legumes of the Mediterranean basin. 'Genetic resources of Mediterranean pasture and forage legumes. London : Kluwer Academic Publishers, 182–226.

1201. Woods, N.F., Mitchell, E.S., 2005. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. Am J Med. 118, 14-24.

1202. Wu, Chi-Rei, Chang, C.L, Hsieh, P.Y, Lin, L.W, Ching, H., 2007. Psoralen and isopsoralen, two coumarins of psoraleae fructus, can alleviate scopolamine-induced amnesia in rats. Planta Med. 73, 275 - 278.

1203. Wu, J.H., Li, Q., Wu, M.H., 2010. Formononetin, an isoflavone, relaxes rat isolated aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent pathways. J Nutr Biochem. 21, 613-620.

1204. Wu, Y.X., Wu, T.Y., Xu, B.B., Xu, X.Y., Chen, H.G., Li, X.Y., Wang, G.L., 2016. Protocatechuic acid inhibits osteoclast differentiation and stimulates apoptosis in mature osteoclasts. Biomed Pharmacother. 82, 399 - 405.

1205. Wu, Y., Jiang, X., Zhang, S., Dai, X., Liu, Y., Tan, H., Gao, L., Xia, T., 2016. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1017-1018, 10-17.

1206. Wubshet, S.G., Brighente, I.M., Moaddel, R., Staerk, D., 2015. Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α-Gucosidase Inhibitory Lgands and Alkylresorcinol Glycosides from *Eugenia catharinae*. J. Nat. Prod. 78, 2657-2665.

1207. Wyrepkowski, C., Costa, D.L., Sinhorin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., dos Santos, L.C., 2014. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. Molecules. 19, 16039-16057.

1208. X. Wu, J.A. Hammer III., 2000. Making sense of melanosome dynamics in mouse melanocytes. Pigment Cell Res. 13, 241-247.

1209. Xia, C., Liu, Y., Xu, J., Yu, J., Qin, W., 2009. Catalytic hydrodechlorination reactivity of monochlorophenols in aqueous solutions over palladium/carbon catalyst. Catalysis Communications 10, 456–458.

1210. Xiao, G., Li, X., Wu, T., Cheng, Z., Tang, Q., Zhang, T., 2012. Isolation of a new meroterpene and inhibitors of nitric oxide production from *Psoralea corylifolia* fruits guided by TLC bioautography. Fitoterapia 83, 1153–1557.

1211. Xiao, C.F., Zou, Y., Du, J.L., Sun, H.Y., Liu, X.K., 2012. Hydroxyl substitutional effect on selective synthesis of *cis trans* stilbenes and 3-arylcoumarins through Perkin condensation. Synth. Commun. 42, 1243–1258.

1212. Xiao, G., Li, G., Chen, L., Zhang, Z., Yin, J.J., Wu, T., Cheng, Z., Wei, X., Wang, Z., 2010. Isolation of antioxidants from *Psoralea corylifolia* fruits using high-speed counter-current chromatography guided by thin layer chromatography-antioxidant autographic assay. J. Chromatogr. 1217, 5470-5476.

1213. Xiao, Z. P., Shi, D.H., Li, H.Q., Zhang, L.N., Xu, C., Zhu, H.L., 2007. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of Helicobacter pylori urease. Bioor Med Chem. 15, 3703–710.

1214. Xiao, Z.P., Ma, T.W., Fu, W.C., Peng, X.C., Zhang, A.H., Zhu, H.L., 2010. The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catecholderivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. Eur J Med Chem. 45, 5064-5070.

1215. Xiao, H.H., Gao, Q.G., Zhang, Y., Wong, K.C., Dai, Y., Yao, X.S., Wong, M.S., 2014. Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. J Steroid Biochem Mol Biol. 144, 382-391.

1216. Xie, Y.G., Li, T., Wang, G.W., Ren, J., Wang, X., Pan, Y.P., Li, H.L., Yan, S.K., Jin, H.Z., Zhang, W.D., 2016. Chemical Constituents of *Campylotropis hirtella.* Chem. Nat. Compd. 52, 704–707.

1217. Xin, D., Wang, H., Yang, J., Su, Y.F., Fan, G.W., Wang, Y.F., Zhu, Y., Gao, X.M., 2010. Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity. Phytomedicine 17, 126-131.

1218. Xin, H.L., Wu, Y.C., Su, Y.H., Sheng, J.Y., Ling, C.Q., 2011. Novel Flavonoids from the Leaves of *Actinidia valvata* Dunn: Structural Elucidation and Antioxidant Activity. Planta Med. 77, 70-73.

1219. Xin, M., Ma, Y., Lin, W., Xu, K., Chen, M., 2015. Use of dihydromyricetin as antioxidant for polypropylene stabilization. J. Therm. Anal. Calorim. 120, 1741-1747.

1220. Xu Y., Simon J.E., Welch C., Wightman J.D., Ferruzzi, M.G., Ho, L., Pasinetti, G.M., Wu, Q., 2011. Survey of polyphenol constituents in grapes and grapederived products. J Agric Food Chem. 59, 10586–10593.

1221. Xu, H.X., Wan, M.D., But, P.P., Foo, L.Y., 2000. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. Biol Pharm Bull. 23, 1072-1076.

1222. Xu, M.Y., Kim, Y.S., 2014. Antitumor activity of glycyrol via induction of cell cycle arrest, apoptosis and defective autophagy. Food Chem Toxicol. 74, 311 - 319.

1223. Xu, S., Shang, M.Y., Liu, G.X., Xu, F., Wang, X., Shou, C.C., Cai, S.Q., 2013. Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and their antimicrobial activity. Molecules 18, 5265- 5287.

1224. Xu, X., Pan, J., Zhou, X., 2014. Amelioration of lipid profile and level of antioxidant activities by epigallocatechin-gallate in a rat model of atherogenesis. Hear. Lung Circ. 23, 1194–1201.

1225. Xu, Y., Simon, J.E., Welch, C., Wightman, J.D., Ferruzzi, M.G., Ho, L., Pasinetti, G.M., Wu, Q., 2011. Survey of polyphenol constituents in grapes and grapederived products. J Agric Food Chem. 59, 10586–10593.

1226. Xue, Y., Zheng, Y., An, L., Dou, Y., Liu, Y., 2014. Density functional theory study of the structure–antioxidant activity. Food Chem. 151, 198–206.

1227. Yakar, S., Rosen, C.J., 2003. From mouse to man: Redefining the role of insulin-like growth factor-I in the acquisition of bone mass. Exp Biol Med (Maywood). 3, 245-52.

1228. Yamagishi, T., Otsuka, E., Hagiwara, H., 2001. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. Endocrinology 142, 3632–3637.

1229. Yamaguchi, A., Komori, T., Suda, T., 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev. 21, 393-411.

1230. Yamaguchi, M., Sugimoto, E., 2000. Stimulatory effect of genistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells: activation of aminoacyl-tRNA synthetase. Mol Cell Biochem. 214, 97-102.

1231. Yamaguchi, M., Weitzmann, M., 2009. The estrogen 17beta-estradiol and phytoestrogen genistein mediate differential effects on osteoblastic NF-kappaB activity. Int. J.Mol. Med., 23, 297 - 301.

1232. Yamaguchi, M., Weitzmann, M., 2009. The bone anabolic carotenoids p-hydroxycinnamic acid and β-cryptoxanthin antagonize NF-κB activation in MC3T3 preosteoblasts. Mol Med Rep. 2, 641 - 644.

1233. Yamaguchi, M., Lai, Y.L., Uchiyama, S., Nakagawa, T., 2008. Oral administration of phytocomponent p-hydroxycinnamic acid prevents bone loss in ovariectomized rats. Mol Cell Biochem. 311, 31 - 36.

1234. Yang, H., Ye, X., Liu, D., Chen, J., Zhang, J., Shen, Y., Yu, D., 2011. Characterization of unusual proanthocyanidins in leaves of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). J. Agric. Food Chem. 59, 1622 - 1629.

1235. Yang, Li, Takai, H., Utsunomiya, T., Li, X., Li, Z., Wang, Z., Wang, S., Sasaki, Y., Yamamoto, H., Ogata, Y., 2010. Kaempferol stimulates bone sialoprotein gene transcription and new bone formation. J. Cell.Biochem. 110, 1342 - 1355.

1236. Yang, M.H., Vasquez, Y., Ali Z, K.I., Khan, S.I., 2013. Constituents from *Terminalia* species increase PPARα and PPARγ levels and stimulate glucose uptake without enhancing adipocyte differentiation. J. Ethnopharmacol. 149, 490 - 498.

1237. Yang, R., Li, W., Yuan, B., Ren, G., Wang, L., Cheng, T., Liu, Y., 2018. The genetic and chemical diversity in three original plants of licorice, *Glycyrriza uralensis* Fisch.,*Glycyrrhiza inflata* Bat. and *Glycyrrhiza glabra* L. Pak J Pharm Sci. 31, 525 - 535.

1238. Yang, R.Y., Lan, Y.S., Huang, Z.J., Shao, C.L., Liang, H., Chen, Z.F., Li, J., 2012. Isoflavonoids from *Sophora tonkinensis.* Chem. Nat. Compd. 48, 674 - 676.

1239. Yang, S., Liu, X.K., 2005. Three new diarylpropanes from *Dioscorea composita*. Chin. J. Chem. 16, 57-60.

1240. Yang, X., Y., Li, Z., L., Qian, S., H., Pu, S.B., 2016. Chemical Constituents of the Spines of *Gleditsia sinensis*. Chem. Nat. Compd. 52, 904 – 906.

1241. Yang, X.Y., Liu, R., Dou, T.Y., Wang, J., He, H.Z., Lu, W., 2018. Furocoumarin from radix *Angelica dahurica* and synthetic analogue as potential agent for treatment of vitiligo. Int. j. pharmacol. 14, 595 - 600.

1242. Yang, Y.F., Zhang, L., Zhang, Y.B., Yang, X.W., 2017. Simultaneous assessment of absorption characteristics of coumarins from *Angelicae pubescentis* Radix: *In vitro* transport across Caco-2 cell and in vivo pharmacokinetics in rats after oral administration. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 10, 308 - 315.

1243. Yang, Y.N., Li, F.S., Liu, F., Feng, Z.M., Jiang, J.S., Zhang, P.C., 2016. A novel adduct of ECG fused to piceid and four new dimeric stilbene glycosides from: *Polygonum cuspidatum*. RSC Adv. 6, 60741 - 60748.

1244. Yang, Z.G., Jia, L.N., Shen, Y., Ohmura, A., Kitanaka, S., 2011. Inhibitory Effects of Constituents from *Euphorbia lunulata* on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW 264.7 cells. Molecules, 16, 8305-8318.

1245. Yang, Z.,Huang, J.H., Liu, S.F., Zhao, Y.J., Shen, Z.Y., Wang, Y.J., Bian, Q., 2012. The osteoprotective effect of psoralen in ovariectomy-induced osteoporotic rats via stimulating the osteoblastic differentiation from bone mesenchymal stem cells. Menopause 19, 1156 - 1164.

1246. Yang, H.M., Ham, Y.M., Yoon, W.J., Roh, S.W., Jeon, Y.J., Oda, T., Kang, S.M., Kang, M.C., Kim, E.A., Kim, D., Kim, K.N., 2012. Quercitrin protects against ultraviolet B-induced cell death *in vitro* and in an *in vivo* zebrafish model. J Photochem Photobiol B. 114, 126-131.

1247. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N, and Suda, T., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sc. 95, 3597-3602.

1248. Ydjedd, Chaalal, M., Richard, G., Kati, D.E., López-Nicolás, R. Fauconnier, M. L., Louaileche, H., 2017. Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages. Food Res Int. 4, 2041 - 2049.

1249. Ye, G., Huang, C., 2006. Flavonoids of *Limonium aureum*. Chem. Nat. Compd. 42, 232 - 234.

1250. Ye, Y., Chou, G.X., Wang, H., Chu, J.H., Yu, Z.L., 2010. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. Phytomedicine 18, 32-35.

1251. Yin, J., Winzenberg, T., Quinn, S., Giles, G., Jones, G., 2011. Beverage-specific alcohol intake and bone loss in older men and women: a longitudinal study. Eur J Clin Nutr. 65, 526-532.

1252. Yin, L., Guan. E., Zhang. Y., Shu. Z., Wang. B., Wu. X., Chen. J., Liu. J., Fu. X., Sun. W., Liu. M., 2018. Chemical profile and anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* fisch. Iran J Pharm Res. 17, 726 - 734.

1253. Ying, X., Chen, X., Feng, Y., Xu, H.Z., Chen, H., Yu, K., Cheng, S., Peng, L., 2014. Myricetin enhances osteogenic differentiation through the activation of canonical Wnt/β-catenin signaling in human bone marrow stromal cells. Eur J Pharmacol. 738, 22 - 30.

1254. Yokozawa, T., Kim, Y.J., 2007. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. Biol. Pharm. Bull. 30, 2007-2011.

1255. Yoshida, T., Okuda, T., Memon, U., Shingu, T., 1985. Tannins of Rosaceous Medicinal Plants. Part 2. Gemins A, B, and C, New Dimeric Ellagitannins from *Geum japonicum*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 0, 315 - 322.

1256. Yoshimo, K., Higashi, N., Koga, K., 2006. Antioxidant and antiinflammatory activities of oreano extract. J Health Sci. 52, 169-173.

1257. Yoshimori, A., Oyama, T., Takahashi, S., Abe, H., Kamiya, T., Abe, T., 2014. Structure-activity relationships of the thujaplicins for inhibition of human tyrosinase. Bioorganic Med Chem. 22 6193- 6200.

1258. You, A., Zhou, J., Song, S., Zhu, G., Song, H., Yi, W., 2015. Structure-based modification of 3-/4-aminoacetophenones giving a profound change of activity on

tyrosinase: From potent activators to highly efficient inhibitors. Eur J Med Chem. 93, 255-262.

1259. Young, M.F., 2003. Bone matrix proteins: more than markers. Calcif Tissue Int. 72, 2-4.

1260. Yu, N.H., Pei, H., Huang, Y.P., Li, Y.F., 2017. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits arsenic-induced inflammation and apoptosis through suppression of oxidative stress in mice. Cell. Physiol. Biochem. 41, 1788–1800.

1261. Yuan, Wang, J., Wu, W. Liu, Q., Liu, X., 2016. Effect of isoorientin on intracellular antioxidant defence mechanisms in hepatoma and liver cell lines. Biomed Pharmacother. 81, 356-362.

1262. Yuan, L., Wang, J., Xiao, H., Xiao, C., Wang, Y., Liu, X., 2012. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 265, 83 - 92.

1263. Yuan, L., Yu, D.M., Zhang, S.S., 2005. A New Stilbene from *Cercis chinensis* Bunge. J. Integr. Plant Biol. 47, 1021-1024.

1264. Yuk, H.J., Lee, J.W., Park, H.A., Kwon, O.K., Seo, K.H., Ahn, K.S., Oh, S.R., Ryu, H.W., 2017. Protective effects of coumestrol on lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the inhibition of proinflammatory mediators and NF-activation. J Funct Foods. 34, 181–188.

1265. Yuldashev, M.P., Malikov, V.M., Botirov, E., Yuldasheva, N.P., 1996. Flavonoids of *Psoralea drupaceae* and *Reseda luteola*. Chem. Nat. Compd. 32, 923–924.

1266. Yun, J.U., Woo, E.R., Lee, D.G., 2018. Effect of isoquercitrin on membrane dynamics and apoptosis-like death in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 1860, 357–363.

1267. Zaldivar, J., Ingram, L.O., 1999. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. Biotechnol Bioeng. 66, 203-210.

1268. Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., 2002. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: The Cache County Study. JAMA. 288, 2123–9.

1269. Zeng, H., Su, S., Xiang, X., Sha, X., Zhu, Z., Wang, Y., Guo, S., Yan, H., Qian, D, Duan, J., 2017. Comparative Analysis of the Major Chemical Constituents in Salvia miltiorrhiza Roots, Stems, Leaves and Flowers during Different Growth Periods by UPLC-TQ-MS/MS and HPLC-ELSD Methods. Molecules. 22, 771.

1270. Zha, L., Chen, J., Sun, S., Mao, L., Chu, X., Deng, H., Cai, J., Li, X., Liu, Z., Cao, W., 2014. Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF-kB pathway. PLoS One. 9, 1-9.

1271. Zhai, Y., Li, Y., Wang, Y., Cui, J., Feng, K., Kong, X., Chen, L., 2017. Psoralidin, a prenylated coumestan, as a novel anti-osteoporosis candidate to enhance bone formation of osteoblasts and decrease bone resorption of osteoclasts. Eur J Pharmacol. 801, 62-71.

1272. Zhai, Y.K., Niu, Y.B., Pan, Y.I., Mei, Q.B.2012. Comparative studies on the differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts by psoralen and isopsoralen *in vitro*. Chin.Pharm.Bull. 28, 355 - 361.

1273. Zhai, Y., Wang, Q., Li, Y., Cui, J., Feng, K., Kong, X., Xian, C.J., 2018. The higher osteoprotective activity of psoralidin in vivo than coumestrol is attributed by its presence of an isopentenyl group and through activated PI3K/Akt axis. Biomed Pharmacother. 102, 1015-1024.

1274. Zhang, B.L., Fan, C.Q., Dong, L., Wang, F.D., Yue, J.M., 2010. Structural modification of a specific antimicrobial lead against *Helicobacter pylori* discovered from traditional Chinese medicine and a structure-activity relationship study. Eur J Med Chem. 45, 5258 - 5264.

1275. Zhang, C., Wang, R., Zhang, G., Gong, D., 2018. Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase. Int J Biol Macromol. 112, 405-412.

1276. Zhang, C., Wang, Y.M., Zhao, F.C., Chen, L.M., Zhang, Q.W., Gao, H.M., Wang, Z.M., 2014. Phenolic Metabolites from the Stems and Leaves of *Sophora flavescens*. Helv.Chim.Acta. 97, 1516 - 1525.

1277. Zhang, H., Ta, N., 2017. Effect of isopsoralen on Smad7 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Exper.Ther.Med. 14, 1561 - 1567.

1278. Zhang, N.D., Han T., Huang, B.K., Rahman, K., Jiang, Y.P., Xu, H.T., Qin, L.P., Xin, H.L., Zhang, Q.Y., Li, Y., 2016. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: Implication for antiosteoporotic drug discovery. J.Ethnopharmacol. 189, 61 - 80.

1279. Zhang, Q., Zhang, F., Thakur, K., Wang, J., Wang, H., Hu, F., Zhang, J.G., Wei, Z.J., 2018. Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. Food. Chem. Toxicol. 112, 466-475.

1280. Zhang, S., Tang, X., Tian, J., Li, C., Zhang, G., Jiang, W., Zhang, Z., 2011. Cardioprotective effect of sulphonated formononetin on acute myocardial infarction in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 108, 390-395.

1281. Zhang, X., Hu, X., Hou, A., Wang, H., 2009. Inhibitory effect of 2,4,2′,4′-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. Biol. Pharm. Bull. 32, 86-90.

1282. Zhang, X., Zhao, W., Wang, Y., Lu, J., Chen, X., 2016. The Chemical Constituents and Bioactivities of *Psoralea corylifolia*Linn.: A Review. Am J Chin Med. 44, 35 – 60.

1283. Zhang, X.Q., Gu, H.M., Li, X.Z., Xu, Z.N., Chen, Y.S., Li, Y., 2013. Anti-Helicobacter pylori compounds from the ethanol extracts of *Geranium wilfordii*. J Ethnopharmacol. 147, 204 - 207.

1284. Zhang, Z., Yuan, W., Wang, P., Grant, G., Li, S., 2011. Flavonoids from *Lupinus texensis* and their free radical scavenging activity. Nat. Prod. Res. 25, 1641 - 1649.

1285. Zhang, Z., You, T., Zou, L., Wu, T., Wu, Y., Cui, L. Effect of Danshen root compound on blood lipid and bonebiomechanics in mice with hyperlipemia- induced osteoporosis. J. South. Med. University. 37, 1550–1553.

1286. Zhao L, Cai C, Wang J, Zhao L, Li W, Liu C, Guan H, Zhu, Y. and Xiao, J., 2017. Dihydromyricetin Protects against Bone Loss in Ovariectomized Mice by Suppressing Osteoclast Activity. Front. Pharmacol. 8, 928.

1287. Zhao, X.M., Guo, F.J., Li, Y.M., Zhu, D.Y, 2012. Two new lignans from *Celastrus flagellaris* Rupr. J Asian Nat Prod Res. 14, 159 - 164.

1288. Zhao, Y., Chen, M.X., Kongstad, K.T., Jäger, A.K., Staerk, D., 2017. Potential of Polygonum cuspidatum Root as an Antidiabetic Food: Dual High-Resolution α-Glucosidase and PTP1B Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS and NMR for Identification of Antidiabetic Constituents. J Agric Food Chem. 65, 4421–4427.

1289. Zhao, Z., Moghadasian, M.H., 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chem. 109, 691-02.

1290. Zhao-Ning, J., Zhao, W.Y., Liao, G.R., Choi, R.C., Lo, C.K., Dong, T.T., Tsim, K.W., 2006. *In vitro* estrogenic activity of formononetin by two bioassay systems. Gynecol.Endocrinol. 22, 578–584.

1291. Zheng, J., Zhang, R.J., Chen, Y.M., Ye, X., Chen, Q.X., Shen, D.U., Wang, Q., 2017. Synthesis of Caffeic Acid Ester Morpholines and Their Activation Effects on Tyrosinase. Process Biochem. 62, 91 – 98.

1292. Zheng, X.P., Cui, Q.F., Zhao, J.F., Yang, L.J., 2014. Zhang, H.B., Yang, X.D., Li, L. Three new phthalides from *Gnaphalium adnatum*. Helv. Chim. Acta. 97, 1638 - 1643.

1293. Zhou, B., Wan, C.X., 2015. Phenolic constituents from the aerial parts of *Glycyrrhiza inflata* and their antibacterial activities. J Asian Nat Prod Res. 17, 256 - 261.

1294. Zhou, B., Wan, C.X., 2016. Chemical constituents from aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*. Chin.Trad.Herbal Drugs. 47, 21 - 25.

1295. Zhou, Q., Lu, W., Niu, Y., Zhang, X., Gao, B., Akoh, C., Shi, H., Yu, L., 2013. Identification and Quantification of Phytochemical Composition and Anti-inflammatory, Cellular Antioxidant, and Radical Scavenging Activities of 12 *Plantago* Species. J. Agric. Food Chem., 61, 6693-6702.

1296. Zhou, Q.M., Peng, C., Yang, H., Liu, L.S,, Yang, Y.T., Xie, X.F., Guo, L., Liu, Z.H., Xiong, L.,. 2015. Steroids from the aerial parts of *Leonurus japonicus*. Phytochem.Lett. 12, 287-290.

1297. Zhou, T., Shun, M., Zhou, L., 2012. Formononetin could increase soluble-APPα secretion by up-regulating ADAM10 level. Mol.Neurodegener. 7, O10.

1298. Zhu, S.F., Yu, Y.B., Li, S., Wang, I.X., Zhou, Q.L., 2012. Enantioselective Hydrogenation of α-Substituted Acrylic Acids Catalyzed by Iridium Complexes with Chiral Spiro Aminophosphine Ligands. Angew. Chem. Int. Ed. 51, 8872–8875.

1299. Zobel, A.M., Brown, S.A., 1991. Dermatitis- inducing psoralens on the surfaces of seven medicinal plant species. J. Toxico. 10, 223-231.

1300. Zunft, H.J.F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H.J., Gruenwald, J., 2001. Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. AdV. Ther. 18, 230-236.

1301. Zunft, H.J.F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H.J., Koebnick, C., Grünwald, J., 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. Eur. J. Nutr. 42, 235-242.

1302. Καββαδάς, Δ., 1964. Εικονογραφημένον βοτανικόν, φυτολογικόν λεξικόν, Αθήνα

1303. Μιτάκης, Μ. Η ελληνική βιοποικιλότητα Ενας κρυμμένος θησαυρός, 2014. https://docplayer.gr/8330170-I-elliniki-viopoikilotita-enas-krymmenos-thisayros-manolis-mitakis-farmakopoios-antiproedros-ellinikis-etaireias-ethnofarmakologias.html (accessed 15 September 2017).

1304. Φιλότης. 1994. https://filotis.itia.ntua.gr/species/d/780/ (accessed 15 September 2017).

1305. Χατζηπαύλου, Α., Κοντάκης, Γ. 2006. Παθήσεις των οστών και των αρθρώσεων. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα.