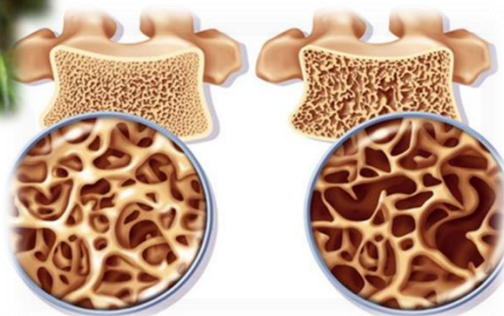


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Διδακτορική Διατριβή



**Διερεύνηση της επίδρασης φυσικών
προϊόντων, προερχόμενων από
φυτά της Ελληνικής χλωρίδας, στο
μεταβολισμό των οστών**



Μακροπούλου Μαρία

Φαρμακοποιός

ΑΘΗΝΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΜΗΤΑΚΟΥ (επιβλέπουσα)

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

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

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

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΜΗΤΑΚΟΥ (επιβλέπουσα)

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

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

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

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ-ΝΙΚΗ ΔΟΝΤΑ

Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής & Χειρουργικής Έρευνας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό &
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄ ΜΙΧΑΗΛ Ν. ΑΛΕΞΗΣ

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

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΩΤΕΙΝΗ ΛΑΜΑΡΗ

Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΡΩΞΑΝΗ ΤΕΝΤΑ

Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Σχολή
Επιστημών Υγείας & Αγωγής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή με τίτλο «Διερεύνηση της επίδρασης φυσικών προϊόντων, προερχόμενων από φυτά της Ελληνικής χλωρίδας, στο μεταβολισμό των οστών» έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



*Στο Γιάννη
το Νεκτάριο
και τους γονείς μου*

Ευχαριστίες

Η διδακτορική διατριβή με τίτλο «Διερεύνηση της επίδρασης φυσικών προϊόντων, προερχόμενων από φυτά της Ελληνικής χλωρίδας, στο μεταβολισμό των οστών» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών, στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων “Θ. Γαροφαλλίδης” του Π.Γ.Ν. “ΚΑΤ” και στο Εργαστήριο Μηχανικής Αντοχής του Ε.Μ.Π.

Η διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη των μελών της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, της Καθηγήτριας Σοφίας Μητάκου, του Καθηγητή Αλέξιου-Λέανδρου Σκαλτσούνη και της Καθηγήτριας Παρασκευής Μουτσάτσου, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου.

Επιστημονική υπεύθυνη του έργου ήταν η Καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τόσο για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε, όσο και για την επιστημονική καθοδήγηση και το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον της καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου, τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια Παρασκευή Μουτσάτσου, τον Ερευνητή Α’ Μιχαήλ Αλέξη, την Καθηγήτρια Ισμήνη Δοντά, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ρωξάνη Τέντα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φωτεινή Λάμαρη, οι οποίοι δέχθηκαν να κρίνουν την παρούσα διατριβή.

Ιδιαίτερω ευχαριστώ τον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη που με δέχθηκε στο εργαστήριο και με εμπιστεύτηκε στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ ολόψυχα τον Δρ. Μιχαήλ Αλέξη για την εμπιστοσύνη του, την επιστημονική καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και τη στήριξή του καθ’ όλη τη διάρκεια της διατριβής. Του είμαι ευγνώμων.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα Ισμήνη Δοντά για την αμέριστη βοήθειά της κατά την διάρκεια του *in vivo* πειράματος, τις εύστοχες συμβουλές και την άριστη συνεργασία.

Ιδιαίτερω ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για τη συμβολή του στη συγγραφή του Ερευνητικού Προγράμματος Ηράκλειτος II, καθώς και για το σχεδιασμό και την επιστημονική καθοδήγησή του καθ’ όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταύρο Κουρκουλή του Εργαστηρίου Μηχανικής Αντοχής του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και την καθοδήγησή του στην ολοκλήρωση της εμβιομηχανικής μελέτης.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη για τη συλλογή και ταυτοποίηση των φυτικών δρογών της παρούσας διατριβής, το φωτογραφικό υλικό και την πολύτιμη βοήθειά του, όποτε του ζητήθηκε.

Ευχαριστώ τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων του Π.Γ.Ν.Α. “ΚΑΤ”, Δρ. Παύλο Λελόβα για τη βοήθειά του στις μετρήσεις οστικής απορρόφησης και Δρ. Αντώνιο Γαλανό για τη συμβολή του στην επεξεργασία των στατιστικών αποτελεσμάτων, αλλά και για την άψογη συνεργασία τους.

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

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συνεργάτες και μεταπτυχιακούς φοιτητές όλων των εργαστηρίων για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία και ιδιαιτέρως τους φίλους μου Αργυρώ, Βάνα, Γιώργο, Εύα, Ελίζα, Γεωργία και Ντία για την απεριόριστη βοήθειά τους, την υπομονή, και την υποστήριξή τους.

Η πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς τη συμβολή της οικογένειάς μου. Θέλω από την καρδιά μου να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ιωάννη και Πηνελόπη, για όλα όσα με πολύ κόπο μου έχουν προσφέρει για να μπορώ κάθε φορά να φτάνω τους στόχους μου, όπως επίσης και την αδερφή μου Κατερίνα και τον Παναγιώτη για την κατανόηση, υποστήριξη και συμπαράστασή τους.

Το να ευχαριστήσω το σύζυγό μου Νεκτάριο είναι δύσκολο και λίγο για εμένα. Αποτελεί σημαντικό κομμάτι της ζωής μου και είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα με κατανόηση και υπομονή.

Φυσικά ευχαριστώ τον γιο μας Γιάννη, για την υπομονή που έδειξε όλο αυτό το διάστημα και γιατί η ύπαρξή του με γεμίζει δύναμη και θέληση για το καλύτερο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	1
Summary.....	5
Πρόλογος και σκοπός της εργασίας.....	7
A. Γενικό μέρος.....	1
1. Φυσιολογία των οστών.....	15
1.1. Δομικά χαρακτηριστικά των οστών - Οστίτης Ιστός.....	15
1.2. Οστεοβλάστες - Οστεοκλάστες.....	18
1.2.1. Φυσιολογία - Διαφοροποίηση Οστεοβλαστών.....	18
1.2.2. Λειτουργίες Οστεοβλαστών.....	20
1.2.3. Φυσιολογία - Διαφοροποίηση Οστεοκλαστών.....	20
1.2.4. Οστική απορρόφηση.....	22
1.3. Ανακατασκευή του Οστού (Bone Remodeling).....	23
1.3.1. Στάδια οστικής ανακατασκευής.....	24
2. Οστεοπόρωση – Θεραπεία.....	27
2.1. Ιστορική αναδρομή.....	27
2.2. Ορισμός της Οστεοπόρωσης.....	27
2.3. Αιτιολογία οστεοπόρωσης – παράγοντες κινδύνου.....	28
2.4. Διάγνωση.....	30
2.5. Θεραπευτική αγωγή.....	32
2.5.1. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	32
2.5.2. Εναλλακτικές θεραπείες - Φυτοοιστρογόνα.....	35
3. Περιγραφή του γένους <i>Iris</i>	38
3.1. Οικογένεια Iridaceae.....	38
3.1.1. Γένος <i>Iris</i>	39
3.1.2. Είδος <i>Iris germanica</i>	40

3.2. Δρογοϊστορία	41
3.3. Δρογοχημεία	43
3.3.1. Δευτερογενείς Μεταβολίτες του Γένους <i>Iris</i>	43
3.3.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες του είδους <i>Iris germanica</i>	48
3.4. Δρογοφαρμακολογία	51
3.4.1. Φαρμακολογικές και Βιολογικές δράσεις του <i>Iris germanica</i>	51
3.4.2. Δράσεις και Χρήσεις στη Λαϊκή Θεραπευτική του <i>Iris germanica</i>	52
B. Ειδικό μέρος	53
1. Υλικά και Μέθοδοι	57
1.1. Φυτοχημική επεξεργασία	57
1.1.1. Συλλογή φυτικού υλικού.....	57
1.1.2. Τεχνικές εκχύλισης.....	57
1.1.2.1. Εκχύλιση φυτικού υλικού με τη χρήση συσκευής επιταχυνόμενης εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction-ASE 300).....	57
1.1.2.2. Εκχύλιση μεγάλης κλίμακας	58
1.1.3. Χρωματογραφικές τεχνικές.....	59
1.1.3.1. Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography – Analytical TLC) 59	
1.1.3.2. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography – Preparative TLC).....	60
1.1.3.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (High Performance Preparative Thin Layer Chromatography - HPTLC).....	60
1.1.3.4. Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (LC)	62
1.1.3.5. Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20)	62
1.1.3.6. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	62
1.1.3.7. Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC).....	64
1.1.4. Φασματοσκοπικές τεχνικές	68
1.1.4.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	68
1.1.4.2. Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (LC-MS)	69

1.2. <i>In vitro</i> πειραματική διαδικασία	70
1.2.1. Υλικά.....	70
1.2.2. Ειδικές επεξεργασίες υλικών	71
1.2.2.1. Επεξεργασία ορού έμβριου βοός (FBS) για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών	71
1.2.2.2. Θερμική κατεργασία ορού έμβριου βοός (FBS)	71
1.2.3. Κυτταρικές σειρές	71
1.2.4. Χειρισμοί κυττάρων	72
1.2.4.1. Καλλιέργεια κυττάρων	72
1.2.4.2. Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7	73
1.2.4.3. Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa	74
1.2.4.4. Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα MC3T3-E1	77
1.2.4.5. Προσδιορισμός της απόθεσης φωσφορικού ασβεστίου στα κύτταρα MC3T3-E1.....	78
1.2.4.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των οστεοκλαστών μέσω της έκφρασης της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP)	79
1.2.4.7. Προσδιορισμός της επαγωγής της οστεοκλαστογένεσης με χρώση της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP)	80
1.3. <i>In vivo</i> πειραματική επεξεργασία	82
1.3.1. Ζωικά πρότυπα: στέγαση και ομάδες.....	82
1.3.2. Μέτρηση οστικής πυκνότητας	83
1.3.3. Ωθηκεκτομή	84
1.3.4. Χορήγηση φαρμακευτικής παρέμβασης	84
1.3.5. Ευθανασία, συλλογή οργάνων	84
1.3.6. Μετρήσεις περιφερική Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT).....	85
1.3.7. Δοκιμές μηχανικής αντοχής των οστών	86
1.4. Στατιστική ανάλυση	88
2. Επιλογή και παρασκευή εκχυλισμάτων.....	89
2.1. Επιλογή φυτικών δρογών	89
2.2. Παρασκευή εκχυλισμάτων.....	106

2.3. Παρασκευή εκχυλισμάτων σε μεγάλη κλίμακα.....	113
3. Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων	114
4. Προκαταρκτική <i>in vitro</i> αξιολόγηση φυτικών εκχυλισμάτων	145
4.1. Προκαταρκτικός έλεγχος της οιστρογόνου / αντιοιστρογόνου δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων	145
4.1.1. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά Ishikawa	146
4.1.2. Προσδιορισμός της αντιοιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά Ishikawa	153
4.1.3. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά MCF-7	159
4.1.4. Προσδιορισμός της αντιοιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά MCF-7.....	162
4.2. Προσδιορισμός της οστεοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων	166
4.2.1. Προκαταρκτική αξιολόγηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1..	167
4.3. Περαιτέρω διερεύνηση της οστεοπροστατευτικής δράσης των επιλεγμένων εκχυλισμάτων	183
4.3.1. Προσδιορισμός της ικανότητας των εκχυλισμάτων του γένους <i>Iris</i> να προκαλούν επιμετάλλωση στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1	183
4.3.2. Προσδιορισμός της ικανότητας των εκχυλισμάτων του γένους <i>Iris</i> να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση	186
5. Φυτοχημική μελέτη των ριζών του <i>Iris germanica</i>	192
5.1. Συλλογή φυτικού υλικού.....	192
5.2. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων	192
5.3. Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του <i>Iris germanica</i>	193
5.3.1. Κλασμάτωση με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC1, C1)	193
5.3.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών από κλάσματα του εκχυλίσματος IGE	197
5.3.2.1. Μελέτη του κλάσματος 6-9 από το FCPC-1 (C1F2)	197
5.3.2.2. Μελέτη των κλασμάτων 10-11 και 12-16 του FCPC-1 (C1F3, C1F4)	205
5.3.2.3. Μελέτη του κλάσματος 93-96 του FCPC-1 (C1F16)	213
5.3.2.4. Μελέτη του κλάσματος 97-99 του FCPC-1 (C1F17)	230
5.3.2.5. Μελέτη του κλάσματος 100-110 του FCPC-1 (C1F18)	232
5.3.2.6. Μελέτη του κλάσματος 149-150 του FCPC-1 (C1F26)	244
5.3.2.7. Μελέτη του κλάσματος 152-160 του FCPC-1 (C1F27)	257

5.3.2.8.	Μελέτη του κλάσματος 129-133 του FCPC-1 (C1F23)	273
5.3.2.9.	Μελέτη του κλάσματος 85-92 του FCPC-1 (C1F15)	277
5.3.2.10.	Μελέτη του κλάσματος 34-42 του FCPC-1 (C1F8)	281
5.4.	Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του <i>Iris germanica</i>	283
5.4.1.	Κλασμάτωση με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC2, C2)	283
5.4.2.	Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών από κλάσματα του εκχυλίσματος IGM.....	286
5.4.2.1.	Μελέτη των κλασμάτων 25-30 του FCPC-2 (C2F7- C2F9)	286
5.4.2.2.	Μελέτη των κλασμάτων 49-52 του FCPC-2 (C2F16- C2F17)	290
5.4.2.3.	Μελέτη των κλασμάτων 56-59 του FCPC-2 (C2F19)	294
5.4.2.4.	Μελέτη των κλασμάτων 62-66 του FCPC-2 (C2F22)	302
5.4.2.5.	Μελέτη των κλασμάτων 69-72 του FCPC-2 (C2F24)	306
5.4.2.6.	Μελέτη των κλασμάτων 73-80 του FCPC-2 (C2F25)	311
5.4.2.7.	Μελέτη των κλασμάτων 84-89 του FCPC-2 (C2F28)	312
5.4.2.8.	Μελέτη του κλάσματος 95 του FCPC-2 (C2F32).....	329
6.	<i>In vitro</i> βιολογική αξιολόγηση των 2 ^ο γενών μεταβολιτών του είδους <i>Iris germanica</i>	337
6.1.	Αξιολόγηση της επίδρασης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του <i>Iris germanica</i> στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση	337
6.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του <i>Iris germanica</i> στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης	340
6.3.	Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του <i>Iris germanica</i> στην κυτταρική σειρά Ishikawa	343
6.4.	Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του <i>Iris germanica</i> στην κυτταρική σειρά MCF-7.....	345
7.	Παρασκευή και <i>in vivo</i> αξιολόγηση μεθανολικού εκχυλίσματος ριζών του <i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> σε πειραματικό πρότυπο θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμουσ	357
7.1.	Παρασκευή του εκχυλίσματος των ριζών του <i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (IUCM)	357
7.2.	Προσδιορισμός οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry).....	358
7.2.1.	Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας	358
7.2.2.	Ποσοστιαίες αλλαγές της οστικής πυκνότητας	361

7.3. Προσδιορισμός οστικών παραμέτρων με χρήση Περιφερικής Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT, Peripheral Quantitative Computerized Tomography).....	365
7.4. Εμβιομηχανικές παράμετροι – Κάμψη τριών σημείων	369
7.4.1. Υπολογισμός δύναμης θραύσεως – δαπανηθείσας ενέργειας - στιβαρότητας	369
7.4.2. Υπολογισμός τάσης θραύσης (σ)	373
7.5. Σωματικά βάρη – Βάρη οργάνων.....	381
Συμπεράσματα-Προοπτικές	385
Παράρτημα Εικόνων.....	393
Παράρτημα Πινάκων	405
Συντομογραφίες	413
Βιβλιογραφία.....	421

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η φυτοχημική ανάλυση και φαρμακολογική μελέτη εκχυλισμάτων και απομονωμένων ενώσεων, προερχόμενων από φυτά της ελληνικής χλωρίδας, με σκοπό την ανακάλυψη φυσικών προϊόντων με ευεργετικές επιπτώσεις στην οστεοπόρωση. Οι βασικοί άξονες επιλογής των εμπλεκόμενων φυτικών ειδών ήταν: α) η αξιολόγηση πληροφοριών οι οποίες ανευρέθησαν σε κείμενα των Αρχαίων Ελλήνων συγγραφέων-θεραπευτών (Διοσκουρίδης, Ιπποκράτης, Θεόφραστος κ.ά.), β) η μελέτη σύγχρονων βιβλιογραφικών δεδομένων, τα οποία αναζητήθηκαν τόσο σε συγγράμματα παραδοσιακής θεραπευτικής, όσο και σε εργασίες δημοσιευμένες σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και γ) η αξιοποίηση δεδομένων τα οποία σχετίζονται με φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας και αναφέρονται στην περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, τον ενδημισμό τους, την σπανιότητα, τον κίνδυνο εξαφάνισης τους κ.ά.

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των προαναφερόμενων πληροφοριών και σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα επιλέχθηκαν 85 φυτικές δρόγες, οι οποίες μετά τη συλλογή και την ξήρανσή τους εκχυλίστηκαν κυρίως με τις τεχνικές της επιταχυνόμενης εκχύλισης και της υποβοηθούμενης με υπερήχους εκχύλισης. Έτσι, παρασκευάστηκαν 169 φυτικά εκχυλίσματα, τα οποία αξιολογήθηκαν αρχικά ως προς το χημικό τους περιεχόμενο, με τη χρήση των τεχνικών της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Βασιζόμενοι στο φυτοχημικό προφίλ των παραγόμενων εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν τα πλέον ενδιαφέροντα για να αξιολογηθούν ως προς την οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο και οστεοπροστατευτική δραστηρότητά τους. Ο έλεγχος της οιστρογόνου / αντιοιστρογόνου δράσης των επιλεγμένων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου (Ishikawa), τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση, υπό την επίδραση οιστρογόνων ουσιών. Τα εκχυλίσματα που παρουσίασαν καλή οιστρογόνο ή/και αντιοιστρογόνο δράση στην προαναφερόμενη κυτταρική σειρά ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητάς τους να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7). Οι κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7 χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ανεύρεση ενώσεων με οιστρογονικές / αντιοιστρογονικές

ιδιότητες και αποτελούν ένα πολύ αξιόπιστο μοντέλο, μιας και θεωρείται ότι αναπαριστούν *in vitro* την απόκριση σε οιστρογόνα και αντιοιστρογόνα των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας και του μαστού, αντίστοιχα.

Για τον προσδιορισμό των οστεοπροστατευτικών ιδιοτήτων των παρασκευασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν πρώιμα οστεοβλαστικά κύτταρα (MC3T3-E1) ικανά να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες. Η διαφοροποίηση σε ώριμους οστεοβλάστες τεκμηριώθηκε με τη μέτρηση της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, ενζύμου το οποίο παράγεται και εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες στο αρχικό στάδιο ωρίμανσής τους.

Τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων ελέγχων ανέδειξαν μια σειρά εκχυλισμάτων ως πιθανούς οστεοπροστατευτικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων το εκχύλισμα EtOAc και το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Iris germanica* (οικ. Iridaceae) επέδειξαν όχι μόνο αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, αλλά και αξιοσημείωτο φυτοχημικό προφίλ. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών (φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας) επιτεύχθηκε ο εντοπισμός 26 δευτερογενών μεταβολιτών. Με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών (1D και 2D NMR, HRMS) πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και ο πλήρης χαρακτηρισμός των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών 23 απομονωμένων ενώσεων, οι οποίες ανήκουν στις κατηγορίες των ιριδαλών, ισοφλαβονοειδών, ακετοφαινονών, βενζοφαινονών και ξανθονών.

Οι απομονωμένοι μεταβολίτες αξιολογήθηκαν ως δυνητικά οστεοπροστατευτικοί παράγοντες μέσω προσδιορισμού της ικανότητά τους να επάγουν τη διαφοροποίηση πρώιμων οστεοβλαστών (προ-οστεοβλαστικά κύτταρα MC3T3-E1) ή/και να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση μακροφάγων κυττάρων σε οστεοκλαστών (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 και εντοπίστηκαν οι ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις αξιόλογες ιδιότητες των αρχικών φυτικών παρασκευασμάτων.

Ωστόσο, δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες και των άλλων ειδών του γένους *Iris*, τα οποία μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσης μελέτης και επέδειξαν οστεοπροστατευτικές ιδιότητες. Επομένως, κρίθηκε σκόπιμη η *in vivo* αξιολόγηση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του είδους *Iris unguicularis* subsp.

cretensis ως προς την επίδρασή του στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας σε μοντέλο θήλεος ωοθηκεκτομημένου επίμυος (μοντέλο οστεοπόρωσης). Η επιλογή του συγκεκριμένου εκχυλίσματος βασίσθηκε κυρίως στο γεγονός ότι υπήρχε διαθέσιμη η απαιτούμενη ποσότητα φυτικού υλικού για την παρασκευή του εκχυλίσματος, παρόλο που το φυτό *I. unguicularis* subsp. *cretensis* αποτελεί ενδημικό είδος της ελληνικής χλωρίδας. Η πειραματική διαδικασία διήρκεσε έξι μήνες και προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα της αριστερής κνήμης των πειραματοζώων με τη μέθοδο DEXA κατά την έναρξη του πειράματος, καθώς και τον 3^ο και 6^ο μήνα. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιούνταν μετρήσεις του βάρους των επίμυων και κατά τη ευθανασία, προσδιορίστηκε το βάρος των ζωτικών τους οργάνων. Επιπρόσθετα, τα μηριαία οστά υποβλήθηκαν σε *ex vivo* δοκιμασία καταπόνησης τριών σημείων, για να προσδιοριστεί η ανθεκτικότητα των οστών και οι δεξιές κνήμες σε τοπογραφικές μετρήσεις με τη μέθοδο pQCT για τον προσδιορισμό της γεωμετρίας και της ποιότητάς τους.

Summary

The purpose of this thesis was the phytochemical analysis and pharmacological study of extracts and isolated compounds derived from plants of the Greek flora, in order to discover natural products with beneficial effects in osteoporosis. The main selection criteria of the plants involved were: a) the evaluation of information found in scripts of Ancient Greek authors-therapists (Dioscorides, Hippocrates, Theophrastos etc), b) the study of current bibliographical data which were searched both in ethnopharmacological scripts as well as in manuscripts published in international scientific journals and c) the use of data correlated with plants of the Greek flora and refer to their morphological characteristics, endemism, rareness etc.

Taking into account the results of the evaluation of the aforementioned information and scientific data, 85 plant material, which after their harvesting and drying were extracted mainly with accelerated extraction and ultrasound extraction methods. Therefore 169 plant extracts were prepared and initially evaluated as to their chemical composition with the use of methods such as high performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

Based on the extract phytochemical profile, the most interesting were selected for evaluation of their estrogen/antiestrogen and osteoprotective activity. The estrogen/antiestrogen activity was evaluated against human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa) which have the ability to produce alkaline phosphatase activity under the influence of estrogens. The extracts which showed significant estrogen and/or anti-estrogen activity in the aforementioned cell line were tested for their ability to affect the proliferation and viability of human breast adenocarcinoma cells (MCF-7). The Ishikawa and MCF-7 cell lines are used for the recognition of compounds with estrogen/antiestrogen properties and are a very credible model and it is thought that they represent *in vitro* the response to estrogen and antiestrogen of cancer epithelial cells of the uterus and breast respectively.

For the determination of the osteoprotective properties of the extracts we used pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) capable of differentiating to mature osteoblasts, which has been documented by measurement of alkaline phosphatase expression. Alkaline phosphatase is an enzyme which is produced and secreted by osteoblasts in their initial maturation phase. The results of the assays showed a series of extracts as potential osteoprotective agents, which involve the

EtOAc and methanolic extract of the roots of the species *Iris germanica* (Iridaceae). Subsequently using various chromatographic techniques we isolated 26 secondary metabolites which have been identified through spectral techniques (1D and 2D NMR, HRMS). These compounds belong to the chemical categories of iridal, isoflavonoids, acetophenones, benzophenones and xanthones.

The isolated metabolites has been evaluated as potential osteoprotective agents 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 estrogenicity was also determined through the promotion of alkaline phosphatase expression in Ishikawa cells as well as proliferation of MCF-7.

Furthermore these compounds are also found in other species of *Iris* genus which have been also studied in this thesis and they showed potential osteoprotective activity. So, we decided to evaluate *in vivo* the methanolic extract of the roots of *Iris unguicularis* subsp. *cretensis*, on bone mass loss of the ovariectomized (OVX) rat experimental model of osteoporosis. The selection of this extract was based on the fact that there was a sufficient amount of the plant for the production of the extract although that, the plant *I. unguicularis* subsp. *cretensis* is an endemic Greek plant. The experimental procedures lasted for six months as the determination of bone mineral density of the left tibia of the experimental animals through DEXA method was done at the beginning as well as at the third and sixth month. For the duration of the experiment the body weight of rats was measured and at the point of euthanasia the weight of their vital organs, also. In addition the femurs were subjected to *ex vivo* three point bending test, in order to determine the mechanical properties and the strength of bones and the right tibia in topographical measurements with pQCT method for the determination of their geometry and quality.

Πρόλογος και σκοπός της εργασίας

Η οστεοπόρωση είναι μια συστηματική πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη οστική πυκνότητα και αλλοίωση της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων λόγω της ευθραυστότητάς τους. Οστεοπόρωση εμφανίζεται ιδιαίτερα στη γεροντική ηλικία και οφείλει την εμφάνισή της στην διατάραξη της ισορροπίας στη διαδοχική δραστηριοποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Μολονότι δεν είναι ακριβώς γνωστά τα αίτια που προκαλούν αυτή τη διαταραχή, η πρόωρη ωοθηκεκτομή και η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση αποτελούν τις συχνότερες μορφές πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης.

Σήμερα, η οστεοπόρωση θεωρείται ως μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου σε προχωρημένες ηλικίες. Η πάθηση αυτή είναι πολύ συχνή στις ανεπτυγμένες χώρες του Δυτικού κόσμου και πλήττει ειδικότερα τις γυναίκες. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην Ευρώπη 30 εκατομμύρια γυναικών και 3 εκατομμύρια αντρών πάσχουν από οστεοπόρωση, με αυξανόμενη συχνότητα στις γυναίκες άνω των 50 ετών. Εκτιμάται ότι το 25% έως 60% των γυναικών άνω των 60 ετών θα αντιμετωπίσει τουλάχιστον ένα περιστατικό κατάγματος στη σπονδυλική στήλη. Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες συμβαίνουν περίπου 500.000 κατάγματα σπονδυλικής στήλης, 300.000 κατάγματα ισχιακού οστού, 200.000 κατάγματα του πήχη του χεριού και 300.000 κατάγματα άλλων οστών. Σε ποσοστό 14-36% των ηλικιωμένων ατόμων που πεθαίνουν κάθε χρόνο, το αίτιο είναι κάποια μορφή κατάγματος κυρίως της λεκάνης. Αν ταυτόχρονα με τα προηγούμενα ληφθεί υπόψη και το γεγονός ότι στη σημερινή εποχή, σύμφωνα με το μέσο όρο ζωής, η γυναίκα διανύει το ένα τρίτο της ζωής της μετά την εμμηνόπαυση γίνεται φανερό το μέγεθος του προβλήματος. Μάλιστα, το κόστος της θεραπείας των ασθενών με οστεοπορωτικά κατάγματα επιφέρει μια σημαντική οικονομική επιβάρυνση στα συστήματα υγείας της κάθε χώρας, προκειμένου να καλυφθεί το αυξημένο κόστος της περίθαλψης και της αποκατάστασης των ασθενών αυτών.

Δεδομένης της κατάστασης γίνονται προσπάθειες διεθνώς, για την ενημέρωση των ασθενών σχετικά με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τους παράγοντες διατροφής που επηρεάζουν τα οστά, ενώ συγχρόνως διενεργούνται ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπευτικών μέσων με σκοπό την βελτίωση της υγείας του σκελετού.

Όσον αφορά στη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, χορηγούνται συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D, σε συνδυασμό με διφωσφονικά φάρμακα ή με εκλεκτικούς ρυθμιστές των υποδοχέων των οιστρογόνων (SERMs). Μολονότι η οιστρογονική υποκατάσταση είναι αποτελεσματική στην θεραπεία της οστεοπόρωσης, δε χρήζει γενικότερης αποδοχής επειδή συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες, όπως η υπερπλασία του ενδομητρίου και η αυξανόμενη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Έτσι, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανεύρεση εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων και νέων προϊόντων με σκοπό την πρόληψη και θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης.

Μία σύγχρονη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου σχετίζεται με την ανακάλυψη διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων και προϊόντων φυσικής προέλευσης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να μιμούνται το ρόλο των οιστρογόνων και είναι γνωστά ως “φυτο-οιστρογόνα”. Τα ισοφλαβονοειδή, τα κουμεστάνια και τα λιγνάνια αποτελούν τις κυριότερες κατηγορίες φυτοοιστρογόνων. Φυτά τα οποία είναι πλούσιες πηγές των προϊόντων αυτών θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και αντιμετώπιση διαταραχών και δυσλειτουργιών του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου.

Η μεγάλη πλειοψηφία των ανθρώπων του πλανήτη μας εξακολουθούν να στηρίζονται στην παραδοσιακή τους θεραπευτική “Materia medica” (φαρμακευτικά φυτά και άλλα υλικά) για τις ανάγκες της καθημερινής ιατρικής φροντίδας τους. Οι Κινέζοι και γενικότερα οι λαοί της Ασίας, έχουν παράδοση χιλιάδων ετών στη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (δρoγών) για τη θεραπεία διαφόρων γυναικολογικών διαταραχών και της οστεοπόρωσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε μερικές περιπτώσεις η θεραπευτική δράση των φυτών της λαϊκής θεραπευτικής έχει επιβεβαιωθεί με σύγχρονες μελέτες. Για παράδειγμα το ρίζωμα “*Drynariae*” είναι ένα παραδοσιακό κορεάτικο σκεύασμα, το οποίο απαντάται ως ένα από τα κύρια συστατικά σε διάφορες συνταγές αντιμετώπισης οστικών βλαβών. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το υδατικό εκχύλισμα των ριζών του φυτού *Drynaria fortunei* (οικ. Polipodiaceae) προάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Επίσης, η φυτοχημική ανάλυση του έδειξε ότι η δρόγη αυτή είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα, τα οποία κατέχουν σημαντική οιστρογονική δράση.

Η μεγάλη στροφή της επιστημονικής κοινότητας προς την ανάπτυξη φυτοθεραπευτικών προϊόντων για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης φαίνεται από το γεγονός ότι στο “Science

direct”, το οποίο αποτελεί μία από τις πιο ενημερωμένες επιστημονικές βάσεις δεδομένων, βρέθηκαν 450 αναφορές σχετικές με τους όρους “Plant extract” και “Osteoporosis”. Μεταξύ των 100 σημαντικότερων περιλαμβάνονται αναφορές τόσο σε δρόγες οι οποίες είναι γνωστές για τις οιστρογονικές ιδιότητές τους [π.χ. η σόγια και το ρίζωμα του φυτού *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh)], όσο και σε φυτά τα οποία, αν και δεν είναι γνωστά για ανάλογες δράσεις, φέρουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των κλασικών φυτοοιστρογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το είδος *Astragalus membranaceus* (οικ. Fabaceae), το οποίο περιέχει ισοφλαβονοειδή και έχει αποδειχτεί ότι εμποδίζει την ελάττωση της οστικής μάζας σε επίμυες που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή. Επίσης, ένα γεγονός που αναδεικνύει το σημαντικό ερευνητικό, επιστημονικό, κοινωνικό και οικονομικό ενδιαφέρον για το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι ότι για την ανακάλυψη φυτικών εκχυλισμάτων με αντι-οστεοπορωτική δράση υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία περισσότερα από 25 διεθνή διπλώματα ευρεσιτεχνίας, τα οποία έχουν κατατεθεί την τελευταία δεκαετία (πηγή SciFinder). Μολονότι αρκετά από αυτά αφορούν δρόγες για τις οποίες υπάρχουν σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές (π.χ. *Allium sativum*, οικ. Alliaceae), σε άλλες αναφέρονται εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης, για τα οποία δεν είναι γνωστός ο οιστρογονικός ή/και ο οστεοπροστατευτικός τους χαρακτήρας (*Pinus pinea*, οικ. Pinaceae).

Παρότι η Ελλάδα είναι ένα από τα μεγαλύτερα κέντρα πλούσιας χλωριδικής ποικιλότητας “hot spot” του πλανήτη, ελάχιστες είναι οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που συσχετίζουν φυτά της ελληνικής χλωρίδας με την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Η Ελλάδα, αναλογικά με το μέγεθός της, έχει 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 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. Η μεγάλη αυτή χλωριδική ποικιλότητα αναμένεται να εκφραστεί σε επίπεδο δευτερογενών μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές δράσεις.

Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής προσπάθειας μελετήθηκαν τόσο ως προς την χημική τους σύσταση, όσο και ως προς τη βιολογική τους δράση φυτά της ελληνικής χλωρίδας για τα οποία υπάρχουν δεδομένα (αναφορές σε κείμενα αρχαίων Ελλήνων θεραπευτών, δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά, συγγράμματα παραδοσιακής θεραπευτικής κ.ά.) για την πιθανή ευεργετική επίδρασή τους στην οστεοπόρωση. Τα 71 επιλεγμένα φυτικά είδη είτε υπήρχαν στη

φυτικής συλλογή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, είτε συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ετών της διατριβής. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα (οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης) κυρίως με τη χρήση της συσκευής ASE (Accelerated Solvent Extractor), η οποία επέτρεψε την παρασκευή μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων (169) σε σύντομο χρονικό διάστημα, με χαμηλό κόστος και μεγάλη επαναληψιμότητα. Τα παραχθέντα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ποιοτικά ως προς το χημικό τους περιεχόμενο με σύγχρονες χρωματογραφικές τεχνικές HPTLC και HPLC-DAD. Από την αξιολόγηση των βιβλιογραφικών και χρωματογραφικών δεδομένων επιλέχθηκαν 94 εκχυλίσματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε ο πρωταρχικός έλεγχος της οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο και οστεοβλαστικής ικανότητάς τους. Τα παρασκευάσματα, τα οποία παρουσίασαν αξιόλογη δραστηριότητα στους προαναφερόμενους βιολογικούς ελέγχους, αξιολογήθηκαν περαιτέρω ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στην ισορροπία οστεοβλαστικής/οστεοκλαστικής δραστηριότητας στις κυτταρικές σειρές προ-οστεοβλαστικών κυττάρων (MC3T3-E1) και μακροφάγων (RAW264.7).

Τα δύο εκχυλίσματα που προήλθαν από το ρίζωμα του φυτού *Iris germanica* (οικ. Iridaceae) μελετήθηκαν περαιτέρω προκειμένου να απομονωθούν τα κυριότερα συστατικά τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από χρωματογραφικές τεχνικές (υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης (LC), φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC), παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Απομονώθηκαν 23 μεταβολίτες, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με βάση τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα (NMR και MS) και αξιολογήθηκαν ως προς την οιστρογονική τους δράση και την επίδρασή τους στις κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και οστεοκλαστών.

Τέλος, το μεθανολικό εκχύλισμα του ριζώματος του είδους *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* αξιολογήθηκε *in vivo* ως προς τη πιθανή ευεργετική του επίδραση έναντι της προκαλούμενης οστικής απώλειας σε πειραματικό μοντέλο οστεοπόρωσης.

Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο, είναι η πρώτη φορά που γίνεται μια τέτοια συστηματική προσπάθεια συλλογής και αξιολόγησης πληροφοριών, οι οποίες είτε προέρχονται από σύγχρονες ερευνητικές ανακαλύψεις, είτε από αναφορές σε αρχαία κείμενα και τη λαϊκή θεραπευτική. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη συλλογή των πληροφοριών, οι οποίες περιέχονται σε κείμενα των Αρχαίων Ελλήνων συγγραφέων – θεραπευτών (Thesaurus Linguae Graecae's Musaios: a Digital Library of Greek Literature) και σχετίζονται με τη χρήση δρογών για την

αντιμετώπιση διαφόρων γυναικολογικών διαταραχών και φυσικά της οστεοπόρωσης. Επίσης, στο συγκεκριμένο γνωστικό αντικείμενο επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η επιβεβαίωση πληροφοριών της ελληνικής λαϊκής θεραπευτικής με σύγχρονες επιστημονικές μελέτες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρασκευή ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού φυτικών εκχυλισμάτων που έλαβε χώρα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής οδήγησε στη δημιουργία μιας συλλογής εκχυλισμάτων, τα οποία θα είναι δυνατόν να ελεγχθούν μελλοντικά και σε άλλους βιολογικούς στόχους.

Ωστόσο, απώτερος στόχος της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας ήταν ο σχετικά μεγάλος αριθμός των δρογών που επιλέχθηκαν αρχικά, σε συνδυασμό με την συστηματική προσπάθεια καταγραφής και αξιολόγησης των πληροφοριών, να συντελέσουν στην ανάδειξη του σπουδαίου ρόλου που μπορεί να διαδραματίσει η ελληνική χλωρίδα στη θεραπεία της οστεοπόρωσης.

Με σκοπό και την επίτευξη των προαναφερόμενων στόχων, οι προβλεπόμενες διεργασίες συμπεριλήφθηκαν στις ακόλουθες ενότητες εργασίας:

- Επιλογή φυτικών ειδών, παρασκευή εκχυλισμάτων και πρωταρχικός χρωματογραφικός έλεγχος
- Προκαταρκτικός έλεγχος – αποτίμηση (screening) της οιστρογόνου / αντιοιστρογόνου, κυτταροστατικής και οστεοβλαστογενετική δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων
- Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων εκχυλισμάτων και απομονωμένων ενώσεων να ρυθμίζουν τη δυναμική ισορροπία οστεοβλαστών-οστεοκλαστών
- Απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών των πιο δραστικών εκχυλισμάτων
- Έλεγχος της οιστρογόνου και οστεοπροστατευτικής ικανότητας των απομονωμένων 2^ο γενών μεταβολιτών
- *In vivo* εκτίμηση της επίδρασης του επιλεγμένου εκχυλίσματος στην οστική πυκνότητα, γεωμετρία και ανθεκτικότητα των οστών ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων
- Επεξεργασία των αποτελεσμάτων και συγγραφή της διδακτορικής διατριβής

Α. Γενικό μέρος

1. Φυσιολογία των οστών

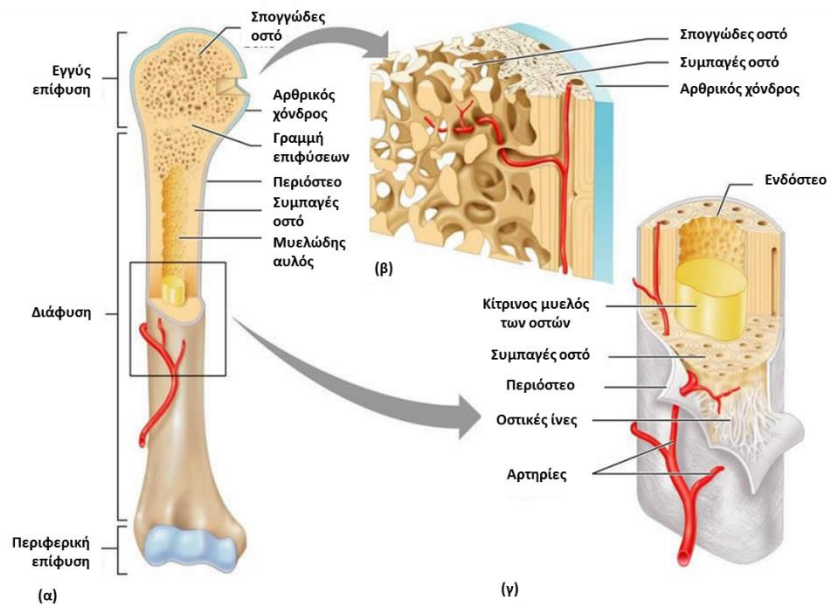
1.1. Δομικά χαρακτηριστικά των οστών - Οστίτης Ιστός

Τα οστά αποτελούν ένα δυναμικό ιστό που υφίσταται συνεχή αναδιαμόρφωση, ώστε να διατηρεί ένα υγιή και λειτουργικό σκελετό ικανό να επιτελεί όλες τις ζωτικής σημασίας λειτουργίες του. Το σκελετικό ή ερειστικό σύστημα εξασφαλίζει την κίνηση και στήριξη του σώματος, σε συνεργασία με τους μυς και τις αρθρώσεις, προστατεύει τα ζωτικά όργανα, με τη δημιουργία οστέινων κοιλοτήτων, αποτελεί την έδρα της αιμοποίησης και ενεργεί ως μεταβολικό όργανο στη ρύθμιση της ομοιόστασης ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου [1].

Όλα τα οστά αποτελούνται από κύτταρα με εξειδικευμένες λειτουργίες, επιμεταλλωμένες και μη επιμεταλλωμένες επιφάνειες συνδετικού ιστού και από χώρους στους οποίους εντοπίζονται η κοιλότητα του μυελού των οστών, οι κοιλότητες των αγγείων και των νεύρων και τα οστικά βοθρία, ενώ η λειτουργική προσαρμογή των οστών πραγματοποιείται μέσω της μορφολογικής και μηχανικής ανομοιογένειάς τους. Ανάλογα με τη μορφολογία τους, τα οστά διακρίνονται σε βραχέα, μακρά και σε πλατιά. Τα βραχέα οστά έχουν κυβικό σχήμα, είναι μικρά με πολλές αρθρικές επιφάνειες και εντοπίζονται κυρίως στον καρπό και τον ταρσό, ενώ τα πλατιά οστά λόγω της μορφολογίας τους συμμετέχουν στον σχηματισμό των κοιλοτήτων του σώματος. Τα μακρά οστά αποτελούνται στα δύο άκρα τους από τις επιφύσεις, στο εσωτερικό των οποίων εντοπίζονται οι διαπλεκόμενες κοιλότητες (σπογγώδες οστό) και στο κέντρο από τη διάφυση, η οποία δεν φέρει κοιλότητες και αποτελεί το συμπαγές τμήμα (φλοιώδες οστό) των οστών.

Το φλοιώδες οστό αποτελείται από ασβεστοποιημένες στιβάδες κολλαγόνου, έχει κυρίως προστατευτικό ρόλο, είναι απαραίτητο για τη μηχανική λειτουργία του σκελετού και εντοπίζεται τόσο στα οστά των άκρων, όσο και στους σπονδύλους. Το σπογγώδες τμήμα των οστών εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό σκελετό και στα σώματα των σπονδύλων και διαφέρει από το φλοιώδες τόσο στο ποσοστό πορωτικότητάς του, όσο και στη μηχανική του συμπεριφορά. Αν και το σπογγώδες οστό είναι λιγότερο ανθεκτικό στις μηχανικές καταπονήσεις σε σχέση με το φλοιώδες, παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα παραμόρφωσης και ελαστικότητας και είναι εκείνο στο οποίο εκτελείται η πλειονότητα των μεταβολικών λειτουργιών των οστών. Αποτελεί την κύρια περιοχή ανακατασκευής των οστών, χάριν της μεγάλης επιφάνειάς του, αλλά και της στενής

σύνδεσή του με το μυελό των οστών, περιοχή όπου παράγονται και εκκρίνονται ρυθμιστικοί παράγοντες, απαραίτητοι για τη διατήρηση της υγείας των οστών. Η συνύπαρξη και των δύο τύπων οστού στη δημιουργία του σκελετού είναι αυτή που του προσδίδει στιβαρότητα και ανθεκτικότητα.



Ανατομικά χαρακτηριστικά μακρών οστών.

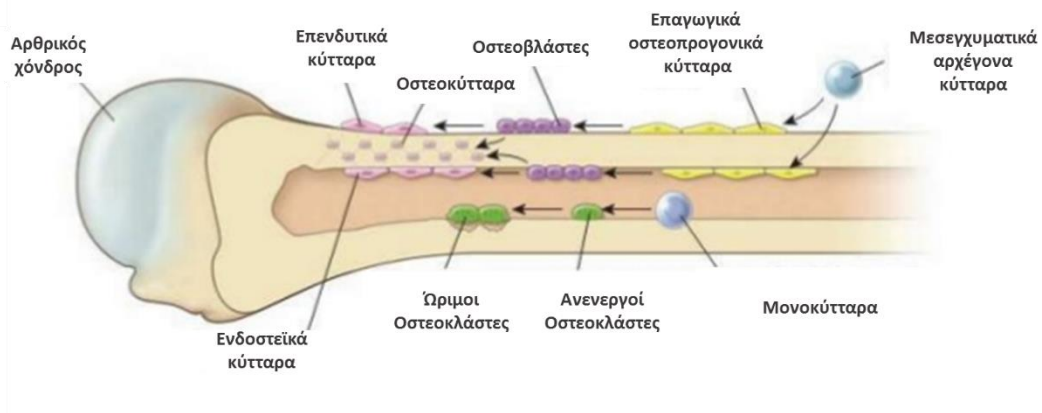
Μορφολογικά χαρακτηριστικά Οστίτη ιστού

Ο οστίτης ιστός είναι ο δομικός ιστός των οστών. Αποτελεί ένας εξειδικευμένος συνδετικός ιστός, που χαρακτηρίζεται από ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία ικανή να του προσδίδει την απαραίτητα σκληρότητα και αντοχή (μεγάλη αντοχή στη συμπίεση και μικρή ελαστικότητα). Ο οστίτης ιστός αποτελείται κατά 35% περίπου από οργανικά υλικά (κύτταρα, θεμέλια ουσία, κολλαγόνο) και κατά 65% από ανόργανα υλικά, κυρίως άλατα φωσφορικού ασβεστίου, που εγκλωβίζονται στη θεμέλια ουσία με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού καταλαμβάνουν τα κολλαγόνα ινίδια τύπου I, ενώ στο υπόλοιπο απαντώνται οι μη κολλαγονικές πρωτεΐνες οστεοκαλσίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη, που εντοπίζονται μόνο στον οστίτη ιστό, καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως η οστεοποντίνη, οστεονεκτίνη, λιπίδια, μακροφάγα κ.ά.

Τα κύτταρα που εντοπίζονται στον οστίτη ιστό ανήκουν σε πέντε διαφορετικούς τύπους οστικών κυττάρων [2]. Πιο συγκεκριμένα απαντώνται:

1. τα **οστεοπρογονικά κύτταρα** (stem cells), τα οποία αποτελούν πολυδύναμα μεσεγχοματικά κύτταρα και εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες
2. τους **οστεοβλάστες** (osteoblasts) έχουν κυβοειδές σχήμα, είναι τα αρμόδια κύτταρα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών της μητρικής ουσίας και την ασβεστοποίησή της και εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες, όπως και τα οστεοπρογονικά κύτταρα
3. τα **οστεοκύτταρα** (osteocytes) έχουν αστεροειδή μορφή, είναι αριθμητικά τα περισσότερα κύτταρα του οστίτη ιστού και εντοπίζονται σε κοιλότητες (lacunae) της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας. Δημιουργούνται όταν ένας οστεοβλάστης περιβληθεί από την επιμεταλλωμένη οστέινη ουσία, που ο ίδιος παράγει και έχουν σημαντικό ρόλο στο συνολικό μεταβολισμό του οστίτη ιστού καθώς και στη διατήρηση της οστέινης ουσίας και των επιπέδων ασβεστίου [3, 4, 5]
4. τους **οστεοκλάστες** (osteoclasts), οι οποίοι προέρχονται από προγονικά κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού, που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, εντοπισμένα στα βοθρία οστικής απορρόφησης (βοθρία του Howship)
5. τα **επενδυτικά οστικά κύτταρα** (lining cells) ή “οστεοβλάστες εν ηρεμία” ή “οστεοβλάστες επιφανείας”, τα οποία προέρχονται από οστεοβλάστες που δεν είναι ενεργοί και δεν εγκλωβίστηκαν σε οστεοειδές για να μετατραπούν σε οστεοκύτταρα. Τα επενδυτικά οστικά κύτταρα είναι επίπεδα ή επιμήκη στη μορφολογία τους και καλύπτουν μεγάλη έκταση των οστικών επιφανειών, προστατεύοντας τις από την δράση των οστεοκλαστών [6].



Οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες αποτελούν τα κύτταρα που είναι κυρίως υπεύθυνα για τη διατήρηση της υγείας των οστών, μέσω της συμμετοχής τους στη δια βίου διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των οστών και θα περιγράψουν αναλυτικά στη συνέχεια.

1.2. Οστεοβλάστες - Οστεοκλάστες

Τα πιο ενεργά κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες, υπεύθυνοι για την παραγωγή και την απορρόφηση του οστού, αντίστοιχα.

1.2.1. Φυσιολογία - Διαφοροποίηση Οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες μαζί με τα οστεοκύτταρα αποτελούν τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα του σκελετού. Είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό της οργανικής θεμέλιας ουσίας και τη ρύθμιση της απόθεσης ανόργανων συστατικών. Ο χρόνος ζωής τους στον άνθρωπο είναι περίπου οκτώ εβδομάδες και μετά την ωρίμανσή τους, ορισμένοι οστεοβλάστες εγκλωβίζονται στην θεμέλια ουσία και μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα. Στην κυτταρική μεμβράνη των οστεοβλαστών εντοπίζεται μια πληθώρα υποδοχέων μέσω των οποίων εξασφαλίζεται η επικοινωνία με τα υπόλοιπα κύτταρα, με τη θεμέλια ουσία, αλλά και η απόκρισή τους σε μηχανικά και μεταβολικά ερεθίσματα. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων, παραθορμόνης και 1.25-διυδροξυ βιταμίνης D₃, εκκρίνουν οστεοκαλσίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη και ρυθμίζουν την

απόθεση ανόργανων αλάτων στη θεμέλια ουσία, μέσω του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση που διαθέτουν σε αφθονία στην κυτταρική τους μεμβράνη [7].

Ο πρόγονος του οστεοβλάστη είναι το πολυδύναμο, αρχέγονο μεσεγγυματικό κύτταρο (stem cell), που εκτός από τη μεγάλη αναγεννητική του ικανότητα, μπορεί εν δυνάμει να διαφοροποιηθεί σε χονδροκύτταρο, λιποκύτταρο, οστικό ή μυϊκό κύτταρο υπό την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων [8, 9]. Το πρώτο στάδιο στη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων είναι η δημιουργία του επαγωγίμου οστεοπρογονικού κυττάρου, δηλαδή του κυττάρου το οποίο υπό συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. επαφή με μη τιτανωμένο οστό), είναι ικανό να διαφοροποιηθεί σε οστεοβλάστη. Η ύπαρξη επαγωγίμων οστεοπρογονικών κυττάρων πιστεύεται ότι εξηγεί την έκτοπη παραγωγή οστίτη ιστού σε εξωσκελετικούς ιστούς [10]. Το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης είναι η δημιουργία του προ-οστεοβλαστικού κυττάρου, το οποίο είναι προκαθορισμένο να εξελιχθεί σε οστεοβλάστη, έχει ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης, η οποία όμως μειώνεται καθώς εξελίσσεται η διαδικασία της διαφοροποίησης. Οι ώριμοι οστεοβλάστες έχουν μικρή ικανότητα διαίρεσης και ένα ποσοστό τους εγκλωβίζεται στην επιμεταλλωμένη θεμέλια ουσία και μετατρέπεται σε οστεοκύτταρα, ενώ ένα άλλο ποσοστό τους παραμένει ανενεργό στις οστικές επιφάνειες με τη μορφή επενδυτικών κυττάρων [11].

Η οστεοβλαστογένεση είναι μία διαδικασία που γίνεται βαθμιαία [12] και ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF- β) και ινοβλαστών (FGF-2), οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs), οι κυτταροκίνες και πολλοί άλλοι παράγοντες [13]. Κατά τη διάρκεια της προαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών επάγεται η έκφραση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών, όπως η οστική αλκαλική φωσφατάση, η οποία θεωρείται πρώιμος δείκτης διαφοροποίησης και ακολουθούν το κολλαγόνο τύπου I και οι πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσία όπως η οστεοκαλσίνη και η οστική σιαλοπρωτεΐνη [14].

1.2.2. Λειτουργίες Οστεοβλαστών

Οι λειτουργίες των οστεοβλαστών χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, την παραγωγή δομικών συστατικών του οστίτη ιστού και την παραγωγή ρυθμιστικών παραγόντων και ενζύμων που επηρεάζουν την ανακατασκευή των οστών [15].

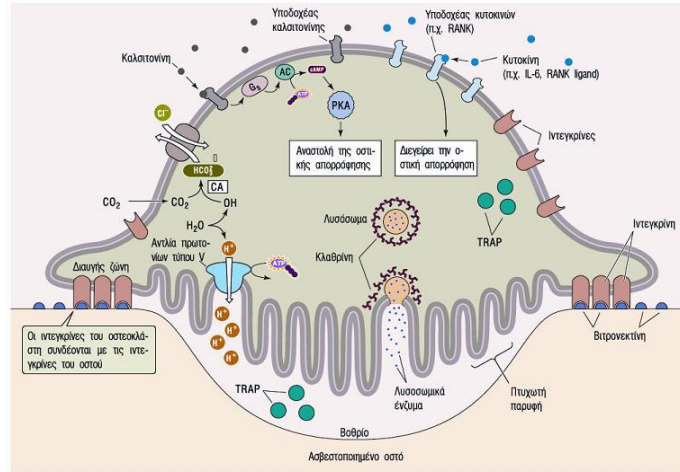
Οι ώριμοι οστεοβλάστες παράγουν και εναποθέτουν κολλαγόνο τύπου I, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό του οστεοειδούς και είναι ικανό να επιμεταλλωθεί, αλλά και άλλες μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη κατά τη φάση της επιμετάλλωσης των οστών [16]. Επιπλέον, οι οστεοβλάστες συμμετέχουν στην ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας, κυρίως μέσω επαγωγής της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, ενζύμου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης τους, το οποίο σχετίζεται με την συγκεκριμένη διαδικασία.

Η συμβολή των οστεοβλαστών στην ανακατασκευή των οστών πραγματοποιείται μέσω ρύθμισης της παραγωγής αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και ενζύμων απαραίτητων για τη διαδικασία της οστικής παραγωγής. Ο ρυθμός της οστικής παραγωγής καθορίζεται από την ενεργότητα των ώριμων οστεοβλαστών, καθώς και από τον αριθμό των προ-οστεοβλαστικών κυττάρων που είναι ικανά να διαφοροποιηθούν [17]. Οι οστεοβλάστες παράγουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι παραμένουν δεσμευμένοι στη θεμέλια ουσία και μετά την απορρόφηση του οστού από τους οστεοκλάστες, εκκρίνονται σηματοδοτώντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες [16]. Μεταξύ των ουσιών που παράγονται από τους οστεοβλάστες συμπεριλαμβάνονται και οι κυτταροκίνες, μερικές εκ των οποίων επάγουν την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και κατ' επέκταση την απορρόφηση των οστών, διαδικασία όμως που όταν είναι σε ισορροπία με την οστική παραγωγή είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της υγείας του σκελετού [11].

1.2.3. Φυσιολογία - Διαφοροποίηση Οστεοκλαστών

Οι οστεοκλάστες είναι κύτταρα υψηλής εξειδίκευσης, τα οποία εντοπίζονται στις ενδοοστικές επιφάνειες των οστών και είναι υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση [18]. Οι οστεοκλάστες παρουσιάζουν κυτταρική πόλωση και μπορούν να απορροφούν οστό μόνο από την κροσσωτή (πτυχωτή) τους επιφάνεια, η οποία και αποτελεί την επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης που βρίσκεται σε επαφή με το προς απορρόφηση τμήμα του οστού. Τα κύτταρα

προέλευσης των οστεοκλαστών είναι τα αρχέγονα, πολυδύναμα κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία υπό την επίδραση κυτταροκινών και άλλων παραγόντων πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και συγχωνεύονται, σχηματίζοντας μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα (περίπου 20 πυρήνες/οστεοκλάστη), τους ώριμους οστεοκλάστες.



Κυτταρική δομή οστεοκλάστη.

Αναλυτικότερα, τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών παρουσία συγκεκριμένων παραγόντων όπως ορμονών και κυτταροκινών πολλαπλασιάζονται και μετατρέπονται σε μονοπύρηνους πρόγονους οστεοκλαστών. Στη συνέχεια, τα μονοπύρρηνα αυτά κύτταρα συγχωνεύονται και μετατρέπονται σε ανώριμους οστεοκλάστες [19], οι οποίοι όταν έρθουν σε επαφή με οστική επιφάνεια χωρίς επενδυτικά κύτταρα, υφίστανται περαιτέρω διαφοροποίηση και σχηματίζουν την πτυχωτή παρυφή τους μέσω της οποίας πραγματοποιείται η οστική απορρόφηση.

Στους ρυθμιστικούς παράγοντες της οστεοκλαστογένεσης περιλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-κB, FOS κ.ά., αλλά και κυτταροκίνες, σημαντικότερες από τις οποίες θεωρούνται ο παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF), η κινάση της τυροσίνης (SRC) [20], ο προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του NF-κB (RANKL) και η οστεοπροτεγερίνη (OPG). Όλοι οι προαναφερόμενοι ρυθμιστικοί παράγοντες δρουν στα πρόδρομα κύτταρα των οστεοκλαστών επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοκλάστες [17].

Στο σημείο όπου προσκολλάται ο οστεοκλάστης στην οστική επιφάνεια και πραγματοποιείται οστική απορρόφηση, δημιουργείται κοιλότητα γνωστή ως κοιλότητα του

Howship ή βοθρίο απορρόφησης [21]. Οι ώριμοι οστεοκλάστες μικροσκοπικά εντοπίζονται κοντά στα βοθρία απορρόφησης, όμως η παρουσία σε αυτές τις περιοχές και ενεργοποιημένων μακροφάγων δυσχεραίνει την αναγνωρισή τους. Έρευνες έχουν καταδείξει την ύπαρξη ειδικών κυτταρικών δεικτών όπως ο υποδοχέας βιτρονεκτίνης και η όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό (TRAP), οι οποίοι εκφράζονται από τους ώριμους οστεοκλάστες [22], αλλά και ο υποδοχέας καλσιτονίνης, ο οποίος εκφράζεται τόσο από τους προ-οστεοκλάστες, όσο και από τους ώριμους οστεοκλάστες [23].

1.2.4. Οστική απορρόφηση

Όπως έχει προαναφερθεί, οι ώριμοι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για την διαδικασία της απορρόφησης των οστών. Στις περιπτώσεις όπου εξωτερικά ερεθίσματα σηματοδοτούν την εξασθένηση των επενδυτικών κυττάρων, οι ώριμοι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια μέσω της πτυχωτής τους παρυφής και δημιουργούν την κοιλότητα του Howship για να ακολουθήσει η οστική απορρόφηση. Η προσκόλληση του οστεοκλάστη στην οστική επιφάνεια επιτυγχάνεται μέσω των ιντεγκρινών, που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη της πτυχωτής παρυφής και αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (οστεοποντίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη), μέσω ειδικών δομών των ποδοσωμάτων [24]. Η κύρια ιντεγκρίνη των οστεοκλαστών είναι η $\alpha_v\beta_3$ (υποδοχέας βιτρονεκτίνης). Όταν οι ιντεγκρίνες είναι ενεργοποιημένες, τα ποδοσώματα συγκεντρώνονται στην περιφέρεια των κυττάρων σχηματίζοντας το δακτύλιο ακτίνης, μια δομή απαραίτητη για την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και την επακόλουθη οστική απορρόφηση [25].

Το επόμενο στάδιο της απορρόφησης είναι η διάλυση της επιμεταλλωμένης θεμέλιας ουσίας. Οι οστεοκλάστες παράγουν ιόντα H^+ για να διαλύσουν τα επιμεταλλωμένα στοιχεία της θεμέλιας ουσίας, μέσω της δράσης του ενζύμου καρβονική ανυδράση II. Το όξινο pH διαλύει τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, ενώ πρωτεολυτικά ένζυμα, που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των μεταλλοπρωτεϊνών, όπως η καθεψίνη K και η κολλαγενάση (MMP-1), αλλά και άλλα ένζυμα όπως η TRAP αποδομούν την οργανική θεμέλια ουσία και στο υπάρχον όξινο pH διασπούν το κολλαγόνο [26, 27].

Τα ιόντα ασβεστίου που απελευθερώνονται κατά τη διάλυση του υδροξυαπατίτη απορροφώνται από τους οστεοκλάστες, οι οποίοι όταν κορεστούν αποκολλώνται και

απομακρύνονται από το οστό. Επιπρόσθετα, άμεση επίδραση στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης ασκεί η ορμόνη καλσιτονίνη, οι προσταγλανδίνες και το μονοξείδιο του αζώτου, ενώ μελέτες έχουν καταδείξει και την ύπαρξη οιστρογονικών υποδοχέων στους οστεοκλάστες [28, 29].

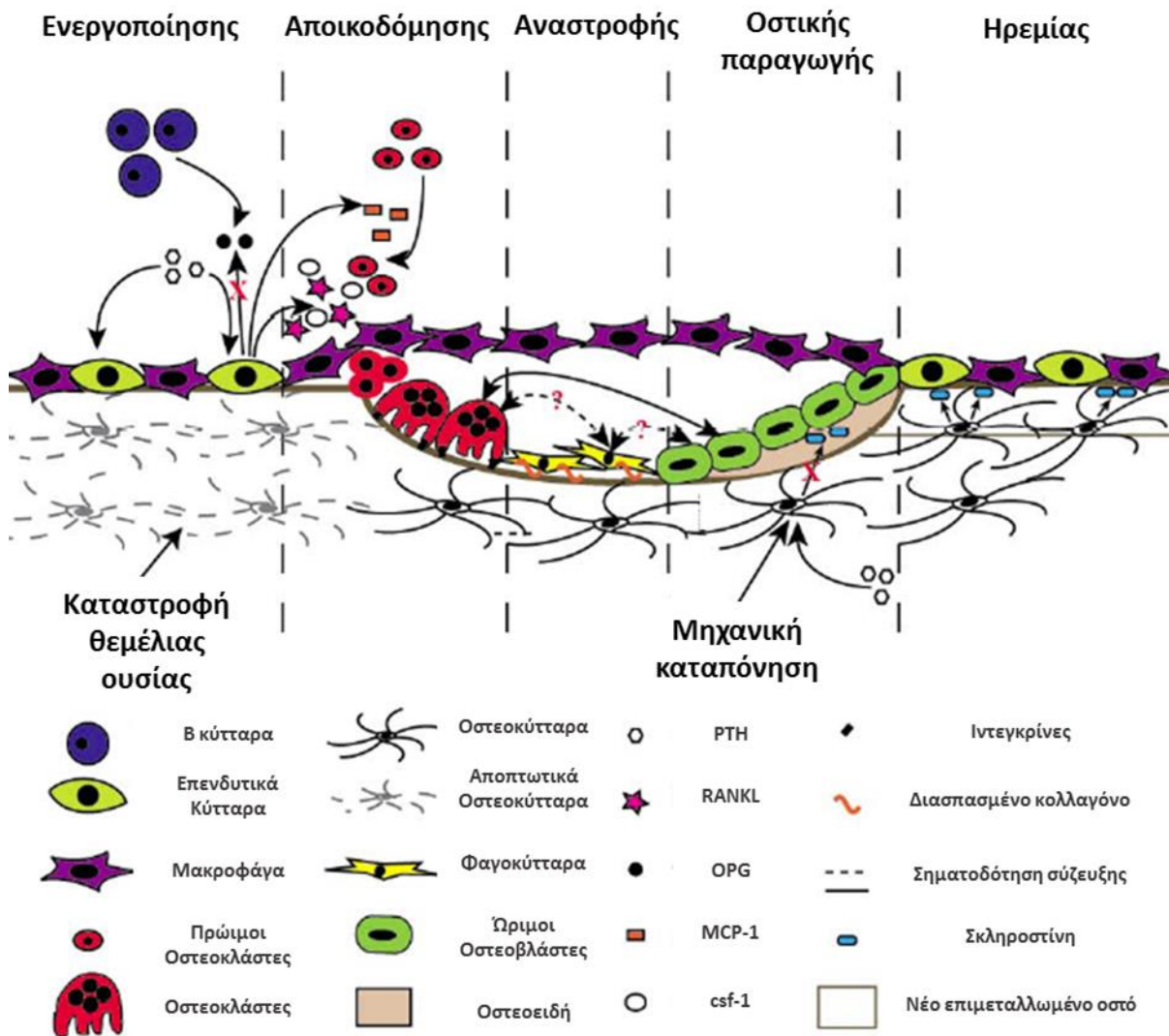
1.3. Ανακατασκευή του Οστού (Bone Remodeling)

Η δυναμική διεργασία, η οποία διατηρεί τη φυσιολογική δομή και σύσταση των ώριμων οστών καθώς και την ομοιότητα ασβεστίου στον οργανισμό ονομάζεται οστική αναδόμηση ή ανακατασκευή (Bone Remodeling). Η οστική ανακατασκευή αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εκτελείται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, ως απόκριση στα ερεθίσματα που δέχεται το σκελετικό σύστημα. Η διαδικασία ανακατασκευής των οστών χαρακτηρίζεται από πέντε διακριτές φάσεις και δεν πραγματοποιείται συγχρόνως σε όλο το σκελετό, αλλά σε επιλεγμένες μικρές περιοχές κυρίως του σπογγώδους, αλλά και του φλοιώδους οστού που ονομάζονται Βασικές Πολυκυτταρικές Μονάδες (Bone Multicellular Units, BMUs) [30]. Η επιλογή των συγκεκριμένων περιοχών γίνεται από οστεοκύτταρα, τα οποία διεγείρονται από αυξητικούς και ορμονικούς παράγοντες, καθώς και μηχανικές και ηλεκτρικές δυνάμεις που ασκούνται στο σκελετό και πυροδοτούν τη διαδικασία ανακατασκευής του [31].

Ουσιαστικά, η οστική ανακατασκευής είναι το αποτέλεσμα δύο αντίρροπων διαδικασιών, της οστικής απορρόφησης που επιτελείται από τους οστεοκλάστες και της οστικής παραγωγής που πραγματοποιείται από τους οστεοβλάστες. Σε φυσιολογικές συνθήκες αυτές οι δύο διεργασίες βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία για τη διατήρηση της υγείας των οστών και η ενορχηστρωμένη συνεργασία οστεοβλαστών – οστεοκλαστών (σύζευξη, coupling) αποτελεί το σημείο κλειδί της οστικής ανακατασκευής [32]. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας (αποσύζευξη) αποτελεί την κύρια αιτία των μεταβολικών νοσημάτων των οστών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η οστεοπόρωση [33].

1.3.1. Στάδια οστικής ανακατασκευής

Οι διακριτές φάσεις της οστικής ανακατασκευής είναι η φάση της ηρεμίας, της ενεργοποίησης, της αποικοδόμησης, της αναστροφής και της οστικής παραγωγής. Αν και η σειρά των φάσεων ανακατασκευής δεν αλλάζει, τροποποιήσεις της ταχύτητας εναλλαγής καθώς και του χρόνου και της έντασης των φάσεων, καθορίζουν το ρυθμό οστικής αναδόμησης (Bone Turnover) του σκελετού. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται ανανέωση όλου του σκελετού κάθε δέκα χρόνια [34].



Στάδια οστικής ανακατασκευής

Οι φάσεις ανακατασκευής των οστών είναι οι ακόλουθες:

1. Φάση ηρεμίας (Quiescent phase)

Στη φάση της ηρεμίας οι μεταβολικές μονάδες του οστού είναι ανενεργές και μικροσκοπικά, η θεμέλια ουσία καλύπτεται από μη ασβεστοποιημένο οστεοειδές και από ανενεργά επενδυτικά κύτταρα. Σε αυτή τη φάση βρίσκεται το μεγαλύτερο μέρος του οστίτη ιστού.

2. Φάση ενεργοποίησης (Activation phase)

Σε αυτή τη φάση ενεργοποιείται η Βασική Πολυκυτταρική Μονάδα, μέσω των επενδυτικών κυττάρων, τα οποία αφενός απομακρύνονται από την οστική επιφάνεια και αφετέρου εκκρίνουν μια σειρά παραγόντων όπως ο MCSF, το RANKL, η ιντερλευκίνη-11 και η ιντερλευκίνη-6. Η έκκριση των προαναφερόμενων παραγόντων προσελκύει πρόδρομους οστεοκλάστων, επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση / σύντηξή τους σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες. Η φάση ενεργοποίησης διαρκεί περίπου 5-7 ημέρες.

3. Φάση αποικοδόμησης (Resorption phase)

Στη φάση αυτή ουσιαστικά έχουμε την αποικοδομητική δράση των οστεοκλαστών. Οι ώριμοι οστεοκλάστες, αφού προσκολληθούν με την πτυχωτή τους επιφάνεια στο οστό, πραγματοποιούν την διάλυση των ανόργανων αλάτων και την απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η διάρκεια της οστεολυτικής φάσης δεν είναι ίδια και στους δύο τύπους οστού και στο φλοιώδες οστό διαρκεί περίπου 6-10 εβδομάδες, ενώ στο σπογγώδες περίπου 10 ημέρες.

4. Φάση αναστροφής (Reversal phase)

Η φάση της αναστροφής αποτελεί το διάστημα μεταξύ της απορρόφησης και της επαναδημιουργίας οστού. Κατά την φάση αυτή αποκολλώνται και απομακρύνονται οι οστεοκλάστες από το βοθρίο απορρόφησης και τη θέση τους παίρνουν οι οστεοβλάστες. Η αναστροφή αυτή πιστεύεται ότι συμβαίνει για δύο κυρίως λόγους. Μία αιτία είναι ο κορεσμός του οστεοκλάστη από το απορροφούμενο ασβέστιο που τον οδηγεί σε αποκόλληση και απομάκρυνση από το βοθρίο απορρόφησης. Ως δεύτερη αιτία αναστροφής θεωρείται η έκκριση αυξητικών παραγόντων, μεταξύ αυτών και του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης β2 (TGF-β2). Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη αναστέλλει τη δημιουργία νέων οστεοκλαστών, προσελκύει τους οστεοβλάστες στο βοθρίο απορρόφησης, επάγει τον πολλαπλασιασμό και

την ενεργότητά τους, οδηγώντας στη δημιουργία νέου οστού. Η φάση της αναστροφής διαρκεί περίπου 1-2 εβδομάδες.

5. Φάση οστικής παραγωγής (Formation, Mineralization phase)

Στη φάση αυτή οι οστεοβλάστες που βρίσκονται πλέον στην κοιλότητα αρχίζουν να δημιουργούν νέο οστό σε δύο στάδια, υπό την επίδραση διαφόρων κυτταροκινών όπως ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης I και II (Insulin-like Growth Factor) και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs). Κατά το πρώτο στάδιο, οι ώριμοι οστεοβλάστες συνθέτουν και εναποθέτουν ινίδια κολλαγόνου κυρίως τύπου I, δομώντας έτσι τη θεμέλια ουσία και το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 3 μήνες. Στο επόμενο στάδιο, η μεταβολική μονάδα του οστού έχει εξασθενήσει και πλέον πραγματοποιείται η επιμετάλλωση της οστικής μάζας, μέσω εναπόθεσης κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Το στάδιο της επιμετάλλωσης ξεκινά περίπου 30 ημέρες μετά τη δημιουργία του οστεοειδούς και ολοκληρώνεται μετά από 90 ημέρες στο σπογγώδες οστό και μετά από 130 ημέρες περίπου στο φλοιώδες, οπότε το οστό εισέρχεται ξανά στη φάση ηρεμίας.

Με την ολοκλήρωση του κύκλου ανακατασκευής μιας οστικής περιοχής, αφενός ανανεώνεται ένα τμήμα του σκελετού και αφετέρου προστίθεται στην κυκλοφορία ασβέστιο απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού [35].

2. Οστεοπόρωση – Θεραπεία

2.1. Ιστορική αναδρομή

Η έννοια της οστεοπόρωσης παρουσιάστηκε πρώτη φορά το 1824 από τον Άγγλο χειρουργό Sir Astley Cooper, ο οποίος παρατήρησε ότι η μείωση της μάζας των οστών στους ηλικιωμένους σχετίζεται με την αύξηση των καταγμάτων [36]. Η διατύπωση του όρου «Οστεοπόρωση» πρωτοεμφανίστηκε την ίδια περίπου περίοδο από το Γάλλο παθολόγο Jean Lobstein, αλλά πιθανότατα αναφερόταν στην ατελή οστεογένεση [37]. Η γεροντική οστεοπόρωση περιγράφηκε πολύ αργότερα το 1926 από τον Alwens [38], ενώ η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση αναγνωρίστηκε από τον ενδοκρινολόγο Albright Fuller το 1940 όταν διαπίστωσε ότι η έλλειψη οιστρογόνων συνδέεται με την οστική απώλεια και την ευθραυστότητα των οστών των γυναικών κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης [39]. Έτσι, διατυπώθηκε η θεωρία της ύπαρξης δύο τύπων οστεοπόρωσης, η οστεοπόρωση που σχετίζεται άμεσα με την έλλειψη οιστρογόνων και η οστεοπόρωση που συνδέεται με την έλλειψη ασβεστίου και τη γήρανση του σκελετού [40].

Η θεωρία αυτή έχει πλέον αντικατασταθεί, μιας και έχει διαπιστωθεί ότι η οστεοπόρωση αποτελεί μια αλυσιδωτή αντίδραση, στην οποία συμμετέχουν πολλαπλοί παθογενετικοί μηχανισμοί, οι οποίοι οδηγούν στην απώλεια οστικής μάζας και εξασθένηση της μικροαρχιτεκτονικής των οστών. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί σε συνδυασμό με τον αυξημένο κίνδυνο πτώσεων, συνεισφέρουν στην υψηλή εμφάνιση καταγμάτων σε οστεοπορωτικούς πληθυσμούς [41].

2.2. Ορισμός της Οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση είναι μια συστηματική μεταβολική νόσος των οστών, η οποία χαρακτηρίζεται από ελάττωση της οστικής μάζας, αλλαγή της μικροαρχιτεκτονικής των οστών και αύξηση της ευθραυστότητάς τους, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο πρόκλησης καταγμάτων [42], ενώ διεθνή ινστιτούτα υγείας των Η.Π.Α. το 2000 (National Institutes of Health, NIH), όρισαν την οστεοπόρωση ως σκελετική διαταραχή χαρακτηριζόμενη από απώλεια της οστικής αντοχής εκθέτοντας το άτομο σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κατάγματος [43]. Μετά την ανακάλυψη της τεχνικής DEXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometry) για τον προσδιορισμό της οστικής

πυκνότητας, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) ορίζει την οστεοπόρωση με βάση μετρήσεις οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης και του ισχίου μετεμμηνοπαυσιακά, εκφρασμένες σε μονάδες τυπικών αποκλίσεων (*T-score*) και δεν συμπεριλαμβάνει άλλες παραμέτρους των οστών [44]. Ουσιαστικά όμως, πρόκειται για μια θεώρηση η οποία παρέχει τις κατευθυντήριες γραμμές στη θεραπεία της οστεοπόρωσης μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις κατηγορίες ασθενών.



Φυσιολογικό οστό



Οστεοπορωτικό οστό

2.3. Αιτιολογία οστεοπόρωσης – παράγοντες κινδύνου

Η οστεοπόρωση επιδημιολογικά φαίνεται να είναι η πιο συχνή πάθηση των οστών και αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης καταγμάτων σε ποσοστό 40% των γυναικών και 15% των ανδρών σε προχωρημένη ηλικία [45, 46]. Χωρίζεται δε, σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τη γενικευμένη και την τοπική οστεοπόρωση.

Η **γενικευμένη μορφή** υποδιαιρείται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή οστεοπόρωση.

- Στην **πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή οστεοπόρωση** ανήκουν, η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, η γεροντική οστεοπόρωση και η ιδιοπαθής οστεοπόρωση που εμφανίζεται σε νεαρούς ενήλικες άνδρες και γυναίκες, αλλά έχει σχετικά περιορισμένη χρονική διάρκεια.
- Η **δευτεροπαθής οστεοπόρωση** προκαλείται από φαρμακευτικούς παράγοντες ή είναι απόρροια άλλων παθήσεων. Δευτεροπαθής οστεοπόρωση μπορεί να προκληθεί από τη χρήση κορτικοστεροειδών, την συνύπαρξη υπερπαραθυρεοειδισμού, διαβήτη, νόσο του Cushing κ.ά. [47, 48].

Υπάρχει και η τοπική οστεοπόρωση, η οποία εκδηλώνεται μετά από μακρόχρονη ακινητοποίηση σκελετικών τμημάτων λόγω καταγμάτων, η οστεοπόρωση ή οστική ατροφία Sudeck (αλγοδυστροφία), η ιδιοπαθής παροδική οστεοπόρωση μιας άρθρωσης, κυρίως του ισχίου κ.ά.

Φυσιολογικά η οστική μάζα αυξάνεται προοδευτικά όσο ο σκελετός αναπτύσσεται και εξακολουθεί να αυξάνεται μέχρι την ηλικία περίπου των 30 περίπου ετών, οπότε φθάνει στο μέγιστο επίπεδο [49], ενώ όσο αυξάνεται η ηλικία, η οστική απορρόφηση υπερβαίνει την οστική παραγωγή. Ο ρυθμός οστικής απώλειας είναι αρχικά ίδιος στους άνδρες και στις γυναίκες, αλλά στις γυναίκες η οστικής απώλειας επιταχύνεται στην περίοδο της εμμηνόπαυσης και συνδέεται στενά με την ελάττωση των επιπέδων οιστρογόνων [50].

Οστεοπόρωση δημιουργείται, όταν η οστική μάζα ενός ατόμου που φθάνει το μέγιστο στην ηλικία των 35 περίπου ετών είναι χαμηλή ή ο ρυθμός οστικής απώλειας είναι αυξημένος ή υπάρχει συνδυασμός και των δύο. Γι' αυτό η φιλοσοφία της σύγχρονης αντιμετώπισης της οστεοπόρωσης συγκεντρώνεται στους δύο αυτούς στόχους, δηλαδή τη μεγιστοποίηση της κορυφαίας οστικής μάζας (πρωτογενής πρόληψη) και την ελαχιστοποίηση των οστικών απωλειών (δευτερογενής πρόληψη). Τελευταία φαίνεται ότι εκτός από το επίπεδο της οστικής μάζας σημασία έχει και η ποιότητα της μάζας που μένει.

Πολλοί είναι οι παράγοντες που καθορίζουν τη μέγιστη οστική μάζα ενός ατόμου. Πιστεύεται ότι το 45-80% περίπου της διακύμανσης της οστικής μάζας των ενηλίκων, αλλά και ο ρυθμός οστικής απώλειας σχετίζονται άμεσα με γενετικούς παράγοντες και την κληρονομικότητα των γονέων [51, 52]. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει και το φύλο, μιας και ο ρυθμός ανάπτυξης των γυναικών αρχίζει και ολοκληρώνεται νωρίτερα σε σχέση με τους άντρες και οι άντρες έχουν μεγαλύτερη κορύφωση οστικής μάζας συγκρινόμενοι με τις γυναίκες [47, 53]. Η φυλή αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που σχετίζεται με την οστεοπόρωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα αφρικανικής καταγωγής έχουν υψηλότερη οστική μάζα, συγκρινόμενα με εκείνα κυρίως της Βόρειας Ευρώπης [53], ενώ οι Ασιάτες χαρακτηρίζονται από μικρότερη οστική μάζα σε σχέση με τους Καυκάσιους [54]. Η διατροφή φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καλή υγεία των οστών. Η πρόσληψη ασβεστίου, φωσφόρου και άλλων ιχνοστοιχείων συνδέεται με την διατήρηση της οστικής μάζας, ενώ η αυξημένη πρόσληψη πρωτεϊνών, αλκοόλ, καφέ, αλλά και το κάπνισμα φαίνεται να οδηγούν σε επιτάχυνση της οστικής απώλειας [47, 51]. Τέλος, ο περιορισμός της φυσιολογικής κίνησης (βάδισμα, τρέξιμο) στερεί το μυοσκελετικό σύστημα από ερεθίσματα που συμβάλλουν στη διάπλαση και ανακατασκευή του σκελετού σε όλη τη διάρκεια

της ζωής και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν καταδείξει την αύξηση της οστικής μάζας μετά από μηχανική φόρτιση του σκελετού και ταχεία απώλεια σε καταστάσεις αδράνειας [55].

2.4. Διάγνωση

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης μπορεί να γίνει κλινικά, ραδιογραφικά, πυκνομετρικά, αλλά και με τη βοήθεια μιας πληθώρας βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού, που χρησιμοποιούνται συνεπικουρικά στις παραπάνω διαγνωστικές μεθόδους.

Η διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων-X (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DEXA). Ο εξοπλισμός DEXA επιτρέπει σάρωση της σπονδυλικής στήλης και του ισχίου που γενικά θεωρούνται ως τα μεγαλύτερης σπουδαιότητας σημεία μέτρησης, καθώς είναι περιοχές συχνής εμφάνισης καταγμάτων και που έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλη θνησιμότητα [56, 57]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διέλευση ακτίνας φωτονίων από την υπό εξέταση περιοχή. Οι μετρήσεις αφορούν στο άθροισμα φλοιώδους και σπογγώδους οστού, με ποσοστό ακριβείας 1-3% [58], ενώ τα επίπεδα ακτινοβολίας είναι πολύ χαμηλότερα από την κλασική ακτινογραφία.

Εναλλακτική απεικονιστική μέθοδος αποτελεί η Ποσοτική Αξονική Τομογραφία (Quantitative Computerized Tomography, QCT), η οποία παρέχει πληροφορίες για την ανατομία του οστού, αλλά και για την περιεκτικότητά του σε ανόργανα άλατα. Ίδιας τεχνολογίας, αλλά πιο εύκολη στη χρήση είναι και η Περιφερική Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (Peripheral Quantitative Computerized Tomography, pQCT) με την οποία γίνονται μετρήσεις στα άκρα του σκελετού, παραμένει όμως πιο ακριβή τεχνική. Οι διαθέσιμες συσκευές μέτρησης εκτελούν εγκάρσιες σαρώσεις και παρέχουν τρισδιάστατες εικόνες σε ένα πλήθος από περιοχές ενδιαφέροντος και επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε μικροσκοπικά οστά, όπως μυών και επίμυων [59, 60]. Επιπλέον, η μέθοδος pQCT πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής DEXA μιας και παρέχει τη δυνατότητα διακριτής ποσοτικοποίησης του φλοιώδους και του σπογγώδους οστού, ογκομετρικής μέτρησης της οστικής πυκνότητας και εντοπισμού των σημείων της οστικής απώλειας.

Άλλες μέθοδοι διάγνωσης της οστεοπόρωσης αποτελούν η Ποσοτική Οστική Υπερηχομετρία (Quantitative UltraSound, QUS), η οποία μετρά την εξασθένιση των ευρέως φάσματος υπερήχων ή την ταχύτητα του ήχου, έχει χαμηλό κόστος, είναι εύκολη στη χρήση, αλλά

λόγω της χαμηλής επαναληψιμότητας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μεγάλων ομάδων πληθυσμού και όχι για τη διαχρονική παρακολούθηση των μεταβολών της οστικής μάζας [61]. Τέλος, η Μαγνητική Τομογραφία ή Απεικόνιση με Μαγνητικό Συντονισμό (Magnetic Resonance Imaging, MRI) και η Μικροϋπολογιστική Τομογραφία (micro-Computerized Tomography, μ CT) αποτελούν επίσης τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, μιας και αναδεικνύουν την πραγματική μορφολογία του οστού, μέσω ψηφιακής εικόνας ως ένα μέτρο εκτίμησης της ποιότητας του οστού [62, 63].

Εκτός των απεικονιστικών τεχνικών μια σειρά βιοχημικών δεικτών έχουν προταθεί για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικών σχημάτων, αλλά όχι και για τη διάγνωση της νόσου. Οι χρησιμοποιούμενοι βιοχημικοί δείκτες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στους Δείκτες Οστικής παραγωγής και στους Δείκτες Οστικής απορρόφησης.

Στους δείκτες οστικής παραγωγής περιλαμβάνονται τα πεπτίδια προ-κολλαγόνου, καρβοξυτελικό και αμινοτελικό πεπτίδιο προ-κολλαγόνου τύπου I (PICP, PINP), τα οποία είναι ενδιάμεσα προϊόντα σύνθεσης κολλαγόνου και ανιχνεύονται στον ορό, αλλά και η μη κολλαγονική πρωτεΐνη Οστεοκαλσίνη (BGP), η οποία παράγεται μόνο από τους οστεοβλάστες και αποτελεί δείκτη οστικής παραγωγής, ανιχνεύσιμο στον ορό [64]. Επίσης, στους δείκτες οστικής παραγωγής συμπεριλαμβάνονται η ολική Αλκαλική Φωσφατάση (Total ALP) και το Οστικό κλάσμα της (Bone ALP), ένζυμο το οποίο σχετίζεται με τον ρυθμό επιμετάλλωσης των οστών [64].

Στους δείκτες οστικής απορρόφησης περιλαμβάνονται η υδροξυπρολίνη, παράγωγα πυριδινολίνης και πεπτίδια κολλαγόνου. Η υδροξυπρολίνη (OHP) παράγεται από την αποδόμηση του κολλαγόνου των οστών και απεκκρίνεται μέσω των ούρων, έχει όμως αντικατασταθεί από πιο ευαίσθητους δείκτες, μιας και συνδέεται πολύ ασθενώς και με τον οστικό μεταβολισμό [64]. Τα παράγωγα πυριδινολίνης (ελεύθερη και ολική πυριδινολίνη και δεοξυπυριδινολίνη) αποτελούν δείκτες αποικοδόμησης του κολλαγόνου, που ανιχνεύονται στα ούρα και τον ορό των ασθενών. Αποτελούν τους παράγοντες διασύνδεσης των μορίων κολλαγόνου προκειμένου να σταθεροποιηθεί στη θεμέλια ουσία [64]. Τα τελοπεπτίδια (καρβοξυτελικό και αμινοτελικό) των μορίων κολλαγόνου τύπου I αποτελούν ιδιαίτερα ευαίσθητους δείκτες οστικής απορρόφησης, μιας και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά την καταστροφή του κολλαγόνου [65]. Τέλος, δείκτες οστικής απορρόφησης θεωρούνται και τα οστεοκλαστικά ένζυμα όξινη φωσφατάση

ανθεκτική στο τρυγικό και καθεψίνη K, όμως η εγκυρότητα των μετρήσεών τους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [64].

2.5. Θεραπευτική αγωγή

2.5.1. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Όλα τα θεραπευτικά σχήματα για την πρόληψη και τη θεραπεία της οστεοπόρωσης επιδρούν στην οστική ανακατασκευή και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε εκείνα που επιδρούν στην απορρόφηση και σε εκείνα που επάγουν την οστική παραγωγή [66]. Επιπλέον, κυρίως σε περιπτώσεις κληρονομικότητας ή προδιάθεσης προτείνονται συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D, ασκήσεις άρσης βάρους και διακοπή του καπνίσματος, κυρίως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [67, 68].

Στην κατηγορία των φαρμάκων που επιδρούν στην οστική απορρόφηση η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Hormone Replacement Therapy, HRT) αποτελούσε προσέγγιση πρώτης γραμμής, στοχεύοντας στη θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Παρά όμως την ευεργετική επίδραση των οιστρογόνων στην αύξηση της οστικής πυκνότητας, οι βλαβερές επιπτώσεις της στο καρδιαγγειακό σύστημα και ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης νεοπλασιών, περιόρισε τη χρήση τους [68, 69].

Στην κατηγορία των φαρμάκων που επιδρούν στην οστική απορρόφηση εντάχθηκαν οι εκλεκτικοί τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs). Οι SERMs αρχικά αναφέρθηκαν ως αντιοιστρογόνα, όμως περαιτέρω μελέτες ανέδειξαν την ανταγωνιστική τους δράση σε κάποιους ιστούς, όπως ο μαστός και την αγωνιστική τους σε άλλους, όπως στα οστά [70]. Οι SERMs, με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους την Ταμοξιφαίνη και την Ραλοξιφαίνη, δεν παρουσιάζουν τις ανεπιθύμητες ενέργειες που προκύπτουν κατά την οιστρογονική θεραπεία, όπως είναι ο αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών ανωμαλιών ή καρκίνου του στήθους και της μήτρας [71, 72]. Πιο συγκεκριμένα, η Ταμοξιφαίνη, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, έχει ευεργετικές επιδράσεις στην οστική πυκνότητα, ενώ η υδροχλωρική Ραλοξιφαίνη (Evista®) αυξάνει την οστική πυκνότητα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και εγκρίθηκε από το FDA για χρήση στην πρόληψη της οστεοπόρωσης σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση το 1997 [73]. Στην προσπάθεια αναζήτησης

νέων SERMs, η έρευνα έχει μετατοπιστεί και στο πεδίο των φυτικής προέλευσης μη στεροειδών οιστρογόνων ουσιών (φυτοοιστρογόνα) για την αντιμετώπιση της οστικής απώλειας. Οι φυτικοί μεταβολίτες που εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κυρίως στις ομάδες των ισοφλαβονών, λιγνανίων και κουμεστανών και περιγράφονται εκτενώς στη συνέχεια.

Η τελευταία μεγάλη κατηγορία αντικαταβολικών παραγόντων είναι τα διφωσφονικά άλατα, τα οποία αποτελούν παράγωγα πυροφωσφορικού οξέος και δρουν μειώνοντας την οστεοκλαστική οστική απορρόφηση. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζουν μεγάλη έλξη με τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, αποκτώντας πρόσβαση στους οστεοκλάστες προκαλώντας μείωση της οστικής απορρόφησης. Στους οστεοκλάστες δρουν αναστέλλοντας την αντλία πρωτονίων τους και έτσι καταστέλλουν την διάλυση των ανόργανων αλάτων, μειώνοντας την ενεργότητα και αυξάνουν την απόπτωσή τους. Με κύριους εκπροσώπους την αλενδρονάτη, ετιδρονάτη, παμιδρονάτη, ρισεδρονάτη και το ζολενδρονικό οξύ, τα διφωσφονικά αποτελούν την πρώτη επιλογή για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, μιας και μειώνουν τον κίνδυνο καταγμάτων, παρεμποδίζοντας την επιβίωση και την ενεργότητα των οστεοκλαστών, όχι όμως και τον σχηματισμό τους [74].

Η αλενδρονάτη (Fosamax®) είναι το πιο συχνά συνταγογραφούμενο φάρμακο για τη θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και σχετίζεται με αύξηση της οστικής πυκνότητας (BMD) και τη μείωση των κινδύνων κατάγματος [75]. Από την άλλη, τα διφωσφονικά άλατα και κυρίως η Αλενδρονάτη, σχετίζονται με γαστροοισοφαγικά έλκη, όπως επίσης και με διάρροια, έμετο και κοιλιακά άλγη [68]. Αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι πιθανόν ένας από τους λόγους ελλιπούς συμμόρφωσης των ασθενών με την από του στόματος χορήγηση διφωσφονικών [76].

Περιορισμένη εφαρμογή, λόγω αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, έχει η καλσιτονίνη σολωμού, που χορηγείται ενδορρινικώς και ενδείκνυται για τη θεραπεία της εγκατεστημένης μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και για τη μείωση του κινδύνου σπονδυλικών καταγμάτων. Η καλσιτονίνη δρα μέσω των υποδοχέων της στους οστεοκλάστες και αναστέλλει την οστική απορρόφηση. Η έκκρισή της διεγείρεται από την αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου του ορού, η οποία στη συνέχεια οδηγεί στην ελάττωση της οστικής απορρόφησης κι η αναλγητική της δράση οφείλεται κυρίως στην αύξηση του επιπέδου των ενδορφινών. Η παρατεταμένη χρήση των καλσιτονινών είναι δυνατό να οδηγήσει στην ελάττωση της θεραπευτικής δράσης, κυρίως λόγω ανάπτυξης ανοχής [77, 78, 79]. Στην κατηγορία των

παραγόντων που επάγουν την οστική παραγωγή ανήκει η παραθορμόνη καθώς και φθοριούχα σκευάσματα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) έχει καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου, καθώς διατηρεί το επίπεδο ασβεστίου του ορού στα φυσιολογικά επίπεδα με έμμεσο τρόπο (ενεργοποίηση των οστεοκλαστών) και σε χαμηλές δόσεις, ενώ υψηλά επίπεδα PTH συνδέονται με αυξημένη οστική απορρόφηση [80, 81]. Πάνω σε αυτή την ιδιότητα βασίστηκε η παρασκευή της Τεριπαρατίδης (Forsteo®), η οποία είναι ανασυνδυασμένη ανθρώπινη παραθορμόνη, η οποία χρησιμοποιείται για παρεντερική θεραπεία της οστεοπόρωσης. Αποτελεί την πρώτη εγκεκριμένη θεραπεία για την οστεοπόρωση που διεγείρει τον οστικό σχηματισμό, όταν χορηγείται υποδορίως μία φορά την ημέρα [68, 82].

Όπως προαναφέρθηκε, στην πρόληψη αλλά και τη θεραπεία της οστεοπόρωσης συμπεριλαμβάνονται συμπληρώματα ασβεστίου, τα οποία μειώνουν το ρυθμό οστικής απώλειας, το ίδιο και η βιταμίνη D, αλλά και φθοριούχα συμπληρώματα. Το φθοριούχο νάτριο φαίνεται να δρα μέσω αύξησης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας μιας και αυξάνει την οστική πυκνότητα σε πολλούς, όχι όμως σε όλους τους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε [83]. Παρόλα ταύτα, αν και οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δίνουν αποτελέσματα αντικρουόμενα μεταξύ τους, φαίνεται να παρέχεται κάποια οστεοπροστασία κατά την χορήγηση φθοριούχων, όμως η αύξηση της οστικής μάζας δεν συμπορεύεται σε όλες τις περιπτώσεις και με αύξηση της αντοχής των οστών [84, 85].

Τελευταίο όπλο στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης αποτελεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του RANKL, η δανοσουμάμπη (Denosumab, Prolia®), μια σχετικώς πρόσφατα εγκεκριμένη φαρμακευτική ουσία (EE, 2010), η οποία χορηγείται υποδόρια για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε άνδρες που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του προστάτη [86, 87]. Η δανοσουμάμπη προσκολλάται στην κυτταροκίνη RANKL, την απενεργοποιεί και προλαμβάνει την ενεργοποίηση του υποδοχέα της στην επιφάνεια των οστεοκλαστών. Με αυτό το μηχανισμό αναστέλλεται ο σχηματισμός, η λειτουργία και η επιβίωση των οστεοκλαστών και κατ' επέκταση η οστική απορρόφηση. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι στερείται σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ έχει παρατηρηθεί μόνο πόνος στα άνω και κάτω άκρα, κυτταρίτιδα και υπασβεστιαμία κατά την χορήγησή της.

2.5.2. Εναλλακτικές Θεραπείες - Φυτοοιστρογόνα

Φυτοοιστρογόνα ονομάζονται οι μη στεροειδικές ενώσεις, οι οποίες απαντώνται στα φυτά και εκδηλώνουν οιστρογόνο δράση. Στα φυτοοιστρογόνα ανήκουν πολλές κατηγορίες χημικών ενώσεων μεταξύ των οποίων, ισοφλαβόνες, λιγνάνια, στιλβενοειδή, κουμεστάνες και λακτόνες ρεσορκυλικού οξέος, οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως οιστρογόνα μυκήτων, εξαιτίας της παραγωγής τους από τη μούχλα που βρέθηκε σε καλλιέργειες σιτηρών.

Η δομική ομοιότητα των φυτοοιστρογόνων με τα ενδογενή οιστρογόνα έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, στην αξιολόγησή τους ως εναλλακτική λύση για τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση προϊόντων πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από τον καρκίνο του προστάτη. Υπάρχουν επίσης έρευνες που δείχνουν το ρόλο των φυτοοιστρογόνων σε άλλες μορφές καρκίνου όπως ο καρκίνος του στομάχου, του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου. Επιπροσθέτως, αρκετές επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο των φυτοοιστρογόνων στη διαμόρφωση πολλών δεικτών καρδιαγγειακού κινδύνου [88].

Οι Κινέζοι και γενικότερα οι λαοί της Ασίας, που έχουν παράδοση χιλιάδων χρόνων στη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης, χρησιμοποιούν το ρίζωμα “*Drynariae*”, ένα παραδοσιακό κορεάτικο φάρμακο, ως ένα από τα κύρια συστατικά σε συνταγές για την αντιμετώπιση οστικών βλαβών [89]. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το υδατικό εκχύλισμα του φυτού αυτού προωθεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση [90] και η φυτοχημική του ανάλυση έδειξε ότι η δρόγη αυτή είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα, τα οποία κατέχουν σημαντική οιστρογονική δράση. Επιπροσθέτως, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ανδρικός Ασιατικός πληθυσμός εμφανίζει χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, ενώ οι γυναίκες αντιμετωπίζουν σαφώς λιγότερα προβλήματα κατά την εμμηνόπαυση (εφίδρωση, εξάψεις), γεγονός που οφείλεται στην υψηλή πρόσληψη φυτοοιστρογόνων, ιδιαίτερα ισοφλαβονών μέσω της διατροφής τους (κατανάλωση σόγιας), συγκριτικά με το Δυτικό πληθυσμό [91]. Η σόγια είναι γνωστή για τις οιστρογονικές ιδιότητές της [92, 93], ενώ άλλη μια γνωστή δρόγη, με οιστρογονικές ιδιότητες είναι το ρίζωμα του φυτού *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh) [94].

Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές για φυτά τα οποία, αν και δεν είναι γνωστά για ανάλογες δράσεις, φέρουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των κλασικών

φυτοοιστρογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το είδος *Astragalus membranaceus*, το οποίο περιέχει ισοφλαβονοειδή και έχει αποδειχτεί ότι εμποδίζει την ελάττωση της οστικής μάζας σε επίμυες που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή [95]. Αντίστοιχα δεδομένα παρουσιάστηκαν σε μια μελέτη, κατά την οποία το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Onobrychis ebenoides* (οικ. Leguminosae), το οποίο είναι πλούσιο σε βενζοφουράνια και ισοφλαβονοειδή, φάνηκε ικανό να εμποδίζει την απώλεια οστικής μάζας σε ωθηκεκτομηθέντες επίμυες [96].

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης και εκχυλίσματα θαλάσσιων οργανισμών που έχουν έντονη επίδραση στο οστό μέσω ενίσχυσης του σχηματισμού αλλά και καταστολής της απορρόφησής του. Αυτές οι οστεοπροστατευτικές επιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών μονοπατιών οδηγώντας σε ενεργοποίηση των οστεοβλαστών και αδρανοποίηση των οστεοκλαστών. Γνωστό για τη δράση του είναι το εκχύλισμα του *Padina ravnonica* με κύριο συστατικό τη δικτυόλη, το οποίο περιλαμβάνεται σε συμπληρώματα διατροφής κατά της οστεοπόρωσης, τα οποία φαίνεται να αυξάνουν την πρόσληψη και τη διατήρηση του ασβεστίου. Άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί με παρόμοια δραστηριότητα είναι οι *Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida*, *Sargassum horneri*, *Eiseniabicyclis*, *Cryptonemia scmitziana*, *Gelidium amansii* και *Ulva pertusa Kjellman*. Εκτός από τα θαλάσσια φύκια και σφουγγάρια, διάφορα κυανοβακτηρίδια, μικρόβια και άλλοι μικροοργανισμοί περιέχουν ουσίες που έχουν επίσης μεταβολική δράση στα οστά [97].

Πλήθος μελετών υποστηρίζουν ότι τα φυτοοιστρογόνα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικά θεραπευτικά εργαλεία όχι μόνο για την αντιμετώπιση των ανεπιθύμητων συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, αλλά και για τη διατήρηση της οστικής μάζας. Συγκριτικά με την κλασική θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, θεωρείται ότι εμφανίζουν λιγότερες παρενέργειες, αλλά τόσο το γεγονός αυτό, όσο και ο μηχανισμός δράσης τους θα πρέπει να διερευνηθούν περισσότερο με τη διεξαγωγή επιπλέον μελετών [98].

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες κατά τις οποίες η χορήγηση φυτοοιστρογόνων (ισοφλαβόνες σόγιας) σε πειραματόζωα φαίνεται να συνοδεύεται από σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες [99] και η παρατεταμένη χορήγησή τους είναι ικανή να προκαλέσει αδenoκαρκίνωμα ενδομητρίου, σταδίου-1 [100]. Οι McLachlan *et al.*, το 2006 διαπίστωσαν ότι η λήψη σημαντικής ποσότητας φυτοοιστρογόνων επηρεάζει την αύξηση του στήθους και της γαλουχίας, ενώ μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών της μήτρας όπως είναι η ενδομητρίωση. Μεταξύ των προβλημάτων κατά την χορήγηση φυτοοιστρογόνων,

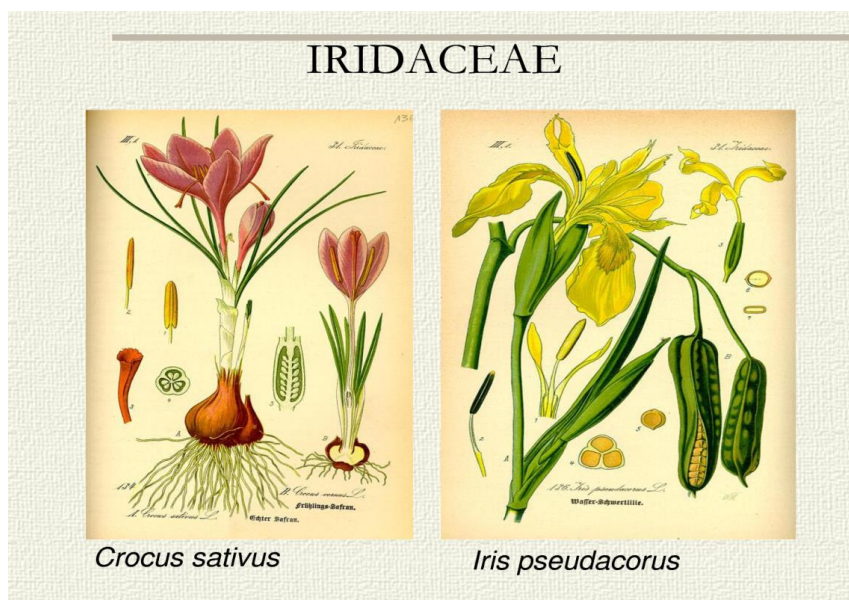
περιλαμβάνονται η έλλειψη αναλυτικών προδιαγραφών των σκευασμάτων, οι ανεπαρκείς μέθοδοι για τη μέτρηση των επιπέδων τους στα τρόφιμα, καθώς και η ατομική μεταβλητότητα του μεταβολισμού των πρόδρομων ουσιών που εισάγονται με τη διατροφή. Τέλος, υπάρχουν ολοένα και αυξανόμενες ενδείξεις των επιπτώσεων των οιστρογονικών ρυπαντών, η πρόσληψη των οποίων θα μπορούσε να προκαλέσει θηλεοποίηση του ανδρικού πληθυσμού [101].

3. Περιγραφή του γένους *Iris*

3.1. Οικογένεια Iridaceae

Η οικογένεια Iridaceae διαιρείται σε 3 υποοικογένειες, τα Κροκοειδή (Crocoidae), τα Ιριδοειδή (Iridoideae) και τα Ιξιοειδή (Ixioidae). Μεταξύ των γενών της οικογένειας περιλαμβάνονται τα γένη *Iris*, *Crocus*, *Gladiolus*, *Romulea*, *Ixia*, *Moraea* κ.ά.

Η οικογένεια των Ιριδοειδών ανήκει στην τάξη *Asparagales* και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γνωστών καλλιεργούμενων φυτών (φρέζια, γλαδιόλα, κρόκος). Τα υπόγεια μέρη αυτών των φυτών σχηματίζουν ριζώματα, βολβούς ή κόνδυλους, τα οποία χρησιμοποιούν σαν υπόγεια αποθησαυριστικά όργανα. Η οικογένεια των Ιριδοειδών αποτελείται από 75 γένη και περίπου 1.700 είδη από τα οποία τα περισσότερα είναι πολυετή φυτά και είναι ευρέως διαδεδομένα σε ολόκληρο τον κόσμο, ιδιαίτερα σε θερμές, εύκρατες και τροπικές περιοχές, όπως η Αφρική κι η Ευρώπη. Οι βολβοί, τα ριζώματα και οι κόνδυλοι αναπαράγονται μέσω βλάστησης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του φυτού *Crocus sativus* που ανήκει στην κατηγορία των τριπλοειδών φυτών, το οποίο είναι στείρο και δεν μπορεί να αναπαραχθεί εγγενώς. Έτσι, ο μόνος τρόπος για την αναπαραγωγή του είναι μέσω της διάσπασης και σποράς των βολβών του, οι οποίοι, αφού φυτευτούν δίνουν νέα φυτά.



3.1.1. Γένος *Iris*

Το γένος *Iris*, ανήκει στα αγγειόσπερμα μονοκοτυλήδωνα φυτά και περιλαμβάνει γύρω στα 300 είδη πολυετών ποών [102]. Το γένος είναι πολύ διαδεδομένο σε όλη τη βόρεια εύκρατη ζώνη. Συναντάται συχνότερα στην Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή, στη Βόρεια Αφρική, στην Ασία και σε ολόκληρη τη Βόρεια Αμερική. Οι ταξιανθίες έχουν σχήμα βεντάλιας και περιέχουν ένα ή περισσότερα συμμετρικά, εξάλοβα άνθη, τα οποία αναπτύσσονται με ή χωρίς ποδίσκο. Αποτελείται από τρία σέπαλα και τρία πέταλα, τα οποία στέκονται όρθια εν μέρει, πίσω από τη βάση των σεπάλων [103].

Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 15 είδη *Iris*, τα οποία κοινώς αποκαλούνται κρίνα. Τα ελληνικά είδη ίριδας είναι [103]:

- *Iris albicans* (*I. florentina*)
- *Iris attica* (*I. falcata*, *I. pumila* subsp. *attica*)
- *Iris germanica* (*I. pallida*, *I. trojana*)
- *Iris hellenica*
- *Iris orientalis* (*I. monnierin*, *I. ochroleuca*, *I. spuria* subsp. *ochroleuca*)
- *Iris planifolia*
- *Iris pseudacorus*
- *Iris reichenbachii* (*I. athoa*, *I. balkana*)
- *Iris sintenisii* subsp. *sintenisii*
- *Iris suaveolens* (*I. rubromarginata*)
- *Iris tuberosa*
- *Iris unguicularis*
- *Iris unguicularis* subsp. *angustifolia*
- *Iris unguicularis* subsp. *carica*
- *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (*I. cretensis*, *I. cretica*, *I. humilis*)

3.1.2. Είδος *Iris germanica*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Άθροισμα	Tracheophyta
Υπόάθροισμα	Spermatophytina
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Asparagales
Οικογένεια	Iridaceae
Γένος	<i>Iris</i> L.
Είδος	<i>Iris germanica</i> L.



Το είδος *Iris germanica* εμφανίζεται στην Ευρώπη και τη Ν.Α. Ασία και ενίοτε στη Β. Αφρική και Κ. Ασία. Είναι ένα πολυετές μονοκοτυλήδονο φυτό που μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 120 cm και σε πλάτος έως 30 cm. Οι ρίζες του, που έχουν διάμετρο περίπου 2,5 mm, μπορούν να εισχωρήσουν στο έδαφος σε βάθος έως 10 cm. Τα υπέργεια μέρη του φυτού περιοδικά ξηραίνονται, ενώ τα τμήματα που βρίσκονται κάτω από το έδαφος επιβιώνουν στις δυσμενείς περιόδους (χειμώνα ή καλοκαίρι στην περιοχή της Μεσογείου) και έτσι κατηγοριοποιούνται στα βολβώδη ή κονδυλώδη ή ριζωματώδη φυτά και στα αλόφυτα [103]. Η περίοδος άνθισής του είναι από Απρίλιο μέχρι Ιούνιο και τα λουλούδια του περιλαμβάνουν μια τεράστια ποικιλία χρωμάτων, έτσι δικαιολογείται και το όνομά του από την ελληνική λέξη «Ιρις» που σημαίνει ουράνιο τόξο. Στην Ελλάδα, η Ίριδα είναι γνωστή με τα ονόματα γαλάζιος κρίνος (γαλάζια άνθη), κρίνος, αγριόκρινος, καλατζιοχόρτι και ζαμπάκι (κυρίως στην Κύπρο) [104]. Τα φύλλα της είναι γραμμοειδή, μήκους έως 70 cm και πλάτους 3,5 cm με χρώμα πράσινο ανοιχτό, ενώ φυτρώνουν μόνο από τη βάση του φυτού. Σχηματίζει συνήθως 3 έως 5 μεγάλα και εντυπωσιακά άνθη που βγαίνουν στην κορυφή ενός υψηλού στελέχους. Έχουν χρώμα ανοιχτό μπλε προς ιώδες και αποτελούνται από τρία σέπαλα και τρία πέταλα. Τα πέταλα στέκονται όρθια, ενώ τα σέπαλα βρίσκονται στην εξωτερική μεριά του φυτού και γέρνουν προς τα κάτω. Τα άνθη των φυτών αυτών είναι τέλεια (τα αρσενικά και θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα βρίσκονται στο ίδιο άνθος) και επικονιάζονται με τη βοήθεια εντόμων (εντομόφιλα). Το έντονο χρώμα των άνθεων, καθώς και οι

αρωματικές ουσίες που παράγουν, βοηθούν στην προσέλκυση των εντόμων και κατά συνέπεια, στην αναπαραγωγή του φυτού. Η ωοθήκη βρίσκεται κάτω από το σημείο που ενώνονται τα πέταλα με τα σέπαλα. Ο στήμονας που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της γύρης, βρίσκεται στο εσωτερικό μέρος των σεπάλων και αποτελείται από τον ανθήρα και το νήμα. Ο ανθήρας χρησιμεύει στην παραγωγή και την αποθήκευση της γύρης και βρίσκεται συνήθως στην κορυφή του νήματος, το οποίο μοιάζει με πολύ λεπτή τρίχα.

3.2. Δρογοϊστορία



Το λουλούδι Ίρις πήρε το όνομα του από την αρχαία θεά Ίριδα, που ήταν η θεά του ουράνιου τόξου και αγγελιοφόρος των θεών, κυρίως του Δία και της Ήρας. Αυτή μετέφερε τα μηνύματα από το "μάτι του ουρανού" στη γη, χρησιμοποιώντας την καμπύλη του ουράνιου τόξου. Η λέξη ίρις σημαίνει "μάτι του ουρανού" και έτσι δόθηκε αυτό το όνομα στη θεά και εν συνεχεία στο λουλούδι και στην κόρη των ματιών μας.

Για το φυτό Ίρις υπάρχουν περιγραφές από την αρχαιότητα. Σύμφωνα με το Διοσκουρίδη, στο "Περί Ύλης Ιατρικής", η Ίρις φέρει φύλλα σαν μικρά στιλέτα αλλά, μεγαλύτερα, ευρύτερα και πιο παχιά. Τα λουλούδια στο μίσχο κάμπτονται το ένα πάνω στο άλλο και έχουν μεγάλη ποικιλία χρωμάτων, όπως άσπρο, μαύρο, ωχρό, μπλε ή γαλανό. Εξαιτίας του τόσο μεγάλου εύρους των χρωμάτων της, πήρε το όνομά της από το ουράνιο τόξο του παραδείσου.

ἴρις Ἰλλυρικὴ φύλλα φέρει ὅμοια
ξίφει, μείζονα δὲ καὶ πλατύτερα καὶ
λιπαρώτερα, ἄνθη ἐπὶ καυλῶν
παράλληλα, ἐπικαμπῆ, ποικίλα· ἢ γὰρ
λευκὰ [ἢ ὠχρὰ] ἢ μήλινα ἢ πορφυρᾶ ἢ
κυανίζοντα ὁρᾶται, ὅθεν διὰ τὴν
ποικιλίαν ἀπεικάσθη Ἰριδι τῆ οὐρανία.

Οι ρίζες της είναι δυνατές και γεμάτες κόμπους, αλλά έχουν γλυκιά γεύση και όταν κόβονται, πρέπει να ξηραίνονται σε σκιερό μέρος και να αποθηκεύονται ιδανικά σε λινό ύφασμα. Τα καλύτερα στελέχη προέρχονται από την Ιλλυρία και τη Μακεδονία και έχουν δυνατή ρίζα, απαλό κίτρινο χρώμα, ιδιαίτερο άρωμα και πολύ πικρή γεύση. Τα δεύτερα καλύτερα στελέχη προέρχονται από τη Λιβύη. Είναι λευκού χρώματος, πικρά στην γεύση, αλλά δεν έχουν τόσο δυνατές ρίζες, όσο τα προηγούμενα [105]. Οι ρίζες του φυτού είναι επίσης γνωστές για τις αρωματικές ιδιότητές τους. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν την ρίζα του φυτού στην αρωματοποιία, ενώ ο Πλίνιος και ο Θεόφραστος συνιστούσαν τις ρίζες για τον αρωματισμό του κρασιού και το αιθέριο έλαιο για την κακοσμία του στόματος.

Η Ίριδα ως μοτίβο εμφανίζεται από πολύ παλιά και στην τέχνη. Ένα από τα πρώτα γνωστά έργα της ίριδας είναι μια τοιχογραφία στο ανάκτορο του βασιλιά Μίνωα στην Κρήτη που χρονολογείται το 2.100 π.Χ.. Χρησιμοποιούνταν ως σύμβολο εξουσίας και η πιο διάσημη βασιλική χρήση της ήταν από τους βασιλείς της Γαλλίας, συμπεριλαμβανομένου του Λουδοβίκου XIV. Προσαρμόστηκε στο βασιλικό έμβλημα ως “Fleur de Lys”, και εξαφανίστηκε από τη γαλλική σημαία με την επανάσταση. Η Μεγάλη Βρετανία δανείστηκε επίσης το μοτίβο της ίριδας και ο Εδουάρδος III την τοποθέτησε στο βασιλικό οικόσημό του κατά τη διάρκεια του 14^{ου} αιώνα. Επίσης, ένας διάσημος πίνακας της Ελισάβετ Α΄ την δείχνει να φοράει φόρεμα κεντημένο με ίριδες [106]. Τέλος, η Ίριδα κατέχει τη δεύτερη θέση, μετά το τριαντάφυλλο σε διάφορα έργα τέχνης γνωστών ζωγράφων όπως ο Λεονάρντο Ντα Βίντσι, ο Ρενουάρ, ο Σεζάρ, Ο Βαν Γκόγκ και φυσικά, ο Κλοντ Μονέ.



«Ίριδες», Βαν Γκόγκ, 1889

3.3. Δρογοχημεία

3.3.1. Δευτερογενείς Μεταβολίτες του Γένους *Iris*

Λίγα είδη του γένους *Iris* έχουν μελετηθεί, εκ των οποίων τα *I. germanica*, *I. dichotoma*, *I. leptophylla*, *I. pallasi*, *I. pallida*, *I. suaveolens* και *I. tectorum*, αν και το γένος περιλαμβάνει, όπως προαναφέρθηκε περί τα 300 είδη.

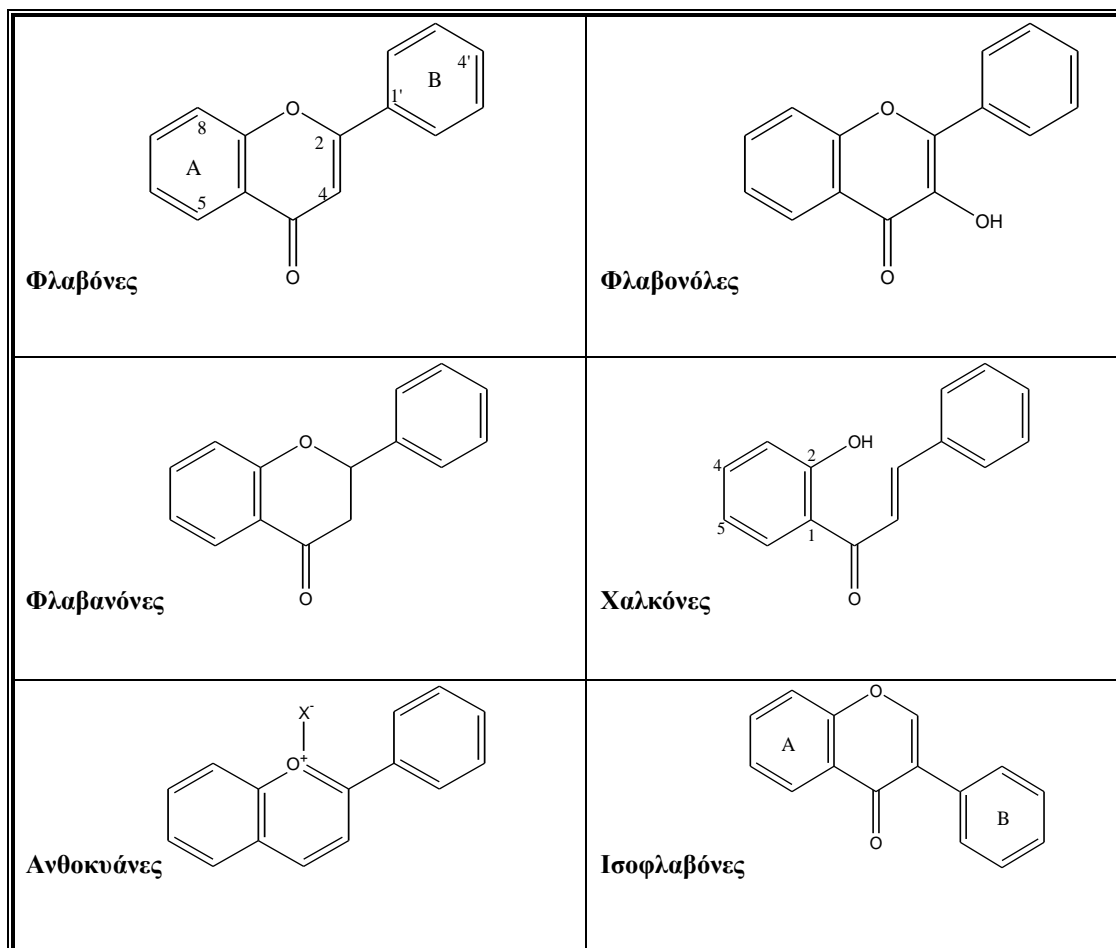
Από τα προαναφερόμενα φυτικά είδη έχουν απομονωθεί φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβόνες) [107, 108], κινόνες [109], ξανθόνες και C-γλυκοσίδες ξανθονών [110], απλά φαινολικά και βενζολικά παράγωγα [111], ορισμένα στεροειδή, γλυκοσίδες στιλβενίων [112] και τερπενοειδή τύπου ιριδάλης [113].

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, δηλαδή οργανικά συστατικά, χωρίς άμεση συμμετοχή στην ανάπτυξη ή την αύξησή τους [114]. Είναι πολυφαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών, των άνθων και των φύλλων, ενώ συνιστούν σημαντικό μέρος της διατροφής. Τα φλαβονοειδή είναι πολύ διαδεδομένα σε όλες τις οικογένειες των αγγειοσπέρμων, είτε υπό μορφή γενινών, είτε ως γλυκοσίδες, δηλαδή με κάποιο σάκχαρο συνδεδεμένο στο σκελετό της γενίνης. Η σύνδεση μπορεί να γίνει μέσω του -OH του αγλύκου, οπότε προκύπτουν οι O-γλυκοσίδες, αλλά και απευθείας με άτομο άνθρακα της γενίνης (δεσμός C-C) και προκύπτουν οι C-γλυκοσίδες. Τα πιο συχνά απαντώμενα σάκχαρα είναι η γλυκόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη, η γαλακτόζη και κάποιοι δισακχαρίτες [115].

Ο βασικός τους σκελετός αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη δύο αρωματικών δακτυλίων με 6 άτομα άνθρακα (δακτύλιοι A και B) που συνδέονται με μια γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα (δακτύλιος C) [116]. Θεωρούνται παράγωγα του φαινυλοπροπανίου (C6-C3) και προέρχονται από το συνδυασμό των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού οξέος και του οξικού οξέος. Οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών φλαβονοειδών οφείλονται στην παρουσία ή όχι διπλού δεσμού στο δακτύλιο, στην παρουσία 3-υδρόξυ ή 2-υδρόξυ ομάδων και στο είδος και στον αριθμό των υποκατάστατων των δακτυλίων A και B. Περισσότερες από 3.000 φλαβονοειδή

είναι γνωστά και απαντώνται στα ανώτερα φυτά. Στις λειχήνες και στο ζωικό βασίλειο δεν έχουν βρεθεί φλαβονοειδή μέχρι σήμερα, εκτός από μερικά φλαβονοειδή που βρέθηκαν στα φτερά μιας πεταλούδας. Επίσης, τα φύκη και οι μύκητες δε διαθέτουν τη δυνατότητα σύνθεσης φλαβονοειδών, με εξαίρεση το κοράλι *Echinophora lamellose* [117] και τους μύκητες *Aspergillus candidus* [118] και *Phalus impudicus* [119].

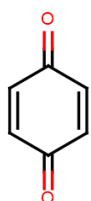


Κλάσεις φλαβονοειδών

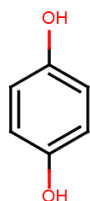
Τα φλαβονοειδή έχουν πολύ ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να προστατεύουν τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες, ενώ παράλληλα εμφανίζουν αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση [120]. Τα βιοφλαβονοειδή, σε συνδυασμό με τη βιταμίνη C, προστατεύουν και ενδυναμώνουν τα αιμοφόρα αγγεία.

Οι ισοφλαβόνες του γένους απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το *Iris florentina*, αλλά προσφάτως εντοπίστηκαν και στο *Iris pseudopumila*. Μέχρι το 1998, αναφέρεται ότι σε δεκαοχτώ είδη *Iris* είχαν παραχθεί 46 διαφορετικά άγλυκα ισοφλαβονοειδών, που αποτελεί ίσως τον μεγαλύτερο αριθμό ισοφλαβονοειδών σε ένα μόνο είδος μη ψυχανθών φυτών [121]. Οι ισοφλαβόνες συσσωρεύονται κυρίως στα ριζώματα, αλλά κάτω από ορισμένες συνθήκες, παράγονται και από τα φύλλα ορισμένων ειδών π.χ. *Iris pseudacorus* [122]. Δρουν προστατευτικά κατά του καρκίνου [123] και εμφανίζουν αντιβακτηριακή [124], αντιφλεγμονώδη [125] και ανασταλτική έναντι της cGMP- φωσφοδιεστεράσης δράση [126].

Κινόνες



p-βενζοκινόνη

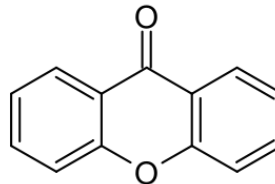


υδροξυκινόνη

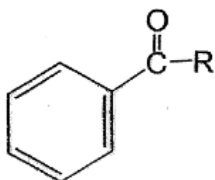
Οι κινόνες είναι μία ομάδα αρωματικών δικετονών, στις οποίες τα άτομα του άνθρακα των καρβονυλικών ομάδων αποτελούν μέρος του αρωματικού δακτυλίου. Προέρχονται από το βενζόλιο και τα παράγωγά του, με αντικατάσταση δύο ατόμων υδρογόνου από δύο άτομα οξυγόνου. Είναι σώματα κρυσταλλικά, με έντονη οσμή, και χαρακτηρίζονται από το έντονο κίτρινο ή κόκκινο χρώμα τους και από το γεγονός ότι ανάγονται εύκολα προς διϋδροφαινόλες. Τα δύο πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της ομάδας είναι η υδροκινόνη και η π-βενζοκινόνη.

Ξανθόνες

Οι ξανθόνες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ενώσεων στη χημεία των φυσικών προϊόντων. Έχουν απομονωθεί από ανώτερα φυτά, μύκητες, φτέρες και λειχήνες, ενώ διαθέτουν αξιοσημείωτες φαρμακολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν οι αντικαρκινικές ιδιότητες. Στα είδη *Iris* απαντώνται συνήθως με τη μορφή C-γλυκοσιδών [127].

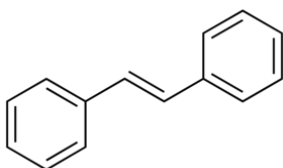


Απλά Φαινολικά και Βενζολικά παράγωγα



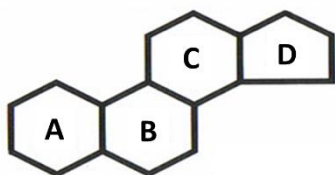
Τα φυτικά είδη του γένους *Iris* περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό απλών φαινολικών παραγώγων, τα οποία συνεισφέρουν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτών, ενώ επίσης συμβάλλουν και σε πολλές άλλες βιολογικές δράσεις [111]. Στην κατηγορία των παραγώγων του βενζολίου ανήκουν οι ακετοφαινόνες, οι οποίες απαντώνται σε διάφορα είδη *Iris*, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό τους έχει αναφερθεί στο ρίζωμα του *Iris germanica* [128].

Στιλβένια



Τα στιλβένια συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και παράγονται από φυτικούς οργανισμούς σε καταστάσεις κινδύνου, αποτελούν δηλαδή μέρος της άμυνας των φυτών. Απαντώνται ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, ενώ μεταξύ άλλων έχουν ανιχνευθεί στα σταφύλια, τα φυστίκια, τα όσπρια, τον ευκάλυπτο κ.ά.

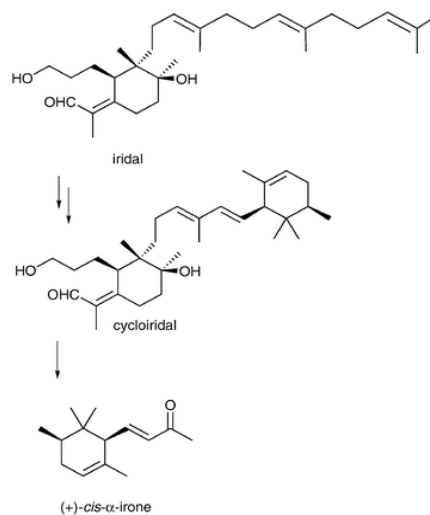
Στεροειδή



Ως στεροειδή χαρακτηρίζονται οι οργανικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν παράγωγα του κυκλοπεντανοϋπερυδρο - φαινανθρενίου. Αποτελούνται δηλαδή, από τους τρεις δακτυλίους του υπερυδροφαινανθρενίου (A, B και C), με τους οποίους συμπυκνώνεται ένας τέταρτος κυκλοπεντανικός δακτύλιος (D). Στα στεροειδή συγκαταλέγονται ενώσεις μεγάλης βιολογικής σημασίας, μεταξύ των οποίων είναι οι στερόλες, τα χολικά οξέα, οι ορμόνες του φύλου (οιστρογόνα και ανδρογόνα), παράγωγα της βιταμίνης D και το άγλυκο τμήμα των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών [129].

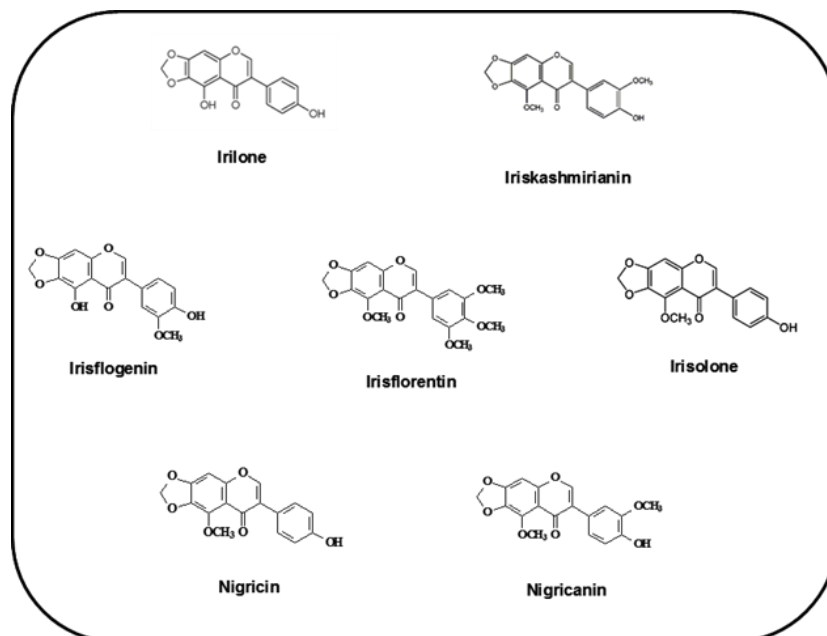
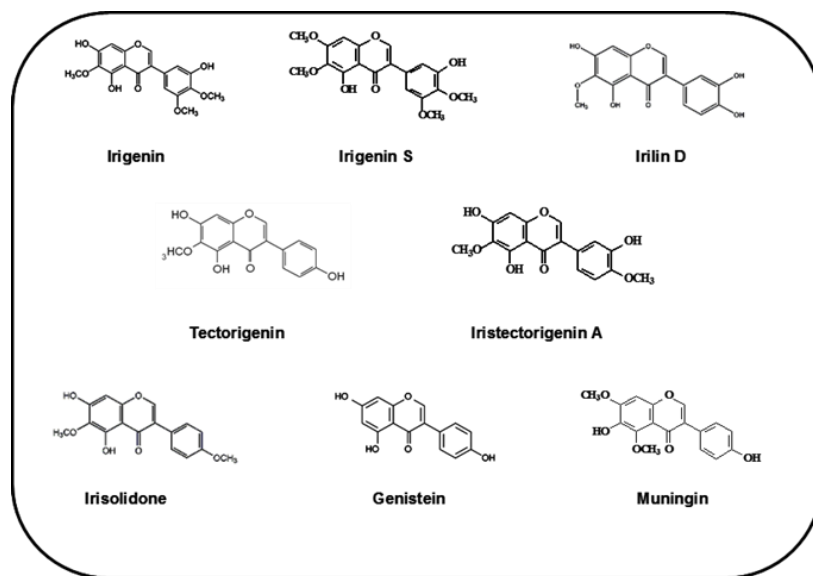
Τερπενοειδή

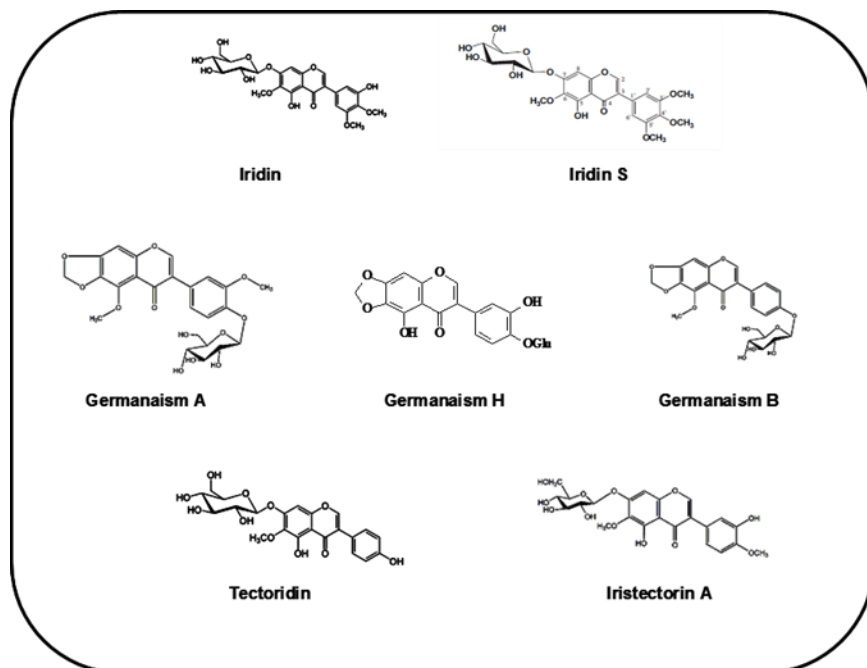
Τα φυτά του γένους *Iris* περιέχουν μια χαρακτηριστική ομάδα τριτερπενίων, τα οποία είναι γνωστά ως ιριδάλες [130]. Από το 1982, έχουν καταγραφεί περίπου 30 μέλη αυτής της κατηγορίας στο γένος *Iris* [123]. Μερικές από αυτές τις ενώσεις μετά από οξειδωτική διάσπαση μετατρέπονται στις αντίστοιχες ιρόνες, οι οποίες ευθύνονται για το χαρακτηριστικό άρωμα (όμοιο με εκείνο της βιολέτας) του αιθέριου ελαίου της ίριδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην αρωματοποιία [131]. Οι ιρόνες είναι αρωματικά συστατικά που απελευθερώνονται μετά από οξειδωτικές και μεταβολικές διαδικασίες αποικοδόμησης λιπών και ελαίων στο ρίζωμα των φυτών.



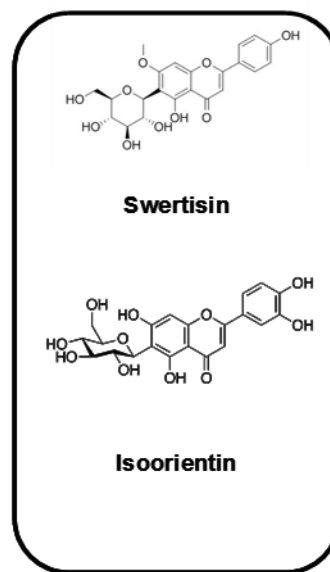
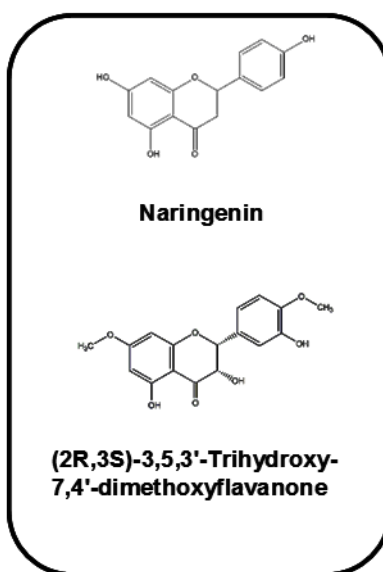
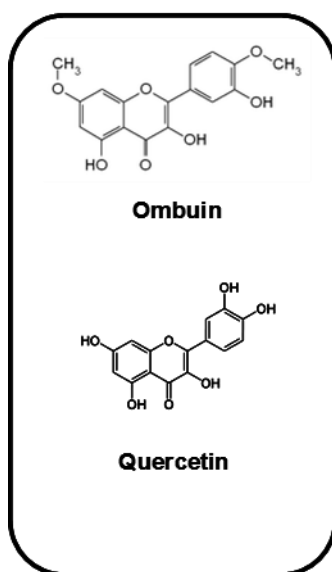
3.3.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες του είδους *Iris germanica*

Το *Iris germanica* είναι ένα είδος πολύ πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολίτες, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων συσσωρεύεται στις ρίζες και τα ριζώματα. Χαρακτηριστικό συστατικό των ριζωμάτων είναι οι ισοφλαβόνες, οι οποίες είτε διατηρούν τον κλασικό σκελετό των ισοφλαβονών, όπως οι ιριγενίνη, ιριλίνη κ.ά. είτε διαθέτουν μία μεθυλενοδιοξυμάδα μεταξύ των θέσεων 6 και 7, ενώ απαντώνται πολύ συχνά και με τη μορφή των αντίστοιχων γλυκοσιδών τους.

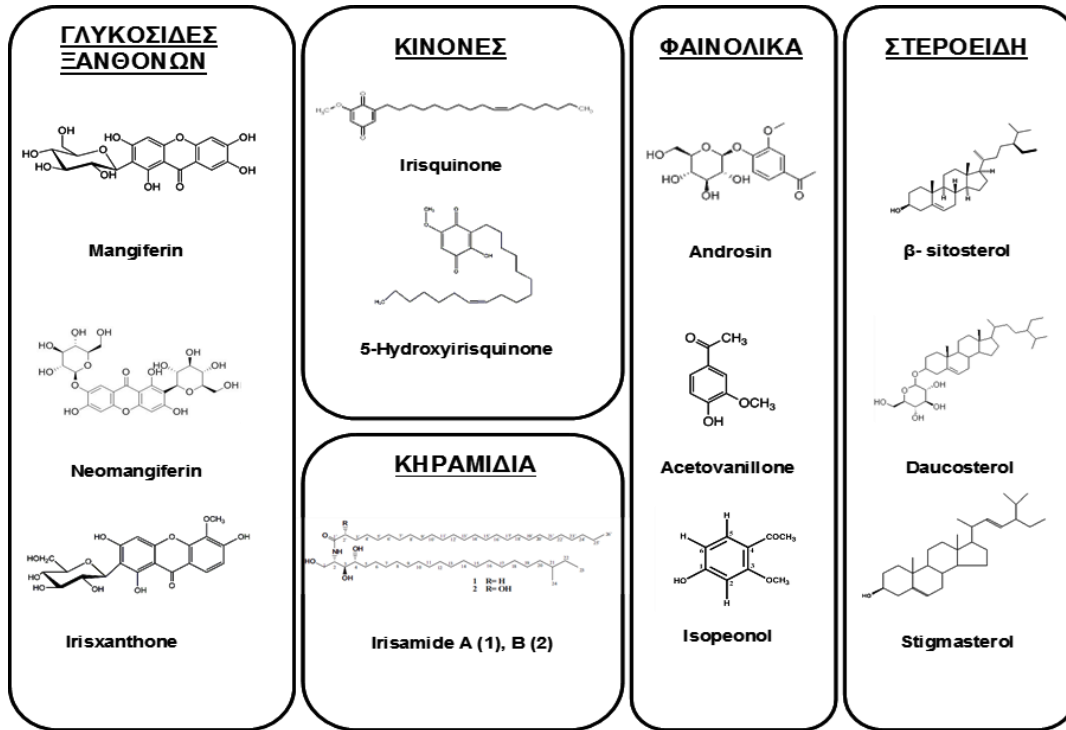




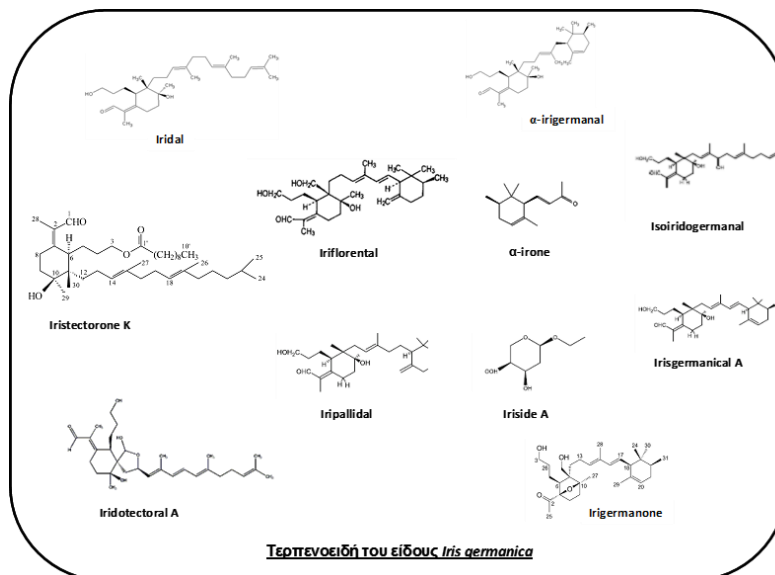
Άλλα παράγωγα φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από το είδος *Iris germanica* είναι φλαβανόνες (π.χ. η ναρινγκενίνη και η (2R,3S)-7,4'-διμεθοξυ-3,5,3'-τριυδροξυφλαβανόνη), φλαβονόλες (π.χ. η ομπουΐνη και η κερκετίνη), καθώς και γλυκοσίδες φλαβονών (π.χ. η σουερτισίνη και η ισοοριεντίνη).



Επίσης, στο είδος απαντώνται γλυκοσίδες ξανθονών, κινόνες, απλά φαινολικά και βενζολικά παράγωγα, στεροειδή και κεραμίδια.



Μια άλλη μεγάλη χημική κατηγορία που χαρακτηρίζει το γένος *Iris*, αλλά και το είδος *Iris germanica* είναι τα τερπενοειδή και πιο συγκεκριμένα τα παράγωγα τριτερπενίων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται παράγωγα ιριδαλών, ιρονών, ιριγερμαναλίων κ.ά.



3.4. Δρογοφαρμακολογία

3.4.1. Φαρμακολογικές και Βιολογικές δράσεις του *Iris germanica*

Στις ρίζες του *Iris germanica* όπως προαναφέρθηκε, παράγεται μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών, μεταξύ των οποίων κυρίως ισοφλαβόνες. Οι ισοφλαβόνες έχουν αντιοξειδωτικές [132] και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [133], ενώ μελέτες έδειξαν την κυτταροτοξική δράση ισοφλαβονών του *Iris germanica*, η οποία εκδηλώνεται μέσω αναστολής του κυτοχρώματος P450 [134]. Η αντιμεταλλαξιγόνο δράση πραγματοποιείται πιθανώς μέσω αναστολής του ισοενζύμου CYP1A, το οποίο εμπλέκεται στην μεταβολική μετατροπή προκαρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνες [120, 134].

Τα φλαβονοειδή που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν από αντιοξειδωτική δράση, η οποία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (DPPH) [135]. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις φαίνεται ότι καθυστερούν ή αποτρέπουν την οξείδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων μέσω αναστολής της έναρξης ή της διάδοσης της αλυσίδας των οξειδωτικών αντιδράσεων [136].

Εκτός από τα φλαβονοειδή, οι ιριδάλες που περιέχονται στα ριζώματα παρουσιάζουν επίσης κυτταροτοξική δράση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν έναντι ορισμένων τύπων καρκίνου στον άνθρωπο, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία [137].

Επιπλέον το μεθανολικό εκχύλισμα του ριζώματος του *I. germanica* παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση κατά των στελεχών των *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* και *Aspergillus flavus* [124, 133]. Για τις δράσεις αυτές φαίνεται ότι ευθύνονται τόσο τα φλαβονοειδή με τις αντισηπτικές τους ιδιότητες, όσο και οι ιρόνες, οι οποίες λόγω της μεγάλης τους τοξικότητας είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά βακτηριοκτόνα [138].

Άλλες μελέτες ανέδειξαν τις θεραπευτικές ιδιότητες του *I. germanica* κατά της πειραματικά προκαλούμενης υπερλιπιδαιμίας, υπερχοληστερολαιμίας και υπεργλυκαιμίας σε επίμυες. Η χορήγηση του αιθανολικού εκχυλίσματος των ριζών μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της LDL-χοληστερόλης του ορού, ενώ επηρέασε θετικά την αναλογία HDL-C/LDL-C, με αποτέλεσμα την μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου [139].

Μερικές από τις ενώσεις που περιέχονται σε διάφορα γένη *Iris*, από τις οποίες οι περισσότερες είναι φλαβονοειδή, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της α-γλυκοσιδάσης ή/και ικανότητα περιορισμού της πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης. Οι δράσεις αυτές έχουν ιδιαίτερη θεραπευτική σημασία κατά του διαβήτη τύπου-II και στο εγγύς μέλλον η αναστολή της πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης αναμένεται να αποτελέσει μία πολύ αποτελεσματική στρατηγική για τη διαχείριση των όψιμων διαβητικών επιπλοκών [112].

Μια ακόμη δράση που αποδίδεται στα τερπενοειδή του είδους είναι η ανθρολοσιακή. Πιο συγκεκριμένα, παράγωγα ιριδαλών έχουν εξεταστεί *in vitro* και *in vivo* ως προς τη δράση τους έναντι των *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vinckey*, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα των ιριδαλών είναι παρόμοια με αυτή του εκχυλίσματος του φυτού *Azadirachta indica*, το οποίο αποτελεί το κλασσικότερο παράδειγμα στη φυτοθεραπευτική αντιμετώπιση της ελονοσίας [140].

Τέλος, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν τη δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Iris pseudacorus*, ενός συγγενούς με το *Iris germanica* είδους, στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Το εκχύλισμα αυτό φαίνεται να ευνοεί *in vitro* την οστεοβλαστογένεση, μέσω της προώθησης του οστικού σχηματισμού και της ενίσχυσης της εναπόθεσης ανόργανων στοιχείων στη μήτρα του οστού, ενώ παράλληλα μειώνει τη δράση των οστεοκλαστών και κατ' επέκταση την οστική απορρόφηση. Με το τρόπο αυτόν, ο οστικός σχηματισμός υπερτερεί της οστικής απορρόφησης, με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής πυκνότητας και επιβράδυνση των συμπτωμάτων της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης [141].

3.4.2. Δράσεις και Χρήσεις στη Λαϊκή Θεραπευτική του *Iris germanica*

Η ίριδα είναι ένα φυτό το οποίο καλλιεργείται σε πολλές χώρες του Βόρειου Ημισφαιρίου ως διακοσμητικό φυτό, λόγω της μεγάλης ποικιλίας χρωμάτων του άνθους του, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία αρωμάτων, λόγω του ιδιαίτερου αρώματός του. Ωστόσο, έχει παρουσιάσει αξιόλογες θεραπευτικές ιδιότητες σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, καθώς τόσο οι ρίζες, όσο και τα φύλλα και τα άνθη του γένους είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες με ποικίλες βιολογικές δράσεις [142]. Οι θεραπευτικές ιδιότητες του είναι γνωστές από την εποχή του Διοσκουρίδη και περιγράφονται χαρακτηριστικά στο σύγγραμμά του “Περί Ιατρικής Ύλης” (THESAURUS LINGVAE GRAECAE®).

Πεδάνιος Διοσκουρίδης 'Περί Ιατρικής Ὑλης'

δύναμιν δὲ ἔχουσι πᾶσαι **θερμαντικήν, λεπτυντικήν, ἀρμόζουσαι πρὸς βῆχας καὶ τὰ δυσανάγωγα ὑγρὰ λεπτοποιούσαι.** καθαίρουσι δὲ **πάχη καὶ χολὰς** ποτιζόμεναι μεθ' ὕδρομέλιτος ὀλκή δραχμῶν ἑπτὰ. εἰσὶ δὲ καὶ ὑπνοποιοὶ καὶ δακρυοποιοὶ καὶ **στρόφους ἰώνται.** μετ' ὄξους δὲ πινόμεναι **θηριοδῆκτοις ἀρήγουσι καὶ σπληνικοῖς καὶ σπυμένοις** καὶ περιψυχομένοις ἢ ῥιγοῦσι καὶ τοῖς γόνον προιεμένοις, σὺν οἴνῳ δὲ ποθεῖσαι **ἄγουσιν ἔμμηνα.**

καὶ τὸ ἀπόζεμα δὲ αὐτῶν πρὸς γυναικείας πυρίας εὐθετον, **μαλάσσουν τοὺς τόπους καὶ ἀναστομοῦν,** ἰστιάδος τε ἔγκλυσμα, καὶ **συρίγγων καὶ κόλπων σαρκωτικόν.**

προστεθεῖσαι δὲ ὡς κολλύριον μετὰ μέλιτος **ἔμβρυα κατασπῶσι,** [καὶ] μαλάσσουν δὲ χοιράδας καὶ σκιρρώματα παλαιὰ ἐφθαὶ καταπλασθεῖσαι. ξηραὶ δὲ **πληροῦσιν ἔλκη** καὶ ἀνακαθαίρουσι μετὰ μέλιτος καὶ **τὰ ἐψιλωμένα τῶν ὀστέων σαρκούσιν.**

Τα μέλη της οικογένειας Iridaceae ἔχουν χρησιμοποιηθεῖ παραδοσιακά κατά του κρυολογήματος, της γρίπης, του πονόδοντου, της ελονοσίας και των αιματωμάτων [143], ενώ τα εἶδη του γένους *Iris* θεωροῦνται μεγάλης θεραπευτικῆς ἀξίας στην αντιμετώπιση του καρκίνου, των φλεγμονῶν, των βακτηριακῶν και των ιογενῶν λοιμώξεων [122]. Ἐχουν χρησιμοποιηθεῖ στην παραδοσιακή ιατρική ως μυοχαλαρωτικά καθὼς και για τη θεραπεία αναπνευστικῶν διαταραχῶν [111]. Τα ριζώματα του *Iris dichotoma* (που στα κινεζικά ονομάζεται “Bai She Gan” ἢ “Bai Hua She Gan”), ἔχουν χρησιμοποιηθεῖ στην παραδοσιακή Κινεζική ιατρική στη θεραπεία φλεγμονῶν και σε διαταραχές του αναπνευστικῶν συστήματος [144, 145], καθὼς και ως αντιπυρετικά και αποτοξινωτικά του οργανισμού [146]. Στην Τουρκική λαϊκή θεραπευτική, τα ριζώματα των ειδῶν της Ἴριδος ονομάζονται “navruz” ἢ “su sen” και ἔχουν εφαρμοστεῖ ως διουρητικά, ἄφουσα και καθαρτικά [147].

Το ριζώμα του *Iris germanica* ἔχει εφαρμοστεῖ τοπικά σε πληγές, για την απομάκρυνση των φακίδων του δέρματος [120], καθὼς και για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του πονόδοντου [148]. Τα αφεψήματα της ρίζας του φυτοῦ ἔχουν χρησιμοποιηθεῖ ευρέως ως αντισπασμωδικοί, ἐμμηναγωγοί, διουρητικοί και καθαρτικοί παράγοντες. Εἶναι γνωστό ὅτι μειώνουν την κινητικότητα των λειῶν μυϊκῶν ινῶν *in vivo* και εμφανίζουν ιδιότητες αναστολέων σεροτονίνης [125]. Επιπλέον, ἔχουν χρησιμοποιηθεῖ κατά των οιδημάτων και για την

αντιμετώπιση των συμπτωμάτων κρυολογήματος, δηλαδή ως αποχρεμπτικά, αντιβηχικά και αντικαταρροϊκά. Χρησιμοποιούνταν επίσης, για τη θεραπεία παθήσεων της χοληδόχου κύστεως, της διόγκωσης του ήπατος και ως αναλγητικά, σπασμολυτικά του γαστρεντερικού. Ορισμένα κείμενα αναφέρουν πως εάν ληφθούν με ξύδι, μπορεί να αντιμετωπίσουν το δάγκωμα δηλητηριωδών ζώων και τους σπασμούς, ενώ εάν ληφθούν με κρασί, αντιμετωπίζουν διαταραχές της εμμήνου ρύσης. Τέλος, τα αφεψήματα της ρίζας του φυτού έχουν παρουσιάσει δράση ήπιου ηρεμιστικού, αποτοξινωτικού και για τη θεραπεία αφροδίσιων νοσημάτων [105, 122].

B. Ειδικό μέρος

1. Υλικά και Μέθοδοι

1.1. Φυτοχημική επεξεργασία

1.1.1. Συλλογή φυτικού υλικού

Το μεγαλύτερο μέρος των φυτικών ειδών υπήρχε ήδη στη βοτανική συλλογή του εργαστηρίου (ΕΦΧΦΠ), 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. Εκχύλιση φυτικού υλικού με τη χρήση συσκευής επιταχυνόμενης εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction-ASE 300)

Η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE, 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 100 °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 θαλαμών-κελιών εκχύλισης (100 και 33 ml) όπου τοποθετούνται τα προς εκχύλιση δείγματα
- Δίσκος φιαλών συλλογής των παραγόμενων εκχυλισμάτων και οι εν λόγω φιάλες
- Ο 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 των 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 περισσότερων δειγμάτων με διαφορετικούς διαλύτες. Τέλος χαρακτηρίζεται ως «πράσινη» τεχνική μιας και είναι γρήγορη, γίνεται κατανάλωση μικρής ποσότητας διαλυτών και κατ' επέκταση προστατεύεται το περιβάλλον.

1.1.2.2. Εκχύλιση μεγάλης κλίμακας

Προκειμένου να είναι εφικτή η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από τα τελικώς επιλεγμένα εκχυλίσματα, αλλά και για να είναι δυνατή η χορήγηση του τελικού εκχυλίσματος *in vivo* στα πειραματόζωα, πραγματοποιήθηκε παρασκευή των εκχυλισμάτων σε μεγαλύτερη κλίμακα. Για το σκοπό αυτό οι δρόγες εκχυλίστηκαν με τους κατάλληλους διαλύτες με χρήση υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, σε 300g δρόγης προστέθηκε μεθανόλη και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση χωρίς θέρμανση σε υδατόλουτρο υπερήχων (Elma S 100H Elmasonic) και σε τρεις κύκλους των 30 λεπτών ο καθένας. Ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος μέχρι ξηρού, υπό κενό και ζύγιση του τελικού ξηρού εκχυλίσματος (απόδοση

~13%). Το χημικό φορτίο των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τη χρήση υπερήχων, ήταν ανάλογο με εκείνο των εκχυλισμάτων που παράχθηκαν με την μέθοδο ASE.

1.1.3. Χρωματογραφικές τεχνικές

Με σκοπό τον έλεγχο των φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και την απομόνωση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά χρωματογραφικών τεχνικών, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

1.1.3.1. Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography – Analytical TLC)

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

Η χρωματογραφική αυτή τεχνική παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικού κυρίως ελέγχου του χημικού περιεχομένου των ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους. Οι πλάκες μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, μεταφέρονται σε γυάλινους θαλάμους που έχουν ήδη κορεστεί 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 366 nm και τέλος εμφάνισή τους με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Το μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης παρασκευάζεται με την ανάμειξη ίσων όγκων διαλυμάτων 5 % βανιλίνη σε μεθανόλη και 5 % π.Η₂SO₄ 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 [149].

1.1.3.2. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography – Preparative TLC)

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).

Με την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι δυνατή η ποσοτική παραλαβή ενός ή περισσοτέρων δευτερογενών μεταβολιτών από ένα απλό μίγμα. 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 οξύδιο του πυριτίου με κατάλληλο διαλύτη.

1.1.3.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (High Performance Preparative Thin Layer Chromatography - HPTLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης αποτελεί μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική η οποία πλεονεκτεί έναντι της κλασικής TLC στην αναλυτική ικανότητα μελετών ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης πολύπλοκων δειγμάτων. Είναι απλή στο χειρισμό, επιτρέπει την ανάλυση πολλών δειγμάτων και επιπρόσθετα είναι σύντομη, επαναλήψιμη και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των δειγμάτων με πυκνομετρία.

Μετά την αναγνώριση των βέλτιστων συστημάτων ανάπτυξης με τη βοήθεια της αναλυτικής TLC, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής

απόδοσης (HPTLC) για να μελετηθεί το φυτοχημικό περιεχόμενο των υπό εξέταση δειγμάτων, καθώς και για την ανάπτυξη των παρασκευαστικών TLC. Η διάταξη συσκευών (CAMAG) που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

- Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού (εξασφαλίζεται ακρίβεια και επαναληψιμότητα)
- CAMAG TLC Scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και την λήψη φασμάτων απορρόφησης
- CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην χρωματογραφική πλάκα, ακολουθεί η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων σε ειδικούς θαλάμους με κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης και τέλος, η παρατήρησή τους στο ορατό και το υπεριώδες και η εμφάνισή τους με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης.



Συσκευή HPTLC με τα διάφορα μέρη της

1.1.3.4. Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (LC)

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 συνέχεια 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.

1.1.3.5. Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20)

Και σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιείται ανοιχτή γυάλινη στήλη, αλλά δεν εφαρμόζεται καθόλου πίεση. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης (Sephadex LH-20) με μέγεθος κόκκων 25-100 μ.. Πριν από τη χρήση αφέθηκε να διογκωθεί η δεξτράνη με το διαλύτη έκλουσης και ακολούθως, μεταφέρθηκε στη στήλη και έγινε έκπλυση 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.

1.1.3.6. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 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, ενώ 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) [150]. Έτσι, μεταβολίτες οι οποίοι φέρουν χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ανιχνευθούν με αυτή την τεχνική και να προκύψει ένα πλήρες και αξιόπιστο φυτοχημικό προφίλ για κάθε δείγμα. Επιπλέον, πλεονέκτημα του ανιχνευτή φωτοδιόδων είναι η δυνατότητα προσδιορισμού της καθαρότητας της κάθε κορυφής (peak purity) [151], 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
- Απαερωτή (degasser) SpectraSystem 1000
- Αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000
- Ανιχνευτή 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, αντιστρόφου φάσεως (Discovery) και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Chromquest 4.1.

1.1.3.7. Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC)

Η μέθοδος της χρωματογραφίας κατ' αντιρροή περιλαμβάνει δύο βασικούς τύπους, οι οποίοι διακρίνονται από τον τρόπο που επιτυγχάνεται η ισορροπία στο σύστημα. Απαντώνται το σύστημα Υδροστατικής Εξισορρόπησης (HSES) και το σύστημα Υδροδυναμικής Εξισορρόπησης (HDES). Η συσκευή του εργαστηρίου μας είναι "Kromaton FCPC" του δεύτερου τύπου και η μέθοδος διαχωρισμού είναι γνωστή ως φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής.



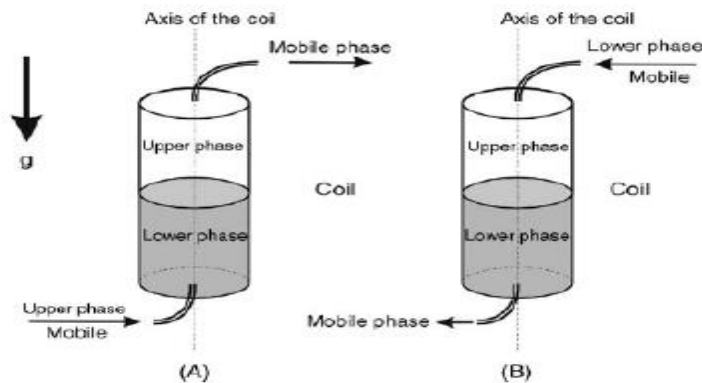
Συσκευή KROMATON FCPC



Διάταξη πρώτων συσκευών CCC

Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (Fast Centrifugal Partition Chromatography, FCPC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μία 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 δείγμα), 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 δυο 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.



Αρχή λειτουργίας της μεθόδου χρωματογραφίας κατανομής με Φυγοκέντριση

Οργανολογία: 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 οποία 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 πίεσης. Τα χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Η 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
- Η 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
- Η κλιμάκωση, μιας και με την ίδια συσκευή και διαφορετικές στήλες μπορούν να αναλυθούν από χιλιόγραμμα μέχρι γραμμάρια
- Το χαμηλότερο κόστος, στο οποίο περιλαμβάνονται οι διαλύτες που είναι κατά 10-50% λιγότεροι από ότι στην υγρή χρωματογραφία
- Ο ασφαλής χειρισμός, μιας και η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε στεγανοποιημένη ατσάλινη διάταξη, μειώνοντας τις πιθανότητες ατυχημάτων και απώλειας διαλυτών.

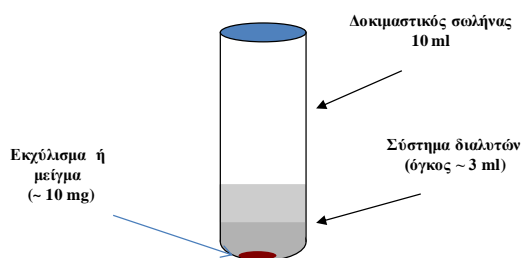
Επιλογή και Έλεγχος Διφασικών Συστημάτων

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)

Πρώτο και βασικό στάδιο της διαδικασίας επιλογής συστήματος αποτελεί ο βιβλιογραφικός έλεγχος και συγκεκριμένα η αναζήτηση συστημάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομόνωση ουσιών που ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες με αυτές που περιέχονται στο προς ανάλυση δείγμα, καθώς και η ερευνητική εμπειρία στο συγκεκριμένο πεδίο. Στη συνέχεια, τα συστήματα που επιλέχθηκαν μπορεί να ελεγχθούν, είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), είτε με χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC).

Στο δεύτερο στάδιο, τα συστήματα που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία ή δημιουργήθηκαν από τον ερευνητή υπόκεινται σε δύο κύριους ελέγχους με στόχο να διαπιστωθεί η καταλληλότητά τους στο διαχωρισμό του προς μελέτη εκχυλίσματος ή μείγματος ουσιών. Ο πρώτος έλεγχος έχει ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την ικανότητα διάλυσης του μείγματος, την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων. 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.



Σχηματική παράσταση προετοιμασίας δείγματος

Με τον δεύτερο έλεγχο γίνεται 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.

$K_x = \frac{C_x \alpha}{C_x \beta} = \frac{E_x \alpha}{E_x \beta}$	<p>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</p>
---	---

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 έκλυσης των ουσιών, όσο και τον όγκο της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση κάποια ουσία.

Η εύρεση των συντελεστών κατανομής αποτελεί σημαντικό στάδιο στην διαδικασία επιλογής συστήματος. Έτσι είναι απαραίτητος ένας αρχικός έλεγχος ρουτίνας, με σκοπό να μειωθεί ο αριθμός των συστημάτων για τα οποία θα προχωρήσουμε στην εύρεση των συντελεστών

κατανομής. Την δυνατότητα αυτή μας την παρέχει η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), με την οποία 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). Η χρησιμοποίηση της παραπάνω τεχνικής προϋποθέτει ότι οι ουσίες απορροφούν στο υπεριώδες. Για την εύρεση των συντελεστών κατανομής ουσιών οι οποίες δεν απορροφούν στο υπεριώδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά άλλες τεχνικές όπως Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (LC-MS), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Ανιχνευτή Σκέδασης Φωτός κ.ά.

Τέλος στην περίπτωση μειγμάτων άπολων ή πτητικών συστατικών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και την Αέριο Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS), προκειμένου να υπολογίσουμε τους συντελεστές κατανομής. Και στην περίπτωση αυτή η επιφάνεια κορυφής μιας ουσίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της.

1.1.4. Φασματοσκοπικές τεχνικές

1.1.4.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κυρίως τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Πιο συγκεκριμένα τα απομονωμένα συστατικά των εκχυλισμάτων, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή 'rotavapor' και την εφαρμογή υψηλού κενού, επαναδιαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες ανάλογα με την πολικότητά τους. Στη συνέχεια, στα παρασκευαζόμενα διαλύματα πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας (1D-NMR) και δύο διαστάσεων (2D-NMR). Η λήψη των φασμάτων μιας διαστάσεως $^1\text{H-NMR}$ και δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum



Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), 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 διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD), το δευτεριωμένο διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO-D₆), το δευτεριωμένο ύδωρ (D₂O) 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. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλής) και m (πολλαπλή). Ακολούθησε σύγκριση των πειραματικών τιμών με δεδομένα της βιβλιογραφίας.

1.1.4.2. Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Η Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (LC-MS) 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 αερίου (συνηθώς N₂), (β) τα ιόντα που έχουν προσχηματισθεί στο διάλυμα που ενίεται, περνούν με τη διαδικασία αυτή στην αέρια φάση και εισέρχονται στο φασματομέτρο μάζας που απαιτεί υψηλό κενό.

Οργανολογία

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

- Σύστημα υγροχρωματογραφίας 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.

1.2. *In vitro* πειραματική διαδικασία

Η *in vitro* πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας (ΕΜΕ) του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), υπό την εποπτεία του υπεύθυνου του εργαστηρίου. Το Διοικητικό Συμβούλιο του ΕΙΕ αποδέχτηκε το αίτημα του υπευθύνου του ΕΜΕ και χορήγησε άδεια για τη χρήση των εγκαταστάσεων του για την πραγματοποίηση των *in vitro* πειραμάτων που περιγράφονται στις ενότητες 4 και 6.

1.2.1. Υλικά

Τα κοινά χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, αλλά και το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και τα υλικά της κυτταροκαλλιέργειας (MEM, D-MEM, L-γλουταμίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, τρυψίνη, και όξινο ανθρακικό νάτριο) προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich (Germany). Επίσης, από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Germany) ήταν το υπόστρωμα p-nitrophenyl phosphate, το β-glycerophosphate, η χρωστική αλιζαρίνης και kit ανίχνευσης TRAP [Acid phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit, 387A].

Το θρεπτικό υλικό a-MEM, το ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ο ορός έμβριου βοός (FBS) προμηθεύτηκαν από την Gibco (Invitrogen, USA), ενώ ο ορός έμβριου 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.

1.2.2. Ειδικές επεξεργασίες υλικών

1.2.2.1. Επεξεργασία ορού έμβριου βοός (FBS) για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών

Όπως περιγράφεται λεπτομερώς στις επόμενες παραγράφους, στους ελέγχους οιστρογονικότητας ήταν απαραίτητα 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 (Dextran Coated Charcoal-FBS, DCC-FBS). Πιο συγκεκριμένα, ο ορός επώαστηκε 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 προκύπτον 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.

1.2.2.2. Θερμική κατεργασία ορού έμβριου βοός (FBS)

Στα πειράματα που απαιτούνταν συνθήκες απουσίας αυξητικών παραγόντων, τα κύτταρα έπρεπε να καλλιεργηθούν με ορό που είχε πρότινος υποστεί θερμική κατεργασία (Heat Inactivated FBS, HI-FBS). Πιο συγκεκριμένα, ο ορός επώαστηκε για 30 min στους 56 °C, όπως περιγράφεται από την GE Healthcare HyClone™.

1.2.3. Κυτταρικές σειρές

- 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 ασκитικό όγκο που προκλήθηκε σε άρρενες ποντικούς από τον ιό της λευχαιμίας Abelson, με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ώριμους οστεοκλάστες (ATCC® TIB-71™)

1.2.4. Χειρισμοί κυττάρων

1.2.4.1. 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 αερίου CO₂ 5%. Τα ακριβή υλικά και οι συνθήκες καλλιέργειας της κάθε κυτταρικής σειράς περιγράφονται στη συνέχεια.

Κυτταρική σειρά MCF-7: Τα κύτταρα MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης, συμπληρωμένο με 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βόως (FBS, Fetal Bovine Serum), 1 mg/l 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 πενικιλίνη 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 πενικιλίνη 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 πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και εμπλουτισμένο με 10% FBS με χαμηλά ποσοστά ενδοτοξινών που έχει υποστεί θερμική κατεργασία (HI-FBS), όπως περιγράφεται στην § 1.2.2.2. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πυκνότητα περίπου 70% (κάθε 2-3 ημέρες), πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειά τους, μέσω μηχανικής αποκόλλησής τους (scraping).

1.2.4.2. Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7

Προκειμένου να προσδιοριστεί η οιστρογόνας/αντιοιστρογόνας δράση των δειγμάτων, αξιολογήθηκε η 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]methylum 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. Συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν 4×10^3 κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επώαστηκαν για 24 ώρες στο προαναφερόμενο θρεπτικό υλικό, προκειμένου να υπολογιστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός την 1^η ημέρα (DAY-1) και να χρησιμοποιηθεί ως control. Παράλληλα, σε δεύτερη πλάκα επιστρώθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων και την 1^η ημέρα έγινε η

προσθήκη των υπό εξέταση δειγμάτων, διαλυμένων σε 0.1% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν 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 50μl 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).

1.2.4.3. Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa

Προκειμένου να αξιολογηθεί η οιστρογόνος/αντιοιστρογόνος 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 p-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 [152, 153].



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 12×10^3 κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επώασθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη των υπό εξέταση δειγμάτων και επώαση για 72 ώρες. Για τον προσδιορισμό της καταστολής της επαγόμενης από την οιστραδιόλη έκφρασης της AlkP, τα κύτταρα επώασθηκαν με το υπό εξέταση δείγμα παρουσία οιστραδιόλης 0.1 nM (μετεμνηνοπαυσιακή συγκέντρωση), για το προαναφερόμενο χρονικό διάστημα. 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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 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 κρούς διαλύματος υποστρώματος, το οποίο περιείχε 5 mM φωσφορικό εστέρα της π-νιτροφαινόλης (pNPP), 0.24 mM MgCl₂ και 1 M διαιθανολαμίνης (pH 9.8). Στην περίπτωση προσδιορισμού της οιστρογόνου δράσης των δειγμάτων, τα κύτταρα που επώασθηκαν μόνο με διαλύτη (0.1% DMSO) αποτέλεσαν το δείγμα αναφοράς (C), ενώ τα κύτταρα που επώασθηκαν με 1 nM οιστραδιόλης (E₂) αποτέλεσαν το θετικό δείγμα αναφοράς. Αντίστοιχα, στην περίπτωση προσδιορισμού της αντιοιστρογόνου δράσης των δειγμάτων, τα

κύτταρα που επώασθηκαν μόνο με διαλύτη (0.1% DMSO) αποτέλεσαν το δείγμα αναφοράς (C), ενώ τα κύτταρα που επώασθηκαν με φουλβεστράνη (ICI), παρουσία οιστραδιόλης αποτελούν το θετικό δείγμα αναφοράς (πλήρης καταστολή). 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”.

1.2.4.4. 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.

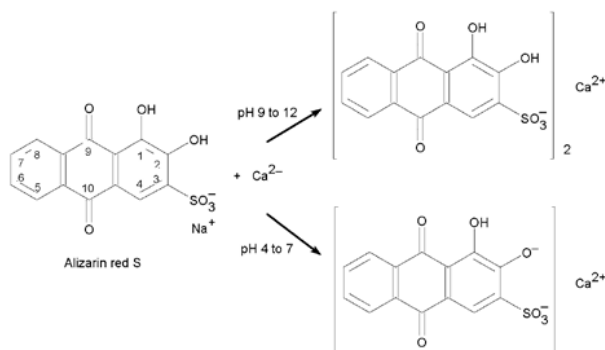
Αρχή της μεθόδου: Η αρχή της μεθόδου που οδηγεί στον προσδιορισμό της έκφραση της AlkP έχει περιγραφεί στην § 1.2.3.3.

Πειραματική διαδικασία: Κατά την πειραματική διαδικασία 3.3×10^3 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 επώασθηκαν 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 διαφοροποίηση (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 § 1.2.3.3.

1.2.4.5. Προσδιορισμός της απόθεσης φωσφορικού ασβεστίου στα κύτταρα MC3T3-E1

Η διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες, υπό την επίδραση των υπό εξέταση δειγμάτων, πιστοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης ασβεστίου, το οποίο δεσμεύεται από τα κύτταρα σχηματίζοντας επιμεταλλωμένα οξείδια (mineralization). Η ανίχνευση της απόθεσης των κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου (υδροξυαπατίτης) προσδιορίζεται με τη χρώση αλιζαρίνης (Alizarin Red Staining, ARS), κατά το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των κυττάρων.

Αρχή της μεθόδου: Η χρωστική ερυθρό της αλιζαρίνης είναι ένα σουλφονικό μετά νατρίου άλας ανθρακινόνης, του οποίου το ανιόν έχει την ικανότητα να δημιουργεί χηλική ένωση με ιόντα ασβεστίου, χρωματίζοντας τις περιοχές που έχουν υποστεί επιμετάλλωση κόκκινες σε όξινο έως ουδέτερο pH.



Πειραματική διαδικασία: Κατά την πειραματική διαδικασία 3.3×10^3 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 επώασθησαν για 24 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 21 ημέρες με το υλικό του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη 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 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 διαφοροποίηση (C + Δ.Π.) διαλυμένα σε 0.1% σε DMSO. Τα θρεπτικά υλικά ανανεωνόταν κάθε τρεις ημέρες και στο τέλος των 21 ημερών πραγματοποιήθηκε χρώση ARS όπως έχει περιγραφεί από τους Gregory C.A. *et al*, 2004 [154]. Αναλυτικότερα, μετά από 21 ημέρες καλλιέργειας έγινε έκπλυση των κυττάρων, δύο φορές με PBS και μονιμοποίησή τους με διάλυμα αιθανόλης 70%, για 15 min στον πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκε η χρώση αλιζαρίνης (40 mM, pH 4.2) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένα από το φως. Ακολούθησε έκπλυση της χρώσης δύο φορές με απεσταγμένο νερό και μια φορά με PBS και η απόθεση φωσφορικού ασβεστίου πιστοποιήθηκε σε αυτό το στάδιο με φωτογράφιση των κυττάρων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Στη συνέχεια, η παραγόμενη χρωστική εκχυλίστηκε με προσθήκη διαλύματος οξικού οξέος 33% και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του προκύπτοντος διαλύματος στα 405 nm χρησιμοποιώντας συσκευή φωτομέτρησης Safire II (TECAN).

1.2.4.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των 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 (Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP), 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. Η αντίδραση της TRAP με το pNPP που θα οδηγήσει στην παραγωγή του χρωμογόνου παραγώγου είναι ίδια με εκείνη της αλκαλικής φωσφατάσης, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο.

Πειραματική πορεία: Τα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Πιο συγκεκριμένα, 9.6×10^3 κύτταρα RAW264.7 επιστρώθηκαν σε κάθε θέση της πλάκας και

παρέμειναν σε θρεπτικό υλικό alpha-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.).

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 MgCl₂, 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 °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).

1.2.4.7. Προσδιορισμός της επαγωγής της οστεοκλαστογένεσης με χρώση της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP)

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των ενώσεων να παρεμβαίνουν στην διαφοροποίηση των μακροφάγων κυττάρων σε οστεοκλάστες, εκτός του ποσοτικού προσδιορισμού της TRAP, όπως περιγράφηκε στην § 1.2.4.6, πραγματοποιήθηκε και χρώση των κυττάρων με διάλυμα Naphthol, προκειμένου να πιστοποιηθεί η δημιουργία πολυπύρηνων ώριμων οστεοκλαστών.

Αρχή της μεθόδου: Η TRAP που εκκρίνεται από τους ώριμους οστεοκλάστες καταλύει την υδρόλυση της φωσφορικής α-ναφθόλης, απελευθερώνοντας α-ναφθόλη ικανή να αντιδρά με το άλας του 2-methyl-4-([2-methylphenyl]azo)benzenediazonium (GBC) και να σχηματίζει αδιάλυτη ένωση πορφυρού χρώματος. Με σκοπό τον προσδιορισμό μόνο της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό, χρησιμοποιείται τρυγικό οξύ, το οποίο αναστέλλει τη δράση ισοενζύμων όξινων φωσφατασών που είναι ευαίσθητα στο τρυγικό.

Πειραματική πορεία: Η πειραματική διαδικασία έχει περιγραφεί στην παράγραφο 1.2.4.6. Τα κύτταρα επώάζονται με τα υπό εξέταση δείγματα για τρεις ημέρες και με τη λήξη της επώασης πραγματοποιείται έκπλυση με PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα χαλαρά προσδεμένα κύτταρα και χρώση της TRAP, όπως περιγράφεται στο Acid phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit της εταιρείας Sigma. Πιο συγκεκριμένα, μετά την έκπλυση των κυττάρων ακολούθησε μονιμοποίησή τους με χρήση του διαλύματος “Fixative solution” (6.75 mM Citrate, 65% Acetone, 2.96% Formaldehyde), έκπλυση με PBS και επώαση των κυττάρων για 10 min στους 39 °C με το διάλυμα χρώσης TRAP (1.25 mg Naphthol, 75 mM Acetate, 0.1 g Tartrate, 0.7 mg Fast Garnet, 1.38 mg Sodium Nitrate). Στο τελευταίο στάδιο, απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης και προστέθηκε διάλυμα γλυκερόλης 50% σε PBS, με σκοπό τη διατήρηση των κυττάρων και φωτογράφησή τους σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

1.3. *In vivo* πειραματική επεξεργασία

1.3.1. Ζωικά πρότυπα: στέγαση και ομάδες

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». Το εργαστήριο πληροί 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.

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 28 θηλυκοί ενήλικοι επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 10 μηνών και βάρους 300 ± 50 g, οι οποίοι αποκτήθηκαν από την καταχωρημένη μονάδα αναπαραγωγής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Οι επίμυες στεγάστηκαν σε ομάδες των τεσσάρων ανά κλωβό, κάτω από πρότυπες εργαστηριακές συνθήκες στο χώρο φύλαξης πειραματοζώων και υπό την πλήρη εποπτεία του αρμόδιου κτηνιάτρου. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του χώρου διατηρούνταν σταθερή μεταξύ 19 °C και 22 °C, η σχετική υγρασία μεταξύ 55% και 65% και πραγματοποιούνταν 15 πλήρεις εναλλαγές αέρα/ώρα και 12 ώροι κύκλοι ημέρας/νύκτας, από 6^η πρωινής έως 6^η απογευματινής. Μετά από επτά ημέρες εγκλιματισμού έγινε μέτρηση των σωματικών βαρών και οι επίμυες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες:

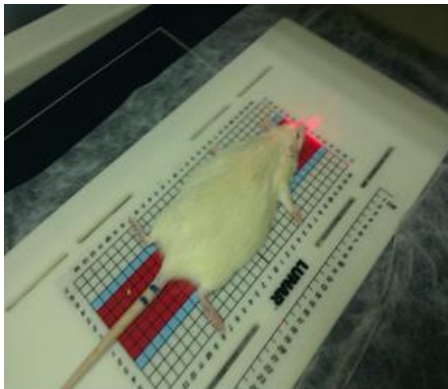
- ομάδα ελέγχου (CONTROL), αποτελούμενη από 8 επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε εικονική παρέμβαση και δεν λάμβαναν φαρμακευτική παρέμβαση
- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων χωρίς θεραπευτική παρέμβαση (OVX), των 10 πειραματοζώων
- ομάδα ωοθηκεκτομηθέντων, στους οποίους χορηγούνταν το φυτικό εκχύλισμα (OVX+IUCM), αποτελούμενη από 10 επίμυες

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

1.3.2. Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Σε όλα τα πειραματόζωα προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα (BMD) με απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-X (Dual Energy X-ray Absorptiometry/DEXA) κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε τον 3^ο μήνα και πριν την ευθανασία (6^ο 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.

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%.



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

1.3.3. 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 με τομή του δέρματος στη μέση γραμμή, στο ουραίο τρίτο της απόστασης μεταξύ ομφαλού και ηβοϊσχιακής σύμφυσης.

1.3.4. Χορήγηση φαρμακευτικής παρέμβασης

Την επόμενη ημέρα της ωοθηκεκτομής άρχισε η χορήγηση του εκχυλίσματος, το οποίο ήταν διαλυμένο στο πόσιμο νερό της ομάδας παρέμβασης, ενώ η ομάδα ελέγχου (C) και η OVX λάμβανε μόνο νερό. Το εκχύλισμα IUCM 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.

1.3.5. Ευθανασία, συλλογή οργάνων

Η ευθανασία των πειραματόζωων 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 °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 αποθηκεύτηκαν στους -80 °C για διενέργεια ιστολογικών εξετάσεων, κάποιιοι δε από αυτούς και σε διάλυμα φορμόλης για παθολογοανατομική επεξεργασία, ώστε να ελεγχθεί πιθανή τοξικότητα των φαρμακευτικών παρεμβάσεων. Η δεξιά κνήμη μετά την απομάκρυνση των περιβαλλόντων ιστών αποθηκεύτηκε σε αιθανόλη 70%, ενώ η αριστερή σε διάλυμα φορμόλης για να ακολουθήσουν τοπογραφικές και ιστομορφομετρικές μετρήσεις,

αντίστοιχα. Το αριστερό και το δεξί μηριαίο οστό αποθηκευθήκαν σε γάζες εμποτισμένες με φυσιολογικό ορό στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, για να ακολουθήσουν μετρήσεις εμβιομηχανικών παραμέτρων των δοκιμίων.

1.3.6. Μετρήσεις περιφερική Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT)

Μετά την ευθανασία, οι δεξιές κνήμες των πειραματόζων αξιολογήθηκαν σε συσκευή περιφερικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας (Norland-Stratec XCT 2000), που βρίσκεται στο “Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος”. Οι *ex vivo* μετρήσεις των οστικών δοκιμίων έγιναν μετά από τοποθέτησή τους σε κλειστούς δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 70% αιθανόλη, για προσομοίωση των γύρω μαλακών μορίων και κατόπιν στο κέντρο του τοπογραφικού πεδίου του μηχανήματος pQCT. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε απόσταση 3 mm, 4 mm και 20 mm από την γραμμή αναφοράς (εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης). Οι θέσεις των τομών έγιναν μετά από τη σάρωση ολόκληρου του μήκους του οστικού δοκιμίου.



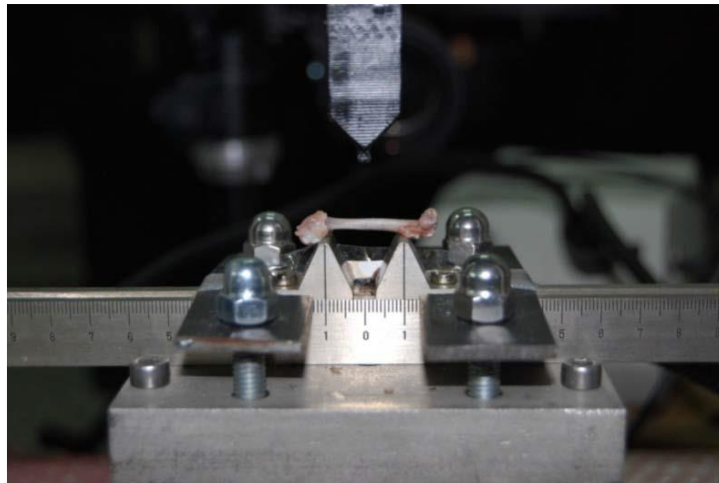
Διάταξη συσκευής pQCT

1.3.7. Δοκιμές μηχανικής αντοχής των οστών

Η *ex vivo* πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής Αντοχής, της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), υπό την εποπτεία του υπεύθυνου εργαστηρίου.

Τα μηριαία οστά μελετήθηκαν ως προς τις εμβιομηχανικές τους ιδιότητες με την μηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων (three-point-bending, 3PB). Μετά την ευθανασία και τα δύο μηριαία οστά καθαρίστηκαν από τους παρακείμενους ιστούς και αποθηκευτήκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, τυλιγμένα σε γάζες εμποτισμένες με φυσιολογικό ορό.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η μέθοδος αυτή θεωρείται η καλύτερη για τη μακρά συντήρηση των οστικών δοκιμών πριν από την εκτέλεση των δοκιμών μηχανικής αντοχής μιας και δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στα μηχανικά χαρακτηριστικά των δοκιμών [155]. Η μέθοδος κάμψης τριών σημείων επιλέχθηκε για την αξιοπιστία της, την ευκολία εκτέλεσής της, και για τον μικρό χρόνο κατά τον οποίο τα οστικά δοκίμια είναι εκτεθειμένα (ελάχιστες αλλοιώσεις προκαλούνται στις μηχανικές ιδιότητες των δοκιμών) και οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή “MTS INSIGHT 1KN”.



Διάταξη τοποθέτησης των δοκιμών στο πλαίσιο φόρτισης

Την ημέρα των πειραμάτων τα δοκίμια αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και κάθε ζεύγος οστών υποβλήθηκε σε κάμψη την ίδια μέρα. Η σειρά των δοκιμών καθορίστηκε από την ημερομηνία ευθανασίας του πειραματόζωου, ξεκινώντας από αυτά που θανατώθηκαν πρώτα. Τα δοκίμια κωδικοποιήθηκαν με αποκλειστικό κωδικό RF (right femur) για τα δεξιά μηριαία οστά και LF (left femur) για τα αριστερά μηριαία οστά. Τα μηριαία αφού καθαρίστηκαν από τυχόν μαλακούς ιστούς, φωτογραφήθηκαν και μετρήθηκε το μήκος τους καθώς και η διάμετρος στο μέσο της διάφυσης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οριζόντια στις θέσεις στήριξης του πλαισίου φόρτισης, σε στρογγυλεμένες άρπαγες που βρίσκονταν σε απόσταση 20 mm μεταξύ τους.

Δόθηκε προσοχή έτσι ώστε όλα τα δοκίμια να τοποθετηθούν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όσον αφορά στην κατεύθυνσή τους, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα λάθη εξαιτίας εσφαλμένης θέσης των δειγμάτων. Σε περίπτωση εσφαλμένης τοποθέτησης, εξαιτίας ανατομικών παραλλαγών των δοκιμών, παρατηρήθηκε στροφή του δοκιμίου κατά τη διάρκεια της φόρτισης. Η φόρτιση εφαρμοζόταν στη μεσότητα της διάφυσης του μηριαίου με τη χρήση εμβόλου με στρογγυλεμένη άκρη, έτσι ώστε να ασκηθεί το φορτίο χωρίς να προκληθούν βλάβες στο οστό κατά την επιβολή του φορτίου. Ο ρυθμός φόρτισης που επιλέχθηκε ήταν 0.1 mm/min, με σκοπό να προσομοιωθούν όσον το δυνατόν πιστότερα οι *in vivo* στατικές συνθήκες. Το δοκίμιο φωτογραφίζονταν κατά την τοποθέτησή τους στις αρπάγες και το πείραμα βιντεοσκοπούνταν καθ' όλη τη διάρκειά του. Η φόρτιση εφαρμοζόταν σταθερά μέχρις ότου επέλθει το κάταγμα-αστοχία του δοκιμίου και τα δεδομένα του κάθε πειράματος καταγράφονταν μέσω του λογισμικού TestWorks 4, το οποίο ελέγχει το πλαίσιο φόρτισης. Με αυτό τον τρόπο κατεγράφησαν οι καμπύλες φόρτισης-παραμόρφωσης και η μέγιστη φόρτιση (Newtons), κατά τη στιγμή του κατάγματος και ακολούθησε προσδιορισμός της αντοχής και της στιβαρότητας του οστίτη ιστού με τη βοήθεια της πειραματικής μέτρησης των κάτωθι μηχανικών παραμέτρων:

- α. Δύναμη θραύσης
- β. Στιβαρότητα (κλίση του διαγράμματος δύναμης-βύθισης)
- γ. Τάση θραύσεως
- δ. Απορροφούμενη ανά μονάδα όγκου ιστού ενέργεια παραμορφώσεων

Μετά τη λήξη του πειράματος, προσδιορίστηκε με παχύμετρο το μέσο πάχος του φλοιώδους οστού, σημειώθηκαν παρατηρήσεις σχετικά με το δοκίμιο και τη ροή της διαδικασίας φόρτισης και επανατοποθετήθηκαν στους -20 °C.

1.4. Στατιστική ανάλυση

Για τα *in vivo* αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε αρχικά στατιστική ανάλυση των δεδομένων με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov για να διαπιστωθεί η κανονικότητα των δεδομένων. Οι συγκρίσεις των απολύτων τιμών των μεταβλητών μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διασποράς μιας κατεύθυνσης [one-way analysis of variance (ANOVA)]. Πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμή Bonferroni, ενώ οι δοκιμές Kruskal-Wallis και Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκαν σε περίπτωση παραβίασης της ομαλότητας.

Για τη σύγκριση των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους για όλες τις παραμέτρους της κάθε ομάδας χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς μιας κατεύθυνσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (one-factor repeated measures analysis of variance). Πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο Tukey critical difference.

Για να αναδειχθεί η πορεία της οστικής πυκνότητας κατά τους έξι μήνες του πειραματισμού και για τις τρεις ομάδες, υπολογίστηκε η μέση τιμή της ποσοστιαίας μεταβολής από τις αρχικές μετρήσεις, μετά από τρεις και έξι μήνες αντίστοιχα. Οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών από τις αρχικές μετρήσεις, κατά την περίοδο της παρατήρησης εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis. Οι πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Mann-Whitney U test.

Σε όλες τις δοκιμές ως στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε το $p < 0.05$. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο SPSS version 13.00 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

2. Επιλογή και παρασκευή εκχυλισμάτων

2.1. Επιλογή φυτικών δρογών

Το πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής περιλαμβάνει την επιλογή του κατάλληλου φυτικού υλικού με βάση πληροφορίες, οι οποίες προέρχονται από κείμενα Ελλήνων Ιατρών - Θεραπευτών της Αρχαιότητας και από τη διεθνή βιβλιογραφία και σχετίζονται με τη Λαϊκή θεραπευτική και την αντι-οστεοπορωτική δράση διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων. Κατά τη συλλογή και αξιολόγηση των πληροφοριών δόθηκε έμφαση σε φυτά, τα γένη των οποίων διαθέτουν αντιπροσώπους που έχουν δείξει ευεργετικές επιδράσεις στην οστεοπόρωση ή περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες με φυτοοιστρογόνες – αντιοστεοπορωτικές ιδιότητες.

Από το γένος *Acanthus*, της οικογένειας *Acanthaceae*, αποφασίστηκε η αξιολόγηση του είδους *Acanthus spinosus*. Το γένος *Acanthus* αποτελεί μια πλούσια πηγή δευτερογενών μεταβολιτών και έχει χαρακτηριστεί από την παρουσία ουσιών που αποτελούν στόχους της παρούσας μελέτης, όπως λιγνάνια, τριτερπένια, φαινολικά παράγωγα, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή καθώς και σαπωνίνες κυρίως με τη γλυκοσιδική τους μορφή [156, 157]. Επιπλέον, μελέτες του συγγενούς είδους *Acanthus ilicifolius* απέδωσαν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τόσο στο μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού,



Acanthus ilicifolius

όσο και στους περιεχόμενους μεταβολίτες του [156, 158, 159]. Βασικό κριτήριο της επιλογής του είδους *Acanthus spinosus* αποτέλεσε η μελέτη των Van Kiem *et al.*, το 2008 [160], στο εκχύλισμα των φύλλων του *Acanthus ilicifolius*, κατά την οποία προσδιορίστηκε *in vitro* η ικανότητα των περιεχόμενων μεταβολιτών του να προάγουν την οστεοβλαστογένεση σε κυτταρική σειρά προ-οστεοβλαστικών κυττάρων. Η οικογένεια *Anacardiaceae* εκπροσωπείται στην παρούσα μελέτη από δρόγες που ανήκουν στα γένη *Cotinus*, *Pistacia* και *Schinus*. Η επιλογή τους στηρίχθηκε σε φυτοχημικές μελέτες που έχουν δείξει ότι είδη των προαναφερόμενων γενών είναι πλούσια σε μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενίων, ταννινών, φλαβονοειδών και αλκαλοειδών, προσδίδοντάς τους μια πληθώρα βιολογικών δράσεων [161, 162]. Μεταξύ των δράσεων αναφέρονται η αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή αλλά και η αντιφλεγμονώδης του γένους *Pistacia* [161, 163], η αντιοξειδωτική δράση γλυκοσίδων κερκετίνης του είδους *Schinus molle*

[164], καθώς και η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδης του γένους *Cotinus* [162]. Επίσης, στο είδος *Rhus sylvestris*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae και είναι συγγενές του *Cotinus coggygria* (*Rhus cotinus*) έχει αναφερθεί η παρουσία ενός σесκιτερπενίου, το οποίο αυξάνει σημαντικά την ενεργότητα των οστεοβλαστών *in vitro* [165]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη των Song *et al.*, το 2015 [166], απέδωσε στο φλαβονοειδές σουλφουρετίνη, που απομονώθηκε από το ξύλο του *Rhus verniciflua*, σημαντική ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης στην κυτταρική σειρά προ-οστεοβλαστών MC3T3-E1.

Φυτά του γένους *Epimedium* της οικογένειας Berberidaceae είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα της παραδοσιακής Κινέζικης θεραπευτικής για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Μελέτες έχουν περιγράψει την αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών της ομάδας των ικαροσιδών, που περιέχονται σε εκχυλίσματα του γένους *Epimedium* [167]. Επιπλέον έχει περιγραφεί η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών του γένους, στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών [168, 169, 170] και η επαγωγική δράση τους στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση [171]. Η οστεοπροστατευτική δράση δρογών του γένους *Epimedium* και των περιεχόμενων φλαβονοειδών έχει προσδιοριστεί και σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vivo* σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες [172, 173], αλλά και σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [174], όπου αναφέρονται τα ευεργετικά αποτελέσματα στην μέτρηση της οστικής πυκνότητας στα άτομα που χορηγήθηκαν.



Berberis aristata

Σε ένα ακόμη γένος της οικογένειας Berberidaceae αποδίδονται οστεοπροστατευτικές ιδιότητες. Πρόκειται για το γένος *Berberis*, από το οποίο το είδος *Berberis aristata* χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην Αγιουβερδική θεραπευτική για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης και των υπόλοιπων επιπτώσεων της εμμηνόπαυσης [175], με πρόσφατες μελέτες να επιβεβαιώνουν τη δράση του και να την αποδίδουν σε συγκεκριμένο μεταβολίτη [176]. Οι βασικοί μεταβολίτες του γένους *Berberis* ανήκουν κυρίως στην ομάδα των αλκαλοειδών της ισοκινολίνης, με κύριο εκπρόσωπο τη βερβερίνη, αλλά απαντώνται και πολυφαινολικά φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η ρουτίνη κ.ά. [177]. Οι Hu *et al.*, το 2008 [178] έδειξαν την ανασταλτική δράση της βερβερίνης στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, μέσω σηματοδότησης του NF-κB και Akt μονοπατιού, τα οποία μεταξύ άλλων, εμπλέκονται και στην διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης. Η προαναφερόμενη δραστηριότητα της βερβερίνης είχε ήδη

προσδιοριστεί και σε *in vivo* μοντέλο οστεοπόρωσης επίμυων [179] δείχνοντας τη δράση της στη μείωση της αποδόμησης των οστών. Τέλος, πρόσφατα προσδιορίστηκε η οστεοπροστατευτική δράση του ολικού μεθανολικού εκχυλίσματος του *Berberis aristata* από τους Yogesh *et al.*, το 2011 σε μοντέλο οστεοπόρωσης επίμυων [180]. Με γνώμονα τις προαναφερθείσες αναφορές αποφασίστηκε η αξιολόγηση του ελληνικού είδους *Berberis cretica*.

Το είδος *Sambucus williamsii* της οικογένειας



Sambucus williamsii

Caprifoliaceae χρησιμοποιείται ευρύτατα στην παραδοσιακή θεραπευτική στην Κίνα έναντι της φλεγμονής [181], αλλά και στην Κορέα και Ιαπωνία για την επούλωση καταγμάτων και άλλων παθήσεων των οστών [182, 183]. Φυτοχημικές μελέτες του είδους έχουν καταδείξει την ύπαρξη λιγνανίων, φαινολικών οξέων, τριτερπενίων και ιριδοειδών [184, 185, 186], με τα λιγνάνια να παρουσιάζονται ως οστεοπροστατευτικοί παράγοντες, μέσω επαγωγής της ενεργότητας των οστεοβλαστικών κυττάρων [182, 187, 188], δραστηριότητα που αποδόθηκε και στα περιεχόμενα φαινολικά οξέα και τριτερπένια [184, 185]. Οι Xie *et al.*, το 2005 [189] επιβεβαίωσαν την οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος *in vivo* σε ωθηκεκτομηθέντες επίμυες, αλλά και το μηχανισμό δράσης του *in vitro*, μέσω καταστολής της οστεοκλαστογένεσης [190]. Οστεοπροστατευτικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί και σε άλλα είδη του γένους όπως το *Sambucus sieboldiana* [191] και *Sambucus nigra* [192] σε μοντέλα πειραματοζώων. Στην παρούσα μελέτη θα αξιολογηθούν τα κλαδιά και τα φύλλα των ειδών *Sambucus nigra* και *Sambucus edulus*.

Η οικογένεια Cupressaceae περιλαμβάνει γένη, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως προς τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Είδη του γένους *Juniperus* χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή θεραπευτική της Τουρκίας ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες [193], δράση που έχει κυρίως αποδοθεί στα περιεχόμενα φλαβονοειδή των φύλλων του φυτού [194, 195]. Πρόσφατη μελέτη έχει επίσης δείξει και την επίδραση του είδους *Juniperus communis* στη σχέση οστικής πυκνότητας και λιπιδαιμικού προφίλ σε μοντέλο επίμυων, χωρίς όμως να έχει αποδοθεί η δραστηριότητα σε συγκεκριμένη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών [196]. Το γένος *Juniperus* πέραν των φλαβονοειδών, περιέχει και άλλα φαινολικά παράγωγα με αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση [197, 198], αλλά και τερπενικά παράγωγα όπως σεσκιτερπένια [199], διτερπένια [200], λαβδανικά διτερπένια [201] και νεολιγνάνια [202].

Το συγγενές γένος *Cupressus* παρουσιάζει αντίστοιχο φυτοχημικό προφίλ, χαρακτηριζόμενο από την παρουσία флаβονοειδών σε κλαδιά, φύλλα και καρπούς [203, 204, 205, 206], αλλά και τερπενικών παραγώγων, όπως σεσκιτερπενίων [207] και διτερπενίων [208]. Στα διτερπένια των καρπών του *Cupressus sempervirens* έχουν αποδοθεί δυνητικά οστεοπροστατευτικές ιδιότητες, μιας και φαίνεται να επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση *in vitro*, αλλά και την ανθεκτικότητα των οστών σε *in vivo* μοντέλο ωθηκεκτομηθέντων επίμυων [208]. Επιπρόσθετα, μελέτη των Siddiqui *et al.*, [209] έδειξε ότι η 8,8'- διαπιγενίνη, ένα флаβονοειδές που απαντάται στους καρπούς του *C. sempervirens*, αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση και επάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro*. Οι προαναφερόμενες δράσεις αντικατοπτρίστηκαν στην διατήρηση της καλής αρχιτεκτονικής των οστών, ωθηκεκτομηθέντων επίμυων που λάμβαναν το флаβονοειδές και μάλιστα χωρίς να προκαλεί υπερπλασία στη μήτρα. Βασιζόμενοι στις παραπάνω πληροφορίες θα μελετήσουμε στη συνέχεια είδη των γενών *Cupressus* και *Juniperus*.



Cupressus sempervirens

Το γένος *Iris* έχει επαρκώς χαρακτηριστεί από την παρουσία флаβονοειδών [210, 148], απλών φαινολικών παραγώγων [211, 128], αλλά και τερπενίων με κυριότερους εκπροσώπους τις ιριδάλες [212, 213]. Οι Rahman *et al.*, σε μελέτη τους το 2003 [120] έδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση ισοφλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το ρίζωμα του *Iris germanica*, ενώ οι Kim *et al.*, το 2012 [141] προσδιόρισαν την ικανότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Iris pseudacorus* να επάγει *in vitro* την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και να καταστέλλει εκείνη των οστεοκλαστών, δρώντας ρυθμιστικά στην ισορροπία μεταξύ αναδόμησης και απορρόφησης των οστών. Στην παρούσα μελέτη θα αξιολογηθούν τρία είδη του γένους *Iris* που φύονται στον ελληνικό χώρο.



Iris pseudacorus

Η οικογένεια Labiatae περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αρωματικών φυτών, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί από ένα πλήθος βιολογικών δράσεων, μεταξύ αυτών την αντιμικροβιακή, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και κυτταροστατική, και έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή θεραπευτική διαφόρων λαών. Η *Salvia miltiorrhiza* έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στην Κίνα για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων [214], αλλά και

καταστάσεων που σχετίζονται με το εμμηνοπαυσιακό σύνδρομο, όπως και για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης [215]. Στη *S. miltiorrhiza* έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την οστεοπροστατευτική της δράση. *In vivo* μελέτες σε μοντέλα οστεοπόρωσης επίμυων έδειξαν την ικανότητα διατήρησης της οστικής πυκνότητας και της αρχιτεκτονικής των οστών στις ομάδες που λάμβαναν παρασκευάσματα της δρόγης, αυξάνοντας την ενεργότητα των οστεοβλαστών και καταστέλλοντας εκείνη των οστεοκλαστών [214, 216, 217]. Περαιτέρω μελέτες εστίασαν στην δραστικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών του είδους. Έτσι, οι Cui *et al.*, το 2012 [218] περιέγραψαν την οστεοπροστατευτική δράση του σαλβιανολικού οξέος που περιέχεται στη *S. miltiorrhiza* σε οστεοπορωτικούς επίμυες, αλλά και την ικανότητά του να επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση κυττάρων μυελού των οστών. Επιπλέον, τα περιεχόμενα διτερπένια και κυρίως οι τανσινόνες φάνηκε ότι δρουν καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση, κυρίως μέσω αναστολής της έκφρασης RANKL και της NF-κB σηματοδότησης [219, 220, 221].



Salvia miltiorrhiza



Salvia miltiorrhiza

Ένα ακόμη γένος της οικογένειας Labiatae, το γένος *Sideritis* έχει δείξει οστεοπροστατευτική δράση σε κυτταρική σειρά οστεοβλαστών, αλλά και αντιοιστρογόνο ικανότητα σε κύτταρα καρκίνου του μαστού [222]. Μελέτη του είδους *Sideritis euboica* σε μοντέλο οστεοπόρωσης επίμυων, περιγράφει την διατήρηση της οστικής πυκνότητας και αντοχής των οστών στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα [223], καθιστώντας το δυνητικά οστεοπροστατευτικό παράγοντα.

Επιπροσθέτως τα γένη *Ajuga* και *Mentha* της οικογένειας Labiatae περιλαμβάνουν δρόγες με αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία στεροειδών, τερπενίων και πολυφαινολών [224, 225, 226]. Η συσχέτιση της φλεγμονής με την οστεοπόρωση, οδήγησε στην μελέτη ειδών των προαναφερόμενων γενών ως πιθανούς

οστεοπροστατευτικούς παράγοντες. Εκχύλισμα του είδους *Ajuga decumbens* φάνηκε να επάγει την ενεργότητα των οστεοβλαστών και να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση *in vitro*, αλλά και να διατηρεί την φυσιολογία των οστών ωοθηκεκτομημένων μυών στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα [227]. Από τη μελέτη ενός παραδοσιακού κινέζικου σκευάσματος, το οποίο περιέχει *Mentha*, σε επίμυες που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή, διαπιστώθηκε η ικανότητά του να δρα προφυλακτικά στην προκαλούμενη οστική απώλεια και επιβεβαιώθηκε η χρήση του για την αντιμετώπιση του εμμηνοπαυσιακού συνδρόμου [228]. Επίδραση στο μεταβολισμό των οστών, αναστέλλοντας την οστική απορρόφηση, έχει επιδείξει και η μενθόλη, ένα μονοτερπένιο που απαντάται στο γένος *Mentha* [229], ενώ περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι μεγαλύτερη επίδραση στην οστική απορρόφηση ασκούσαν οι παραγόμενοι μεταβολίτες της μενθόλης στο αίμα και τα ούρα, κατά την *in vivo* χορήγησή της σε επίμυες [230].

Τέλος, είδη του γένους *Ballota*, εκτός των φλαβονοειδών, αποτελούν και σημαντική πηγή τερπενικών παραγώγων [231, 232, 233, 234] με σημαντική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση [235, 236, 237], αλλά και πιθανή οστεοπροστατευτική. Βασιζόμενοι στις προαναφερόμενες μελέτες ειδών της οικογένεια Labiatae, θα αξιολογήσουμε στη συνέχεια δρόγες των γενών *Salvia*, *Sideritis*, *Ballota*, *Ajuga* και *Mentha*.

Μια οικογένεια με μεγάλο φυτοχημικό και βιολογικό ενδιαφέρον είναι η Leguminosae. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν είδη με σημαντική αντιφλεγμονώδη, οιστρογονική, αλλά και οστεοπροστατευτική δράση. Είδη του γένους *Astragalus* αποτελούν συστατικά σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή θεραπευτική κυρίως της Κίνας για την αντιμετώπιση γυναικολογικών παθήσεων, φλεγμονωδών καταστάσεων, αλλά και για την οστεοπόρωση. Πολλές μελέτες τέτοιων σκευασμάτων έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα οστεοπόρωσης επίμυων, επιβεβαιώνοντας την οστεοπροστατευτική τους δράση [95, 238, 239, 240, 241, 242]. Το γένος χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία τριτερπενικών σαπωνινών, αλλά και φλαβονοειδών, αλκαλοειδών και στεροειδών [243]. Η οστεοπροστατευτική ικανότητα των δρογών του γένους έχει αποδοθεί στις τριτερπενικές σαπωνίνες, μιας και ο αστραγαλοσίδης II και ο αστραγαλοσίδης IV φάνηκε να επάγουν την οστεοβλαστική ενεργότητα και διαφοροποίηση *in vitro* [244, 245].

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε προς αξιολόγηση ένα είδος του γένους *Psoralea* που φύεται στο ελληνικό χώρο, με βασικό κριτήριο τη παραδοσιακή χρήση ενός συγγενούς είδους, του *Psoralea corylifolia*. Το είδος *P. corylifolia* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινέζικη θεραπευτική για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων, μεταξύ αυτών και της οστεοπόρωσης. Μια πολύ πρόσφατη ανασκόπηση των Zhang *et al.*, το 2016 [246] περιγράφει τους μεταβολίτες που απαντώνται στο είδος, καθώς και τις σημαντικότερες βιολογικές τους δράσεις. Κύρια συστατικά του είναι οι κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή και τα μεροτερπένια, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντες επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Η κουμαρίνη ψωραλένιο, φάνηκε να επάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro* και να αυξάνει την οστική μάζα σε ωθηκεκτομημένους επίμυες [247, 248]. Αντίστοιχη δραστηριότητα έχει αποδοθεί και στα περιεχόμενα φλαβονοειδή και τερπένια [249, 250, 251, 252], δεδομένα που εξηγούν την οστεοπροστατευτική δράση εκχυλισμάτων της δρόγης σε μοντέλα οστεοπόρωσης [253, 254].



Psoralea corylifolia

Ένα ακόμη γένος της οικογένειας Leguminosae με σημαντική τόσο οιστρογονική, όσο και οστεοπροστατευτική δραστηριότητα είναι το γένος *Glycyrrhiza*, το οποίο χρησιμοποιείται για περισσότερο από 4.000 χρόνια για θεραπευτικούς σκοπούς.



Glycyrrhiza glabra



Glycyrrhiza glabra

roots

Εκχυλίσματα ειδών του γένους, μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλες δρόγες, φαίνεται να επάγουν τη διαφοροποίηση οστεοβλαστικών κυττάρων και να δρουν ευεργετικά σε οστεοπορωτικούς επίμυες [255, 256, 257]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόδοση της οστεοβλαστικής ικανότητας των ειδών *Glycyrrhiza*, στις περιεχόμενες ισοφλαβόνες και φλαβονόνες και κυρίως στην γκλαμπριντίνη και λικουιριτιγενίνη, οι οποίες επάγουν την

διαφοροποίηση οστεοβλαστικών κυττάρων [258, 259, 260, 261], καθώς και στη φορμονονετίνη, η οποία είχε ευεργετική επίδραση στις εμβιομηχανικές ιδιότητες και τη φυσιολογία οστών επίμυων που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή [262].

Εκτός των προαναφερόμενων δρογών, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα γένη *Lupinus*, *Genista*, *Ceratonia*, *Ononis*, *Lathyrus*, *Melilotus* και *Ballota*.

Αναλυτικότερα γένη *Lupinus* και *Genista* χαρακτηρίζονται από την παρουσία ισοφλαβονών, οι οποίες αναφέρονται ως φυτοιστρογόνα, λόγω της δομικής ομοιότητας που παρουσιάζουν με την οιστραδιόλη και την οιστρογονική ενεργότητα που επιδεικνύουν [263, 264, 265]. Επιπλέον, είδη του γένους *Lupinus* παρουσιάζουν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση, κυρίως λόγω της παρουσίας συγκεκριμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων στα εκχυλίσματά τους [266, 267]. Παρά το γεγονός ότι σε εκχυλίσματα του γένους *Genista* δεν έχουν αποδοθεί οστεοπροστατευτικές ιδιότητες, η παρουσία ισοφλαβονών όπως η νταϊντζεΐνη, η γενιστεΐνη και η φορμονονετίνη [268], οι οποίες επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro* και έχουν ευεργετική επίδραση στις εμβιομηχανικές ιδιότητες και τη φυσιολογία των οστών ωθηκεκτομηθέντων επίμυων [262, 269, 270], καθιστά είδη του γένους δυνητικά οστεοπροστατευτικούς παράγοντες που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Το γένος *Ceratonia* περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολών, όπως φλαβονοειδή, ταννίνες [271, 272], αλλά και απλά φαινολικά οξέα [273] με πιθανή οιστρογονική ή/και οστεοπροστατευτική δράση.

Είδη του γένους *Ononis* αποτέλεσαν επίσης φυτοχημικούς στόχους της παρούσας μελέτης, κυρίως λόγω της παρουσίας φλαβονοειδών και ειδικότερα ισοφλαβονών σε εκχυλίσματα διαφόρων ειδών *Ononis* [274, 275, 276], τα οποία πιθανολογείται ότι προσφέρουν θετικά στη διατήρηση της υγείας των οστών.

Το γένος *Melilotus* επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη λόγω των περιεχόμενων κουμαρινών, αλλά και των γλυκοσιδών της καιμφερόλης [277, 278]. Τα παράγωγα της καιμφερόλης έχουν χαρακτηριστεί ως οστεοπροστατευτικοί παράγοντες τόσο σε *in vitro*, όσο και *in vivo* πειράματα [279, 280]. Από την άλλη μεριά, στις κουμαρίνες έχει αποδοθεί αντιφλεγμονώδης δράση [281] και οστεοπροστατευτικές ιδιότητες [282, 283], με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο το ψωραλένιο, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί, επάγει τη διαφοροποίηση των



Melilotus albus

οστεοβλαστών *in vitro* και να αυξάνει την οστική μάζα σε ωθηκεκτομημένους επίμυες [247, 248].

Είδη των γενών *Lathyrus* και *Vicia* ανήκουν στην κατηγορία των οσπρίων και έκτος των θρεπτικών τους συστατικών, αποτελούν και αξιόλογες πηγές βιοδραστικών μεταβολιτών και θα αξιολογηθούν στην παρούσα μελέτη. Και στα δύο γένη απαντώνται φλαβονοειδή (καιμπερόλη, κερκετίνη, λουτεολίνη κ.ά.) ως γενίνες ή με τη μορφή γλυκοζυλιωμένων παραγώγων, αλλά και προανθοκυανιδίνες και σαπωνίνες [284, 285, 286, 287, 288]. Σε όλους τους προαναφερόμενους μεταβολίτες έχουν αποδοθεί σημαντικές δράσεις, ενώ σε μελέτη των Lee *et al.*, (2011) [289] φάνηκε ότι η κατανάλωση διαφόρων ειδών που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των οσπρίων δρα ευεργετικά στα οστά ωθηκεκτομηθέντων επίμυων.



Allium sativum

Το γένος *Allium* περιλαμβάνει αρκετές κοινές δρόγες που χρησιμοποιούνται στην διατροφή μας, όπως το κρεμμύδι (*Allium cepa*), το σκόρδο (*Allium sativum*), το πράσο (*Allium ampeloprasum*) κ.ά. Πρόκειται για φυτά πλούσια σε φλαβονοειδή [290], πολυφαινόλες [291], τερπένια [292], αλκαλοειδή και σαπωνίνες [293]. Είδη του γένους *Allium*, αλλά και τα περιεχόμενα φλαβονοειδή και κυρίως η κερκετίνη και η ρουτίνη έχουν χαρακτηριστεί για την αντιοξειδωτική [294] και αντιφλεγμονώδη δράση τους [295]. Στα προαναφερόμενα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί και οστεοπροστατευτικές ιδιότητες τόσο *in vitro* [296], όσο και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης [297, 298]. Οι Mukherjee *et al.*, προσδιόρισαν τις οστεοπροστατευτικές ιδιότητες του *Allium sativum* σε επίμυες, δείχνοντας την αύξηση της οστικής πυκνότητας, κυρίως μέσω μηχανισμού μεταφοράς ασβεστίου [299, 300], ενώ οι Oliveira *et al.* [295] και Wetli *et al.* [301] παρουσίασαν την ικανότητα του *Allium cepa* να καταστέλλει την διαφοροποίηση και την ενεργότητα των οστεοκλαστών. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες οδήγησαν στην μελέτη του είδους *Allium ampeloprasum* ως πιθανό οστεοπροστατευτικό παράγοντα.



Antiaris toxicaria

Το γένος *Morus* έχει χαρακτηριστεί από την παρουσία κυρίως φλαβονοειδών στα φύλλα του [302, 303] και τριτερπενίων στα κλαδιά του [304]. Μελέτες έχουν αποδώσει αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε εκχυλίσματα των κλαδιών του [305], καθώς και αντιφλεγμονώδεις, οι οποίες έχουν προσδιοριστεί μέσω αναστολής διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης της φλεγμονώδους

διαδικασίας. Αναλυτικότερα, οι Chung *et al.*, το 2003 απέδωσαν την αντιφλεγμονώδη δράση του ξύλου του *Morus alba* στην περιεχόμενη οξυρεσβερατρόλη [306], ενώ οι Phung *et al.*, το 2012 σε παράγωγα χαλκονών, μέσω αναστολής της NF-κB σηματοδότησης [307]. Επιπρόσθετα, στην επιλογή του *Morus alba* ως δυνητικά οστεοπροστατευτικού παράγοντα συνέβαλε η μελέτη του συγγενούς είδους *Antiaris toxicaria* από τους Jiang *et al.*, το 2009, στην οποία παρουσιάστηκε η ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης οστεοβλαστικών κυττάρων, μέσω των περιεχόμενων λιγνανίων του είδους [308]. Η οστεοπροστατευτική ικανότητα του είδους επιβεβαιώθηκε και με πρόσφατη μελέτη των Sungkamanee *et al.*, το 2014 σε *in vivo* μοντέλο οστεοπόρωσης, κατά την οποία διαπιστώθηκε μείωση της οστικής απορρόφησης, αλλά και αύξηση του πάχους του φλοιώδους οστού του, αριθμού των οστεοβλαστών και των επιπέδων ασβεστίου και οστεοκαλσίνης [309].

Το γένος *Morina* της οικογένειας Morinaceae χρησιμοποιείται στην Αγιουβερδική θεραπευτική για την αντιμετώπιση διαφόρων φλεγμονωδών καταστάσεων και σε κάποια είδη του γένους έχουν αποδοθεί αντιβακτηριακές [310] και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [311]. Στις δρόγες του γένους *Morina* απαντώνται κυρίως τριτερπενικές σαπωνίνες [312, 313, 314], λιγνάνια [315], καθώς και γλυκοσίδες κερκετίνης και απιγενίνης [316], που αποτελούν ουσίες με σημαντικές βιολογικές δράσεις. Αν και δεν υπάρχουν αναφορές για οστεοπροστατευτική δράση δρογών της οικογένειας Morinaceae, οι κατηγορίες των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών μας οδήγησαν στην επιλογή του είδους *Morina persica*, για την περαιτέρω φυτοχημική και βιολογική αξιολόγησή του.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν επίσης είδη των γενών *Pinus* και *Abies*, αφού και τα δύο γένη έχουν χαρακτηριστεί από την παρουσία κυρίως τερπενίων, φλαβονοειδών και λιγνανίων, στα οποία έχουν αποδοθεί αξιοσημείωτες βιολογικές ιδιότητες [317, 318]. Σε είδη του γένους *Abies* έχουν αποδοθεί μεταξύ άλλων, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [319, 320], ενώ το γένος *Pinus* διαθέτει εκτός των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του [321] και οστεοπροστατευτική δράση. Αναλυτικότερα, οι Sharma *et al.*, σε πρόσφατη μελέτη τους το 2014, έδειξαν την οστεοπροστατευτική δράση εκχυλίσματος του *Pinus roxburghii* σε ωθηκεκτομημένους επίμυες [322], ενώ δύο άλλες ερευνητικές ομάδες απέδωσαν τη δράση αυτή στην περιεχόμενη πυκνογενόλη [323, 324].



Pinus roxburghii

Το γένος *Plantago* περιέχει αρκετές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που ενδιαφέρουν την παρούσα μελέτη, όπως φλαβονοειδή, τερπένια, γλυκοσίδες ιριδοειδών [325, 326], αλλά και υψηλές ποσότητες ιχνοστοιχείων, συμπεριλαμβανομένου και του ασβεστίου [327]. Επιπρόσθετα, στο είδος *Plantago major* έχουν αποδοθεί οιστρογονικές [328] και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, σημαντικές για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης [325, 329]. Με γνώμονα τις προαναφερόμενες μελέτες αποφασίστηκε η αξιολόγηση ειδών του γένους για την πιθανή οστεοπροστατευτική τους δράση.

Ένα ακόμη γένος που επιλέχθηκε λόγω των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών του είναι το γένος *Platanus*. Τα είδη *Platanus orientalis* και *Platanus acerifolia* περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών, με κύριους εκπροσώπους τις φλαβονόλες [330, 331, 332] και μεταξύ αυτών κυρίως παράγωγα καιμφερόλης [333, 334]. Η καιμφερόλη έχει χαρακτηριστεί για τις οστεοπροστατευτικές της ιδιότητες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στο γένος *Melilotus*, τόσο *in vitro* σε καλλιέργειες οστεοβλαστών [279, 335], όσο και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης [280, 336].



Polygonum multiflorum

Η επιλογή ειδών του γένους *Polygonum*, βασίστηκε σε μελέτες συγγενών ειδών του γένους που έδειξαν οστεοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι Zhang *et al.*, το 2012 περιέγραψαν τη οστεοπροστατευτική δράση ενός στιλβενικού γλυκοσίδη του είδους *Polygonum multiflorum* σε κυτταρική σειρά οστεοβλαστών, μέσω καταστολής της επαγόμενης από οξειδωτικό στρες καταστροφής των οστεοβλαστών [337]. Οι οστεοπροστατευτικές ιδιότητες ειδών του γένους διαφάνηκαν και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης τόσο σε μύες [338], όσο και σε επίμυες [309]. Μάλιστα, οι Liu *et al.*, το 2005 περιέγραψαν σε μοντέλο ωθηκεκτομημένων επίμυων, τη δράση της trans-ρεσβερατρόλης, που περιέχεται στο είδος *Polygonum cuspidatum*, στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας και των επιπέδων ασβεστίου των πειραματοζώων [339].

Οι καρποί του είδους *Punica granatum* έχουν ερευνηθεί εκτενώς για την οιστρογονική δράση τους. Οι Sharaf *et al.* από το 1964 είχαν δείξει την οιστρογονική επίδραση στη μήτρα ωοθηκεκτομημένων επίμυων [340] και οι Kim *et al.*, το 2002 την παρουσία οιστρογόνων (οιστραδιόλη, οιστρόνη και οιστριόλη) και την ευεργετική επίδραση τους σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού [341]. Βασιζόμενοι στην οιστρογονική



Punica granatum

δράση της δρόγης, οι Morigi-Okamoto *et al.*, περιέγραψαν την ευεργετική επίδραση εκχυλίσματος του *Punica granatum* στην φυσιολογία των οστών, σε μοντέλο οστεοπόρωσης επίμυων [342]. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει την οιστρογονική δράση του αλκοολικού εκχυλίσματος της δρόγης *in vivo* [343], καθώς και την οστεοπροστατευτική δράση του ελαίου των σπόρων σε ωοθηκεκτομηθέντες μύες. Αναλυτικότερα, φάνηκε ότι το έλαιο των σπόρων του *Punica granatum*, του οποίου το κύριο συστατικό είναι το πουνικικό οξύ, επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και καταστέλλει την ενεργότητα των οστεοκλαστών *in vitro*, ενώ παράλληλα διατηρεί την οστική πυκνότητα και αρχιτεκτονική *in vivo* [344, 345]. Η ίδια ερευνητική ομάδα απέδωσε την ευεργετική επίδραση, του εκχυλίσματος της δρόγης στην υγεία των οστών, στις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητές του.

Μια οικογένεια φυτών που στην παρούσα μελέτη εκπροσωπείται από τρία είδη είναι η Rhamnaceae. Είδη του γένους *Rhamnus* έχουν χαρακτηριστεί από την παρουσία ανθρακινονών [346, 347] και φλαβονολών, ως απλές γενίνες ή με τη μορφή των γλυκοσιδών τους [346, 348], μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται παράγωγα κερκετίνης και καιμφερόλης με γνωστές οστεοπροστατευτικές ιδιότητες. Επιπρόσθετα, οι Lee *et al.* διαπίστωσαν ότι η ανθρακινόνη εμοδίνη, που απαντάται στο γένος *Rhamnus*, επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση *in vitro* στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 [349]. Τέλος, πρόσφατες μελέτες από δύο ερευνητικές ομάδες περιέγραψαν την οστεοπροστατευτική δράση ενός άλλου είδους της οικογένειας Rhamnaceae, του *Hovenia dulcis*, σε *in vivo* μοντέλο οστεοπόρωσης μυών [350, 351].



Hovenia dulcis

Η επιλογή του γένους *Prunus* της οικογένειας Rosaceae, έγκειται στο γεγονός ότι είδη του γένους και ειδικότερα τα είδη *Prunus domestica* και *Prunus mume* έχουν μελετηθεί εκτενώς για



Prunus domestica

τις οστεοπροστατευτικές τους ιδιότητες τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Το γένος *Prunus* έχει χαρακτηριστεί από την παρουσία φλαβονοειδών, στεροειδών και τερπενίων, κουμαρινών και καροτενοειδών [352]. Η πρώτη αναφορά στις οστεοβλαστικές ιδιότητες εκχυλίσματος του είδους *Prunus mume* έγινε από τους Kono *et al.* [353]. Αργότερα, η οστεοπροστατευτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του είδους αποδόθηκε στα φλαβονοειδή και στα παράγωγα ακυλιώμενης σουκρόσης, τα οποία φάνηκε να έχουν την ικανότητα να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και να καταστέλλουν εκείνη των οστεοκλαστών [354, 355]. Η ερευνητική ομάδα των Yan *et al.* σε μεταγενέστερη μελέτη το 2015, διαπίστωσε ότι η αναστολή της οστεοκλαστογένεσης οφειλόταν στην παρουσία τερπενίων και στερολών στους καρπούς του *Prunus mume* [356]. Το είδος *Prunus domestica* είναι το πλέον μελετημένο είδος της οικογένειας ως προς τις οστεοπροστατευτικές ιδιότητές του. *In vitro* μελέτες περιέγραψαν την ικανότητά του να καταστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών δρώντας στη φλεγμονώδη σηματοδότηση [357]. Η ικανότητα του συγκεκριμένου είδους να επάγει την ενεργότητα των οστεοβλαστών και να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση, αποδόθηκε στις περιεχόμενες πολυφαινόλες [358, 359]. Η προαναφερόμενη δράση του *Prunus domestica* έχει επιβεβαιωθεί και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης σε μύες και επίμυες, στα οποία έχει διαφανεί η ικανότητά του να αναστέλλει την προκαλούμενη οστική απώλεια και να βελτιώνει τις δομικές και μηχανικές ιδιότητες των οστών [358, 360, 361, 362], αλλά και σε κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Από τις κλινικές μελέτες φάνηκε η θετική επίδραση της δρόγης στα οστά, μέσω επαγωγής της οστικής αναδόμησης και καταστολής της απορρόφησης των οστών [363, 364, 365].

Ένα ακόμα είδος που επιλέχθηκε για μελέτη προέρχεται από το γένος *Styrax*, φυτά του οποίου έχουν χαρακτηριστεί από την παρουσία βενζοφουρανικών παραγώγων [366, 367] αλλά και σαπωνινών [368]. Τα παράγωγα βενζοφουρανίου είναι γνωστά για τις οιστρογονικές τους ιδιότητες [369, 370], γεγονός που τα καθιστά δυνητικά οστεοπροστατευτικούς παράγοντες. Επιπρόσθετα, η δράση των βενζοφουρανίων στα οστά επιβεβαιώθηκε σε μελέτη των Guo *et al.*,

όπου φάνηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την οστική απώλεια σε μοντέλο οστεοπόρωσης αρουραίων [371].

Είδη του γένους *Taxus* και ειδικότερα το *Taxus baccata* είναι γνωστά για τις οιστρογονικές τους ιδιότητες, κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού [372]. Εκτός των ταχοειδών που περιέχονται στα φυτά του γένους *Taxus* [373], έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη λιγνανίων με σημαντικές βιολογικές δράσεις [374]. Μεταξύ των δράσεων περιλαμβάνεται και η αντι-οστεοπορωτική ενός λιγνανίου που απομονώθηκε από το είδος *Taxus yunnanensis* και είχε την ικανότητα να αυξάνει τους οστικούς δείκτες σε μοντέλο οστεοπόρωσης επίμυων [375]. Επίσης, στο πλέον γνωστό στιλβένιο του γένους, την ταμοξιφαίνη, έχουν αποδοθεί και οστεοπροστατευτικές ιδιότητες, όπως φαίνεται σε μελέτες ωθηκεκτομημένων επίμυων [376, 377]. Βασιζόμενοι στις παραπάνω πληροφορίες, θα ασχοληθούμε με τη μελέτη δρογών του γένους *Taxus*, ως δυνητικά οστεοπροστατευτικούς παράγοντες.



Taxus yunnanensis

Η επιλογή ειδών του γένους *Bupleurum* στην παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στην ευρεία χρήση τους στην Κινέζικη θεραπευτική για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών καταστάσεων και στην παρουσία στο γένος μεταβολιτών όπως οι τριτερπενικές σαπωνίνες (σαϊκοσαπωνίνες) και τα λιγνάνια [378]. Μιας και η φλεγμονή σχετίζεται άμεσα με την οστεοπόρωση, η παρουσία ριζών *Bupleurum* σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή θεραπευτική για την αντιμετώπιση της φλεγμονής, οδήγησε στην αξιολόγησή τους και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης, όπου επιβεβαιώθηκε η οστεοπροστατευτική δράση των προαναφερόμενων σκευασμάτων [228, 238, 379]. Η απόδοση αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων στους κύριους μεταβολίτες του γένους, τις σαϊκοσαπωνίνες [380, 381], οδήγησε στην συσχέτιση της αντιφλεγμονώδους με την οστεοπροστατευτική δράση των συγκεκριμένων μεταβολιτών, περιγράφοντας τη δράση τους στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης, μέσω καταστολής της NF-κB και MAPK σηματοδότησης [382, 383].



Vitex agnus castus

Το είδος *Vitex agnus castus* της οικογένειας Verbenaceae είναι γνωστό ήδη από αναφορές του Ιπποκράτη, όπου χρησιμοποιούταν ως αντιφλεγμονώδες, εμμηναγωγό αλλά και εκτριωτικό. Η δράση του στο προεμμηνορρυσιακό σύνδρομο έχει αναφερθεί και στην μονογραφία του είδους στο W.H.O. το 2009. Οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες του είδους ανήκουν στις κατηγορίες των ιριδοειδών, φλαβονοειδών, τερπενίων και γενικότερα στεροειδών [384]. Στους προαναφερόμενους μεταβολίτες αποδίδεται η οστεοπροστατευτική δράση ενός συγγενούς είδους που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή θεραπευτική της Ινδίας, κατόπιν αξιολόγησής τους σε κυτταρική σειρά οστεοβλαστών [385]. Η προστατευτική δράση του *Vitex agnus castus* διαφάνηκε και σε μελέτες σε ηλικιωμένους άρρενες μύες και επίμυες που είχαν υποστεί ορχεκτομή, και οι οποίοι διατήρησαν τις εμβιομηχανικές ιδιότητες τόσο του φλοιώδους, όσο και του σπογγώδους οστού μετά από τη χορήγηση του εκχυλίσματος [386, 387]. Έχοντας ως γνώμονα αυτές τις βιολογικές ιδιότητες του *Vitex agnus castus*, θα μελετηθούν περαιτέρω δύο δρόγες του είδους.

Ένα φυτικό γένος με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την ικανότητά του να βοηθάει στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης είναι το γένος *Zingiber*. Το είδος *Zingiber officinalis* χρησιμοποιείται στην Αγιουβερδική και Ιαπωνική παραδοσιακή θεραπευτική για την αντιμετώπιση παθήσεων που σχετίζονται με τη φλεγμονή [388], ενώ μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι είναι αποτελεσματικό και σε ρευματολογικές παθήσεις [389]. Οι Lee *et al.*, παρουσίασαν την ευεργετική επίδραση στα οστά ωθηκεκτομημένων επίμυων, όταν τους χορηγήθηκε ένα μίγμα δρογών, το οποίο περιείχε και *Zingiber* και που παραδοσιακά χρησιμοποιούταν σε γυναικολογικές παθήσεις και στην αντιμετώπιση του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου [228]. Επιπρόσθετα, οι Im *et al.* διαπίστωσαν την ικανότητα εκχυλίσματος του *Zingiber officinalis* να δρα οστεοπροστατευτικά, μέσω επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και καταστολής της οστεοκλαστογένεσης *in vitro* [390].



Zingiber officinalis

Από την οικογένεια Vitaceae, αποφασίστηκε η αξιολόγηση του είδους *Vitis vinifera* (κρασί Μοσχάτο Αμβούργου), κυρίως λόγω της παρουσίας ρεσβερατρόλης σε παρασκευάσματα του γένους. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί τη σημαντικότερη πολυφαινόλη του κόκκινου κρασιού, με σημαντική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, αν και έχει απομονωθεί και από πολλά άλλα είδη της οικογένειας



Vitis thunbergii

Vitaceae [391]. Η ρεσβερατρόλη έχει πολύ νωρίς ενταχθεί στην ομάδα των φυτοοιστρογόνων, μιας και έχει τη δυνατότητα να δεσμεύεται με τους ER-υποδοχείς και η οστεογενετική της ικανότητα αποδίδεται στην αγωνιστική αλλά και ανταγωνιστική δράση της στους ER-α και ER-β υποδοχείς [392, 393]. Όσον αφορά την οστεοπροστατευτική της δράση, αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro*, στις οποίες περιγράφεται η ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης [394, 395, 396], αλλά και η ικανότητά της να επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών [397, 398]. Η ευεργετική επίδραση της ρεσβερατρόλης στην υγεία των οστών έχει επιβεβαιωθεί και σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες, όπου περιεγράφηκε η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ απορρόφησης και αναδόμησης των οστών, με επακόλουθο την αύξηση της οστικής πυκνότητας και αντοχής στις ομάδες που λάμβαναν ρεσβερατρόλη [399, 400]. Εκτός της ρεσβερατρόλης, πυρανοανθοκυανίνες και στυλβένια, που απομονώθηκαν από το είδος *Vitis thunbergii*, φαίνεται να έχουν δράση ανάλογη της ρεσβερατρόλης *in vitro* και *in vivo*, ενώ η ίδια η δρόγη χρησιμοποιείται ήδη στην παραδοσιακή θεραπευτική της Ταϊβάν για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών παθήσεων των οστών [401].

Βασιζόμενοι στις παραπάνω πληροφορίες, καταλήξαμε στην αξιολόγηση 85 δρογών προερχόμενων από 71 φυτικά είδη, τα οποία ανήκουν σε 41 γένη και αυτά με τη σειρά τους σε 24 οικογένειες φυτών. Αναλυτικότερα, επιλέχθηκαν δρόγες που ανήκουν στις παρακάτω οικογένειες/ γένη φυτών:

- Acanthaceae: *Acanthus*
- Anacardiaceae: *Cotinus*, *Pistacia* και *Schinus*
- Berberidaceae: *Berberis*
- Caprifoliaceae: *Sambucus*
- Cupressaceae: *Cupressus* και *Juniperus*
- Iridaceae: *Iris*
- Labiatae: *Ajuga*, *Ballota*, *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis*
- Leguminosae: *Astragalus*, *Ceratonia*, *Genista*, *Glycyrrhiza*, *Lupinus*, *Ononis*, *Psoralea*, *Lathyrus*, *Melilotus* και *Vicia*
- Liliaceae: *Allium*
- Moraceae: *Morus*
- Morinaceae: *Morina*
- Pinaceae: *Pinus* και *Abies*
- Plantaginaceae: *Plantago*
- Platanaceae: *Platanus*
- Polygonaceae: *Polygonum*
- Punicaceae: *Punica*
- Rhamnaceae: *Rhamnus*
- Rosaceae: *Prunus*
- Styracaceae: *Styrax*
- Taxaceae: *Taxus*
- Umbelliferae: *Bupleurum*
- Verbenaceae: *Vitex*
- Zingiberaceae: *Zingiber* και
- Vitaceae: *Vitis*

Το μεγαλύτερο μέρος των προαναφερόμενων φυτικών ειδών υπήρχε ήδη στη βοτανική συλλογή του εργαστηρίου, ενώ για τα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκε συλλογή του φυτικού υλικού, ξήρανση και κονιοποίηση.

2.2. Παρασκευή εκχυλισμάτων

Μετά την επιλογή του κατάλληλου φυτικού υλικού ακολούθησε παρασκευή εκχυλισμάτων των δρογών που επιλέχθηκαν με την τεχνική ASE (Accelerated Solvent Extraction). Η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE, 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 100 °C και σε πιέσεις μεταξύ 10 και 15 MPa (§ 1.1.2.1).

Στην παρούσα μελέτη, 20 g αδρομερώς τετμημένης ξηρής δρόγης εγκλείστηκαν στα κελιά εκχύλισης όγκου 100 ml, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η κατανάλωση οργανικών διαλυτών. Σε κάθε δρόγη πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές εκχυλίσεις με χρήση ενός πολικού (μεθανόλη-MeOH) και ενός λιγότερου πολικού (οξικός αιθυλεστέρας-EtOAc) διαλύτη, προκειμένου να γίνει παραλαβή της πλειονότητας των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών. Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης η θερμοκρασία ήταν 70 °C, η πίεση 1500 psi (104 bar), το κάθε κελί προθερμαινόταν για 1 min στην προαναφερόμενη θερμοκρασία και ο χρόνος στατικής εκχύλισης ήταν 10 min. Πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι εκχυλίσεων ανά δείγμα με όγκο εκπλύσεως 60 ml και χρόνο εξώθησης εκχυλίσματος 2 min. Τέλος, τα παραγόμενα υγρά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) και ζυγίστηκαν τα τελικά ξηρά εκχυλίσματα, προκειμένου να προσδιοριστεί η απόδοση της κάθε εκχύλισης.

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

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα 169 εκχυλίσματα των δρογών που επιλέχθηκαν και η απόδοση της εκχύλισης για το καθένα από αυτά.

Οικ. Leguminosae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
35	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	1.8
36	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	4.5
37	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	0.9
38	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	4.7
39	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	Ρίζες	EtOAc	4.6
40	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	Ρίζες	MeOH	18.2
41	<i>Astragalus lacteus</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	1.1
42	<i>Astragalus lacteus</i>	Όλο το φυτό	MeOH	9.1
43	<i>Astragalus pubiflorus</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	1.9
44	<i>Astragalus pubiflorus</i>	Όλο το φυτό	MeOH	14.1
45	<i>Ceratonia siliqua</i>	Βλαστοί (ετήσιοι), φύλλα	EtOAc	8.0
46	<i>Ceratonia siliqua</i>	Βλαστοί (ετήσιοι), φύλλα	MeOH	31.1
47	<i>Ceratonia siliqua</i>	Σπέρματα	EtOAc	4.6
48	<i>Ceratonia siliqua</i>	Σπέρματα	MeOH	12.4
49	<i>Genista acanthoclada</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.9
50	<i>Genista acanthoclada</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	19.8
51	<i>Genista depressa</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	3.6
52	<i>Genista depressa</i>	Όλο το φυτό	MeOH	8.3
53	<i>Genista hassertiana</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.9
54	<i>Genista hassertiana</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	15.3
55	<i>Genista milii</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	1.4
56	<i>Genista milii</i>	Όλο το φυτό	MeOH	19.1
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ρίζες	EtOAc	9.4
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ρίζες	MeOH	13.1
59	<i>Lupinus albus</i>	Καρποί, σπέρματα	EtOAc	5.4
60	<i>Lupinus albus</i>	Καρποί, σπέρματα	MeOH	14.0
61	<i>Lupinus albus</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	5.5
62	<i>Lupinus albus</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	25.5
63	<i>Ononis pubescens</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	3.4
64	<i>Ononis pubescens</i>	Όλο το φυτό	MeOH	13.3
65	<i>Ononis spinosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	4.8
66	<i>Ononis spinosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	6.7
67	<i>Ononis viscosa</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	2.0
68	<i>Ononis viscosa</i>	Όλο το φυτό	MeOH	10.2
69	<i>Psoralea bituminosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	1.1
70	<i>Psoralea bituminosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	16.5

127	<i>Lathyrus clymenum</i> cv.	Περισπέρμιο	EtOAc	4.8
128	<i>Lathyrus clymenum</i> cv.	Περισπέρμιο	MeOH	3.5
131	<i>Melilotus graecus</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	5.8
132	<i>Melilotus graecus</i>	Όλο το φυτό	MeOH	23.2
153	<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	5.5
154	<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	17.9
155	<i>Vicia sativa</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	0.9
156	<i>Vicia sativa</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	13.6

Οικ. Acanthaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
1	<i>Acanthus spinosus</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	0.9
2	<i>Acanthus spinosus</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	17.2
Οικ. Anacardiaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
3	<i>Cotinus coggygia</i> (<i>Rhus cotinus</i>)	Πολυετές ξύλο	EtOAc	6.7
4	<i>Cotinus coggygia</i> (<i>Rhus cotinus</i>)	Πολυετές ξύλο	MeOH	6.5
5	<i>Cotinus coggygia</i>	Βλαστοί, φύλλα	EtOAc	3.8
6	<i>Cotinus coggygia</i>	Βλαστοί, φύλλα	MeOH	18.0
7	<i>Pistacia lentiscus</i>	Ξύλο	EtOAc	1.6
8	<i>Pistacia lentiscus</i>	Ξύλο	MeOH	7.8
9	<i>Pistacia lentiscus</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	7.7
10	<i>Pistacia lentiscus</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	30.2
167	<i>Pistacia lentiscus</i>	Καρποί	EtOAc	1.7
168	<i>Pistacia lentiscus</i>	Καρποί	MeOH	18.5
11	<i>Pistacia terebinthus</i>	Φύλλα	EtOAc	4.1
12	<i>Pistacia terebinthus</i>	Φύλλα	MeOH	24.3
13	<i>Pistacia terebinthus</i>	Κλαδιά	EtOAc	8.9
14	<i>Pistacia terebinthus</i>	Κλαδιά	MeOH	25.0
157	<i>Schinus molle</i>	Φύλλα	EtOAc	13.9
158	<i>Schinus molle</i>	Φύλλα	MeOH	34.2
159	<i>Schinus molle</i>	Κλαδιά	EtOAc	8.8
160	<i>Schinus molle</i>	Κλαδιά	MeOH	20.0
Οικ. Berberidaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
15	<i>Berberis cretica</i>	Ρίζες	EtOAc	1.0
16	<i>Berberis cretica</i>	Ρίζες	MeOH	12.8
17	<i>Berberis cretica</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	5.1
18	<i>Berberis cretica</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	10.2

Οικ. Caprifoliaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
19	<i>Sambucus ebulus</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	6.2
20	<i>Sambucus ebulus</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	16.7
119	<i>Sambucus nigra</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	9.4
120	<i>Sambucus nigra</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	12.3
Οικ. Cupressaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
21	<i>Cupressus sempervirens</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	10.1
22	<i>Cupressus sempervirens</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	22.1
23	<i>Cupressus sempervirens</i>	Καρποί	EtOAc	14.1
24	<i>Cupressus sempervirens</i>	Καρποί	MeOH	18.7
25	<i>Juniperus drupacea</i>	Καρποί	EtOAc	3.7
26	<i>Juniperus drupacea</i>	Καρποί	MeOH	31.9
117	<i>Juniperus drupacea</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	9.4
118	<i>Juniperus drupacea</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	29.8
27	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	13.6
28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	33.0
Οικ. Iridaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
29	<i>Iris attica</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	8.5
30	<i>Iris attica</i>	Όλο το φυτό	MeOH	11.8
31	<i>Iris germanica</i>	Ρίζωμα	EtOAc	6.3
32	<i>Iris germanica</i>	Ρίζωμα	MeOH	34.0
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i>	Ρίζωμα	EtOAc	5.8
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i>	Ρίζωμα	MeOH	20.0

Οικ. Labiatae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
133	<i>Ajuga orientalis</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	2.1
134	<i>Ajuga orientalis</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	16.4
135	<i>Ballota pseudodictamnus</i> ssp. <i>pseudodict.</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.5
136	<i>Ballota pseudodictamnus</i> ssp. <i>pseudodict.</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	12.5
137	<i>Mentha aquatica</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	2.4
138	<i>Mentha aquatica</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	15.3
139	<i>Mentha longifolia</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	1.9
140	<i>Mentha longifolia</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	8.1
141	<i>Mentha pulegium</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	2.0
142	<i>Mentha pulegium</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	12.6
143	<i>Salvia fruticosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	6.9
144	<i>Salvia fruticosa</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	15.1
145	<i>Salvia officinalis</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	10.1
146	<i>Salvia officinalis</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	15.0
147	<i>Salvia sclarea</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	4.6
148	<i>Salvia sclarea</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	13.5
161	<i>Salvia argentea</i>	Ρίζες	EtOAc	2.0
162	<i>Salvia argentea</i>	Ρίζες	MeOH	13.5
163	<i>Salvia ringens</i>	Ρίζες	EtOAc	4.9
164	<i>Salvia ringens</i>	Ρίζες	MeOH	9.9
149	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.1
150	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	16.0
151	<i>Sideritis raeseri</i> ssp. <i>raeseri</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	EtOAc	3.3
152	<i>Sideritis raeseri</i> ssp. <i>raeseri</i>	Υπέργεια τμήματα ανθισμένα	MeOH	13.3

Οικ. Liliaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
71	<i>Allium ampeloprasum</i>	Φύλλα βάσης, βολβοί	EtOAc	1.3
72	<i>Allium ampeloprasum</i>	Φύλλα βάσης, βολβοί	MeOH	18.8
Οικ. Moraceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
121	<i>Morus alba</i>	Ξύλο	EtOAc	6.6
122	<i>Morus alba</i>	Ξύλο	MeOH	10.9
Οικ. Morinaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
73	<i>Morina persica</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	1.2
74	<i>Morina persica</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	15.4
Οικ. Pinaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
75	<i>Pinus heldreichi</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	11.5
76	<i>Pinus heldreichi</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	17.8
123	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Φλοιός	EtOAc	9.8
124	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Φλοιός	MeOH	11.2
77	<i>Abies cephalonica</i>	Φλοιός	EtOAc	4.0
78	<i>Abies cephalonica</i>	Φλοιός	MeOH	19.4

Οικ. Plantaginaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
79	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	3.5
80	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i>	Όλο το φυτό	MeOH	4.6
81	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	4.5
82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i>	Όλο το φυτό	MeOH	5.9
83	<i>Plantago holosteum</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	1.6
84	<i>Plantago holosteum</i>	Όλο το φυτό	MeOH	15.1
85	<i>Plantago lanceolata</i>	Φύλλα βάσης	EtOAc	3.8
86	<i>Plantago lanceolata</i>	Φύλλα βάσης	MeOH	16.6
87	<i>Plantago major</i>	Φύλλα βάσης	EtOAc	5.3
88	<i>Plantago major</i>	Φύλλα βάσης	MeOH	16.9
Οικ. Platanaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
89	<i>Platanus orientalis</i>	Κούμαρα	EtOAc	7.2
90	<i>Platanus orientalis</i>	Κούμαρα	MeOH	6.1
Οικ. Polygonaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
91	<i>Polygonum idaeum</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	0.5
92	<i>Polygonum idaeum</i>	Όλο το φυτό	MeOH	6.6
93	<i>Polygonum tinctoria</i> (Cult.)	Όλο το φυτό	EtOAc	1.1
94	<i>Polygonum tinctoria</i> (Cult.)	Όλο το φυτό	MeOH	19.9
165	<i>Polygonum aviculare</i>	Όλο το φυτό	EtOAc	13.7
166	<i>Polygonum aviculare</i>	Όλο το φυτό	MeOH	23.6

Οικ. Punicaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
95	<i>Punica granatum</i>	Περικάρπιο	EtOAc	5.0
96	<i>Punica granatum</i>	Περικάρπιο	MeOH	47.6

Οικ. Rhamnaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
97	<i>Rhamnus alpinus</i>	Υπέργεια τμήματα-Κοζάνη	EtOAc	7.0
98	<i>Rhamnus alpinus</i>	Υπέργεια τμήματα-Κοζάνη	MeOH	26.2
99	<i>Rhamnus alpinus</i>	Υπέργεια τμήματα-Γκιώνα	EtOAc	5.2
100	<i>Rhamnus alpinus</i>	Υπέργεια τμήματα-Γκιώνα	MeOH	19.2
101	<i>Rhamnus lycioides subsp. graecus</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	2.0
102	<i>Rhamnus lycioides subsp. graecus</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	10.1
103	<i>Rhamnus sibthorpiana</i>	Υπέργεια τμήματα	EtOAc	6.3
104	<i>Rhamnus sibthorpiana</i>	Υπέργεια τμήματα	MeOH	18.1

Οικ. Rosaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
125	<i>Prunus spinosa</i>	Καρποί, κλαδιά, φύλλα	EtOAc	6.1
126	<i>Prunus spinosa</i>	Καρποί, κλαδιά, φύλλα	MeOH	24.3

Οικ. Styracaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
105	<i>Styrax officinalis</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	8.2
106	<i>Styrax officinalis</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	27.7

Οικ. Taxaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
107	<i>Taxus baccata</i>	Φύλλα	EtOAc	7.0
108	<i>Taxus baccata</i>	Φύλλα	MeOH	43.2
109	<i>Taxus baccata</i>	Κλαδιά	EtOAc	6.2
110	<i>Taxus baccata</i>	Κλαδιά	MeOH	12.5

Οικ. Umbelliferae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
111	<i>Bupleurum fruticosum</i>	Στελέχη με φύλλα	EtOAc	5.9
112	<i>Bupleurum fruticosum</i>	Στελέχη με φύλλα	MeOH	13.3

Οικ. Verbenaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
113	<i>Vitex agnus-castus</i>	Καρποί	EtOAc	14.2
114	<i>Vitex agnus-castus</i>	Καρποί	MeOH	21.4
115	<i>Vitex agnus-castus</i>	Κλαδιά, φύλλα	EtOAc	8.0
116	<i>Vitex agnus-castus</i>	Κλαδιά, φύλλα	MeOH	23.1
Οικ. Zingiberaceae				
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Διαλύτης εκχύλισης	Απόδοση (%)
129	<i>Zingiber officinale</i>	Ρίζωμα	EtOAc	8.2
130	<i>Zingiber officinale</i>	Ρίζωμα	MeOH	12.4

Οικ. Vitaceae			
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Είδος	Δρόγη	Απόδοση (%)
170	<i>Vitis vinifera</i>	Κρασί, ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου	9.0

2.3. Παρασκευή εκχυλισμάτων σε μεγάλη κλίμακα

Προκειμένου να είναι εφικτή η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από τα τελικώς επιλεγμένα εκχυλίσματα αλλά και για να είναι δυνατή η χορήγηση του τελικού εκχυλίσματος *in vivo* στα πειραματόζωα, πραγματοποιήθηκε παρασκευή των εκχυλισμάτων σε μεγαλύτερη κλίμακα. Για το σκοπό αυτό οι δρόγες εκχυλίστηκαν στους κατάλληλους διαλύτες με χρήση υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, σε 300 g δρόγης προστέθηκε ο διαλύτης επιλογής και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση χωρίς θέρμανση σε υδατόλουτρο υπερήχων (Elma S 100H Elmasonic) σε τρεις κύκλους των 30 λεπτών ο καθένας. Ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος υπό κενό μέχρι ξηρού και ζύγιση του τελικού ξηρού εκχυλίσματος.

3. Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων

Τα 169 εκχυλίσματα, τα οποία παρασκευάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, υποβλήθηκαν σε μία σειρά χρωματογραφικών τεχνικών, με σκοπό τη μελέτη του χημικού τους φορτίου. Έτσι, αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), καθώς και με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) προκειμένου να αποδοθεί το φυτοχημικό αποτύπωμα του κάθε εκχυλίσματος. Χάριν συντομίας σε κάθε εκχύλισμα δόθηκε ένας κωδικός HR.MM, καθώς και ο αριθμός που αντιστοιχεί στο καθένα από αυτά. Οι μονοί αριθμοί των κωδικών αναφέρονται σε εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc), ενώ οι ζυγοί στα μεθανολικά (MeOH) εκχυλίσματα. Στη συνέχεια, για την ορθότερη ανάλυση των δειγμάτων, τα εκχυλίσματα ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο διαχωρισμού την πολικότητά τους. Έτσι δημιουργήθηκαν δύο ομάδες εκχυλισμάτων, εκείνη που περιλάμβανε τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα (A) των επιλεγμένων δρογών και εκείνη με τα μεθανολικά εκχυλίσματα (B), όπως φαίνεται στους πίνακες 3.3 και 3.4.

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan, το οποίο περιγράφηκε αναλυτικά στην § 1.1.3.6. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε διήθηση σε ειδική συσκευή υπό κενό και με ηθμό 0.45 μm . 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 - νερού και η ταχύτητα ροής επιλέχθηκε να είναι 1.0 ml/min. Για τα εκχυλίσματα τόσο της μεθανόλης, όσο και του οξικού αιθυλεστέρα, δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι βαθμιδωτής έκλουσης και τελικά επιλέχθηκαν οι μέθοδοι A και B, αντίστοιχα (πίνακας 3.1).

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

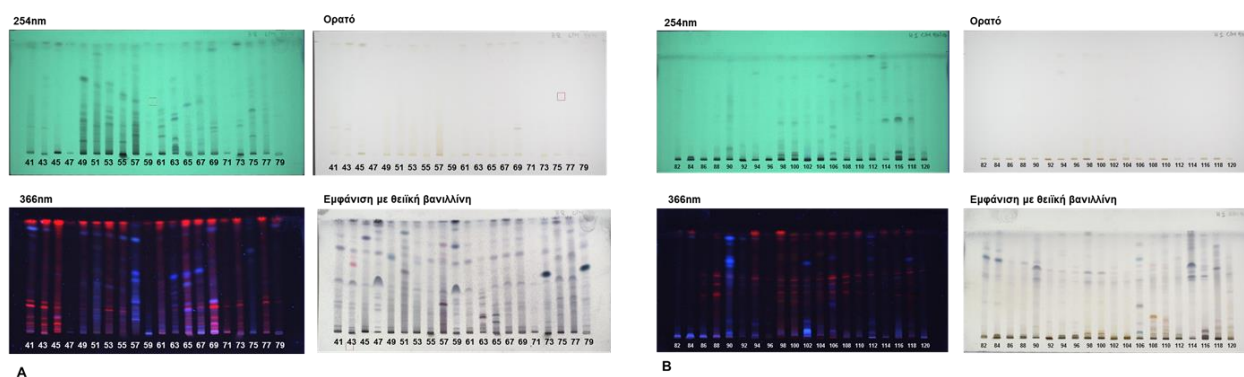
Πίνακας 3.1 Πρωτόκολλο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Παρουσιάζονται το πρόγραμμα έκλυσης, καθώς και οι αναλογίες διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο.

Για τη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο συσκευών, το οποίο περιλαμβάνει: CAMAG Linomat 5, για την εφαρμογή του δείγματος, CAMAG TLC Scanner 3, για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και την λήψη φασμάτων απορρόφησης και τέλος CAMAG TLC Visualizer, για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμη εικόνα στα 254nm, 366nm και στο ορατό. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη οξειδίου του πυριτίου κανονικής (Kieselgel 60 F₂₅₄) και αντίστροφης φάσης (RP-18F_{254s}), επιστρωμένη σε φύλλα αλουμινίου. Ως συστήματα ανάπτυξης των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ		ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ	
Κανονική φάση	Αντίστροφη φάση	Κανονική φάση	Αντίστροφη φάση
Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη	Νερό / Ακετονιτρίλιο	Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη	Νερό / Ακετονιτρίλιο
90 / 10	60 / 40	90 / 10	80 / 20
95 / 5	40 / 60	75 / 25	60 / 40

Πίνακας 3.2 Συστήματα ανάπτυξης Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης. Παρουσιάζονται τα συστήματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα εκχυλισμάτων.

Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα HPTLC παρουσιάζονται στην εικόνα 3.1, όπου παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των εκχυλισμάτων στα 254 και 366 nm, καθώς και η εμφάνισή τους μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα κριτήρια επιλογής εκχυλισμάτων για *in vitro* βιολογική αξιολόγηση και παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των τελικώς επιλεγμένων εκχυλισμάτων, όπου αποτυπώνεται η απορρόφηση στα 365 nm (πράσινο χρωματογράφημα), στα 260 nm (μπλε χρωματογράφημα) και στα 280 nm (κόκκινο χρωματογράφημα).



Εικόνα 3.1 Ενδεικτικά χρωματογραφήματα HPTLC. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα HPTLC εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα (A) και μεθανόλης (B).

Α. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ	
ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ - ΔΡΟΓΗ
HR.MM 1	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 3	<i>Cotinus coggygria</i> (<i>Rhus cotinus</i>) (Ξύλο πολυετές)
HR.MM 5	<i>Cotinus coggygria</i> (<i>Rhus cotinus</i>) (Βλαστοί, φύλλα)
HR.MM 7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)
HR.MM 9	<i>Pistacia lentiscus</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 11	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα)
HR.MM 13	<i>Pistacia terebinthus</i> (Κλαδιά)
HR.MM 15	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες)
HR.MM 17	<i>Berberis cretica</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 19	<i>Sambucus ebulus</i> Μονοδένδρι (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 21	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 23	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί, κυπαρισσόμηλα)
HR.MM 25	<i>Juniperus drupacea</i> (Καρποί)
HR.MM 27	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί)
HR.MM 29	<i>Iris attica</i> (Όλο)
HR.MM 31	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 35	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 37	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 39	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες)
HR.MM 41	<i>Astragalus lacteus</i> (Υπέργεια τμήματα, ρίζες, καρποί)
HR.MM 43	<i>Astragalus pubiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα, τμήματα ριζών, καρποί)
HR.MM 45	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα)
HR.MM 47	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα)
HR.MM 49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 51	<i>Genista depressa</i> (Όλο)
HR.MM 53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)
HR.MM 57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες)
HR.MM 59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα)
HR.MM 61	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 63	<i>Ononis rubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς)
HR.MM 65	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 67	<i>Ononis viscosa</i> (Όλο με καρπούς)
HR.MM 69	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 71	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί)
HR.MM 73	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 75	<i>Pinus heldreichii</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά)
HR.MM 77	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων)
HR.MM 79	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i> (Όλο)
HR.MM 81	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο)
HR.MM 83	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο)
HR.MM 85	<i>Plantago lanceolata</i> (Φύλλα βάσης)
HR.MM 87	<i>Plantago major</i> (Φύλλα βάσης)
HR.MM 89	<i>Platanus orientalis</i> (Κούμαρα)

HR.MM 91	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες)
HR.MM 93	<i>Polygonum tinctoria</i> (Cult.) (Όλο)
HR.MM 95	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο)
HR.MM 97	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια τμήματα, περιοχή συλλογής Κοζάνη)
HR.MM 99	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια τμήματα, περιοχή συλλογής Γκιώνα)
HR.MM 101	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 103	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 105	<i>Styrax officinalis</i> (Κλαδιά-φύλλα)
HR.MM 107	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα)
HR.MM 109	<i>Taxus baccata</i> (Κλαδιά λεπτά)
HR.MM 111	<i>Bupleurum fruticosum</i> (Στελέχη με φύλλα)
HR.MM 113	<i>Vitex agnus-castus</i> (Καρποί 'berry' ώριμα)
HR.MM 115	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 117	<i>Juniperus drupacea</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 119	<i>Sambucus nigra</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο)
HR.MM 123	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> (Φλοιός)
HR.MM 125	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 127	<i>Lathyrus clymenum</i> cv. (Περισπέρμιο)
HR.MM 129	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 131	<i>Melilotus graecus</i> (Όλο και ρίζες και καρποί)
HR.MM 133	<i>Ajuga orientalis</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 135	<i>Ballota pseudodictamnus</i> ssp. <i>pseudodict.</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 139	<i>Mentha longifolia</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 141	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 143	<i>Salvia fruticosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 145	<i>Salvia officinalis</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 147	<i>Salvia sclarea</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 149	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 151	<i>Sideritis raeseri</i> ssp. <i>raeseri</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 153	<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 155	<i>Vicia sativa</i> (Υπέργεια με καρπούς)
HR.MM 157	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα)
HR.MM 159	<i>Schinus molle</i> (Κλαδιά χωρίς φύλλα)
HR.MM 161	<i>Salvia argentea</i> (Ρίζες)
HR.MM 163	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες)
HR.MM 165	<i>Polygonum aviculare</i> (Υπέργεια τμήματα, ρίζες)
HR.MM 167	<i>Pistacia lentiscus</i> (Καρποί)

Πίνακας 3.3 Εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα. Παρουσιάζονται οι δρόγες των φυτικών ειδών και οι κωδικοί των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα που τους αντιστοιχούν.

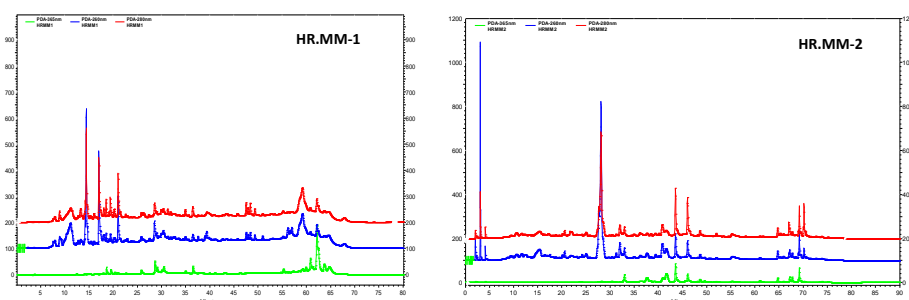
B. ΜΕΘΑΝΟΔΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	
ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ - ΔΡΟΓΗ
HR.MM 2	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 4	<i>Cotinus coggygria</i> (<i>Rhus cotinus</i>) (Ξύλο πολυετές)
HR.MM 6	<i>Cotinus coggygria</i> (<i>Rhus cotinus</i>) (Βλαστοί, φύλλα)
HR.MM 8	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)
HR.MM 10	<i>Pistacia lentiscus</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 12	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα)
HR.MM 14	<i>Pistacia terebinthus</i> (Κλαδιά)
HR.MM 16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες)
HR.MM 18	<i>Berberis cretica</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 20	<i>Sambucus ebulus</i> Μονοδένδρι (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 22	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 24	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί, κυπαρισσόμηλα)
HR.MM 26	<i>Juniperus drupacea</i> (Καρποί)
HR.MM 28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί)
HR.MM 30	<i>Iris attica</i> (Όλο)
HR.MM 32	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 36	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 38	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 40	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες)
HR.MM 42	<i>Astragalus lacteus</i> (Υπέργεια τμήματα, ρίζες, καρποί)
HR.MM 44	<i>Astragalus pubiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα, τμήματα ριζών, καρποί)
HR.MM 46	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα)
HR.MM 48	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα)
HR.MM 50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 52	<i>Genista depressa</i> (Όλο)
HR.MM 54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)
HR.MM 58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες)
HR.MM 60	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα)
HR.MM 62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 64	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς)
HR.MM 66	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 68	<i>Ononis viscosa</i> (Όλο με καρπούς)
HR.MM 70	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί)
HR.MM 74	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 76	<i>Pinus heldreichii</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά)
HR.MM 78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων)
HR.MM 80	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i> (Όλο)
HR.MM 82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο)
HR.MM 84	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο)
HR.MM 86	<i>Plantago lanceolata</i> (Φύλλα βάσης)
HR.MM 88	<i>Plantago major</i> (Φύλλα βάσης)
HR.MM 90	<i>Platanus orientalis</i> (Κούμαρα)
HR.MM 92	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες)
HR.MM 94	<i>Polygonum tinctoria</i> (Cult.) (Όλο)
HR.MM 96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο)
HR.MM 98	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια τμήματα, περιοχή συλλογής Κοζάνη)

HR.MM 100	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια τμήματα, περιοχή συλλογής Γκιώνα)
HR.MM 102	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 104	<i>Rhamnus sibthoriana</i> (Υπέργεια τμήματα)
HR.MM 106	<i>Styrax officinalis</i> (Κλαδιά-φύλλα)
HR.MM 108	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα)
HR.MM 110	<i>Taxus baccata</i> (Κλαδιά λεπτά)
HR.MM 112	<i>Bupleurum fruticosum</i> (Στελέχη με φύλλα)
HR.MM 114	<i>Vitex agnus-castus</i> (Καρποί 'berry' ώριμα)
HR.MM 116	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 118	<i>Juniperus drupacea</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 120	<i>Sambucus nigra</i> (Κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 122	<i>Morus alba</i> (Ξύλο)
HR.MM 124	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> (Φλοιός)
HR.MM 126	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα)
HR.MM 128	<i>Lathyrus clymenum</i> cv. (Περισπέρμιο)
HR.MM 130	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα)
HR.MM 132	<i>Melilotus graecus</i> (Όλο και ρίζες και καρποί)
HR.MM 134	<i>Ajuga orientalis</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 136	<i>Ballota pseudodictamnus</i> ssp. <i>pseudodict.</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 140	<i>Mentha longifolia</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 142	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 144	<i>Salvia fruticosa</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 146	<i>Salvia officinalis</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 148	<i>Salvia sclarea</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 150	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 152	<i>Sideritis raeseri</i> ssp. <i>raeseri</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 154	<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)
HR.MM 156	<i>Vicia sativa</i> (Υπέργεια με καρπούς)
HR.MM 158	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα)
HR.MM 160	<i>Schinus molle</i> (Κλαδιά χωρίς φύλλα)
HR.MM 162	<i>Salvia argentea</i> (Ρίζες)
HR.MM 164	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες)
HR.MM 166	<i>Polygonum aviculare</i> (Υπέργεια τμήματα, ρίζες)
HR.MM 168	<i>Pistacia lentiscus</i> (Καρποί)
HR.MM 170	<i>Vitis vinifera</i> (Κρασί, ποικιλία μοσχάτο Αμβούργου)

Πίνακας 3.4 Μεθανολικά εκχυλίσματα. Παρουσιάζονται οι δρόγες των φυτικών ειδών και οι κωδικοί των μεθανολικών εκχυλισμάτων που τους αντιστοιχούν.

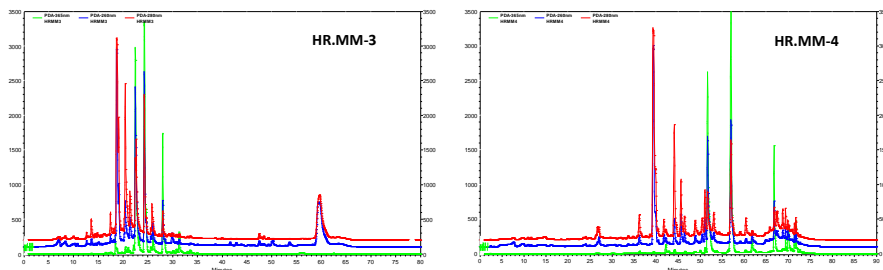
Τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού ελέγχου των εκχυλισμάτων και με τις δύο τεχνικές οδήγησαν στην επιλογή των παρασκευασμάτων στα οποία θα πραγματοποιηθεί περαιτέρω *in vitro* βιολογική αξιολόγηση. Αναλυτικότερα, τα εκχυλίσματα HR.MM-1, 2, τα οποία προήλθαν από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Acanthus spinosus* δεν φάνηκε να είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ουσίες οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες. Το HR.MM-1 φαίνεται ότι αποτελείται από τερπενικά παράγωγα (μωβ χρώση, μετά από εμφάνιση με θεϊκή βανιλίνη) ενώ το HR.MM-2 χαρακτηρίζεται κυρίως από δύο ουσίες, οι οποίες απορροφούν στα 254 nm. Με βάση τόσο το

γεγονός ότι η κύρια κορυφή στο χρωματογράφημα της HPLC έχει χρόνο ανάσχεσης $R_t = 28$ min περίπου, όσο και τους συντελεστές ανάσχεσης (R_f) από την HPTLC, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μέσης πολικότητας ουσίες. Αξιολογώντας τις προαναφερόμενες παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές αναφορές που περιγράφουν την ύπαρξη φλαβονοειδών, τριτερπενίων, λιγνανίων και βενζοξασζινών σε άλλα είδη του γένους *Acanthus*, αποφασίστηκε η *in vitro* αξιολόγηση και των δύο εκχυλισμάτων.



Acanthus spinosus

Από το ξύλο του *Cotinus coggygia*, το HR.MM-3 στο αποτύπωμα της HPTLC φαίνεται να περιέχει τερπενικά παράγωγα, καθώς και ουσίες οι οποίες απορροφούν σε μήκος κύματος 254 nm, φθορίζουν στα 366 nm και μετά από εμφάνιση με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης δίνουν καφε-κίτρινη κηλίδα. Πιθανολογούμε ότι πρόκειται για ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Στο χρωματογράφημα της HPLC και σε μήκη κύματος 260 και 280 nm, εμφανίζονται αρκετές ουσίες που απορροφούν, με σημαντικότερες τις κορυφές με R_t : 19, 23 και 25 min, περίπου. Συνδυάζοντας τα παραπάνω, με στοιχεία από τη βιβλιογραφία θεωρούμε ότι πρόκειται για φλαβανόνες. Αντίθετα με το HR.MM-3, το HR.MM-4 δεν περιέχει τερπενικά παράγωγα, αλλά κυρίως ουσίες της κατηγορίας των φλαβονοειδών. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήξαμε μετά από παρατήρηση του χρωματογραφήματος της HPTLC, στο οποίο φαίνονται ουσίες που απορροφούν στα 254 nm και δίνουν χαρακτηριστική χρώση μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλίνη. Η υπόθεσή μας ενισχύθηκε και από το χρωματογράφημα της HPLC, στο οποίο παρατηρούνται αρκετές ουσίες που απορροφούν στα 260 και 280 nm, με χαρακτηριστικές κορυφές στα 40, 57 min (αρκετά πολικές ουσίες). Στηριζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά στοιχεία αποφασίζουμε να μελετήσουμε περαιτέρω τα εκχυλίσματα του ξύλου του *Cotinus coggygia* (HR.MM-3, 4).

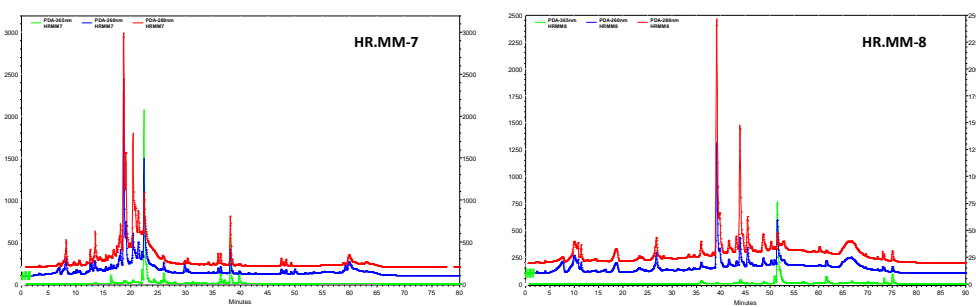


Cotinus coggygia

Τα εκχυλίσματα HR.MM-5, 6 προέρχονται από το ίδιο είδος με τα HR.MM-3, 4, αλλά από διαφορετικό μέρος του φυτού. Τα HR.MM-5, 6 προέρχονται από τους βλαστούς και τα φύλλα του *Cotinus coggygia*. Το χρωματογράφημα της HPTLC του εκχυλίσματος του EtOAc (HR.MM-5), εμφανίζει παρόμοια εικόνα με το HR.MM-3. Επικρατούν τερπενικά παράγωγα, ενώ τα φυσικά προϊόντα με απορρόφηση στα 254 nm είναι σε μικρή περιεκτικότητα. Με βάση το γεγονός ότι τα τελευταία θεωρούνται πιο σημαντικά για οιστρογόνο / αντιοιστρογόνο δράση, θεωρούμε το HR.MM-3 πιο αξιόλογο σε σχέση με το HR.MM-5. Πράγματι, και στο χρωματογράφημα της HPLC εμφανίζονται πολλές μικρές κορυφές στα 260 και 280 nm, χωρίς να υπάρχουν κάποιες οι οποίες να χαρακτηρίζουν το εκχύλισμα. Το μεθανολικό εκχύλισμα της δρόγης (HR.MM-6), σε σύγκριση με το αντίστοιχο HR.MM-4, εμφανίζεται πιο φτωχό σε φαινολικές ουσίες και γι' αυτό δεν θα μελετηθεί περαιτέρω.

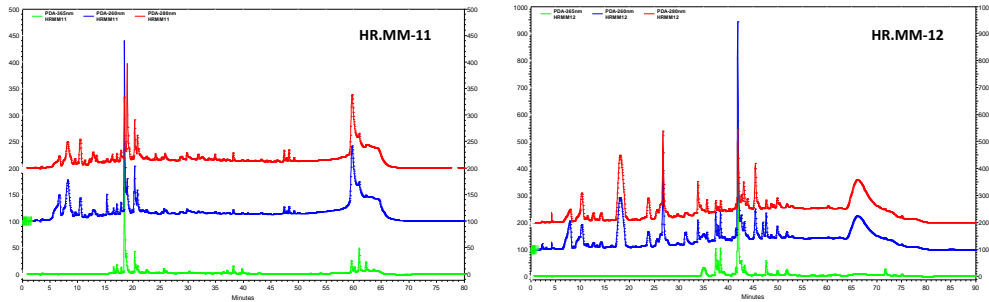
Τα επόμενα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν προέρχονται από τρεις δρόγες του φυτού *Pistacia lentiscus*, το ξύλο (HR.MM-7, 8), τα κλαδιά-φύλλα (HR.MM-9, 10) και τους καρπούς (HR.MM-167, 168). Τα είδη του γένους χαρακτηρίζονται από την παρουσία τερπενικών παραγώγων (κυρίως τριτερπένια), κάτι που είναι εμφανές και στο χρωματογράφημα HPTLC. Ωστόσο, στα εκχυλίσματα HR.MM-7, 8 εμφανίζονται και φαινολικές ουσίες της κατηγορίας των φλαβονών. Χαρακτηριστικά, στο εκχύλισμα HR.MM-7 εμφανίζεται μία ουσία με απορρόφηση στα 254 nm, η οποία δίνει και χαρακτηριστική χρώση μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλίνη (καφε-κίτρινη κηλίδα) και είναι πιθανόν φλαβονοειδές. Στο χρωματογράφημα HPLC του ίδιου εκχυλίσματος, εμφανίζονται τέσσερις κορυφές, που αντιστοιχούν πιθανότατα σε φαινολικά παράγωγα (Rt: 18.8, 19.2, 20.4, 22.5 min). Το μεθανολικό εκχύλισμα του ξύλου (HR.MM-8) είναι φτωχότερο σε τερπενικά παράγωγα, συγκριτικά με το αντίστοιχο του EtOAc, ενώ είναι πιο πλούσιο σε φαινολικά, τα οποία εμφανίζονται και στο HR.MM-7. Οι κυριότερες κορυφές στο χρωματογράφημα HPLC εμφανίζονται στα 40, 44 min περίπου και φανερώνουν την παρουσία ουσιών μέτριας πολικότητας. Το HR.MM-9, που προέρχεται από κλαδιά-φύλλα, είναι πλούσιο σε

τερπενικά παράγωγα, αντίθετα με το HR.MM-7 (ξύλο), ενώ περιέχει και σημαντικές ποσότητες χλωροφυλλών. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία φαινολικών παραγώγων σε σημαντική περιεκτικότητα, το καθιστούν λιγότερο αξιόλογο για περαιτέρω μελέτη. Το ίδιο παρατηρείται και στο HR.MM-10, το οποίο φαίνεται πιο φτωχό σε φαινολικές ενώσεις συγκριτικά με το HR.MM-8. Τέλος, τα εκχυλίσματα HR.MM-167, 168 των καρπών δεν εμφανίζουν ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα, μιας και είναι φτωχά σε ενώσεις οι οποίες απορροφούν στα 254, 366 nm. Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις αποφασίζουμε την περαιτέρω μελέτη των εκχυλισμάτων HR.MM-7, 8 της δρόγης *Pistacia lentiscus*-ξύλο.



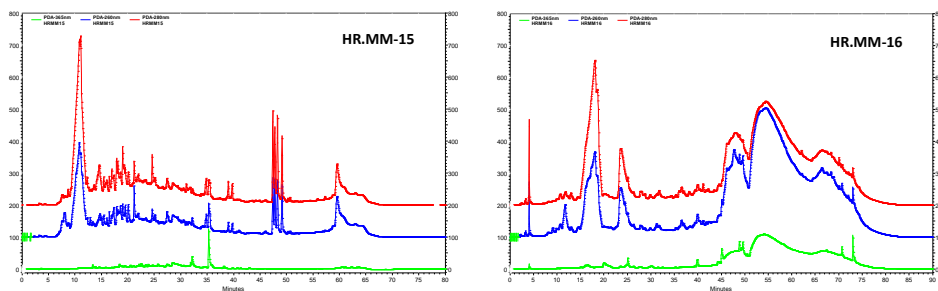
Pistacia lentiscus

Στο γένος *Pistacia* ανήκει και η επόμενη τετράδα εκχυλισμάτων HR.MM-11, 12, 13, 14. Πρόκειται για δύο δρόγες του είδους *Pistacia terebinthus* και πιο συγκεκριμένα, τα HR.MM-11, 12 είναι εκχυλίσματα φύλλων, ενώ τα HR.MM-13, 14 εκχυλίσματα κλαδιών. Η χρωματογραφική μελέτη όλων των παραπάνω, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του είδους *Pistacia lentiscus*, έδειξε ότι πρόκειται για εκχυλίσματα με μικρότερη περιεκτικότητα ουσιών των κατηγοριών που μας ενδιαφέρουν. Ενδεικτικά, θα αξιολογηθούν περαιτέρω τα εκχυλίσματα των φύλλων HR.MM-11, 12, λόγω της παρουσίας κάποιων φαινολικών παραγώγων. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγουμε μετά από μελέτη του χρωματογραφήματος της HPLC του HR.MM-12, όπου εμφανίζονται κορυφές στα 8, 10, 18 min, οι οποίες υποθέτουμε ότι αντιστοιχούν σε φαινολοξέα (γνωστά για την οιστρογονική δράση τους).



Pistacia terebinthus

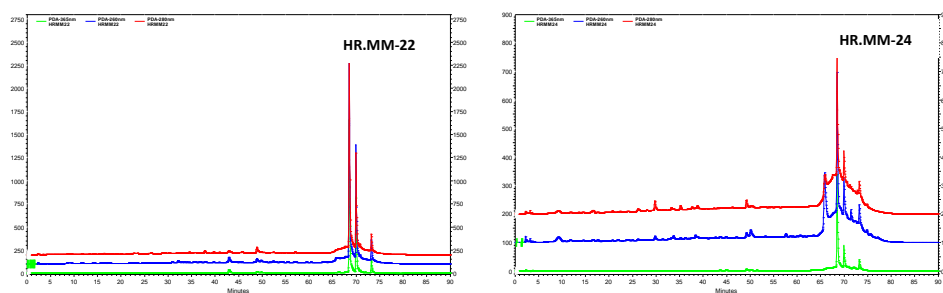
Το είδος *Berberis cretica* εκπροσωπείται από τα εκχυλίσματα HR.MM-15, 16 που προέρχονται από τις ρίζες του φυτού και τα HR.MM-17, 18 από τα υπέργεια τμήματά του. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των ριζών (HR.MM-15) περιέχει ορισμένα τερπένια, αλλά κυρίως αλκαλοειδή τύπου βερβερίνης, τα οποία φθορίζουν στα 366 nm και δίνουν χαρακτηριστική κίτρινη κηλίδα. Ένα ακόμη εκχύλισμα της παραπάνω ομάδας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι το μεθανολικό της ίδιας δρόγης HR.MM-16. Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι περιέχει μεγάλο αριθμό αλκαλοειδών, αλλά και άλλων φαινολικών ενώσεων (απορροφήσεις στα 254 nm). Αντίθετα, στα υπέργεια τμήματα παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα είναι πλούσιο σε χλωροφύλλες (κόκκινη απορρόφηση στα 366 nm), οι οποίες δεν προσφέρουν στη βιολογική δράση και δυσχεραίνουν την απομόνωση των υπόλοιπων δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ το μεθανολικό είναι φτωχότερο σε μεταβολίτες, συγκρινόμενο με το HR.MM-16. Ως προς τη βιολογική τους δράση, θα μελετηθούν τα HR.MM-15, 16 των ριζών του *Berberis cretica*.



Berberis cretica

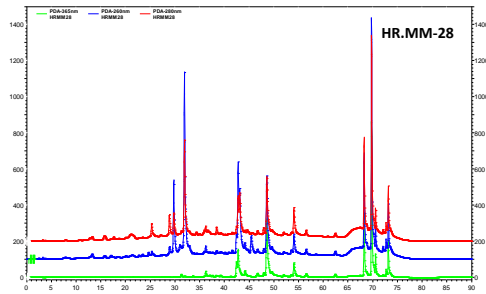
Τα εκχυλίσματα των κλαδιών και φύλλων του *Sambucus ebulus* (HR.MM-19, 20) δεν εμφανίζουν πλούσια χρωματογραφική εικόνα. Το HR.MM-19 περιέχει τερπενικά παράγωγα και πιθανόν τρία τερπένια τύπου ουρσολικού οξέος. Στο μεθανολικό εκχύλισμα εμφανίζεται μία ουσία με απορρόφηση στα 254 nm, αλλά είναι σε μικρή περιεκτικότητα.

Ακολουθούν τα εκχυλίσματα από δύο δρόγες που ανήκουν στο φυτό *Cupressus sempervirens*. Στο HR.MM-21, των κλαδιών και φύλλων παρατηρούμε δύο ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζουν το εκχύλισμα, απορροφούν στα 254 nm, φθορίζουν στα 366 nm και δεν φαίνεται να ανήκουν στις κλασικές κατηγορίες των флаβονοειδών. Το μεθανολικό εκχύλισμα της ίδιας δρόγης (HR.MM-22), περιέχει τα ίδια φαινολικά παράγωγα με το HR.MM-21, αλλά λόγω πιθανώς καλύτερης διαλυτότητας, επιλέγεται το HR.MM-22 για την επόμενη φάση μελέτης. Το μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών του *Cupressus sempervirens* (HR.MM-24), αντίθετα με τα HR.MM-21, 22, περιέχει δύο τερπενικά παράγωγα, τα οποία βάση βιβλιογραφίας, κρίνεται ενδιαφέρον να αξιολογηθούν ως προς τη δραστηκότητά τους. Το HR.MM-23 έχει ανάλογη χρωματογραφική εικόνα με το 24, αλλά δεν προτιμάται λόγω των δυσκολιών διαλυτότητας που αναμένεται να παρουσιάσει.



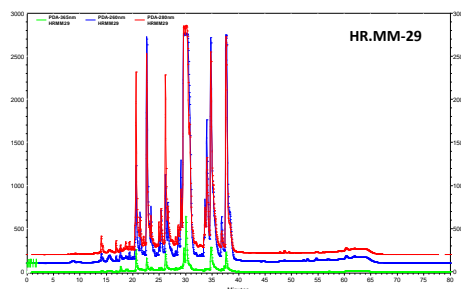
Cupressus sempervirens

Τα εκχυλίσματα HR.MM-25/26, 117/118 και 27/28 ανήκουν στο γένος *Juniperus* και πιο συγκεκριμένα στα είδη *Juniperus drupacea* και *Juniperus communis* subsp. *communis*, αντίστοιχα. Από την μελέτη των χρωματογραφημάτων της HPLC και HPTLC των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων, καταλήξαμε στην επιλογή του μεθανολικού εκχυλίσματος του είδους *Juniperus communis* subsp. *communis* (HR.MM-28), μιας και είναι το πλέον πλούσιο σε φαινολικές ουσίες.

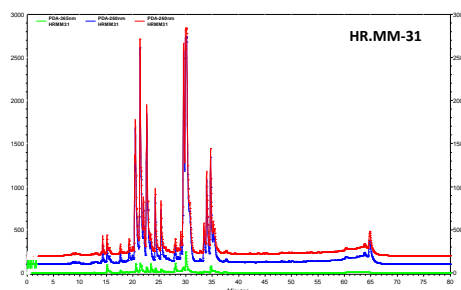
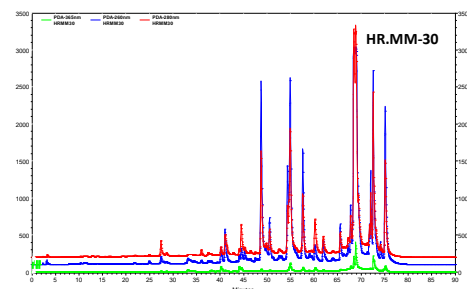


Juniperus communis subsp. communis

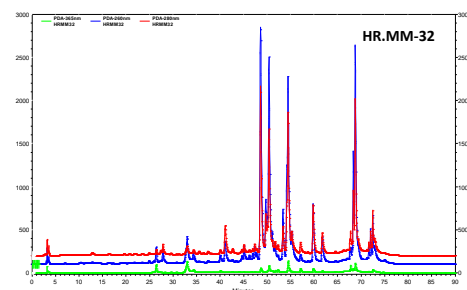
Η επόμενη ομάδα εκχυλισμάτων προέρχεται από είδη του γένους *Iris*. Τα εκχυλίσματα HR.MM-29, 30 προέκυψαν από όλο το φυτό *Iris attica*, ενώ τα HR.MM-31, 32 και HR.MM-33,34 από το ρίζωμα των ειδών *Iris germanica* και *Iris unguicularis subsp. cretensis*, αντίστοιχα. Βάση της χρωματογραφικής τους εικόνας, όλα τα εκχυλίσματα του γένους χαρακτηρίζονται ως πολύ αξιόλογα για περαιτέρω μελέτη. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα HR.MM-29, 31, 33, φαίνεται ότι περιέχουν ισοφλαβονοειδή (έντονη απορρόφηση στα 254 nm και ασθενή κίτρινη χρώση με θειϊκή βανιλίνη), καθώς και άλλα φαινολικά παράγωγα, όπως π.χ. οι ακετοφαινόνες. Τα αντίστοιχα μεθανολικά τους εκχυλίσματα είναι πολύ πλούσια σε πολικά φαινολικά παράγωγα των προαναφερόμενων χημικών κατηγοριών.

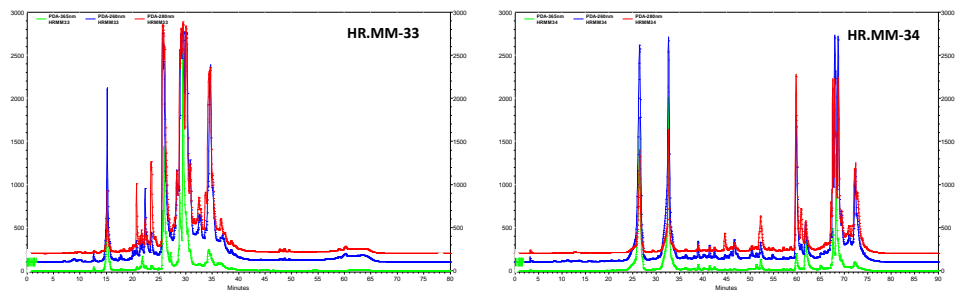


Iris attica



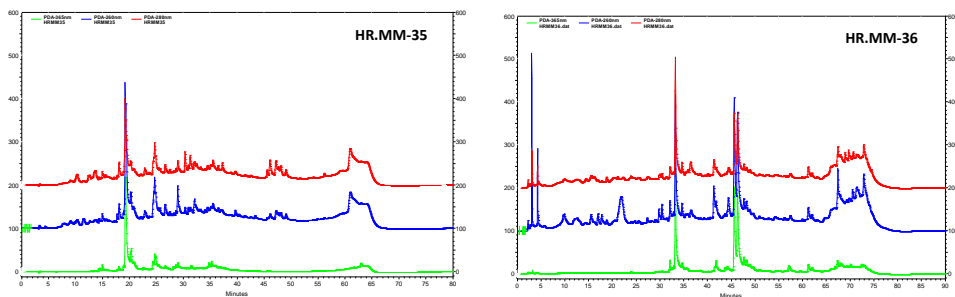
Iris germanica



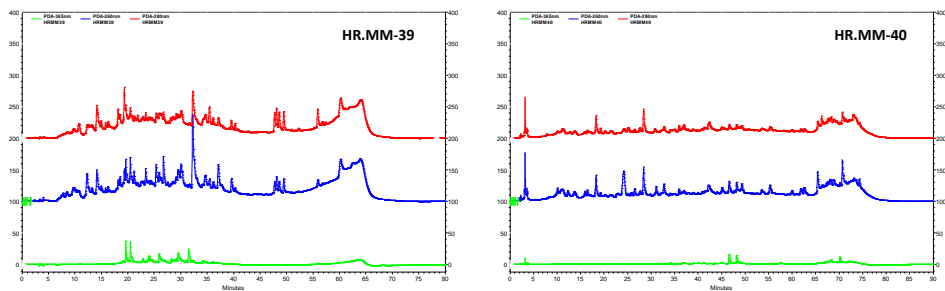


Iris unguicularis subsp. cretensis

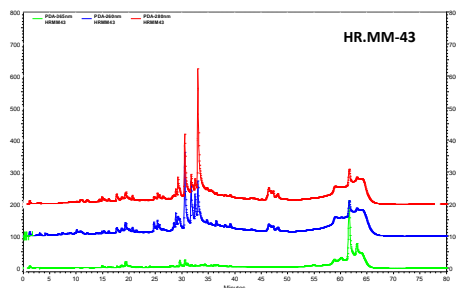
Το γένος *Astragalus* εκπροσωπείται στην παρούσα μελέτη από τις δρόγες τεσσάρων διαφορετικών ειδών. Το είδος *Astragalus angustifolius ssp. angustifolius*, το *Astragalus creticus subsp. creticus*, το *Astragalus lacteus* και το *Astragalus pubiflorus*. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστερά των παραπάνω δρογών είναι πλούσια σε τερπενικά παράγωγα, τα οποία βάση βιβλιογραφίας ανήκουν πιθανότατα στην κατηγορία των τριτερπενικών σαπωνινών. Από τα παραπάνω εκχυλίσματα των ειδών του γένους *Astragalus* θα ήταν χρήσιμο να αξιολογηθούν ως προς τη δραστηριότητά τους τα HR.MM-35 (*Astragalus angustifolius ssp. angustifolius* – υπέργεια τμήματα του φυτού), HR.MM-39 (*Astragalus creticus subsp. creticus* – ρίζες) και HR.MM-43 (*Astragalus pubiflorus* – υπέργεια, ρίζες, καρποί), λόγω της πιο ενδιαφέρουσας χρωματογραφικής εικόνας που παρουσιάζουν. Από τα αντίστοιχα μεθανολικά εκχυλίσματα επιλέγουμε για περαιτέρω μελέτη το HR.MM-36 (*Astragalus angustifolius ssp. angustifolius* – υπέργεια τμήματα του φυτού) και το HR.MM-40 (*Astragalus creticus subsp. creticus* – ρίζες), μιας και περιέχουν σαπωνίνες με περισσότερες σακχαριδικές μονάδες, σε σχέση με τα υπόλοιπα. Επιπρόσθετα, θα θέλαμε να τονίσουμε ότι το ενδιαφέρον μας για τις σαπωνίνες που φαίνεται να περιέχονται στο γένος, έγκειται στο γεγονός ότι, σε μελέτες *in vitro*, τα παράγωγα αυτά εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και έχουν παρουσιαστεί δραστικά σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου.



Astragalus angustifolius ssp. Angustifolius

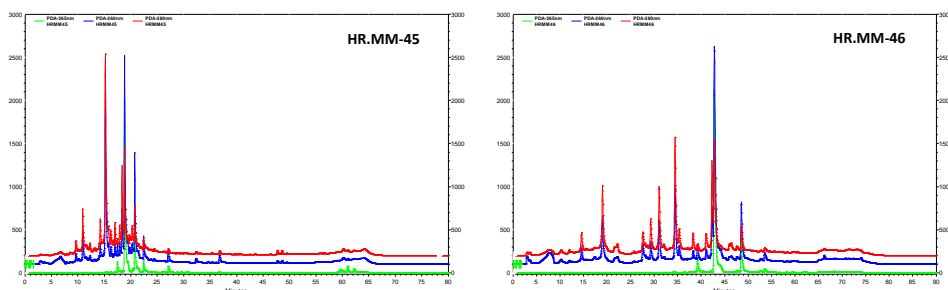


Astragalus creticus subsp. creticus

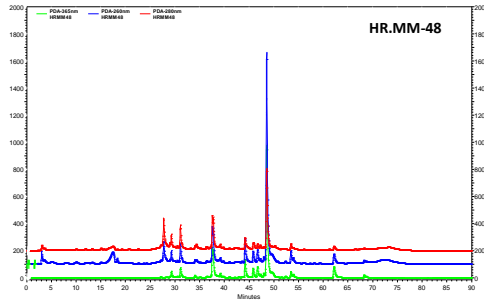


Astragalus pubiflorus

Χρωματογραφικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το φυτικό είδος *Ceratonia siliqua*, το οποίο εκπροσωπείται από τα εκχυλίσματα HR.MM-45/46 και 47/48. Το εκχύλισμα HR.MM-45 των βλαστών και φύλλων του είδους, φαίνεται να περιέχει απλά φαινολικά παράγωγα, τα οποία χαρακτηρίζονται για την οιστρογονικότητά τους (π.χ. γαλλικό οξύ), αλλά και το μεθανολικό εκχύλισμα της ίδιας δρόγης (HR.MM-46), εμφανίζεται πλούσιο σε πολικές φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ενδιαφέρουν την παρούσα μελέτη. Το HR.MM-48, το οποίο προέρχεται από τα σπέρματα του *Ceratonia siliqua*, είναι λιγότερο πλούσιο σε φαινολικά παράγωγα από 46, ωστόσο επειδή διαφοροποιείται στα κύρια συστατικά του επιλέχθηκε και αυτό για περαιτέρω μελέτη.

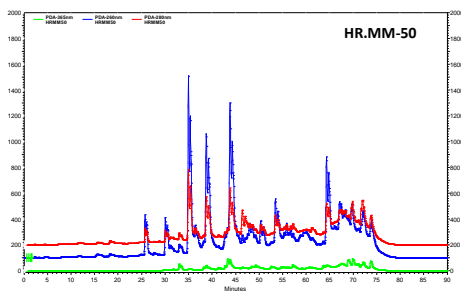
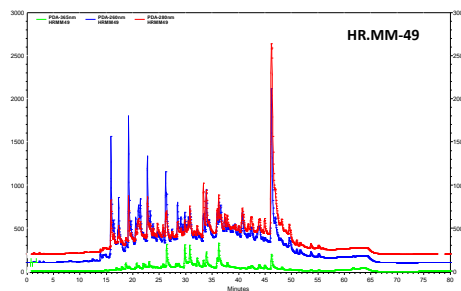


Ceratonia siliqua

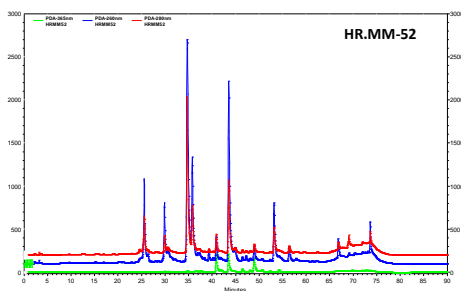
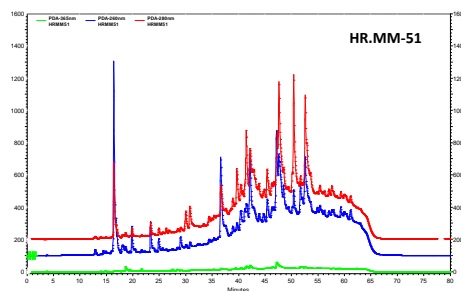


Ceratonia siliqua

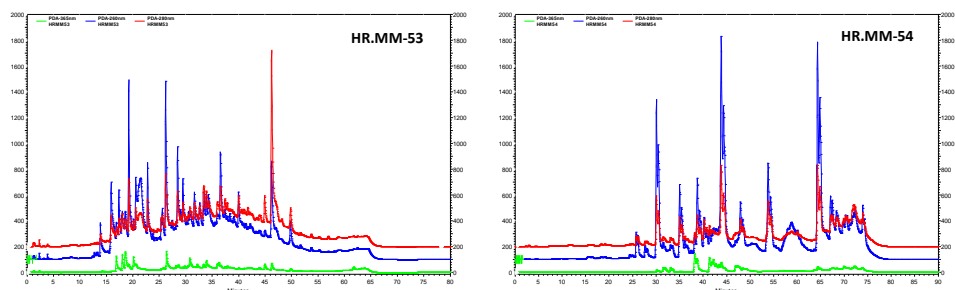
Ένα φυτικό γένος το οποίο έχει μελετηθεί αρκετά ως προς την οιστρογονική του δράση, είναι το γένος *Genista*. Στην παρούσα μελέτη έχουν παρασκευαστεί εκχυλίσματα από τέσσερα είδη του γένους, λόγω του υψηλού βιολογικού τους ενδιαφέροντος. Η χρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων ήταν επιβεβαιωτική της αρχικής μας επιλογής. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα εμφανίζονται πλούσια σε ουσίες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονοειδών, όταν τα αντίστοιχα μεθανολικά περιέχουν γλυκοσίδες των φλαβονοειδών. Έτσι, θα μελετήσουμε περαιτέρω όλα τα εκχυλίσματα του γένους και πιο συγκεκριμένα, τα HR.MM-49, 50 των υπέργειων τμημάτων της *Genista acanthoclada*, τα HR.MM-51, 52 του είδους *Genista depressa*, τα HR.MM-53, 54 των υπέργειων τμημάτων της *Genista hassertiana* και τα HR.MM-55, 56 από το είδος *Genista milii*.



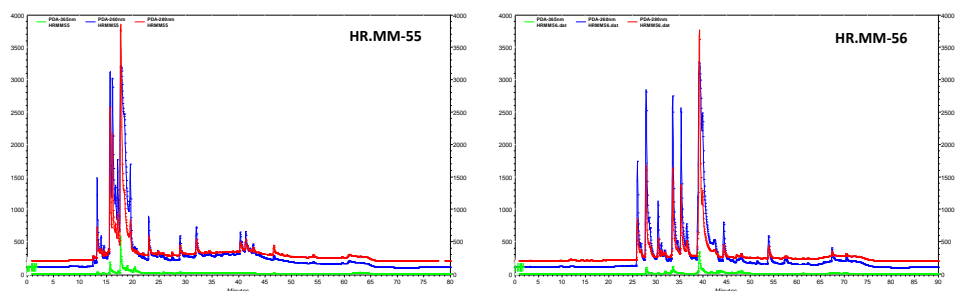
Genista acanthoclada



Genista depressa

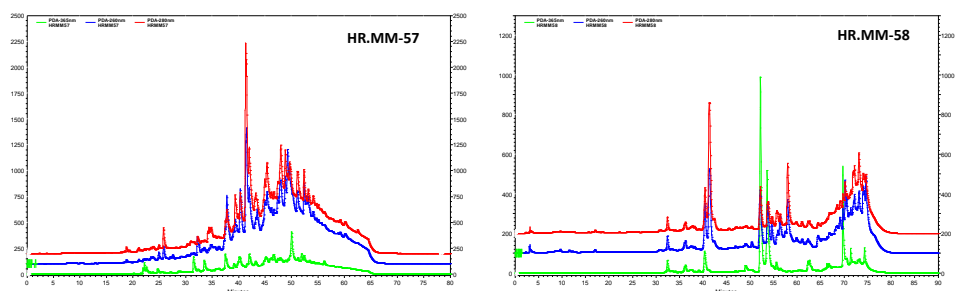


Genista hassertiana



Genista milii

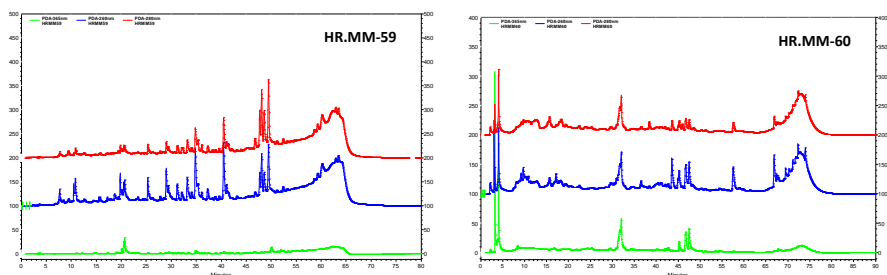
Ανάλογου φυτοχημικού-βιολογικού ενδιαφέροντος είναι το γένος *Glycyrrhiza*, το οποίο εκπροσωπείται από το είδος *Glycyrrhiza glabra* και πιο συγκεκριμένα από τα εκχυλίσματα των ριζών του (HR.MM-57, 58). Η χρωματογραφική μελέτη των παραπάνω εκχυλισμάτων, έδειξε ότι περιέχουν ουσίες της κατηγορίας των φλαβονόνων, μιας και απορροφούν στα 254 nm και χρωματίζονται κόκκινες μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλίνη και έτσι κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης.



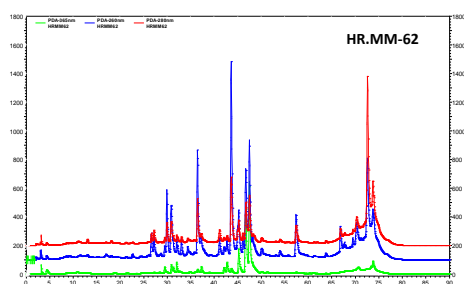
Glycyrrhiza glabra

Τα εκχυλίσματα HR.MM-59, 60 και HR.MM-61, 62 προέρχονται από τους καρπούς-σπέρματα και τα υπέργεια τμήματα αντίστοιχα, του είδους *Lupinus albus*. Στον χρωματογραφικό έλεγχο με HPTLC, φάνηκε ότι το εκχύλισμα HR.MM-59 χαρακτηρίζεται από την παρουσία

λιπαρών οξέων, τα οποία είναι γνωστό ότι δεν διαθέτουν σημαντική οιστρογονική δράση, ενώ το HR.MM-61 δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο χρωματογραφικό ενδιαφέρον. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα, μόνο το HR.MM-62 των υπέργειων τμημάτων φαίνεται να περιέχει πολικές φαινολικές ενώσεις. Αντίθετα, από τον έλεγχο με HPLC προέκυψε ότι τόσο τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα, όσο και το HR.MM-60 περιέχουν μια πληθώρα φαινολικών ενώσεων και κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη τους.

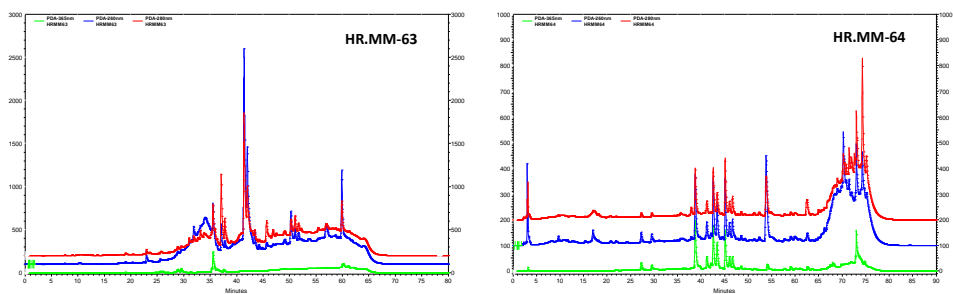


Lupinus albus (καρποί-σπέρματα)

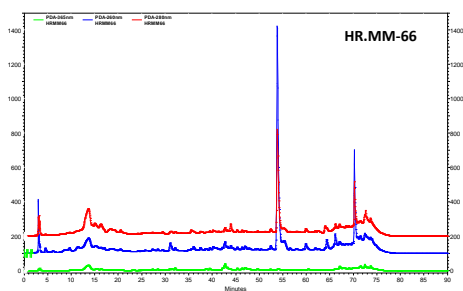


Lupinus albus (υπέργεια τμήματα)

Η επόμενη ομάδα εκχυλισμάτων ανήκει στο γένος *Ononis* και περιλαμβάνει τα είδη *Ononis rubescens*, *Ononis spinosa* και *Ononis viscosa*. Από τα παραπάνω, το HR.MM-63, το οποίο προέρχεται από όλα τα μέρη του φυτού *Ononis rubescens*, παρουσιάζει το μεγαλύτερο φυτοχημικό ενδιαφέρον, συγκρινόμενο με τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των άλλων ειδών (HR.MM-65, 67). Η μελέτη των χρωματογραφημάτων τόσο της HPLC, όσο και της HPTLC του HR.MM-63 έδειξε ότι περιέχει φαινολικά παράγωγα και ίσως ισοφλαβονοειδή και αποφασίστηκε η διερεύνηση των βιολογικών ιδιοτήτων του. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα, το HR.MM-64 φαίνεται ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη, λόγω της παρουσίας γλυκοσιδικών φλαβονών, καθώς και το HR.MM-66 (*Ononis spinosa*-υπέργεια), το οποίο περιέχει δύο κυρίως ουσίες που απορροφούν στα 254 nm και από τη χρωματογραφική τους εικόνα κρίνεται εύκολη η απομόνωσή τους.

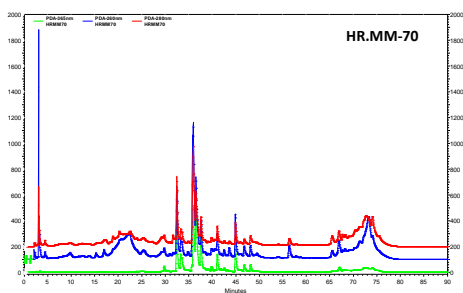


Ononis pubescens



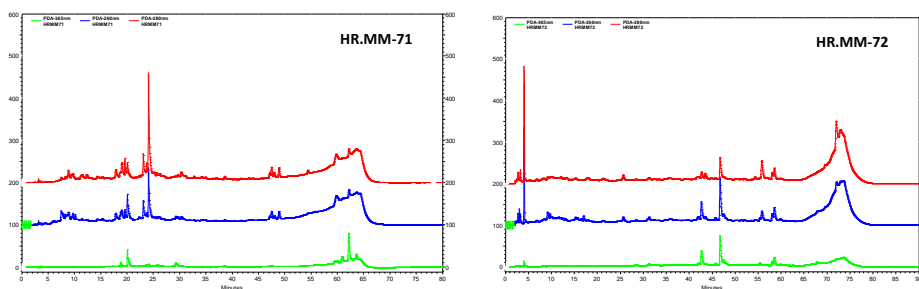
Ononis spinosa

Τα υπέργεια, ανθισμένα τμήματα του είδους *Psoralea bituminosa* έδωσαν τα εκχυλίσματα HR.MM-69, 70. Από αυτά μόνο το HR.MM-70 παρουσιάζει φυτοχημικό ενδιαφέρον και θα μελετηθεί ως προς τη βιολογική του δραστηριότητα. Η μελέτη των χρωματογραφημάτων του έδειξε ότι περιέχει φαινολικά παράγωγα, κάποια από τα οποία πιθανόν να ανήκουν στις πτεροκαρπάνες. Η χημική αυτή κατηγορία φυσικών προϊόντων φαίνεται βιβλιογραφικά να χαρακτηρίζει το γένος.



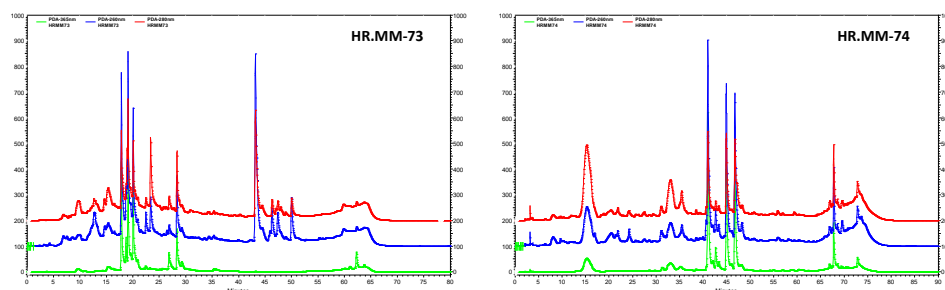
Psoralea bituminosa

Τα εκχυλίσματα HR.MM-71, 72 του είδους *Allium ampeloprasum* αν και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο χρωματογραφικό ενδιαφέρον κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω αξιολόγησή τους, μιας και σε άλλα είδη του γένους έχουν αποδοθεί δυνητικά οστεοπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στην περιεχόμενη ρουτίνη.



Allium ampeloprasum

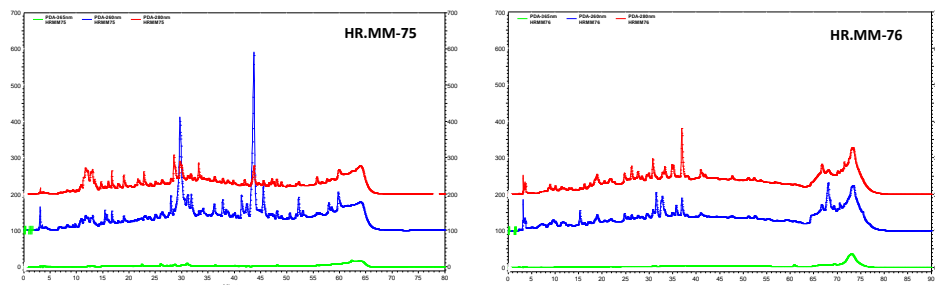
Τα εκχυλίσματα HR.MM-73, 74 του είδους *Morina persica* θεωρούμε ότι αξίζει να αξιολογηθούν σε *in vitro* βιολογικά συστήματα. Από τα χρωματογραφήματά τους καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι περιέχουν κάποια τριτερπένια και νεολιγνάνια. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα νεολιγνάνια αποτελούν φαινολικά παράγωγα με οιστρογονικές ιδιότητες.



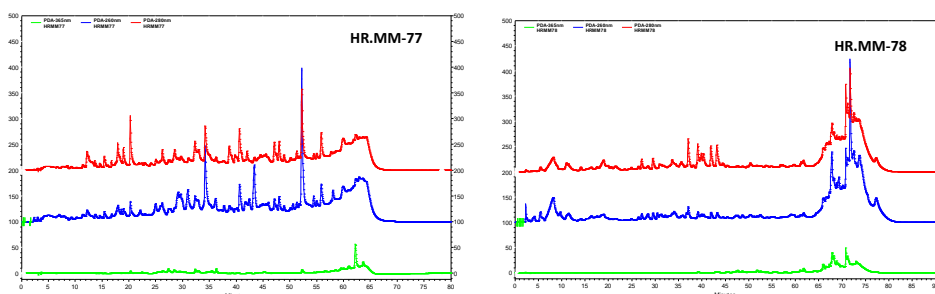
Morina persica

Ένα ακόμη εκχύλισμα με βιολογικό ενδιαφέρον είναι το HR.MM-76 των κλαδιών και φύλλων του είδους *Pinus heldreichi*. Χρωματογραφικά εμφανίζεται πλούσιο σε ανθοκυάνες, οι οποίες αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία φυσικών προϊόντων με σπουδαίες βιολογικές ιδιότητες. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα HR.MM-123, 124 από τον φλοιό του *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* δεν παρουσιάζουν αντιστοίχως ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα και δεν θα αξιολογηθούν περαιτέρω. Τέλος, τα εκχυλίσματα HR.MM-77, 78 του είδους *Abies cephalonica* στον χρωματογραφικό έλεγχο με HPTLC, φαίνεται να περιέχουν τερπενικές ενώσεις, οι οποίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πιθανόν ανήκουν στην κατηγορία των διτερπενίων, ενώ ο έλεγχος

με HPLC κατέδειξε την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού ουσιών που παρουσιάζουν απορρόφηση και γι' αυτό θα αξιολογηθούν περαιτέρω.

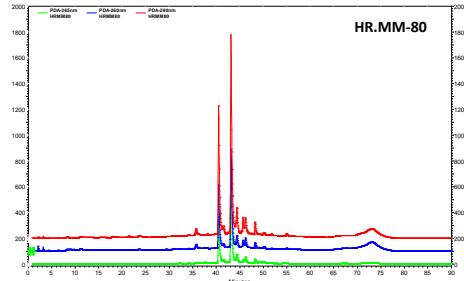


Pinus heldreichii

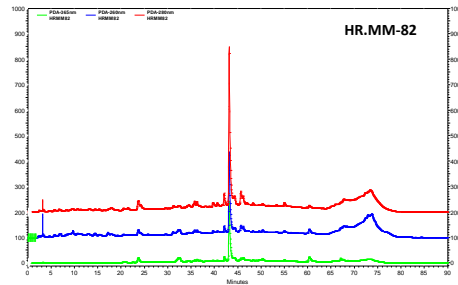
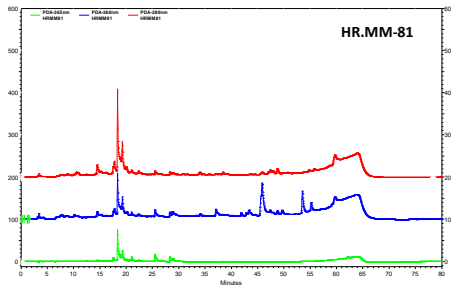


Abies cephalonica

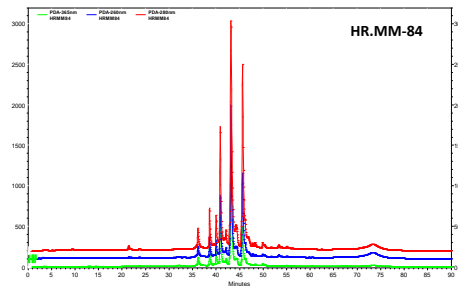
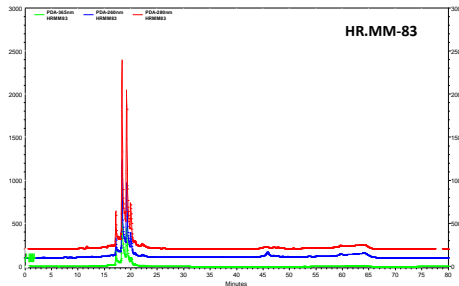
Τα εκχυλίσματα HR.MM-79 ως 88 ανήκουν στο γένος *Plantago*. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα του γένους, το πλέον πλούσιο σε πολικές φαινολικές ενώσεις φαίνεται να είναι το HR.MM-84, το οποίο ανήκει στο είδος *Plantago holosteum*. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Plantago atrata* subsp. *graeca* (HR.MM-80), λόγω της παρουσίας φαινυλαιθανοειδικών γλυκοσιδών, ουσιών με χαρακτηριστική οιστρογονική δράση, αλλά και το HR.MM-82 του *Plantago coronopus* subsp. *cummutata*. Σύμφωνα με την χρωματογραφική εικόνα των εκχυλισμάτων του οξικού αιθυλεστέρα, πιθανολογείται η ύπαρξη τερπενικών παραγώγων, ενώ μόνο στα HR.MM-81 και 83 παρατηρούνται απορροφήσεις οι οποίες αποδίδονται σε φαινολικές ουσίες. Για το λόγο αυτό τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των ειδών *Plantago coronopus* subsp. *cummutata* και *Plantago holosteum* θα μελετηθούν στο επόμενο στάδιο μελέτης.



Plantago atrata subsp. *graeca*

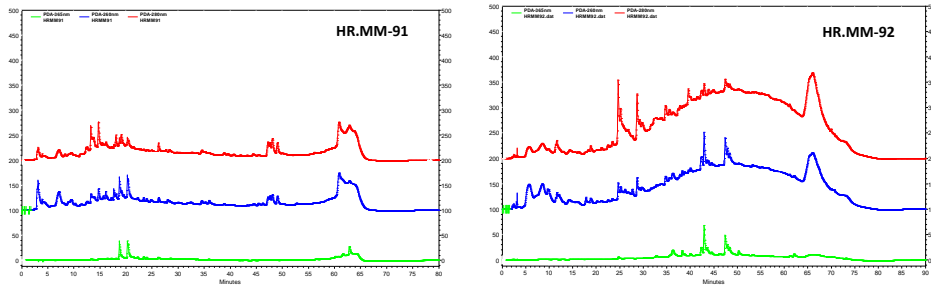


Plantago coronopus subsp. *cummutata*

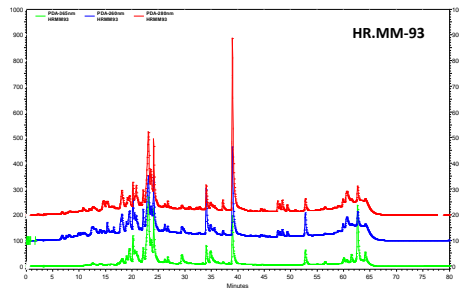


Plantago holosteum

Τα εκχυλίσματα HR.MM-89, 90 του είδους *Platanus orientalis* δεν παρουσίασαν ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα και δεν θα μελετηθούν περαιτέρω. Ενώ, από τα εκχυλίσματα του γένους *Polygonum* (HR.MM-91 έως 94 και 165, 166) κρίθηκε σκόπιμο να μελετήσουμε τα HR.MM-93 του είδους *Polygonum tinctoria* και HR.MM-91, 92 του είδους *Polygonum idaeum*, εξαιτίας της ύπαρξης χρωστικών ουσιών, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ανθοκυανών.

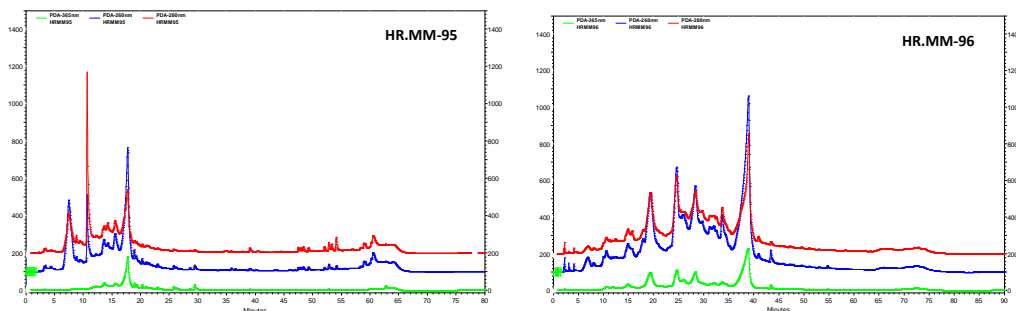


Polygonum idaeum



Polygonum tinctoria

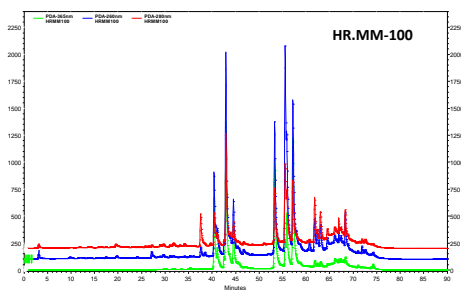
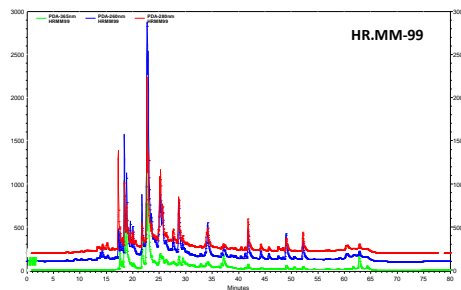
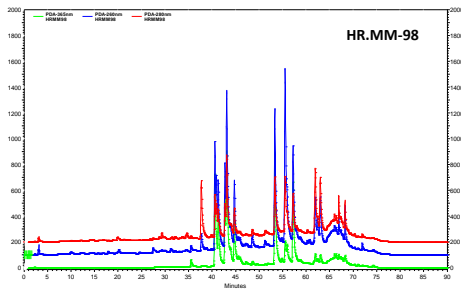
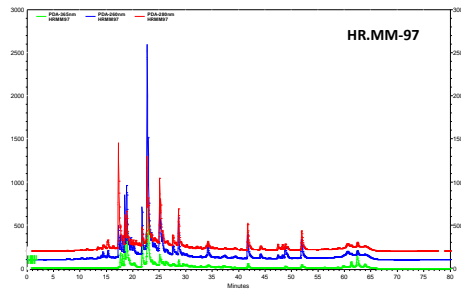
Από το περικάρπιο του είδους *Punica granatum* προέκυψαν τα εκχυλίσματα HR.MM-95 και 96, τα οποία θα αξιολογηθούν ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες, τόσο εξαιτίας της χρωματογραφικής τους εικόνας, όσο και βάσει μελετών οι οποίες αποδίδουν στο είδος οπροστατευτικές ιδιότητες.



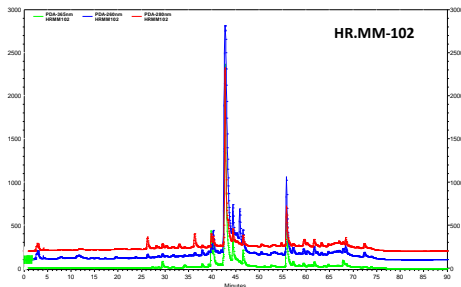
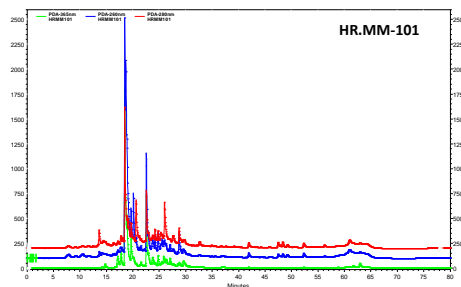
Punica granatum

Επόμενη, μεγάλη και ενδιαφέρουσα ομάδα εκχυλισμάτων είναι εκείνη του γένους *Rhamnus*. Όλα τα εκχυλίσματα του γένους *Rhamnus* κρίθηκαν εξαιρετικά ενδιαφέροντα, κυρίως λόγω της ύπαρξης φλαβονοειδών (πορτοκαλί-κίτρινη χρώση μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλίνη). Έτσι, θα μελετήσουμε στην επόμενη φάση ελέγχου τα HR.MM-97, 98, 99 και 100 των

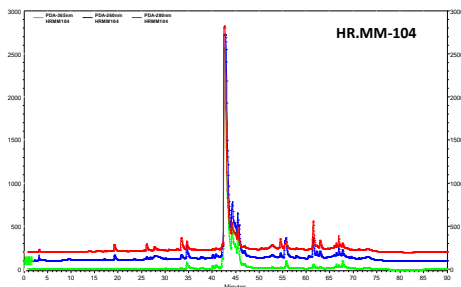
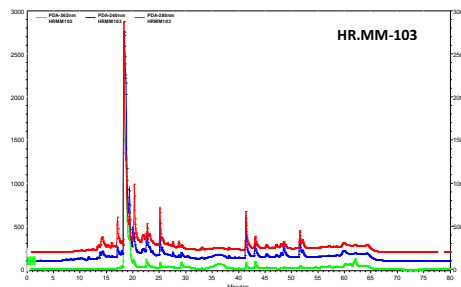
υπέργειων τμημάτων του είδους *Rhamnus alpinus*, τα HR.MM-101 και 102 του είδους *Rhamnus lycioides* subsp. *graecus* και τέλος τα HR.MM-103 και 104 από το είδος *Rhamnus sibthorpiana*.



Rhamnus alpinus



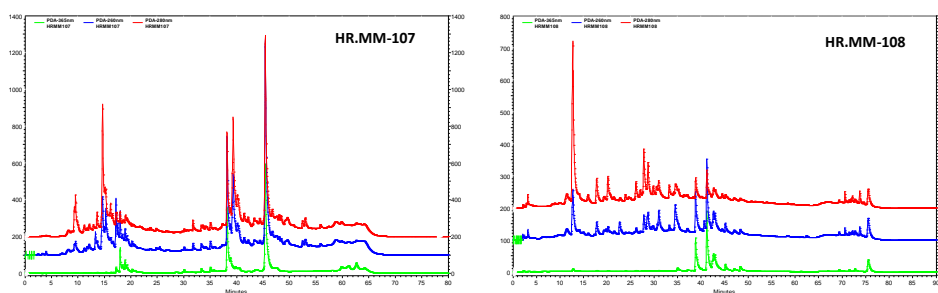
Rhamnus lycioides subsp. *graecus*



Rhamnus sibthorpiana

Τα κλαδιά και φύλλα του είδους *Styrax officinalis* έδωσαν τα εκχυλίσματα HR.MM-105 και 106, τα οποία δεν παρουσίασαν ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα, με μόνο χαρακτηριστικό, την πιθανή παρουσία σαπωνινών στο HR.MM-105.

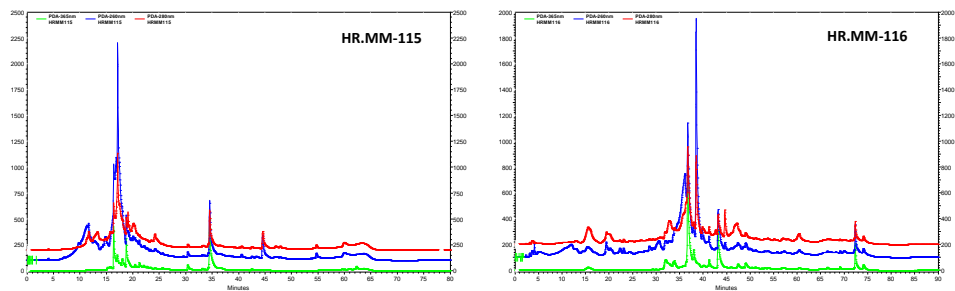
Το είδος *Taxus baccata* εκπροσωπείται από δύο δρόγες, τα φύλλα (HR.MM-107, 108) και τα λεπτά κλαδιά (HR.MM-109, 110). Από τα παραπάνω εκχυλίσματα, χημικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα HR.MM-107 και 108, μιας και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας ουσίας, η οποία δεν απορροφά στα μήκη κύματος 254, 366 nm, αλλά δίνει καφέ χρώση μετά από εμφάνισή της με θειϊκή βανιλίνη.



Taxus baccata

Τα εκχυλίσματα HR.MM-111, 112 προέκυψαν από το είδος *Bupleurum fruticosum* και πιο συγκεκριμένα από τα στελέχη με φύλλα του φυτού. Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων HPLC και HPTLC των παραπάνω, δεν φαίνεται να περιέχουν μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στις χημικές κατηγορίες που είναι γνωστές για τις οιστρογονικές τους ιδιότητες.

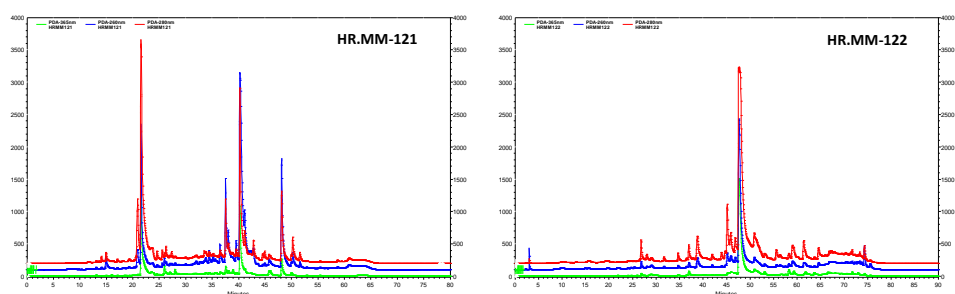
Το επόμενο είδος το οποίο μελετήθηκε χρωματογραφικά είναι το *Vitex agnus-castus*. Τα εκχυλίσματα των ώριμων καρπών του φυτού (HR.MM-113, 114) δεν παρουσίασαν ενδιαφέρουσα χρωματογραφική εικόνα, αντίθετα με τα εκχυλίσματα HR.MM-115, 116, τα οποία προέκυψαν από τα κλαδιά και φύλλα. Αναλυτικότερα, τα HR.MM-115 και 116, φαίνεται χρωματογραφικά ότι περιέχουν μεταβολίτες της κατηγορίας των φλαβονοειδών, η οποία είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα για το βιολογικό μας στόχο.



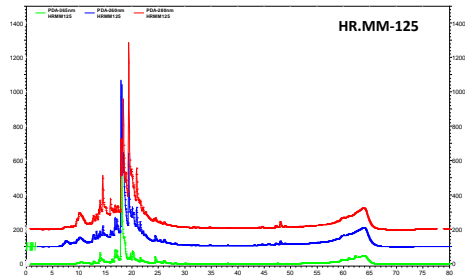
Vitex agnus-castus

Φυτικά είδη χωρίς ιδιαίτερο χρωματογραφικό ενδιαφέρον φαίνεται να είναι τα *Sambucus nigra* (HR.MM-119, 120), *Melilotus graecus* (HR.MM-131, 132), *Ballota pseudodictamnus* ssp. *pseudodictamnus* (HR.MM-135, 136) και *Vicia sativa* (HR.MM-155, 156).

Από το ξύλο του είδους *Morus alba* και τα δύο εκχυλίσματα (HR.MM-121, 122) φαίνονται πλούσια σε φαινολικά παράγωγα, μιας και οι ουσίες που περιέχουν απορροφούν στα 254 nm και δίνουν καφέ χρώση κατόπιν εμφάνισής τους με θειϊκή βανιλίνη, καθώς και φλαβονοειδή, οδηγώντας μας στην απόφαση για περαιτέρω *in vitro* αξιολόγησή τους. Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων HPLC και HPTLC των εκχυλισμάτων HR.MM-125, 126, του είδους *Prunus spinosa* κρίθηκε ως πιο ενδιαφέρον το HR.MM-125. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν απορρόφηση στα 254 και 366 nm και δίνουν καφέ χρώση με θειϊκή βανιλίνη. Από τα παραπάνω υποθέτουμε ότι πρόκειται για ουσίες της κατηγορίας των φλαβονών και προανθοκυανιδών.



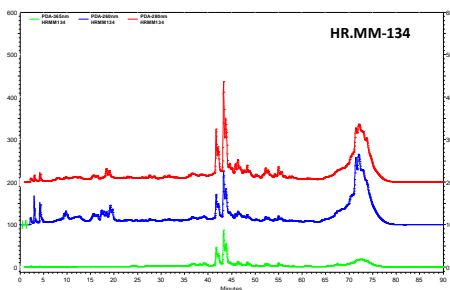
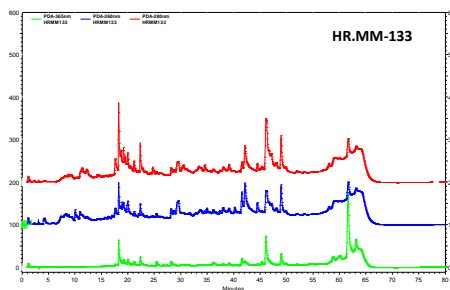
Morus alba



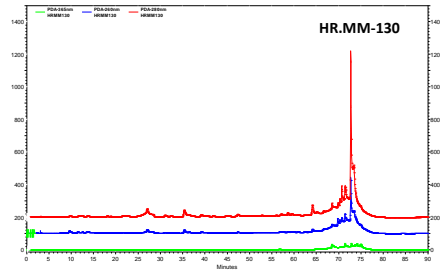
Prunus spinosa

Το γένος *Lathyrus* εκπροσωπείται από δύο φυτικά είδη, το *Lathyrus clymenum* (HR.MM-127, 128) και το *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (HR.MM-153, 154), όμως η χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων τους δεν χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη μεταβολιτών που πιθανόν να ενδιαφέρουν την παρούσα μελέτη.

Εξαιρετικά ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ παρουσιάζει το είδος *Ajuga orientalis*. Τα εκχυλίσματά του (HR.MM-133, 134) χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυρίως διτερπενίων, τα οποία υποθέτουμε ότι ανήκουν στην ομάδα του κλεροδανίου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ανάλογες ουσίες έχουν βρεθεί σε δρόγες οι οποίες χρησιμοποιούνται στη λαϊκή θεραπευτική για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Το μεθανολικό εκχύλισμα HR.MM-130, του ριζώματος του είδους *Zingiber officinale*, περιέχει φαινολικά παράγωγα, τα οποία με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα ανήκουν στην κατηγορία των αρυλοαλκανίων (γνωστά για τις οιστρογονικές τους ιδιότητες) και για αυτό το λόγο αποφασίστηκε η βιολογική αξιολόγησή του.

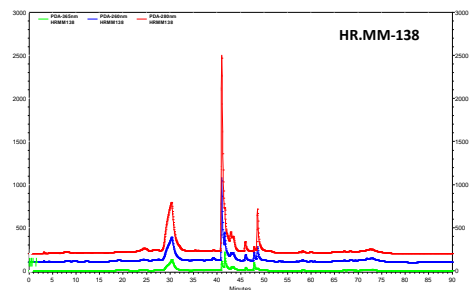
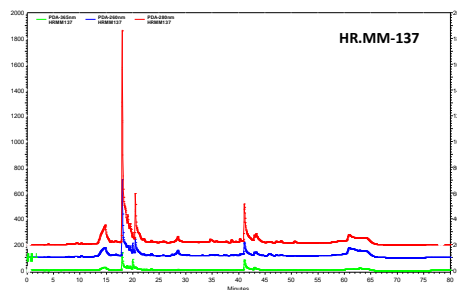


Ajuga orientalis

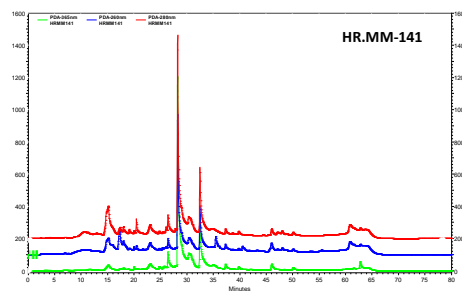


Zingiber officinale

Τα γένη *Mentha* και *Salvia*, παρουσιάζουν ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον, μιας και υπάρχουν αναφορές σχετικές με τις οιστρογονικές ιδιότητες και των δύο γενών. Από την χρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων των ειδών του γένους *Mentha*, διαπιστώσαμε την παρουσία φαινολικών παραγώγων, με πιο ενδιαφέρον εκπρόσωπο το μεθανολικό εκχύλισμα HR.MM-138 της *Mentha aquatica*. Εξίσου σημαντικό κρίθηκε και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα HR.MM-137 του προαναφερόμενου είδους, αλλά και το HR.MM-141, το οποίο προέκυψε από το είδος *Mentha pulegium*. Στο τελευταίο εκχύλισμα διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός κύριου τερπενίου που πιθανόν χαρακτηρίζει τη δράση του (δεν απορροφά αλλά χρωματίζεται μπλε με θειϊκή βανιλίνη).

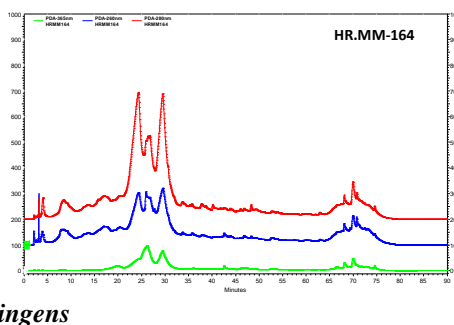
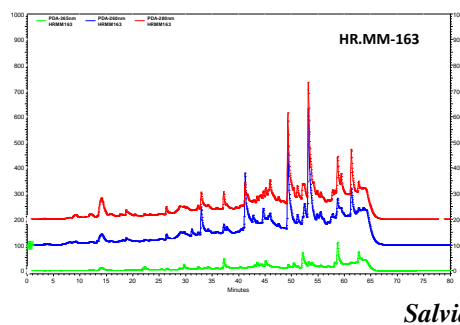
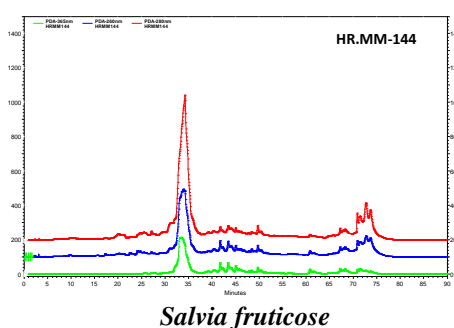
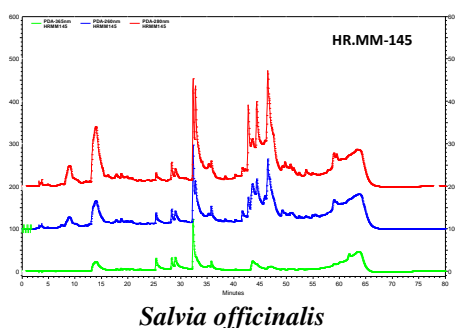


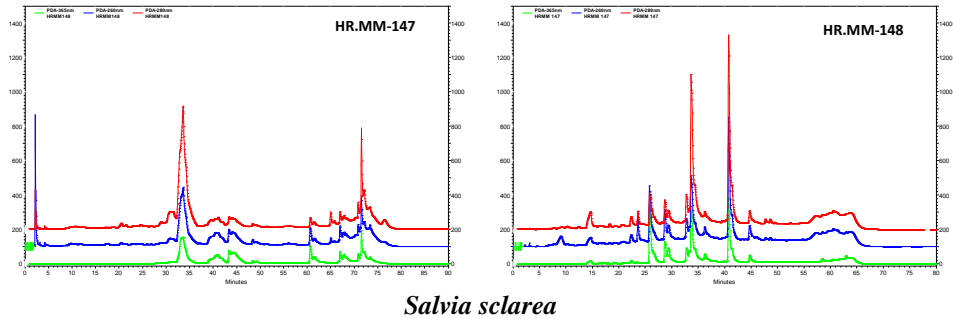
Mentha aquatica



Mentha pulegium

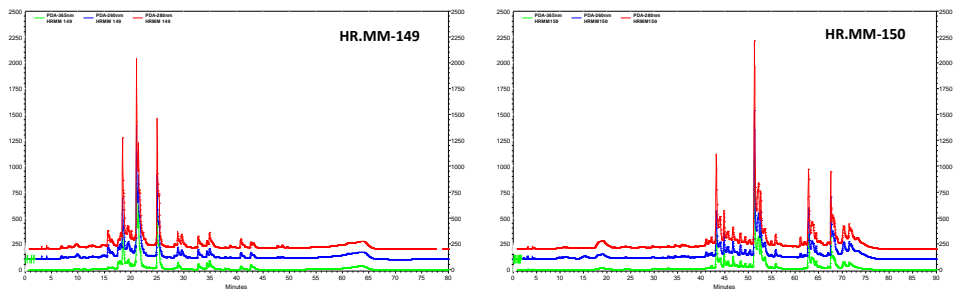
Στην παρουσία τερπενίων έχει αποδοθεί η οιστρογονική δράση του είδους *Salvia miltiorrhiza*. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν χρωματογραφικά, ελληνικά είδη του γένους *Salvia* και διαπιστώθηκε η παρουσία τερπενίων σε όλα τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα όλων των ειδών. Για περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκαν τα εκχυλίσματα τα οποία προέκυψαν από τα υπέργεια, ανθισμένα τμήματα της *Salvia officinalis* (HR.MM-145) και *Salvia sclarea* (HR.MM-147), καθώς και το εκχύλισμα των ριζών της *Salvia ringens* (HR.MM-163). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των δρογών που μελετήθηκαν χαρακτηρίζονται και εκείνα από την παρουσία τερπενίων, αλλά και φαινολικών παραγώγων. Εξαιτίας την καλύτερης χρωματογραφικής τους εικόνας θα μελετηθούν στην επόμενη φάση ελέγχου τα εκχυλίσματα HR.MM-144 και HR.MM-148 από τα υπέργεια, ανθισμένα τμήματα της *Salvia fruticosa* και *Salvia sclarea* αντίστοιχα, καθώς και το HR.MM-164 των ριζών της *Salvia ringens*.





Salvia sclarea

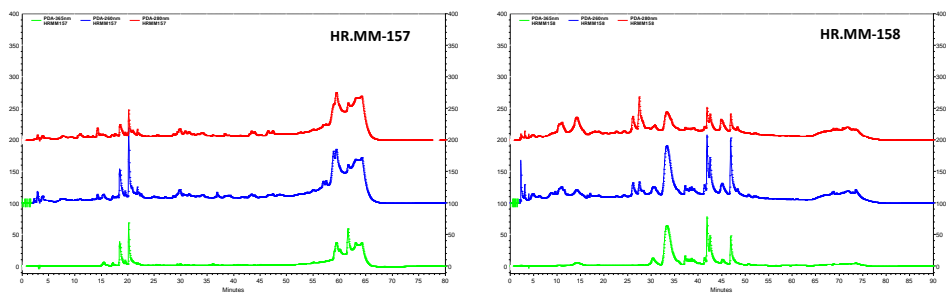
Ένα φυτικό γένος το οποίο έχει επίσης χαρακτηριστεί για την οιστρογονική του δράση είναι το γένος *Sideritis*. Η χρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα των ειδών *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* (HR.MM-149) και *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* (HR.MM-151) κατέδειξε την παρουσία τερπενικών ενώσεων, με χαρακτηριστική την ύπαρξη δύο τερπενίων τύπου καουρενίου στο HR.MM-149. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των προαναφερόμενων δρογών κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί περαιτέρω το HR.MM-150 του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, λόγω της παρουσίας τόσο τερπενικών ενώσεων, όσο και φλαβονοειδών.



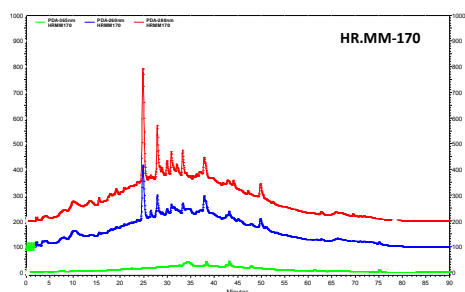
Sideritis clandestina subsp. *clandestina*

Από το είδος *Schinus molle* αναλύθηκαν χρωματογραφικά δύο δρόγες. Τα φύλλα του φυτού έδωσαν τα εκχυλίσματα HR.MM-157 και 158, ενώ τα κλαδιά του έδωσαν τα HR.MM-159 και 160. Μετά τη χρωματογραφική ανάλυση των παραπάνω εκχυλισμάτων, αποφασίστηκε η περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών ιδιοτήτων των HR.MM-157 και 158, λόγω της ύπαρξης τερπενικών ενώσεων, με χαρακτηριστική την παρουσία τριών κυρίως τερπενίων στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Τέλος, αποφασίστηκε η βιολογική διερεύνηση του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος (HR.MM-170) του είδους *Vitis vinifera* (εκχύλισμα κρασιού, ποικιλίας Μοσχάτου

Αμβούργου). Για το συγκεκριμένο είδος έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά μια σειρά βιολογικών ιδιοτήτων, αλλά και η χρωματογραφική ανάλυσή του ήταν αρκετά ενδιαφέρουσα.



Schinus molle



Vitis vinifera

4. Προκαταρκτική *in vitro* αξιολόγηση φυτικών εκχυλισμάτων

4.1. Προκαταρκτικός έλεγχος της οιστρογόνου / αντιοιστρογόνου δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων

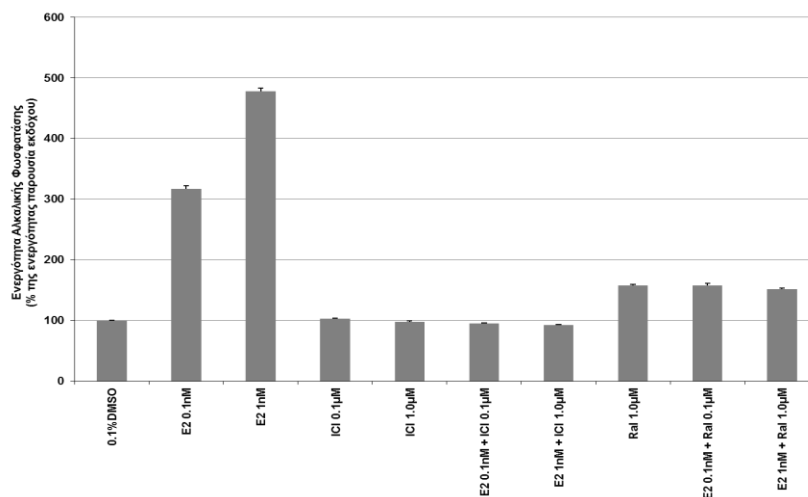
Στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφεται η συμβολή των οιστρογόνων και αντιοιστρογόνων τύπου SERM στη διατήρηση της οστικής μάζας και κατ' επέκταση στη διατήρηση της υγείας των οστών. Βασιζόμενοι σε αυτή την παραδοχή προχωρήσαμε στην αξιολόγηση της οιστρογονικής αλλά και αντιοιστρογονικής δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς την επίδραση τους τόσο στην απουσία, όσο και στην παρουσία οιστρογόνου σε εμμηνοπαυσιακό επίπεδο (0.1 nM οιστραδιόλης) στα κύτταρα Ishikawa (ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου που εκφράζουν ERα & ERβ και χρησιμοποιείται για *in vitro* εκτίμηση οιστρογόνου δράσης) και στα κύτταρα MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου μαστού που εκφράζουν μόνο ERα και χρησιμοποιούνται για *in vitro* εκτίμηση της ικανότητας προαγωγής ήδη εγκατεστημένου καρκίνου του μαστού).

Η οιστρογόνος δράση προσδιορίστηκε στα κύτταρα Ishikawa μέσω της επαγωγής της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) απουσία οιστρογόνου στο υλικό καλλιέργειας και στα κύτταρα MCF-7 μέσω της επαγωγής του πολλαπλασιασμού τους. Η αντιοιστρογονική δράση προσδιορίζεται αντίστοιχα μέσω καταστολής της επαγωγής της AlkP στα κύτταρα Ishikawa και καταστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7, παρουσία όμως οιστραδιόλης στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και σε συγκέντρωση 0.1 nM.

Ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των SERM's επιδρούν ασκώντας μερική επαγωγή/καταστολή της AlkP στα κύτταρα Ishikawa (απουσία ή παρουσία οιστρογόνου στο θρεπτικό υλικό αντίστοιχα), αλλά δεν επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7. Οι δύο προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές θεωρούνται ότι αναπαριστούν *in vitro* την ανταπόκριση σε οιστρογόνα και αντιοιστρογόνα των επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας και του μαστού αντίστοιχα και έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της οιστρογονικής/αντιοιστρογονικής δράσης φυσικών και συνθετικών ενώσεων [402, 403].

4.1.1. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Για να αξιολογηθεί η οιστρογονική δράση των γνωστών αγωνιστών του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) εξετάστηκε η ρύθμιση της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa, η οποία θεωρείται δείκτης της εγγενούς οιστρογονικής δράσης του υπό εξέταση δείγματος στη μήτρα [153]. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.4.3. Η οιστραδιόλη, η οποία αποτελεί τον φυσικό προσδέτη του υποδοχέα ER χρησιμοποιείται ως ένωση αναφοράς και σε συγκέντρωση 1 nM επάγει περίπου 5 φορές την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης αποκλειστικά μέσω ERα και ERβ, δεδομένου ότι η επαγωγή καταστέλλεται πλήρως στην παρουσία ICI-182.780 (ισχυρό αντιοιστρογόνο). Αντίθετα από το ICI, η ραλοξιφαίνη ως αντιοιστρογόνο τύπου SERM, εμφανίζει μικρότερο αγωνισμό της τάξης του 15% αυτού της οιστραδιόλης (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του εκδόχου. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ο αγωνισμός των υπό εξέταση δειγμάτων σε σχέση με εκείνον της οιστραδιόλης (E₂, 1 nM) υπολογίστηκε ως εξής:

% αγωνισμός = $(OD_{\text{δείγματος}} - OD_{\text{εκδόχου}}) * 100 / (OD_{E_2} - OD_{\text{εκδόχου}})$, OD: 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 $\geq 67\%$, 34-66%, 33-10% και $< 10\%$.

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η ικανότητα επαγωγής της AlkP ενενήντα τεσσάρων (94) εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης σε τρεις συγκεντρώσεις (1 μg/ml, 0.1 μg/ml και 0.01 μg/ml), τα οποία ανήκουν σε είκοσι μία οικογένειες φυτών. Ο μεγαλύτερος αριθμός εκχυλισμάτων προήλθε από την οικογένεια Leguminosae ή Fabaceae, από την οποία αξιολογήθηκε η δραστηριότητα 25 εκχυλισμάτων των γενών *Astragalus*, *Genista*, *Glycyrrhiza*, *Ceratonia*, *Psoralea*, *Lupinus* και *Ononis*. Η Leguminosae χαρακτηρίζεται από την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν φυτοχημικά στις κατηγορίες των φλαβονοειδών και ισοφλαβονοειδών και χαρακτηρίζονται μεταξύ άλλων ως φυτοοιστρογόνα. Πράγματι, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1, τα περισσότερα εκχυλίσματα του γένους *Genista* και ειδικότερα και τα δύο εκχυλίσματα των ειδών *Genista acanthoclada*, *Genista hassertiana*, αλλά και τα μεθανολικά παρασκευάσματα των *Genista milli* και *Genista depressa* σε συγκέντρωση 1 μg/ml, παρουσίασαν μεγάλη ικανότητα επαγωγής της AlkP και χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί αγωνιστές. Αντίστοιχη δραστηριότητα στη ίδια συγκέντρωση, εμφάνισε και το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Lupinus albus*, ενώ το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των καρπών του ίδιου είδους χαρακτηρίστηκε ως μερικός αγωνιστής, συγκρινόμενο με την οιστραδιόλη (1 nM). Μερικό αγωνισμό επέδειξαν επίσης, τα εκχυλίσματα της *Glycyrrhiza glabra* και το μεθανολικό παρασκεύασμα του είδους *Ononis pubescens* και αυτά μόνο σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Όλα τα παρασκευάσματα επέδειξαν ασθενή ή μερικό αγωνισμό στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου.

Οικ. Leguminosae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E ₂ 1 nM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml
35	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	W (13.3±0.1)	M	M
36	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια ανθισμένα)-MeOH	W (15.3±1.3)	M	M
39	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες)-EtOAc	M	M	M
40	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες) -MeOH	M	M	M
43	<i>Astragalus pubiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα, τμήματα ριζών, καρποί)-EtOAc	M	M	M
55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	P (63.9±4.7)	M	M
56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	F (82.4±5.6)	W (15.5±3.5)	W (14.2±7.4)
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (81.2±6.3)	W (25.1±5.3)	M
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (84.6±2.5)	W (16.0±4.5)	M
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (82.2±3.0)	W (12.5±0.1)	M
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (100.7±9.8)	W (29.1±6.6)	M
51	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -EtOAc	W (32.4±2.0)	M	M
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	F (88.3±6.0)	M	M
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	P (50.2±6.8)	W (17.2±1.0)	M
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	P (45.5±0.1)	W (11.8±0.2)	M
45	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -EtOAc	M	M	M
46	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -MeOH	M	M	M
48	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα) -MeOH	M	M	M
70	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	W (19.3±0.5)	M	M
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	P (54.9±13.9)	W (26.0±0.8)	W (14.6±0.5)
60	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -MeOH	W (11.1±0.7)	M	M
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (71.1±7.7)	M	M
63	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -EtOAc	W (23.2±1.5)	M	M
64	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -MeOH	P (40.7±18.5)	M	M
66	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	M	M	M

Πίνακας 4.1 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).

Τα εκχυλίσματα των οικογενειών Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae αντιπροσωπεύτηκαν από τα γένη *Cotinus*, *Pistaceae*, *Berberis* και *Iris*. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.2, μόνο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* σε συγκέντρωση 1 µg/ml εμφάνισε ισχυρή αγωνιστική δράση σε σχέση με εκείνη της οιστραδιόλης με τιμή αγωνισμού 83.6±12.5%, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του ίδιου είδους έδωσε μερικό αγωνισμό (33.7±0.9%) στην ίδια συγκέντρωση.

Οικ. Acanthaceaea, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae, Iridaceae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E ₂ 1 nM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml
1	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-EtOAc	M	M	M
2	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-MeOH	M	M	M
3	<i>Cotinus coggygia</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές)-EtOAc	M	P (38.8±1.4)	P (65.1±0.3)
4	<i>Cotinus coggygia</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές) -MeOH	P (63.2±9.4)	M	M
7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)-EtOAc	P (33.6±1.2)	W (32.3±0.6)	W (30.4±1.0)
8	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)- MeOH	M	W (11.4±1.1)	M
11	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) -EtOAc	W (20.2±0.6)	M	M
12	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) - MeOH	M	M	M
157	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) -EtOAc	M	M	M
158	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) - MeOH	M	M	M
15	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) -EtOAc	M	M	M
16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) - MeOH	P (61.0±18.1)	M	M
22	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	M	M	M
24	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί) - MeOH	M	M	M
28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί) - MeOH	M	M	M
29	<i>Iris attica</i> (Όλο) -EtOAc	W (30.8±0.7)	M	M
30	<i>Iris attica</i> (Όλο) - MeOH	W (12.1±0.2)	M	M
31	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	M	M	W (16.7±3.1)
32	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M	M	M
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	F (83.6±12.5)	M	M
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) - MeOH	P (33.7±0.9)	M	M

Πίνακας 4.2 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceaea, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae 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).

Ως μερικοί αγωνιστές σε συγκέντρωση 1 µg/ml χαρακτηρίστηκαν επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα του ξύλου του *Cotinus coggygia* (63.2±9.4%) και το αντίστοιχο των ριζών του *Berberis cretica* (61.0±18.1%), αλλά και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του ξύλου του *Pistacia lentiscus* (33.6±1.2%). Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του ξύλου του *Cotinus coggygia*, αν και δεν χαρακτηρίστηκε από σημαντική οιστρογονικότητα στα 1 µg/ml, επέδειξε μερικό αγωνισμό στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου.

Η οικογένεια Labiatae αντιπροσωπεύτηκε από τα γένη *Sideritis*, *Salvia*, *Mentha* και *Ajuga* και μεταξύ αυτών μόνο τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων της *Mentha aquatica* επέδειξαν ισχυρό αγωνισμό σε συγκέντρωση 1 µg/ml, με το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα να διατηρεί μερικό αγωνισμό και σε μικρότερη συγκέντρωση (0.1 µg/ml). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα του

Allium ampeloprasum της οικογένειας Liliaceae και του *Abies cephalonica* της οικ. Pinaceae, καθώς και το παρασκεύασμα οξικού αιθυλεστέρα του ξύλου του *Morus alba* της οικ. Moraceae, χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές σε συγκέντρωση 1 µg/ml, με επαγωγή της AlkP 55.0±21.6%, 55.9±3.9% και 34.9±1.4%, αντίστοιχα. Από την οικογένεια Pinaceae, το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων και κλαδιών του *Pinus heldreichi* έδειξε ισχυρή οιστρογόνο δράση (82.6±1.4%) σε συγκ. 1 µg/ml και μέτρια οιστρογονικότητα (43.8±7.0%) στα 0.1 µg/ml. Σε συγκέντρωση 0.1 µg/ml επέδειξε μέτρια οιστρογονικότητα και το παρασκεύασμα οξικού αιθυλεστέρα του φλοιού του *Abies cephalonica* (38.2±1.0%), το οποίο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελέγχου στερούνταν οιστρογόνου δράσης, (Πίνακας 4.3).

Οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae, Pinaceae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E ₂ 1 nM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml
149	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
150	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
147	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
148	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	M	M	M
163	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) -EtOAc	M	M	M
164	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) - MeOH	M	M	M
144	<i>Salvia fruticosa</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	M	M	M
145	<i>Salvia officinalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (67.2±14.8)	P (38.4±28.2)	M
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	F (76.7±26.2)	M	M
141	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
133	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
134	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	M	M	M
71	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) -EtOAc	M	M	M
72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) - MeOH	P (55.0±21.6)	W (24.4±0.3)	M
121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	P (34.9±1.4)	M	M
122	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) - MeOH	W (27.7±1.1)	M	M
73	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
74	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
75	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) -EtOAc	M	M	W (22.0±1.4)
76	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) - MeOH	F (82.6±1.4)	P (43.8±7.0)	W (14.5±2.5)
77	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) -EtOAc	M	P (38.2±1.0)	W (32.9±1.5)
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) - MeOH	P (55.9±3.9)	W (30.3±1.9)	M

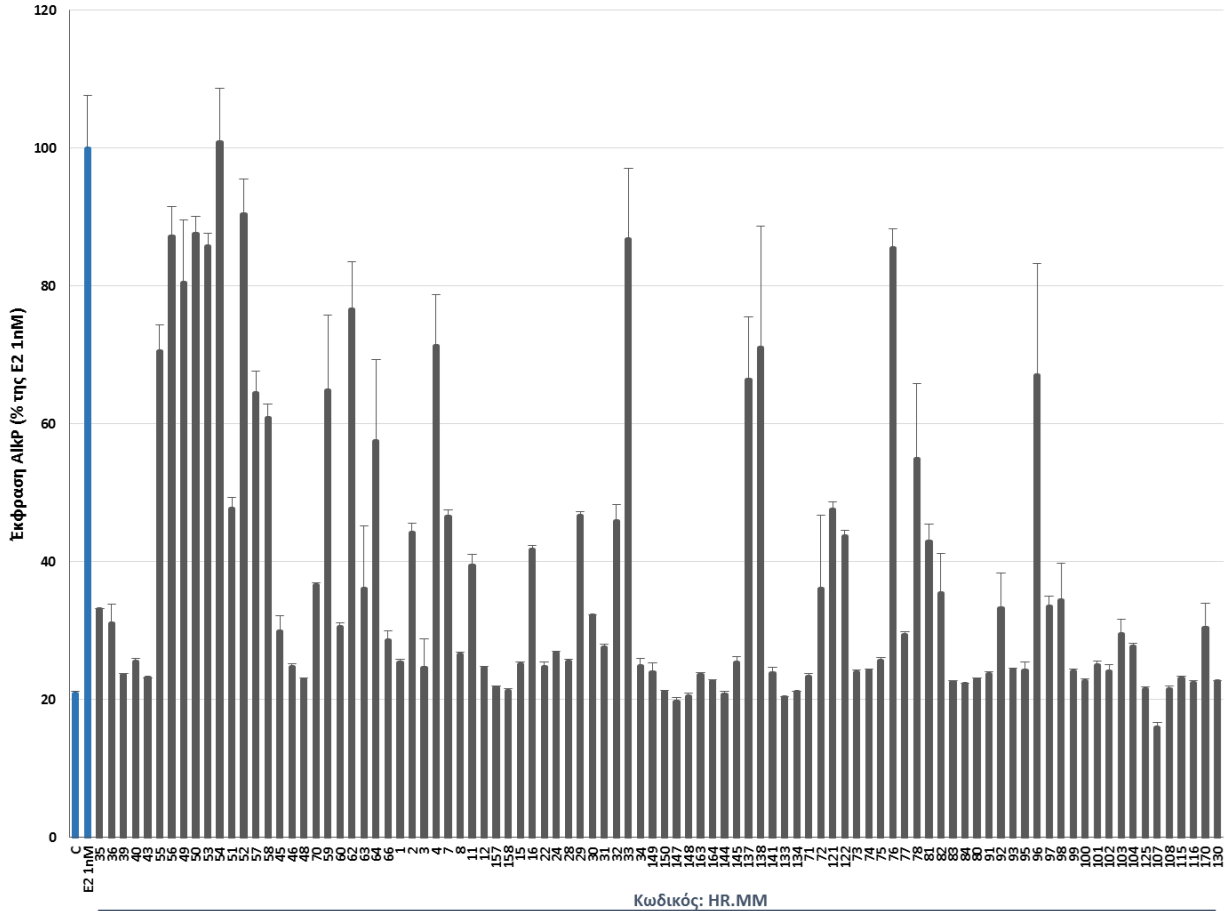
Πίνακας 4.3 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae αγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % αγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν της E₂ σε συγκέντρωση 1 nM (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής).

Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε επίσης σε εκχυλίσματα του γένους *Plantago* (Plantaginaceae), *Polygonum* (Polygonaceae), *Punica* (Punicaceae), *Rhamnus* (Rhamnaceae), *Prunus* (Rosaceae), *Taxus* (Taxaceae), *Vitex* (Verbenaceae), *Vitis* (Vitaceae) και *Zingiber* (Zingiberaceae). Μεταξύ αυτών, μερικό αγωνισμό ως προς την οιστραδιόλη επέδειξαν το μεθανολικό εκχύλισμα του περικάρπιου του είδους *Punica granatum* (56.8±21.7%) σε συγκέντρωση 1 µg/ml και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Plantago coronopus* subsp. *cummutata*, αλλά μόνο στη μικρότερη συγκέντρωση (0.01 µg/ml), ενώ όλα τα υπόλοιπα στερούνταν οιστρογονικότητας (Πίνακας 4.4).

Οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae, Zingiberaceae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP Αγωνισμός (% της E ₂ 1 nM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml
81	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - EtOAc	W (29.1±3.1)	W (20.9±0.2)	P (45.3±2.4)
82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - MeOH	M	M	M
83	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο) - EtOAc	M	M	M
84	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο) - MeOH	M	M	M
80	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i> (Όλο) - MeOH	M	M	M
91	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - EtOAc	M	W (16.3±1.9)	W (12.6±2.4)
92	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - MeOH	M	M	W (18.2±4.1)
93	<i>Polygonum tinctoria</i> (Όλο) - EtOAc	M	M	M
95	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - EtOAc	M	M	M
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	P (56.8±21.7)	M	M
97	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - EtOAc	W (11.1±2.1)	M	M
98	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - MeOH	W (27.3±2.1)	M	M
99	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώννα) - EtOAc	M	M	M
100	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώννα) - MeOH	M	M	M
101	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - EtOAc	M	M	M
102	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
103	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - EtOAc	M	M	M
104	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
125	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	M	M	M
107	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - EtOAc	M	M	M
108	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - MeOH	M	M	M
115	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	M	M	M
116	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	M	M	M
170	<i>Vitis vinifera</i> (Κρασί, ποικιλία μοσχάτο Αμβούργου)	M	M	M
130	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M	M	M

Πίνακας 4.4 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae 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).

Στο ιστόγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης ως προς την οιστραδιόλη (1 nM) όλων των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 1 µg/ml.



Εικόνα 4.2 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (1 µg/ml) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E₂ (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.1.2. Προσδιορισμός της αντιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να επιδεικνύουν ανταγωνιστική των οιστρογόνων δράση εξετάστηκε μέσω ρύθμισης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa και η καταστολή της επαγωγής της από την οιστραδιόλη, θεωρήθηκε δείκτης αντιστρογονικής δράσης του εκάστοτε δείγματος [153]. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.4.3 και πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία οιστραδιόλης στη μεταεμμηνοπαυσιακή συγκέντρωση 0.1 nM και ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ICI-182,780. Η ένωση ICI-182,780 είναι γνωστή ως Fulvestrant ή με την εμπορική ονομασία Faslodex[®] και είναι ένα πολύ ισχυρό αντιστρογόνο με μηδενική αγωνιστική δράση, ενώ η πρόσδεσή του στον υποδοχέα ER προκαλεί την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Η επώαση των κυττάρων Ishikawa με οιστραδιόλη 0.1 nM και ICI-182,780 0.1 μM είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή της προκαλούμενης από την οιστραδιόλη επαγωγής της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης.

Όπως και κατά τον προσδιορισμό της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων, έτσι και εδώ όλα τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν σε τρεις συγκεντρώσεις 1 μg/ml, 0.1 μg/ml και 0.01 μg/ml παρουσία οιστραδιόλης 0.1 nM. Οι πίνακες που ακολουθούν περιλαμβάνουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων να καταστέλλουν την προκαλούμενη από την οιστραδιόλη επαγωγή της έκφρασης AlkP, εκφρασμένη ως % ανταγωνισμό του δείγματος ως προς τη δράση του ICI-182,780 (0.1 μM). Ο ανταγωνισμός της επαγόμενης από την οιστραδιόλη έκφρασης της AlkP των δειγμάτων σε σχέση με εκείνον του ICI (0.1 μM) υπολογίστηκε ως εξής:

$\% \text{ ανταγωνισμός} = (\text{OD}_{\text{E2}} - \text{OD}_{\text{E2}+\text{δείγματος}}) * 100 / (\text{OD}_{\text{E2}} - \text{OD}_{\text{E2}+\text{ICI}})$, OD: οπτική απορρόφηση στα 405 nm. Ο ανταγωνισμός καταχωρήθηκε ως ισχυρός/πλήρης (F: full), μέτριος/μερικός (P: partial), ασθενής/μικρός (W: weak) και μηδαμινός (M: marginal), όταν η καταστολή της έκφρασης AlkP ως προς το ICI ήταν αντίστοιχα $\geq 67\%$, 34-66%, 33-10% και $< 10\%$.

Από το σύνολο των εκχυλισμάτων κανένα δεν παρουσίασε ισχυρή ανταγωνιστική της οιστραδιόλης δράση και μόνο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Plantago holosteum* χαρακτηρίστηκε ως μερικός ανταγωνιστής (34.9±4.9%) σε συγκέντρωση 1 μg/ml (Πίνακας 4.8). Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσίασαν ασθενή ως και μηδαμινή ανταγωνιστική δράση.

Οικ. Leguminosae		Καταστολή της έκφρασης AlkP Ανταγωνισμός (% του ICI 0.1 μM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.01 μg/ml + E2 0.1 nM
35	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	M	M	M
36	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια ανθισμένα)-MeOH	M	M	M
39	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες)-EtOAc	M	M	M
40	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες) -MeOH	M	M	M
43	<i>Astragalus rubiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα, τμήματα ριζών, καρποί)-EtOAc	M	M	M
55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	M	M	M
56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	M	M	M
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -MeOH	M	M	M
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -MeOH	M	M	M
51	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -EtOAc	M	M	M
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	M	M	M
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	W (14.7±1.3)	W (21.0±1.1)	M
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	W (14.3±1.9)	W (14.7±3.8)	W (16.6±3.3)
45	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -EtOAc	M	W (14.8±3.9)	M
46	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -MeOH	M	M	M
48	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα) -MeOH	M	W (14.8±3.3)	M
70	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	M	W (22.5±1.0)	W (26.7±3.5)
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	M	M	M
60	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -MeOH	M	M	M
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	M	M	M
63	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -EtOAc	W (19.4±2.6)	M	W (25.4±7.2)
64	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -MeOH	M	M	M
66	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	M	W (18.8±5.8)	W (24.6±1.4)

Πίνακας 4.5 Δράση εκχυλισμάτων της οικογένειας Leguminosae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae, Iridaceae		Καταστολή της έκφρασης AikP Ανταγωνισμός (% του ICI 0.1 μM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.01 μg/ml + E2 0.1 nM
1	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-EtOAc	M	W (21.3±0.3)	W (23.2±3.6)
2	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-MeOH	M	W (18.6±4.4)	W (25.6±1.8)
3	<i>Cotinus coggygria</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές)-EtOAc	M	M	M
4	<i>Cotinus coggygria</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές) -MeOH	M	M	M
7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)-EtOAc	W (28.9±2.4)	W (18.8±5.8)	W (18.8±5.8)
8	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)- MeOH	W (21.1±3.7)	W (14.3±0.7)	M
11	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) -EtOAc	W (12.4±1.0)	W (20.4±2.0)	W (20.8±3.3)
12	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) - MeOH	M	W (14.0±4.4)	W (15.9±3.3)
157	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) -EtOAc	M	M	M
158	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) - MeOH	W (11.7±3.8)	M	M
15	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) -EtOAc	M	M	M
16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) - MeOH	M	M	M
22	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	M	M	M
24	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί) - MeOH	M	M	M
28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί) - MeOH	M	M	W (19.3±3.2)
29	<i>Iris attica</i> (Όλο) -EtOAc	M	M	M
30	<i>Iris attica</i> (Όλο) - MeOH	M	M	M
31	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	M	M	M
32	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M	M	M
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	M	M	M
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M	M	M

Πίνακας 4.6 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AikP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae, Pinaceae		Καταστολή της έκφρασης ΑΙκΡ Ανταγωνισμός (% του ΙCΙ 0.1 μΜ)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (ΗΡ.ΜΜ)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.01 μg/ml + E2 0.1 nM
149	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	W (15.5±5.8)	W (10.8±4.4)
150	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
147	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
148	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	M	M	M
163	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) -EtOAc	M	W (20.2±3.3)	W (25.7±3.5)
164	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) - MeOH	M	M	W (24.2±8.9)
144	<i>Salvia fruticosa</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	W (17.7±2.2)	W (17.7±4.4)	M
145	<i>Salvia officinalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	M	M	W (19.2±5.2)
137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
141	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια) -EtOAc	M	M	M
133	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	W (12.8±2.2)	W (15.7±3.3)	W (18.5±1.3)
134	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	M	M	M
71	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) -EtOAc	M	M	M
72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) - MeOH	M	M	M
121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	M	W (14.7±2.3)	W (22.6±2.3)
122	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) - MeOH	M	M	M
73	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	W (23.5±8.6)	W (28.1±8.1)	W (17.7±2.7)
74	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) - MeOH	W (14.8±1.8)	W (24.9±0.5)	W (23.0±0.6)
75	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) -EtOAc	M	M	M
76	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) - MeOH	M	M	M
77	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) -EtOAc	M	M	M
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) - MeOH	M	M	M

Πίνακας 4.7 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της ΑΙκΡ στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ΙCΙ σε συγκέντρωση 0.1 μΜ (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae, Zingiberaceae		Καταστολή της έκφρασης AIkP Ανταγωνισμός (% του ICI 0.1 μM)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.1 μg/ml + E2 0.1 nM	0.01 μg/ml + E2 0.1 nM
81	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - EtOAc	W (17.0±5.0)	M	M
82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - MeOH	M	M	M
83	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο) - EtOAc	P (34.9±4.9)	W (19.8±9.9)	W (26.7±6.8)
84	<i>Plantago holosteum</i> (Όλο) - MeOH	W (17.7±2.7)	W (11.3±1.5)	W (19.9±2.2)
80	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i> (Όλο) - MeOH	W (14.7±2.5)	W (22.9±4.1)	W (29.5±2.5)
91	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - EtOAc	M	M	M
92	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - MeOH	M	M	M
93	<i>Polygonum tinctoria</i> (Όλο) - EtOAc	M	M	M
95	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - EtOAc	M	M	M
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	M	M	M
97	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - EtOAc	M	M	M
98	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - MeOH	M	M	M
99	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - EtOAc	W (11.9±4.1)	W (23.1±2.9)	W (19.2±7.5)
100	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - MeOH	W (20.7±5.6)	W (26.6±4.3)	W (25.8±3.5)
101	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - EtOAc	M	M	W (12.0±2.2)
102	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	W (10.9±8.0)	M
103	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - EtOAc	M	M	M
104	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - MeOH	M	M	M
125	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	W (16.2±4.4)	W (22.7±1.4)	M
107	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - EtOAc	M	M	M
108	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - MeOH	M	M	M
115	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	M	M	M
116	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	M	M	M
170	<i>Vitis vinifera</i> (Κρασί, ποικιλία μοσχάτο Αμβούργου)	M	M	M
130	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M	M	W (18.9±3.1)

Πίνακας 4.8 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AIkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Συνοψίζοντας, στην κυτταρική σειρά Ishikawa αξιολογήθηκαν ενενήντα τέσσερα εκχυλίσματα διαφόρων φυτικών οικογενειών ως προς την οιστρογονική τους δράση, μέσω επαγωγής της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης. Ο έλεγχος των 94 εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$, ανέδειξε 11 εκχυλίσματα με ισχυρή οιστρογόνο δράση, ενώ 13 παρουσίασαν μέτρια οιστρογονικότητα. Η αξιολόγηση της δραστηριότητας των παρασκευασμάτων και σε μικρότερες συγκεντρώσεις οδήγησε στον χαρακτηρισμό 4 εκχυλισμάτων ως μέτριους αγωνιστές σε συγκέντρωση 0.1 $\mu\text{g/ml}$ και 2 εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

Τα παρασκευάσματα που επέδειξαν υψηλή οιστρογονικότητα, σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών *Genista milli* (όλο το φυτό), *Genista acanthoclada* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Genista hassertiana* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Genista depressa* (όλο το φυτό), *Lupinus albus* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Mentha aquatica* (υπέργειο τμήμα φυτού) και *Pinus heldreichii* (κλαδιά, φύλλα). Επίσης, ως ισχυροί αγωνιστές χαρακτηρίστηκαν και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των δρογών *Genista acanthoclada* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Genista hassertiana* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (ρίζωμα) και *Mentha aquatica* (υπέργειο τμήμα φυτού).

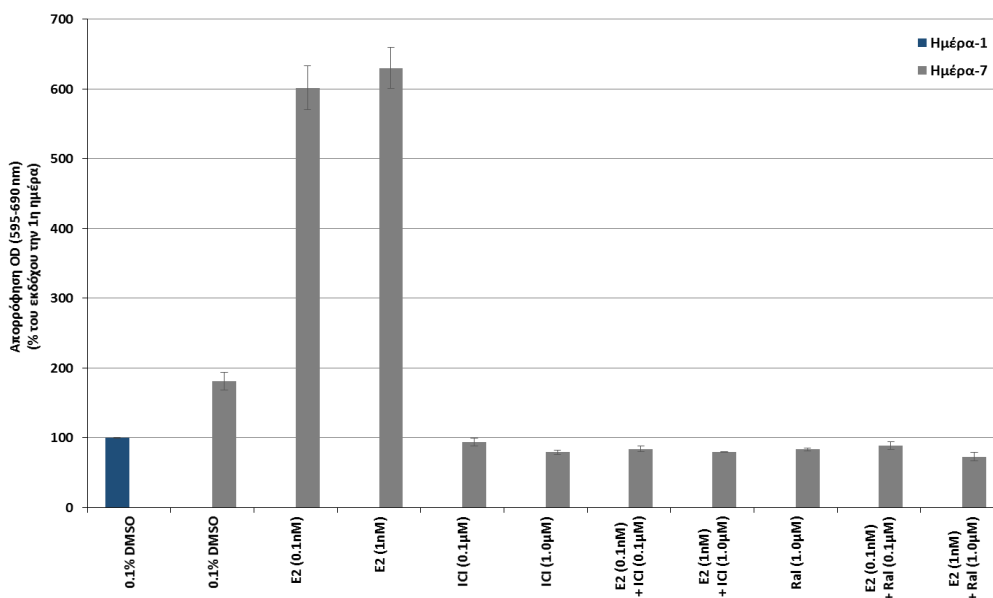
Με μέτρια οιστρογονικότητα, σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ χαρακτηρίστηκαν τα μεθανολικά των δρογών *Glycyrrhiza glabra* (ρίζωμα), *Ononis pubescens* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Cotinus coggygria* (ξύλο), *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (ρίζωμα), *Allium ampeloprasum* (φύλλα, βολβοί), *Abies cephalonica* (φλοιός) και *Punica granatum* (περικόρπιο). Μεταξύ των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα, μερικοί αγωνιστές των οιστρογόνων αναδείχθηκαν τα εκχυλίσματα των δρογών *Genista milli* (όλο το φυτό), *Glycyrrhiza glabra* (ρίζωμα), *Lupinus albus* (καρποί), *Pistacia lentiscus* (ξύλο), *Berberis cretica* (ρίζες) και *Morus alba* (ξύλο).

Στον έλεγχο της αντιοιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων, κανένα δεν φάνηκε ικανό να ανταγωνίζεται σημαντικά την οιστραδιόλη (0.1 nM) και στις τρεις συγκεντρώσεις ελέγχου, εκτός από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Plantago holosteum*, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως μερικός ανταγωνιστής σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$.

Τα εκχυλίσματα που επέδειξαν αξιόλογη οιστρογόνο δράση στην κυτταρική σειρά Ishikawa, ελέγχονται στη συνέχεια και ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7.

4.1.3. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά MCF-7

Τα κύτταρα MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού) είναι γνωστό ότι περιέχουν ελάχιστη ποσότητα ERβ υποδοχέα, σε σχέση με τον ERα [404], με αποτέλεσμα η δράση των στεροειδών να εκφράζεται κυρίως μέσω του ERα υποδοχέα.



Εικόνα 4.3 Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επώαστηκαν 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. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η οιστρογονική δράση στα καρκινικά κύτταρα μαστού προσδιορίζεται μέσω επαγωγής του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα MCF-7 σταματούν να πολλαπλασιάζονται απουσία οιστρογόνων και ανταποκρίνονται στην αυξανόμενη συγκέντρωση οιστραδιόλης, με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, παρουσιάζοντας μέγιστη αποτελεσματικότητα σε συγκέντρωση οιστραδιόλης ≥ 0.1 nM. Ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση έξι ημερών παρουσία οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM ή παρουσία μόνο του εκδόχου αυξάνεται

κατά περίπου 6 και 2 φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με αυτόν της πρώτης ημέρας καλλιέργειας (εικόνα 4.3). 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. Στην περίπτωση που τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ICI-182.780, η καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν πλήρης.

Τα εκχυλίσματα, τα οποία επέδειξαν αξιόλογη οιστρογονικότητα στα κύτταρα Ishikawa αξιολογήθηκαν και ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.4.2. 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 του παρουσιάστηκε στη § 4.1.1.

Πιο συγκεκριμένα, από τα 25 εκχυλίσματα της οικογένειας Leguminosae, τα 12 χαρακτηρίστηκαν ως ισχυροί ή μερικοί αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων στα κύτταρα Ishikawa. Μεταξύ αυτών πέντε εκχυλίσματα, τα οποία ανήκουν στα γένη *Genista* και *Lupinus* έδειξαν μεγάλη ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των MCF-7 και τέσσερα, των γενών *Genista*, *Glycyrrhiza* και *Lupinus*, μέτρια ικανότητα σε σχέση με αυτή που προκαλεί η οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0.1 nM (πίνακας 4.9).

Οικ. Leguminosae		Επαγωγή Κυτταρικού Πολ/σμου Αγωνισμός (% της E ₂ 0.1 nM)
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 $\mu\text{g/ml}$
55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	F (87.6±1.3)
56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	F (115.5±16.6)
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -EtOAc	P (45.4±5.8)
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (71.6±2.0)
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -EtOAc	W (33.5±8.1)
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (72.3±10.1)
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	P (58.2±9.8)
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	W (23.8±3.2)
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	P (60.1±10.1)
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	F (105.0±12.2)
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	P (48.5±6.0)
64	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -MeOH	M

Πίνακας 4.9 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 E₂ σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Από τα εκχυλίσματα των υπόλοιπων οικογενειών, έξι εκχυλίσματα έδειξαν μεγάλη ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των MCF-7, ενώ δύο επέδειξαν μέτρια οιστρογονική δράση (πίνακας 4.10). Αναλυτικότερα, ως ισχυροί αγωνιστές των οιστρογόνων χαρακτηρίστηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των δρογών *Cotinus coggygria* (ξύλο), *Mentha aquatica* (υπέργειο τμήμα φυτού), *Allium ampeloprasum* (φύλλα, βολβοί), *Pinus heldreichi* (κλαδιά, φύλλα) και *Abies cephalonica* (φλοιός), καθώς και το παρασκευάσμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis*. Τέλος, μέτρια ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των MCF-7 παρουσίασαν τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των δρογών *Mentha aquatica* (υπέργειο τμήμα φυτού) και *Punica granatum* (περικάρπιο).

Οικ. Anacardiaceae, Berberidaceae, Iridaceae, Labiatae, Liliaceae, Pinaceae, Punicaceae		Επαγωγή Κυτταρικού Πολ/σμου Αγωνισμός (% της E ₂ 0.1 nM)
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ – Διαλύτης εκχύλισης	1 μg/ml
4	<i>Cotinus coggygria</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές) - MeOH	F (98.2±5.2)
7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)-EtOAc	M
16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) - MeOH	M
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	F (66.7±4.0)
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) - MeOH	M
137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	P (63.8±9.4)
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	F (84.9±7.7)
72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) - MeOH	F (100.3±10.3)
121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	M
76	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) - MeOH	F (142.4±15.9)
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) - MeOH	F (80.6±6.2)
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	P (53.7±4.6)

Πίνακας 4.10 Επίδραση των εκχυλισμάτων των οικ. Anacardiaceae, Berberidaceae, Iridaceae, Labiatae, Liliaceae, Pinaceae, Punicaceae 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 E₂ σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Συνοψίζοντας, μεταξύ των εκχυλισμάτων των υπόλοιπων οικογενειών (εκτός της Leguminosae), σημαντική οιστρογονική δράση τόσο στα κύτταρα ενδομητρίου, όσο και σε εκείνα του μαστού παρουσίασαν και τα δύο εκχυλίσματα των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* και των υπέργειων τμημάτων του *Mentha aquatica*, καθώς επίσης και τα μεθανολικά εκχύλισματα του ξύλου του *Cotinus coggygia*, των φύλλων και βολβών του *Allium ampeloprasum*, των κλαδιών και φύλλων του *Pinus heldreichii*, του φλοιού του *Abies cephalonica* και του περικάρπιου του είδους *Punica granatum*. Τέλος, δράση μερικού αγωνιστή μόνο στα κύτταρα Ishikawa επέδειξαν το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του *Berberis cretica*.

4.1.4. Προσδιορισμός της αντιοιστρογόνου δράσης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά MCF-7

Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή αντιοιστρογόνος δράση στα κύτταρα του μαστού (MCF-7), τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία οιστραδιόλης σε μεταεμμηνοπαυσιακή συγκέντρωση 0.1 nM και ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ICI-182.780. Η επώαση των κυττάρων MCF-7 με οιστραδιόλη (0.1 nM) και ICI-182.780 (0.1 μM) είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή του πολλαπλασιασμού τους, όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική crystal violet (§ 1.2.4.2).

Από τα εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 1 μg/ml παρουσία οιστραδιόλης μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του *Berberis cretica* χαρακτηρίστηκε ως μερικός ανταγωνιστής ως προς το ICI-182.780 με τιμή 36.4±2.1%. Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσίασαν ασθενή ως και μηδαμινή ανταγωνιστική δράση.

Συμπερασματικά, αξιολογήθηκε η οιστρογόνας και αντιοιστρογόνας δράση 94 εκχυλίσμάτων σε τρεις συγκεντρώσεις, μέσω προσδιορισμού της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου (Ishikawa). Τα πλέον δραστικά εξ' αυτών ελέγχθηκαν περαιτέρω ως προς την ικανότητά τους να επάγουν/καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7) που εκφράζουν μόνο τον υποδοχέα ERα και χρησιμοποιούνται για *in vitro* εκτίμηση της ικανότητας προαγωγής ήδη εγκατεστημένου καρκίνου του μαστού.

Ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι 24 εκχυλίσματα επέδειξαν υψηλή και μέτρια ικανότητα επαγωγής της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης ($\geq 67\%$ και 34-66% αντίστοιχα) στα κύτταρα Ishikawa σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$. Από τα 24 εκχυλίσματα, τα 12 ανήκουν στη οικογένεια Leguminosae και πιο συγκεκριμένα, εννέα εκχυλίσματα, τα οποία ανήκουν στα γένη *Genista* (HR.MM55, 56, 49, 50, 54, 52), *Glycyrrhiza* (HR.MM58) και *Lupinus* (HR.MM59, 62) παρουσίασαν σημαντική οιστρογονική δράση (ισχυρού και μέτριου αγωνιστή) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επιπρόσθετα, τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα της *Genista hassertiana* (HR.MM53) και *Glycyrrhiza glabra* (HR.MM57), καθώς και το μεθανολικό εκχύλισμα του *Ononis pubescens* (HR.MM64) επέδειξαν δράση ισχυρού ή μερικού αγωνιστή μόνο στα κύτταρα ενδομητρίου αλλά όχι σε εκείνα του μαστού.

Στις υπόλοιπες οικογένειες φυτών ξεχώρισαν οκτώ εκχυλίσματα με σημαντική οιστρογόνα δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ τέσσερα είχαν δράση μερικού αγωνιστή μόνο στα Ishikawa, χωρίς αυτή να συνοδεύεται με αντίστοιχη δραστικότητα και στα MCF-7. Σημαντική δράση αγωνιστή και στις δύο κυτταρικές σειρές παρουσίασαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Cotinus coggygria* (HR.MM4), *Allium ampeloprasum* (HR.MM72), *Pinus heldreichi* (HR.MM76), *Abies cephalonica* (HR.MM78) και *Punica granatum* (HR.MM96), το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (HR.MM33), αλλά και τα δύο εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων της *Mentha aquatica* (HR.MM137, 138). Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ριζών του *Berberis cretica* (HR.MM16) και *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (HR.MM34), καθώς και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα του ξύλου του *Pistacia lentiscus* (HR.MM7) και *Morus alba* (HR.MM121), τα οποία παρουσίασαν δράση μερικού αγωνιστή των οιστρογόνων μόνο στα κύτταρα ενδομητρίου. Τέλος, τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των *Cotinus coggygria* (HR.MM3), *Mentha aquatica* (HR.MM137), *Pinus heldreichi* (HR.MM76) και *Abies cephalonica* (HR.MM77) παρουσίασαν

μέτρια αγωνιστική δράση και σε μικρότερη συγκέντρωση (0.1 και 0.01 $\mu\text{g/ml}$), αλλά μόνο στην κυτταρική σειρά των Ishikawa.

Στην περίπτωση ελέγχου της αντιοιστρογόνου δράσης στα κύτταρα Ishikawa, περίπου το 30% των εκχυλισμάτων παρουσίασε ασθενή αγωνισμό και μόνο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Plantago holosteum* (HR.MM83) επέδειξε οριακά μέτρια ανταγωνιστική των οιστρογόνων δράση, ενώ κανένα δεν φάνηκε να είναι ισχυρό αντιοιστρογόνο. Ακόμα και αυτή η ασθενής δραστηριότητα των εκχυλισμάτων στα κύτταρα Ishikawa δεν συνοδεύτηκε από αντίστοιχη δράση στα MCF-7, στα οποία μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του *Berberis cretica* (HR.MM16) επέδειξε μερική καταστολή του πολλαπλασιασμού των MCF-7.

Οι ομαδοποιήσεις των εκχυλισμάτων (πίνακας 4.11) δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση των μετρήσεων [$r(\text{Pearson's correlation coefficient})=0,532$, $p(2\text{-tailed})=0,007$], με τη μέση τιμή αγωνισμού σε συγκ. 1 $\mu\text{g/ml}$ στα κύτταρα Ishikawa (63.6%) να είναι πρακτικά ίδια με αυτή σε συγκ. 1 $\mu\text{g/ml}$ στα κύτταρα MCF-7 (62.0%) , παρόλο που πέντε εκχυλίσματα με οιστρογονικού τύπου δράση στα κύτταρα Ishikawa δεν έχουν καθόλου δράση στα MCF-7. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα κύτταρα Ishikawa χαρακτηρίζονται από ειδικότητα και ευαισθησία ανίχνευσης οιστρογονικής δράσης, ενώ τα κύτταρα MCF-7 από ευαισθησία αλλά όχι ειδικότητα ανίχνευσης οιστρογόνων.

Εκχυλίσματα με σημαντική οιστρογόνο δράση		ISHIKAWA Επαγωγή της έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E ₂ 1 nM)			MCF-7 Επαγωγή του κυτ. πολ/σμου (αγωνισμός % της E ₂ 0.1 nM)
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml	1 µg/ml
55	<i>Genista milii</i> (Όλο)-EtOAc	P (63.9±4.7)	M	M	F (87.6±1.3)
56	<i>Genista milii</i> (Όλο) -MeOH	F (82.4±5.6)	W (15.5±3.5)	W (14.2±7.4)	F (115.5±16.6)
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (81.2±6.3)	W (25.1±5.3)	M	P (45.4±5.8)
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (84.6±2.5)	W (16.0±4.5)	M	F (71.6±2.0)
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (82.2±3.0)	W (12.5±0.1)	M	P (33.5±8.1)
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (100.7±9.8)	W (29.1±6.6)	M	F (72.3±10.1)
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	F (88.3±6.0)	M	M	P (58.2±9.8)
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	P (50.2±6.8)	W (17.2±1.0)	M	W (23.8±3.2)
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	P (45.5±0.1)	W (11.8±0.2)	M	P (60.1±10.1)
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	P (54.9±13.9)	W (26.0±0.8)	W (14.6±0.5)	F (105.0±12.2)
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	F (71.1±7.7)	M	M	P (48.5±6.0)
64	<i>Ononis pubescens</i> (Όλο) -MeOH	P (40.7±18.5)	M	M	M
4	<i>Cotinus coggygria</i> (Ξύλο) -MeOH	P (63.2±9.4)	M	M	F (98.2±5.2)
7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)-EtOAc	P (33.6±1.2)	W (32.3±0.6)	W (30.4±1.0)	M
16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) - MeOH	P (61.0±18.1)	M	M	M
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα)-EtOAc	F (83.6±12.5)	M	M	F (66.7±4.0)
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα)-MeOH	P (33.7±0.9)	M	M	M
137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	F (67.2±14.8)	P (38.4±28.2)	M	P (63.8±9.4)
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	F (76.7±26.2)	M	M	F (84.9±7.7)
72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα,βολβοί) - MeOH	P (55.0±21.6)	W (24.4±0.3)	M	F (100.3±10.3)
121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	P (34.9±1.4)	M	M	M
76	<i>Pinus heldreichii</i> (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	F (82.6±1.4)	P (43.8±7.0)	W (14.5±2.5)	F (142.4±15.9)
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός) - MeOH	P (55.9±3.9)	W (30.3±1.9)	M	F (80.6±6.2)
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	P (56.8±21.7)	M	M	P (53.7±4.6)

Πίνακας 4.11 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 E₂ (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

4.2. Προσδιορισμός της οστεοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων

Τα οιστρογόνα συμβάλλουν στην διατήρηση της οστικής μάζας δρώντας όπως πιστεύεται, μέσω και των δύο ισotypes του υποδοχέα οιστρογόνων, ERα και ERβ [405, 406]. Η δράση τους προκαλεί προαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και καταστολή αυτής των οστεοκλαστών. Η συμβολή των οιστρογόνων στη διατήρηση της οστικής μάζας προϋποθέτει την παρουσία οιστρογόνου στην κυκλοφορία σε συγκέντρωση 1-10 nM. Μετά την εμμηνόπαυση η συγκέντρωση οιστρογόνου στην κυκλοφορία περιορίζεται σε περίπου 0.1 nM και παράλληλα παρατηρείται μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών και αύξηση των οστεοκλαστών. Οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες αλληλεπιδρούν παρουσία οιστρογόνου με τρόπο που διασφαλίζει την φυσιολογική ομοιοστάση των οστών. Οι οστεοβλάστες ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών σε ώριμους, μέσω της παραγωγής των κυτταροκινών RANKL και OPG. Η RANKL αντιδρά με τον υποδοχέα RANK που υπάρχει στη μεμβράνη των πρόδρομων κυττάρων του μυελού και προάγει τη διαφοροποίησή τους σε οστεοκλάστες. Όμως, η OPG δένεται με τη RANKL και την αδρανοποιεί με αποτέλεσμα η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών να εξαρτάται από την αναλογία RANKL/OPG. Τα οιστρογόνα προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών ρυθμίζοντας παράλληλα και την παραγωγή OPG και με αυτό τον τρόπο εναρμονίζουν τη διαφοροποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών και την ομοιοστάση στα οστά. Σε καλλιέργεια κυττάρων του μυελού οστών ενήλικων αρουραίων που έχουν υποβληθεί σε αφαίρεση ωοθηκών παρατηρείται, μετά από χρώση για ανίχνευση όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό (TRAP), ότι ένας μεγάλος αριθμός ώριμων πολυπύρηνων οστεοκλαστών οδηγείται σε απόπτωση μετά από προσθήκη εκλεκτικών ρυθμιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (SERMs) [407].

Τα κύτταρα MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™) και τα RAW264.7 (ATCC® TIB-71™) χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη *in vitro* 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, καταστολή του πολλαπλασιασμού και 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 [408].

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 οιστρογόνα και φυτοοιστρογόνα εμποδίζουν τη διαφοροποίησή τους [409] και οδηγούν τους ώριμους οστεοκλάστες σε απόπτωση [410], κατά αναλογία με ότι έχει αναφερθεί παραπάνω σχετικά με τη δράση SERMs.

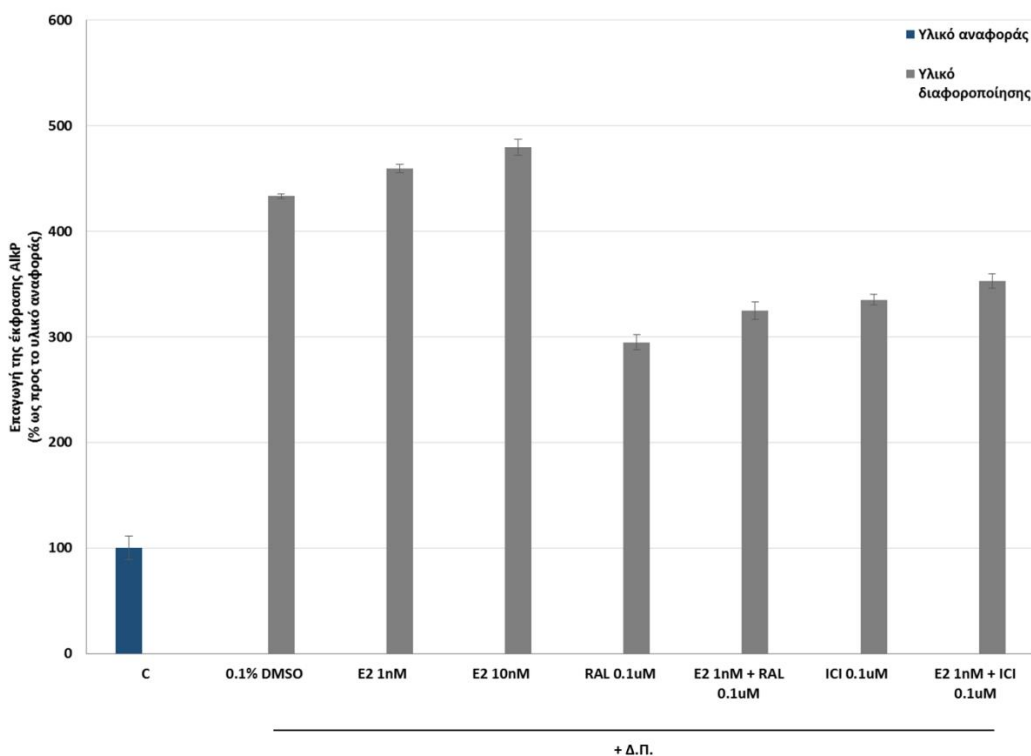
4.2.1. Προκαταρκτική αξιολόγηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Τα κύτταρα MC3T3-E1 είναι προ-οστεοβλάστες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα παρουσία ασκορβικού οξέος να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες, όπως έχει περιγραφεί στην § 1.2.4.4.

Η διαφοροποίηση των MC3T3-E1 πιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως δείκτη διαφοροποίησης την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στο πρώιμο στάδιο ωρίμανσής τους. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.) για διάστημα έξι ημερών και ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 και 10 nM (μικρή και μεγάλη προεμμηνοπαυσιακή συγκέντρωση, αντίστοιχα), η ραλοξιφαίνη (Ral) και η φουλβεστράνη (ICI) σε συγκέντρωση 0.1 μM, καθώς και οι συνδυασμοί των τελευταίων με την οιστραδιόλη. Η ραλοξιφαίνη αποτελεί γνωστό SERM παράγοντα, ενώ η φουλβεστράνη δένεται στους ERα & ERβ και προκαλεί την αποικοδόμηση τους μέσω του πρωτεασώματος.

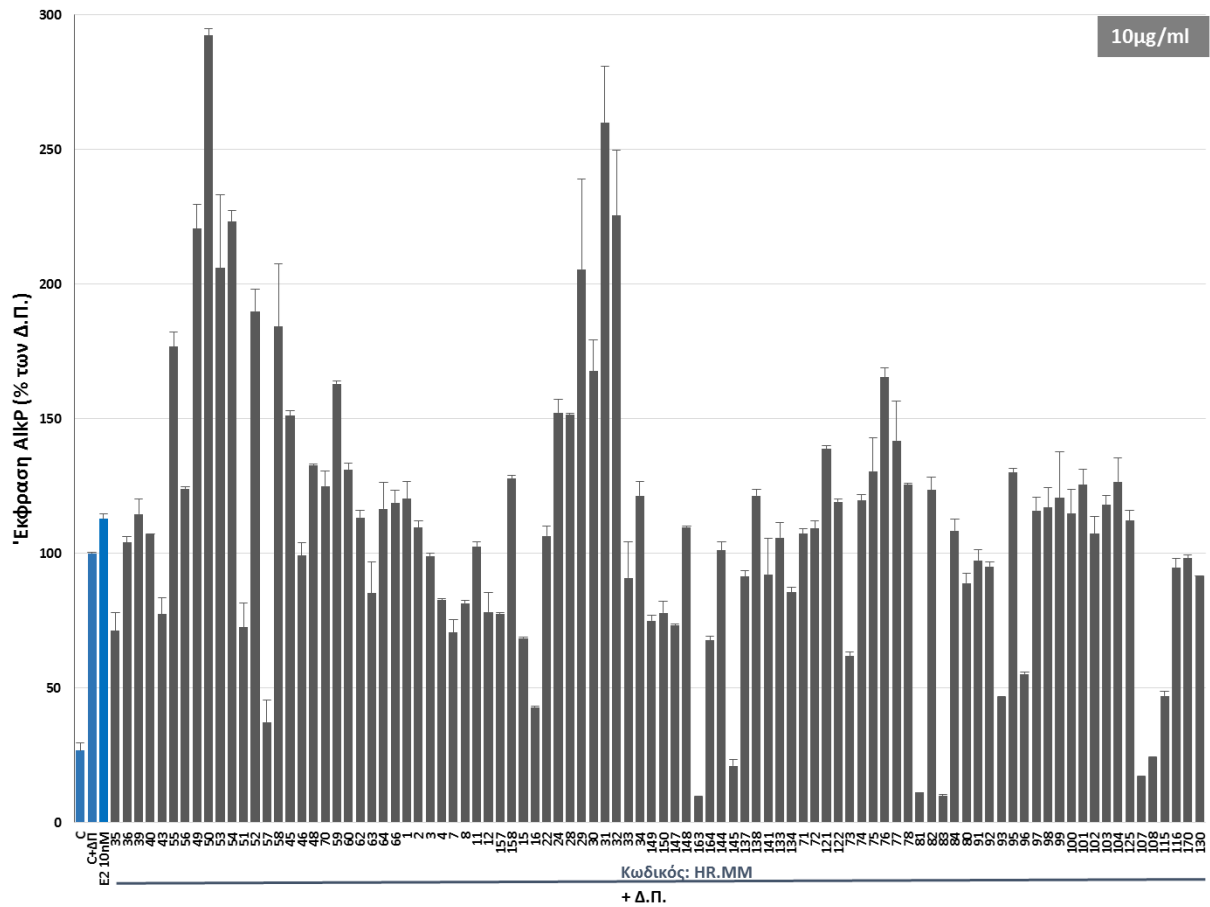
Τα αποτελέσματα των ενώσεων αναφοράς, στο σύνολο των πειραμάτων, εκφράστηκαν ως % της έκφρασης AlkP των κυττάρων πριν τη διαφοροποίηση, προκειμένου να διαπιστωθεί αφενός, η ικανότητα των διαφοροποιητικών παραγόντων να επάγουν την έκφραση της AlkP και κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση, και αφετέρου η ικανότητα της οιστραδιόλης να προάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1 σε οστεοβλάστες (εικόνα 4.4). Η προαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 από την οιστραδιόλη (την ενδογενή του ορού και την προστεθείσα) αναστέλλεται πλήρως τόσο από 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.

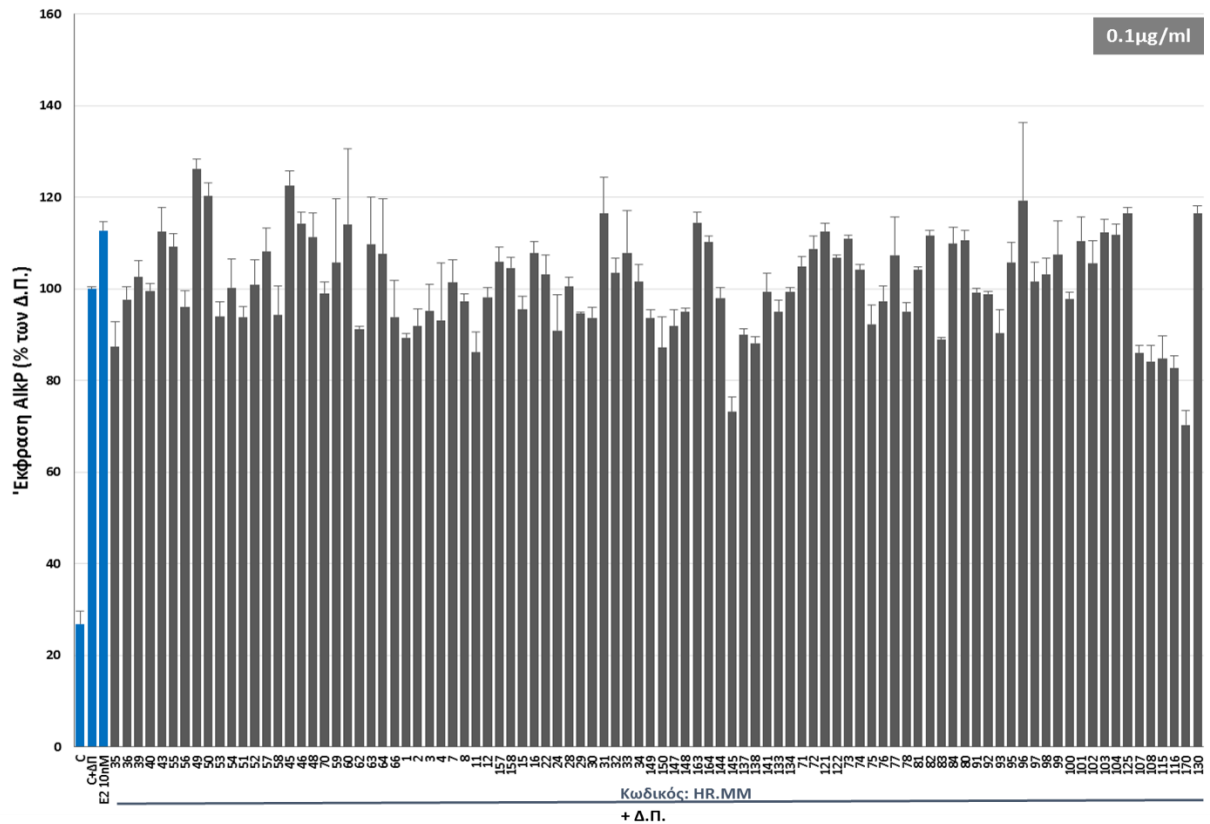


Εικόνα 4.4 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς, είτε υλικού διαφοροποίησης (50 µg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχρόνηση των ενώσεων αναφοράς για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού αναφοράς. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η ικανότητα των 94 φυτικών εκχυλισμάτων να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 αξιολογήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις (10, 1, 0.1 µg/ml) και προσδιορίστηκε η έκφραση της AlkP. Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση εκφράστηκε ως % της επαγωγής της έκφρασης AlkP παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αρκετών εκχυλισμάτων ικανών να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες και μεταξύ αυτών, αρκετά ήταν εκείνα που δρούσαν ικανοποιητικότερα ακόμα και από ότι η οιστραδιόλη όταν χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 10 nM (115.2±1.9%), όπως φαίνεται στις εικόνες 4.5, 4.6 και 4.7.



Εικόνα 4.5 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά 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 συγχωρήγηση 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.



Εικόνα 4.7 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά 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 συγχρογήση 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.

Αναλυτικότερα, από τα 25 εκχυλίσματα της οικογένειας Leguminosae, τα 21 αποδείχθηκαν ικανά να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και μεταξύ αυτών τα 14 επέδειξαν καλύτερη ικανότητα προαγωγής της διαφοροποίησης σε συγκέντρωση 10 µg/ml, συγκρινόμενα με την οιστραδιόλη (πίνακας 4.12). Μεταξύ των πλέον δραστικότερων εξ' αυτών συμπεριλαμβάνονται εκχυλίσματα των γενών *Genista*, *Glycyrrhiza*, *Ceratonia*, *Psoralea*, *Lupinus* και *Ononis*, με το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Genista acanthoclada* να επιδεικνύει τη μεγαλύτερη δραστικότητα, με επαγωγή $292.4 \pm 2.5\%$ ως προς τους Δ.Π. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και τα δύο εκχυλίσματα της *Genista acanthoclada*, αλλά και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα της *Ceratonia siliqua* διατήρησαν την υψηλή δραστικότητά τους και σε μικρότερες συγκεντρώσεις (1 και 0.1 µg/ml), ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα της *Genista hassertiana* χαρακτηρίστηκε ισχυρός διαφοροποιητικός παράγοντας σε συγκεντρώσεις 10 και 1 µg/ml.

Οικ. Leguminosae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ - Διαλύτης εκχύλισης	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml
35	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)-EtOAc	71.3±6.7	99.0±4.4	87.4±5.4
36	<i>Astragalus angustifolius</i> ssp. <i>angustifolius</i> (Υπέργεια τμήματα ανθισμένα)-MeOH	104.1±2.3	105.9±3.9	97.7±2.8
39	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες)-EtOAc	114.6±5.5	103.0±1.5	102.6±3.6
40	<i>Astragalus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ρίζες) -MeOH	107.0±0.1	100.2±1.3	99.6±1.6
43	<i>Astragalus pubiflorus</i> (Υπέργεια τμήματα, τμήματα ριζών, καρποί)-EtOAc	77.5±6.2	106.3±1.1	112.5±5.4
55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	176.9±5.3	112.5±6.0	109.2±2.9
56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	124.0±0.9	94.4±1.1	96.1±3.5
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -EtOAc	220.6±9.1	175.3±3.7	126.3±2.0
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) -MeOH	292.4±2.5	142.1±1.7	120.3±2.9
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -EtOAc	206.1±27.2	107.3±12.1	94±3.2
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) -MeOH	223.3±4.0	119.4±8.2	100.3±6.2
51	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -EtOAc	72.6±9.1	102.1±4.8	93.9±2.3
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	190.0±8.1	108.6±1.7	100.9±5.4
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	37.3±8.2	117.4±8.1	108.2±5.1
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	184.3±23.2	111.3±4.1	94.3±6.3
45	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -EtOAc	151.1±1.8	118.6±5.6	122.6±3.1
46	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -MeOH	99.3±4.7	117.2±3.1	114.3±2.4
48	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα) -MeOH	132.7±0.4	110.6±1.4	111.4±5.2
70	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	125.0±5.5	99.2±4.5	99.1±2.4
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	163.0±1.2	110.9±6.6	105.7±14.0
60	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -MeOH	131.2±2.3	108.6±8.2	114.1±16.5
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	113.4±2.6	94.4±1.1	91.3±0.5
63	<i>Ononis rubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -EtOAc	85.3±11.5	101.8±3.2	109.8±10.3
64	<i>Ononis rubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -MeOH	116.6±9.7	105.0±4.0	107.6±12.2
66	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	118.9±4.7	93.1±7.6	93.9±7.9

Πίνακας 4.12 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).

Ο έλεγχος των δειγμάτων των οικογενειών Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae (21 εκχυλίσματα), ανέδειξε τα έξι εκχυλίσματα της οικογένειας Iridaceae μεταξύ των πλέον δραστικών στο σύνολο της ομάδας. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του *Iris germanica* παρουσίασε ικανότητα επαγωγής της έκφρασης AlkP μεγαλύτερη εκείνη της οιστραδιόλης και στις τρεις συγκεντρώσεις 10, 1 και 0.1 μg/ml (260.1±20.8%, 211±16.1% και 116.5±7.9% αντίστοιχα), ακολουθούμενο από το μεθανολικό εκχύλισμα του ίδιου είδους με επαγωγή AlkP 226±24.3%, 152.5±7.9% και 103.5±3.2% στις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα του *Iris attica* επέδειξαν δράση καλύτερη της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 10 μg/ml, ενώ το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα διατήρησε κάποια επαγωγή της AlkP και στα 1 μg/ml. Το τρίτο είδος της οικογένειας που αξιολογήθηκε ήταν το *Iris unguicularis* subsp. *cretensis*, το μεθανολικό εκχύλισμα του οποίου παρουσίασε και αυτό καλύτερη ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης σε συγκέντρωση 10 μg/ml, σε σχέση με την οιστραδιόλη και διατήρησε μια μικρότερη επαγωγή στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ελέγχου. Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του ίδιου είδους, αν και δεν φάνηκε να επάγει τη διαφοροποίηση σε συγκέντρωση 10 μg/ml, παρουσίασε επαγωγή της έκφρασης της AlkP κατά 109.7±4.9% και 107.9±9.3%, σε συγκεντρώσεις 1 μg/ml και 0.1 μg/ml, αντίστοιχα (πίνακας 4.13).

Από την οικογένεια Cupressaceae και τα τρία παρασκευάσματα που αξιολογήθηκαν, παρουσίασαν επαγωγή της διαφοροποίησης, με τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Cupressus sempervirens* και *Juniperus communis* subsp. *communis* σε συγκέντρωση 10 μg/ml να ξεπερνούν τη δράση της οιστραδιόλης. Αντίστοιχη δραστηριότητα στα 10 μg/ml επέδειξαν το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Acanthus spinosus* (120.3±6.6%) καθώς και το μεθανολικό του *Schinus molle* (127.8±1.1%), όπως φαίνεται στον πίνακα 4.13.

Οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae, Iridaceae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ - Διαλύτης εκχύλισης	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml
1	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-EtOAc	120.3±6.6	90.0±0.8	89.4±0.9
2	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-MeOH	109.6±2.6	91.3±3.7	91.9±3.7
3	<i>Cotinus coggygia</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές)-EtOAc	99.0±1.2	107.1±1.5	95.3±5.8
4	<i>Cotinus coggygia</i> (Rhus cotinus) (Ξύλο πολυετές) -MeOH	82.6±0.6	112.1±3.7	93.2±12.5
7	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)-EtOAc	70.7±4.6	101.2±3.3	101.4±5.0
8	<i>Pistacia lentiscus</i> (Ξύλο)- MeOH	81.5±1.1	101.3±1.3	97.3±1.6
11	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) -EtOAc	102.7±1.5	93.7±0.7	86.2±4.5
12	<i>Pistacia terebinthus</i> (Φύλλα) - MeOH	78.3±7.2	99.2±3.9	98.2±2.2
157	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) -EtOAc	77.4±0.7	107.8±3.1	105.9±3.2
158	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) - MeOH	127.8±1.1	107.1±4.3	104.6±2.3
15	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) -EtOAc	68.5±0.3	97.8±2.4	95.5±2.9
16	<i>Berberis cretica</i> (Ρίζες) - MeOH	42.9±0.5	93.0±4.5	107.8±2.6
22	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	106.5±3.8	111.1±3.6	103.2±4.2
24	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί) - MeOH	152.3±4.8	112.1±1.3	90.9±7.9
28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί) - MeOH	151.6±0.4	104.4±3.5	100.6±1.9
29	<i>Iris attica</i> (Όλο) -EtOAc	205.5±33.6	107.7±4.1	94.7±0.3
30	<i>Iris attica</i> (Όλο) - MeOH	167.8±11.5	95.7±2.2	93.7±2.3
31	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	260.1±20.8	211.0±16.1	116.5±7.9
32	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) - MeOH	225.5±24.3	152.5±7.9	103.5±3.2
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	90.9±13.4	109.7±4.9	107.9±9.3
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) - MeOH	121.5±5.4	109.0±1.8	101.6±3.8

Πίνακας 4.13 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae 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).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν είδη των οικογενειών Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae. Μεταξύ των προαναφερόμενων οικογενειών αναδείχθηκαν εκχυλίσματα με σημαντική ικανότητα προαγωγής της διαφοροποίησης ακόμα και υψηλότερης εκείνης της οιστραδιόλης. Στα εκχυλίσματα που επέδειξαν δραστικότητα καλύτερη της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 10 µg/ml περιλαμβάνονται τα παρασκευάσματα οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης του ξύλου του *Morus alba* (138.9±1.2%, 119.2±1.0% αντίστοιχα), του *Abies cephalonica* (141.9±14.6%, 125.6±0.6% αντίστοιχα) και του *Pinus heldreichii* (130.5±12.5%, 165.4±3.4% αντίστοιχα), καθώς και τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του *Morina persica* (119.7±2.1%) και της *Mentha aquatica* (121.1±2.4%). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δύο εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα της οικογένειας Labiatae, εκείνα των ριζών της *Salvia ringens* και των υπέργειων τμημάτων της *Salvia officinalis*, όχι απλώς κατέστειλαν την προκαλούμενη από τους Δ.Π. επαγωγή της έκφρασης της AlkP σε συγκέντρωση 10 µg/ml, αλλά προκάλεσαν επαγωγή μικρότερη και εκείνης των αδιαφοροποίητων κυττάρων, επιτρέποντάς μας να τα χαρακτηρίσουμε ως κυτταροτοξικά στη συγκεκριμένη συγκέντρωση (πίνακας 4.14).

Οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae, Pinaceae		Επαγωγή της έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ - Διαλύτης εκχύλισης	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml
149	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) -EtOAc	75.1±1.8	86.9±0.1	93.6±1.9
150	<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i> (Υπέργεια) - MeOH	78.0±4.4	96.5±2.0	87.2±6.8
147	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	73.3±0.5	98.9±3.4	91.9±3.5
148	<i>Salvia sclarea</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	109.8±0.4	98.7±1.6	95.0±0.8
163	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) -EtOAc	9.7±0.3	90.8±2.0	114.5±2.3
164	<i>Salvia ringens</i> (Ρίζες) - MeOH	67.8±1.5	109.0±0.5	110.2±1.4
144	<i>Salvia fruticosa</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	101.1±3.3	103.2±2.0	98.0±2.3
145	<i>Salvia officinalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	21.2±2.4	108.3±4.3	73.2±3.2
137	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	91.4±2.2	105.2±2.4	90.0±1.4
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	121.4±2.4	93.4±1.4	88.2±1.4
141	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια) -EtOAc	92.3±13.2	117.2±4.1	99.3±4.1
133	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) -EtOAc	105.9±5.6	96.3±0.8	95.0±2.6
134	<i>Ajuga orientalis</i> (Ανθισμένα υπέργεια) - MeOH	85.6±2.0	95.2±3.7	99.4±1.0
71	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) -EtOAc	107.4±1.8	99.3±3.1	105.0±2.0
72	<i>Allium ampeloprasum</i> (Φύλλα βάσης, βολβοί) - MeOH	109.3±2.7	101.5±0.8	108.8±2.7
121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	138.9±1.2	108.9±1.6	112.5±1.8
122	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) - MeOH	119.2±1.0	99.9±0.7	106.9±0.5

73	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) -EtOAc	61.9±1.4	107.5±3.0	111.0±0.8
74	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) - MeOH	119.7±2.1	106.5±1.9	104.2±1.1
75	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) -EtOAc	130.5±12.4	104.7±2.3	92.3±4.3
76	<i>Pinus heldreichi</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) - MeOH	165.4±3.4	99.1±2.2	97.3±3.3
77	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) -EtOAc	141.9±14.6	102.9±2.3	107.4±8.3
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) - MeOH	125.6±0.6	96.1±2.0	95.1±1.9

Πίνακας 4.14 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae 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).

Μεταξύ των υπολοίπων φυτικών ειδών που ελέγχθηκαν, η οικογένεια με την μεγαλύτερη εκπροσώπηση ήταν η Rhamnaceae, της οποίας όλα τα εκχυλίσματα, εκτός του μεθανολικού παρασκευάσματος του *Rhamnus lycioides* subsp. *graecus*, επέδειξαν προαγωγή της διαφοροποίησης καλύτερη εκείνη της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 10 µg/ml. Τα περισσότερα δε εξ' αυτών διατήρησαν μια μικρή επαγωγή της AlkP και στις συγκεντρώσεις 1 µg/ml και 0.1 µg/ml. Αντίστοιχη δραστικότητα επέδειξαν και το μεθανολικό εκχύλισμα του *Plantago coronopus* subsp. *cummutata*, καθώς και το παρασκεύασμα οξικού αιθυλεστέρα του περικάρπιου της *Punica granatum*. Σημαντική παρατήρηση της τελευταίας ομάδας δρογών που ελέγχθηκε, ήταν η ύπαρξη φαινομένων κυτταροτοξικότητας ορισμένων εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 10 µg/ml. Παρασκευάσματα του έδειξαν επαγωγή AlkP μικρότερη εκείνης των αδιαφοροποίητων κυττάρων ήταν τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των *Plantago coronopus* subsp. *cummutata* και *Plantago holosteum* καθώς και τα δύο εκχυλίσματα των φύλλων του *Taxus baccata*, τα οποία και στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου δεν παρουσίασαν καμία δραστικότητα (πίνακας 4.15).

Οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae, Zingiberaceae		Επαγωγή της έκφρασης ΑΙκΡ (% ως προς τους Δ.Π.)		
ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ - Διαλύτης εκχύλισης	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml
81	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - EtOAc	11.2±0.1	106.8±3.4	104.3±0.6
82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - MeOH	123.5±4.7	113.2±1.8	111.6±1.2
83	<i>Plantago holosteam</i> (Όλο) - EtOAc	9.9±0.7	90.9±4.6	89.0±0.5
84	<i>Plantago holosteam</i> (Όλο) - MeOH	108.4±4.3	107.3±4.5	109.9±3.6
80	<i>Plantago atrata</i> subsp. <i>graeca</i> (Όλο) - MeOH	89.0±3.5	96.1±3.4	110.7±2.1
91	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - EtOAc	97.5±3.9	93.2±2.5	99.2±1.0
92	<i>Polygonum idaeum</i> (Όλο και ρίζες) - MeOH	95.1±1.8	94.6±1.1	98.9±0.6
93	<i>Polygonum tinctoria</i> (Όλο) - EtOAc	46.7±0.2	75.2±2.4	90.3±5.2
95	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - EtOAc	130.1±1.5	107.3±3.8	105.8±4.4
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	55.2±0.9	104.6±0.8	119.3±17.1
97	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - EtOAc	116.0±4.9	100.1±4.6	101.6±4.3
98	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - MeOH	117.0±7.5	98.3±5.4	103.2±3.5
99	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - EtOAc	120.7±17.1	104.4±5.0	107.5±7.3
100	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - MeOH	114.8±8.9	99.6±3.9	97.9±1.4
101	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - EtOAc	125.5±5.9	106.0±1.7	110.5±5.3
102	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - MeOH	107.3±6.3	104.9±2.5	105.6±4.9
103	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - EtOAc	118.1±3.6	103.9±5.8	112.4±2.9
104	<i>Rhamnus sibthorpiana</i> (Υπέργεια) - MeOH	126.7±8.9	105.7±4.0	111.8±2.4
125	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	112.2±3.7	102.7±0.4	116.5±1.4
107	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - EtOAc	17.0±0.3	76.1±0.2	86.0±1.7
108	<i>Taxus baccata</i> (Φύλλα) - MeOH	24.2±0.2	86.9±1.5	84.2±3.4
115	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	47.1±1.8	93.6±0.2	84.8±4.9
116	<i>Vitex agnus-castus</i> (Κλαδιά, φύλλα) - MeOH	94.6±3.5	86.8±2.3	82.7±2.7
170	<i>Vitis vinifera</i> (Κρασί, ποικιλία μοσχάτο Αμβούργου)	98.2±1.3	85.4±3.2	70.3±3.1
130	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα) - MeOH	91.4±0.2	113.3±2.0	116.5±1.7

Πίνακας 4.15 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (ΑΙκΡ) των εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae 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).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα και από τις τρεις κυτταρικές σειρές (Ishikawa, MCF-7, MC3T3-E1) διαπιστώθηκε ότι, από τα 94 συνολικά εκχυλίσματα τα 73 (78% επί του συνόλου) έδωσε σε συγκέντρωση 10 µg/ml επαγωγή της έκφρασης AlkP στα κύτταρα MC3T3-E1, γεγονός που υποδηλώνει προαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων σε ώριμους οστεοβλάστες και επιβεβαιώνει την αρχική επιλογή τους ως δυνητικά οστεοπροστατευτικούς παράγοντες. Μεταξύ των προαναφερόμενων δραστικών εκχυλισμάτων, αρκετά ήταν εκείνα που παρουσίασαν προαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 υψηλότερη εκείνης που επέδειξε η οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 10 nM. Πιο συγκεκριμένα, δραστηριότητα καλύτερη ή αντίστοιχη της οιστραδιόλης σε οποιαδήποτε συγκέντρωση ελέγχου επέδειξαν 48 εκχυλίσματα (51% επί του συνόλου) και αναλυτικότερα, 44 εκχυλίσματα (47% επί του συνόλου) σε συγκέντρωση 10µg/ml, 8 σε συγκέντρωση 1 µg/ml και 6 στη μικρότερη συγκέντρωση των 0.1 µg/ml. Από τα 48 εκχυλίσματα, με σημαντική επαγωγή της διαφοροποίησης των MC3T3-E1, τα 14 χαρακτηρίστηκαν και ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων τόσο στα κύτταρα Ishikawa, όσο και στα MCF-7, ενώ 5 εκχυλίσματα επέδειξαν οιστρογόνο δράση μόνο στα Ishikawa. Τα μοναδικά εκχυλίσματα, τα οποία διατήρησαν σημαντική δραστηριότητα στα MC3T3-E1 και στις μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου (1 και 0.1 µg/ml) και παρουσίασαν σημαντική οιστρογόνο δράση στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7 ήταν τα παρασκευάσματα οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης του είδους *Genista acanthoclada*, ενώ όλα τα υπόλοιπα στερούνταν οιστρογονικότητας (πίνακας 4.16). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μεταξύ των 48 εκχυλισμάτων με υψηλή ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, το 60% (29 εκχυλίσματα) παρουσίασαν πολύ ασθενή ή καθόλου οιστρογονικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές (Ishikawa, MCF-7).

ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	ΔΡΟΓΗ - Διαλύτης εκχύλισης	MC3T3-E1 Επαγωγή της έκφρασης ΑΦ (% ως προς τους Δ.Π.)			ISHIKAWA Αγωνισμός (% της E2 1 nM)	MCF-7 Αγωνισμός (% της E2 0.1 nM)
		10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
55	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα)-EtOAc	176.9±5.3	112.5±6.0	109.2±2.9	P (63.9±4.7)	F (87.6±1.3)
56	<i>Genista milii</i> (Όλο: ρίζες, υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	124.0±0.9	94.4±1.1	96.1±3.5	F (82.4±5.6)	F (115.5±16.6)
49	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) - EtOAc	220.6±9.1	175.3±3.7	126.3±2.0	F (81.2±6.3)	P (45.4±5.8)
50	<i>Genista acanthoclada</i> (Υπέργεια) - MeOH	292.4±2.5	142.1±1.7	120.3±2.9	F (84.6±2.5)	F (71.6±2.0)
53	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) - EtOAc	206,1±27,2	107,3±12,1	94±3,2	F (82.2±3.0)	W
54	<i>Genista hassertiana</i> (Υπέργεια) - MeOH	223,3±4,0	119,4±8,2	100,3±6,2	F (100.7±9.8)	F (72.3±10.1)
52	<i>Genista depressa</i> (Όλο) -MeOH	190.0±8.1	108.6±1.7	100.9±5.4	F (88.3±6.0)	P (58.2±9.8)
57	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -EtOAc	37.3±8.2	117.4±8.1	108.2±5.1	P (50.2±6.8)	W
58	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Ρίζες) -MeOH	184.3±23.2	111.3±4.1	94.3±6.3	P (45.5±0.1)	P (60.1±10.1)
45	<i>Ceratonia siliqua</i> (Ετήσιοι βλαστοί, φύλλα) -EtOAc	151.1±1.8	118.6±5.6	122.6±3.1	M	ND
48	<i>Ceratonia siliqua</i> (Σπέρματα) - MeOH	132.7±0.4	110.6±1.4	111.4±5.2	M	ND
70	<i>Psoralea bituminosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	125.0±5.5	99.2±4.5	99.1±2.4	W 19.3±0.5	ND
59	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -EtOAc	163.0±1.2	110.9±6.6	105.7±14.0	P (54.9±13.9)	F (105.0±12.2)
60	<i>Lupinus albus</i> (Καρποί, σπέρματα) -MeOH	131.2±2.3	108.6±8.2	114.1±16.5	W 11.1±0.7	ND
62	<i>Lupinus albus</i> (Υπέργεια) -MeOH	113.4±2.6	94.4±1.1	91.3±0.5	F (71.1±7.7)	P (48.5±6.0)
64	<i>Ononis rubescens</i> (Όλο με άνθη και καρπούς) -MeOH	116.6±9.7	105.0±4.0	107.6±12.2	P (40.7±18.5)	M
66	<i>Ononis spinosa</i> (Υπέργεια ανθισμένα) -MeOH	118.9±4.7	93.1±7.6	93.9±7.9	M	ND
1	<i>Acanthus spinosus</i> (Υπέργεια)-EtOAc	120.3±6.6	90.0±0.8	89.4±0.9	M	ND
158	<i>Schinus molle</i> (Φύλλα) - MeOH	127.8±1.1	107.1±4.3	104.6±2.3	M	ND
24	<i>Cupressus sempervirens</i> (forma horizontalis) (Καρποί, κυπαρισσόμηλα) - MeOH	152.3±4.8	112.1±1.3	90.9±7.9	M	ND
28	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>communis</i> (Κλαδιά, φύλλα, καρποί) - MeOH	151.6±0.4	104.4±3.5	100.6±1.9	M	ND
29	<i>Iris attica</i> (Όλο) -EtOAc	205.5±33.6	107.7±4.1	94.7±0.3	W 30.8±0.7	ND
30	<i>Iris attica</i> (Όλο) - MeOH	167.8±11.5	95.7±2.2	93.7±2.3	W 12.1±0.2	ND
31	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	260.1±20.8	211.0±16.1	116.5±7.9	M	ND
32	<i>Iris germanica</i> (Ρίζωμα) - MeOH	225.5±24.3	152.5±7.9	103.5±3.2	M	ND
33	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) -EtOAc	90.9±13.4	109.7±4.9	107.9±9.3	F (83.6±12.5)	F (66.7±4.0)
34	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>cretensis</i> (Ρίζωμα) - MeOH	121.5±5.4	109.0±1.8	101.6±3.8	P (33.7±0.9)	M
138	<i>Mentha aquatica</i> (Υπέργεια) - MeOH	121.4±2.4	93.4±1.4	88.2±1.4	F (76.7±26.2)	F (84.9±7.7)
141	<i>Mentha pulegium</i> (Υπέργεια) - EtOAc	92.3±13.2	117.2±4.1	99.3±4.1	M	ND

121	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) -EtOAc	138.9±1.2	108.9±1.6	112.5±1.8	P (34.9±1.4)	M
122	<i>Morus alba</i> (Ξύλο) - MeOH	119.2±1.0	99.9±0.7	106.9±0.5	W 27.7±1.1	ND
74	<i>Morina persica</i> (Υπέργεια) - MeOH	119.7±2.1	106.5±1.9	104.2±1.1	M	ND
75	<i>Pinus heldreichii</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) -EtOAc	130.5±12.4	104.7±2.3	92.3±4.3	M	ND
76	<i>Pinus heldreichii</i> (Κλαδιά, φύλλα, κλαδιά d <1,5cm) - MeOH	165.4±3.4	99.1±2.2	97.3±3.3	F (82.6±1.4)	F (142.4±15.9)
77	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) -EtOAc	141.9±14.6	102.9±2.3	107.4±8.3	M	ND
78	<i>Abies cephalonica</i> (Φλοιός κορμών και κλάδων) - MeOH	125.6±0.6	96.1±2.0	95.1±1.9	P (55.9±3.9)	F (80.6±6.2)
82	<i>Plantago coronopus</i> subsp. <i>cummutata</i> (Όλο) - MeOH	123.5±4.7	113.2±1.8	111.6±1.2	M	ND
95	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - EtOAc	130.1±1.5	107.3±3.8	105.8±4.4	M	ND
96	<i>Punica granatum</i> (Περικάρπιο) - MeOH	55.2±0.9	104.6±0.8	119.3±17.1	P (56.8±21.7)	P (53.7±4.6)
97	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - EtOAc	116.0±4.9	100.1±4.6	101.6±4.3	W 11.1±2.1	ND
98	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Κοζάνη) - MeOH	117.0±7.5	98.3±5.4	103.2±3.5	W 27.3±2.1	ND
99	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - EtOAc	120.7±17.1	104.4±5.0	107.5±7.3	M	ND
100	<i>Rhamnus alpinus</i> (Υπέργεια, συλλογή Γκιώνα) - MeOH	114.8±8.9	99.6±3.9	97.9±1.4	M	ND
101	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graecus</i> (Υπέργεια) - EtOAc	125.5±5.9	106.0±1.7	110.5±5.3	M	ND
103	<i>Rhamnus sibthoriana</i> (Υπέργεια) - EtOAc	118.1±3.6	103.9±5.8	112.4±2.9	M	ND
104	<i>Rhamnus sibthoriana</i> (Υπέργεια) - MeOH	126.7±8.9	105.7±4.0	111.8±2.4	M	ND
125	<i>Prunus spinosa</i> (Καρποί, κλαδιά, φύλλα) - EtOAc	112.2±3.7	102.7±0.4	116.5±1.4	M	ND
130	<i>Zingiber officinale</i> (Ρίζωμα) - MeOH	91.4±0.2	113.3±2.0	116.5±1.7	M	ND

Πίνακας 4.16 Συνοπτικός πίνακας των πλέον δραστικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα MC3T3-E1 καθώς και της δράσης τους ως αγωνιστές στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Οι ομαδοποιήσεις των 48 εκχυλισμάτων, τα οποία παρουσίασαν δραστικότητα καλύτερη της οιστραδιόλης σε κάποια από τις συγκεντρώσεις ελέγχου (πίνακας 4.16), δείχνουν ότι υπάρχει μέτρια θετική συσχέτιση των μετρήσεων [$r(\text{Pearson's correlation coefficient})=0,342$, $p(2\text{-tailed})=0,017$] του % αγωνισμού στα Ishikawa σε συγκ. 1 $\mu\text{g/ml}$ και της % ενίσχυσης της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 σε συγκ. 10 $\mu\text{g/ml}$ παρόλο που 20 εκχυλίσματα χωρίς οιστρογονικού τύπου δράση στα κύτταρα Ishikawa είχαν δράση στα MC3T3-E1. Περιορίζοντας την ομαδοποίηση στα εκχυλίσματα του πίνακα 4.11 βρίσκουμε ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση των μετρήσεων [$r(\text{Pearson's correlation coefficient})=0,505$, $p(2\text{-tailed})=0,012$] του % αγωνισμού στα Ishikawa σε συγκ. 1 $\mu\text{g/ml}$ και της % ενίσχυσης της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 σε συγκ. 10 $\mu\text{g/ml}$, παρόλο που επτά εκχυλίσματα με οιστρογονικού τύπου δράση στα κύτταρα Ishikawa δεν είχαν καθόλου δράση στα MC3T3-E1. Επιπλέον, βρίσκουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των μετρήσεων [$r(\text{Pearson's correlation coefficient})=0,179$, $p(2\text{-tailed})=0,402$] του % αγωνισμού στα MCF-7 σε συγκ. 1 $\mu\text{g/ml}$ και της % ενίσχυσης της διαφοροποίησης των MC3T3-E1 σε συγκ. 10 $\mu\text{g/ml}$. Συμπερασματικά, επιβεβαιώνεται η επίδραση των οιστρογόνων που ταυτοποιούνται με τη βοήθεια των κυττάρων Ishikawa στην προαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, μιας και τα παρασκευάσματα με σημαντική οιστρογόνο δράση χαρακτηρίστηκαν και από επαγωγή της έκφρασης AlkP στα κύτταρα MC3T3-E1. Παρόλα αυτά, σε ένα σημαντικό ποσοστό εκχυλισμάτων η ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών δεν συνδυάστηκε με αντίστοιχη οιστρογόνο δράση, υποδηλώνοντας την ύπαρξη και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, πέραν της συμμετοχής των ERs στη διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης.

Βασιζόμενοι στα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα μπορούσαμε να ταξινομήσουμε τα εκχυλίσματα με δυνητικά οστεοπροστατευτική δράση, σε εκείνα που εμφάνισαν *in vitro* οιστρογονικότητα και θα μπορούσαν να χορηγηθούν μόνο σε άτομα που δεν ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου για καρκίνο του μαστού, ενώ όσα δεν επέδειξαν οιστρογόνο δράση μπορεί να θεωρηθούν κατάλληλα για χορήγηση ακόμα και σε άτομα υψηλού κινδύνου. Έχοντας λοιπόν ως κριτήριο επιλογής την υψηλή ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, αλλά συνυπολογίζοντας και τον κίνδυνο προαγωγής καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα σε ασθενείς που έχουν υποστεί χειρουργική αφαίρεση του όγκου και συμπληρωματική θεραπεία, καθώς ενδέχεται να φέρουν αποκεντρωμένες εστίες ή/και μικρομεταστάσεις, καταλήξαμε στην επιλογή των εκχυλισμάτων του γένους *Iris* για περαιτέρω φαρμακολογική και φυτοχημική μελέτη.

4.3. Περαιτέρω διερεύνηση της οστεοπροστατευτικής δράσης των επιλεγμένων εκχυλισμάτων

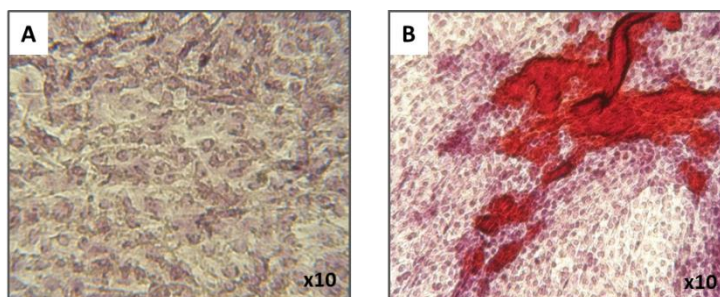
Όπως προαναφέρθηκε, καταλήξαμε στην επιλογή των εκχυλισμάτων του γένους *Iris*, για περαιτέρω διερεύνηση της οστεοπροστατευτικής τους ικανότητας, μιας και όλα χαρακτηρίστηκαν από υψηλή ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, με δείκτη την έκφραση της AlkP (πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης) και όλα, έκτος του εκχυλίσματος EtOAc του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* στερούνταν οιστρογονικότητας. Στη συνέχεια θα περιγραφεί η ικανότητα των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών έως το τελικό στάδιο, καθώς και η ικανότητά τους να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

4.3.1. Προσδιορισμός της ικανότητας των εκχυλισμάτων του γένους *Iris* να προκαλούν επιμετάλλωση στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1

Στα κύτταρα MC3T3-E1 η οστεοβλαστική διαφοροποίηση πιστοποιείται με την επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης, ως πρώιμου δείκτη διαφοροποίησης, αλλά και με τον σχηματισμό επιμεταλλωμένων οζιδίων υδροξυαπατίτη (mineralization). Ο υδροξυαπατίτης είναι φωσφορικό άλας του ασβεστίου $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ που δημιουργείται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και αποτελεί βασικό συστατικό των ασβεστοποιημένων ιστών.

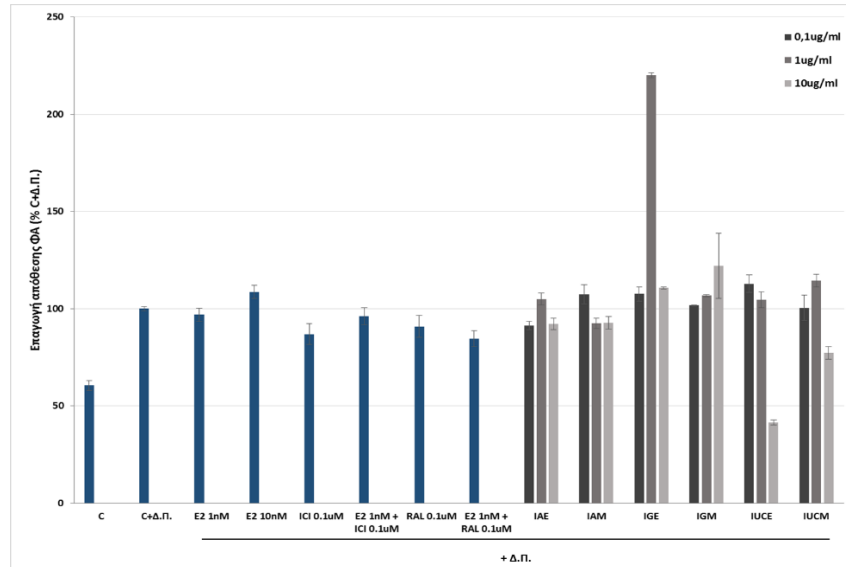
Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων του γένους *Iris*, να επάγουν την απόθεση φωσφορικού ασβεστίου (ΑΦ), τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία διαφοροποιητικών παραγόντων και εκχυλισμάτων για 21 ημέρες και η επιμετάλλωση ανιχνεύθηκε με χρώση αλιζαρίνης (Alizarin Red Staining – ARS) και μέτρηση της απορρόφησης στα 562 nm, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 1.2.4.5. Η πιστοποίηση της ΑΦ διαπιστώθηκε επίσης και κατόπιν φωτογράφισης των κυττάρων στο τέλος του πειράματος (εικόνα 4.8). Οι ενώσεις αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο, ήταν η οιστραδιόλη (1 nM και 10 nM), η ραλοξιφαίνη (0.1 nM), η φουλβεστράνη (0.1 nM) και οι συνδυασμοί των τελευταίων με την οιστραδιόλη. Οι διαφοροποιητικοί παράγοντες ήταν ικανοί να προκαλέσουν αύξηση της απόθεσης φωσφορικού ασβεστίου περίπου δύο φορές, σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα

κύτταρα (εικόνα 4.9) και η επιμετάλλωση εκφράστηκε ως % της απόθεσης φωσφορικού ασβεστίου στο υλικό διαφοροποίησης (C + Δ.Π.).



Εικόνα 4.8 Χρώση ερυθρού της αλιζαρίνης (ARS) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Παρουσιάζεται η απόθεση φωσφορικού στους ώριμους οστεοβλάστες (B) μετά από επώαση 21 ημερών στο υλικό διαφοροποίησης [α-MEM+10% FBS+Δ.Π. (10 mM β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο και 50 μg/ml ασκορβικό οξύ)] σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (A).

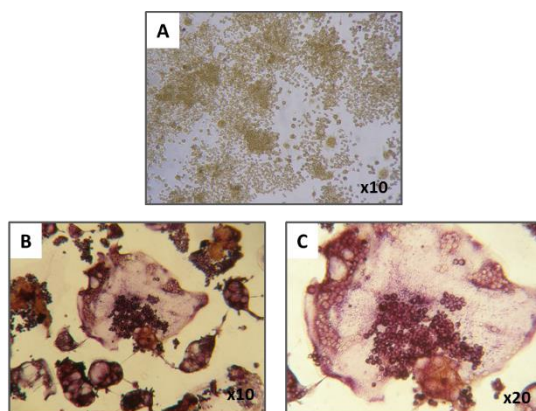
Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.9, όλα τα εκχυλίσματα του γένους αξιολογήθηκαν ως ικανά να επάγουν την απόθεση υδροξυαπατίτη, σε κάποια από τις συγκεντρώσεις ελέγχου, μετά από επώαση 21 ημερών. Αναλυτικότερα, τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης του *Iris attica* (IAE και IAM αντίστοιχα) παρουσίασαν μια μικρή ικανότητα επαγωγής της ΑΦ σε συγκεντρώσεις 1 μg/ml ($104.9 \pm 3.1\%$) και 0.1 μg/ml ($107.4 \pm 4.9\%$), αντίστοιχα. Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του *Iris germanica* (IGE) χαρακτηρίστηκε από υψηλή ικανότητα ΑΦ, δίνοντας επαγωγές $110.8 \pm 0.5\%$, $220.1 \pm 1.2\%$ και $107.7 \pm 3.6\%$, σε συγκεντρώσεις 10 μg/ml, 1 μg/ml και 0.1 μg/ml αντίστοιχα. Από τις προαναφερόμενες τιμές διαφαίνεται η σημαντική ικανότητα του εκχυλίσματος να επάγει την ΑΦ, η οποία στις συγκεντρώσεις 10 μg/ml και 1 μg/ml είναι υψηλότερη ακόμα και από εκείνη της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 10 nM ($108.6 \pm 3.4\%$). Το μεθανολικό εκχύλισμα της ίδιας δρόγης (IGM) χαρακτηρίστηκε επίσης από υψηλή ικανότητα ΑΦ, κυρίως στη μεγάλη συγκέντρωση ελέγχου, δίνοντας επαγωγές $122.0 \pm 6.7\%$, $106.8 \pm 0.6\%$ και $101.7 \pm 0.3\%$, σε συγκεντρώσεις 10 μg/ml, 1 μg/ml και 0.1 μg/ml, αντίστοιχα. Τέλος, τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (IUCE και IUCM, αντίστοιχα) παρουσίασαν επαγωγή ΑΦ $112.9 \pm 4.4\%$ (0.1 μg/ml) και $114.5 \pm 3.2\%$ (1 μg/ml) αντίστοιχα, υψηλότερη συγκρινόμενη με εκείνη της οιστραδιόλης.



Εικόνα 4.9 Απόθεση Φωσφορικού Ασβεστίου κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ + 10 mM β-glycerophosphate) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο δειγμάτων. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

4.3.2. Προσδιορισμός της ικανότητας των εκχυλισμάτων του γένους *Iris* να καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση

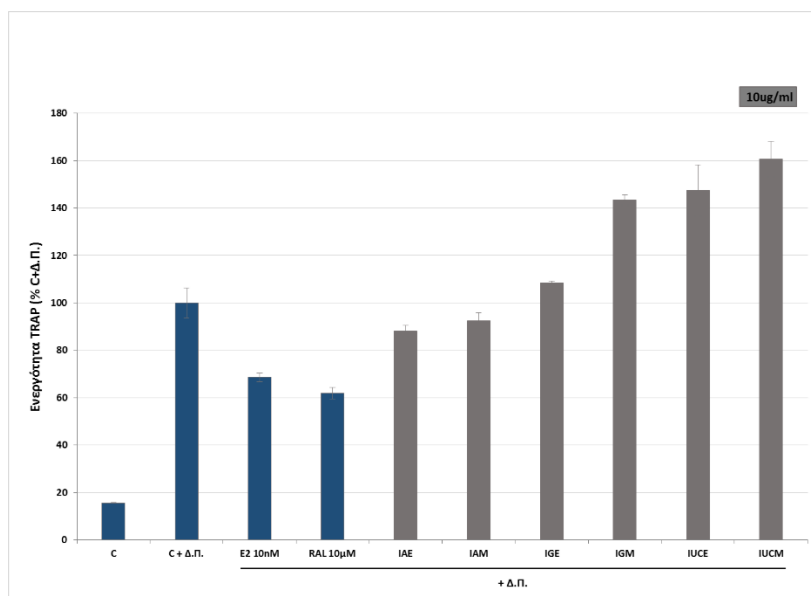
Προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων του γένους *Iris* να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7. Πρόκειται για λευχαιμικά μονοκύτταρα ποντικού, που διαφοροποιούνται παρουσία της πρωτεΐνης RANKL σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες ικανούς να εκφράζουν Όξινη Φωσφατάση Ανθεκτική στο Τρυγικό (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP). Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 1.2.4.7, τα μακροφάγα επώάζονται παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων και των υπό έλεγχο ενώσεων για 4 ημέρες και η οστεοκλαστογένεση πιστοποιείται μετά από χρώση με Naphthol AS (εικόνα 4.10). Προκειμένου να προσδιοριστεί ποσοτικά η έκφραση της TRAP, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και παρουσία τρυγικού οξέος έγινε προσθήκη p-nitrophenyl phosphate ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του παραγόμενου χρωμογόνου στα 405 nm (§ 1.2.4.6).



Εικόνα 4.10 Χρώση με Naphthol-AS για την πιστοποίηση της οστεοκλαστογένεσης στα κύτταρα RAW264.7. Παρουσιάζεται η δημιουργία ώριμων πολυπύρηνων οστεοκλαστών (B, C) μετά από επώαση των μακροφάγων κυττάρων για διάστημα 4 ημερών στο υλικό διαφοροποίησης (a-MEM + 10% HI-FBS + 50 ng/ml RANKL) σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (A).

Τα εκχυλίσματα του γένους *Iris* αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την επαγόμενη από την κυτταροκίνη RANKL έκφραση της TRAP σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τις εκατό της έκφρασης TRAP στο υλικό διαφοροποίησης (RANKL 50 ng/ml). Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (10

nM) και η ραλοξιφαίνη (10 μ M) και διαπιστώθηκε η κατασταλτική επίδραση τόσο της ραλοξιφαίνης, όσο και της οιστραδιόλης στην επαγόμενη από την κυτταροκίνη RANKL έκφραση της TRAP (εικόνα 4.11). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τη συμμετοχή των υποδοχέων οιστρογόνων στην καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, μη αποκλείοντας τη συμμετοχή και άλλων μηχανισμών στη διαδικασία καταστολής της οστεοκλαστογένεσης. Μεταξύ των εκχυλισμάτων του γένους *Iris*, καταστολή της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης, προκάλεσε τόσο το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα, όσο και το μεθανολικό του είδους *Iris attica* ($88.1 \pm 2.6\%$ και $92.6 \pm 3.3\%$ αντίστοιχα), ενώ τα υπόλοιπα δεν φάνηκαν ικανά να καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των RAW264.7 σε οστεοκλάστες σε συγκέντρωση 10 μ g/ml.



Εικόνα 4.11 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. 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 \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

ΚΩΔΙΚΟΣ (HR.MM)	Εκχύλι- σμα	<u>MC3T3-E1</u> Έκφρασης AlkP (% ως προς τους Δ.Π.)			<u>MC3T3-E1</u> Απόθεσης φωσφορικού ασβεστίου (% ως προς τους Δ.Π.)			<u>RAW264.7</u> Έκφρασης TRAP (% των Δ.Π.)	<u>ISHIKAWA</u> Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM)	<u>MCF-7</u> Κυτ. Πολ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM)
		10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
29	IAE	205.5±33.6	107.7±4.1	94.7±0.3	92.3±3.0	104.9±3.1	91.3±2.1	88.1±2.6	W	ND
30	IAM	167.8±11.5	95.7±2.2	93.7±2.3	92.7±3.2	92.5±2.7	107.4±4.9	92.6±3.3	W	ND
31	IGE	260.1±20.8	211.0±16.1	116.5±7.9	110.8±0.5	220.1±1.2	107.7±3.6	108.5±0.7	M	ND
32	IGM	225.5±24.3	152.5±7.9	103.5±3.2	122±6.7	106.8±0.6	101.7±0.3	143.3±2.3	M	ND
33	IUCE	90.9±13.4	109.7±4.9	107.9±9.3	41.5±1.3	104.7±4.1	112.9±4.4	147.4±10.7	F(83.6±12.)	F(66.7±4.0)
34	IUCM	121.5±5.4	109.0±1.8	101.6±3.8	77.2±3.2	114.5±3.2	100.5±6.6	160.6±7.6	P(33.7±0.9)	M

Πίνακας 4.17 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων του γένους Iris 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).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου όλων των εκχυλισμάτων στις κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών (MC3T3-E1), αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου (Ishikawa) και καρκίνου μαστού (MCF-7), εκείνα του γένους *Iris* αναδείχθηκαν ως σημαντικοί παράγοντες προαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και όλα, εκτός του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis*, στερούνταν προαγωγικής του καρκίνου δράσης στη κυτταρική σειρά αναφοράς (MCF-7). Τα εκχυλίσματα των ριζών του *Iris germanica* επέδειξαν την καλύτερη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, διατηρώντας τη δραστηριότητά τους σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου και παράλληλα στερούνταν οιστρογονικότητας, γεγονός που τα καθιστά ασφαλή για πιθανή μελλοντική χορήγηση ακόμα και σε ομάδες υψηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού. Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αποφασίστηκε η περαιτέρω φυτοχημική επεξεργασία των εκχυλισμάτων των ριζών του είδους *Iris germanica*, με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών, καθώς και η αξιολόγησή τους ως προς την δυνητικά οστεοπροστατευτική και οιστρογόνο δράση τους, προκειμένου η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων να αποδοθεί σε συγκεκριμένους μεταβολίτες.

5. Φυτοχημική μελέτη των ριζών του *Iris germanica*

5.1. Συλλογή φυτικού υλικού

Τα ριζώματα του φυτικού είδους *Iris germanica* συλλέχθηκαν τον Ιούνιο του 2010 στην Ανατολική Πελοπόννησο (περιοχή Αγ. Ανδρέας Κυνουρίας), σε ακαλλιέργητους ελαιώνες και υψόμετρο 30 μέτρων, ενώ το ρίζωμα του είδους *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* συλλέχθηκε στην Κρήτη (περιοχή Ζαρός) και σε υψόμετρο 330 μέτρων. Μετά τη συλλογή του φυτικού υλικού, ακολούθησε 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.



Εικόνα 5.1 *Iris germanica* (A) και *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (B)

5.2. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων

Τα επιλεγμένα φυτικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα με τη μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, ώστε να προκύψει η αναγκαία ποσότητα τόσο για την απομόνωση και ταυτοποίηση των περιεχόμενων μεταβολιτών, όσο και για την *in vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους σε μοντέλο οστεοπόρωσης. Πιο συγκεκριμένα, σε 200 g δρόγης προστέθηκε ο αντίστοιχος οργανικός διαλύτης, σε αναλογία 7/1 περίπου και η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30 °C. Ακολούθησε διήθηση για την παραλαβή του υγρού εκχυλίσματος, ενώ η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τελικά, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό με χρήση συσκευής Rotavapor (Buchi). Από τις ρίζες του φυτικού είδους *Iris germanica* παρασκευάστηκε εκχύλισμα τόσο οξικού

αιθυλεστέρα, όσο και μεθανόλης με απόδοση περίπου 4% και 14% αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* η απόδοση υπολογίστηκε σε 15% επί του ξηρού.

5.3. Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του *Iris germanica*

Αρχικά, στα εκχυλίσματα των υπόγειων τμημάτων του φυτού *Iris germanica* πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με τη χρήση της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (FCPC) και ακολούθησε η απομόνωση των ουσιών από τα προκύπτοντα κλάσματα με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως της χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20), της υγρής χρωματογραφίας στήλης υπό χαμηλή πίεση “silica flash” και της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος.

5.3.1. Κλασμάτωση με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC1, C1)

Με σκοπό να διευκολυνθεί η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζωμάτων του *Iris germanica* (IGE), πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με την τεχνική του FCPC. Πιο συγκεκριμένα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το προαναφερόμενο ολικό εκχύλισμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίες παρουσιάζουν δομική ποικιλομορφία (λιπαρά συστατικά, τερπένια, φλαβονοειδή, φαινολικά παράγωγα) και σημαντική διαφοροποίηση στην πολικότητά τους (χρωματογραφικός έλεγχος λεπτής στιβάδας), αποφασίστηκε η κατανομή τους σε απλούστερα μίγματα με τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλυσης. Η αλληλουχία διαφασικών συστημάτων διαλυτών που επιλέχθηκε καθορίστηκε με βάση αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες σε εκχυλίσματα με ανάλογο χημικό φορτίο, οι οποίες είχαν αποδειχθεί αποτελεσματικές.

Η μέθοδος της βαθμιδωτής έκλυσης χαρακτηρίζεται από την διαδοχική εφαρμογή περισσότερων του ενός διαφασικών συστημάτων, προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή κατανομή των περιεχόμενων συστατικών. Ένα σημαντικό ζήτημα, το οποίο είναι αναγκαίο να ληφθεί σοβαρά υπόψη ώστε να είναι επιτυχής η προαναφερόμενη διαδικασία, αποτελεί η

διατήρηση της διφασικότητας κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Έτσι συνήθως, χρησιμοποιούνται συστήματα στα οποία η στατική φάση (κάτω φάση) διατηρείται σχεδόν σταθερή και αλλάζει σημαντικά η αναλογία των διαλυτών στην κινητή φάση (πάνω φάση). Από τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα οποία φαίνονται στον πίνακα 5.1 που ακολουθεί, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η στατική φάση αποτελείται κυρίως από τους διαλύτες EtOH και H₂O σε σταθερή αναλογία (7/8), ενώ η κινητή φάση αποτελεί μίγμα αυξανόμενης πολικότητας, αποτελούμενο κυρίως από τους διαλύτες n-Heptane/EtOAc. Με σκοπό τον έλεγχο διατήρησης της διφασικότητας, τα συστήματα 1-5 παρασκευάστηκαν στις αναλογίες που αναφέρονται στον πίνακα 5.1 και σε ποσότητα περίπου 4-5 ml το καθένα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε μία μικρή ποσότητα (10-15 mg) του ολικού εκχυλίσματος IGE και στη συνέχεια προστέθηκαν το σύστημα διαλυτών 1. Μετά από έντονη ανατάραξη και άφεση σε ηρεμία για το διαχωρισμό των δύο φάσεων, απομακρύνθηκε η ελαφρότερη (οργανική) φάση και προστέθηκε η άνω φάση του συστήματος 2. Μετά από έντονη ανατάραξη και διαχωρισμό των δύο φάσεων, στην υδατική προστέθηκε η οργανική φάση του τρίτου συστήματος και η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι την προσθήκη της άνω φάσης και του τελευταίου διφασικού συστήματος. Όπως παρατηρήθηκε, σε καμία περίπτωση δεν σχηματίστηκε γαλάκτωμα, γεγονός που εξασφαλίζει σε σημαντικό βαθμό τη διατήρηση της διφασικότητας στη στήλη του FCPC καθ' όλη τη διάρκεια της κλασμάτωσης.

Αριθμός Συστήματος	n-Heptane	EtOAc	EtOH	H ₂ O
1	13	2	7	8
2	10	5	7	8
3	7	8	7	8
4	4	11	7	8
5	1	14	7	8

Πίνακας 5.1 Τα διφασικά συστήματα διαλυτών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος IGE με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης

Ο διαχωρισμός (FCPC1–C1) 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 5 g, 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/H₂O 50/50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η 1^η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 650 στροφές/min και ροή 20 ml/min, και μετά την εξισορρόπηση του συστήματος (σημείο στο οποίο η φάση που εισέρχεται στη στήλη εξέρχεται κιάλας διατηρώντας την αναλογία των δύο φάσεων σταθερή) ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή των πρώτων κλασμάτων όγκου 30 ml. Ακολούθησε η εισαγωγή της κινητής (πάνω) φάσης του 2^{ου} συστήματος και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με το τελευταίο σύστημα και έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούνται άλλες ουσίες (περίπου 20 κλάσματα /σύστημα). Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε αναστροφή των φάσεων και η υδατική φάση χρησιμοποιήθηκε ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης και έτσι συνολικά συλλέχθηκαν 160 κλάσματα. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 20 ml/min και 650 rpm, αντίστοιχα.

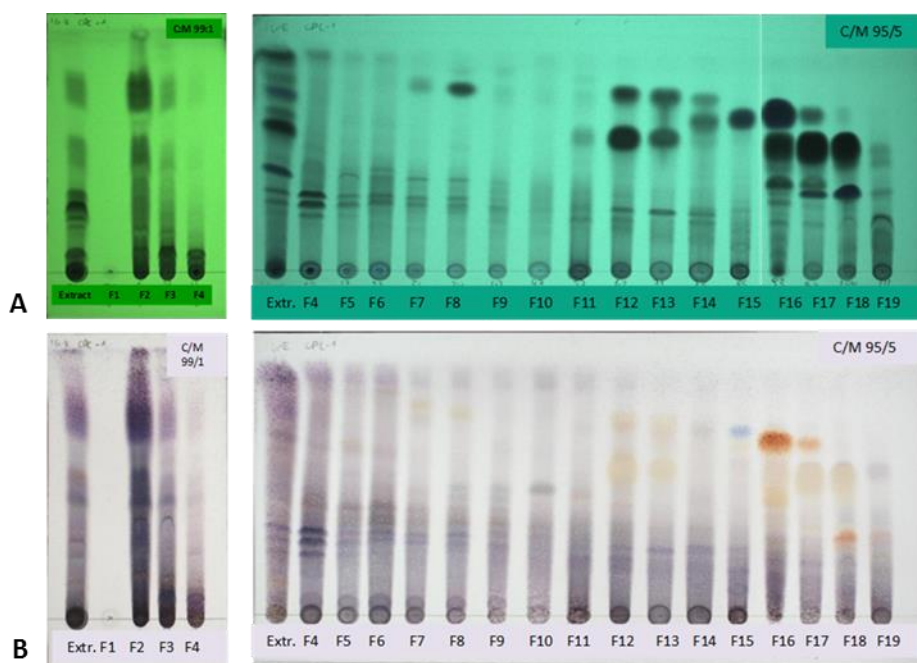
Τα παραληφθέντα κλάσματα ελέγχθηκαν με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂/MeOH και σε αναλογίες 99/1, 95/5, 90/10 και 80/20 και πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις, από τις οποίες προέκυψαν 27 κλάσματα (fractions "C1F"), τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5.2).

ΚΛΑΣΜΑΤΑ FCPC-1 (C1)	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1F1	1-5	1.4
C1F2	6-9	3.230
C1F3	10-11	147.4
C1F4	12-16	173
C1F5	17-21	83.2
C1F6	22-30	83.2
C1F7	31-33	24.1
C1F8	34-42	59.0
C1F9	43-46	20.4
C1F10	47-56	57.5
C1F11	57-61	90.9
C1F12	62-70	108.1
C1F13	71-74	28.7
C1F14	75-84	53.6

C1F15	85-92	50.8
C1F16	93-96	81.5
C1F17	97-99	94.7
C1F18	100-110	279.0
C1F19	111-114	45.3
C1F20	115-118	126.5
C1F21	119-123	89.0
C1F22	124-128	66.7
C1F23	129-133	37.7
C1F24	134-136	13.9
C1F25	137-148	66.6
C1F26	149-151	102.4
C1F27	152-160	112.9

Πίνακας 5.2. Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού (FCPC1 ή C1) του εκχυλίσματος IGE

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων που προέκυψαν μετά από τις συνενώσεις του χρωματογραφικού διαχωρισμού του εκχυλίσματος IGE με τη βαθμιδωτή έκλυση – εξώθηση (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2 TLC χρωματογράφημα των κλασμάτων που προέκυψαν από το IGE με τη βαθμιδωτή έκλυση – εξώθηση μετά από A) παρατήρηση στα 254 nm B) εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης

5.3.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών από κλάσματα του εκχυλίσματος IGE

Από τα 27 κλάσματα που προέκυψαν μετά από επεξεργασία του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα με την τεχνική του FCPC αποφασίστηκε, με τη βοήθεια χρωματογραφικού ελέγχου TLC, η περαιτέρω μελέτη των κλασμάτων C1F2, C1F3, C1F4, C1F8, C1F15, C1F16, C1F17, C1F18, C1F20, C1F23, C1F26 και C1F27. Η επεξεργασία των προαναφερόμενων κλασμάτων με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές και η απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών περιγράφεται στη συνέχεια.

5.3.2.1. Μελέτη του κλάσματος 6-9 από το FCPC-1 (C1F2)

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC έδειξε ότι το κλάσμα C1F2 (6-9) περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενοειδών. Εξαιτίας της σημαντικής ποσότητας η οποία ήταν διαθέσιμη (1.5 g) και της μεγάλης περιεκτικότητας σε σχετικά άπολες ουσίες, χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία του η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης “flash” (CL: column_στήλη), με πληρωτικό υλικό silica flash και κινητή φάση μίγμα διαλυτών κυκλοεξάνιο (cHex) και οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Μετά από τη συλλογή 334 κλασμάτων και τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 36 συνενωμένα κλάσματα, των οποίων τα βάρη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.3).

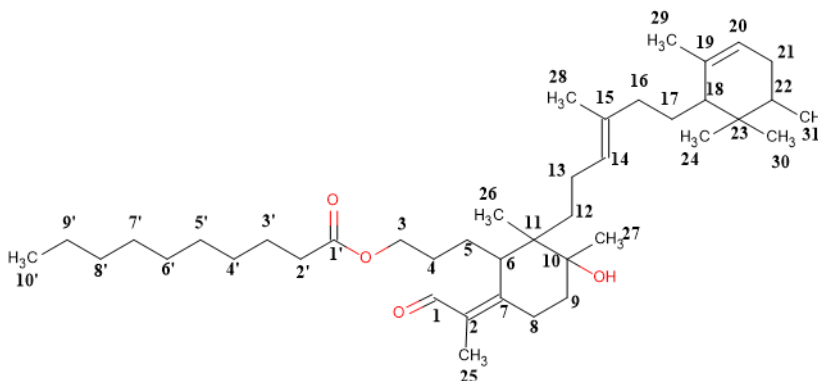
ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1CL2	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1CL2F1	1-10	38.9
C1CL2F2	11-67	3.4
C1CL2F3	68	6.2
C1CL2F4	69-73	102.2
C1CL2F5	74-76	30.0
C1CL2F6	77-79	10.8
C1CL2F7	80-81	7.3
C1CL2F8	82-86	22.9
C1CL2F9	87-95	77.0
C1CL2F10	96-98	22.4
C1CL2F11	99-110	65.6
C1CL2F12	111-112	18.8

C1CL2F13	113-127	70.0
C1CL2F14	128-147	60.0
C1CL2F15	148-150	7.1
C1CL2F16	151-160	19.3
C1CL2F17	161-163	6.2
C1CL2F18	164-171	12.6
C1CL2F19	172-182	16.7
C1CL2F20	183-192	25.2
C1CL2F21	193-195	7.1
C1CL2F22	196-202	13.9
C1CL2F23	203-213	16.8
C1CL2F24	214-221	11.8
C1CL2F25	222-234	20.6
C1CL2F26	235-242	11.3
C1CL2F27	243-251	9.7
C1CL2F28	252-258	7.2
C1CL2F29	259-273	13.3
C1CL2F30	274-284	28.4
C1C2F31	285-294	26.2
C1CL2F32	295-307	25.9
C1CL2F33	308-318	39.3
C1CL2F34	319-323	15.9
C1CL2F35	324-332	21.9
C1CL2F36	333-334	239.7

Πίνακας 5.3 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F2 με γρήγη χρωματογραφία στήλης (C1CL2)

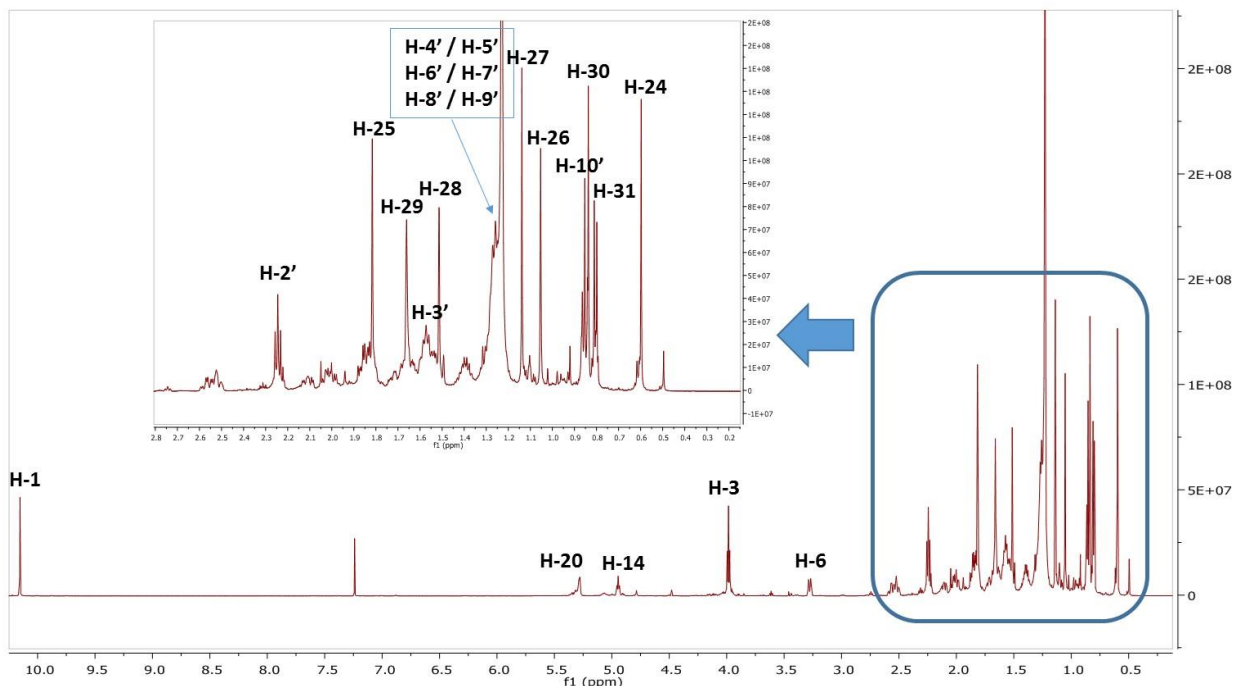
Από το χρωματογραφικό έλεγχο με TLC όλων των κλασμάτων φάνηκε ότι τα C1CL2F9 και C1CL2F13 περιείχαν κυρίως ένα μεταβολίτη και αποφασίσθηκε η περαιτέρω μελέτη τους με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών NMR και MS. Η πραγματοποιηθείσα μελέτη έδειξε ότι στο κλάσμα C1CL2F9 περιέχονταν ο καπρικός ή δεκανοϊκός εστέρας της α-Ιριγερμανάλης (**IGE-10, NC10**), ενώ το κλάσμα C1CL2F13 περιείχε το λινολεϊκό εστέρα της ισομερούς α-Ιριγερμανάλης (**IGE-11, NC11**) σε ποσοστά >90% και >50%, αντίστοιχα.

- Καπρικός ή δεκανοϊκός εστέρας της α-Ιριγερμανάλης (IGE-10, NC10)



IGE-10 (NC10)

Στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC η ουσία **IGE-10** εμφανίσθηκε ως μία κηλίδα, η οποία παρουσίασε μικρή απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε μωβ χρώση μετά την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και συγκεκριμένα στην αλειφατική περιοχή (2.5-0.0 ppm) εμφανίζονται τα περισσότερα σήματα, γεγονός που χαρακτηρίζει τις τερπενοειδικές ουσίες. Μεταξύ των σημάτων της περιοχής αυτής ξεχωρίζουν η διπλή κορυφή στα 0.80 ppm και οι επτά απλές κορυφές σε δ 0.59, 1.82, 1.06, 1.13, 1.52, 1.66 και 0.83, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα H-31, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 και H-30. Επίσης, στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται μία τριπλή κορυφή σε δ 0.85, η οποία αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια H-10', αλλά και οι πολλαπλές κορυφές στα 2.25, 1.59 και 1.25-1.21 ppm, που αντιστοιχούν στα μεθυλένια της αλυσίδας του δεκανοϊκού οξέος (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-10

Ωστόσο, πιο χαρακτηριστικά είναι τα ακόλουθα σήματα (Εικόνα 5.3):

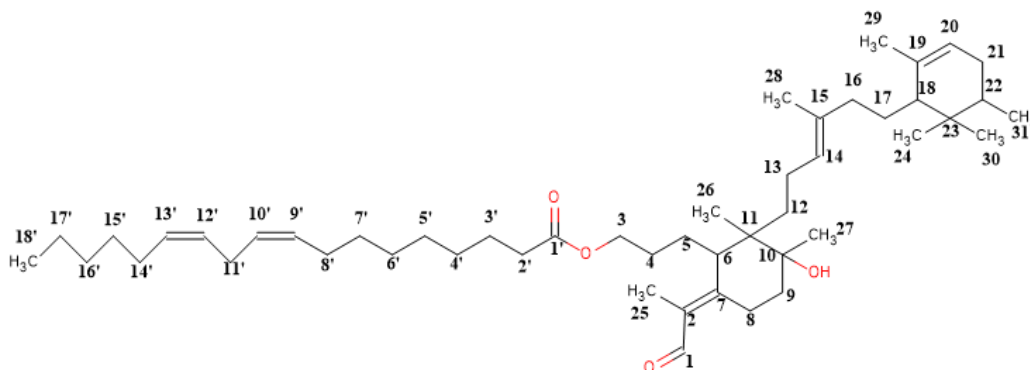
- σε δ 10.20 εμφανίζεται ως απλή κορυφή το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 190.3 ppm
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-14 εμφανίζεται ως ευρεία τριπλή κορυφή ($J = 6.7$ Hz) στα 4.94 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 124.0
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-20 εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.28, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 121.8 ppm
- Τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσεως 3 συντονίζονται σε δ 3.98 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), ενώ ο C-3 εμφανίζεται στα 64.4 ppm
- Σε δ 3.26 εμφανίζεται μία ευρεία διπλή κορυφή ($J = 11.0$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο H-6, ενώ ο C-6 συντονίζεται σε δ 43.4.

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ οι σχετικές πληροφορίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε CDCl ₃	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
1	10.20 (1H, s)	190.3
2	-	134.1
3	3.98 (2H, t, $J = 6.7$)	64.4
4	1.38 (1H, m) / 1.30 (1H, m)	28.6
5	2.02 (1H, m) / 1.71 (1H, m)	26.6
6	3.26 (1H, br d, $J = 11.0$)	43.4
7	-	162.7
8	2.57 (1H, td, 13.8/5.4) / 2.51 (1H, br d, 13.8)	23.7
9	1.84 (1H, m) / 1.64 (1H, m)	37.0
10	-	74.9
11	-	44.7
12	1.26 (1H, m) / 1.10 (1H, m)	37.1
13	1.83 (2H, m)	22.1
14	4.94 (1H, br t, $J = 6.7$)	124.0
15	-	136.1
16	2.11 (1H, m) / 1.85 (1H, m)	42.2
17	1.52 (1H, m) / 1.23 (1H, m)	26.8
18	1.53 (1H, m)	50.4
19	-	136.6
20	5.28 (1H, brs)	121.8
21	1.81 (1H, m) / 1.64 (1H, m)	32.0
22	1.39 (1H, m)	38.5
23	-	35.8
24	0.59 (3H, s)	14.4
25	1.82 (3H, s)	11.0
26	1.06 (3H, s)	17.8
27	1.13 (3H, s)	26.3
28	1.52 (3H, s)	15.9
29	1.66 (3H, s)	22.4
30	0.83 (3H, s)	26.2
31	0.80 (3H, d, $J = 6.7$)	15.9
1'	-	174.2
2'	2.25 (2H, t, 7.0)	34.5
3'	1.59 (2H, m)	25.0
4' – 9'	1.25-1.21 (12H, m)	29.7-29.1
10'	0.85 (3H, t, 6.7)	14.0

Πίνακας 5.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-10

- Λινολεϊκός εστέρας της α-Ισοιριγερμανάλης (IGE-11, NC11)



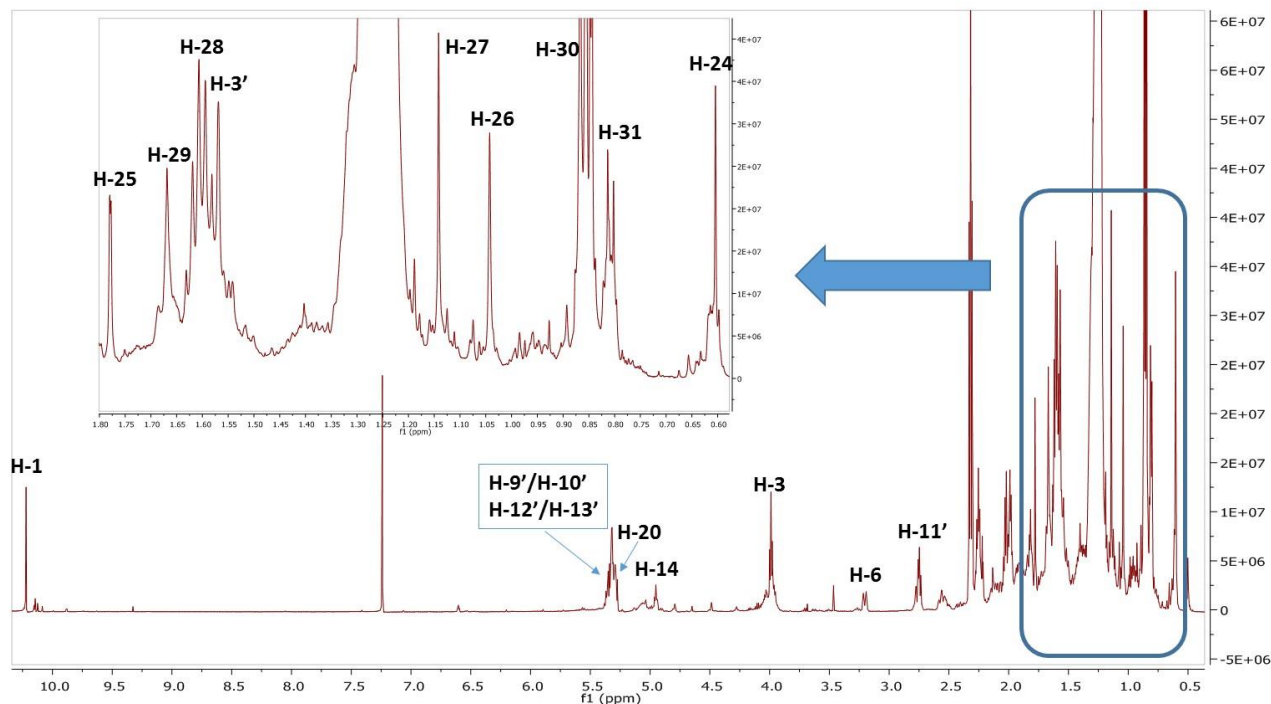
IGE-11 (NC11)

Στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, η ουσία **IGE-11** εμφανίστηκε ως μία κηλίδα η οποία παρουσίασε μικρή απορρόφηση στα 254 nm και έδωσε μώβ χρώση μετά την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και συγκεκριμένα στην αλειφατική περιοχή (2.5-0.0 ppm) εμφανίζονται τα περισσότερα σήματα, γεγονός που χαρακτηρίζει τις τερπενοειδικές ουσίες. Μεταξύ των σημάτων της περιοχής αυτής ξεχωρίζουν η διπλή κορυφή στα 0.80 ppm και οι επτά απλές κορυφές σε δ 0.60, 1.77, 1.04, 1.14, 1.57, 1.66 και 0.85. οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα H-31, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 και H-30. Επίσης, στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται μία τριπλή κορυφή σε δ 0.84, η οποία αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια H-18', αλλά και οι πολλαπλές κορυφές στα 2.26, 1.56, 1.99 και 2.74 ppm που αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια H-2', H-3', H-8'/H-14' και H-11' της αλυσίδας του λινολεϊκού οξέος, αντίστοιχα. Επίσης, στα 5.32-5.30 ppm συντονίζονται τα ολεφινικά πρωτόνια H-9', H-10', H-12' και H-13', τα οποία ανήκουν στην ίδια αλυσίδα (Εικόνα 5.4).

Ωστόσο, πιο χαρακτηριστικά είναι τα ακόλουθα σήματα (Εικόνα 5.4):

- Σε δ 10.20 εμφανίζεται ως απλή κορυφή το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 190.3 ppm
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-14 εμφανίζεται ως ευρεία τριπλή κορυφή ($J = 6.7$ Hz) στα 4.94 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 124.0
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-20 εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.28, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 121.9 ppm

- Τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως 3 συντονίζονται σε δ 3.98 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), ενώ ο C-3 εμφανίζεται στα 64.4 ppm
- Σε δ 2.77 εμφανίζεται μία ευρεία διπλή κορυφή ($J = 11.0$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο H-6, ενώ ο C-6 συντονίζεται σε δ 46.9.



Εικόνα 5.4 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-11

Συγκριτικά με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του βασικού σκελετού της ιριγερμανάλης στην ουσία IGE-10, παρατηρήθηκε θωράκιση στο πρωτόνιο H-6 (δ 2.77 στο IGE-11, έναντι δ 3.26 στο IGE-10), αποθωράκιση στον C-6 (δ 46.9 στο IGE-11, έναντι δ 43.4 στο IGE-10), αποθωράκιση στο πρωτόνιο H-8a (δ 3.20 στο IGE-11, έναντι δ 2.51 στο IGE-10) και θωράκιση στον C-8 (δ 19.9 στο IGE-11, έναντι δ 23.7 στο IGE-10). Αυτή είναι η κύρια φασματοσκοπική διαφοροποίηση μεταξύ των παραγώγων της ιριγερμανάλης και της ισοιριγερμανάλης. Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ οι σχετικές πληροφορίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε CDCl ₃	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
1	10.20 (1H, s)	190.6
2	-	133.4
3	3.97 (2H, t, $J = 6.7$)	64.4
4	1.43 (1H, m) / 1.31 (1H, m)	28.1
5	2.08 (1H, m) / 1.71 (1H, m)	26.9
6	2.77 (1H, br d, $J = 11.0$)	46.9
7	-	162.9
8	3.20 (1H, brd, 14.0) / 2.54 (1H, br t, 14.0)	19.9
9	1.80 (1H, m) / 1.64 (1H, m)	37.9
10	-	75.0
11	-	45.2
12	1.20 (1H, m) / 1.11 (1H, m)	37.0
13	1.839 (2H, m)	23.2
14	4.94 (1H, ~t, $J = 6.7$)	124.0
15	-	136.3
16	2.13 (1H, m) / 1.86 (1H, m)	42.5
17	1.53 (1H, m) / 1.24 (1H, m)	26.9
18	1.53 (1H, m)	50.4
19	-	136.4
20	5.28 (1H, brs)	121.9
21	1.81 (1H, m) / 1.63 (1H, m)	32.0
22	1.39 (1H, m)	38.5
23	-	36.0
24	0.60 (3H, s)	14.4
25	1.77 (3H, s)	11.8
26	1.04 (3H, s)	17.8
27	1.14 (3H, s)	26.2
28	1.57 (3H, s)	16.2
29	1.66 (3H, s)	22.5
30	0.85 (3H, s)	26.2
31	0.80 (3H, d, $J = 6.7$)	15.9
1'	-	174.2
2'	2.26 (2H, t, 6.5)	34.2
3'	1.56 (2H, m)	24.8
4' - 7'	1.27-1.23*	29.5-29.0
8'	1.99**	27.2
9'-10'	5.32-5.30 ***	130.0-128.2
11'	2.74 (2H, m)	25.5
12'-13'	5.32-5.30 **	130.0-128.2
14'	1.99**	27.2

15'-17'	1.27-1.23*	29.5-29.0
18'	0.84 (3H, t, 6.7)	14.0

Πίνακας 5.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-11 (*, **, ***: παρατηρήθηκε αλληλεπικάλυψη των αντίστοιχων σημάτων)

5.3.2.2. Μελέτη των κλασμάτων 10-11 και 12-16 του FCPC-1 (C1F3, C1F4)

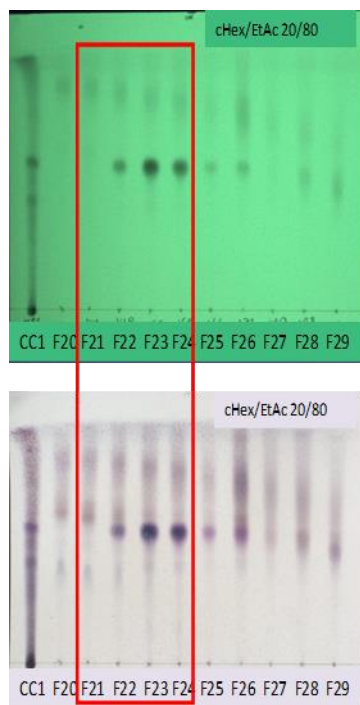
Τα κλάσματα C1F3 και C1F4 (10-16), τα οποία προέκυψαν από τον αρχικό FCPC διαχωρισμό, εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφική εικόνα στην TLC και αποφασίστηκε η συνένωσή τους προκειμένου να επεξεργαστούν περαιτέρω. Από το χρωματογράφημα TLC οι δευτερογενείς μεταβολίτες των κλασμάτων φαίνεται να ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενίων και αποφασίστηκε η επεξεργασία τους με υγρή χρωματογραφία στήλης “flash” (CL:column_στήλη), με πληρωτικό υλικό silica gel και ως κινητή φάση διαλύτες κυκλοεξάνιο (cHex) και οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Μετά τη συλλογή 279 κλασμάτων και τον ποιοτικό έλεγχο τους με TLC προέκυψαν 36 συνενωμένα κλάσματα, των οποίων τα βάρη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1CL1	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1CL1F1	1-22	2.2
C1CL1F2	23-25	3.7
C1CL1F3	26-31	1.7
C1CL1F4	32-34	2.4
C1CL1F5	35	1.6
C1CL1F6	36-39	7.4
C1CL1F7	40-44	8.7
C1CL1F8	45-48	6.0
C1CL1F9	49-54	5.5
C1CL1F10	55-61	6.7
C1C1F11	61-66	2.9
C1CL1F12	67-73	3.8
C1CL1F13	74-79	3.3

C1CL1F14	80-95	5.4
C1CL1F15	96-99	2.7
C1CL1F16	100-103	3.7
C1CL1F17	104-114	8.5
C1CL1F18	115-137	12.4
C1CL1F19	138-144	3.4
C1CL1F20	145-148	3.2
C1CL1F21	149-152	3.2
C1CL1F22	153-157	4.7
C1CL1F23	158-165	4.9
C1CL1F24	166-170	2.3
C1CL1F25	171-179	3.2
C1CL1F26	180-182	2.3
C1CL1F27	183-189	4.2
C1CL1F28	190-194	3.4
C1CL1F29	195-197	3.0
C1CL1F30	198-200	2.7
C1CL1F31	201-204	3.0
C1CL1F32	205-209	2.9
C1CL1F33	210-222	5.9
C1CL1F34	223-249	14.9
C1CL1F35	250-264	9.1
C1CL1F36	265-279	15.7
C1CL1F36	333-334	239.7

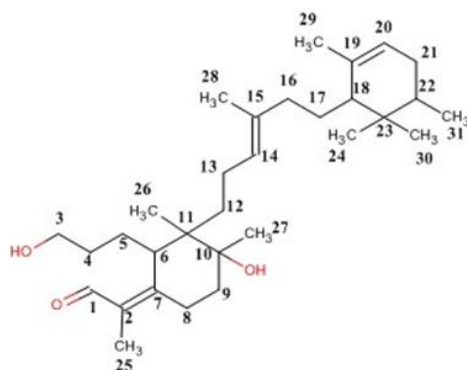
Πίνακας 5.6 Τα κλάσματα της επεξεργασίας των C1F3 και C1F4 με υγρή χρωματογραφία στήλης (C1CL1)

- α-Ιριγερμανάλη (IGE-7, NC7)



Μετά το χρωματογραφικό έλεγχο TLC αποφασίστηκε η συνένωση των κλασμάτων C1CL1F21-C1CL1F24 και η περαιτέρω επεξεργασία τους με παρασκευαστική TLC, με σκοπό την παραλαβή του μεταβολίτη, ο οποίος απορροφά στα 254 nm και χρωματίζεται μωβ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Έτσι, περίπου 15mg του δείγματος διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel στο σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη της γυάλινης πλάκας σε σύστημα ανάπτυξης cHex / EtOAc 20/80, παραλήφθηκε μία ζώνη. Με βάση το χρωματογράφημα TLC, πιθανολογείται ότι ο μεταβολίτης ανήκει στη χημική κατηγορία των ιριδαλών. Πράγματι, μετά από φασματοσκοπική επεξεργασία καταλήξαμε στον μεταβολίτη **IGE-7 (NC7)**, ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως α-

ιριγερμανάλη και η καθαρότητά του είναι μεγαλύτερη από 70%.

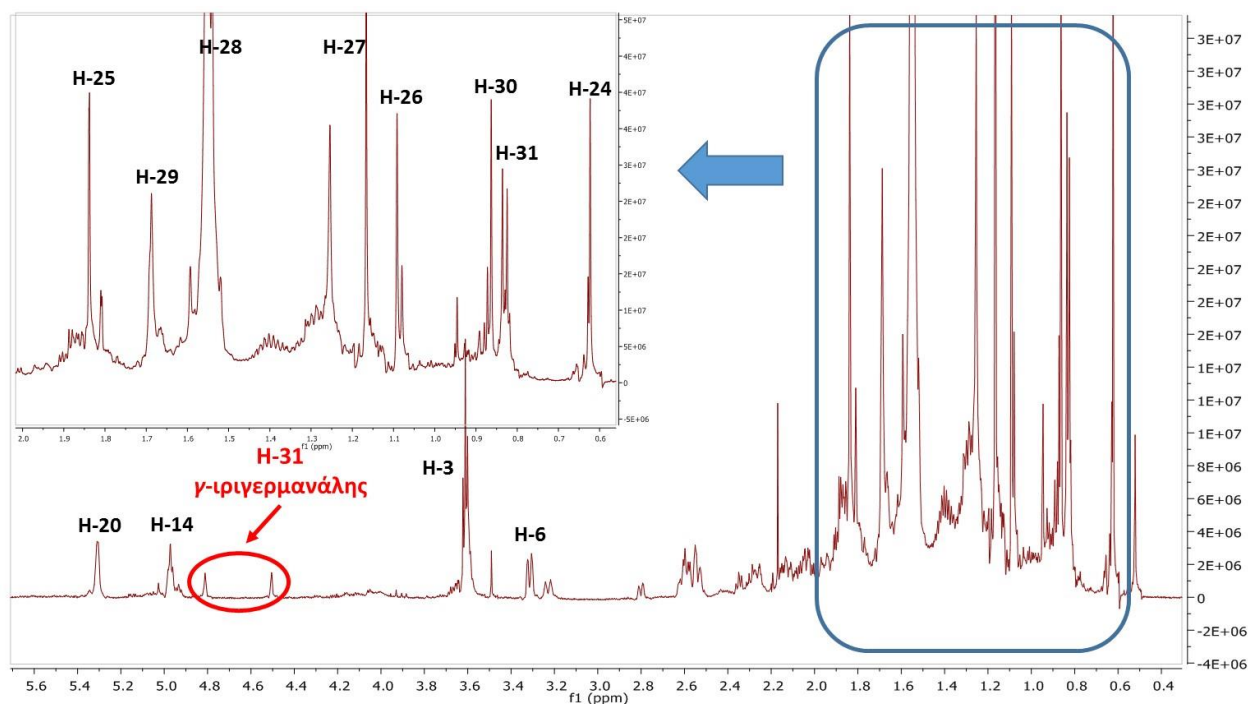


IGE-7 (NC7)

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.5) παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του δεκανοϊκού εστέρα της α-ιριγερμανάλης (IGE-10), ενώ η κύρια διαφοροποίηση αφορά στην απουσία των σημάτων που αντιστοιχούν στην ομάδα του δεκανοϊκού οξέος. Επίσης, αξιοσημείωτη είναι η θωράκιση των μεθυλενικών πρωτονίων H-3 κατά 0.39 ppm, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι η υδροξυλομάδα της θέσης αυτής δεν είναι πλέον εστεροποιημένη.

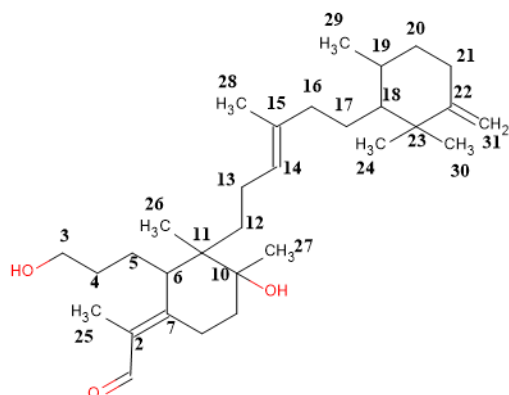
Άλλα χαρακτηριστικά σήματα τα οποία παρατηρούνται στο συγκεκριμένο φάσμα είναι τα ακόλουθα:

- τα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων H-31, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 και H-30 συντονίζονται σε δ 0.81 (d, $J = 6.7$ Hz), 0.60 (s), 1.82 (s), 1.07 (s), 1.15 (s), 1.52 (s), 1.67 (s) και 0.84 (s)
- Σε δ 10.20 εμφανίζεται ως απλή κορυφή το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 190.6 ppm
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-14 εμφανίζεται ως ευρεία τριπλή κορυφή ($J = 6.7$ Hz) στα 4.95 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 124.1
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-20 εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.29, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 121.7 ppm
- Σε δ 3.30 εμφανίζεται μία ευρεία διπλή κορυφή ($J = 11.0$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο H-6, ενώ ο C-6 συντονίζεται σε δ 43.4.



Εικόνα 5.5 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας IGE-7

Επίσης, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ φαίνονται τα χαρακτηριστικά ολεφινικά πρωτόνια H-31 της γ -ιριγερμανάλης (**IGE-7a, NC6**) (Εικόνα 5.5), η οποία αποτελεί την πρόσμιξη στο συγκεκριμένο κλάσμα και η χημική της δομή φαίνεται παρακάτω.



γ -ιριγερμανάλη (NC6)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ οι σχετικές πληροφορίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

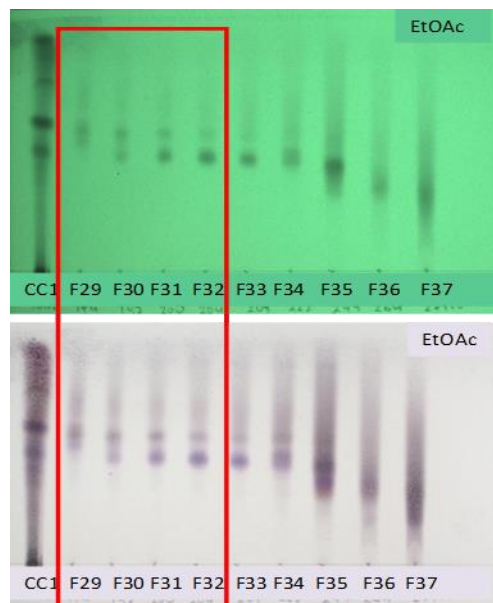
Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε CDCl_3
1	10.20 (1H, s)	190.6
2	-	133.7
3	3.59 (2H, t, $J = 6.7$)	63.1
4	1.40 (1H, m) / 1.28 (1H, m)	32.6
5	2.05 (1H, m) / 1.81 (1H, m)	26.7
6	3.30 (1H, br d, $J = 11.0$)	43.4
7	-	163.6
8	2.58 (1H, m) / 2.52 (1H, m)	23.8
9	1.90 (1H, m) / 1.69 (1H, m)	37.0
10	-	75.4
11	-	45.0
12	1.32 (1H, m) / 1.15 (1H, m)	37.3
13	1.88 (2H, m)	22.1
14	4.95 (1H, br t, $J = 6.7$)	124.1
15	-	136.4
16	2.15 (1H, m) / 1.89 (1H, m)	42.2

17	1.57 (1H, m) / 1.26 (1H, m)	26.9
18	1.58 (1H, m)	50.6
19	-	136.6
20	5.29 (1H, brs)	121.7
21	1.86 (1H, m) / 1.69 (1H, m)	32.0
22	1.43 (1H, m)	38.8
23	-	36.1
24	0.60 (3H, s)	14.5
25	1.82 (3H, s)	11.3
26	1.07 (3H, s)	18.0
27	1.15 (3H, s)	26.4
28	1.52 (3H, s)	16.1
29	1.67 (3H, s)	22.8
30	0.84 (3H, s)	26.2
31	0.81 (3H, d, $J = 6.7$)	16.1

Πίνακας 5.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-7

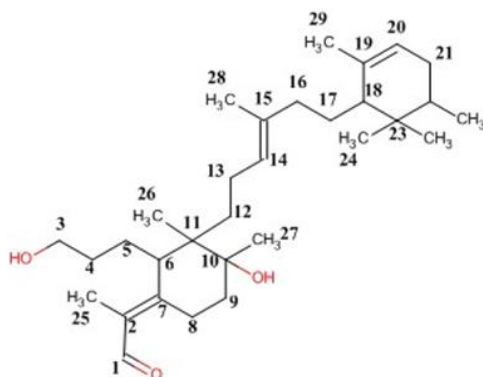
- α -Ισοιριγερμανάλη (IGE-8, NC8)

Τα κλάσματα C1CL1F29-C1CL1F32, μετά τη συνένωσή τους, υποβλήθηκαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος. Το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc 100% και παραλήφθηκε μία ζώνη. Από τα χαρακτηριστικά του χρωματογραφήματος TLC (απορρόφηση στα 254 nm και μώβ χρώση μετά από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης), φάνηκε ότι ο μεταβολίτης που απομονώθηκε ανήκει στη χημική κατηγορία των ιριδαλών, ενώ μετά από φασματοσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκε ως το ισομερές της α -ιριγερμανάλης. Η καθαρότητά του υπολογίσθηκε



ότι είναι μεγαλύτερη από 85%. Οι κύριες διαφορές των φασματοσκοπικών της δεδομένων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δεδομένα της α -ιριγερμανάλης (IGE-7), ήταν οι ακόλουθες: (i) θωράκιση στο πρωτόνιο H-6 (δ 2.86 στο IGE-8, έναντι δ 3.30 στο IGE-7), (ii) αποθωράκιση στον

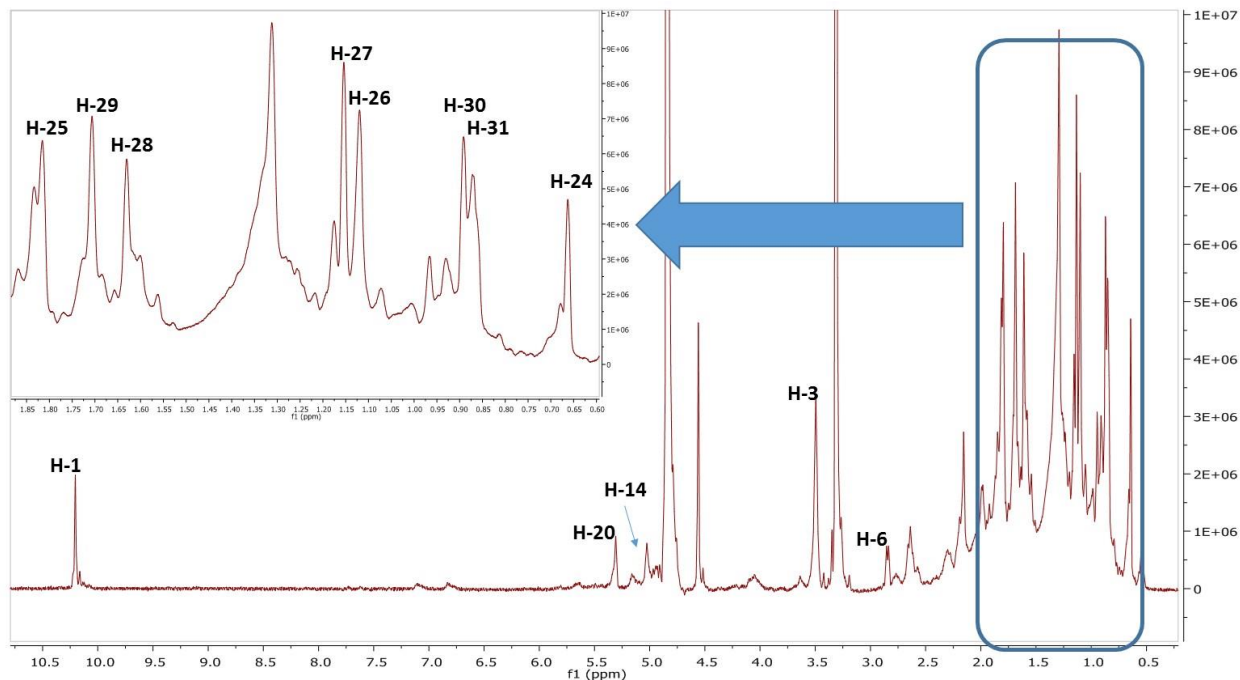
C-6 (δ 49.6 στο IGE-8, έναντι δ 43.4 στο IGE-7), (iii) θωράκιση στο πρωτόνιο H-8a (δ 2.65 στο IGE-8, έναντι δ 2.52 στο IGE-7) και (iv) αποθωράκιση στον C-8 (δ 25.2 στο IGE-8, έναντι δ 23.8 στο IGE-7). Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ οι σχετικές πληροφορίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 5.8 που ακολουθεί.



IGE-8 (NC8)

Άλλα χαρακτηριστικά σήματα τα οποία παρατηρούνται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.6) είναι τα ακόλουθα:

- τα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων H-31, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 και H-30 συντονίζονται σε δ 0.88 (d, $J = 6.7$ Hz), 0.66 (s), 1.81 (s), 1.12 (s), 1.15 (s), 1.63 (s), 1.71 (s) και 0.89 (s)
- Σε δ 10.22 εμφανίζεται ως απλή κορυφή το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 193.1 ppm
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-14 εμφανίζεται ως ευρεία τριπλή κορυφή ($J = 6.7$ Hz) στα 5.04 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 126.7
- Το ολεφινικό πρωτόνιο H-20 εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.31, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 122.5 ppm
- Σε δ 2.86 εμφανίζεται μία ευρεία διπλή κορυφή ($J = 11.0$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο H-6, ενώ ο C-6 συντονίζεται σε δ 49.6.



Εικόνα 5.6 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-8

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ οι σχετικές πληροφορίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε MeOD	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε MeOD
1	10.22 (1H, s)	193.1
2	-	136.4
3	3.52 (2H, t, $J = 6.7$)	63.6
4	1.38 (1H, m) / 1.32 (1H, m)	33.6
5	2.22 (1H, m) / 1.85 (1H, m)	28.7
6	2.86 (1H, br d, $J = 11.0$)	49.6
7	-	167.7
8	2.65 (1H, m) / 2.59 (1H, m)	25.2
9	1.86 (1H, m) / 1.72 (1H, m)	38.9
10	-	75.6
11	-	46.4
12	1.27 (1H, m)	38.6
13	2.01 (2H, m)	24.8

14	5.04 (1H, br s)	126.7
15	-	136.9
16	2.19 (1H, m) / 1.95 (1H, m)	43.2
17	1.30 (2H, m)	30.9
18	1.61 (1H, m)	51.4
19	-	137.6
20	5.31 (1H, brs)	122.5
21	1.88 (1H, m) / 1.70 (1H, m)	33.0
22	1.43 (1H, m)	40.3
23	-	36.9
24	0.66 (3H, s)	15.1
25	1.81 (3H, s)	12.5
26	1.12 (3H, s)	18.6
27	1.15 (3H, s)	26.2
28	1.63 (3H, s)	16.5
29	1.71 (3H, s)	23.2
30	0.91 (3H, s)	27.1
31	0.88 (3H, d, $J = 6.7$)	16.8

Πίνακας 5.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-8

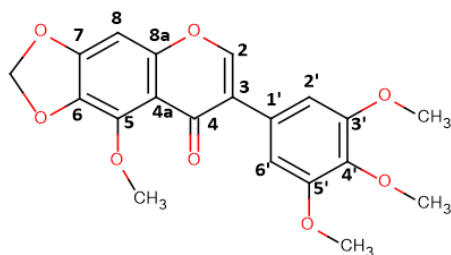
5.3.2.3. Μελέτη του κλάσματος 93-96 του FCPC-1 (C1F16)

Το κλάσμα 93-96 (C1F16 ~ 80 mg) στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC εμφάνισε κηλίδες οι οποίες απορροφούσαν στα 254 nm και μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης έδωσαν πορτοκαλί και υποκίτρινες κηλίδες, με αποτέλεσμα να πιθανολογείται η ύπαρξη φαινολικών ενώσεων. Για το λόγο αυτό, το κλάσμα C1F16 υποβλήθηκε σε περαιτέρω μελέτη με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (prep-TLC), ώστε να παραληφθούν οι περιεχόμενες ουσίες σε καθαρή μορφή. Έτσι, 20 mg του δείγματος διαλύθηκαν σε μεθανόλη και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5, παραλήφθηκαν τέσσερις ζώνες (A, B, C, D) και με την φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5',5'-τετραμεθοξυισοφλαβόνη ή ιρισφλορεντίνη (**IGE-2, NC2**, καθαρότητας >65%), 3-μεθοξυ-4-υδροξυακετοφαινόνη ή ακετοβανιλόνη (**IGE-3, NC3**

καθαρότητας ~100%), 6-μεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη ή τεκτοριγενίνη (**IGE-4, NC4**, καθαρότητας >90%). Επίσης, ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 6,4'-διμεθοξυ-5,7,3'-τριυδροξυισοφλαβόνη (**IGE-5a, NC5**), 6,3'-διμεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη (**IGE-5b, NC24**) και 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνη (**IGE-20, NC20**) ως μίγμα σε αναλογία 30/30/40. Αναλυτικότερα:

- 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5',5-τετραμεθοξυισοφλαβόνη ή Ιρισφλορεντίνη **IGE-2 (NC2)**

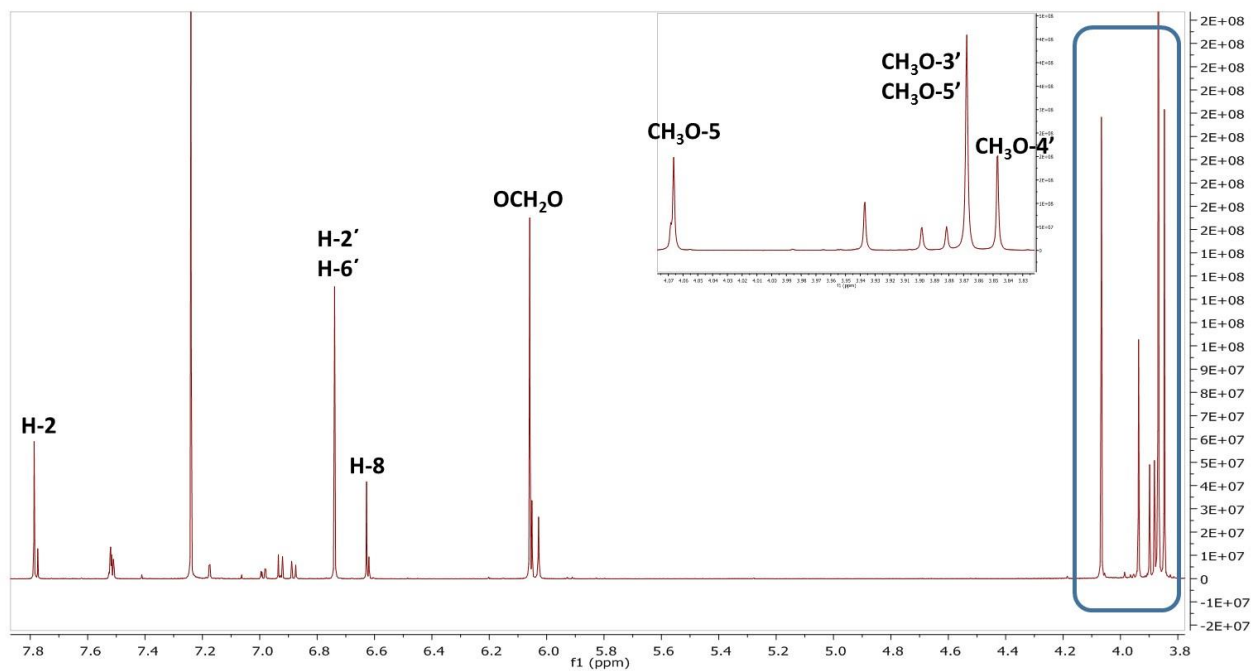
Ο μεταβολίτης της ζώνης Α παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης εμφάνισε υποκίτρινη χρώση, παρατηρήσεις που ταιριάζουν με το γεγονός ότι η ουσία **IGE-2** ή ιρισφλορεντίνη ανήκει στην κατηγορία των ισοφλαβονών.



IGE-2 (NC2)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.7) εμφανίζεται μία χαρακτηριστική απλή κορυφή σε δ 7.79, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 150.8 ppm. Τα προαναφερόμενα σήματα αντιστοιχούν στο μεθίνιο της θέσεως 2 του δακτυλίου C της ισοφλαβόνης. Άλλα χαρακτηριστικά σήματα τα οποία εμφανίζονται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ είναι τα ακόλουθα:

- σε δ 6.62 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.2 ppm
- Τα πρωτόνια H-2' και H-6' είναι ισοδύναμα και εμφανίζονται ως απλή κορυφή στα 6.74 ppm, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 106.8 ppm
- Σε δ 4.06, 3.86 και 3.83 εμφανίζονται τρεις απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία, έξι και τρία πρωτόνια αντίστοιχα και αντιστοιχούν στις μεθοξυλομάδες των θέσεων 5, 3'/5' και 4'.
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.06 ppm.



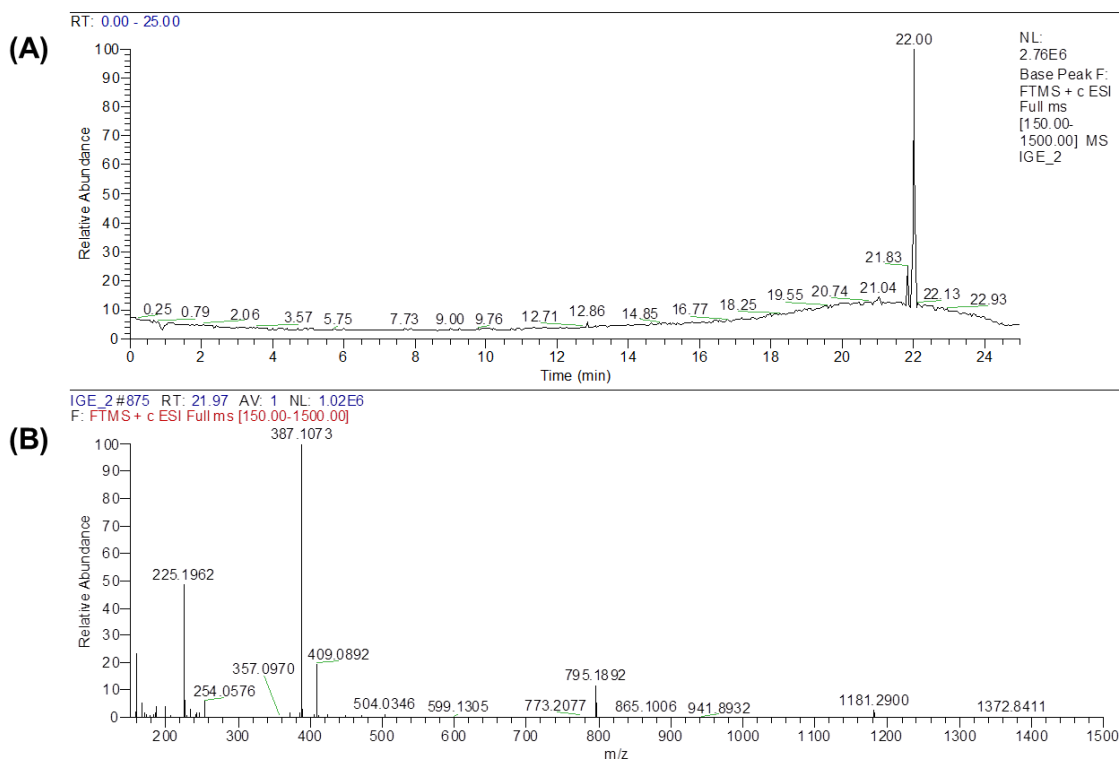
Εικόνα 5.7 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-2

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε CDCl_3
2	7.79 (1H, s)	150.8
3	-	126.3
4	-	175.4
4a	-	113.8
5	-	141.6
6	-	135.6
7	-	153.0
8	6.62 (1H, s)	93.2
8a	-	154.6
1'	-	125.4
2'/6'	6.74 (2H, s)	106.8
3'	-	153.1
4'	-	138.4

5'	-	153.1
CH₃O-3'	3.86 (3H, s)	56.4
CH₃O-4'	3.83 (3H, s)	60.9
CH₃O-5'	3.86 (3H, s)	56.4
CH₃O-5	4.06 (3H, s)	61.3
OCH₂O	6.06 (2H, s)	102.2

Πίνακας 5.9 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-2



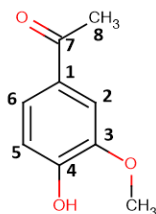
Εικόνα 5.8 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-2 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=22.00$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=22.00$ min με $m/z=387.1073$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισφλορεντίνη (NC2)**

Η ιρισφλορεντίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το έτος 1973, από το ρίζωμα του είδους *Iris florentina* [411, 412]. Έκτοτε, ταυτοποιήθηκε ως μεταβολίτης και άλλων ειδών του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. germanica* [413], *I. milesii*, *I. kumaonensis* [414], *I. tingitana* [415] και *I. rotaninii* [416]. Επίσης, η ιρισφλορεντίνη έχει απομονωθεί και από άλλα γένη της οικογένειας Iridaceae, μεταξύ των οποίων χαρακτηριστικότερη είναι η περίπτωση του είδους *Belamcanda*

chinensis [417, 418]. Σε εκχυλίσματα του προαναφερόμενου είδους, στα οποία έχει εντοπισθεί η ιρισφλορεντίνη, έχουν αποδοθεί αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, όπως είναι η ανασταλτική δράση έναντι της παραγωγής NO και προσταγλανδίνης E2 σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7 [419], η νευροπροστατευτική δράση σε PC12 κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος [420], η επίδραση στον πολλαπλασιασμό καρκινικών σειρών (MCF-7 και T-47D) μαστού [421] και η ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου αναγωγή της αλδόσης και της συσσώρευσης σορβιτόλης σε διαβητικά κύτταρα αρουραίου [422]. Ωστόσο, από τις προαναφερόμενες βιολογικές δράσεις μόνο η αντιφλεγμονώδης συνδέεται με την συγκεκριμένη ισοφλαβόνη [423].

- 3-Μεθοξυ-4-υδροξυακετοφαινόνη ή Ακετοβανιλλόνη (IGE-3, NC3)

Ο μεταβολίτης της ζώνης Β παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλλίνης παρουσίασε πορτοκαλοκόκινη χρώση, δεδομένα που έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η ουσία **NC3** ή ακετοβανιλλόνη ανήκει στην κατηγορία των ακετοφαινονών.



IGE-3 (NC3)

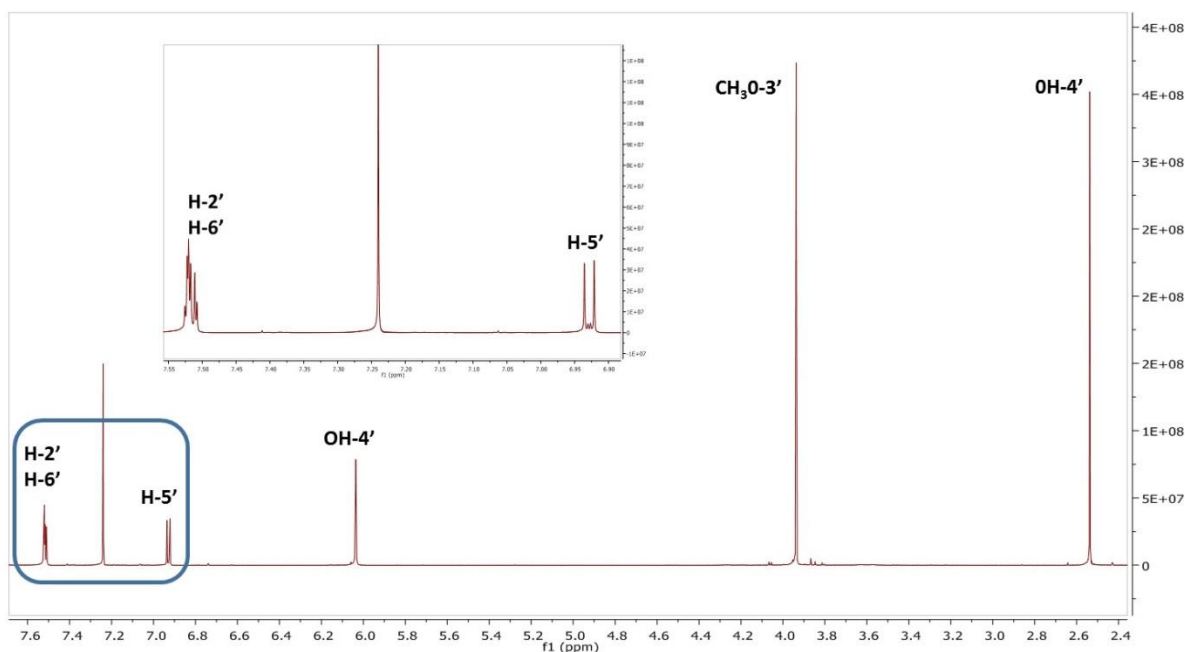
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.9) εμφανίζονται τα παρακάτω χαρακτηριστικά σήματα:

- σε δ 7.52 (1H, d, $J = 2.0$), 7.51 (1H, dd, $J = 8.6 / 2.0$) και 6.93 (1H, d, $J = 8.6$) εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων H-2, H-6 και H-5, τα οποία αποτελούν ένα ABX τρισυποκατεστημένο αρωματικό σύστημα
- Τα πρωτόνια του μεθοξυλίου της θέσεως 3 συντονίζονται στα 3.95 ppm
- Σε δ 2.54 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα H-8
- Το ευκίνητο πρωτόνιο του OH-4, που συντονίζεται στα 6.05 ppm

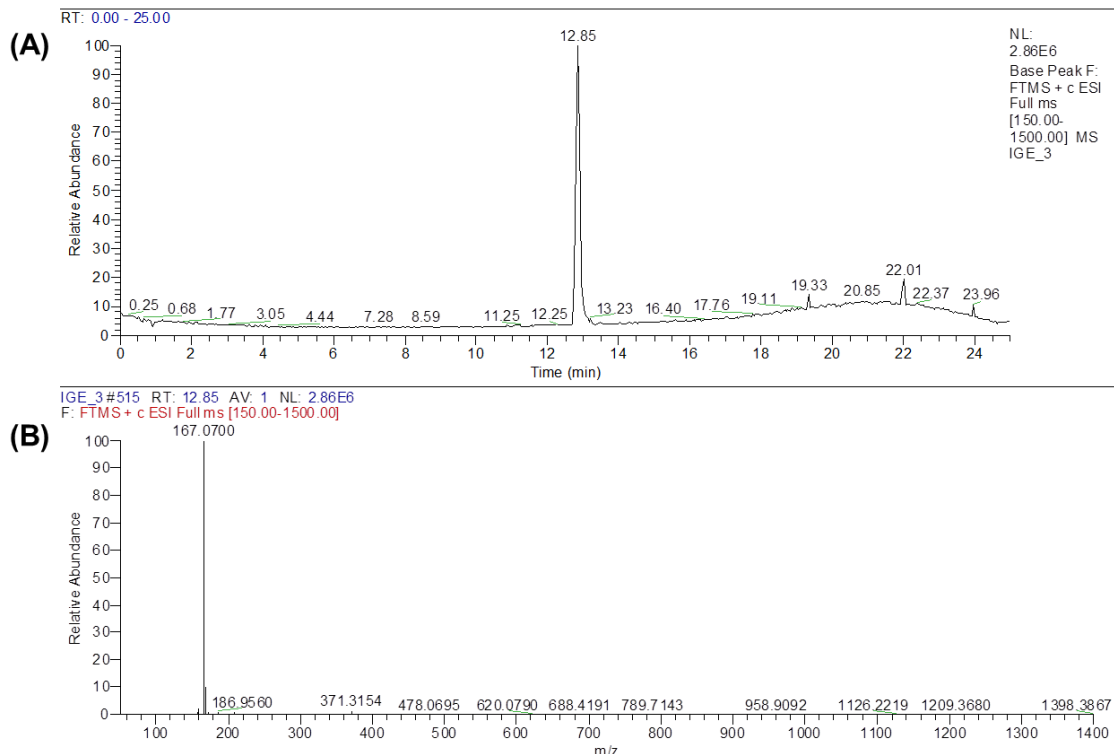
Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	^1H NMR (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	^{13}C NMR (δ) σε CDCl_3
1	-	130.3
2	7.52 (1H, d, $J = 2.0$)	124.3
3	-	146.5
4	-	150.4
5	6.93 (1H, d, $J = 8.6$)	113.6
6	7.51 (1H, dd, $J = 8.6 / 2.0$)	109.7
7	-	197.1
8	2.54 (3H, s)	25.8
$\text{CH}_3\text{O-3}$	3.95 (3H, s)	56.1
OH-4	6.05 (1H, s)	-

Πίνακας 5.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR της ένωσης IGE-3



Εικόνα 5.9 Φάσμα Φάσμα ^1H -NMR της ουσίας IGE-3

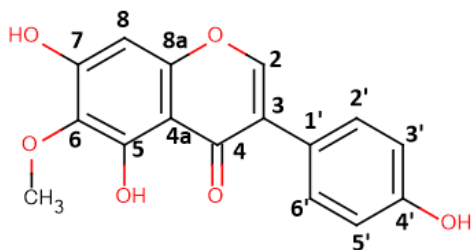


Εικόνα 5.10 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-3 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=12.85$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=12.85$ min με $m/z=167.0700$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ακετοβανιλλόνη (NC3)**

Η ακετοβανιλλόνη έχει ξαναπομονωθεί από τα ριζώματα του *Iris germanica* [148], καθώς και από άλλα είδη του γένους *Iris*, όπως το *I. suaveolens* [424], ενώ έχει αναφερθεί και ως αποσυνίνη ή ισοπενόλη. Ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των βενζολικών παραγώγων και ευθύνεται μερικώς για το έντονο άρωμα των ριζωμάτων του φυτού, καθώς και για την αντιοξειδωτική του δράση.

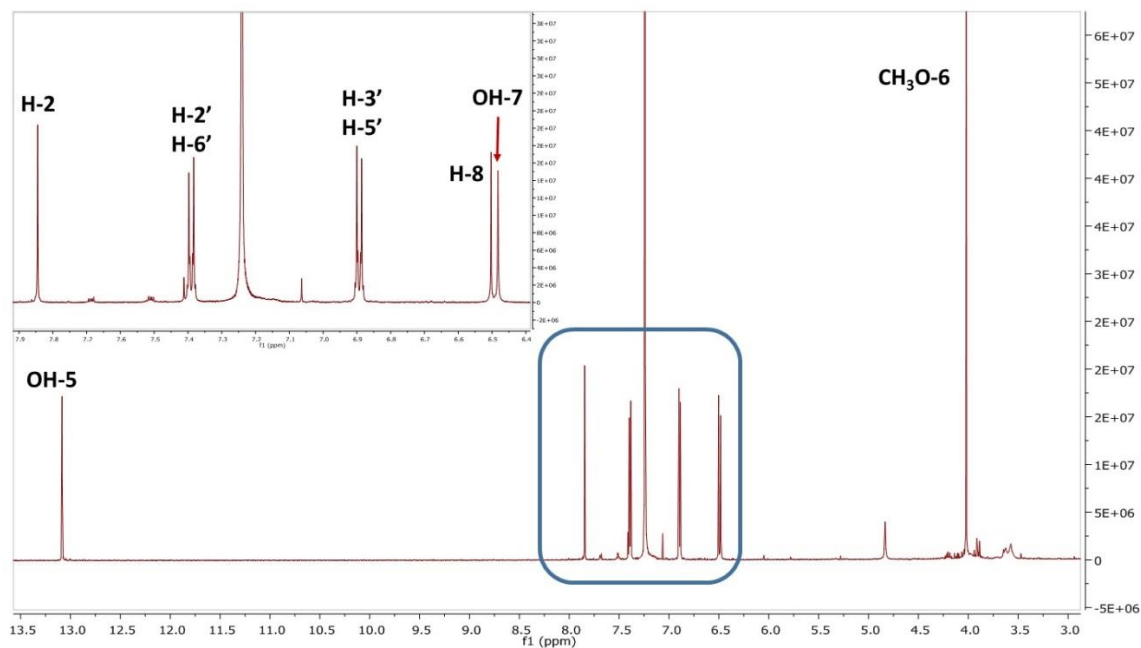
- 6-Μεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη ή Τεκτοριγενίνη (IGE-4, NC4)

Ο μεταβολίτης της ζώνης D παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης παρουσίασε υποκίτρινη χρώση, δεδομένα που έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η ουσία NC4 ή τεκτοριγενίνη ανήκει στην κατηγορία των ισοφλαβονών.



IGE-4 (NC4)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.11) εμφανίζεται σε δ 7.84 η χαρακτηριστική απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 152.9 ppm.



Εικόνα 5.11 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-4

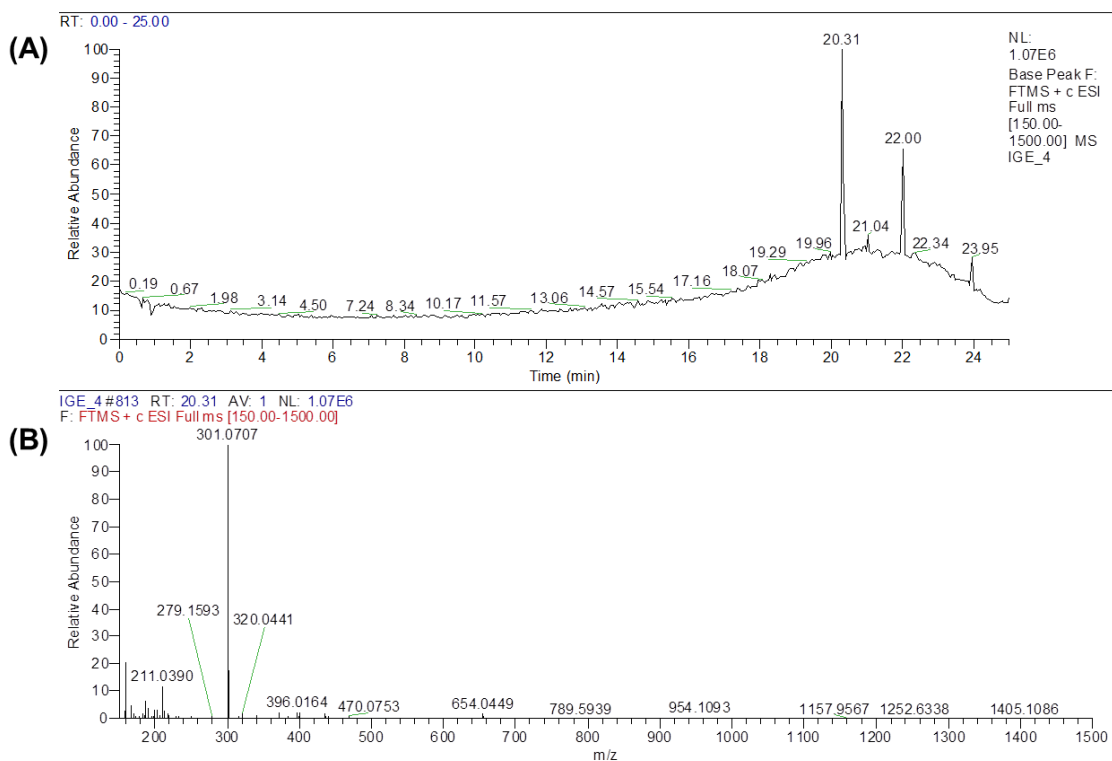
Άλλα χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία εμφανίζονται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ είναι τα ακόλουθα:

- σε δ 6.50 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.4 ppm
- Τα πρωτόνια H-2'/H-6' και H-3'/H-5' του δακτυλίου B εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές σε δ 7.39 και 6.89, από τις οποίες η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και είναι χαρακτηριστικές της π-υποκατάστασης
- Σε δ 4.04 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσεως 6.

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε CDCl_3
2	7.84 (1H, s)	152.9
3	-	124.2
4	-	177.6
4a	-	113.4
5	-	141.8
6	-	135.6
7	-	153.8
8	6.50 (1H, s)	93.4
8a	-	154.8
1'	-	126.7
2'/6'	7.39 (2H, d, $J = 8.7$)	130.5
3'/5'	6.89 (2H, d, $J = 8.7$)	115.5
4'	-	157.1
CH₃O-6	4.04 (3H, s)	60.9
OH-5	13.09 (1H, s)	-
OH-7	6.48 (1H, s)	-
OH-4'	4.83 (1H, brs)	-

Πίνακας 5.11 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-4



Εικόνα 5.12 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-4 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.31$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.31$ min με $m/z=301.0707$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Τεκτοριγενίνη (NC4)**

Η τεκτοριγενίνη έχει απομονωθεί τόσο από είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. pseudacorus* [122], *I. crocea* [425], *I. milesii* [426], *I. japonica* [427] και *I. kumaonensis* [428], όσο και από είδη που ανήκουν σε άλλα γένη: *Podocarpus amarus*, οικ. Podocarpaceae [429], *Milletia auriculata*, οικ. Leguminosae [430], *Maackia amurensis*, οικ. Fabaceae [431] και *Belamcanda chinensis*, οικ. Iridaceae [417]. Μεταξύ των βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων, οι οποίες έχουν αποδοθεί στην τεκτοριγενίνη, περιλαμβάνονται οι αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες [432], η ανασταλτική δράση έναντι της παραγωγής της προσταγλανδίνης E2 [433], η αντιμικροβιακή δράση έναντι μυκήτων και βακτηρίων [434], η ισχυρή σύνδεση με τους α - και β -υποδοχείς οιστρογόνων [435] και η ανασταλτική επίδραση έναντι του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων μαστού [421], η αξιοσημείωτη αντι-αγγειογενετική δράση και η σημαντική μείωση όγκου καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (Lewis) εμφυτευμένων σε μύες [436], η αναστολή της ρεδοκτάσης της αλδόζης [437], η κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών

σειρών [438], η αντιφλεγμονώδης επίδραση σε μακροφάγα (RAW264.7) κύτταρα [439], η αντιοξειδωτική [440] και η κυτταροπροστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες [441].

- 6,4'-διμεθοξυ-5,7,3'-τριυδροξυισοφλαβόνη (IGE-5a, NC5)
- 6,3'-διμεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη (IGE-5b, NC24)
- 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνη (IGE-20, NC20)

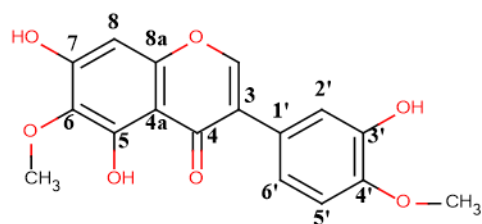
Η ζώνη C παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και εμφάνισε υποκίτρινη χρώση μετά την επίδραση του αντιδραστηρίου της θειϊκής βανιλίνης. Ωστόσο, από τη φασματοσκοπική μελέτη (Εικόνα 5.13) προέκυψε ότι πρόκειται για μίγμα τριών ισοφλαβονοειδών και με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση των πρωτονίων και των ανθράκων και των τριών ενώσεων.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε CDCl ₃	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
2	7.84 (1H, s)	153.0
3	-	122.1
4	-	180.2
4a	-	106.2
5	-	141.7
6	-	130.3
7	-	154.5
8	6.50 (1H, s)	93.4
8a	-	153.7
1'	-	123.9
2'	7.08 (1H, d, $J = 2.0$)	115.2
3'	-	145.7
4'	-	146.2
5'	6.92 (1H, d, $J = 8.3$)	110.7
6'	7.05 (1H, dd, $J = 8.3/2.0$)	120.9
CH₃O-6	4.04 (3H, s)	61.0
OH-5	13.10 (1H, s)	-
OH-7	6.48 (1H, s)	-
OH-3'	5.61 (1H, s)	-
CH₃O-4'	3.92 (3H, s)	56.4

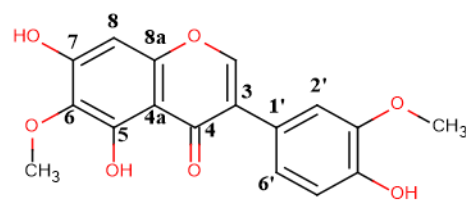
Πίνακας 5.12 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-5a

Άτομο	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε CDCl ₃	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
2	7.85 (1H, s)	153.0
3	-	122.1
4	-	180.2
4a	-	106.2
5	-	141.7
6	-	130.3
7	-	154.5
8	6.48 (1H, s)	93.4
8a	-	153.7
1'	-	123.9
2'	7.11 (1H, d, J = 1.8)	111.8
3'	-	145.7
4'	-	146.5
5'	6.95 (1H, d, J = 8.0)	114.9
6'	6.93 (1H, dd, J = 8.0/1.8)	121.6
CH ₃ O-6	4.02 (3H, s)	61.0
OH-5	13.09 (1H, s)	-
OH-7	6.48 (1H, s)	-
OH-4'	5.67 (1H, s)	-
CH ₃ O-3'	3.92 (3H, s)	56.4

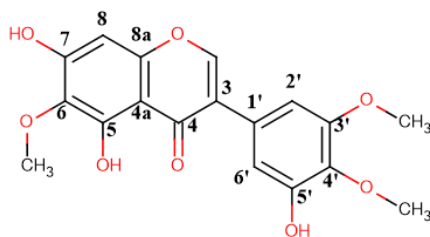
Πίνακας 5.13 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-5b



IGE-5a (NC5)



IGE-5b (NC24)



IGE-20 (NC20)

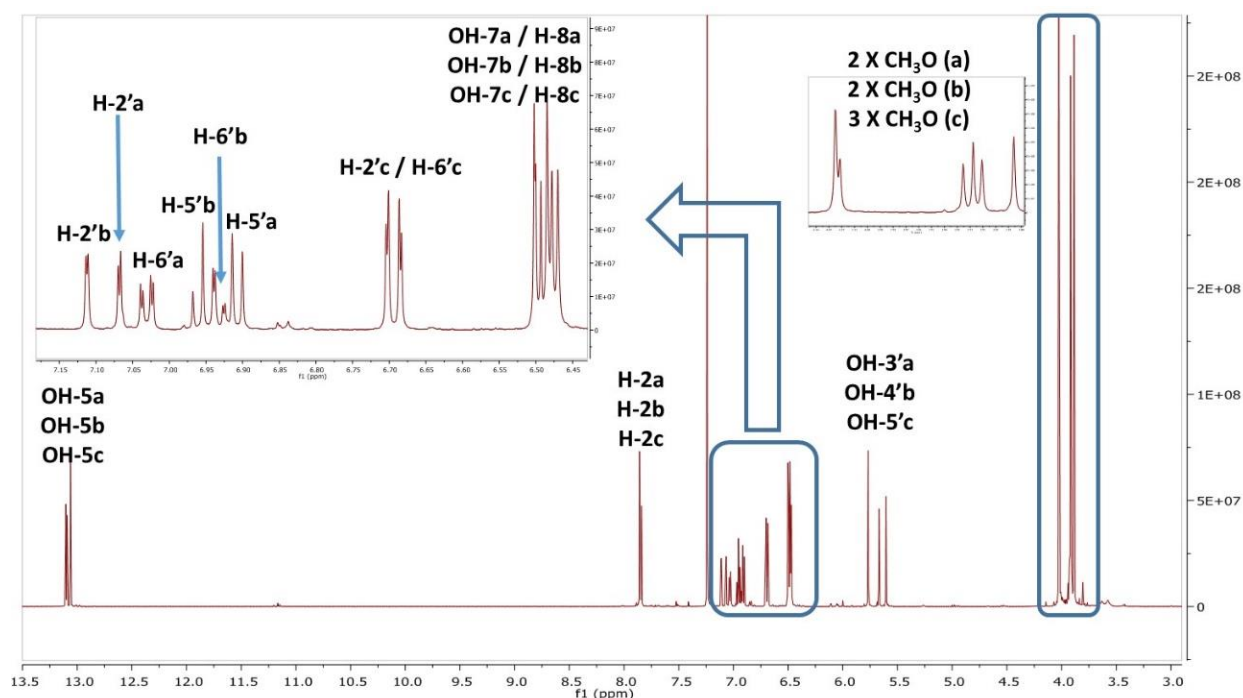
Οι ενώσεις **IGE-5a** και **IGE-5b** αποτελούν ισομερείς ενώσεις, οι οποίες σχετικά με τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα διαφοροποιούνται κυρίως ως προς τις μετατοπίσεις των πρωτονίων του δακτυλίου B, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τη διαφορετική θέση του μεθοξυλίου στο συγκεκριμένο δακτύλιο. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια H-2', H-5' και H-6' της 6,4'-διμεθοξυ-5,7,3'-τριυδροξυισοφλαβόνης (IGE-5a) εμφανίζονται σε δ 7.08 (1H, d, $J = 2.0$), 6.92 (1H, d, $J = 8.3$) και 7.05 (1H, dd, $J = 8.3/2.0$) αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση της 6,3'-διμεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνης (IGE-5b), τα σήματα των αντίστοιχων πρωτονίων εμφανίζονται στα 7.11 (1H, d, $J = 1.8$), 6.95 (1H, d, $J = 8.0$) και 6.93 (1H, dd, $J = 8.0/1.8$).

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε CDCl_3
2	7.87 (1H, s)	153.0
3	-	123.2
4	-	180.2
4a	-	106.2
5	-	141.7
6	-	130.3
7	-	154.5
8	6.50 (1H, s)	93.4
8a	-	153.7
1'	-	123.7
2'	6.71 (1H, d, $J = 1.9$)	115.2
3'	-	152.4
4'	-	135.7
5'	-	149.8
6'	6.69 (1H, dd, $J = 1.9$)	108.6
CH₃O-6	4.04 (3H, s)	61.0
OH-5	13.06 (1H, s)	-
OH-7	6.48 (1H, s)	-

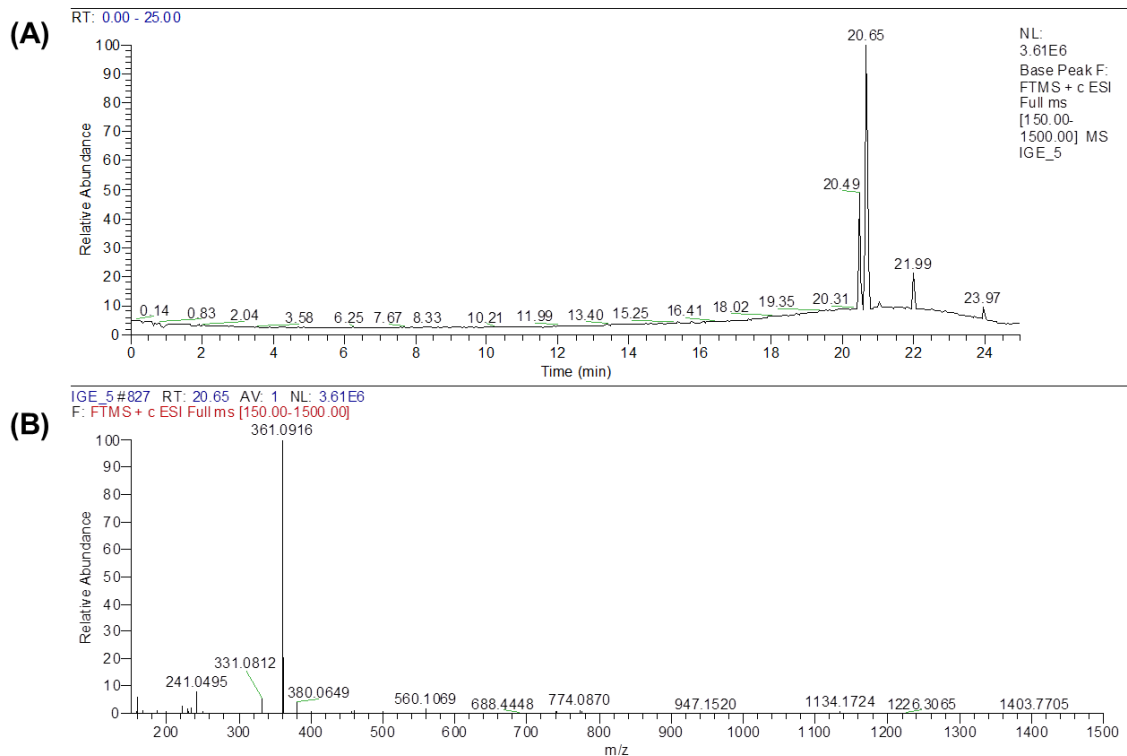
OH-5'	5.77 (1H, s)	-
CH₃O-3'	3.89 (3H, s)	56.4
CH₃O-4'	3.92 (3H, s)	61.2

Πίνακας 5.14 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-20

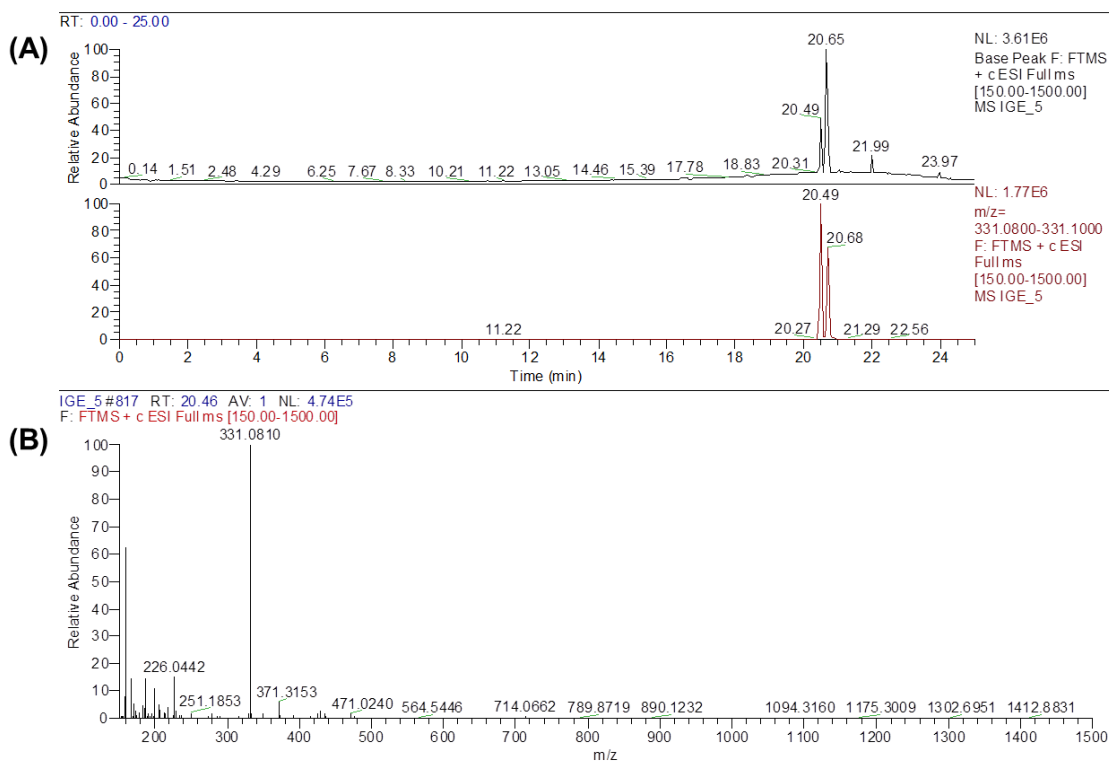
Η 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνη (**IGE-20**), σε σύγκριση με τις άλλες δύο ισοφλαβόνες του μίγματος, διαφέρει στην παρουσία μίας δεύτερης μεθοξυλομάδας στο δακτύλιο B, η οποία εμφανίζεται στο φάσμα ¹H-NMR ως απλή κορυφή σε δ 3.92, με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 61.2 ppm. Η παρουσία ενός ακόμη υποκαταστάτη στο δακτύλιο B έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μόνο δύο αρωματικών πρωτονίων (H-2' και H-6'), τα οποία εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.71 (1H, d, *J* = 1.9) και 6.69 (1H, dd, *J* = 1.9), αντίστοιχα.



Εικόνα 5.13 Φάσμα ¹H-NMR του μίγματος των ουσιών IGE-5a, IGE-5b και IGE-20



Εικόνα 5.14 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.65$ min με $m/z=361.0916$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριγενίνη (NC20)**



Εικόνα 5.15 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.49$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.49$ min με $m/z=331.0810$, το οποίο αντιστοιχεί στα φυσικά προϊόντα **Ιριστεκτοριγενίνη-A και B (NC5 και NC24)**

Ο μεταβολίτης IGE-5a (**NC5**), ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως 6,4'-διμεθοξυ-5,7,3'-τριυδροξυισοφλαβόνη ή ιριστεκτοριγενίνη A, έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Iris*, όπως τα *I. unguicularis* [442], *I. pseudacorus* [122], *I. spuria* [443] και *I. japonica* [427]. Επίσης, η ιριστεκτοριγενίνη A έχει εντοπισθεί σε είδη της οικογένειας Leguminosae, όπως είναι τα *Monopteryx inprae* [444] και *Sophora tomentosa* [445]. Όσον αφορά τις βιολογικές της ιδιότητες, έχει αναφερθεί ότι εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Belamcanda chinensis* (οικ. Iridaceae), από το οποίο απομονώθηκε η ιριστεκτοριγενίνη A και άλλοι 17 μεταβολίτες, παρουσίασε αξιοσημείωτη ανασταλτική επίδραση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών [446].

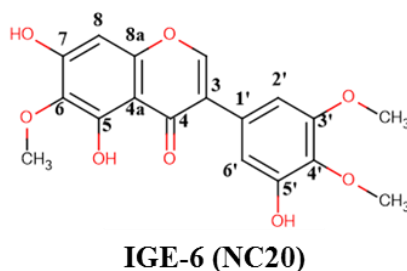
Ο μεταβολίτης IGE-5b (**NC-24**), ο οποίος είναι ισομερές του προαναφερόμενου μεταβολίτη, ταυτοποιήθηκε ως 6,3'-διμεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη ή

ιριστεκτοριγενίνη Β. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία έχει εντοπισθεί τόσο σε είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. florentina* [411, 412], *I. pseudacorus* [122] και *I. kumaonensis* [447], όσο και σε συγγενικά γένη της οικογένειας Iridaceae (*Belamcanda chinensis* / [419], *Gynandriris sisyrinchium* / [448]) ή άλλων οικογενειών όπως στις περιπτώσεις του *Pterospermum acerifolium*, οικ. Sterculiaceae [449] και του *Eriocaulon austral*, οικ. Eriocaulaceae [450]. Όσον αφορά τις βιολογικές ιδιότητες του μεταβολίτη IGE-5b, ο οποίος είναι γνωστός και ως “jaceosidin”, έχει αναφερθεί η ισχυρή κυτταροτοξική του δράση έναντι των καρκινικών σειρών A549, MCF-7 και HeLa [450].

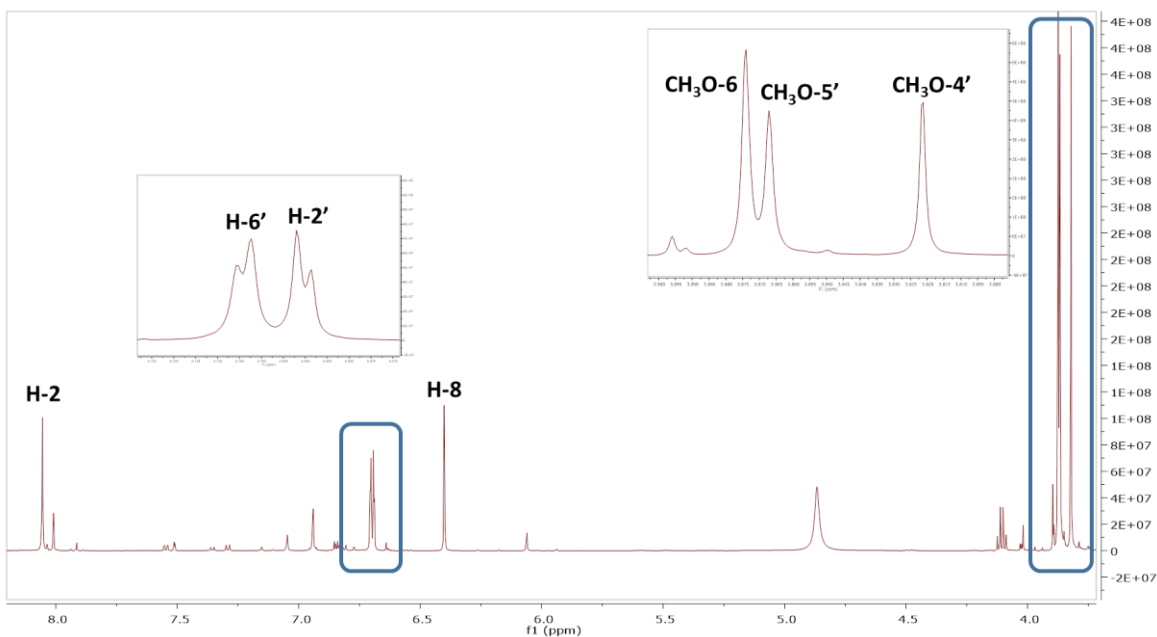
Η 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνη ή ιριγενίνη, IGE-20 (**NC-20**), έχει αναφερθεί ως μεταβολίτης διαφόρων ειδών του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. florentina* [411, 412], *I. unguicularis* [442], *I. milesii*, *I. kumaonensis* [414], *I. germanica* [211] και *I. tingitana* [415]. Επίσης, έχει εντοπισθεί σε είδη άλλων γενών της οικογένειας Iridaceae, όπως είναι η περίπτωση του *Belamcanda chinensis* [417], αλλά και είδη που ανήκουν σε άλλες οικογένειες (π.χ. *Eriocaulon australe*, οικ. Eriocaulaceae / [450]). Μολονότι η ιριγενίνη έχει αξιολογηθεί σε διάφορες βιολογικές δοκιμασίες, δεν έχει επιδείξει αξιόλογη δραστηριότητα.

5.3.2.4. Μελέτη του κλάσματος 97-99 του FCPC-1 (C1F17)

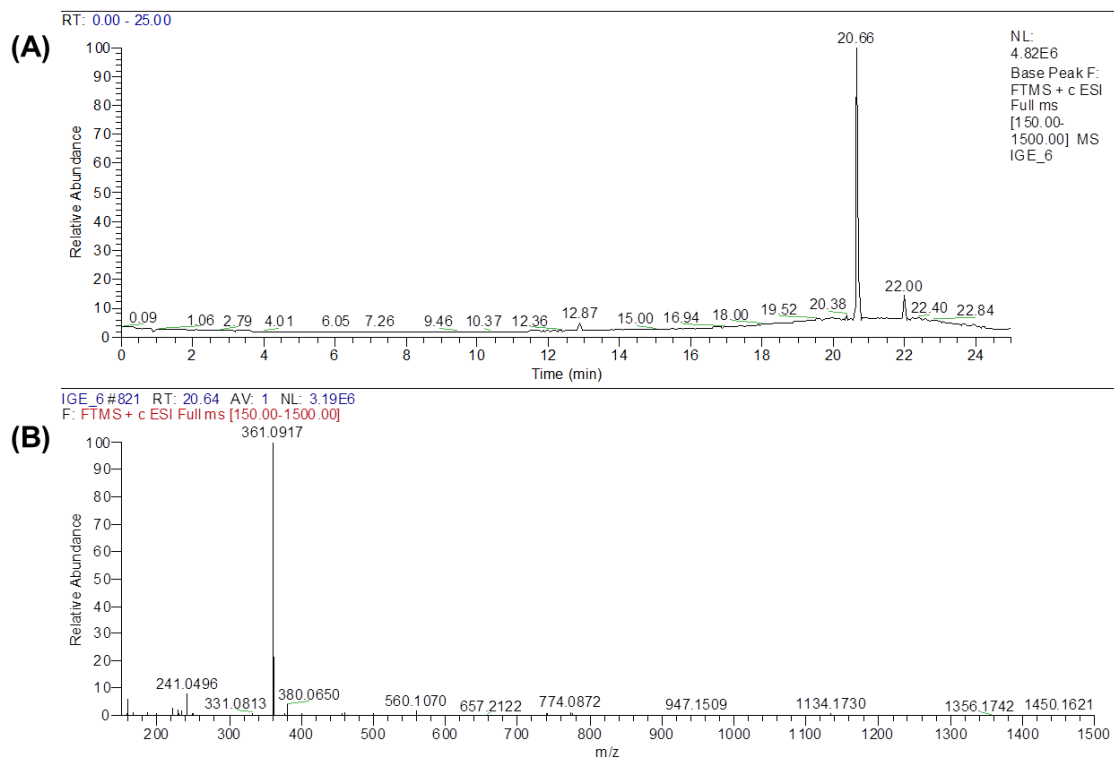
Το συγκεκριμένο κλάσμα του FCPC φαινόταν να περιέχει σε μεγάλο ποσοστό έναν μεταβολίτη, ο οποίος απορροφούσε έντονα στα 254nm και έδωσε υποκίτρινη κηλίδα μετά την εμφάνιση με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι πρόκειται για την 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνη (IGE-6, NC20), της οποίας η περιεκτικότητα στο κλάσμα υπολογίστηκε ότι είναι μεγαλύτερη από 70%.



Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης έχει ξαναταυτοποιηθεί στο εκχύλισμα IGE (IGE-20, NC20) και στη συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου και μάζας της ένωσης.



Εικόνα 5.16 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας IGE-6



Εικόνα 5.17 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-6 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.66$ min με $m/z=361.0917$, το οποίο αντιστοιχεί στα φυσικά προϊόντα **Ιριγενίνη (NC20)**

5.3.2.5. Μελέτη του κλάσματος 100-110 του FCPC-1 (C1F18)

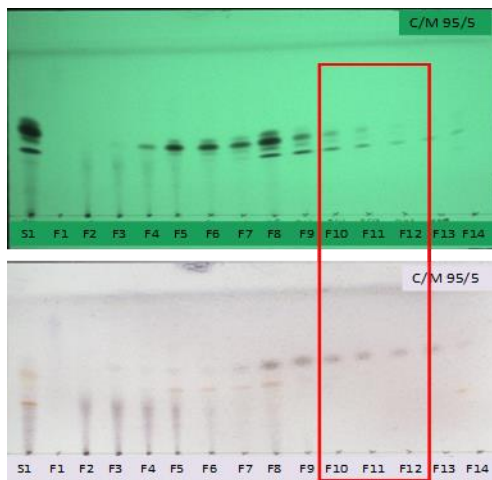
Το κλάσμα 100-110 (279 mg) παρουσίασε παρόμοια εικόνα στη χρωματογραφία TLC με το κλάσμα 97-99, καθώς και τα δύο φαίνεται να περιέχουν σε μεγάλη περιεκτικότητα μία φαινολική ουσία. Ωστόσο, επιλέχθηκε το κλάσμα 100-110 λόγω καλύτερης διαλυτότητας και κατ'επέκταση ευκολότερη επεξεργασία του με στήλη μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλέστερα (C1S5). Αναλύθηκαν περίπου 90 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 305 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν σε 15 κλάσματα, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1S5	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1S5F1	1-14	2.1
C1S5F2	15-23	4.1
C1S5F3	24-32	3.3
C1S5F4	33-40	3.2
C1S5F5	41-64	7.9
C1S5F6	65-68	3.3
C1S5F7	69-77	4.9
C1S5F8	78-210	31.8
C1S5F9	211-240	3.7
C1S5F10	241-258	2.7
C1S5F11	259-275	1.3
C1S5F12	276-286	1.0
C1S5F13	287-302	1.2
C1S5F14	304	2.3
C1S5F15	305	1.3

Πίνακας 5.15 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F18 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S5)

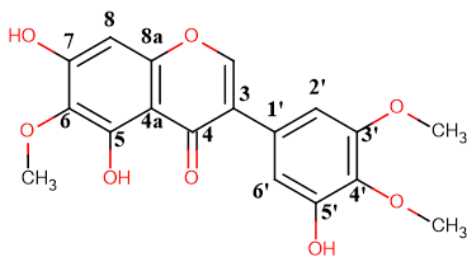
Τα κλάσματα που προέκυψαν μελετήθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος και σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂/MeOH 95/5 και από το χρωματογράφημα καταλήξαμε στην περαιτέρω συνένωση των κλασμάτων C1S5F5 - C1S5F7 και C1S5F10 - C1S5F12.

Στο χρωματογράφημα τα κλάσματα C1S5F5 - C1S5F7 φάνηκε να περιέχουν έναν κύριο μεταβολίτη **IGE-20**, ο οποίος απορροφούσε στα 254 nm και έδωσε πορτοκαλί-καφέ χρώση μετά από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος έδειξε ότι πρόκειται για την 6,4',5'-τριμεθοξυ-5,7,3'-τριϋδροξυισοφλαβόνη (**NC20**) ή ιριγενίνη, της οποίας η καθαρότητα υπολογίστηκε ότι είναι μεγαλύτερη του 90%.



Στο ίδιο χρωματογράφημα TLC διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα C1S5F10 - C1S5F12 περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό έναν μεταβολίτη, ο οποίος δεν παρουσιάζει απορρόφηση στα 254 nm, ενώ χρωματίζεται καφέ-γκρι με θειϊκή βανιλίνη, αλλά και άλλον ένα, ο οποίος απορροφά στα 254 nm. Ωστόσο, η φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος έδειξε ότι πρόκειται για μίγμα των φυσικών προϊόντων 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη (**IGE-21, NC21**) και 6, 4',5'-τριμεθοξυ-5,7,3'-τριϋδροξυισοφλαβόνη (**IGE-20, NC20**) σε αναλογία 60/40. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων NC20 (**IGE-20**) από το κλάσμα C1S5F5 - C1S5F7 και NC21 (**IGE-21**) από το κλάσμα C1S5F10 - C1S5F12.

- 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριϋδροξυισοφλαβόνη (**IGE-20, NC20**)

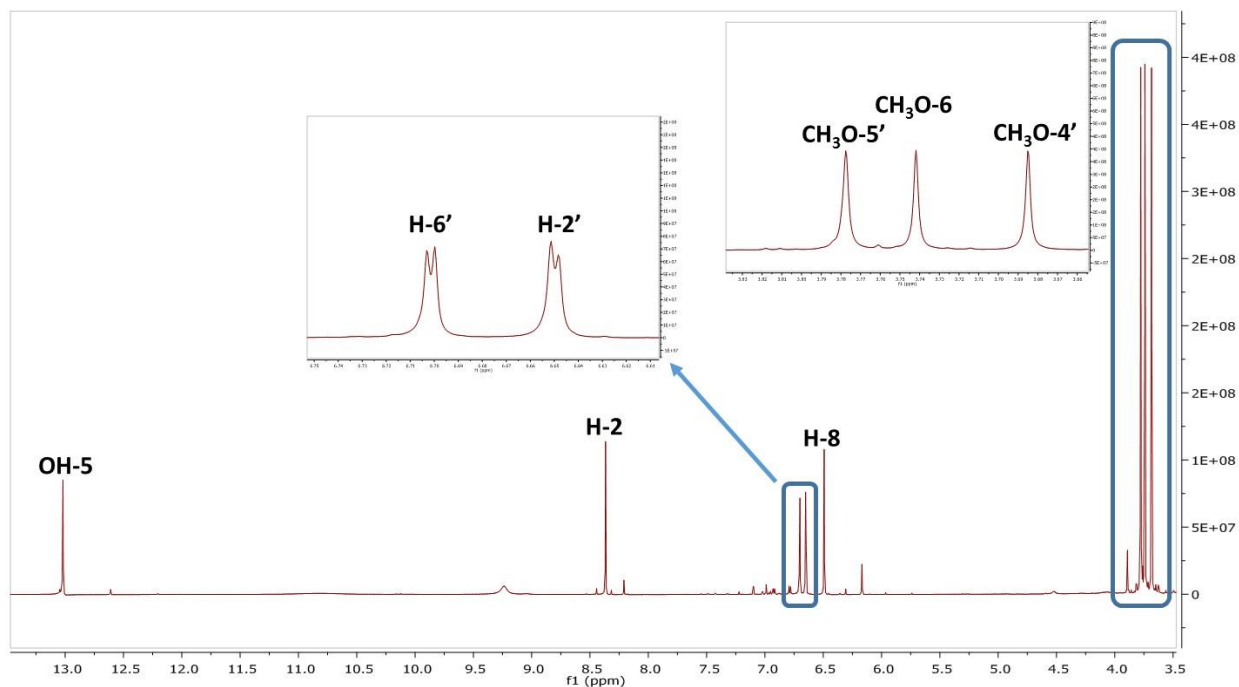


IGE-20 (NC20)

Παρατηρείται η χαρακτηριστική απλή κορυφή της ισοφλαβόνης **IGE-20**, στα 8.05 ppm (1H, s) του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ και στα 154.6 ppm του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, η οποία αντιστοιχεί στο μεθίνιο της θέσεως 2.

Άλλα χαρακτηριστικά φασματοσκοπικά σήματα (Εικόνα 5.18) είναι τα ακόλουθα:

- Το πρωτόνιο H-8 εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε δ 6.49 και ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.9 ppm
- Τα πρωτόνια H-2' και H-6', τα οποία δεν είναι ισοδύναμα λόγω της διαφορετικής υποκατάστασης στις θέσεις 3' και 5' του δακτυλίου B, εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.70 (1H, d, $J = 1.9$) και 6.65 (1H, d, $J = 1.9$), αντίστοιχα
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 3.78, 3.74 και 3.64, οι απλές ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία, αποδίδονται στα μεθοξύλια των θέσεων 5', 6 και 4'.



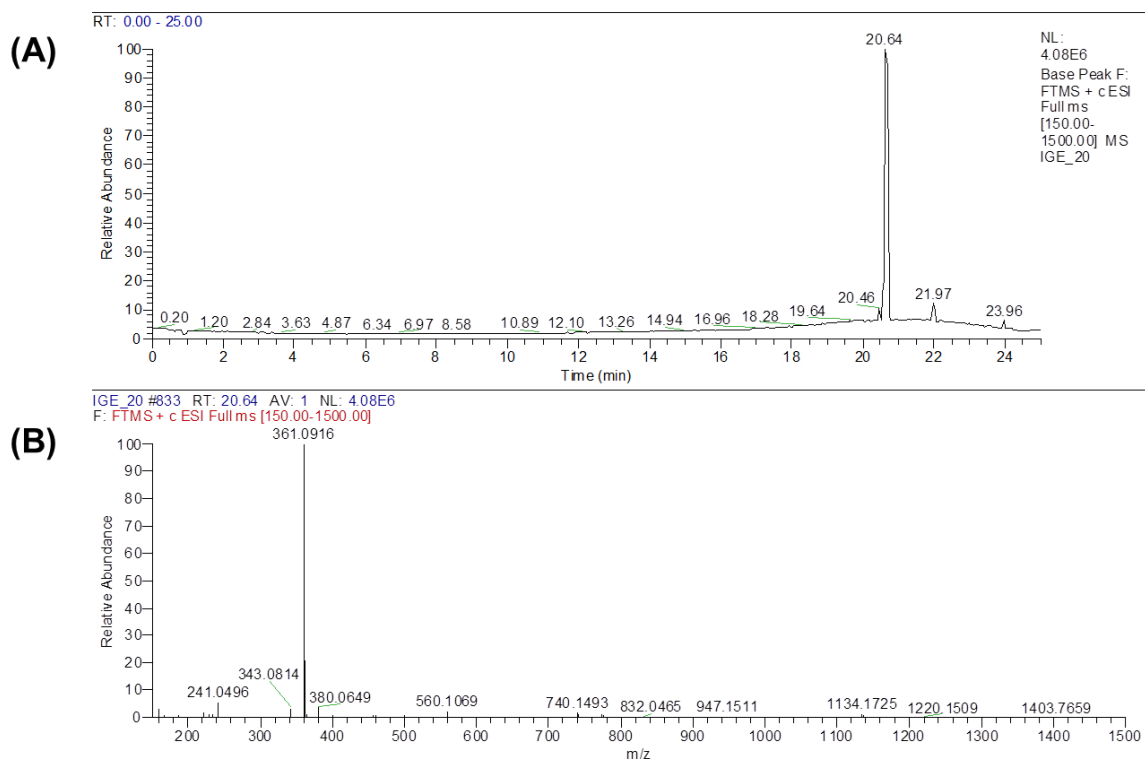
Εικόνα 5.18 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-20

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε DMSO	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε DMSO
2	8.05 (1H, s)	154.6
3	-	122.2
4	-	180.4
4a	-	105.3

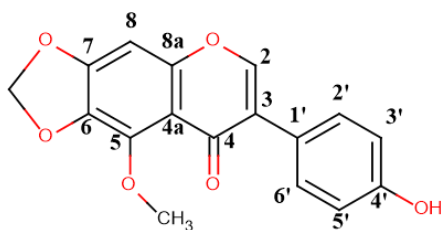
5	-	153.6
6	-	131.5
7	-	158.0
8	6.49 (1H, s)	93.9
8a	-	152.7
1'	-	126.3
2'	6.70 (1H, d, $J = 1.9$)	110.2
3'	-	150.7
4'	-	136.6
5'	-	152.9
6'	6.65 (1H, d, $J = 1.9$)	104.4
OH-5	13.02 (1H, s)	-
CH₃O-6	3.74 (3H, s)	59.7
CH₃O-4'	3.68 (3H, s)	59.7
CH₃O-5'	3.78 (3H, s)	55.6

Πίνακας 5.16 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-20



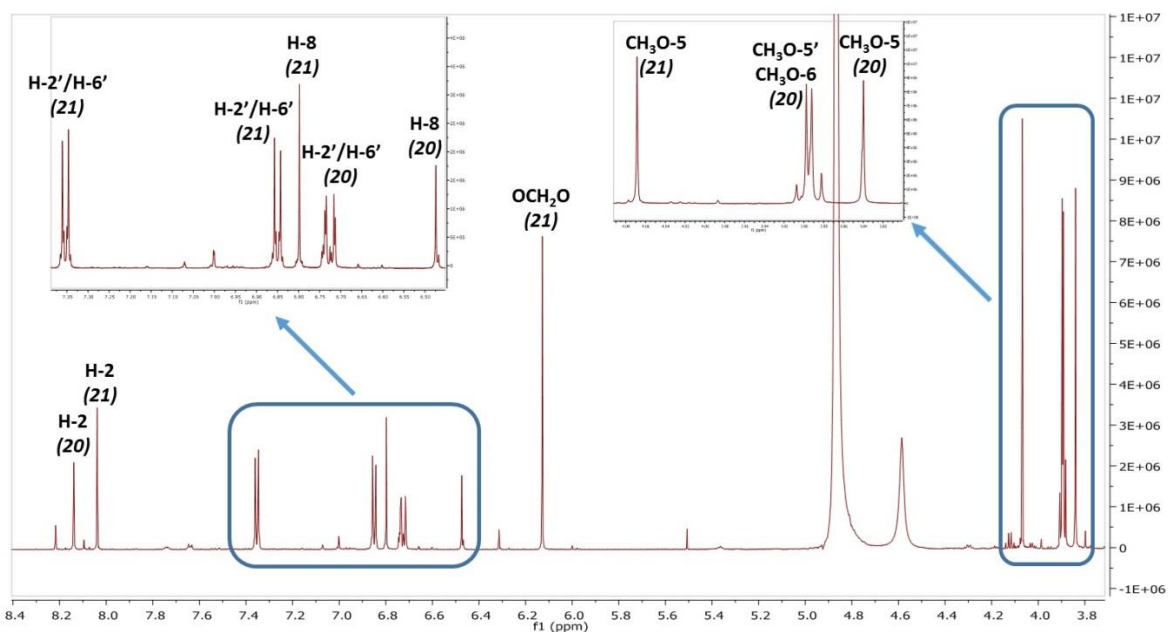
Εικόνα 5.19 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE_20 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.64$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.64$ min με $m/z=361.0916$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριγενίνη (NC20)**

- 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη (IGE-21, NC21)



IGE-21 (NC21)

Η ισοφλαβόνη **IGE-21** ταυτοποιήθηκε στο μίγμα της με την ένωση **IGE-20** (Εικόνα 5.20), με την οποία παρουσιάζει αρκετές δομικές και φασματοσκοπικές ομοιότητες. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται σε δ 8.04 η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-2, ενώ ο αντίστοιχος μεθινικός άνθρακας συντονίζεται στα 153.0 ppm. Επίσης, σε δ 6.80 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-8 ως απλή κορυφή, ενώ η κύρια διαφοροποίηση έγκειται στο γεγονός ότι ο δακτύλιος B παρουσιάζει π-υποκατάσταση και επομένως τα τέσσερα αρωματικά πρωτονία του εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές, σε δ 7.35 (2H, d, $J = 8.2$) και 6.85 (2H, d, $J = 8.2$), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία. Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι η απλή κορυφή στα 6.13 ppm η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθυλενοδιοξυ- ομάδα των θέσεων 6 και 7 του δακτυλίου A.

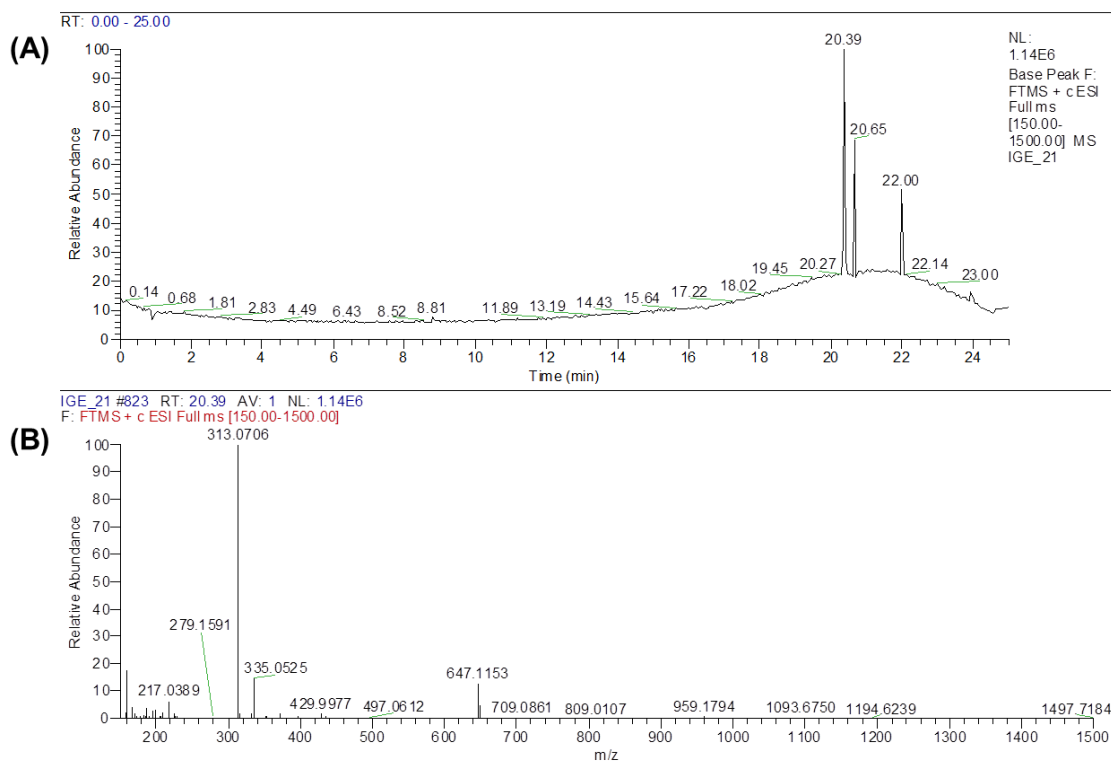


Εικόνα 5.20 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος των ουσιών IGE-20 και IGE-21

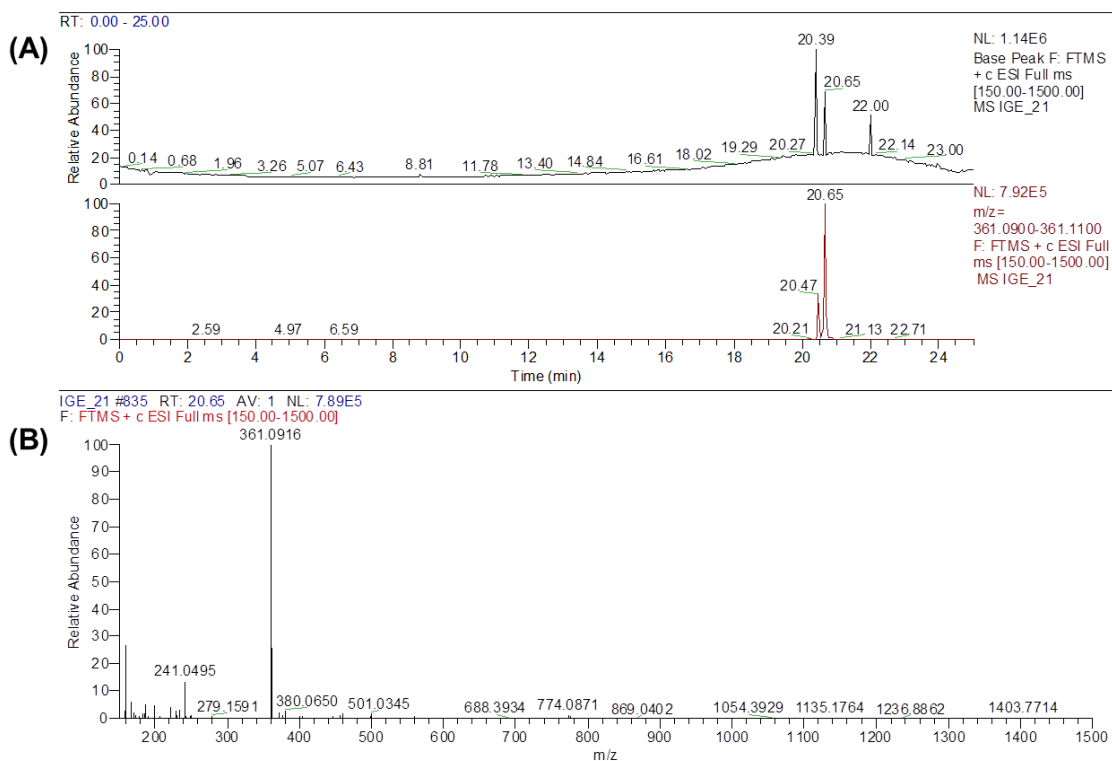
Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε MeOD	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε MeOD
2	8.04 (1H, s)	153.0
3	-	127.3
4	-	178.5
4a	-	114.6
5	-	143.0
6	-	137.2
7	-	155.5
8	6.80 (1H, s)	94.2
8a	-	156.8
1'	-	124.8
2'/6'	7.35 (2H, d, $J = 8.2$)	131.8
3'/5'	6.85 (2H, d, $J = 8.2$)	116.4
4'	-	159.2
OCH ₂ O	6.13 (2H, s)	104.2
CH ₃ O-5	4.07 (3H, s)	61.5

Πίνακας 5.17 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-21



Εικόνα 5.21 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.39$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.39$ min με $m/z=313.0706$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισολόνη (NC21)**



Εικόνα 5.22 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μ g/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.65$ min με $m/z=361.0916$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριγενίνη (NC20)**

Η 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη ή ιρισολόνη (**NC21**), έχει απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. florentina* [411, 412], *I. kashmiriana* [451], *I. rotaninii* [416] και *I. germanica* [128]. Επίσης, έχει εντοπισθεί σε είδη άλλων γενών της οικογένειας Iridaceae, όπως είναι η περίπτωση του *Belamcanda chinensis* [452], αλλά και είδη που ανήκουν σε άλλες οικογένειες (π.χ. *Lindelofia stylosa* / [453]). Μελέτη του κλάσματος 115-118 του FCPC (C1F20)

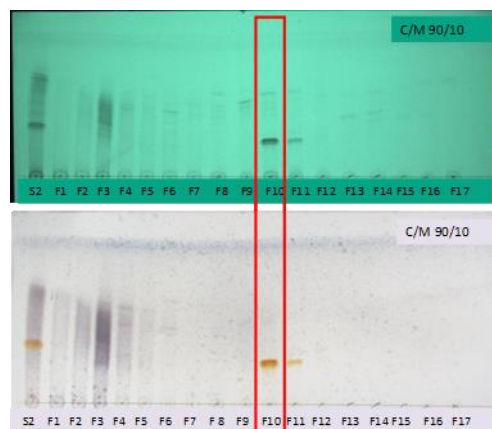
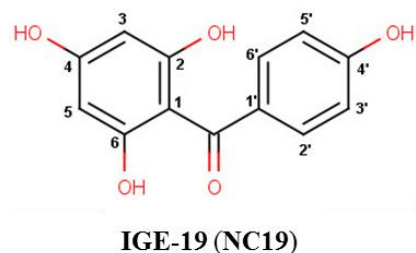
Το κλάσμα 115-118 (126,5 mg) παρουσίασε στη TLC, μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης της θειϊκής βανιλίνης, μία έντονα πορτοκαλί χρώση, γεγονός που ερμηνεύτηκε ως ύπαρξη κάποιου φαινολικού παραγώγου. Για την παραλαβή αυτού του μεταβολίτη σε καθαρή μορφή, περίπου 100 mg του κλάσματος επεξεργάστηκαν σε στήλη μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη

(C1S4). Ύστερα από συλλογή 228 κλασμάτων και χρωματογραφική ανάλυση, καταλήξαμε σε 17 συνενωμένα κλάσματα.

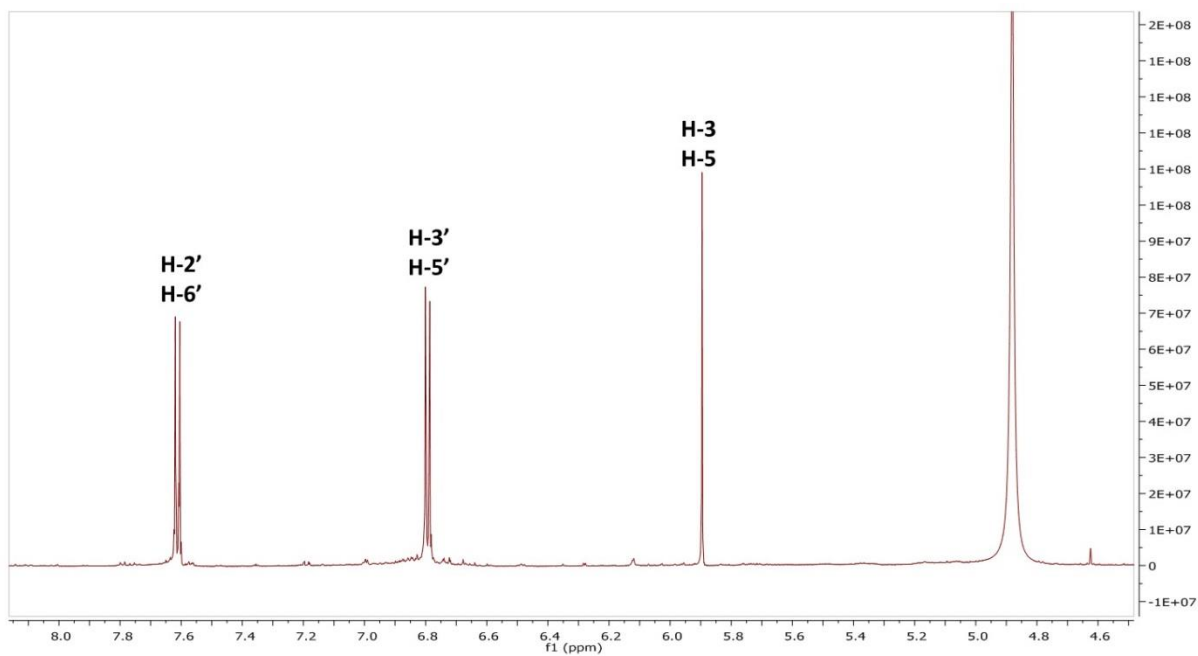
ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1S4	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1S4F1	1-41	8.4
C1S4F2	42-60	15.2
C1S4F3	61-71	22.9
C1S4F4	72-79	8.7
C1S4F5	80-92	7.1
C1S4F6	93-103	3.9
C1S4F7	104-112	2.2
C1S4F8	113-126	2.9
C1S4F9	127-135	2.1
C1S4F10	136-153	15.8
C1S4F11	154-161	4.8
C1S4F12	162-183	5.0
C1S4F13	184-190	1.5
C1S4F14	191-205	1.8
C1S4F15	206-212	1.0
C1S4F16	213-226	1.7
C1S4F17	227-228	2.6

Πίνακας 5.18 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F20 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S4)

Τα προαναφερόμενα κλάσματα αξιολογήθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος και σύστημα διαλυτών ανάπτυξης CH₂Cl₂/MeOH 90/10. Το κλάσμα C1S4F10 (136-153) περιείχε σε καθαρή μορφή τον κύριο μεταβολίτη του επεξεργασμένου δείγματος, ο οποίος με τη βοήθεια φασματοσκοπικών μεθόδων, αποδείχθηκε πως είναι η Ιριφλοφαινόνη (**IGE-19, NC19**), η οποία αποτελεί παράγωγο βενζοφαινόνης.



Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές του π-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα σε δ 7.61 (2H, d, $J = 1.9$) και 6.79 (2H, d, $J = 1.9$), ενώ τα πρωτόνια H-3 και H-5, ως ισοδύναμα δίνουν κοινή κορυφή στα 5.89 ppm.



Εικόνα 5.23 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-19

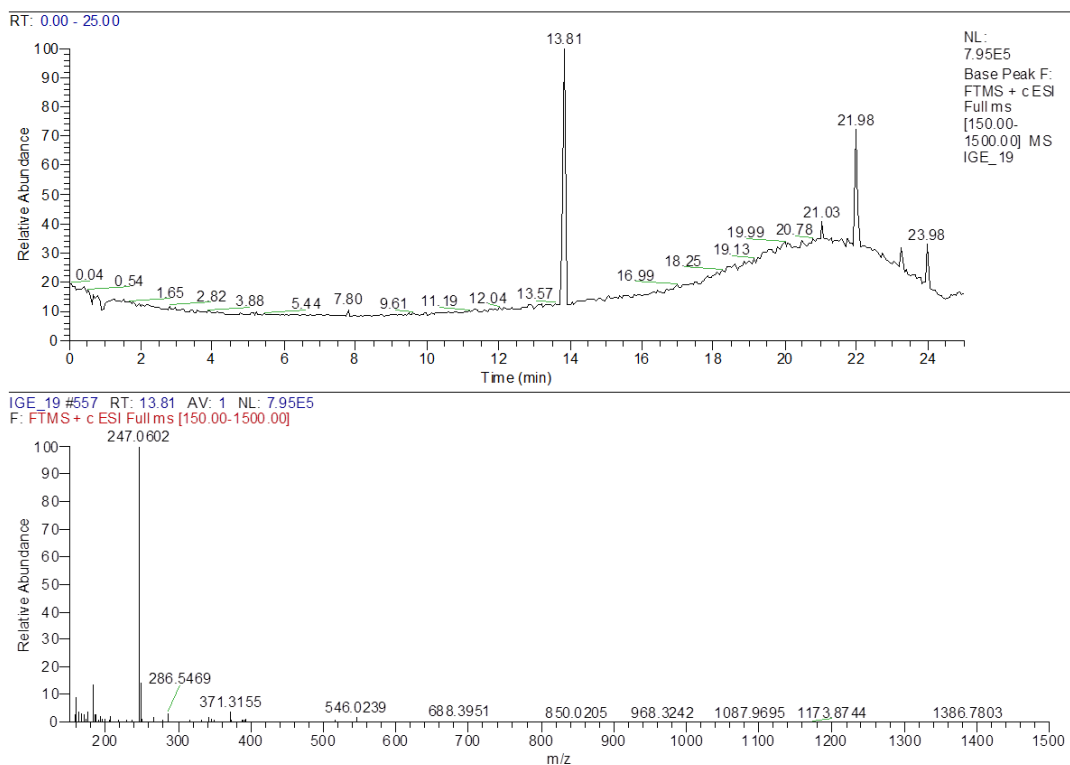
Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο

μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια, ενώ σημειώνεται πως τα φασματικά δεδομένα (Πίνακας 5.19) ταιριάζουν με όσα έχουν δημοσιεύσει οι Hara *et al.*, το 2008 [454].

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε MeOD	¹³ C NMR (δ) σε MeOD
1	-	107.4
2/6		165.0
3/5	5.89 (2H, s)	96.3
4	-	163.0
7	-	199.5
1'	-	133.8
2'/6'	7.61 (2H, d, $J = 1.9$)	133.3
3'/5'	6.79 (2H, d, $J = 1.9$)	116.0
4'	-	163.3

Πίνακας 5.19 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-19

Η ιριφλοφαινόνη έχει απομονωθεί και από τα ριζώματα των ειδών *Iris germanica* [455], *Iris florentina* [412], *Iris potaninii* [416] και *Aquilaria sinensis* [456]. Συνήθως απαντάται με τη μορφή γλυκοσιδών, ενώ πρόσφατες μελέτες την αναδεικνύουν ως αναστολέα της α -γλυκοσιδάσης *in vitro* [457]. Επίσης, έχει αναφερθεί η επίδραση της ιριφλοφαινόνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών σειρών μαστού MCF-7 και T-47D [421].



Εικόνα 5.24 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-19 επιπέδου συγκέντρωσης 1 µg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=13.81$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=13.81$ min με $m/z=247.0602$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριφλοφαινόνη (NC19)**

5.3.2.6. Μελέτη του κλάσματος 149-150 του FCPC-1 (C1F26)

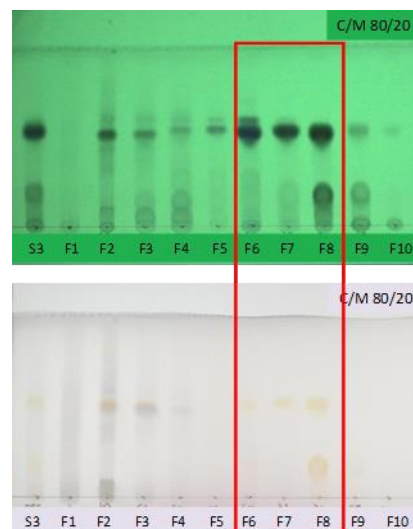
Το κλάσμα 149-150 (102,4 mg) παρουσίασε μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικά παράγωγα. Έτσι, για την παραλαβή τους σε καθαρή μορφή, επεξεργάστηκαν 90 mg περαιτέρω σε στήλη μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C1S1). Αρχικά συλλέχθηκαν 98 κλάσματα και με τη βοήθεια του χρωματογραφικού ελέγχου προέκυψαν τελικά 10 συνεχόμενα κλάσματα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ <u>C1S1</u>	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1S1F1	1-46	6.7
C1S1F2	47-52	7.2
C1S1F3	53-55	4.1
C1S1F4	56-61	6.1
C1S1F5	62-63	1.9
C1S1F6	64-72	18.2
C1S1F7	73-75	7.1
C1S1F8	76-88	28.2
C1S1F9	89-96	5.4
C1S1F10	97-98	5.4

Πίνακας 5.20 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F26 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S1)

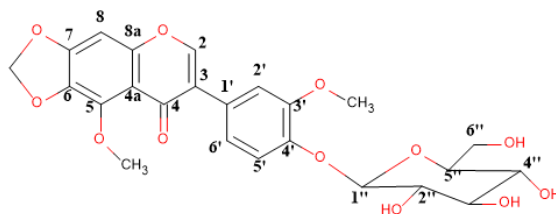
Το κλάσμα C1S1F6 επεξεργάστηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (Preparative TLC). Έτσι, 20 mg του δείγματος διαλύθηκαν σε μεθανόλη και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με τη συσκευή CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα CH₂Cl₂/MeOH 85/15, παραλήφθηκαν τρεις ζώνες (A, B, C).

Μετά τη φασματοσκοπική μελέτη των ζωνών που παρελήφθησαν, καταλήξαμε στην ταυτοποίηση του 4'-Ο-γλυκοσίδη της 3',5-διμεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-12**, **NC12**) καθαρότητας ~50% από τη ζώνη A, του 4'-Ο-γλυκοσίδη της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-13**, **NC13**) καθαρότητας >90%



από τη ζώνη B και του 7-*O*-γλυκοσίδη της 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνης (**IGE-13a, NC25**), του οποίου η περιεκτικότητα στη ζώνη C ήταν ~40%.

- 4'-*O*-γλυκοσίδη της 3',5-διμεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-12, NC12**)



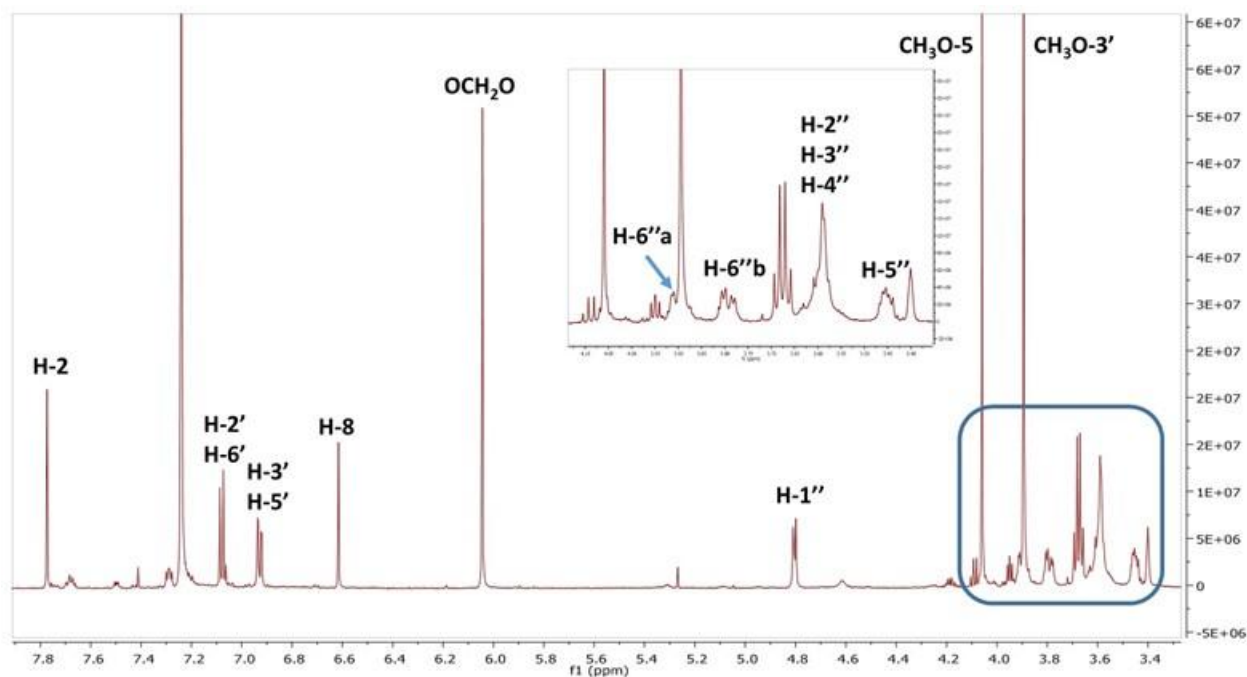
IGE-12 (NC12)

Στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC η ουσία **IGE-12** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm, ενώ έδωσε υποκίτρινη χρώση μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης. Τα φασματοσκοπικά της δεδομένα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα αντίστοιχα δεδομένα του μεταβολίτη **IGE-2**. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα ¹H-NMR (Εικόνα 2.25) εμφανίζεται μία χαρακτηριστική απλή κορυφή σε δ 7.77, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 150.7 ppm. Τα προαναφερόμενα σήματα αντιστοιχούν στο μεθίνιο της θέσεως 2 του δακτυλίου C της ισοφλαβόνης. Άλλα χαρακτηριστικά σήματα τα οποία εμφανίζονται στο φάσμα ¹H-NMR είναι τα ακόλουθα:

- σε δ 6.61 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.7 ppm
- Τα πρωτόνια H-2', H-5' και H-6' αποτελούν ένα ABX τρισυποκατεστημένο αρωματικό σύστημα και εμφανίζονται σε δ 7.24 (επικάλυψη από το σήμα του διαλύτη), 7.08 (1H, d, $J = 8.2$) και 6.93 (1H, dd, $J = 8.2 / 2.0$), αντίστοιχα
- Σε δ 4.06 και 3.89 εμφανίζονται δύο απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στις μεθοξυλομάδες των θέσεων 5 και 3'
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.04 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 101.9.

Ωστόσο, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται μια σειρά από κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του σακχάρου. Το ανωμερικό πρωτόνιο συντονίζεται σε δ 4.80 (1H, d, $J = 7.0$), ενώ αλληλεπικάλυψη παρατηρήθηκε μεταξύ των σημάτων που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2'', H-3'' και H-4''. Τέλος, τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως 6'' εμφανίζονται σε δ 3.92 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$) και 3.79 (1H, dd, $J = 12.2 / 4.8$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 61.9.

Ο άνθρακας στα 145.8 ppm (C-4') παρουσιάζει σύζευξη 3J , τόσο με τα πρωτόνια H-2' και H-6', όσο και με το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου (HMBC), γεγονός που υποδηλώνει τη θέση σύνδεσης της γλυκόζης στη γενίνη.

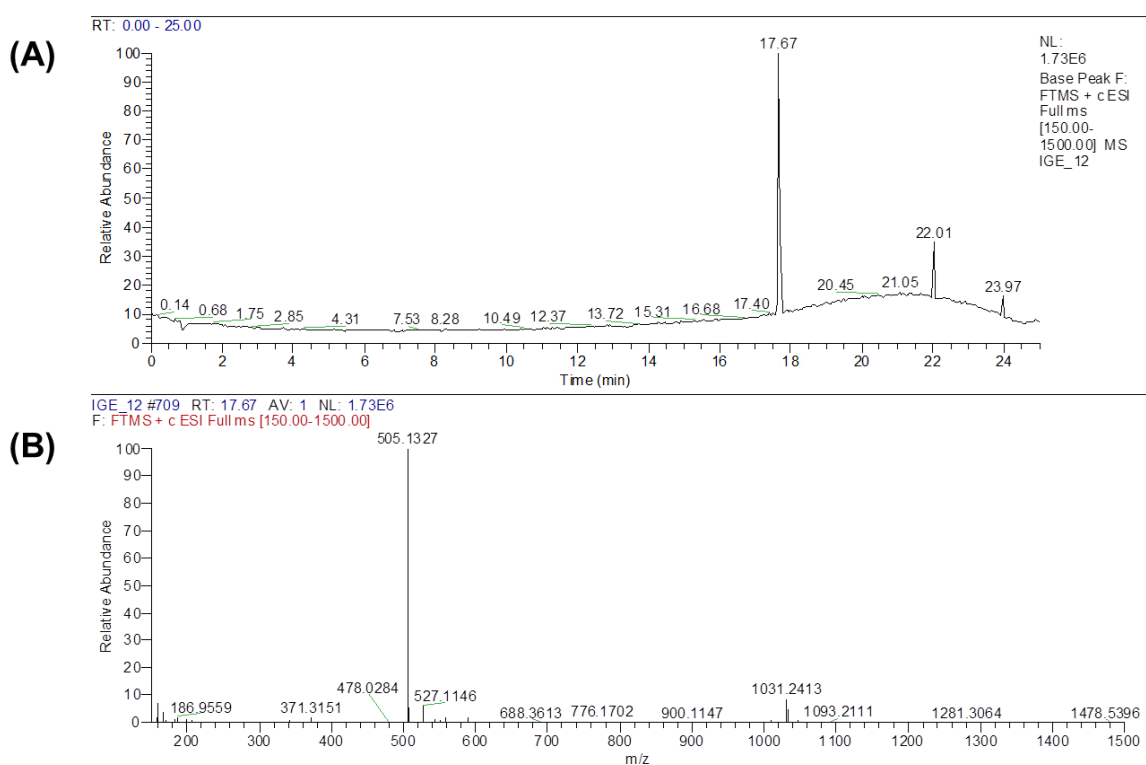


Εικόνα 5.25 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-12

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε CDCl ₃	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
2	7.77 (1H, s)	150.7
3	-	127.5
4	-	175.3
4a	-	113.4
5	-	141.3
6	-	135.4
7	-	153.2
8	6.61 (1H, s)	92.7
8a	-	154.2
1'	-	124.9
2'	7.24 *	115.2
3'	-	149.2
4'	-	145.8
5'	7.08 (1H, d, $J = 8.2$)	121.6
6'	6.93 (1H, dd, $J = 8.2 / 2.0$)	117.8
1''	4.80 (1H, d, $J = 7.0$)	102.5
2''	3.62*	69.7
3''	3.62*	73.1
4''	3.62*	76.0
5''	3.46 (1H, m)	75.6
6''	3.92 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$) / 3.79 (1H, dd, $J = 12.2 / 4.8$)	61.9
CH₃O-3'	3.89 (3H, s)	56.4
CH₃O-5	4.06 (3H, s)	61.3
OCH₂O	6.04 (2H, s)	101.9

Πίνακας 5.21 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE12



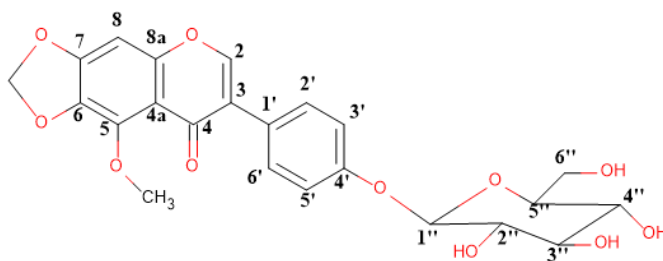
Εικόνα 5.26 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-12 επιπέδου συγκέντρωσης 1 µg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.67$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.67$ min με $m/z=505.1327$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Germanaism-A (NC12)**

Η απομόνωση του 4'-*O*-γλυκοσίδη της 3',5-διμεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (Germanaism-A) από τα ριζώματα του είδους *Iris germanica* έχει αναφερθεί στο παρελθόν [210], ενώ φάνηκε να δρα κυτταροτοξικά σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος “Ehrlich's ascites carcinoma” [458].

- 4'-O-γλυκοσίδη της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (IGE13, NC13)

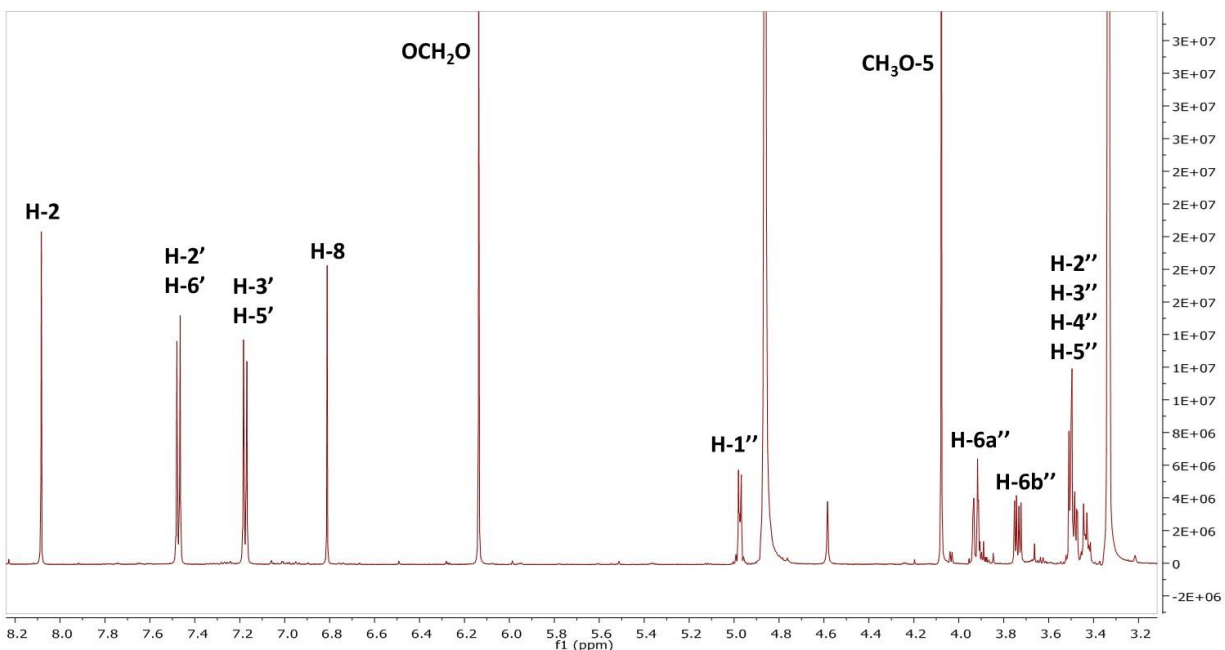
Η ένωση **IGE-13** παρουσιάζει ίδια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με το μεταβολίτη **IGE-12**, ενώ όσον αφορά τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.27) εμφανίζονται ανάλογα σήματα και πιο συγκεκριμένα:

- σε δ 7.79 εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2 ως απλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 150.8 ppm
- Σε δ 6.63 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.5 ppm
- Σε δ 4.08 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσεως 5
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.07 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 102.1
- Στην οξυγονωμένη περιοχή των φασμάτων εμφανίζονται τα σήματα της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 4' της γενίνης και πιο συγκεκριμένα: (i) σε δ 4.99 (1H, d, $J = 8.0$) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.5 ppm, (ii) στα 3.66 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια H-2'', H-3'' και H-4'', ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 70.1, 73.5 και 76.2, (iii) στα 3.51 ppm του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή και ένα σήμα σε δ 75.9 του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, τα οποία αντιστοιχούν στο μεθίνιο της θέσεως 5 του σακχάρου και, (iv) τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται σε δ 3.92 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$) και 3.82 (1H, dd, $J = 12.2 / 4.8$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 62.2.



IGE-13 (NC13)

Η κύρια διαφορά στα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων **IGE-13** και **IGE-12** σχετίζεται με τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου B, εξαιτίας του γεγονότος ότι στο μεταβολίτη **IGE-13** παρατηρείται π-υποκατάσταση. Έτσι, τα τέσσερα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης $J = 8$ Hz, από τις οποίες η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια H-2'/H-6' εμφανίζονται σε δ 7.48 και τα πρωτόνια H-3'/H-5' σε δ 7.08, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 130.7 και 116.7, αντίστοιχα. Η θέση σύνδεσης του σακχάρου στη γενίνη επιβεβαιώθηκε μέσω της 3J σύζευξης του άνθρακα C-4', τόσο με τα πρωτόνια H-2'/H-6', όσο και με το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης.

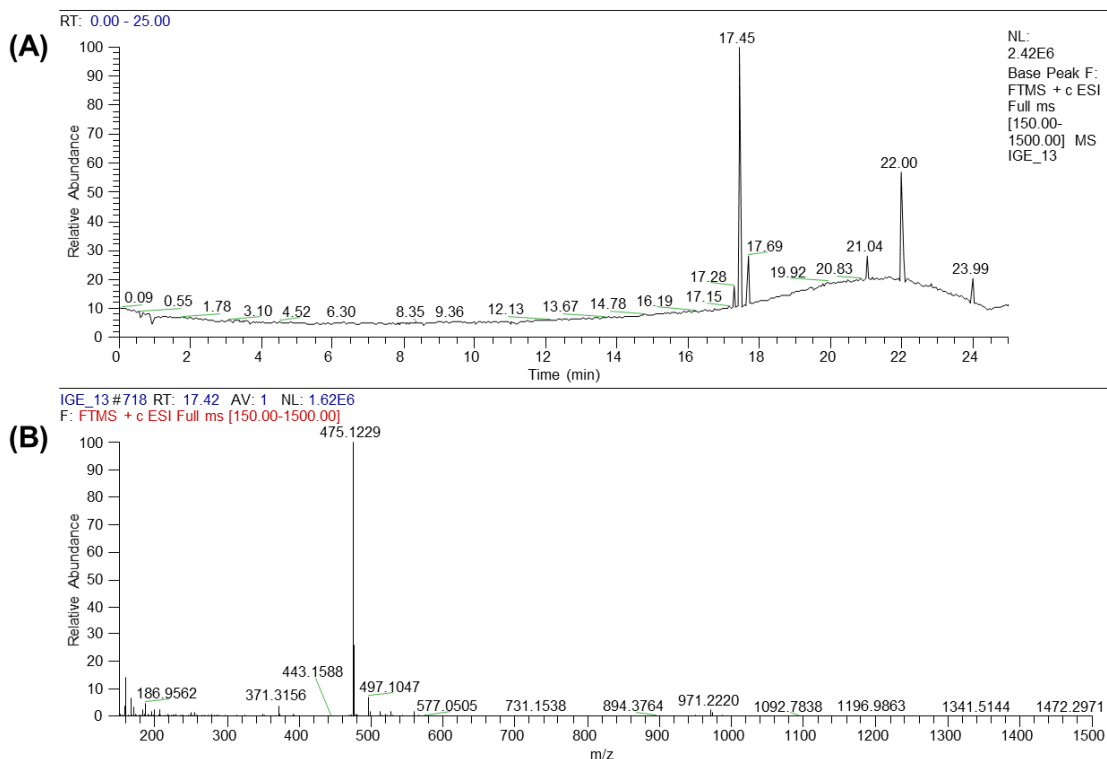


Εικόνα 5.27 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-13

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε CDCl ₃	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε MeOD	¹³ C NMR (δ) σε CDCl ₃
2	7.79 (1H, s)	8.08 (1H, s)	150.8
3	-	-	125.2
4	-	-	175.6
4a	-	-	113.5
5	-	-	141.9
6	-	-	135.6
7	-	-	153.1
8	6.63 (1H, s)	6.81 (1H, s)	93.5
8a	-	-	154.8
1'	-	-	126.4
2'/6'	7.48 (2H, d, J = 8.0)	7.47 (2H, d, J = 8.8)	130.7
3'/5'	7.08 (2H, d, J = 8.0)	7.17 (2H, d, J = 8.8)	116.7
4'	-	-	156.9
1''	4.99 (1H, d, J = 8.0)	4.97 (1H, d, J = 7.9)	100.5
2''	3.66*	3.50-3.48*	70.1
3''	3.66*	3.50-3.48*	73.5
4''	3.66*	3.50-3.48*	76.2
5''	3.51 (1H, m)	3.44 (1H, m)	75.9
6''	3.92 (1H, dd, J = 12.2 / 2.4) 3.82 (1H, dd, J = 12.2 / 4.8)	3.93 (1H, dd, J = 12.2 / 2.1) 3.74 (1H, dd, J = 12.2 / 5.6)	62.2
CH ₃ O-5	4.08 (3H, s)	4.09 (3H, s)	61.2
OCH ₂ O	6.07 (2H, s)	6.14 (2H, s)	102.1

Πίνακας 5.22 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE13



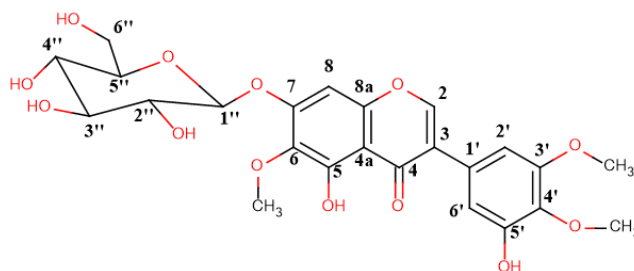
Εικόνα 5.28 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.45$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.45$ min με $m/z=475.1229$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Germanaism-B (NC13)**

Η απομόνωση του 4'-O-γλυκοσίδη της ιρισολόνης (5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης), ή “Germanaism B”, όπως είναι γνωστή, έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα ριζώματα του είδους *Iris germanica* [210] και άλλα είδη του γένους *Iris* (π.χ. *I. pseudorumila* / [459]). Επίσης, η αντιοξειδωτική [459], η νευροπροστατευτική [460] και η κυτταροτοξική δράση της σε καρκινικά κύτταρα “Ehrlich's ascites carcinoma” [458] έχει αξιολογηθεί και έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια.

- 7-O-γλυκοσίδης της 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνης (IGE-13a, NC25)

Η ισοφλαβόνη **IGE-13a**, η οποία ταυτοποιήθηκε σε μίγμα με τον προαναφερόμενο μεταβολίτη (**IGE-13**), όπου η περιεκτικότητά της ήταν περίπου 40%, αποτελεί γλυκοσιδικό παράγωγο του μεταβολίτη **IGE-20** και έτσι εξηγείται η ομοιότητα στα σήματα του φάσματος ¹H-NMR (Εικόνα 5.29), που αντιστοιχούν στη γενίνη, με τα αντίστοιχα της ένωσης **IGE-20**. Πιο συγκεκριμένα:

- το πρωτόνιο H-8 εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε δ 6.64 και ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 93.5 ppm. Η μικρή αποθωράκιση του πρωτονίου, σε σύγκριση με το αντίστοιχο του μεταβολίτη **IGE-20** δικαιολογείται από την παρουσία της γλυκόζης στη γειτονική θέση (C-7)
- Τα πρωτόνια H-2' και H-6', τα οποία δεν είναι ισοδύναμα λόγω της διαφορετικής υποκατάστασης στις θέσεις 3' και 5' του δακτυλίου B, εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.71 (1H, d, *J* = 1.9) και 6.69 (1H, d, *J* = 1.9), αντίστοιχα
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 3.97, 3.92 και 3.94, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία, αποδίδονται στα μεθοξύλια των θέσεων 6, 4' και 2'.

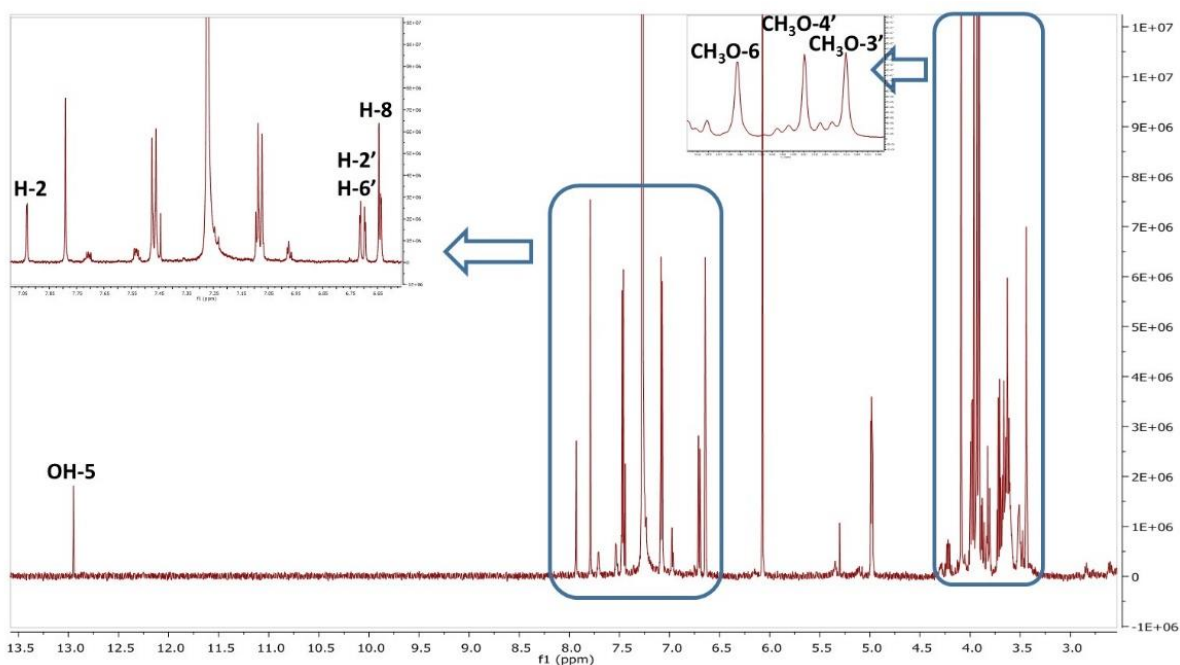


IGE-13a (NC25)

Όσον αφορά το γλυκοσιδικό μέρος της ένωσης, παρατηρούνται αντίστοιχα σήματα με αυτά που προαναφέρθηκαν για το μεταβολίτη **IGE-13**: (i) σε δ 4.99 (1H, d, *J* = 8.0) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.7 ppm, (ii) στην περιοχή 3.70-3.60 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια H-2'', H-3'' και H-4'', ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 70.0, 73.5 και 76.2, (iii) στα 3.51 ppm του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή και ένα σήμα σε δ 75.9 του φάσματος ¹³C-NMR, τα οποία αντιστοιχούν στο μεθίνιο της θέσεως 5 του σακχάρου, και (iv) τα μεθυλενικά πρωτόνια

εμφανίζονται σε δ 3.96 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$) και 3.87 (1H, dd, $J = 12.2 / 4.8$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συτονίζεται σε δ 62.2.

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

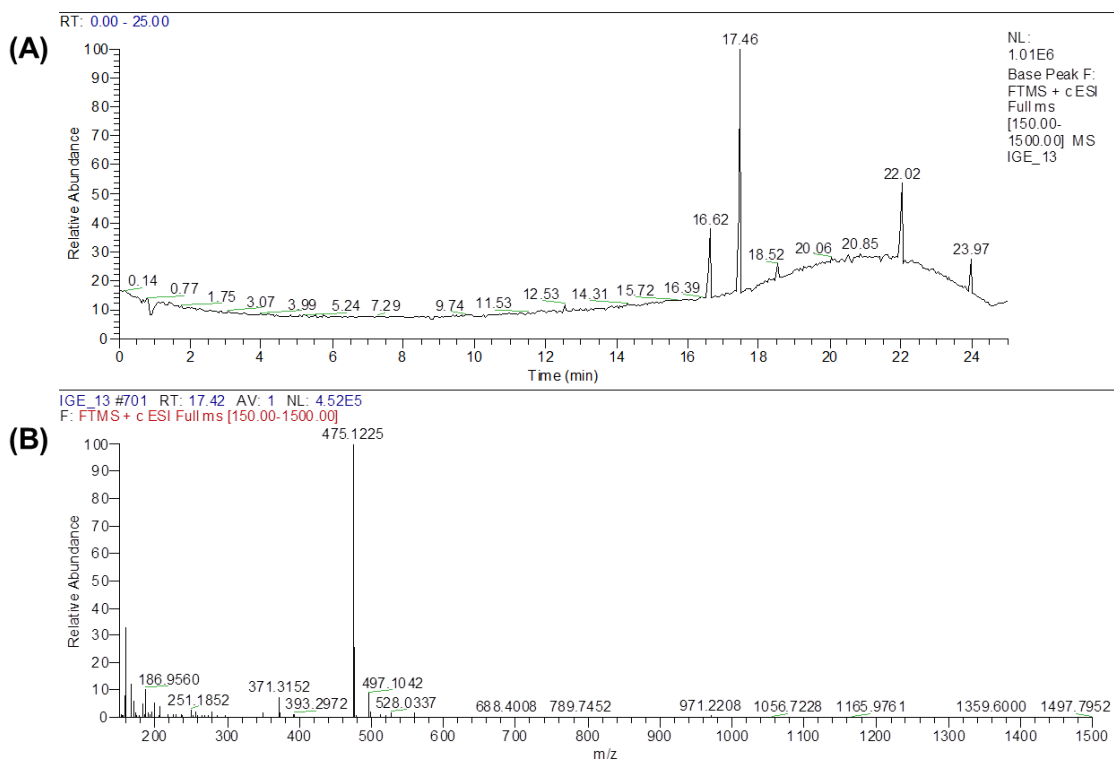


Εικόνα 5.29 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος των ενώσεων IGE-13 και IGE-13a

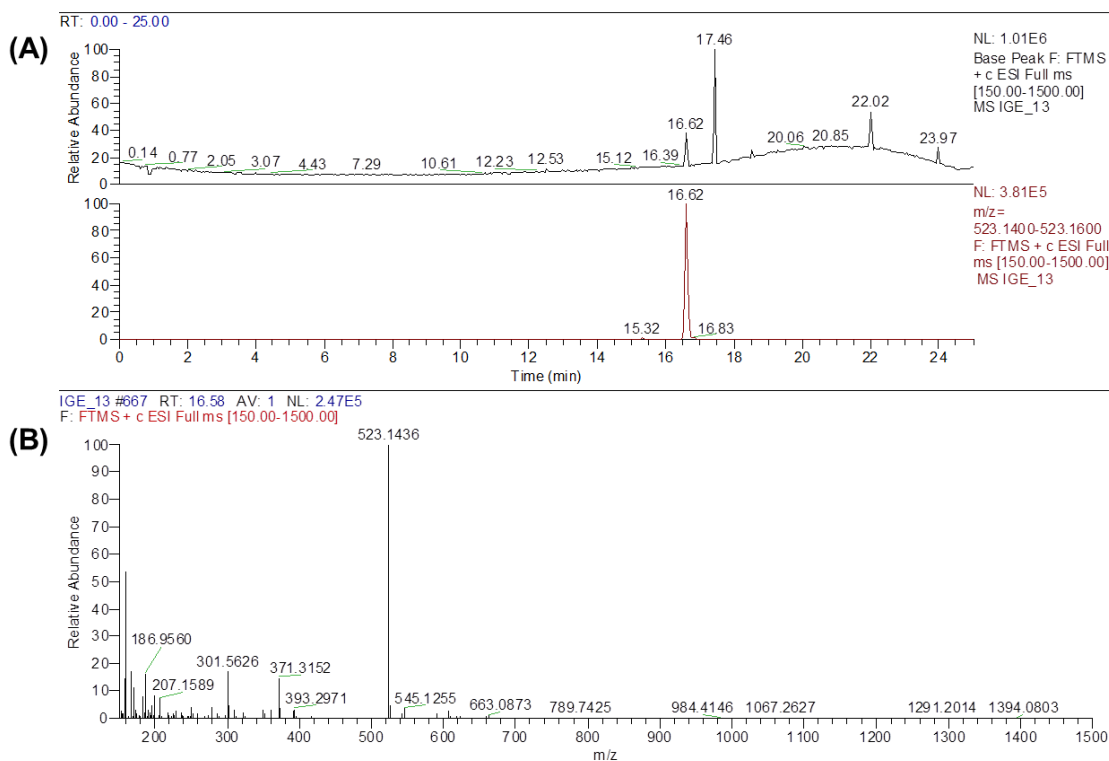
Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε CDCl_3	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε CDCl_3
2	7.93 (1H, s)	153.7
3	-	123.7
4	-	180.7
4a	-	107.8
5	-	143.4
6	-	132.6
7	-	155.8
8	6.64 (1H, s)	93.5
8a	-	153.2
1'	-	126.2
2'	6.71 (1H, d, $J = 1.8$)	105.6
3'	-	152.7

4'	-	136.1
5'	-	
6'	6.69 (1H, d, $J = 1.8$)	108.8
1''	4.99 (1H, d, $J = 8.0$)	100.7
2''	3.70-3.60*	70.0
3''	3.70-3.60*	73.5
4''	3.70-3.60*	76.2
5''	3.51 (1H, m)	75.9
6''	3.96 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$) 3.87 (1H, dd, $J = 12.2 / 4.8$)	62.2
CH₃O-6	3.97 (3H, s)	61.2
CH₃O-3'	3.92 (3H, s)	55.9
CH₃O-4'	3.94 (3H, s)	61.1
OH-5	12.94 (1H, s)	-

Πίνακας 5.23 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-13a



Εικόνα 5.30 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13a επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.46$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.46$ min με $m/z=475.1225$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Germanaism-B (NC13)**



Εικόνα 5.31 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13a επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=16.62$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=16.62$ min με $m/z=523.1436$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριδίνη (NC25)**

Ο μεταβολίτης 7-*O*-γλυκοσίδης της 6,3',4'-τριμεθοξυ-5,7,5'-τριυδροξυισοφλαβόνης, η ιριδίνη όπως είναι επίσης γνωστός, έχει απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. germanica* [210, 211], *I. kumaonensis* [414], *I. milesii* [426], *I. pseudopumila* [459]. Επίσης, έχει εντοπισθεί σε άλλα συγγενικά γένη, όπως είναι η περίπτωση του *Belamcanda chinensis*, οικ. Iridaceae [417]. Η αντιοξειδωτική [459], η ανασταλτική έναντι της ρεδουκτάσης της αλδόσης [422] (Jung *et al.*, 2002), η νευροπροστατευτική [460] και η κυτταροτοξική έναντι των καρκινικών σειρών PC3, MGC-803, Bcap-37 και MCF-7 [446] δράση της έχει αξιολογηθεί και έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια.

5.3.2.7. Μελέτη του κλάσματος 152-160 του FCPC-1 (C1F27)

Με βάση το χρωματογραφικό έλεγχο, το κλάσμα 152-160 (112,9 mg) περιέχει κυρίως φαινολικά παράγωγα, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονών, καθώς παρουσιάζουν απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση της TLC με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλίνης έδωσαν κηλίδες υποκίτρινου χρώματος. Έτσι, για την παραλαβή τους σε καθαρή μορφή, 100mg επεξεργάστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη (C1S2). Αρχικά συλλέχθηκαν 87 κλάσματα και με τη βοήθεια του χρωματογραφικού ελέγχου TLC, προέκυψαν τελικά 9 συνενωμένα κλάσματα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1S2	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1S2F1	1-46	19.7
C1S2F2	47-51	26.8
C1S2F3	53-55	8.1
C1S2F4	56-60	8.4
C1S2F5	61-63	2.6
C1S2F6	64-69	5.0
C1S2F7	70-80	7.4
C1S2F8	81-85	2.5
C1S2F9	86-87	3.9

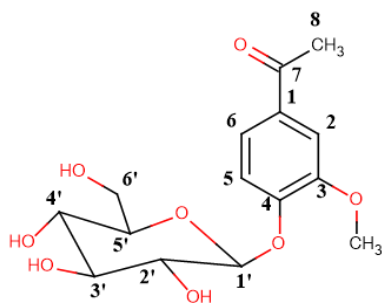
Πίνακας 5.24 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F27 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S2)

Τα κλάσματα C1S2F3 και C1S2F4 συνενώθηκαν περαιτέρω και επεξεργάστηκαν με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος αντιστρόφου φάσεως και σύστημα ανάπτυξης H₂O/Ακετονιτρίλιο 70/30. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, παραλήφθησαν πέντε ζώνες (A, B, C, D, E), ενώ από την φασματοσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 4'-Ο-γλυκοσίδης της 3-μεθοξυ-4-υδροξυακετοφαινόνης (**IGE-14, NC14**) από τη ζώνη A (καθαρότητας περίπου 70%), 4'-Ο-γεντιοβιοσίδης της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-16, NC16**) από τη ζώνη C (καθαρότητας μεγαλύτερης του 90%), 4'-Ο-ραμνοπυρανοσυλο (1→2) γλυκοπυρανοσίδης της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-17, NC17**) από τη ζώνη D (καθαρότητας μεγαλύτερης του 90%). Οι

ζώνες B και E αποδείχτηκε ότι ήταν μίγματα ουσιών και δε μελετήθηκαν περαιτέρω φασματοσκοπικά.

- 4'-O-γλυκοσίδης της 3-μεθοξυ-4-υδροξυακετοφαινόνης (IGE-14, NC14)

Ο μεταβολίτης **IGE-14** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλίνης έδωσε πορτοκαλοκόκκινη χρώση.



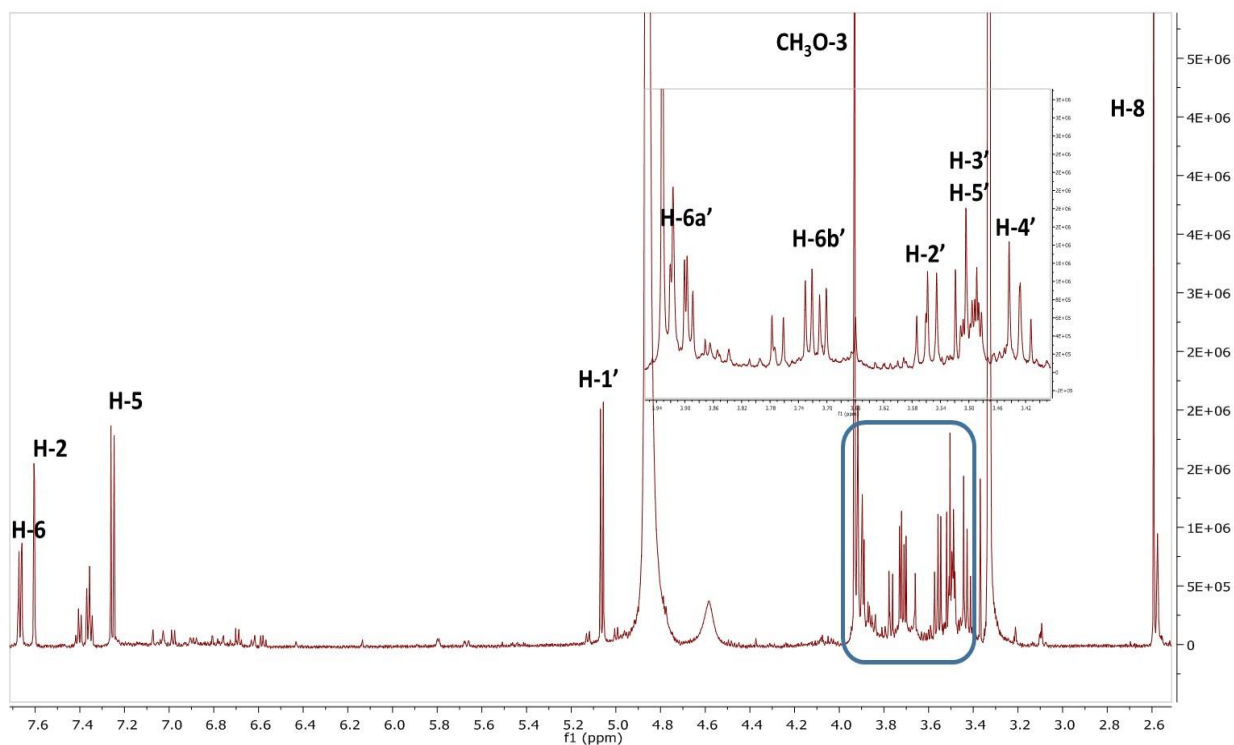
IGE-14 (NC14)

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.32) παρουσιάστηκαν σήματα σε δ 7.60 (1H, d, $J = 2.0$), 7.25 (1H, d, $J = 8.4$) και 7.67 (1H, dd, $J = 8.4 / 2.0$), που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2, H-5 και H-6, ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζονται τα σήματα της μεθοξυλομάδας (δ 3.93, 3H, s) και των πρωτονίων του σακχαριδικού τμήματος της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα:

- το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται σε δ 5.06 ως μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 7.8$, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 102.2 ppm
- Σε δ 3.55 φαίνεται μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 9.4 / 7.8$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2'
- Το H-4' εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή ($J = 9.9$ Hz), ενώ οι κορυφές των πρωτονίων H-3' και H-5' συντονίζονται στα 3.50 ppm και οι κορυφές τους αλληλεπικαλύπτονται
- Τα μεθυλικά πρωτόνια του σακχάρου εμφανίζονται σε δ 3.91 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.2$ Hz) και 3.72 (1H, dd, $J = 12.2/5.8$).

Η σύνδεση της γλυκόζης στην υδροξυλομάδα της θέσεως 4, επιβεβαιώθηκε με τη μελέτη του φάσματος HMBC, όπου φάνηκε η 3J σύζευξη του C-4, τόσο με τα πρωτόνια H-2 και H-6, όσο και με το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου. Επίσης, τα πρωτόνια της ακετυλομάδας

εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 2.59 ppm, ενώ ο μεθυλικός και ο καρβονυλικός άνθρακας συντονίζονται στα 26.7 και 197.4 ppm, αντίστοιχα.



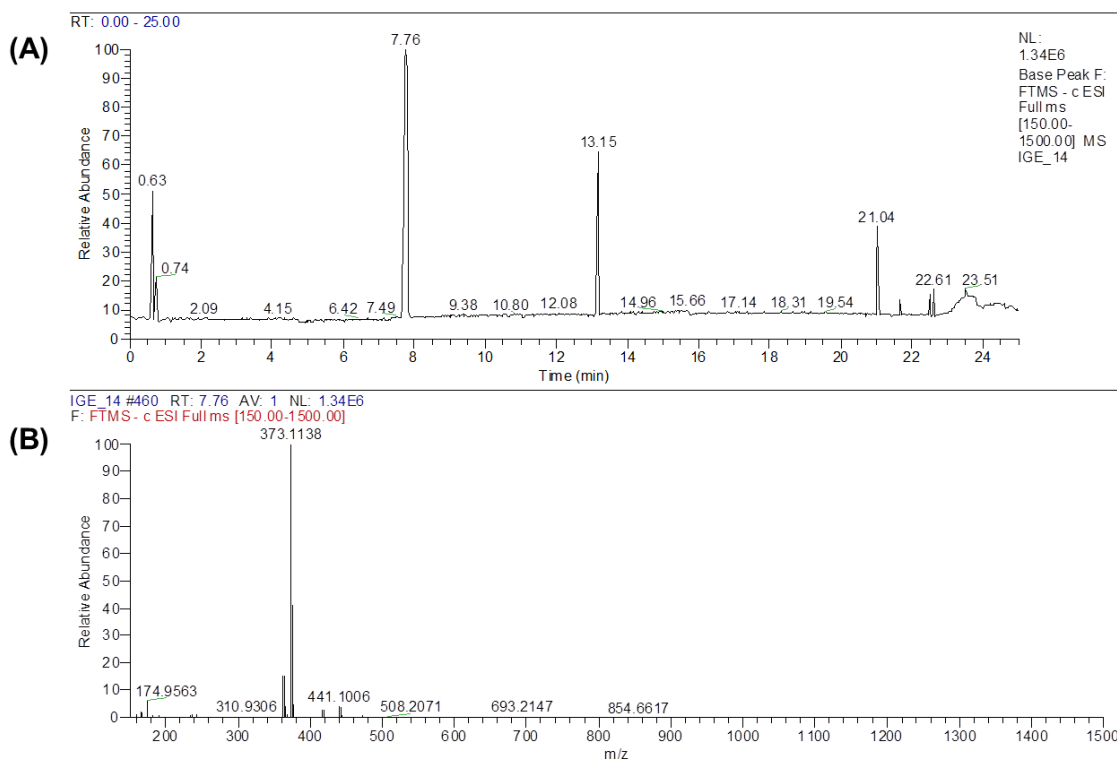
Εικόνα 5.32 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-14

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ τα δεδομένα που περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί ταιριάζουν με τη δημοσίευση των De Rosa *et al.*, το 1996 [461]. Από το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε MeOD	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε MeOD
2	7.60 (1H, d, $J = 2.0$)	112.8
5	7.25 (1H, d, $J = 8.4$)	116.6
6	7.67 (1H, dd, $J = 8.4 / 2.0$)	124.8
8	2.59 (3H, s)	26.7
CH ₃ O-3	3.93 (3H, s)	56.8
1'	5.06 (1H, d, $J = 7.8$)	102.2
2'	3.55 (dd, $J = 9.4 / 7.8$)	75.1

3'	3.50*	78.4
4'	3.43 (1H, t, $J = 9.9$)	71.5
5'	3.50*	78.5
6'	3.91 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.2$) 3.72 (1H, dd, $J = 12.2/5.8$)	62.8

Πίνακας 5.25 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-14



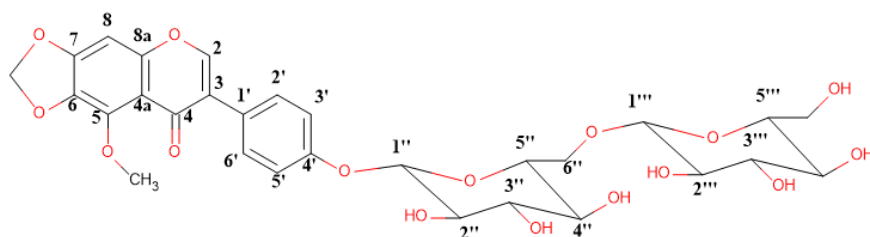
Εικόνα 5.33 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-14 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_{\text{R}}=7.76$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{CO}_2\text{H}_2-\text{H}]^+$ της κορυφής $t_{\text{R}}=7.76$ min με $m/z=373.1138$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ανδροσίνη (NC14)**

Ο μεταβολίτης **NC14**, ο οποίος είναι γνωστός ως Ανδροσίνη και Γλυκοακετοβανιλλόνη έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές, όπως είναι τα υπέργεια τμήματα του *Boerhaavia diffusa* L. (οικ. Nyctaginaceae) [462], τα στελέχη του *Picrorhiza scrophulariiflora* (οικ. Scrophulariaceae) [463], τα ανθισμένα υπέργεια τμήματα του *Thymus vulgaris* (οικ. Labiatae) [464], τα σπέρματα του *Prunus davidiana* (οικ. Rosaceae) [465], αλλά και από καλλιέργειες φυτικών κυττάρων (*Lycopersicon esculentum*, οικ. Solanaceae) [461]. Επίσης, έχει εντοπισθεί σε

εκχυλίσματα ριζωμάτων ειδών του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. Spuria* και *I. tectorum*, με την τεχνική LC-MS [466, 467]. Η αντιοξειδωτική [468], η κυτταροτοξική έναντι των καρκινικών σειρών MCF-7 και T-47D [421] και η αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων και μυκήτων [469] έχουν αξιολογηθεί και η ακετοβανιλλόνη έχει χαρακτηριστεί ως μετρίως δραστική.

- 4'-O-γεντιοβιοσίδης της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (IGE-16, NC16)

Ο μεταβολίτης **IGE-16** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης έδωσε υποκίτρινη χρώση.

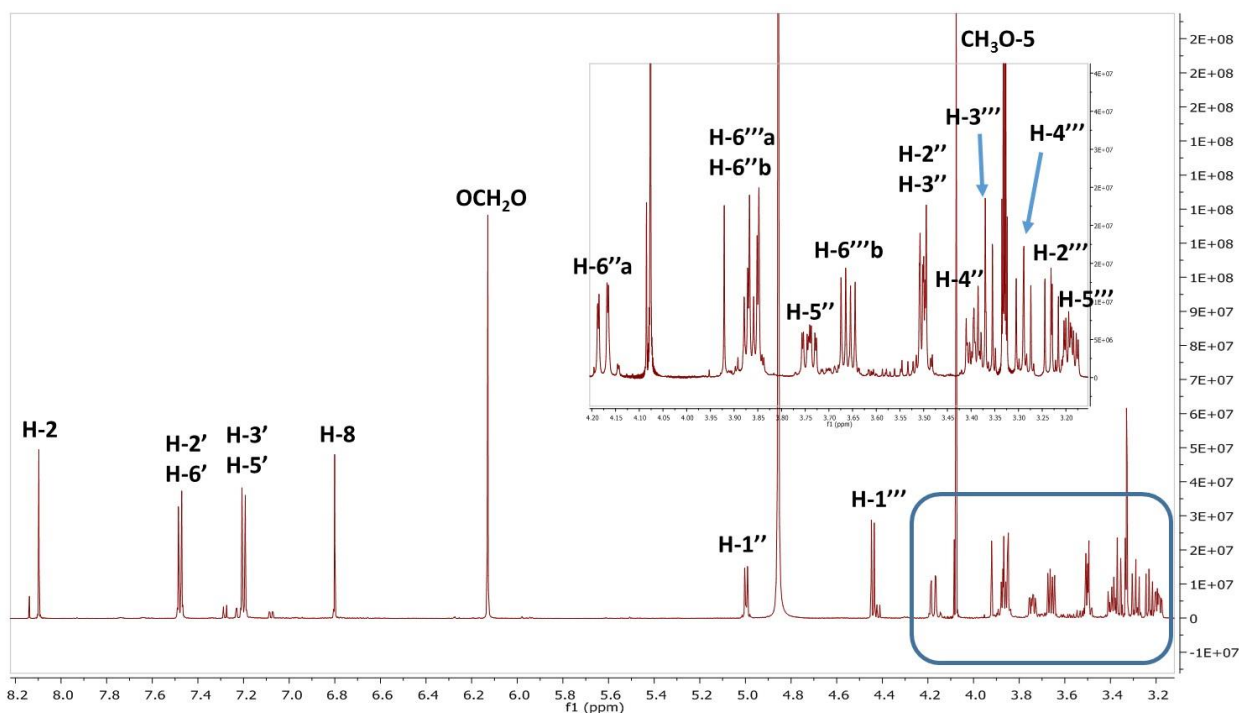


IGE-16 (NC16)

Η ένωση **IGE-16** παρουσιάζει ίδια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με το μεταβολίτη **IGE-13**, ενώ όσον αφορά τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.34) εμφανίζονται ανάλογα σήματα και πιο συγκεκριμένα:

- σε δ 8.00 εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2 ως απλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 153.8 ppm
- Σε δ 6.80 εμφανίζεται μία απλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 94.4 ppm
- Σε δ 4.08 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσεως 5
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.12 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 104.4
- Τα πρωτόνια H-2'/H-6' εμφανίζονται σε δ 7.48 και τα πρωτόνια H-3'/H-5' σε δ 7.20, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 131.9 και 118.1, αντίστοιχα

- Στην οξυγονωμένη περιοχή των φασμάτων εμφανίζονται τα σήματα της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 4' της γενίνης και πιο συγκεκριμένα: (i) σε δ 4.99 (1H, d, $J = 8.0$) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 102.2 ppm, (ii) στα 3.49 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια H-2'', H-3'', ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 75.2 και 78.1, (iii) σε δ 3.39 εμφανίζεται το H-4'' ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 9.9$ Hz, (iv) στα 3.74 ppm του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή και ένα σήμα σε δ 78.1 του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, τα οποία αντιστοιχούν στο μεθίλιο της θέσεως 5 του σακχάρου, και (v) τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται σε δ 4.18 (1H, dd, $J = 12.6 / 1.8$) και 3.86 (1H, dd, $J = 12.6 / 5.8$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 69.8.



Εικόνα 5.34 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-16

Η αποθωράκιση των πρωτονίων H-5'', H-6a'' και H-6b'', όπως επίσης και των ανθράκων C-5'' και C-6'', σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σήματα της ένωσης **IGE-13**, εξηγείται από την παρουσία μιας δεύτερης σακχαριδικής μονάδας. Πρόκειται για μία δεύτερη ομάδα γλυκοπυρανόσης, η οποία συνδέεται στη θέση 6 της πρώτης, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι ο

C-6'' συντονίζεται στα 69.8 ppm (αντί για 62-63 ppm). Τα υπόλοιπα σήματα της δεύτερης γλυκοσιδικής μονάδας είναι τα ακόλουθα:

- το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται στα 4.44 ppm (d, $J = 7.8$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 104.9
- Τα πρωτόνια H-3''' και H-4''' εμφανίζονται ως τριπλές κορυφές σε δ 3.37 (t, $J = 9.2$ Hz) και 3.28 (t, $J = 9.2$ Hz), γεγονός που φανερώνει ότι και το δεύτερο σάκχαρο είναι γλυκόζη
- Το μεθινικό πρωτόνιο H-5''' συντονίζεται σε δ 3.19 (1H, ddd, $J = 9.9 / 5.8 / 2.3$) και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 78.2 ppm
- Τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως 6''' συντονίζονται σε δ 3.86 (1H, dd, $J = 12.2/2.3$) και 3.66 (1H, dd, $J = 12.0 / 5.8$) και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 63.0 ppm.

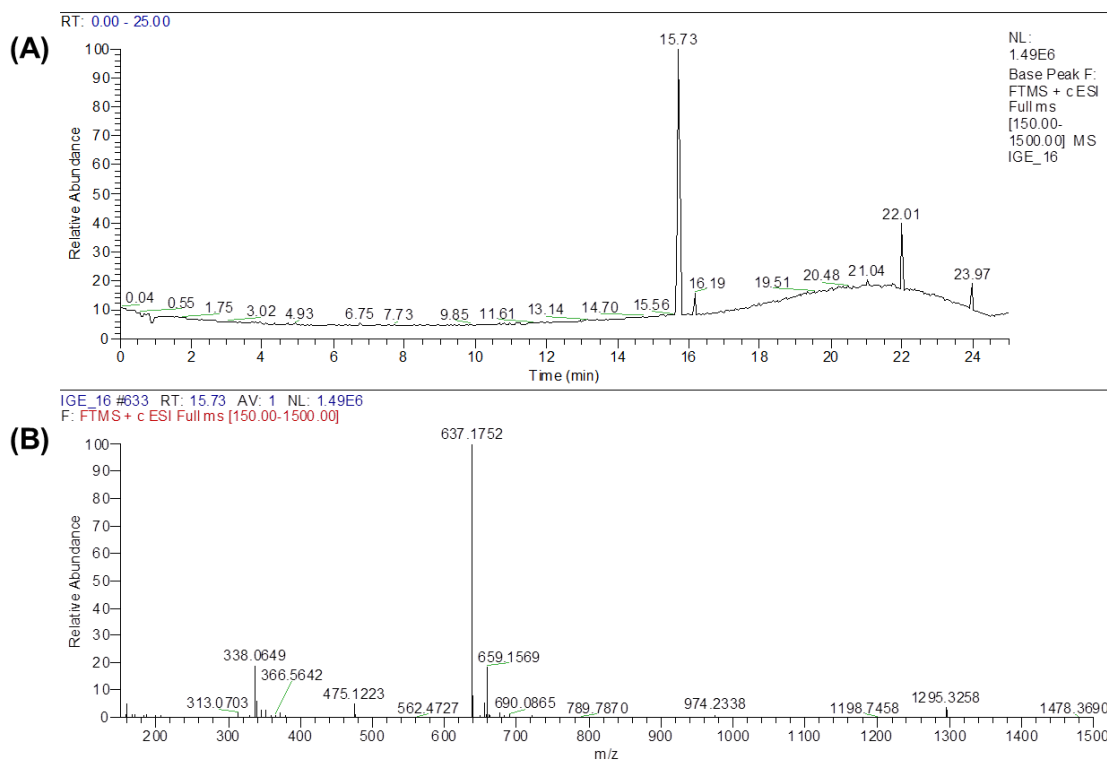
Η θέση σύνδεσης του πρώτου σακχάρου στη γενίνη επιβεβαιώθηκε μέσω της 3J σύζευξης του άνθρακα C-4', τόσο με τα πρωτόνια H-2'/H-6', όσο και με το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης, ενώ η σύζευξη του δεύτερου σακχάρου στη θέση 6'' επιβεβαιώθηκε με τη 3J σύζευξη του άνθρακα C-6'' με το H-1'''.

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	^1H NMR (δ , J σε Hz) σε MeOD	^{13}C NMR (δ) σε MeOD
2	8.00 (1H, s)	153.8
3	-	126.6
4	-	177.7
4a	-	114.6
5	-	142.8
6	-	136.9
7	-	155.4
8	6.80 (1H, s)	94.4
8a	-	156.7
1'	-	127.4
2'/6'	7.48 (2H, d, $J = 8.8$)	131.9
3'/5'	7.20 (2H, d, $J = 8.8$)	118.1
4'	-	159.0
1''	4.99 (1H, d, $J = 7.8$)	102.2
2''	3.49*	75.2
3''	3.49*	78.1
4''	3.39 (1H, br t, $J = 9.9$)	71.8

5''	3.74 (1H, ddd, $J = 9.9 / 5.8 / 1.8$)	78.1
6''	4.18 (1H, dd, $J = 12.6 / 1.8$) 3.86 (1H, dd, $J = 12.6/5.8$)	69.8
1'''	4.44 (1H, d, $J = 7.8$)	104.9
2'''	3.22 (1H, dd, $J = 9.2 / 7.8$)	75.6
3'''	3.37 (1H, t, 9.2)	78.2
4'''	3.28 (1H, t, $J = 9.2$)	72.0
5'''	3.19 (1H, ddd, $J = 9.9 / 5.8 / 2.3$)	78.2
6'''	3.86 (1H, dd, $J = 12.2/2.3$) 3.66 (1H, dd, $J = 12.0 / 5.8$)	63.0
OCH ₂ O	6.12 (2H, s)	104.4
CH ₃ O-5	4.08 (H, s)	61.7

Πίνακας 5.26 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-16

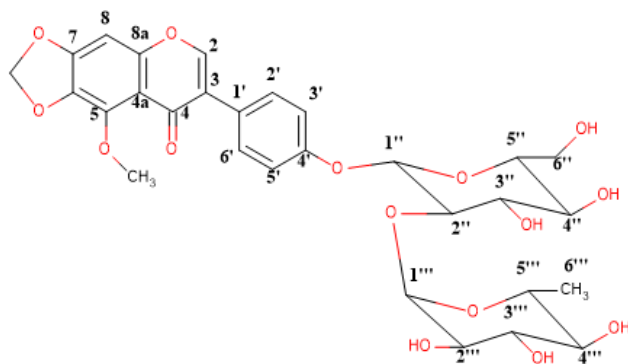


Εικόνα 5.35 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-16 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=15.73$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=15.73$ min με $m/z=637.1752$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Γεντιοβιοσίδη της Ιρισολόνης (NC16)**

Ο γεντιοβιοσίδης της ιρισολόνης ή “Germanaism-E” (**NC16**) έχει απομονωθεί στο παρελθόν από εκχυλίσματα ριζωμάτων ειδών του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. germanica* [125] και *I. pseudorumila* [459]. Επίσης, ο μεταβολίτης NC16 έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την παραγωγή NO σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7 [460] και διαθέτει πιθανή νευροπροστατευτική δράση [470].

- 4'-O-ραμνοπυρανοσυλο(1→2)γλυκοπυρανοσίδης της 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (**IGE-17, NC17**)

Ο μεταβολίτης **IGE-17** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με διάλυμαθειϊκής βανιλίνης έδωσε υποκίτρινη χρώση.



IGE-17 (NC17)

Η ένωση **IGE-17** παρουσιάζει παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά με το μεταβολίτη **IGE-16**. Όσον αφορά στο φάσμα ¹H-NMR (Εικόνα 5.36) εμφανίζονται ανάλογα σήματα και πιο συγκεκριμένα:

- σε δ 8.08 εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2 ως απλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 153.7 ppm
- Σε δ 6.80 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 94.5 ppm
- Σε δ 4.07 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσεως 5

- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.13 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 104.4
- Τα πρωτόνια H-2'/H-6' εμφανίζονται σε δ 7.47 και τα πρωτόνια H-3'/H-5' σε δ 7.13, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 132.0 και 113.6, αντίστοιχα.

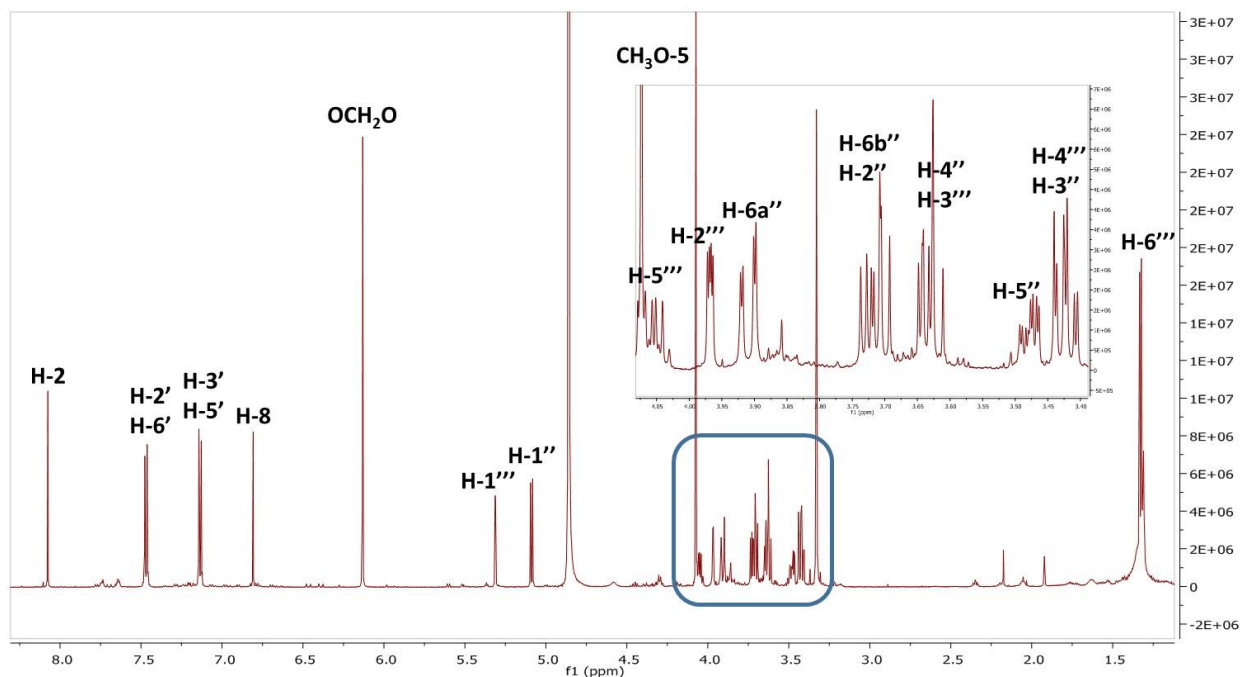
Στην οξυγονωμένη περιοχή των φασμάτων εμφανίζονται τα σήματα της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 4' της γενίνης και πιο συγκεκριμένα: (i) σε δ 5.09 (1H, d, $J = 7.8$) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.6 ppm, (ii) στα 3.71 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο H-2'', το οποίο εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή ($J = 9.7 / 7.8$ Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 79.6, (iii) σε δ 3.42 και 3.63 εμφανίζονται δύο τριπλές κορυφές ($J = 9.9$ Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3'' και H-4'', (iv) στα 3.48 ppm του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή και ένα σήμα σε δ 78.4 του φάσματος ¹³C-NMR, τα οποία αντιστοιχούν στο μεθίλιο της θέσεως 5 του σακχάρου, και (v) τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται σε δ 3.90 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.2$) και 3.72 (1H, dd, $J = 12.2 / 5.4$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 62.6.

Από τη σύγκριση των προαναφερόμενων σημάτων με τα αντίστοιχα δεδομένα της ουσίας **IGE-16**, γίνεται εύκολα αντιληπτή η θωράκιση, τόσο στα πρωτόνια H-6a'' (δ 3.90 αντί για 4.18), H-6b'' (δ 3.72 αντί για 3.86) και H-5'' (δ 3.48 αντί για 3.74), όσο και στον άνθρακα C-6'' (δ 62.6 αντί για 69.8). Οι προαναφερόμενες μετατοπίσεις δικαιολογούνται από το γεγονός ότι στο μεταβολίτη **IGE-17** η δεύτερη σακχαριδική μονάδα δε συνδέεται στην θέση 6 της γλυκόζης, η οποία συνδέεται απευθείας στη γενίνη.

Ωστόσο η σημαντικότερη δομική διαφορά μεταξύ των δύο ενώσεων είναι όχι μόνο στη θέση σύνδεσης, αλλά και στο γεγονός ότι το δεύτερο σάκχαρο στην περίπτωση της **IGE-17** είναι ραμνοπυρανόση. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της ραμνόσης είναι τα ακόλουθα:

- το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται σε δ 5.31 ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 1.7$ Hz, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 102.8 ppm
- Το πρωτόνιο H-2''' εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή ($J = 3.3 / 1.7$ Hz) στα 3.97 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 72.6 ppm
- Το πρωτόνιο H-3''' εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή σε δ 3.64 ($J = 9.5 / 3.3$ Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 72.7 ppm
- Σε δ 3.42 εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή ($J = 9.5$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο H-4''', ενώ το H-5''' εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.05 ppm

- Το μεθύλιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (δ 1.32) με σταθερά σύζευξης $J = 6.1$ Hz.
Η αποθωράκιση του άνθρακα C-2'' (δ 79.6) ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η ραμνόση συνδέεται στη θέση 2 της γλυκόσης.

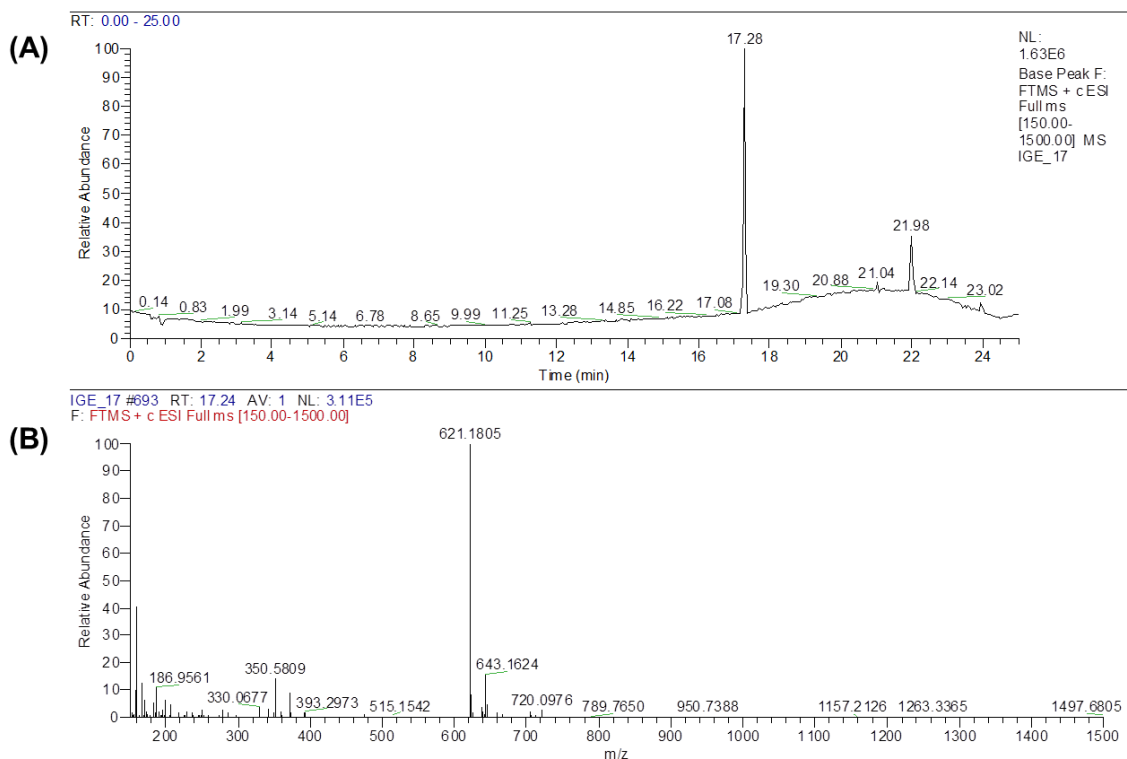


Εικόνα 5.36 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-17

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε MeOD	¹³ C NMR (δ) σε MeOD
2	8.08 (1H, s)	153.7
3	-	126.2
4	-	177.3
4a	-	114.0
5	-	142.4
6	-	136.5
7	-	155.2
8	6.80 (1H, s)	94.5
8a	-	156.5
1'	-	127.1
2'/6'	7.47 (2H, d, $J = 8.8$)	132.0
3'/5'	7.13 (2H, d, $J = 8.8$)	113.6
4'	-	158.4
1''	5.09 (1H, d, $J = 7.8$)	100.6
2''	3.71 (dd, $J = 9.7 / 7.8$)	79.6
3''	3.42 (1H, t, $J = 9.7$)	74.3
4''	3.63 (1H, t, $J = 9.7$)	79.6
5''	3.48 (1H, ddd, $J = 9.7 / 5.4 / 2.2$)	78.4
6''	3.90 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.2$) 3.72 (1H, dd, $J = 12.2 / 5.4$)	62.6
1'''	5.31 (1H, d, $J = 1.7$)	102.8
2'''	3.97 (1H, dd, $J = 3.3 / 1.7$)	72.6
3'''	3.64 (1H, dd, 9.5/3.3)	72.7
4'''	3.42 (1H, t, $J = 9.5$)	71.8
5'''	4.05 (1H, m)	70.3
6'''	1.32 (3H, d, $J = 6.1$)	18.5
OCH₂O	6.13 (2H, s)	104.3
CH₃O-5	4.07 (H, s)	61.6

Πίνακας 5.27 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-17



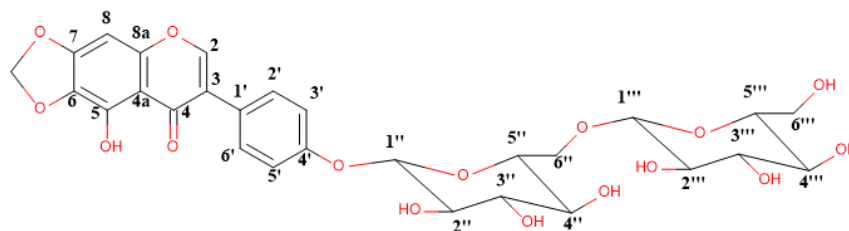
Εικόνα 5.37 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-17 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.28$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.28$ min με $m/z=621.1805$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Βιοσίδη της Ιρισολόνης (NC17)**

Με βάση τις βάσεις δεδομένων στις οποίες έχουμε πρόσβαση, ο μεταβολίτης NC17 ή Βιοσίδη της Ιρισολόνης, δεν έχει απομονωθεί από άλλη φυσική πηγή και δεν υπάρχουν δεδομένα σε σχέση με τις βιολογικές του ιδιότητες.

Το κλάσμα C1S2F7 υποβλήθηκε περαιτέρω σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος αντιστρόφου φάσεως και σύστημα ανάπτυξης $\text{H}_2\text{O}/\text{Ακετονιτρίλιο}$ 70/30. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος παραλήφθηκε μία ζώνη και μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη της αποδείχτηκε ότι περιέχει τον 4'-Ο-γεντιοβιοσίδη της 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-ισοφλαβόνης (IGE-18) σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη του 80%.

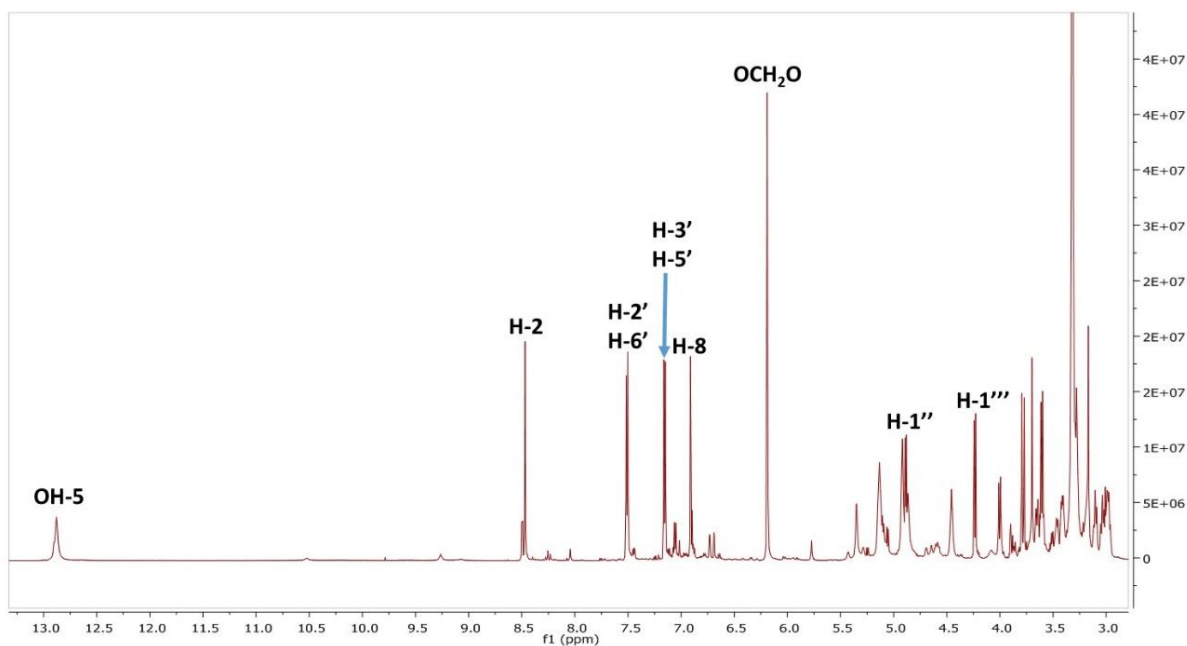
- 4'-O-γεντιοβιοσίδης της 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξισοφλαβόνης (IGE-18, NC18)

Ο μεταβολίτης **IGE-18** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλίνης παρουσίασε υποκίτρινη χρώση.



IGE-18 (NC18)

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.38) είναι παρόμοιο με αυτό της ένωσης **IGE-16**, καθώς η μοναδική δομική διαφορά είναι η απουσία μεθυλομάδας στο υδροξύλιο της θέσεως 5.

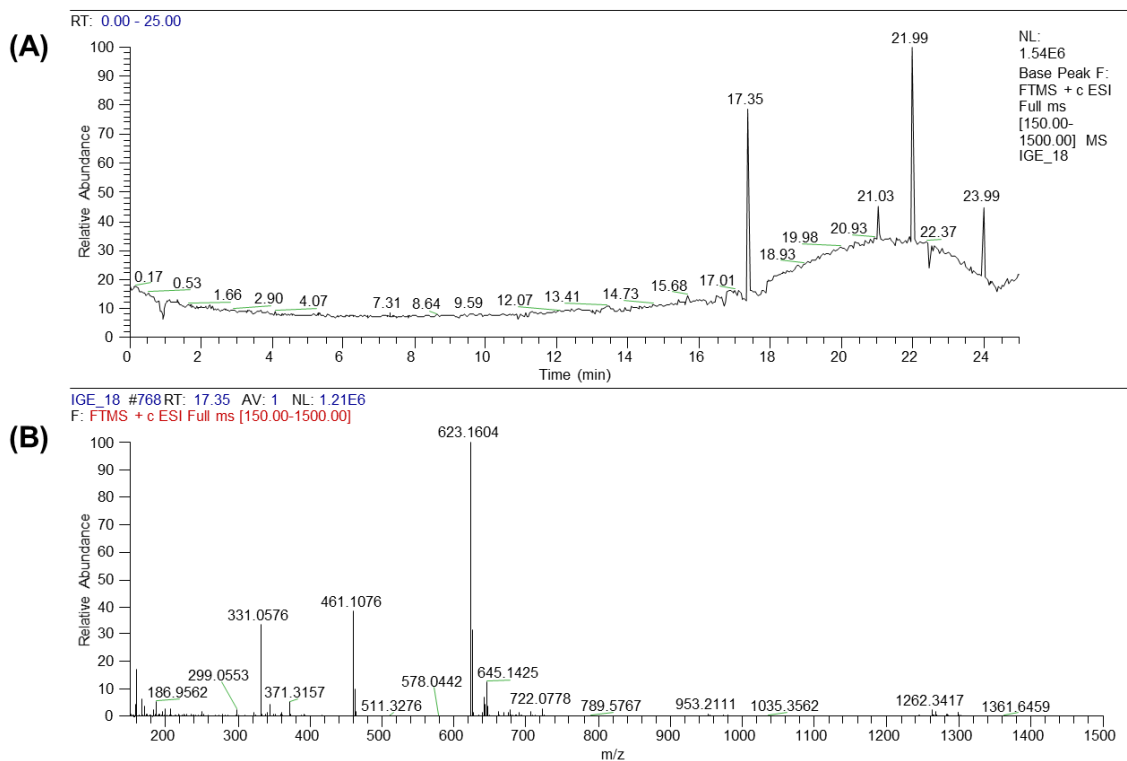


Εικόνα 5.38 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-18

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	¹ H NMR (δ , J σε Hz) σε DMSO	¹³ C NMR (δ) σε DMSO
2	8.48 (1H, s)	155.2
3	-	122.4
4	-	181.5
4a	-	108.2
5	-	141.8
6	-	130.3
7	-	154.1
8	6.91 (1H, s)	89.8
8a	-	153.5
1'	-	124.6
2'/6'	7.51 (2H, d, $J = 8.4$)	130.4
3'/5'	7.16 (2H, d, $J = 8.4$)	116.4
4'	-	158.0
1''	4.88 (1H, d, $J = 7.4$)	100.5
2''	3.28*	73.5
3''	3.28*	76.7
4''	3.18 (1H, br t, $J = 9.1$)	70.0
5''	3.60*	76.3
6''	4.00 (1H, dd, $J = 13.6 / 5.5$) 3.61 (1H, dd, $J = 13.6 / 5.5$)	68.4
1'''	4.23 (1H, d, $J = 7.8$)	103.4
2'''	2.98*	73.7
3'''	3.10 (1H, br t, 9.1)	76.9
4'''	3.03 (1H, br t, $J = 9.0$)	70.3
5'''	3.00*	77.1
6'''	3.65 (1H, dd, $J = 12.2 / 1.8$) 3.45 (1H, dd, $J = 12.2 / 5.5$)	61.3
OCH ₂ O	6.19 (2H, s)	103.1
OH-5	12.87 (H, s)	-

Πίνακας 5.28 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-18 (* αλληλεπικάλυψη σημάτων)



Εικόνα 5.39 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-18 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.35$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.35$ min με $m/z=623.1604$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Γεντιοβιοσίδη της Ιριλόνης (NC18)**

Ο γεντιοβιοσίδη της ιριλόνης (**NC18**) έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *I. pseudopumila* [459]. Μολονότι έχουν ήδη ελεγχθεί οι αντιοξειδωτικές [459] και οι πιθανές νευροπροστατευτικές του ιδιότητες [460], η δραστηκότητά του χαρακτηρίστηκε ως μέτρια.

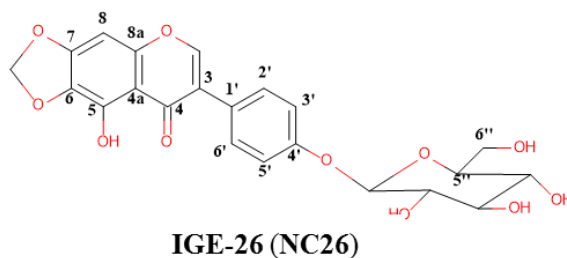
5.3.2.8. Μελέτη του κλάσματος 129-133 του FCPC-1 (C1F23)

Το κλάσμα 129-133 (37,7 mg) περιείχε κυρίως μία ουσία, η οποία παρουσίαζε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης έδωσε υποκίτρινη χρώση. Με σκοπό την απομόνωσή της, το κλάσμα υποβλήθηκε περαιτέρω σε στήλη μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη (C1S3). Αρχικά συλλέχθηκαν 114 κλάσματα και με τη βοήθεια του χρωματογραφικού ελέγχου προέκυψαν τελικά 7 συνενωμένα κλάσματα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C1S3	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C1S3F1	1-44	9.8
C1S3F2	45-49	2.9
C1S3F3	50-51	1.4
C1S3F4	52-61	3.8
C1S3F5	62-84	5.0
C1S3F6	85-112	6.0
C1S3F7	113-114	2.1

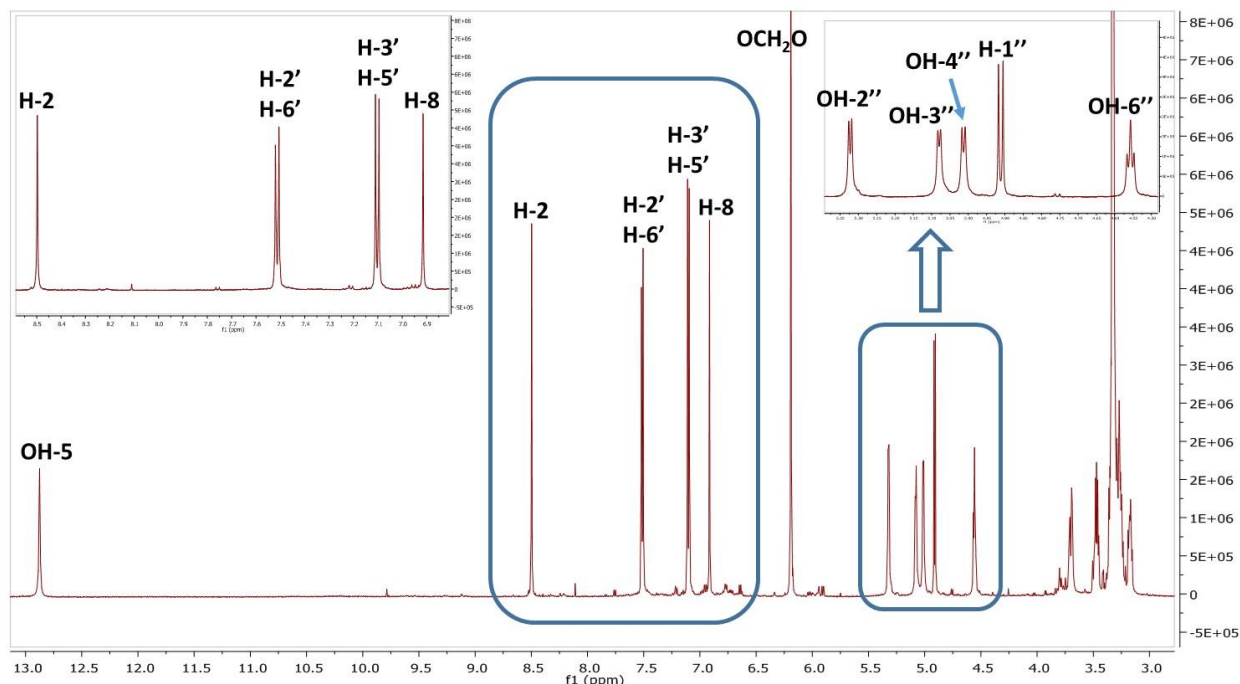
Πίνακας 5.29 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F23 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S3)

Από τη φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος C1S3F6 ταυτοποιήθηκε ο μεταβολίτης 4'-*O*-γλυκοσίδη της 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξισοφλαβόνης (**IGE-26**), του οποίου το φάσμα ¹H-NMR (Εικόνα 5.40) παρουσιάζει ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη IGE-13.



Πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα:

- σε δ 8.50 εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2 ως απλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 155.6 ppm
- Σε δ 6.92 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 90.2 ppm
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.20 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 103.4
- Το υδροξύλιο της θέσεως 5 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο της θέσεως 4 και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 12.87 ppm
- Στην οξυγονωμένη περιοχή των φασμάτων εμφανίζονται τα σήματα της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 4' της γενίνης και πιο συγκεκριμένα: (i) σε δ 4.91 (1H, d, $J = 7.5$) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.8 ppm, (ii) στα 3.35-3.23 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια H-2'', H-3'' και H-5'', ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 73.7, 77.1 και 77.6, (iii) στα 3.17 ppm εμφανίζεται μία διπλή τριπλής κορυφή ($J = 9.1 / 4.7$ Hz) και ένα σήμα σε δ 70.4 του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, τα οποία αντιστοιχούν στο μεθίνιο της θέσεως 4 του σακχάρου, και (iv) τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται σε δ 3.70 (1H, ddd, $J = 12.2 / 5.5 / 1.8$) και 3.48 (1H, dt, $J = 12.2 / 5.5$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 61.1
- Τα υδροξύλια του σακχάρου εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 5.32 (OH-2''), 5.06 (OH-3''), 5.01 (OH-4') και 4.56 (OH-6'').



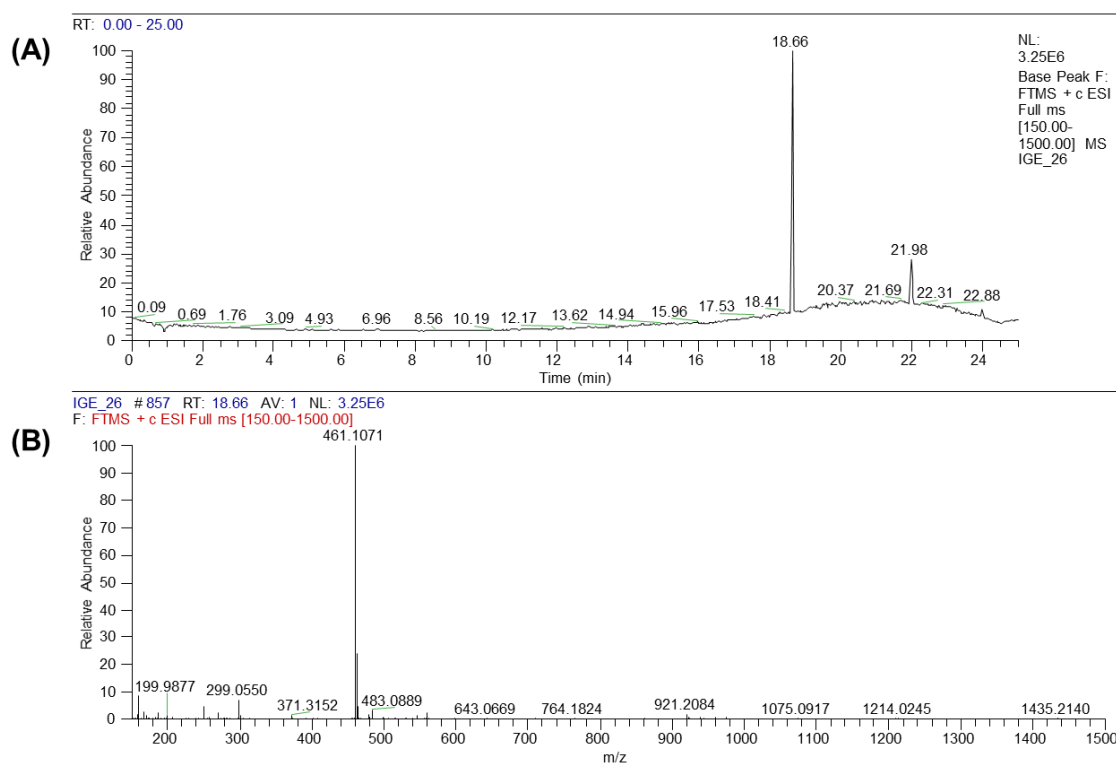
Εικόνα 5.40 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-26

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε DMSO	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε DMSO
2	8.50 (1H, s)	155.6
3	-	122.4
4	-	181.6
4a	-	108.1
5	-	141.7
6	-	130.1
7	-	154.9
8	6.92 (1H, s)	90.2
8a	-	153.8
1'	-	124.4
2'/6'	7.51 (2H, d, $J = 7.8$)	130.6
3'/5'	7.10 (2H, d, $J = 7.8$)	116.6
4'	-	158.2
1''	4.91 (1H, d, $J = 7.5$)	100.8

2''	3.35-3.23*	73.7
3''	3.35-3.23*	77.1
4''	3.17 (1H, td, $J = 9.1 / 4.7$)	70.4
5''	3.35-3.23*	77.6
6''	3.70 (1H, ddd, $J = 12.2 / 5.5 / 1.8$) 3.48 (1H, dt, $J = 12.2 / 5.5$)	61.1
OCH ₂ O	6.20 (2H, s)	103.4
OH-5	12.87 (H, s)	-
OH-2''	5.32 (1H, d, $J = 4.7$)	-
OH-3''	5.06 (1H, d, $J = 4.4$)	-
OH-4''	5.01 (1H, d, $J = 4.7$)	-
OH-6''	4.56 (1H, t, $J = 5.5$)	-

Πίνακας 5.30 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-26 (* αλληλεπικάλυψη σημάτων)

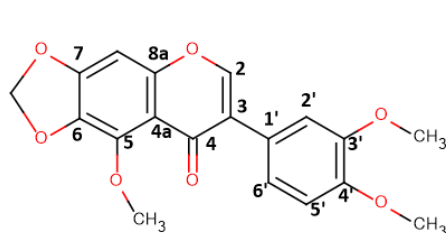


Εικόνα 5.41 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-26 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=18.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=18.66$ min με $m/z=461.1071$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν 4'-O-γλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC26)

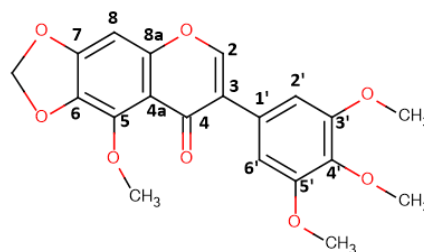
Ο 4'-*O*-γλυκοσίδη της ιριλόνης (**NC26**) έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα είδη *I. pseudopumila* [459] και *I. germanica* [210], ενώ έχει αναδειχθεί η αξιόλογη αντιοξειδωτική του δράση [459].

5.3.2.9. Μελέτη του κλάσματος 85-92 του FCPC-1 (C1F15)

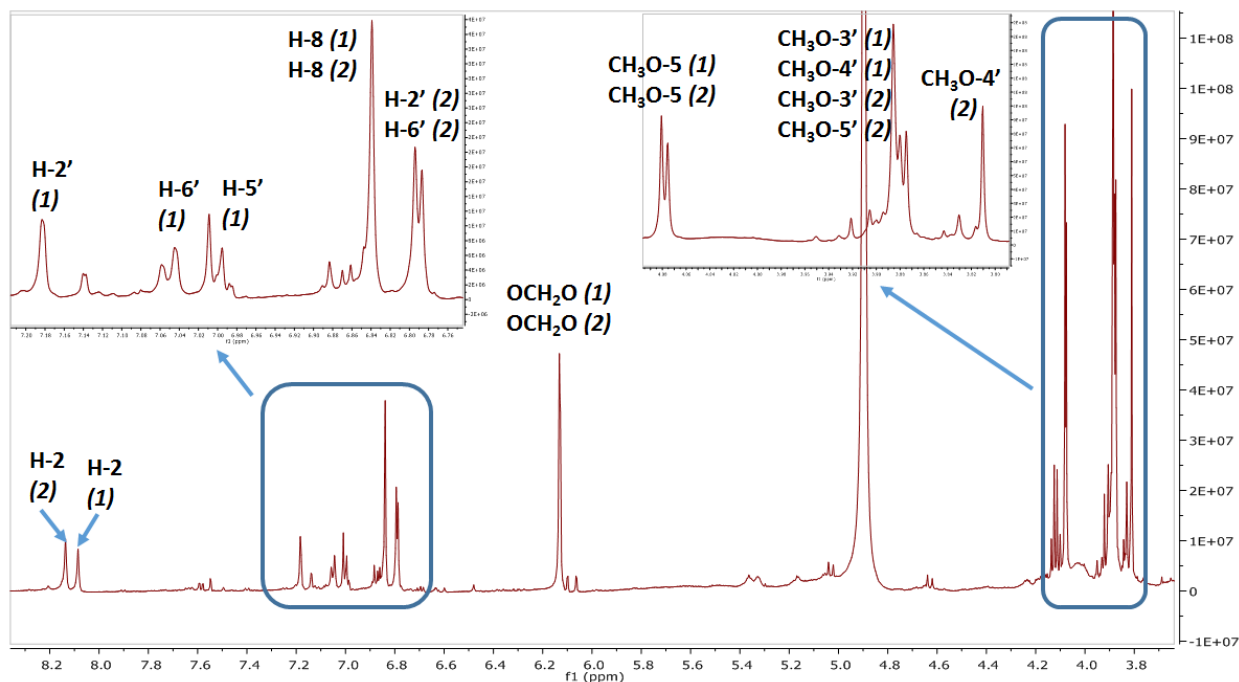
Με βάση το χρωματογραφικό (TLC) έλεγχο της κλασμάτωσης του ολικού εκχυλίσματος EtOAc, το κλάσμα C1F15 εμφάνισε κυρίως μία κηλίδα, η οποία παρουσίαζε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης έδωσε υποκίτρινη χρώση. Στο φάσμα ¹H-NMR (Εικόνα 5.42) φαίνεται ότι αποτελεί μίγμα των ουσιών 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5-τριμεθοξυισοφλαβόνη (**IGE-1**, **NC1**) και 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5',5'-τετραμεθοξυισοφλαβόνη ή ιρισφλορεντίνη (**IGE-2**, **NC2**), σε αναλογία 1.0/1.4. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **IGE-2**, τα οποία έχουν ληφθεί σε διαλύτη CDCl₃, περιγράφονται στην § 5.3.2.3. Στη συνέχεια περιγράφονται τα δεδομένων των φασμάτων ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης **IGE-1**, όπως αυτά έχουν προσδιορισθεί από τα φάσματα του μίγματος με τον μεταβολίτη **IGE-2**.



IGE-1 (NC1)



IGE-2 (NC2)



Εικόνα 5.42 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του κλάσματος C1F15 της αρχικής κλασμάτωσης του ολικού εκχυλίσματος EtOAc

- 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5-τριμεθοξυισοφλαβόνη (IGE-1, NC1)

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **IGE-1** παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα αντίστοιχα της ένωσης IGE-2 καθώς η μοναδική δομική τους διαφορά είναι η απουσία της μεθοξυλομάδας της θέσης 5'. Πιο συγκεκριμένα:

- σε δ 8.08 εμφανίζεται ως μία απλή κορυφή το πρωτόνιο H-2 , ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 154.2 ppm
- Σε δ 6.78 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 94.5 ppm
- Τα πρωτόνια H-2', H-5' και H-6' συντονίζονται σε δ 7.18 (brs), 7.00 (d, $J = 7.8$ Hz) και 7.05 (br d, $J = 7.8$ Hz) σχηματίζοντας ένα ABX σύστημα
- Οι μεθοξυλομάδες των θέσεων 5 και 3'/4' συντονίζονται σε δ 4.08 και 3.89, ενώ εμφανίζονται ως δύο απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία και έξι πρωτόνια, αντίστοιχα
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.13 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 104.5 ppm.

Άτομο	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε MeOD	¹³ C NMR (δ) σε MeOD
2	8.08 (1H, s)	154.2
3	-	126.4
4	-	177.3
4a	-	114.1
5	-	142.5
6	-	136.2
7	-	155.0
8	6.78 (1H, s)	94.5
8a	-	156.0
1'	-	126.2
2'	7.18 (1H, brs)	115.2
3'	-	150.2
4'	-	150.0
5'	7.00 (1H, d, J = 7.8)	113.5
6'	7.05 (1H, br d, J = 7.8)	123.6
CH ₃ O-3'	3.89 (3H, s)	56.8
CH ₃ O-4'	3.89 (3H, s)	56.8
CH ₃ O-5	4.08 (3H, s)	61.7
OCH ₂ O	6.13 (2H, s)	104.5

Πίνακας 5.31 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-1

Η 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5-τριμεθοξυισοφλαβόνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως προϊόν μεθύλωσης φυσικού προϊόντος [471]. Ωστόσο, ο μεθυλαιθέρας της ιρισκουμαονίνης έχει απομονωθεί ως φυσικό προϊόν από είδη του γένους *Iris*, όπως τα *I. milesii* και *I. kumaonensis* [414], *I. tingitana* [415], *I. japonica* [427] και *I. germanica* [458]. Επίσης, η 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5-τριμεθοξυισοφλαβόνη έχει απομονωθεί και από είδη άλλων οικογενειών, όπως είναι οι περιπτώσεις του είδους *Ochna squarrosa* της οικογένειας Ochnaceae [472] και του είδους *Ateleia herbert-smithii* της οικογένειας Fabaceae [473].

- 6,7-μεθυλενοδιοξυ-3',4',5',5-τετραμεθοξυισοφλαβόνη ή Ιρισφλορεντίνη (IGE-2, NC2)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

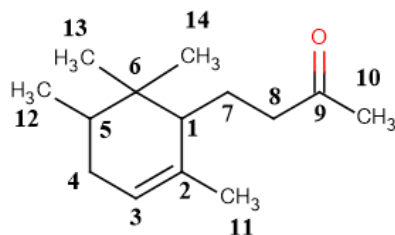
Άτομο	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε MeOD	¹³ C NMR (δ) σε MeOD
2	8.14 (1H, s)	154.2
3	-	126.3
4	-	177.4
4a	-	113.8
5	-	142.3
6	-	136.5
7	-	155.0
8	6.79 (1H, s)	94.5
8a	-	156.1
1'	-	127.1
2'/6'	6.84 (2H, s)	108.2
3'	-	154.0
4'	-	138.8
5'	-	154.0
CH₃O-3'	3.89 (3H, s)	56.8
CH₃O-4'	3.81 (3H, s)	61.3
CH₃O-5'	3.89 (3H, s)	56.8
CH₃O-5	4.08 (3H, s)	61.7
OCH₂O	6.13 (2H, s)	104.5

Πίνακας 5.32 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGE-2

Οι πληροφορίες σχετικά με την απομόνωση και τις βιολογικές της ιδιότητες αναφέρονται στην § 5.3.2.3.

5.3.2.10. Μελέτη του κλάσματος 34-42 του FCPC-1 (C1F8)

Με βάση το χρωματογραφικό (TLC) έλεγχο της κλασμάτωσης του ολικού εκχυλίσματος EtOAc, το κλάσμα C1F8 (59 mg) περιέχει αρκετούς μεταβολίτες, από τους οποίους ο επικρατέστερος παρουσιάζει απορρόφηση στα 254 nm. Με σκοπό την απομόνωσή του πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία 25 mg του κλάσματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂/MeOH 97/3. Η παραληφθείσα ουσία μελετήθηκε φασματοσκοπικά και ταυτοποιήθηκε ως διϋδροϊρόνη (**IGE-9**, **NC9**).



IGE-9 (NC9)

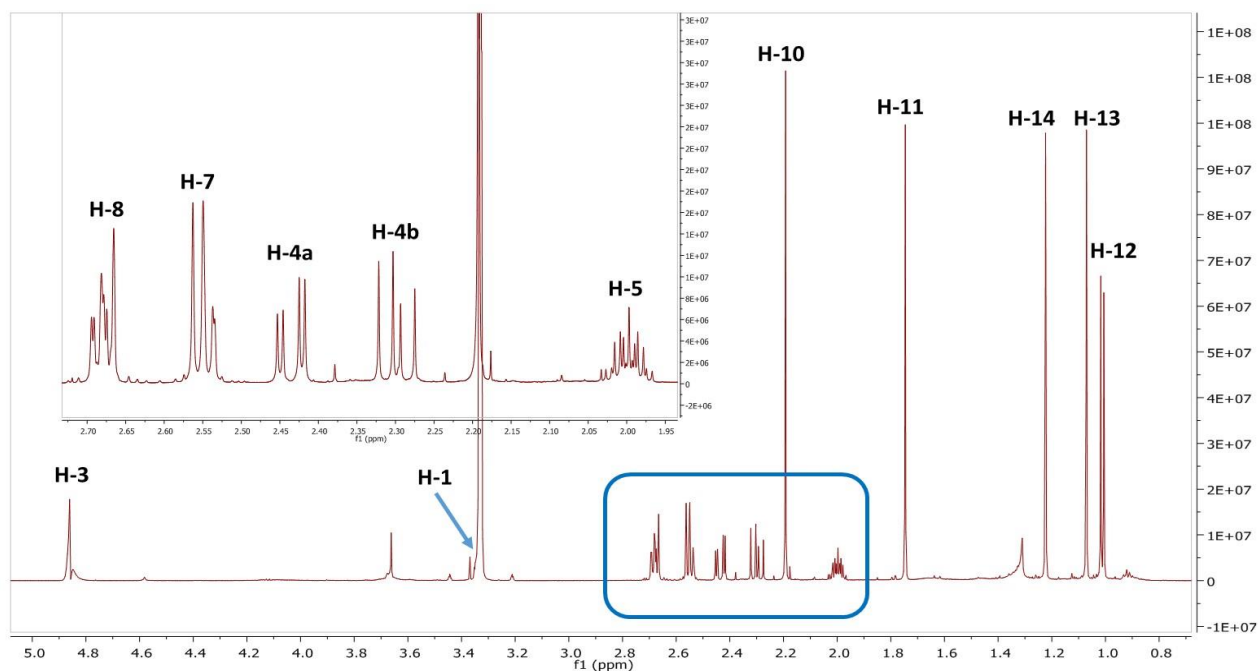
Μεταξύ των χαρακτηριστικών σημάτων περιλαμβάνονται τα ακόλουθα:

- Σε δ 1.01 συντονίζονται τα μεθυλικά πρωτόνια H-12 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), τα οποία παρουσιάζουν σύζευξη (COSY) με το πρωτόνιο H-5 (δ 2.00, m)
- Τα μεθυλικά πρωτόνια H-13 και H-14 δεν είναι ισοδύναμα μεταξύ τους και εμφανίζονται ως δύο απλές κορυφές στα 1.07 και 1.22 ppm, αντίστοιχα
- Τα πρωτόνια της ακετυλομάδας (H-10) εμφανίζονται ως απλή κορυφή σε δ 2.19, ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια H-11, τα οποία είναι σχετικά αποθωρακισμένα λόγω της γειτνίασης με το διπλό δεσμό των θέσεων 2 και 3, συντονίζονται στα 1.74 ppm
- Σε δ 4.86 εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή το ολεφινικό πρωτόνιο H-3, ενώ σχετικά αποθωρακισμένο είναι και το πρωτόνιο H-1 που εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή σε δ 3.34.

Τα υπόλοιπα δεδομένα της α -διϋδροϊρόνης περιλαμβάνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Άτομο	^1H NMR (δ , J σε Hz) σε MeOD	^{13}C NMR (δ) σε CDCl_3 [474]
1	3.34 (1H, m)	50.5
2	-	135.4
3	4.86 (1H, br s)	122.7
4	2.43 (1H, dd, $J = 17.0 / 4.5$) / 2.30 (1H, dd, $J = 17.0 / 11.0$)	32.0
5	2.00 (1H, m)	38.7
6	-	36.2
7	2.55 (2H, m)	22.1
8	2.68 (2H, m)	45.7
9	-	208.5
10	2.19 (3H, s)	29.9
11	1.74 (3H, s)	22.6
12	1.01 (3H, d, $J = 6.7$)	14.5
13	1.07 (3H, s)	15.9
14	1.22 (3H, s)	26.4

Πίνακας 5.33 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR της ένωσης IGE-9



Εικόνα 5.43 Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης IGE-9

Η διϋδροιρόνη είχε ανιχνευτεί στο φρέσκο ρίζωμα του είδους *Iris germanica* [130] και στο αιθέριο έλαιο του ριζώματος του είδους *Iris germanica* και *Iris florentina* [113, 474]. Η ποσότητα της ουσίας, η οποία τελικά απομονώθηκε ήταν πολύ μικρή (< 1 mg), κυρίως λόγω της πτητικότητάς της, γεγονός το οποίο δεν επέτρεψε την αξιολόγηση των βιολογικών της ιδιοτήτων.

5.4. Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του *Iris germanica*

Στο μεθανολικό εκχύλισμα των υπόγειων τμημάτων του φυτού *I. germanica* (IGM) αρχικά πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με τη χρήση της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (FCPC). Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών με την εφαρμογή χρωματογραφίας στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20), καθώς και παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος.

5.4.1. Κλασμάτωση με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC2, C2)

Με σκοπό τη διευκόλυνση της απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζωμάτων του *Iris germanica* αρχικά κλασματώθηκε με την τεχνική του FCPC, όπως και στην περίπτωση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα. Η αλληλουχία διαφασικών συστημάτων διαλυτών καθορίστηκε με βάση αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες, οι οποίες είχαν αποδειχθεί αποτελεσματικές. Το κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων συστημάτων ήταν η καλή κλασμάτωση του ολικού εκχυλίσματος, καθώς η απομόνωση των συστατικών του με μία μόνο χρωματογραφική διαδικασία κρίθηκε δύσκολη λόγω της πληθώρας των δευτερογενών μεταβολιτών του.

Έτσι, το εκχύλισμα αναλύθηκε και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) και η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω §5.3.1. Η σημαντικότερη διαφορά έγκειται στα συστήματα που τελικά επιλέχθηκαν (Πίνακας 5.34), αφού σε αυτή την περίπτωση το εκχύλισμά μας ήταν πιο πλούσιο σε μεταβολίτες μέσης ή/και υψηλής πολικότητας.

Αριθμός Συστήματος	n-Heptane	EtOAc	EtOH	BuOH	H ₂ O + Acetic Acid 10%
1	10	5	5	0	10
2	5	10	5	0	10
3	1	14	5	0	10
4	1	12	5	2	10
5	1	9	5	5	10

Πίνακας 5.34 Τα διφασικά συστήματα διαλυτών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος IGM με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης

Τα ενενήντα πέντε παραληφθέντα κλάσματα ελέγχθηκαν με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) κανονικής αλλά και αντιστρόφου φάσεως σε διάφορα συστήματα, η μελέτη των οποίων οδήγησε στην πραγματοποίηση συνενώσεων. Έτσι, προέκυψαν 32 κλάσματα (fractions “C2F”), τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ <u>FCPC-2</u> (C2)	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2F1	1-13	1.6
C2F2	14	135.8
C2F3	15-16	365.4
C2F4	17-19	105.7
C2F5	20-22	24.6
C2F6	23-24	14.3
C2F7	25-26	13.3
C2F8	27-28	13.1
C2F9	29-30	11.1
C2F10	31-32	7.9
C2F11	33-36	8.1
C2F12	37	2.1
C2F13	38-40	7.1
C2F14	41-45	8.0
C2F15	46-48	6.6
C2F16	49-50	9.4
C2F17	51-52	22.1
C2F18	53-55	96.5
C2F19	56-59	158.7
C2F20	60	45.6
C2F21	61	30.4
C2F22	62-66	153.2
C2F23	67-68	102.7
C2F24	69-72	124.8

C2F25	73-80	170.4
C2F26	81	54.1
C2F27	82-83	627.5
C2F28	84-89	1059.4
C2F29	90	195.8
C2F30	91-92	338.4
C2F31	93-94	96.4
C2F32	95	5065.5

Πίνακας 5.35 Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού (FCPC2 ή C2) του εκχυλίσματος IGM

5.4.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών από κλάσματα του εκχυλίσματος IGM

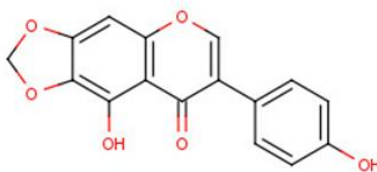
Από τα 32 κλάσματα που προέκυψαν μετά από επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική του FCPC αποφασίστηκε, με τη βοήθεια χρωματογραφικού ελέγχου TLC, η περαιτέρω μελέτη των κλασμάτων C2F7-C2F9, C2F16-C2F17, C2F19, C2F22, C2F24, C2F25, C2F25, C2F28 και C2F32. Η επεξεργασία των προαναφερόμενων κλασμάτων με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές και η απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών περιγράφεται στη συνέχεια.

5.4.2.1. Μελέτη των κλασμάτων 25-30 του FCPC-2 (C2F7- C2F9)

Τα κλάσματα C2F7- C2F9 παρουσίαζαν παρόμοια χρωματογραφική εικόνα στην TLC και αποφασίστηκε η συνένωσή τους και η περαιτέρω επεξεργασία τους με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος κανονικής φάσεως. Στο χρωματογράφημα και σε σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5 εμφανίστηκε μία χαρακτηριστική κηλίδα, η οποία απορροφούσε στα 254nm και μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης έδωσε πορτοκαλί χρώση, χαρακτηριστική των φαινολικών ενώσεων. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η περαιτέρω επεξεργασία του κλάσματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (prep-TLC), με σκοπό την παραλαβή του μεταβολίτη σε καθαρή μορφή. Έτσι, όλη η ποσότητα του δείγματος διαλύθηκε σε μεθανόλη και επιστρώθηκε σε δύο γυάλινες πλάκες silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Μετά από ανάπτυξη του χρωματογραφήματος στο προαναφερόμενο σύστημα ανάπτυξης, παραλήφθηκε η ουσία και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές.

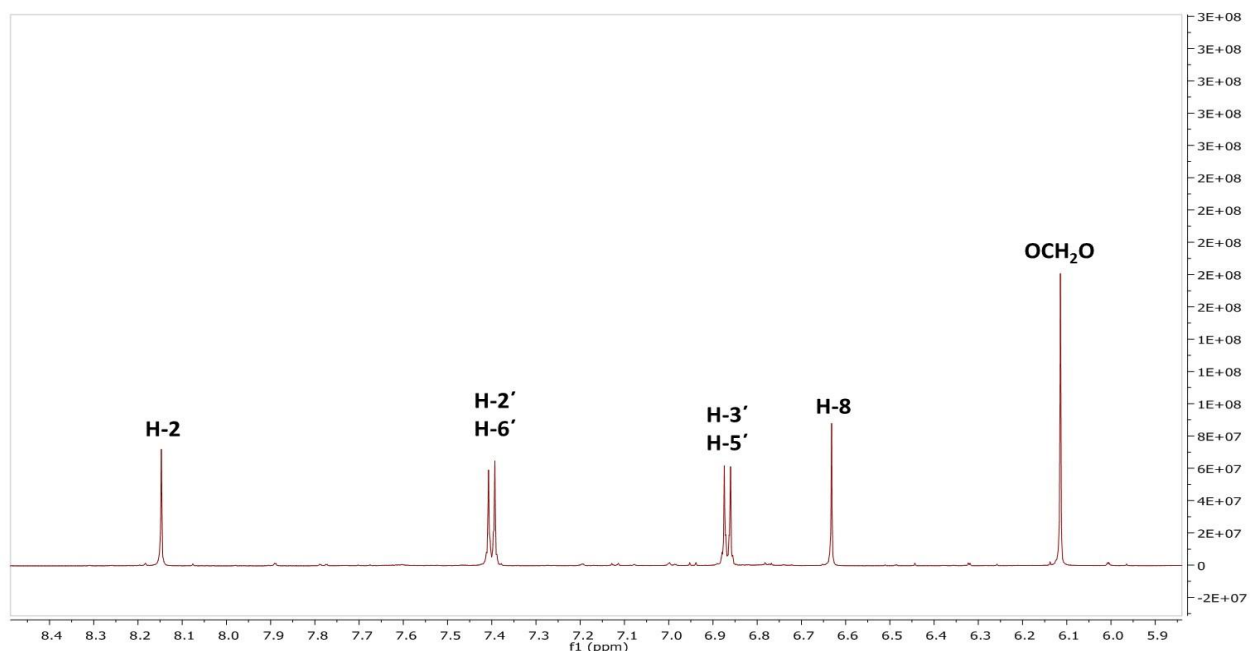
Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή και μεγάλη καθαρότητα (>95%) ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές μεθόδους (κυρίως NMR) ως 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυισοφλαβόνη (**IGM-1, NC23**).

- 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυισοφλαβόνη (IGM-1, NC23)



IGM-1 (NC23)

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ισοφλαβόνης **IGM-1** (Εικόνα 5.44) παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη **IGE-21** και πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται σε δ 8.15 η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-2, ενώ ο αντίστοιχος μεθινικός άνθρακας συντονίζεται στα 155.6 ppm. Επίσης, σε δ 6.63 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-8 ως απλή κορυφή, ενώ ο δακτύλιος B παρουσιάζει π-υποκατάσταση και επομένως τα τέσσερα αρωματικά πρωτόνια του εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές, σε δ 7.40 (2H, d, $J = 8.3$) και 6.87 (2H, d, $J = 8.3$), οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία. Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι η απλή κορυφή στα 6.12 ppm, η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθυλενοδιόξυ-ομάδα των θέσεων 6 και 7 του δακτυλίου A. Από την άλλη μεριά, η κύρια διαφοροποίηση έγκειται στην απουσία του σήματος που αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσεως 5.

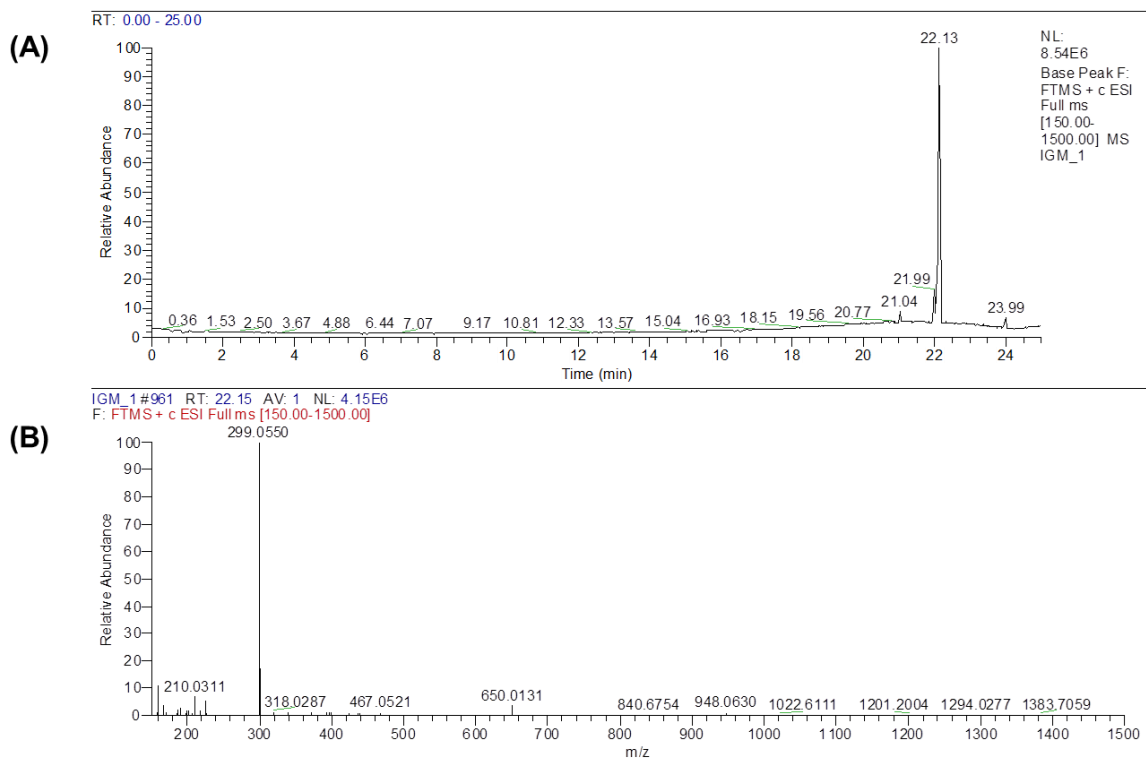


Εικόνα 5.44 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-1

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε MeOD	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε MeOD
2	8.15 (1H, s)	155.6
3	-	127.2
4	-	181.6
4a	-	107.8
5	-	142.0
6	-	129.9
7	-	154.4
8	6.63 (1H, s)	90.7
8a	-	154.1
1'	-	121.6
2'/6'	7.40 (2H, d, $J = 8.3$)	131.4
3'/5'	6.87 (2H, d, $J = 8.3$)	116.9
4'	-	157.5
OCH ₂ O	6.12 (2H, s)	104.6

Πίνακας 5.36 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-23



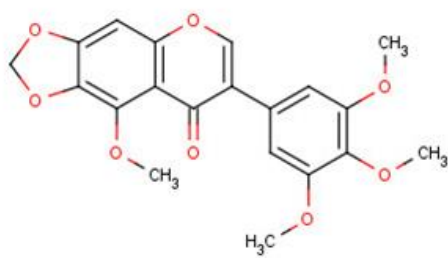
Εικόνα 5.45 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-1 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μ g /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=22.13$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=22.13$ min με $m/z=299.0550$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριλόνη (NC23)**

Ο μεταβολίτης “Ιριλόνη” (**NC23**) απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Iris germanica* [455], ενώ έκτοτε έχει εντοπισθεί και σε άλλα είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. pseudopumila* [459] και *I. pseudacorus* [475]. Επίσης, η 6,7-μεθυλενοδιοξυ-4',5-διϋδροξυισοφλαβόνη έχει απομονωθεί και από είδη άλλων οικογενειών, όπως είναι η περιπτώση του είδους *Ochna calodendron* της οικογένειας Ochnaceae [476]. Όσον αφορά τις βιολογικές ιδιότητες της ιριλόνης, έχουν ελεγχθεί οι αντιοξειδωτικές [459], η κυτταροπροστατευτική [134] και οι πιθανές νευροπροστατευτικές της ιδιότητες [460], αλλά η δραστηριότητά της δεν ήταν αξιόλογη.

5.4.2.2. Μελέτη των κλασμάτων 49-52 του FCPC-2 (C2F16- C2F17)

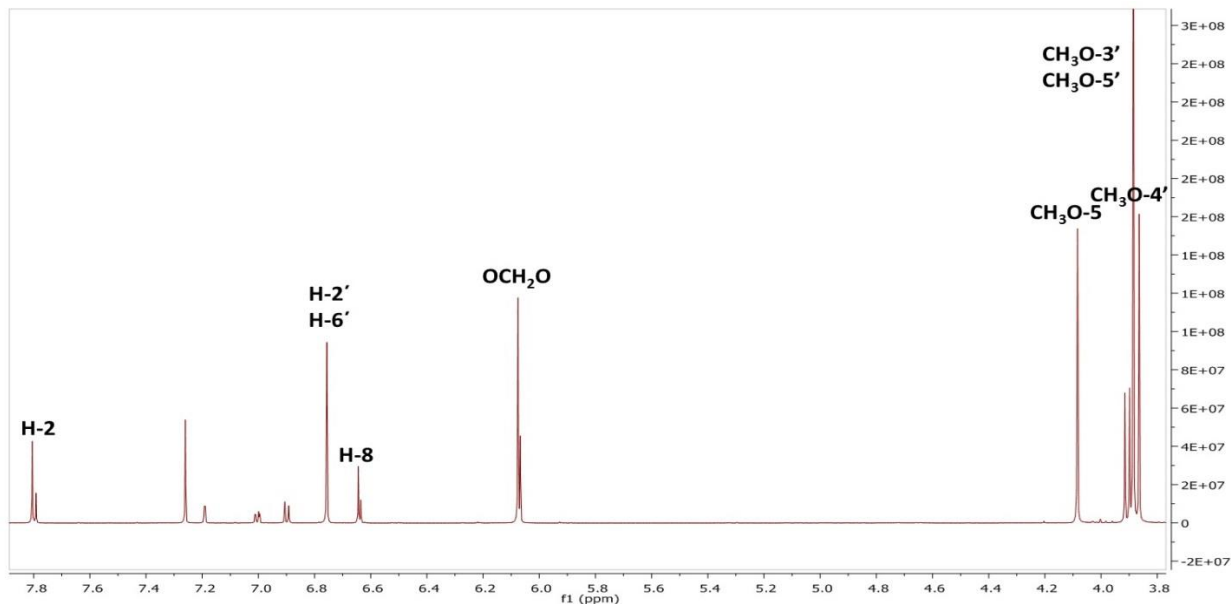
Τα κλάσματα C2F16- C2F17 παρουσίαζαν παρόμοια χρωματογραφική εικόνα στην TLC και αποφασίστηκε η συνένωσή τους και η περαιτέρω επεξεργασία τους με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος κανονικής φάσεως. Στο χρωματογράφημα και σε σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5 εμφανίστηκαν δύο κύριες ζώνες. Και οι δύο ενώσεις απορροφούσαν στα 254nm και μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης έδωσαν ελαφρώς πορτοκαλί χρώση. Με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό τους δοκιμάστηκαν διάφορα συστήματα ανάπτυξης και καταλήξαμε στο Toluene / EtOAc / Formic acid 80/20/2. Η παραλαβή των μεταβολιτών σε καθαρή μορφή έγινε με επεξεργασία του κλάσματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (prep-TLC), ανάπτυξη στο προαναφερόμενο σύστημα και παραλαβή τελικά τριών ζωνών A, B, C.

Ο μεταβολίτης της ζώνης A (**IGM-2**), του οποίου η καθαρότητα αξιολογήθηκε σε ~70%, έχει ήδη απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-2) και έχει ταυτοποιηθεί ως η ισοφλαβόνη «Ιρισφλορεντίνη» (**NC2**).

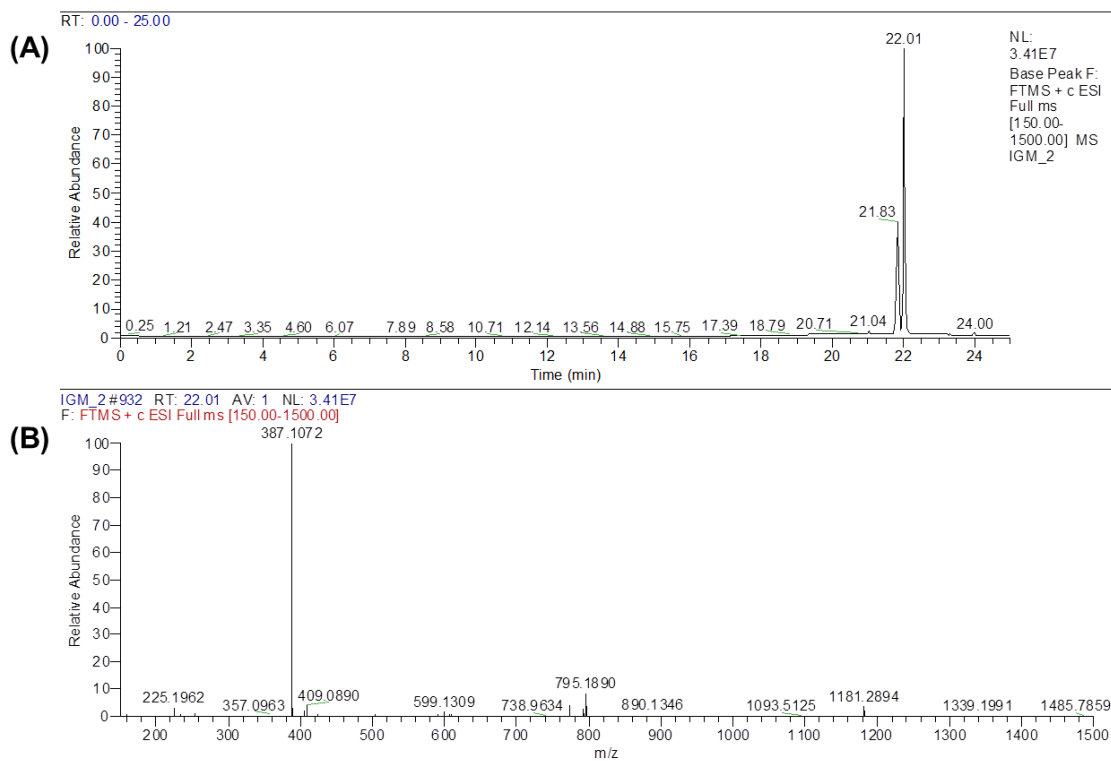


IGM-2 (NC2)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και το φάσμα μάζας της ένωσης IGM-2.



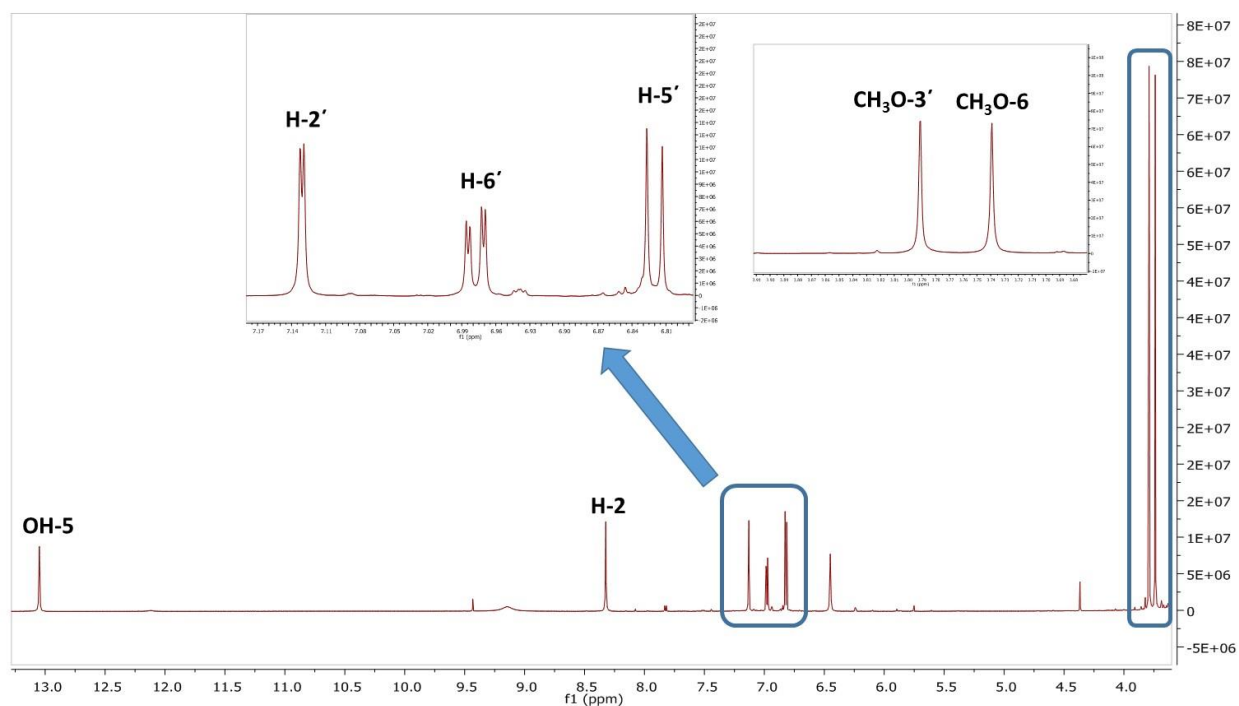
Εικόνα 5.46 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-2



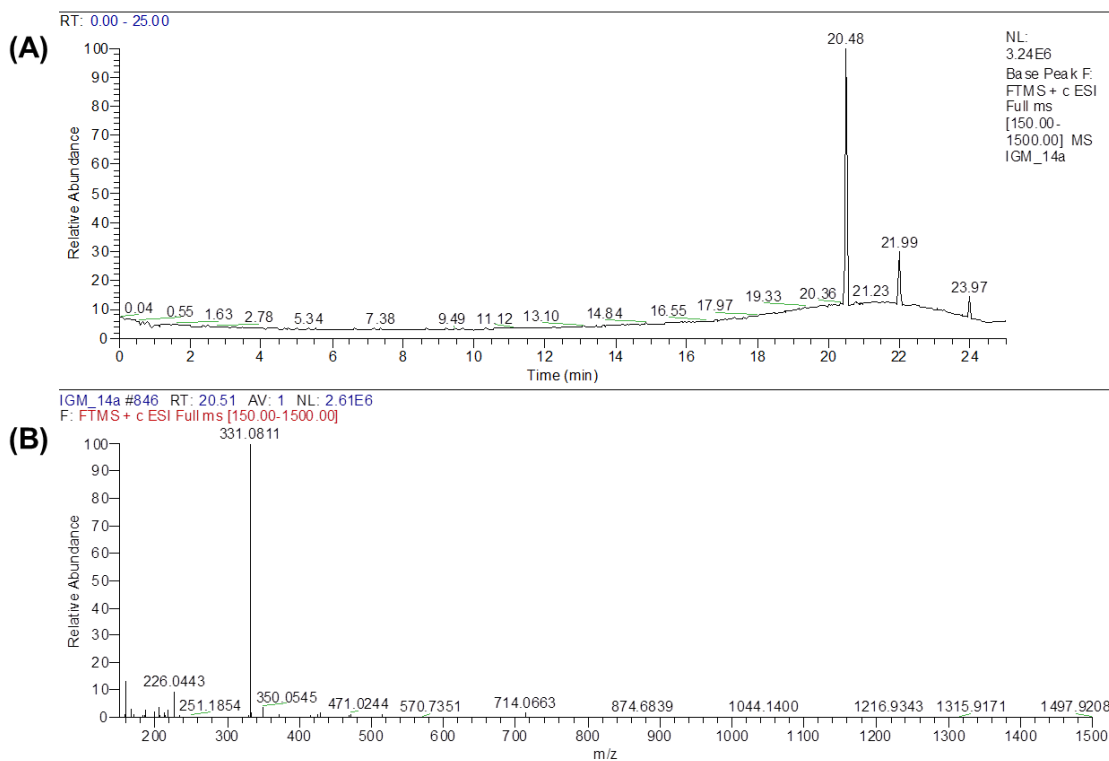
Εικόνα 5.47(A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-2 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=22.01$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=22.01$ min με $m/z=387.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισφλορεντίνη (NC2)**

Οι ζώνες B και C, όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη των αντίστοιχων φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, φάνηκε να περιέχει τον ίδιο κύριο μεταβολίτη αλλά σε διαφορετική καθαρότητα, η οποία αξιολογήθηκε ως ~60% και >90%, αντίστοιχα. Ο μεταβολίτης αυτός (**IGM-14**) ταυτοποιήθηκε ως 6,3'-διμεθοξυ-5,7,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη (**NC24**), η οποία έχει επίσης απομονωθεί από το εκχύλισμα IGE (IGE-5b).

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.



Εικόνα 5.48 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-14

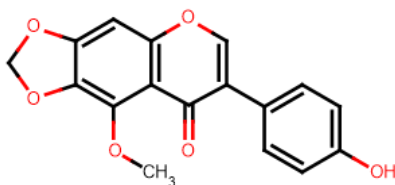


Εικόνα 5.49 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-14 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μ g/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.48$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.48$ min με $m/z=331.0811$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριστεκτοριγενίνη-B (NC24)**

5.4.2.3. Μελέτη των κλασμάτων 56-59 του FCPC-2 (C2F19)

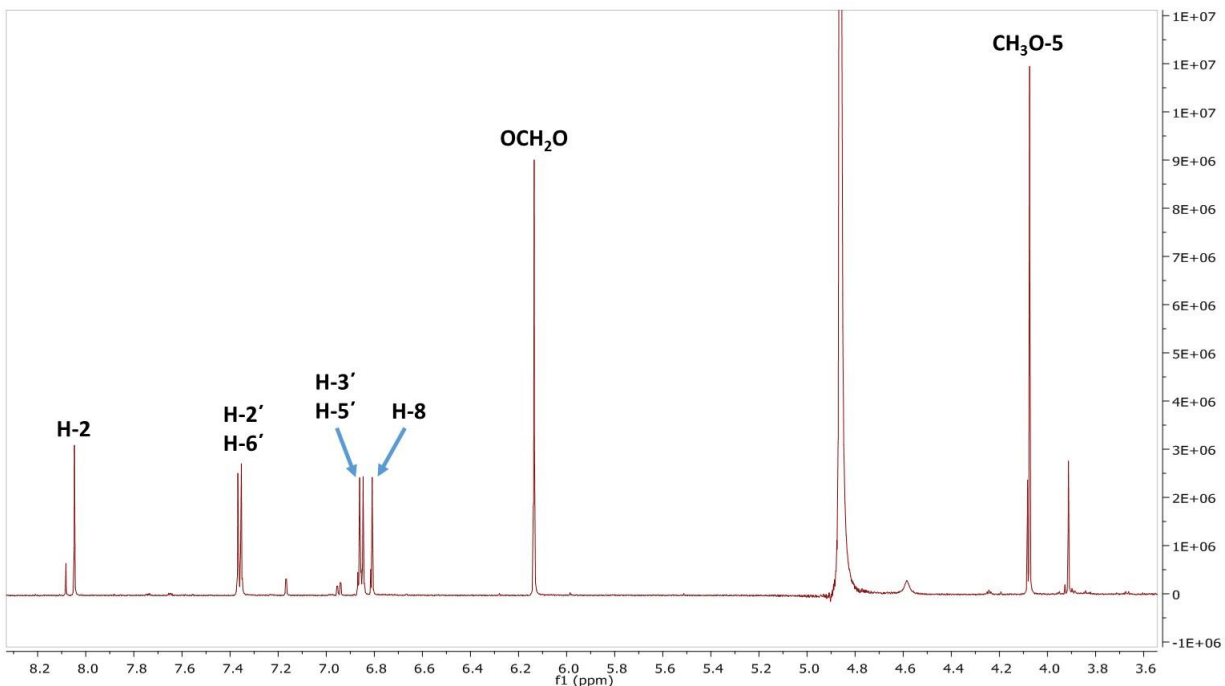
Με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος αποφασίστηκε να γίνει η επεξεργασία και του κλάσματος C2F19, στην οποία χρησιμοποιήθηκε σύστημα ανάπτυξης Toluene / EtOAc / Formic acid 80/20/2. Η επεξεργασία μετά την ανάπτυξη στο προαναφερόμενο σύστημα είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή πέντε ζωνών A, B, C, D και E.

Ο μεταβολίτης της ζώνης A (**IGM-20**), του οποίου η καθαρότητα υπολογίστηκε σε 85% περίπου (Εικόνα 5.50), έχει ήδη απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (**IGE-21**) και ταυτοποιήθηκε ως 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη ή Ιρισολόνη (**NC21**).

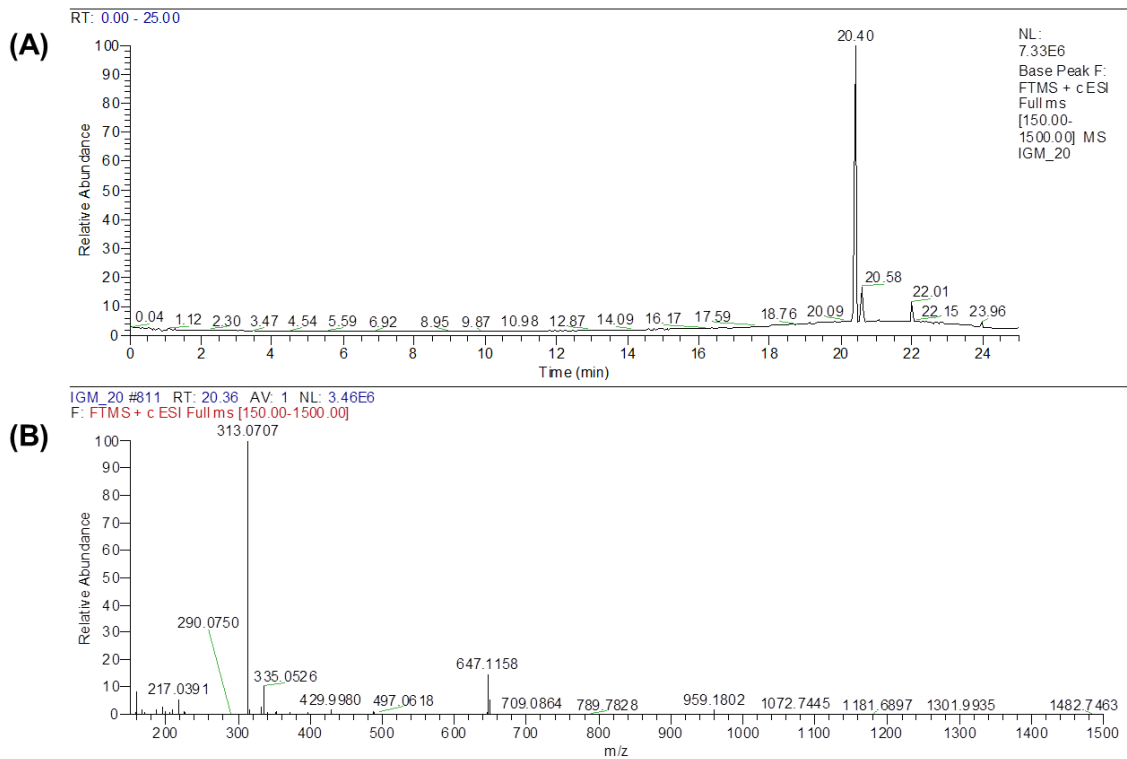


IGM-20 (NC21)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και το φάσμα μάζας.

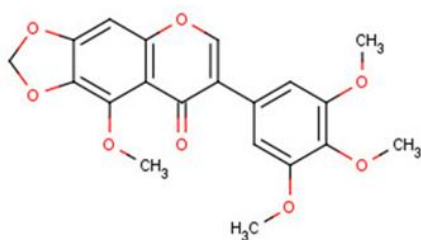


Εικόνα 5.50 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης IGM-20



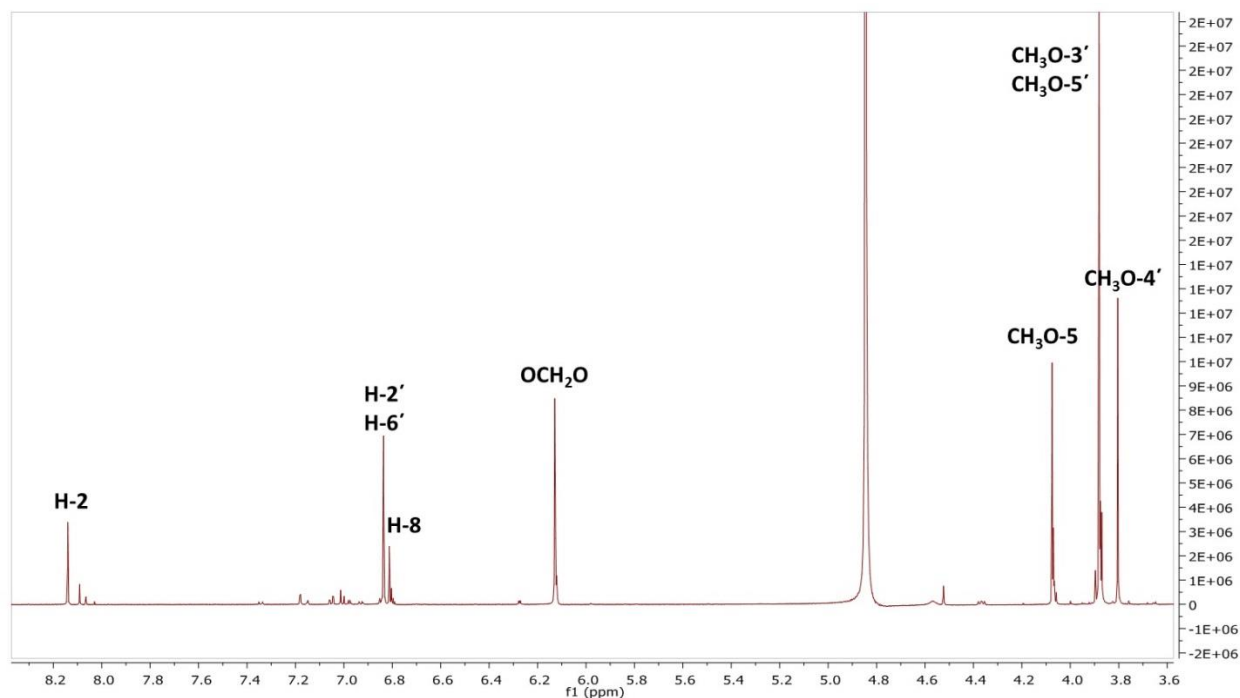
Εικόνα 5.51 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-20 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.40$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.40$ min με $m/z=313.0707$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριγενίνη (NC21)**

Ο μεταβολίτης της ζώνης Β (**IGM-21**), του οποίου η καθαρότητα υπολογίσθηκε σε 70% περίπου, έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-2) και από το IGM (IGM-2) και έχει ταυτοποιηθεί ως «Ιρισφλορεντίνη» (**NC2**).

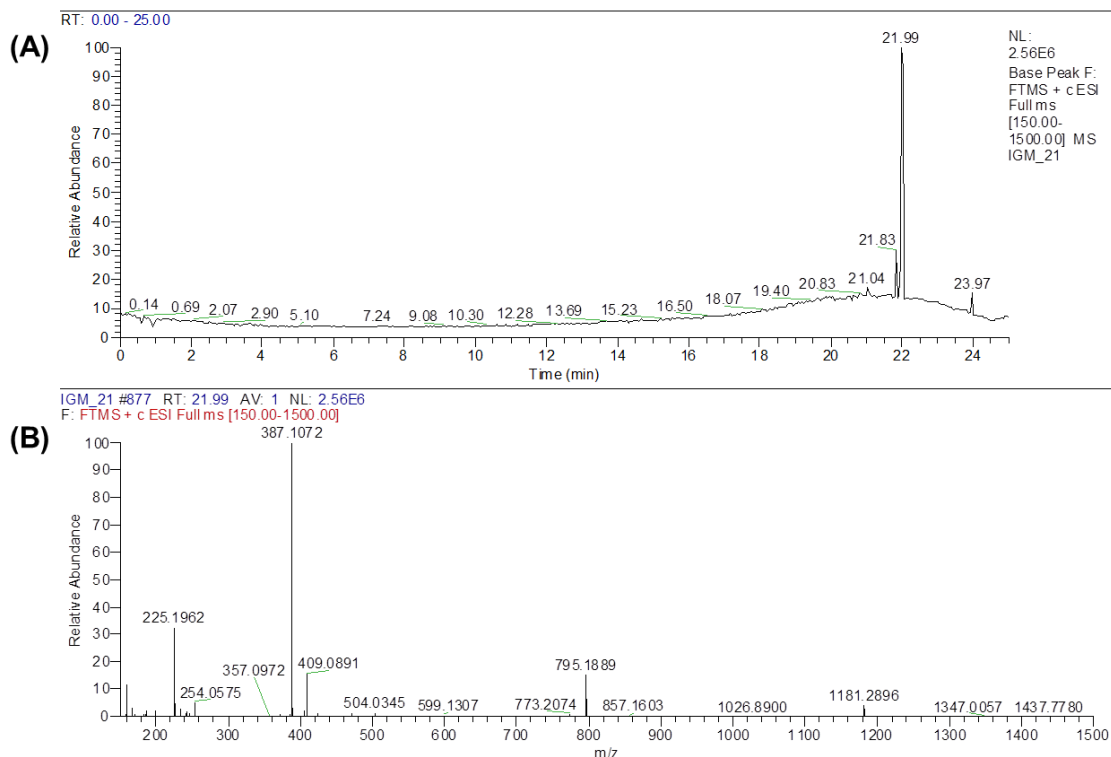


IGM-21 (NC2)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.

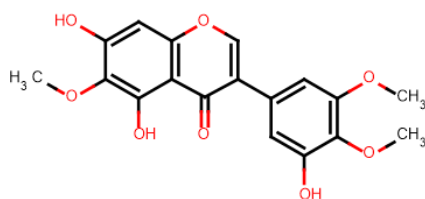


Εικόνα 5.52 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-21



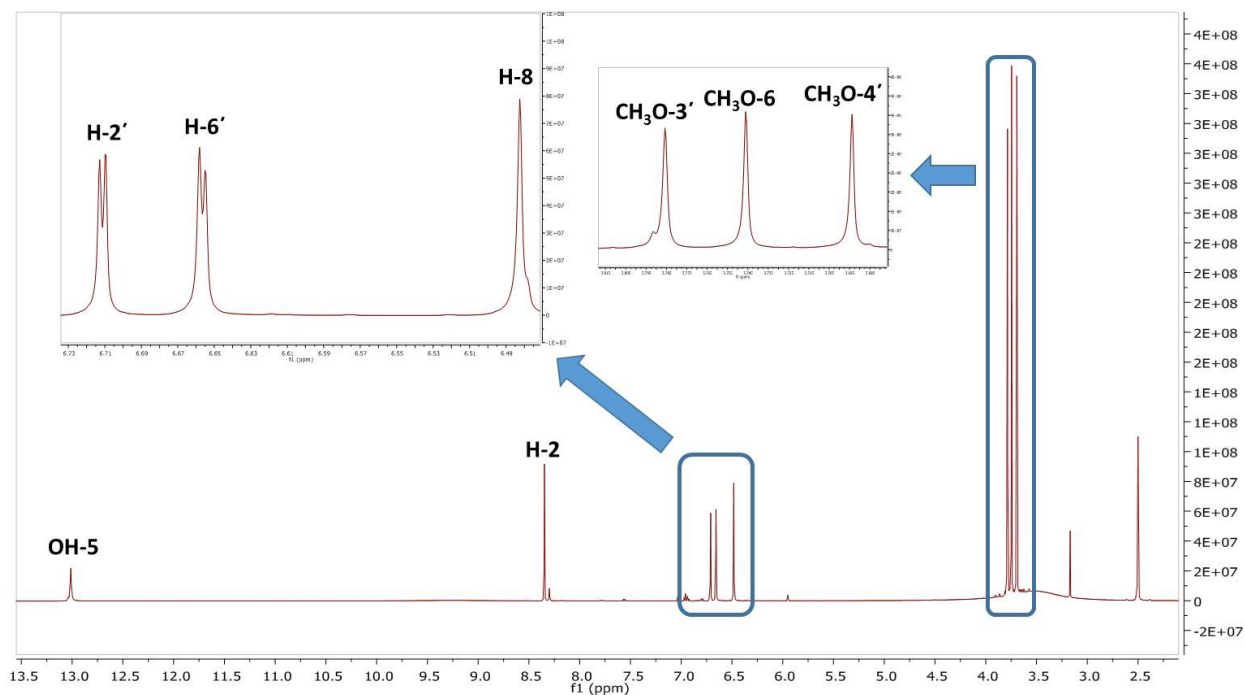
Εικόνα 5.53 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=21.99$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=21.99$ min με $m/z=387.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισφλορεντίνη (NC2)**

Στις ζώνες C και D ταυτοποιήθηκε η ισοφλαβόνη «Ιριγενίνη» (**IGM-13**) και η περιεκτικότητά της στη ζώνη D προσδιορίστηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Η ιριγενίνη (**NC20**) έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-20).

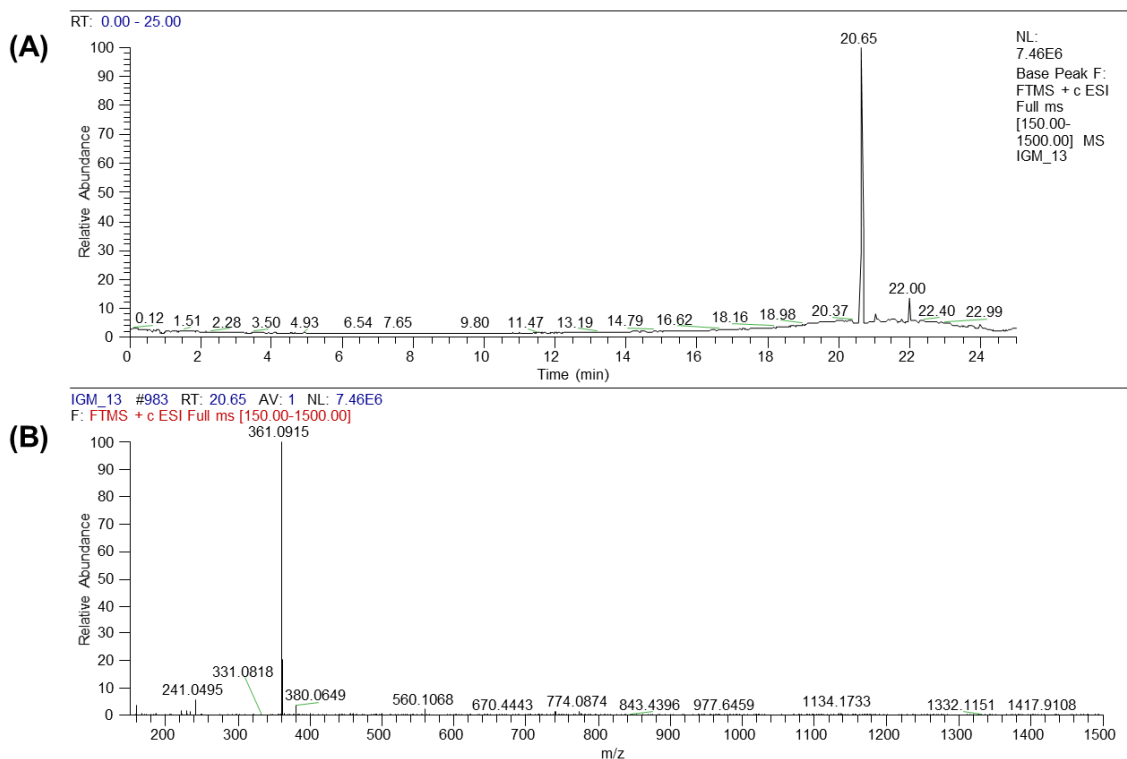


IGM-13 (NC20)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και το φάσμα μάζας.

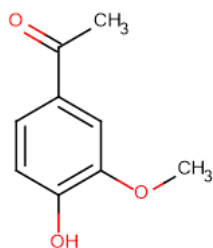


Εικόνα 5.54 Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης IGM-13



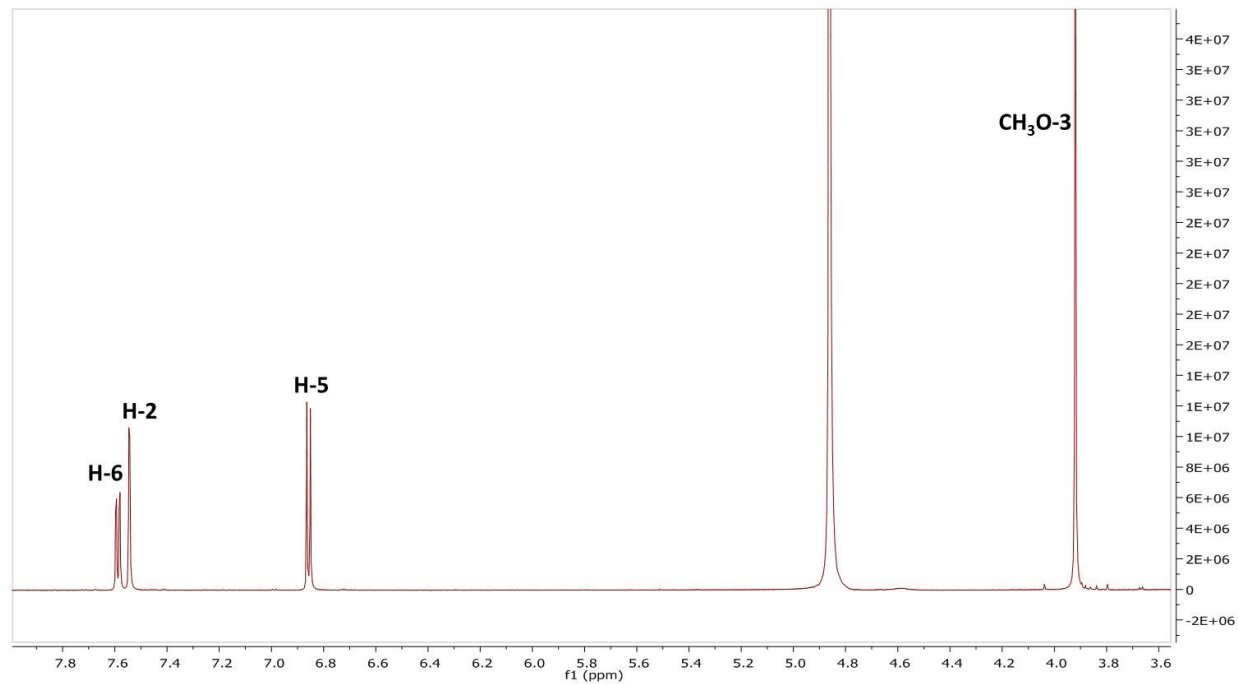
Εικόνα 5.55 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-13 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μ g /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.65$ min με $m/z=361.0915$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριγενίνη (NC20)**

Τέλος, η φασματοσκοπική ανάλυση του μεταβολίτη της ζώνης E (**IGM-23**) είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της ακετοφαινόνης “Αποκυνίνη” ή “Ακετοβανιλλόνη” (**NC3**, >90% καθαρότητα), ο οποίος απομονώθηκε επίσης από κλάσμα του εκχυλίσματος EtOAc των ριζών του *Iris germanica* (IGE-3).

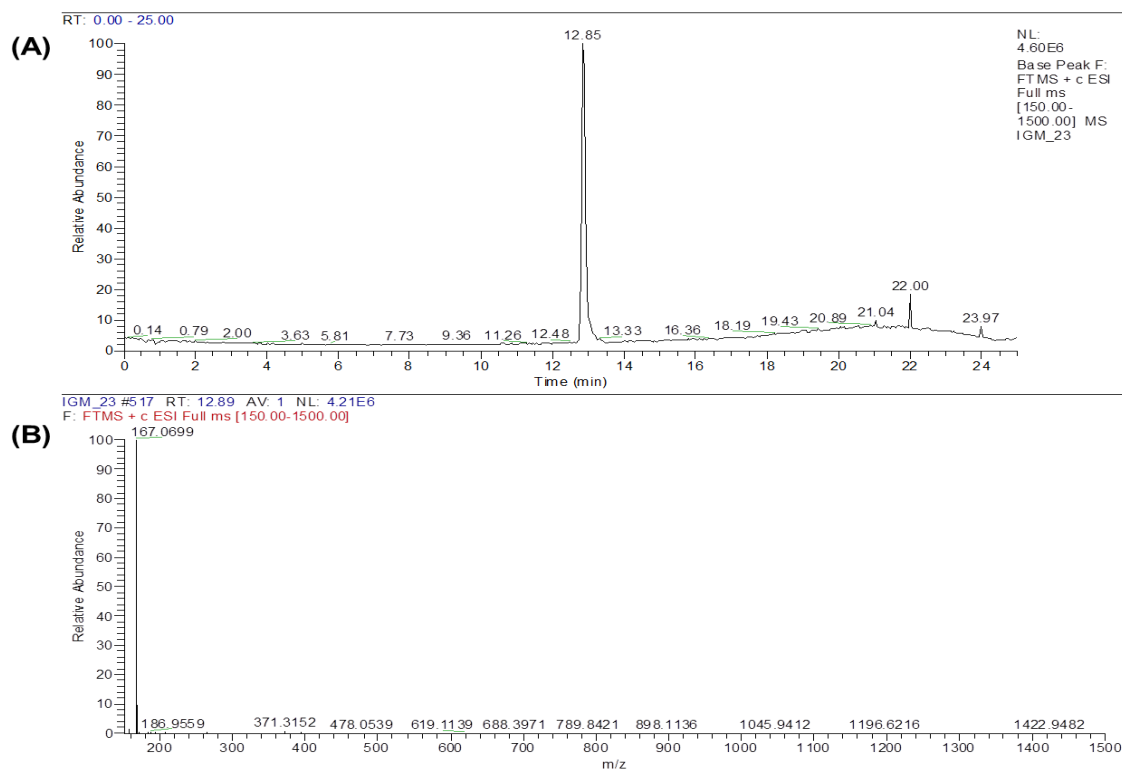


IGM-23 (NC3)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.



Εικόνα 5.56 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-23



Εικόνα 5.57 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-23 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=12.85$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=12.85$ min με $m/z=167.0699$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ακετοβανιλόνη (NC3)**

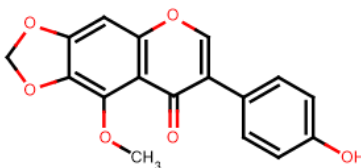
5.4.2.4. Μελέτη των κλασμάτων 62-66 του FCPC-2 (C2F22)

Το κλάσμα C2F22 φαίνεται να περιέχει δύο κύριες ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν απορρόφηση στα 254 nm, χωρίς όμως να χρωματίζονται έντονα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, αλλά και ενώσεις με αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Λόγω της πολυπλοκότητας του δείγματος, αποφασίστηκε η επεξεργασία του με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C2S3). Αναλύθηκαν περίπου 100 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 169 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν τελικά σε 23, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C2S3	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2S3F1	1-9	0.2
C2S3F2	10-30	3.4
C2S3F3	31-50	7.3
C2S3F4	51-56	4.6
C2S3F5	57-63	10.1
C2S3F6	64-68	15.5
C2S3F7	69-72	6.0
C2S3F8	73-77	10.1
C2S3F9	78-82	7.6
C2S3F10	83-91	10.2
C2S3F11	92-96	4.9
C2S3F12	97-101	4.5
C2S3F13	102-107	6.0
C2S3F14	108-115	14.1
C2S3F15	116-119	2.1
C2S3F16	120-123	3.0
C2S3F17	124-125	5.4
C2S3F18	126-128	1.0
C2S3F19	129-137	0.3
C2S3F20	138-148	2.3
C2S3F21	149-156	0.5
C2S3F22	157-167	1.6
C2S3F23	168-169	2.1

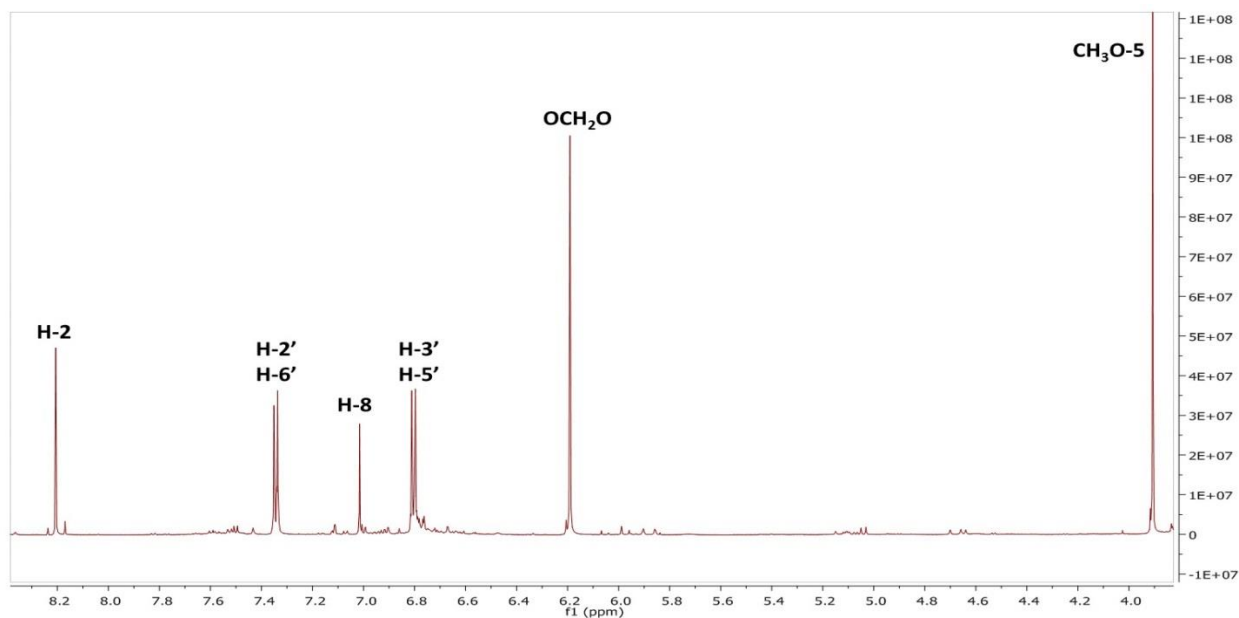
Πίνακας 5.37 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F22 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S3)

Η χρωματογραφική μελέτη των τελικών κλασμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι τα κλάσματα C2S3F14 και C2S3F15 περιείχαν την ίδια κύρια ουσία και σε υψηλότερη καθαρότητα στο κλάσμα C2S3F15 (**IGM-12**, > 90%). Πράγματι, η φασματοσκοπική μελέτη (Εικόνα 5.58) και των δύο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την ισοφλαβόνη «Ιρισολόνη» (**NC21**), η οποία έχει ταυτοποιηθεί ξανά σε κλάσματα των εκχυλισμάτων IGE (IGE-21) και IGM (IGM-20).

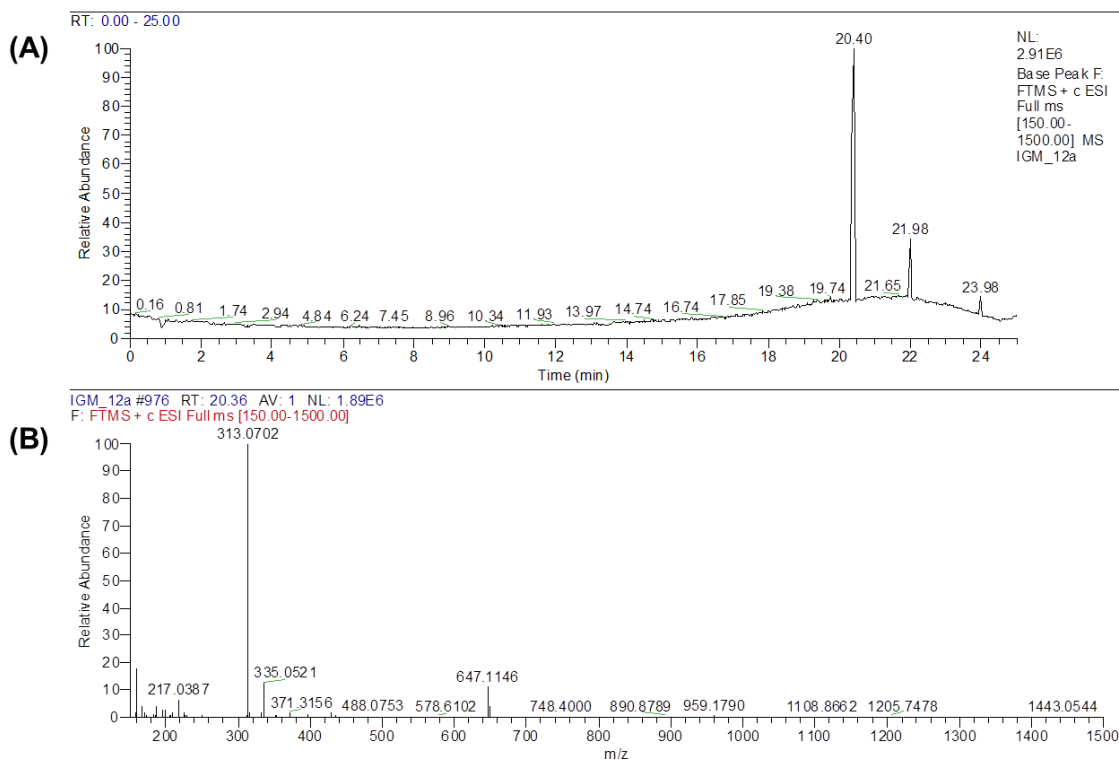


IGM-12 (NC21)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.

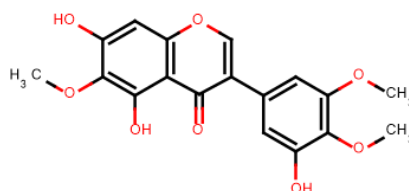


Εικόνα 5.58 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-12



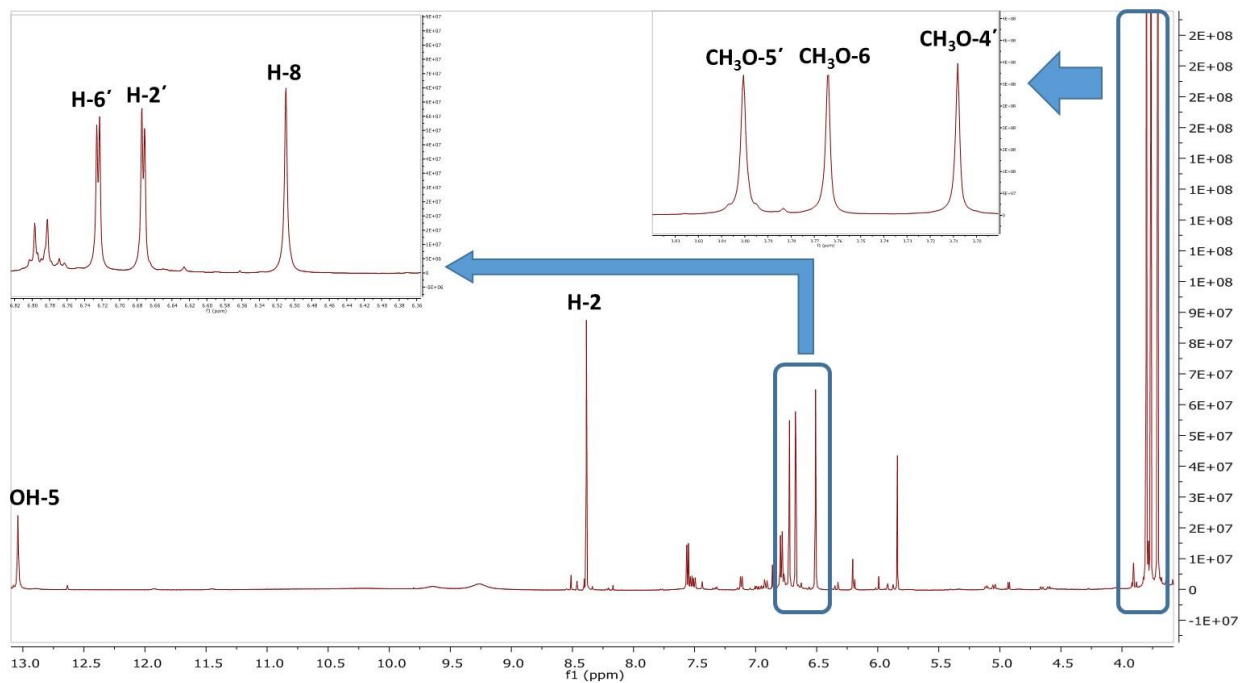
Εικόνα 5.59 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-12 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.40$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.40$ min με $m/z=313.0702$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισολόνη (NC21)**

Στο χρωματογραφικό έλεγχο TLC, τα κλάσματα C2S3F17 και C2S3F18 φάνηκε να περιέχουν την ίδια κύρια ουσία (**IGM-13b**) και αποφασίστηκε η συνένωσή τους. Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μιας (Εικόνα 5.60) και δύο διαστάσεων, από την μελέτη των οποίων ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως η ισοφλαβόνη «Ιριγενίνη» (**NC20**) με καθαρότητα περίπου 80%. Στην παρούσα μελέτη η ιριγενίνη έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-20) και από το IGM (IGM-13).



IGM-13b (NC20)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου.



Εικόνα 5.60 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-13b

5.4.2.5. Μελέτη των κλασμάτων 69-72 του FCPC-2 (C2F24)

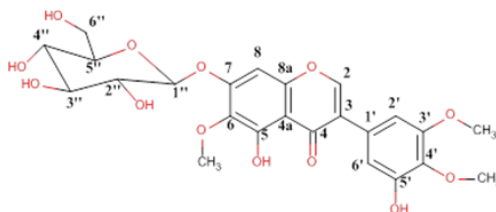
Το κλάσμα C2F24 φαίνεται να περιέχει τρεις κύριες ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν απορρόφηση στα 254 nm και χρωματίζονται γκρι μετά από ψεκασμό με θεϊκή βανιλίνη. Λόγω της παρόμοιας πολικότητας των ενώσεων αποφασίστηκε η περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C2S4). Αναλύθηκαν περίπου 100 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 72 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν τελικά σε 19, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C2S4	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2S4F1	1-14	2.9
C2S4F2	15-18	3.1
C2S4F3	19-22	3.9
C2S4F4	23-25	4.8
C2S4F5	26-28	3.8
C2S4F6	29-31	10.6
C2S4F7	32-34	7.3
C2S4F8	35-38	8.5
C2S4F9	39-40	2.4
C2S4F10	41	0.2
C2S4F11	42	2.8
C2S4F12	43-44	2.8
C2S4F13	45-49	8.9
C2S4F14	50-51	4.2
C2S4F15	52-53	4.1
C2S4F16	54-57	2.5
C2S4F17	58-60	2.0
C2S4F18	61-64	1.2
C2S4F19	65-72	2.5

Πίνακας 5.38 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F24 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S4)

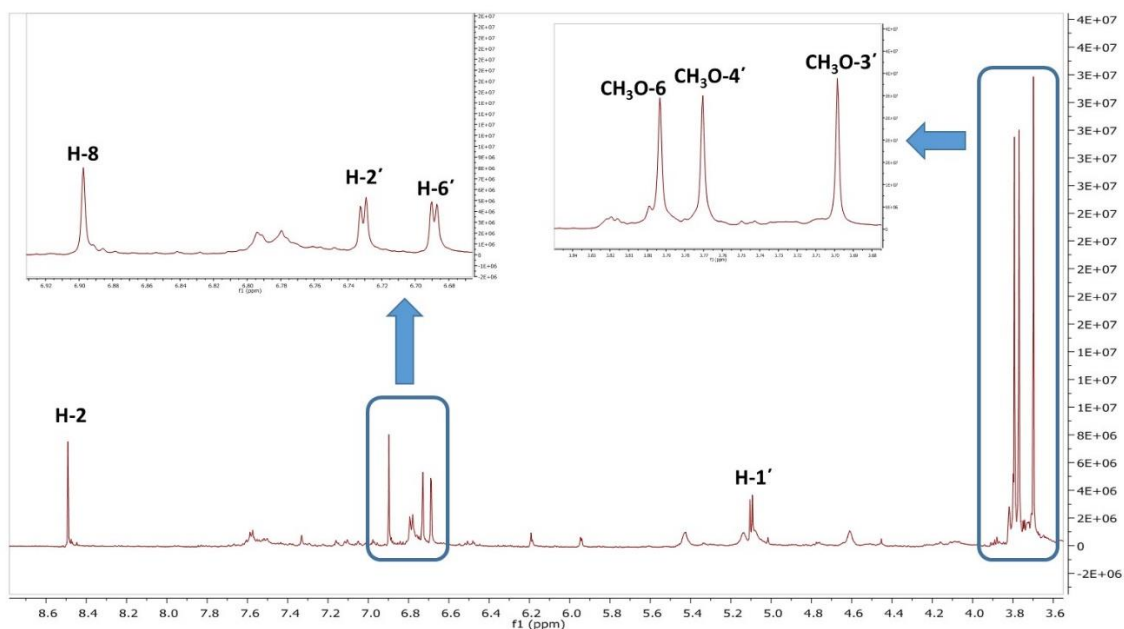
Η χρωματογραφική (TLC) αξιολόγηση των τελικών κλασμάτων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα κλάσματα C2S4F9 και C2S4F19 περιείχαν μία μόνο κύρια ουσία σε υψηλή καθαρότητα (> 90%), ενώ σε όλα τα υπόλοιπα παραλάβαμε μίγματα ουσιών.

Πράγματι, από τη φασματοσκοπική μελέτη (Εικόνα 5.61) του C₂S₄F₉ (**IGM-8**) ταυτοποιήθηκε η ισοφλαβόνη «Ιριδίνη» (**NC25**), η οποία έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-13a).

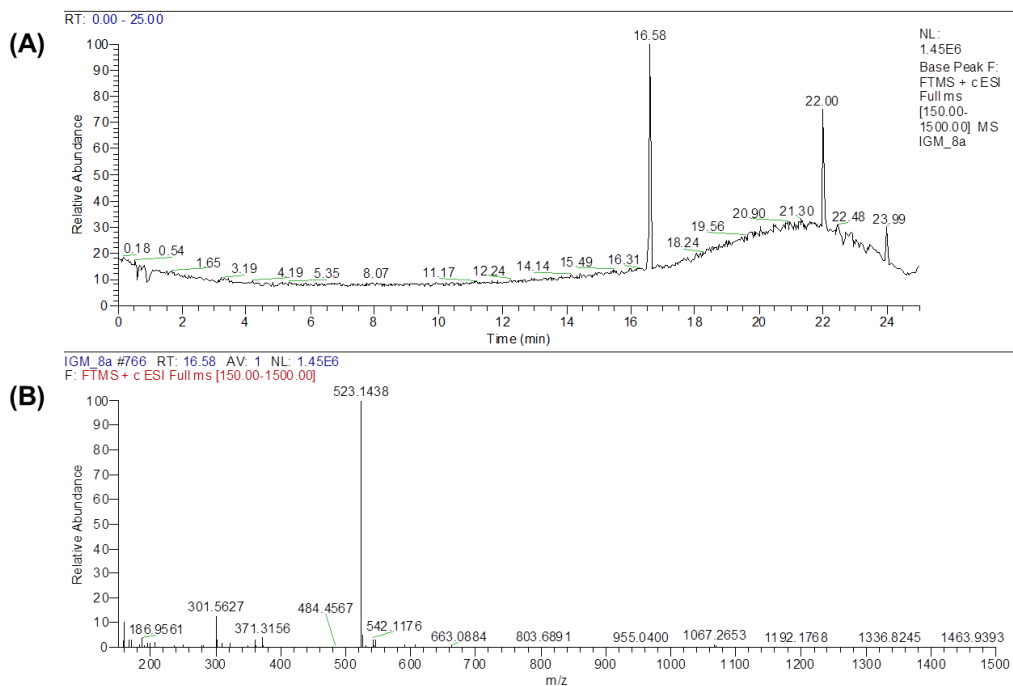


IGM-8 (NC25)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα πρωτονίου και μάζας.

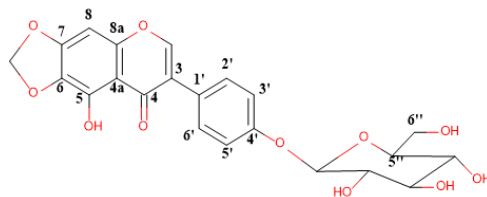


Εικόνα 5.61 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης IGM-8



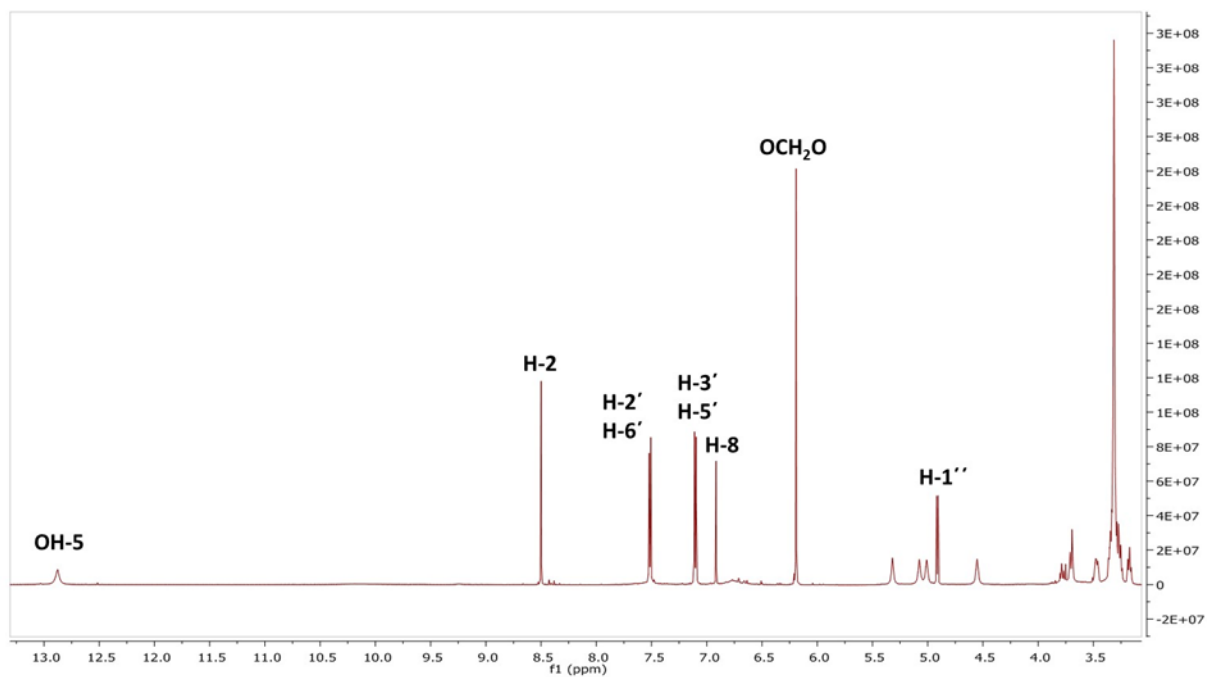
Εικόνα 5.62 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-8 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=16.58$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=16.58$ min με $m/z=523.1438$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριδίνη (NC25)**

Από τη φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος C2S4F19 (**IGM-11**) προέκυψε ότι πρόκειται για τον μεταβολίτη 4'-*O*- β -D-γλυκοπυρανοσίδης της ιριλόνης (**NC26**), ο οποίος έχει επίσης απομονωθεί από το εκχύλισμα IGE (IGE-26). Η καθαρότητά του προσδιορίστηκε σε 90% περίπου (Εικόνα 5.63).

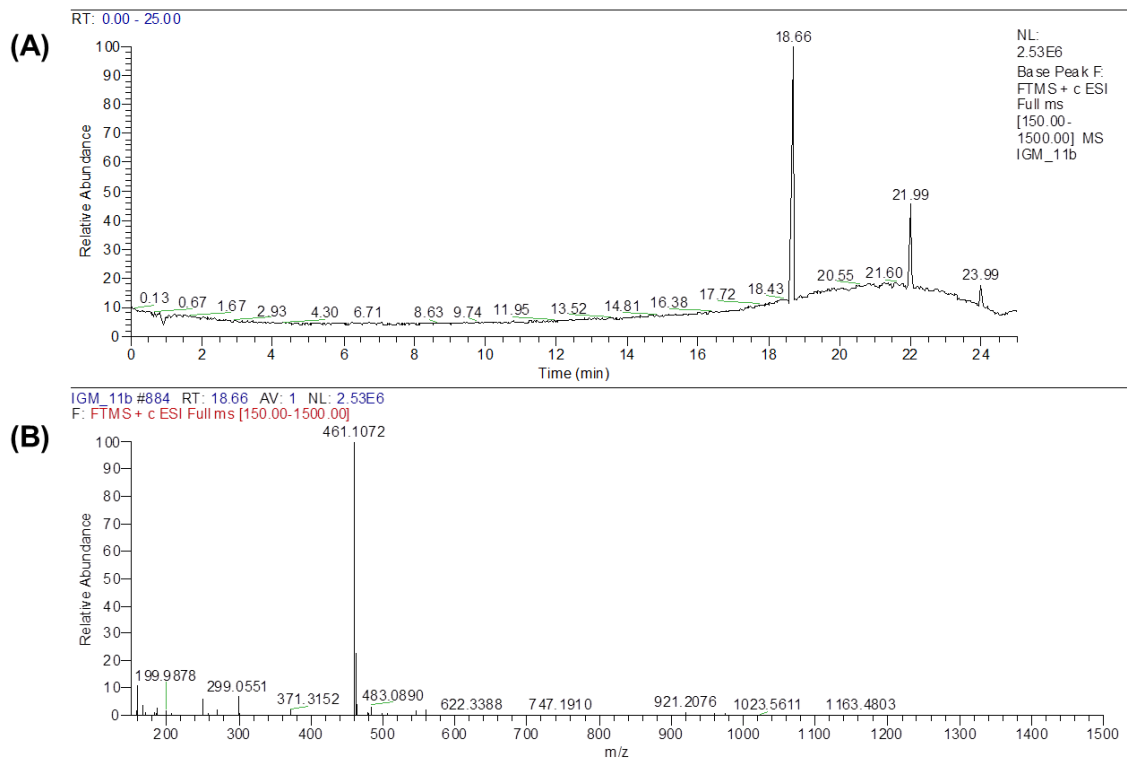


IGM-11 (NC26)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.



Εικόνα 5.63 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης IGM-11



Εικόνα 5.64 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-11 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=18.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=18.66$ min με $m/z=461.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **4'-O- β -D-γλυκοκυρανοσίδης της Ιριλόνης (NC26)**

5.4.2.6. Μελέτη των κλασμάτων 73-80 του FCPC-2 (C2F25)

Το κλάσμα C2F25, όπως φάνηκε από το χρωματογραφικό έλεγχο, περιείχε δύο κύριες ουσίες, οι οποίες παρουσίασαν απορρόφηση στα 254 nm και χρωματίζονταν γκρι μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη. Πιθανολογούμε ότι πρόκειται για τις ίδιες ενώσεις που απομονώθηκαν από το προηγούμενο κλάσμα, αλλά λόγω της μικρής ποσότητας που προέκυψε από την ανάλυση του C2F24 προχωρήσαμε στην επεξεργασία του δείγματος με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C2S5). Αναλύθηκαν περίπου 100 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 67 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν τελικά σε 13, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C2S5	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2S5F1	1-19	2.7
C2S5F2	20-25	8.3
C2S5F3	26-29	8.3
C2S5F4	30-35	23,2
C2S5F5	36-38	3.5
C2S5F6	39-40	5.9
C2S5F7	41-43	10.7
C2S5F8	44-46	7,9
C2S5F9	47-49	7,9
C2S5F10	50-53	7.2
C2S5F11	54-56	2.7
C2S5F12	57-60	5,1
C2S5F13	61-67	3.8

Πίνακας 5.39 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F25 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S5)

Πράγματι, τα κλάσματα C2S5F8 και C2S5F9 περιείχαν το μεταβολίτη «Ιριδίνη» (**IGM-8, NC25**) σε καθαρότητα > 80% και στις δύο περιπτώσεις, ενώ το κλάσμα C2S5F12 τον 4'-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδη της ιριδίνης (**IGM-11, NC26**) σε καθαρότητα > 90%. Και οι δύο μεταβολίτες έχουν απομονωθεί, τόσο από το εκχύλισμα IGE, όσο και από το IGM.

5.4.2.7. Μελέτη των κλασμάτων 84-89 του FCPC-2 (C2F28)

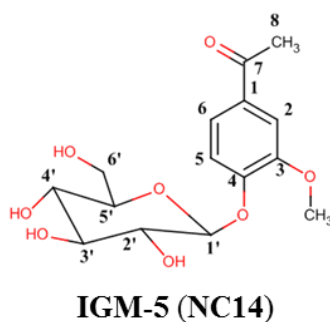
Από τον έλεγχο του χημικού φορτίου του κλάσματος C2F28, με χρωματογραφία TLC, τόσο κανονικής, όσο και αντιστρόφου φάσεως, διαπιστώθηκε η παρουσία αρκετών ενώσεων μέσης και υψηλής πολικότητας. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του δείγματος κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω επεξεργασία του με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C2S2). Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 250 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 165 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν τελικά σε 14, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C2S2	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2S2F1	1-30	5,7
C2S2F2	31-75	6,1
C2S2F3	76-81	19,6
C2S2F4	82-84	12,6
C2S2F5	85-89	19,5
C2S2F6	90-96	23,3
C2S2F7	97-104	22,5
C2S2F8	105-112	29,7
C2S2F9	113-116	17,4
C2S2F10	117-122	27,4
C2S2F11	123-133	30,5
C2S2F12	134-140	8,5
C2S2F13	141-146	4,6
C2S2F14	147-165	8,8

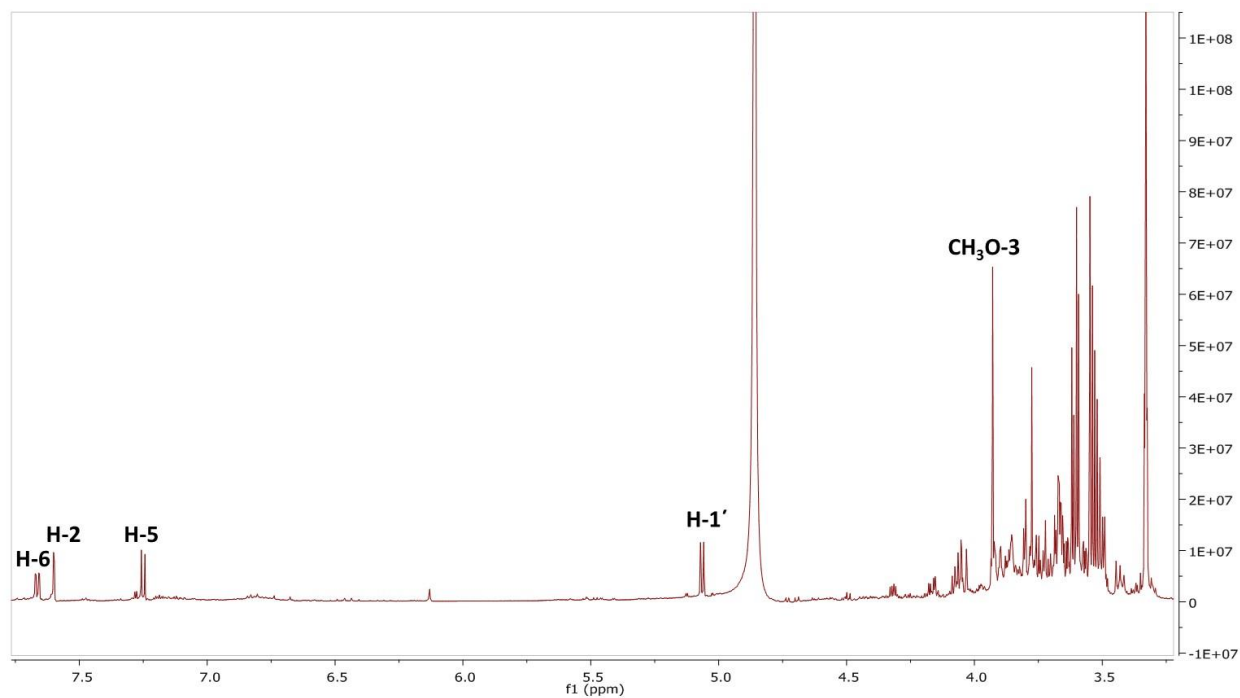
Πίνακας 5.40 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F28 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S2)

Με βάση τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής μελέτης των τελικών κλασμάτων αποφασίσθηκε η περαιτέρω χρωματογραφική και φασματοσκοπική ανάλυση οκτώ κλασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το κλάσμα C2S2F3 χαρακτηριζόταν από την παρουσία κυρίως ενός μεταβολίτη, ο οποίος απορροφούσε ελάχιστα στα 254 nm και έδωσε ερυθρή χρώση μετά από την εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλίνης. Έτσι, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του δείγματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών ανάπτυξης CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 85/15/1 και η ζώνη που παρουσίασε ενδιαφέρον εκχυλίστηκε με CH₂Cl₂/MeOH 70/30. Η απομονωμένη ένωση (IGM-5) ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά (Εικόνα

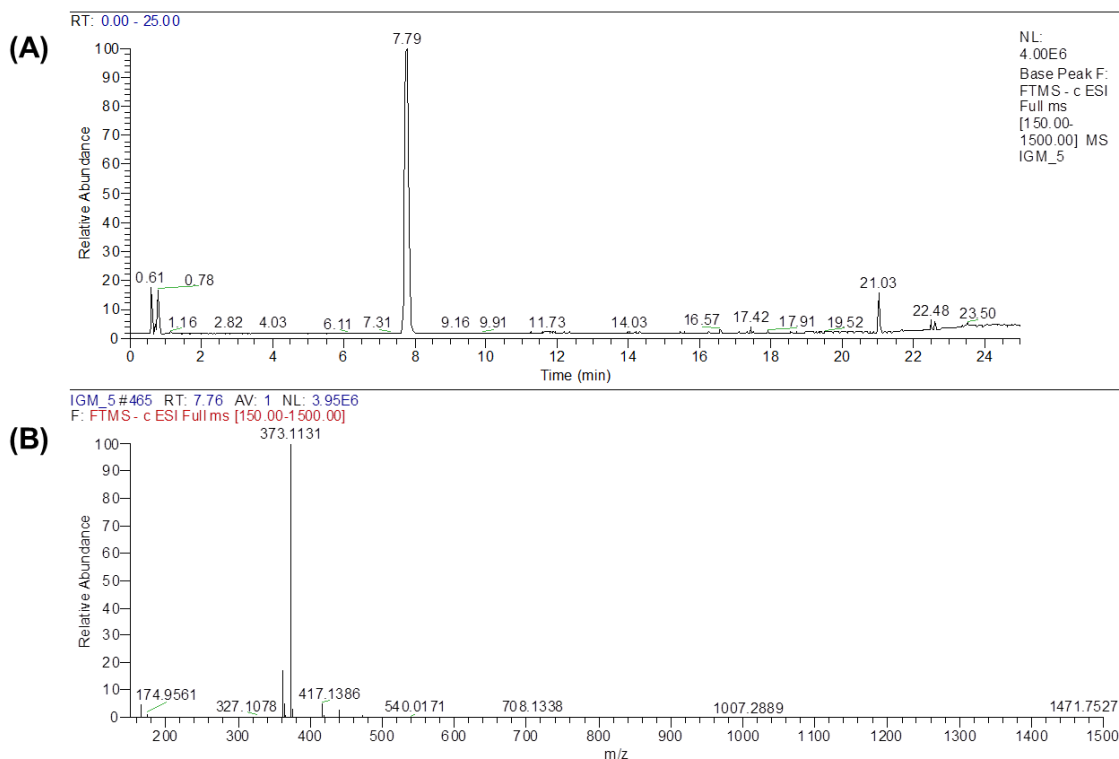
5.65) ως ο μεταβολίτης «Ανδροσίνη» ή «Γλυκοακετοβανιλλόνη» (NC14, καθαρότητας περίπου 60%), η οποία έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-14).



Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.

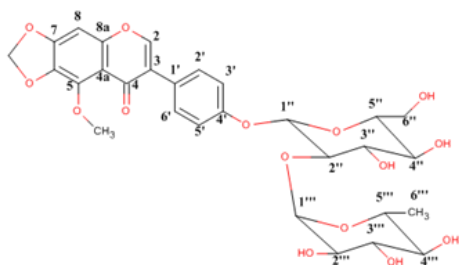


Εικόνα 5.65 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης IGM-5

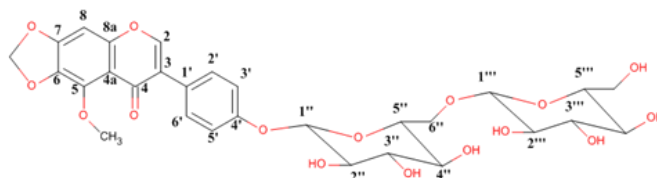


Εικόνα 5.66 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=7.79$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M-CO_2H_2-H]^+$ της κορυφής $t_R=7.79$ min με $m/z=373.1131$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ανδροσίνη (NC14)**

Εξαιτίας της πολικότητας των περιεχόμενων μεταβολιτών των υπολοίπων κλασμάτων έγινε χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος αντιστρόφου φάσεως με σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN 60/40. Από τον έλεγχο διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα C2S2F6 περιείχε κυρίως δύο μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσίαζαν απορρόφηση στα 254nm και έδωσαν γκρι χρώση μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Για την απομόνωσή τους σε καθαρή μορφή χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος αντιστρόφου φάσεως, η οποία αναπτύχθηκε στο προαναφερόμενο σύστημα ανάπτυξης και προέκυψαν δύο καλά διαχωριζόμενες ζώνες (A, B) που εκχυλίστηκαν με μεθανόλη. Η φασματοσκοπική ανάλυση της ζώνης A (Εικόνα 5.67) ανέδειξε την παρουσία του 4'-O-ραμνοπυρανοσυλο (1→2)γλυκοπυρανοσίδης της Ιρισολόνης (**IGM-6, NC17**, καθαρότητας ~90%), ενώ από τη ζώνη B (Εικόνα 5.69) ταυτοποιήθηκε ως Γεντιοβιοσίδης της Ιρισολόνης (**IGM-3, NC16**, καθαρότητας > 90%). Και οι δύο μεταβολίτες έχουν απομονωθεί από το εκχύλισμα IGE (IGE17 και IGE16, αντίστοιχα).

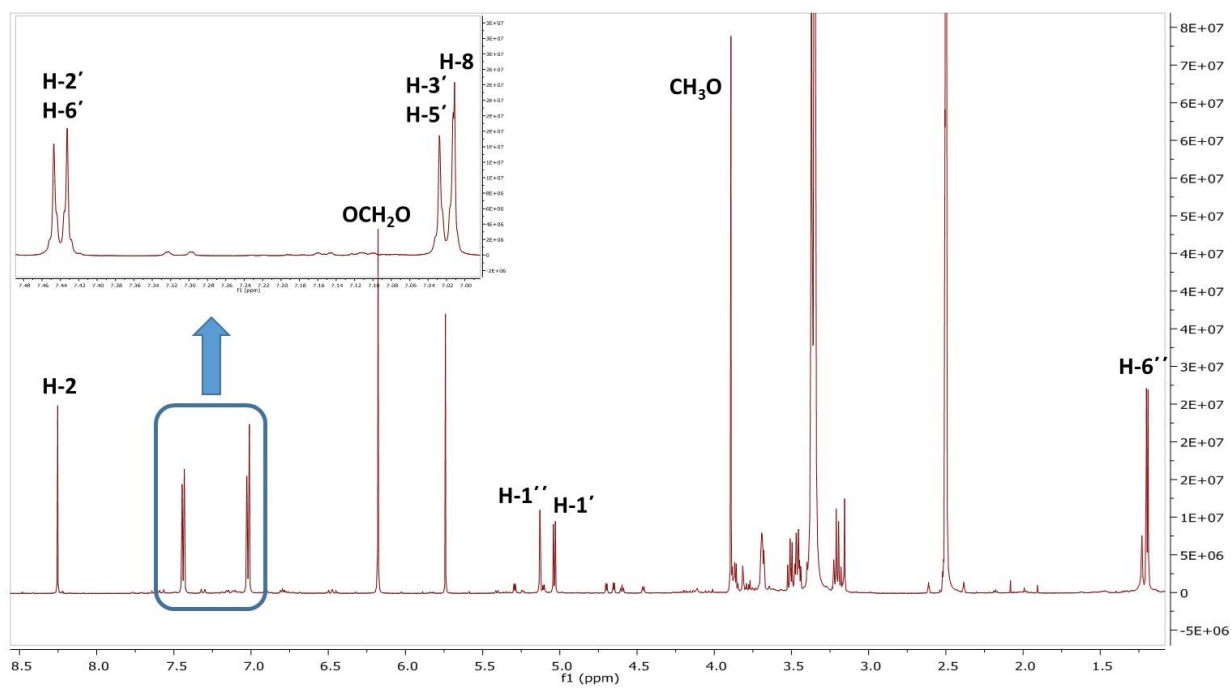


IGM-6 (NC-17)

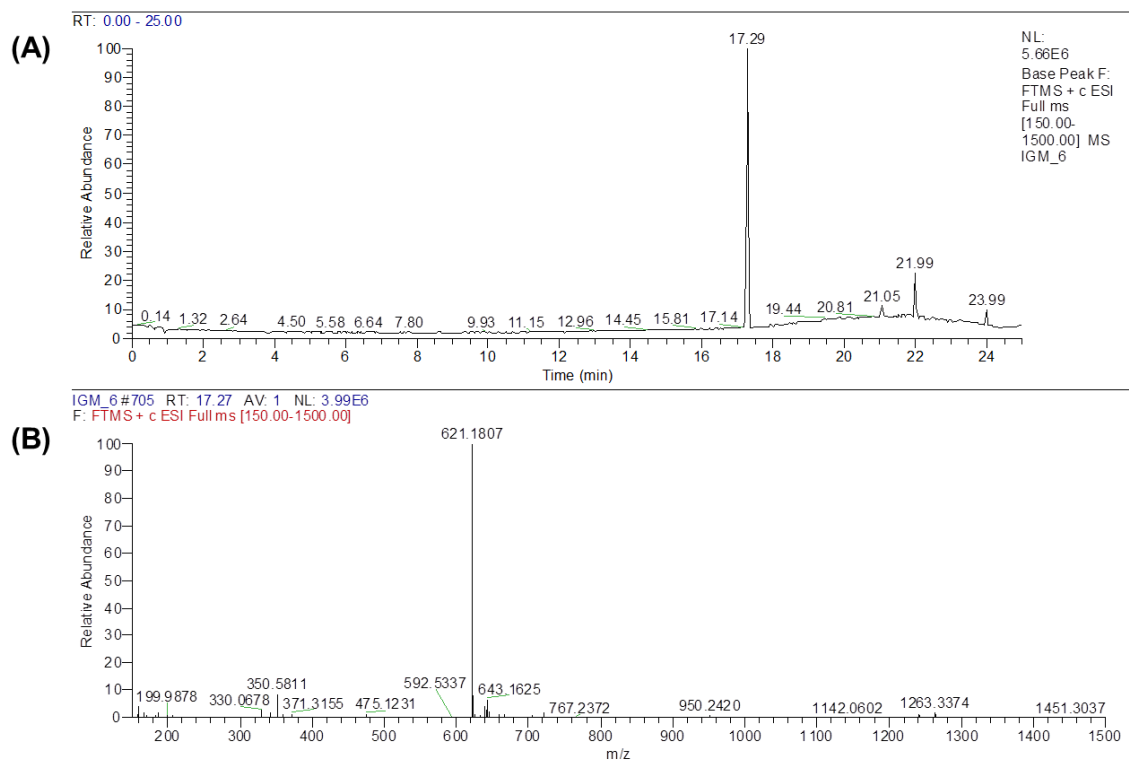


IGM-3 (NC-16)

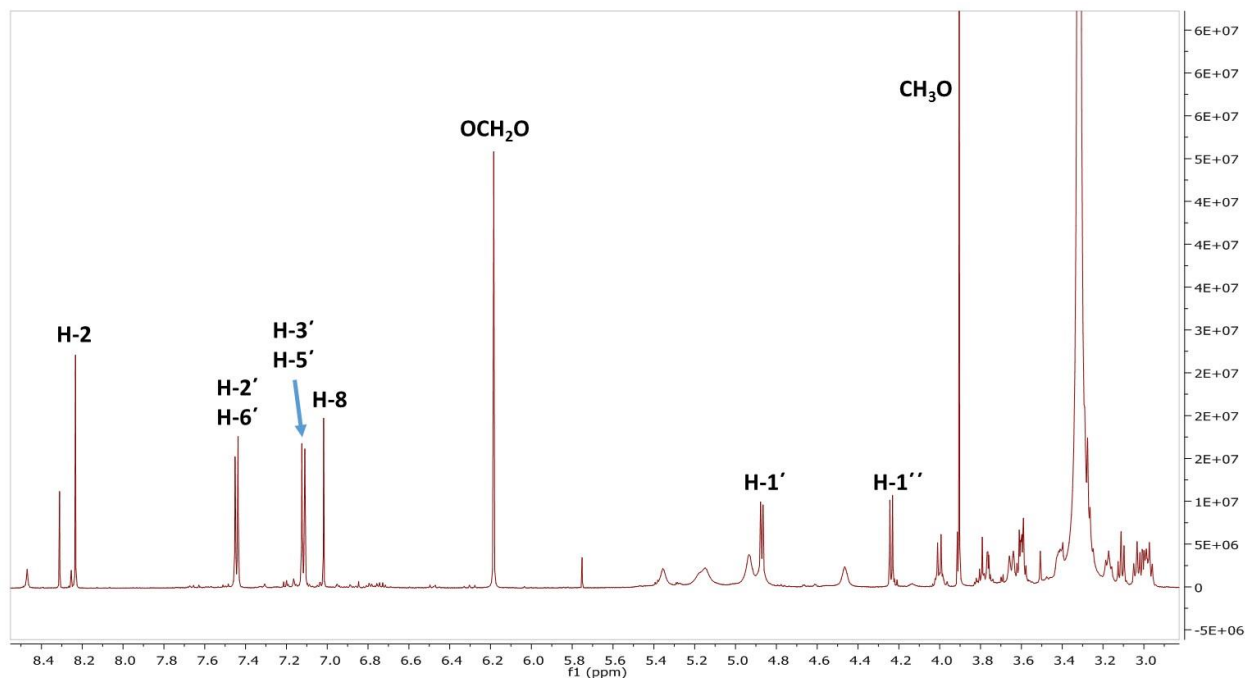
Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων των ενώσεων και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός τους τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα πρωτονίου και φάσμα μάζας.



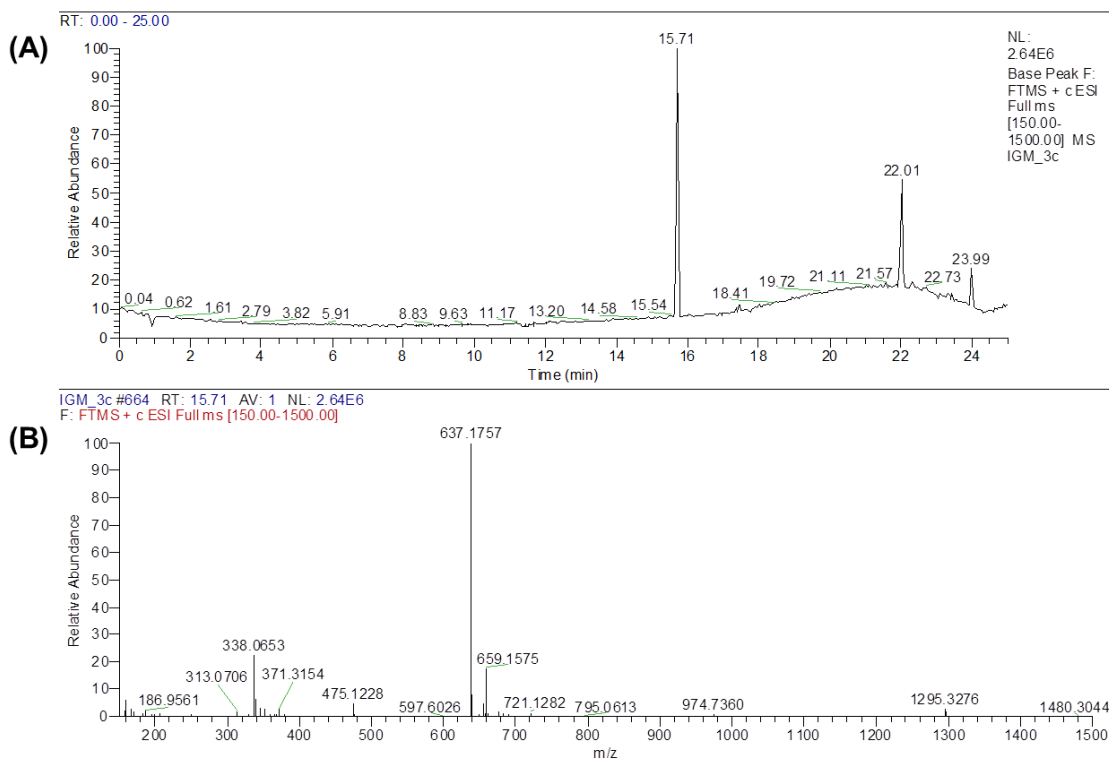
Εικόνα 5.67 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-6



Εικόνα 5.68 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-6 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.29$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.29$ min με $m/z=621.1807$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Βιοσίδη της Ιρισολόνης (NC17)**

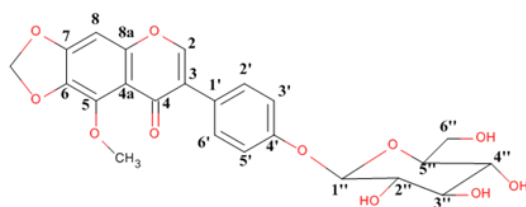


Εικόνα 5.69 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-3



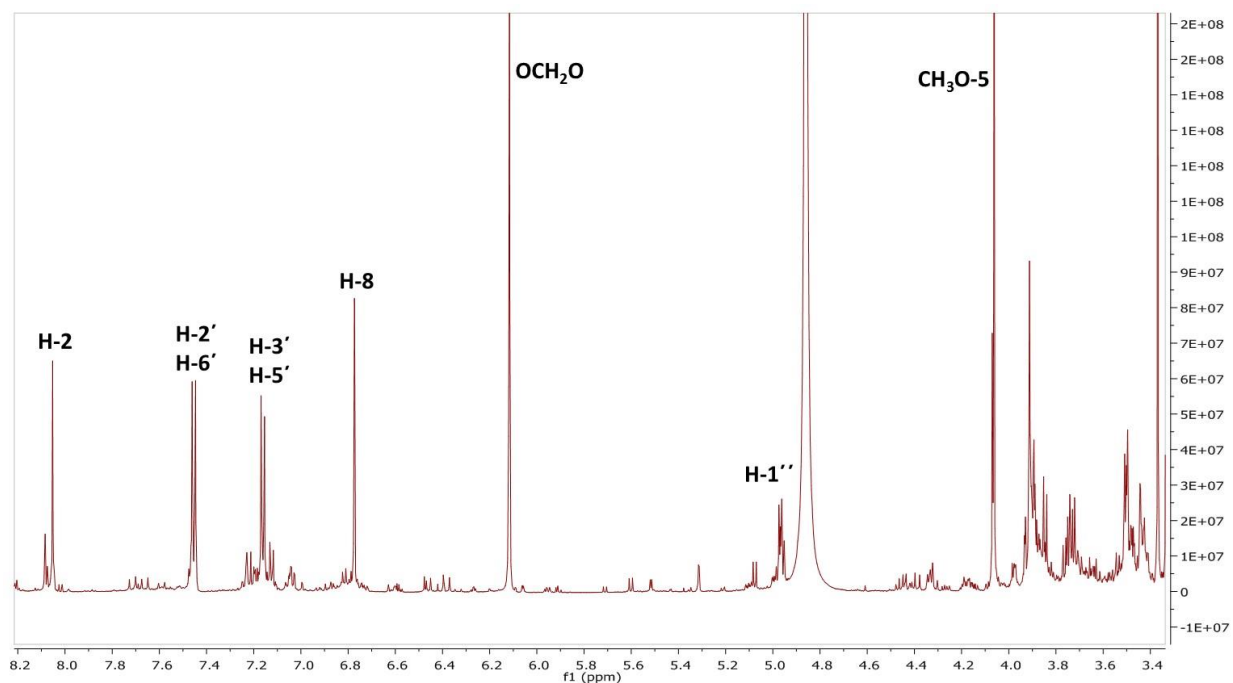
Εικόνα 5.70 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-3 επιπέδου συγκέντρωσης $1\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=15.71\text{ min}$ σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=15.71\text{ min}$ με $m/z=637.1757$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Γεντιοβιοσίδη της Ιρισολόνης (NC16)

Το κλάσμα C2S2F7 (**IGM-7**) φαίνεται να περιέχει μεταξύ άλλων έναν κύριο μεταβολίτη, ο οποίος μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη (Εικόνα 5.71) ταυτοποιήθηκε ως 4'-*O*-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ιρισολόνης ή Germanaism-B (**NC13**) με καθαρότητα περίπου 80%. Ο μεταβολίτης NC13 έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (IGE-13).

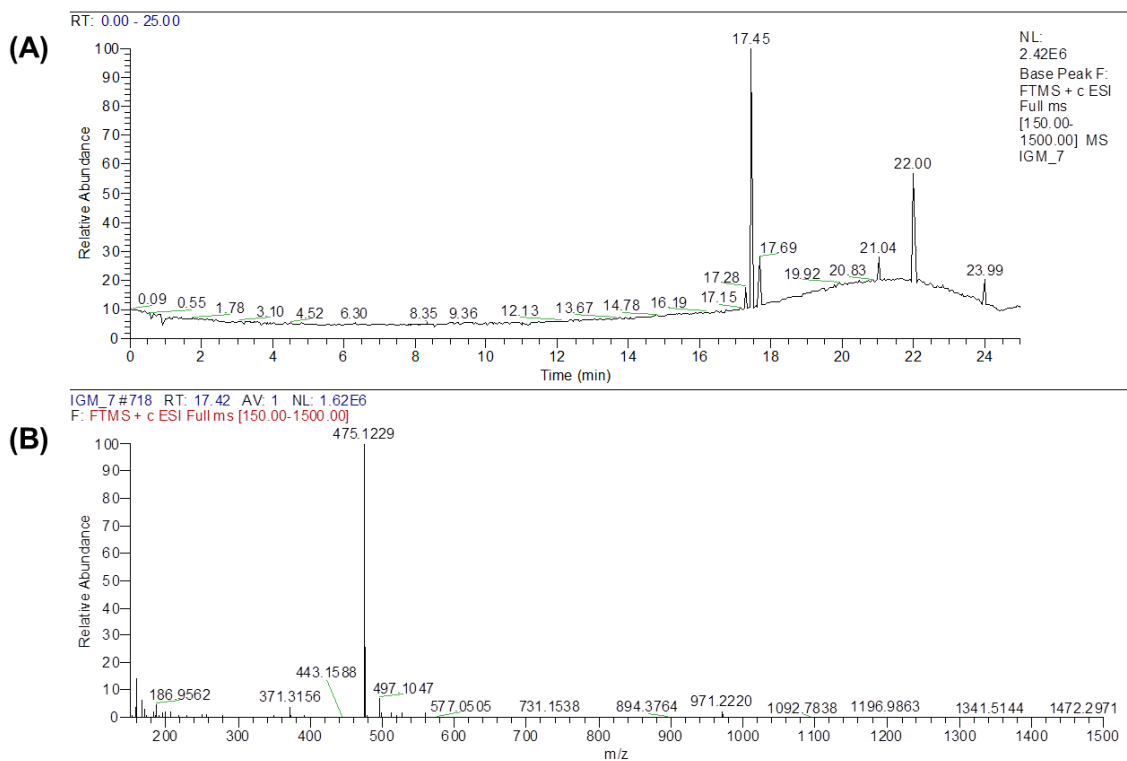


IGM-7 (NC13)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.



Εικόνα 5.71 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης IGM-7

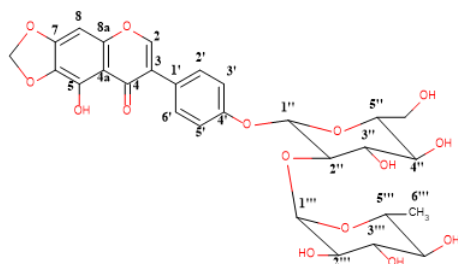


Εικόνα 5.72 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-7 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.45$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.45$ min με $m/z=475.1229$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Germanaism-B (NC13)**

Επίσης, ο προαναφερόμενος μεταβολίτης (**NC-13**) απομονώθηκε σε υψηλότερη καθαρότητα από τη ζώνη A του κλάσματος C2S2F8 (**IGM-17**), μετά από επεξεργασία του με παρασκευαστική TLC αντιστρόφου φάσεως και σύστημα ανάπτυξης $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ 60/40. Από την άλλη μεριά, ο μεταβολίτης της ζώνης B (**IGM-18**) του ίδιου κλάσματος ταυτοποιήθηκε ως «Ιριδίνη» (**NC25**) και έχει απομονωθεί και από προγενέστερο κλάσμα.

Το κλάσμα C2S2F11 χαρακτηρίζεται από δύο κύριους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσίασαν απορρόφηση στα 254nm και έδωσαν γκρι χρώση μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Χρησιμοποιώντας παρασκευαστική TLC αντιστρόφου φάσεως και σύστημα ανάπτυξης $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitrile}$ 60/40 επιτεύχθηκε η απομόνωση των δύο μεταβολιτών. Από τη φασματοσκοπική μελέτη της ζώνης A (**IGM-9**) αποδείχτηκε ότι ο περιεχόμενος μεταβολίτης ήταν ο 4'-O- α -L-ραμνοπυρανοσυλο-(1 \rightarrow 2)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης της ιριδίνης (**NC15**, καθαρότητας

90%), ενώ η ζώνη B (**IGM-16**) περιείχε τους μεταβολίτες «Ιριδίνη» (**IGM-8, NC25**) και τον 4'-γεντιοβιοσίδη της ιριλόνης (**IGM-4, NC18**).



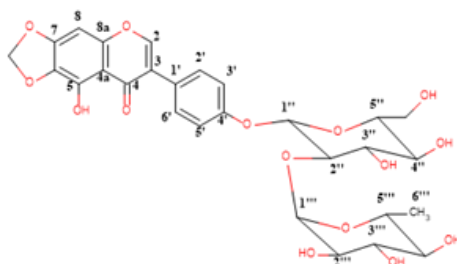
IGM-9 (NC15)

Επίσης, ο 4'-*O*- α -L-ραμνοπυρανοσυλ-(1 \rightarrow 2)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης της ιριλόνης (**IGM-9**) εντοπίστηκε και στο κλάσμα C2S2F12, αλλά σε μικρότερη καθαρότητα (~ 70%) συγκριτικά με το προηγούμενο δείγμα.

Τέλος, το κλάσμα C2S2F14 διαπιστώθηκε ότι περιείχε δύο μεταβολίτες, οι οποίοι λόγω μικρής ποσότητας του δείγματος δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστούν μεταξύ τους. Ωστόσο από τη φασματοσκοπική ανάλυση του κλάσματος επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση της μαγκκιφερίνης (**IGM-10, NC22**) σε μίγμα με τον 4'-*O*- β -D-γλυκοπυρανοσίδα της ιριλόνης (**IGM-11, NC26**) σε αναλογία 3/1 περίπου. Η μαγκκιφερίνη, σε αντίθεση με τον 4'-*O*- β -D-γλυκοπυρανοσίδα της ιριλόνης, δεν έχει απομονωθεί από το εκχύλισμα IGE.

- 4'-O-ραμνοπυρανοσυλο (1→2) γλυκοπυρανοσίδης της 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξισοφλαβόνης (IGM-9, NC15)

Ο μεταβολίτης **IGM-9** παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης έδωσε υποκίτρινη και στη συνέχεια γκρί χρώση.



IGM-9 (NC15)

Η ένωση **IGM-9** παρουσιάζει παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά με το μεταβολίτη **IGE-17**. Όσον αφορά στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.73) εμφανίζονται ανάλογα σήματα και πιο συγκεκριμένα:

- Σε δ 8.50 εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2 ως απλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας (HMQC) συντονίζεται στα 156.1 ppm
- Σε δ 6.90 εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 90.0 ppm
- Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιοξυ- ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 6.19 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 103.3
- Τα πρωτόνια H-2'/H-6' εμφανίζονται σε δ 7.51 και τα πρωτόνια H-3'/H-5' σε δ 7.06, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 130.7 και 116.3, αντίστοιχα.

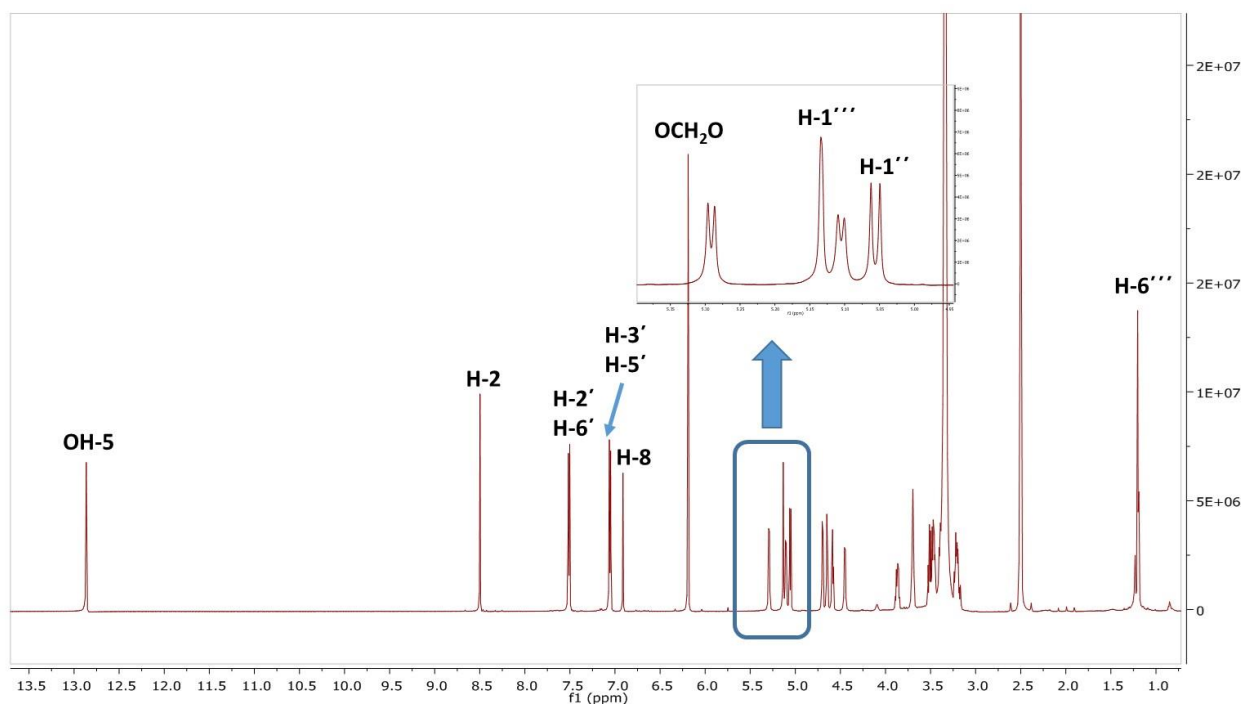
Στην οξυγονωμένη περιοχή των φασμάτων εμφανίζονται τα σήματα της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη στη θέση 4' της γενίνης και πιο συγκεκριμένα: (i) σε δ 5.06 (1H, d, $J = 7.8$) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 98.5 ppm, (ii) στα 3.52 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο H-2'', το οποίο εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή ($J = 9.5 / 7.8$ Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 76.8, (iii) σε δ 3.50-3.20 συντονίζονται τα πρωτόνια H-3'', H-4'' και H-5'', και (iv) τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται

σε δ 3.69 (1H, d, $J = 12.0$) και 3.45 (1H, dd, $J = 12.0 / 5.5$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 61.0.

Επίσης, στην ίδια περιοχή εμφανίζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της ραμνόσης, που είναι τα ακόλουθα:

- Το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται σε δ 5.14 ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 1.7$ Hz, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.8 ppm
- Το πρωτόνιο H-2''' εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή στα 3.70 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 70.9 ppm
- Τα πρωτόνια H-3''' και H-4''' συντονίζονται σε δ 3.50-3.20
- Το μεθινικό πρωτόνιο H-5''' εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 3.87 ppm
- Το μεθύλιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (δ 1.20) με σταθερά σύζευξης $J = 6.4$ H.z.

Η σημαντικότερη διαφορά έγκειται στην απουσία του σήματος που αντιστοιχεί στην μεθοξυλομάδα της θέσεως 5.

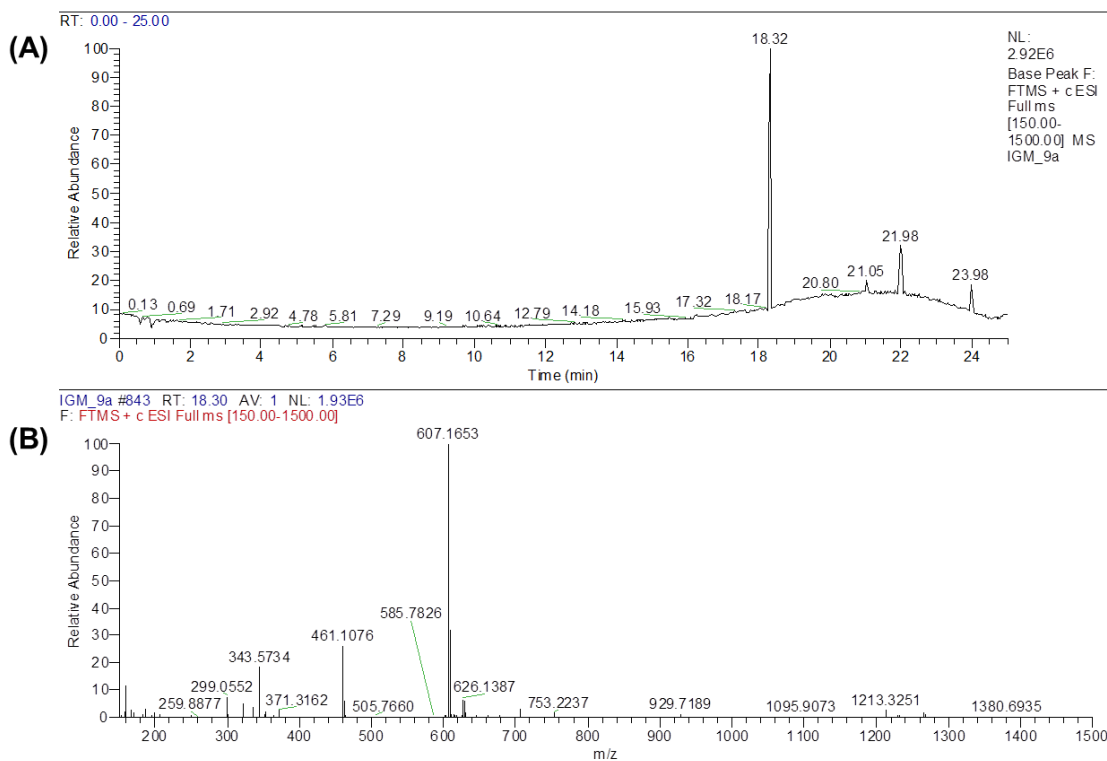


Εικόνα 5.73 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-9

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	¹ H NMR (δ, J σε Hz) σε DMSO	¹³ C NMR (δ) σε DMSO
2	8.50 (1H, s)	156.1
3	-	122.5
4	-	181.4
4a	-	107.9
5	-	141.8
6	-	130.1
7	-	154.6
8	6.90 (1H, s)	90.0
8a	-	153.8
1'	-	124.6
2'/6'	7.51 (2H, d, J = 7.3)	130.7
3'/5'	7.06 (2H, d, J = 7.3)	116.3
4'	-	157.6
1''	5.06 (1H, d, J = 7.8)	98.5
2''	3.52 (dd, J = 9.5 / 7.8)	76.8
3''	3.50-3.25	72.2-70.0
4''	3.50-3.25	77.2
5''	3.50-3.25	77.7
6''	3.69 (1H, d, J = 12.0) 3.45 (1H, dd, J = 12.0 / 5.5)	61.0
1'''	5.14 (1H, d, J = 1.7)	100.8
2'''	3.70 (1H, br s)	70.9
3'''	3.50-3.25	72.2-70.0
4'''	3.50-3.25	72.2-70.0
5'''	3.87 (1H, m)	68.7
6'''	1.20 (3H, d, J = 6.4)	18.6
OCH₂O	6.19 (2H, s)	103.3

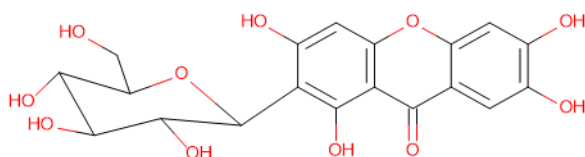
Πίνακας 5.41 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης IGM-9



Εικόνα 5.74 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-9 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=18.32$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=18.32$ min με $m/z=607.1653$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Βιοσίδη της Ιριλόνης (NC15)**

Με βάση τις βάσεις δεδομένων στις οποίες έχουμε πρόσβαση, ο μεταβολίτης NC15 ή Βιοσίδη της Ιριλόνης έχει απομονωθεί ξανά από τις ρίζες του είδους *Iris leptophylla* [477], αλλά δεν υπάρχουν δεδομένα σε σχέση με τις βιολογικές του.

- Μανγκιφερίνη (IGM-10, NC22)

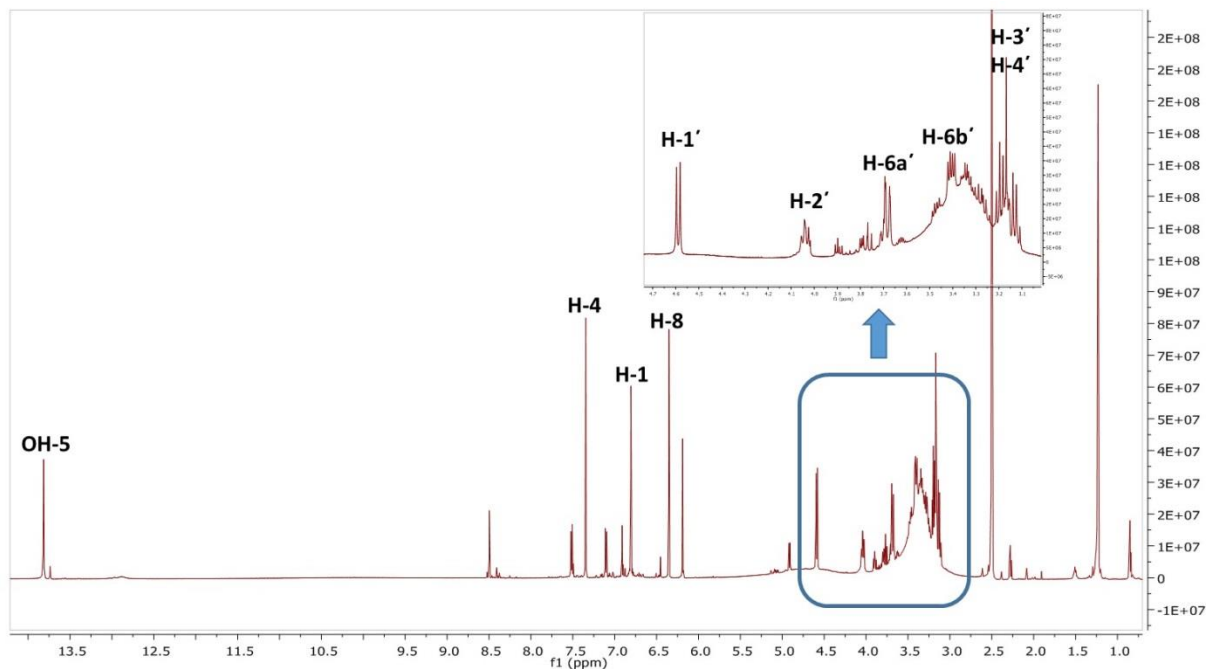


IGM-10 (NC22)

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 5.75) παρατηρούνται τρεις απλές κορυφές σε δ 6.80, 7.34 και 6.36, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-1, H-4 και H-8. Οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 102.2, 107.5 και 93.2 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της θέσεως 5, λόγω του δεσμού υδρογόνου με το καρβonyλίο, συντονίζεται στα 13.8 ppm.

Από την άλλη μεριά, στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζονται τα πρωτόνια του σακχάρου, στα οποία περιλαμβάνονται τα ακόλουθα:

- Το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή ($J = 10.0$ Hz) σε δ 4.57, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 72.9 ppm, γεγονός που χαρακτηρίζει τους C-γλυκοσίδες
- Σε δ 4.05 εμφανίζεται ως σχεδόν τριπλή κορυφή ($J = 9.8$ Hz) το πρωτόνιο H-2' και ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται σε δ 70.2
- Ως τριπλές κορυφές στα 3.28 και 3.15 ppm εμφανίζονται τα πρωτόνια H-3' και H-4', αντίστοιχα
- Τα μεθυλενικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 3.66 (dd, $J = 12.2, 2.2$) και 3.39 (dd, $J = 12.2, 5.9$) ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 61.2 ppm.



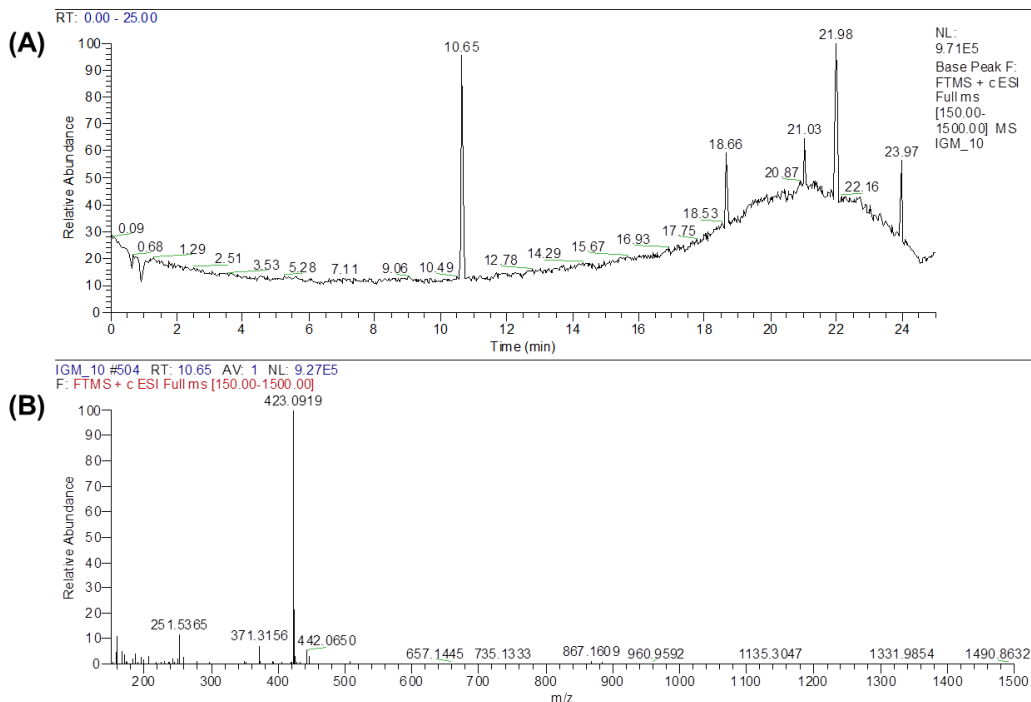
Εικόνα 5.75 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δείγματος IGM-10

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Οι σχετικές πληροφορίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Άτομο	$^1\text{H NMR}$ (δ , J σε Hz) σε DMSO	$^{13}\text{C NMR}$ (δ) σε DMSO
1	6.80 (1H, s)	102.2
2	-	151.4
3	-	144.2
4	7.34 (1H, s)	107.5
4a	-	111.4
5	-	161.8
6	-	107.5
7	-	163.8
8	6.36 (1H, s)	93.2
8a	-	156.3
9a	-	155.4
10	-	179.7
10a	-	101.1
1'	4.57 (1H, d, $J = 10.0$)	70.2
2'	4.05 (~t, $J = 9.5$)	78.9

3'	3.18 (t, $J = 9.5$)	70.7
4'	3.11 (t, $J = 9.5$)	77.2
5'	3.15 (m)	81.5
6'	3.66 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.2$) 3.39 (1H, dd, $J = 12.92 / 5.$)	61.2

Πίνακας 5.42 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGM-10



Εικόνα 5.76 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-10 επιπέδου συγκέντρωσης $1\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=10.65\text{ min}$ σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=10.65$ με $m/z=423.0919$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Μανγκιφερίνη (NC22)**

Η μανγκιφερίνη ανήκει στην κατηγορία των ξανθονών και βιοσυνθετικά προέρχεται από τη βενζοφαινόνη ‘ιριφλοφαινόνη’, η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί έχει εντοπισθεί σε είδη του γένους *Iris*. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από το εμπειρικό της όνομα, έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Mangifera* της οικογένειας Anacardiaceae [478], αλλά και από άλλες φυσικές πηγές όπως το είδος *Iris florentina* [479]. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα μελετών σχετικά με την αξιολόγηση των βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων της μανγκιφερίνης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται αξιόλογες αντιοξειδωτικές [480], αναλγητικές [481], ηπατοπροστατευτικές [482] και αντιδιαβητικές ιδιότητες [483]. Επίσης, έχει αναφερθεί

προστατευτική δράση του καρδιακού και νεφρικού ιστού έναντι του οξειδωτικού στρες [484], γαστροπροστατευτική [485] και προστατευτική επίδραση έναντι της καρκινογένεσης [486]. Ωστόσο δεν ανευρέθησαν αναφορές σχετικές με φυτοοιστρογόνες ιδιότητες ή την πιθανή επίδρασή της στην οστεοπόρωση.

5.4.2.8. Μελέτη του κλάσματος 95 του FCPC-2 (C2F32)

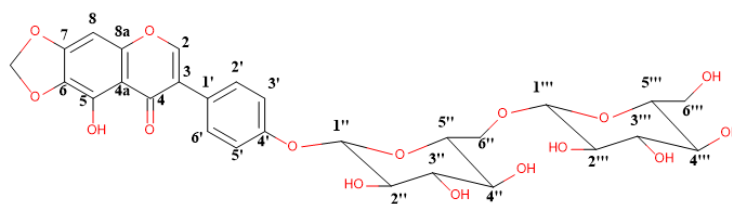
Το τελευταίο κλάσμα του CPC, που ελέγχθηκε φάνηκε μετά από χρωματογραφική παρατήρηση να περιέχει δύο κατηγορίες ενώσεων και πιο συγκεκριμένα: (i) μεταβολίτες οι οποίοι δεν απορροφούσαν στα 254 nm, ενώ έδωσαν γκρι χρώση μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, με αποτέλεσμα να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι πρόκειται για σάκχαρα και (ii) μεταβολίτες οι οποίοι απορροφούσαν στα 254 nm, έδωσαν γκρι χρώση και πιθανότατα ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονών που φέρουν σάκχαρα. Για την απομόνωση των πιθανών γλυκοσιδών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (C2S1). Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 250 mg του κλάσματος και μετά το πέρας της χρωματογραφίας προέκυψαν 162 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν τελικά σε 14, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ C2S1	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	ΒΑΡΟΣ (mg)
C2S1F1	1-50	5,0
C2S1F2	51-59	17,4
C2S1F3	60-72	44,0
C2S1F4	73-79	60,2
C2S1F5	80-83	11,9
C2S1F6	84-88	12,8
C2S1F7	89-95	10,4
C2S1F8	96-100	1,6
C2S1F9	101-105	1,1
C2S1F10	106-111	1,0
C2S1F11	112-131	7,5
C2S1F12	132-139	1,3
C2S1F13	140-147	1,8
C2S1F14	148-162	1,6

Πίνακας 5.43 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F32 με γρήγη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S1)

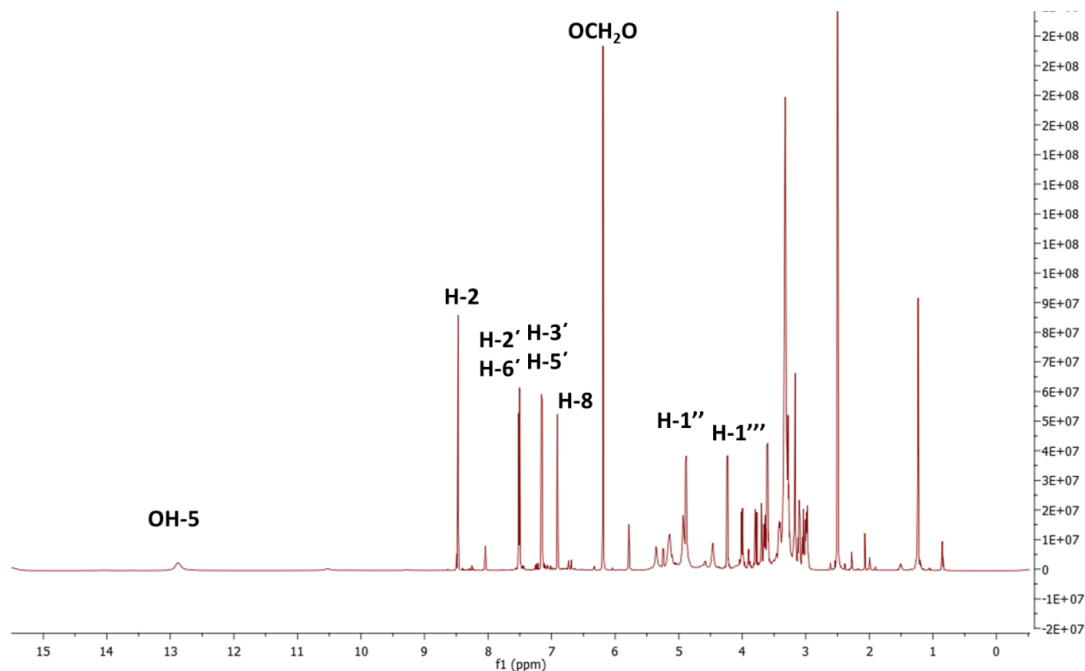
Μετά από τη χρωματογραφική μελέτη των τελικών κλασμάτων αναλύθηκαν φασματοσκοπικά πέντε κλάσματα. Πιο συγκεκριμένα, τα κλάσματα C2S1F4 και C2S1F5 στην TLC εμφάνιζαν κηλίδες που αρχικά πιθανολογούσαμε ότι ήταν σάκχαρα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε φασματοσκοπικά. Τα κλάσματα C2S1F6, C2S1F7 και C2S1F11 περιείχαν

μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσίαζαν απορρόφηση στα 254nm και έδωσαν γκρι χρώση με το αντιδραστήριο της θεϊκής βανιλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα κλάσματα C2S1F6 και C2S1F7 περιείχαν το διγλυκοσίδη της Ιρισολόνης **IGM-3 (NC16)**, σε αρκετά καθαρή μορφή (80 και 70%, αντίστοιχα), ο οποίος έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κλάσμα του εκχύλισματος IGM, ενώ στο κλάσμα C2S1F11 ταυτοποιήθηκε σε υψηλή καθαρότητα (~ 90%) ο 4'-γεντιοβιοσίδη της ιριλόνης **IGM-4 (NC18)**, ο οποίος έχει απομονωθεί και από το εκχύλισμα IGE (**IGE-18**).

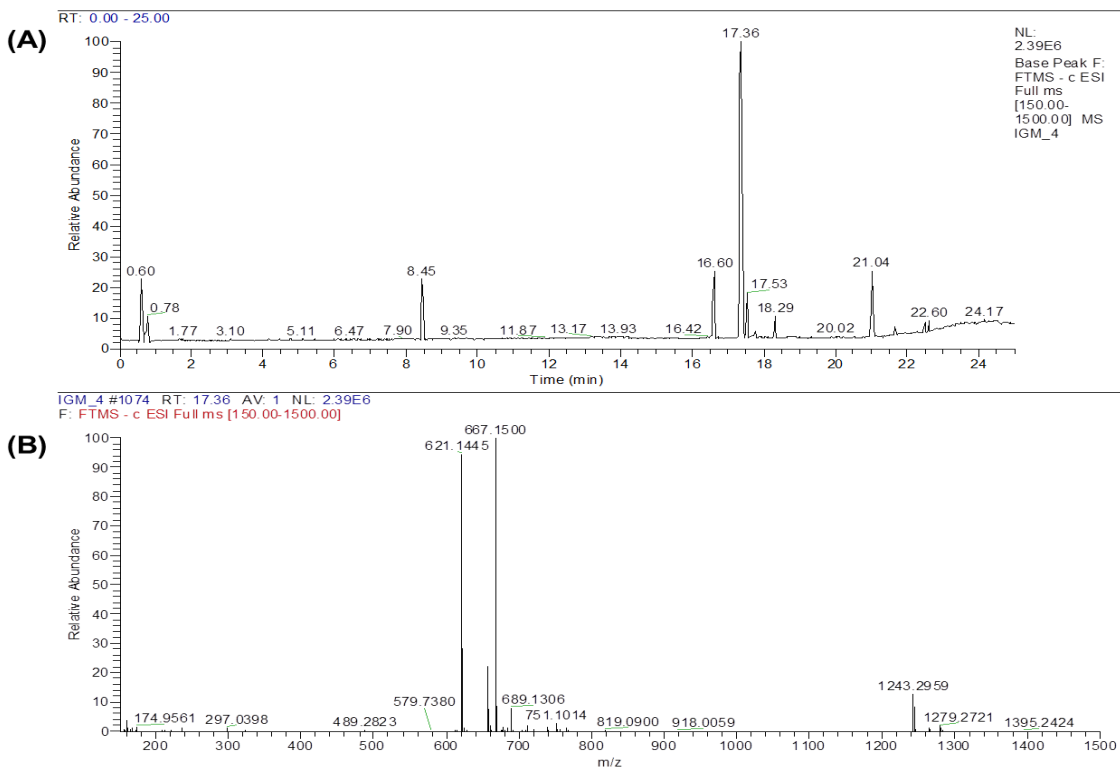


IGM-4 (NC18)

Με τη βοήθεια των φασμάτων 2D-NMR (COSY, HMQC-DEPT, HMBC) έγινε η απόδοση όλων των ανθράκων και των πρωτονίων της ένωσης και με το φάσμα μάζας επαληθεύτηκε ο μοριακός της τύπος (MT). Στη συνέχεια παρουσιάζονται το φάσμα πρωτονίου και μάζας.

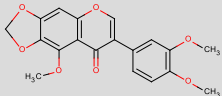
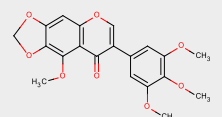
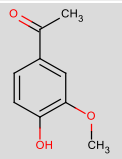
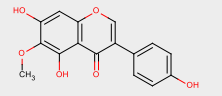
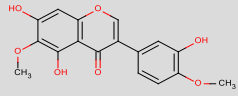
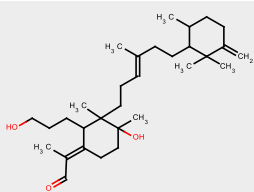
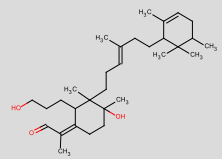
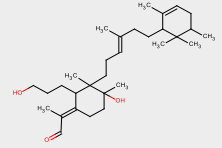
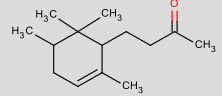


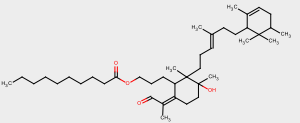
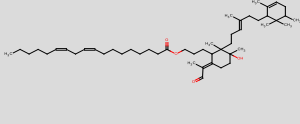
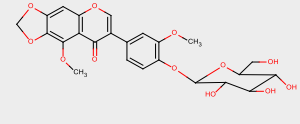
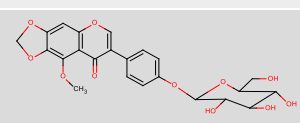
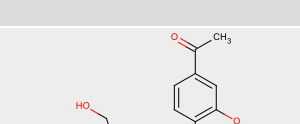
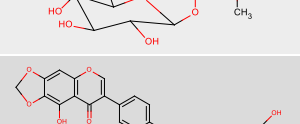
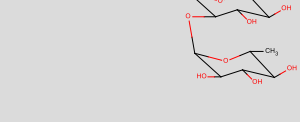
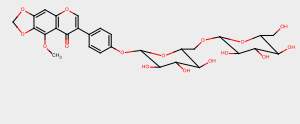
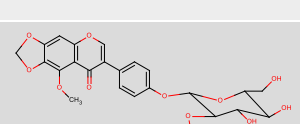
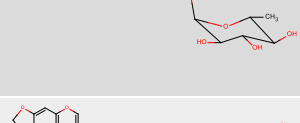
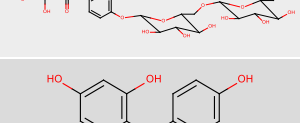
Εικόνα 5.77 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δείγματος IGM-4

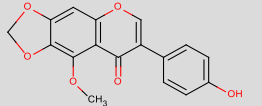
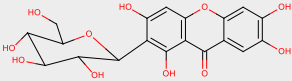
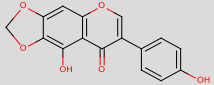
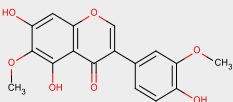
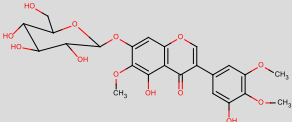
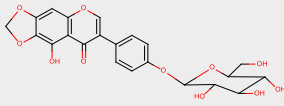


Εικόνα 5.78 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-4 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.36$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M-CO_2H_2-H]^+$ της κορυφής $t_R=17.36$ min με $m/z=667.1500$ και το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^+$ της κορυφής $t_R=17.36$ min με $m/z=621.1445$, τα οποία αντιστοιχούν στο φυσικό προϊόν **Γεντιοβιοσίδη της Ιριλόνης (NC18)**

Στα πλαίσια της φυτοχημικής μελέτης των εκχυλισμάτων IGE και IGM, τα οποία προέκυψαν από τα ριζώματα του είδους *Iris germanica* μετά από ξεχωριστή εκχύλιση με διαλύτες EtOAc και MeOH αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκαν 26 δευτερογενείς μεταβολίτες. Αρκετές ενώσεις εντοπίστηκαν και στα δύο εκχυλίσματα και μάλιστα απομονώθηκαν από διαφορετικά κλάσματα σε καθαρή μορφή ή και σε μίγματα διαφορετικής περιεκτικότητας. Με σκοπό να διευκολυνθεί η παρακολούθηση των αποτελεσμάτων της βιολογικής αξιολόγησής τους, καταρτίστηκε ο ακόλουθος πίνακας ο οποίος περιέχει τις χημικές δομές των 26 ενώσεων, τα κλάσματα από τα οποία απομονώθηκαν, τους κωδικούς που έλαβαν και την καθαρότητά τους, όπως αυτή αξιολογήθηκε με βάση τα φάσματα NMR που ελήφθησαν στα πλαίσια της ταυτοποίησής τους.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ		% ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ
		ΚΛΑΣΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ	
NC1		C1F15	IGE-1	~45%
NC2		C1F16 C1F15 C2F16- C2F17 C2F19	IGE-2 IGE-2 IGM-2 IGM-21	>65% ~55% ~70% ~70%
NC3		C1F16 C2F19	IGE-3 IGM-23	~100% >90%
NC4		C1F16	IGE-4	>90%
NC5		C1F16	IGE-5a	~30%
NC6		C1C1F21-C1C1F24	IGE-7a	~30%
NC7		C1C1F21-C1C1F24	IGE-7	>70%
NC8		C1C1F29-C1C1F32	IGE-8	>85%
NC9		C1F8	IGE-9	>80%

NC10		C1C2F9	IGE-10	>90%
NC11		C1C2F13	IGE-11	>50%
NC12		C1S1F6	IGE-12	~50%
NC13		C1S1F6 C2S2F7 C2S2F8	IGE-13 IGM-7 IGM-17	>90% ~80% ~75%
NC14		C1S2F3 & C1S2F4 C2S2F3	IGE-14 IGM-5	~70% ~60%
NC15		C2S2F11 C2S2F12	IGM-9 IGM-9	~90% ~70%
NC16		C1S2F3 & C1S2F4 C2S2F6 C2S1F6 C2S1F7	IGE-16 IGM-3 IGM-3 IGM-3	>90% >90% ~80% ~70 %
NC17		C1S2F3 & C1S2F4 C2S2F6	IGE-17 IGM-6	>90% ~ 90%
NC18		C1S2F7 C2S1F11 C2S2F11	IGE-18 IGM-4 IGM-16	~ 80% ~ 90% ~ 50%
NC19		C1S4F10	IGE-19	~ 100%
NC20		C1F16 C1S5F5 - C1S5F7 C1S5F10 - C1S5F12 C1F17 C2F19 C2S3F17 & C2S3F18	IGE-20 IGE-20 IGE-20 IGE-6 IGM-13 IGM-13b	~40% > 90% ~40% >70% > 90% ~80%

NC21		C1S5F10 - C1S5F12 C2F19 C2S3F15	IGE-21 IGM-20 IGM-12	~60% ~85% > 90%
NC22		C2S2F14	IGM-10	~70%
NC23		C2F7- C2F9	IGM-1	>95%
NC24		C1F16 C2F16- C2F17 C2F16- C2F17	IGE-5b IGM-14 IGM-14	~30% ~60% >90%
NC25		C1S1F6 C2S4F9 C2S5F8 & C2S5F9 C2S2F8 C2S2F11	IGE-13a IGM-8 IGM-8 IGM-18 IGM-16	~40% >90% >90% ~90% ~50%
NC26		C1S3 85_112 C2S4F19 C2S5F12 C2S2F14	IGE-26 IGM-11 IGM-11 IGM-11	>90% ~90% >90% ~30%

6. *In vitro* βιολογική αξιολόγηση των 2^ογενών μεταβολιτών του είδους *Iris germanica*

Η φυτοχημική επεξεργασία των εκχυλισμάτων των ριζών του *Iris germanica*, οδήγησε στην ταυτοποίηση 26 δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των απλών φαινολικών παραγώγων, των φλαβονοειδών και των λιγνανίων. Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν μία ιρόνη, μία ακετοφαινόνη και ο γλυκοσίδης της, μία βενζοφαινόνη, μία ξανθόνη, πέντε τριτερπενικά παράγωγα τύπου ιριδάλης και δεκαέξι ισοφλαβόνες και γλυκοσίδες τους. Από τους 26 μεταβολίτες απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή οι 23 και όλοι, εκτός της ιρόνης, αξιολογήθηκαν 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.

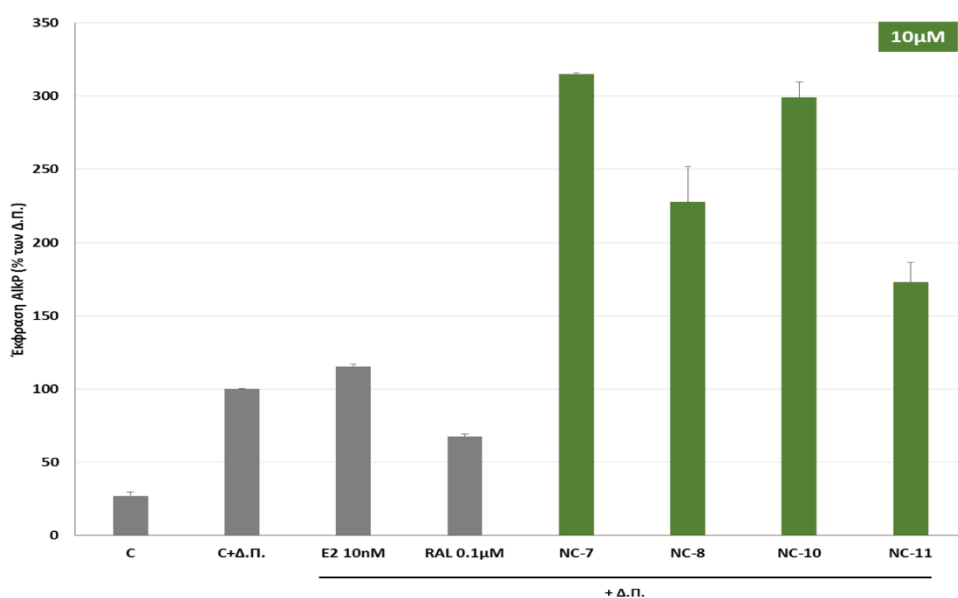
6.1. Αξιολόγηση της επίδρασης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του *Iris germanica* στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση

Η αξιολόγηση της ικανότητας των δευτερογενών μεταβολιτών, που ταυτοποιήθηκαν από τις ρίζες του *Iris germanica* να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την προ-οστεοβλαστική κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Τα κύτταρα MC3T3-E1 είναι προ-οστεοβλάστες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα, παρουσία ασκορβικού οξέος να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες, όπως έχει περιγραφεί στην § 1.2.4.4.

Η διαφοροποίηση των MC3T3-E1 πιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως δείκτη διαφοροποίησης την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στο πρώιμο στάδιο ωρίμανσής τους. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ.Π.) για διάστημα έξι ημερών και ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (E₂) σε συγκέντρωση 10 nM και η ραλοξιφαίνη (Ral) σε συγκέντρωση 0.1 μM, ως αντιπροσωπευτικός SERM παράγοντας. Η δραστηριότητα της οιστραδιόλης, της ραλοξιφαίνης, αλλά και του αντιοιστρογόνου παράγοντα φουλβεστράνη στα MC3T3-E1 έχει αναλυτικά παρουσιαστεί στην § 4.2.1.

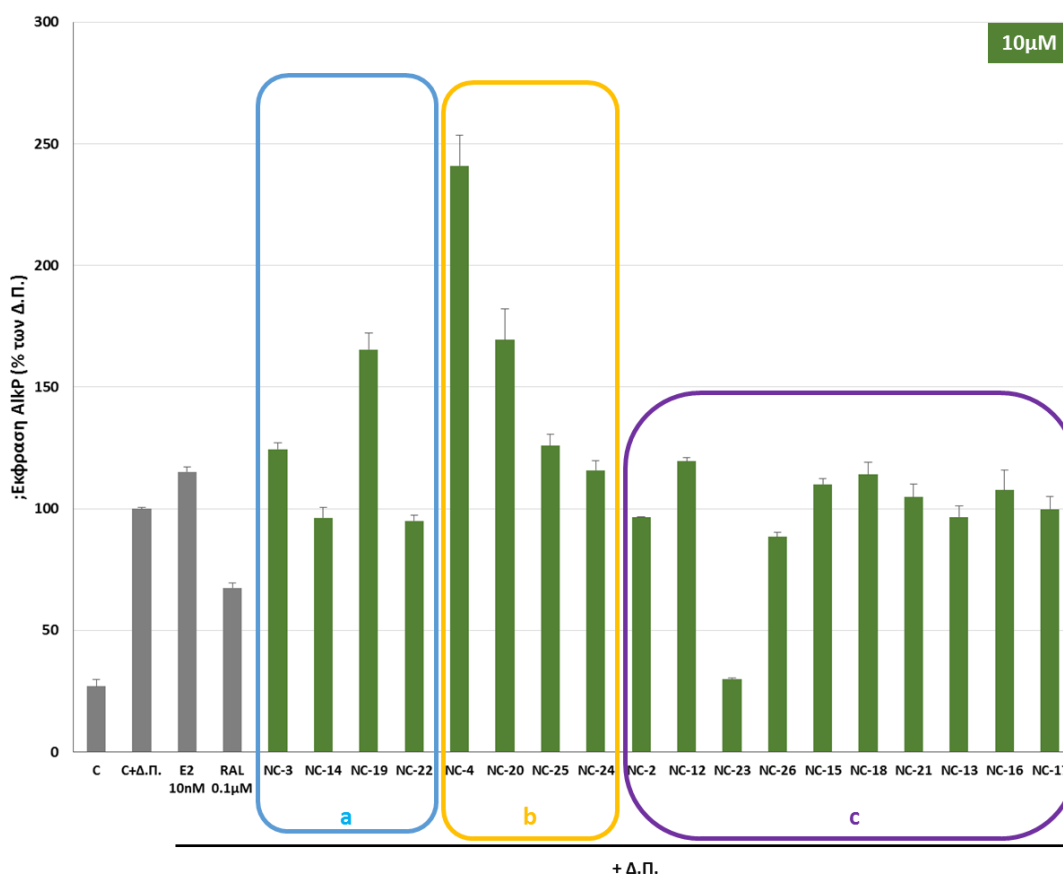
Η ικανότητα των απομονωμένων ενώσεων να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 αξιολογήθηκε σε συγκέντρωση 10 μ M και προσδιορίστηκε η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP). Η επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης εκφράστηκε ως % της επαγωγής της έκφρασης AlkP παρουσία των διαφοροποιητικών παραγόντων (Δ .Π.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 60% των μεταβολιτών ήταν ικανοί να προάγουν τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 σε ώριμους οστεοβλάστες και το 85% αυτών δρούσαν ικανοποιητικότερα ακόμα και από ότι την οιστραδιόλη όταν χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 10 nM ($115.2 \pm 1.9\%$).

Αναλυτικότερα, και τα τέσσερα παράγωγα ιριδάλων (NC7, NC8, NC10 και NC11) χαρακτηρίστηκαν από εξαιρετικά υψηλή ικανότητα επαγωγής της έκφρασης AlkP σε συγκέντρωση 10 μ M, δίνοντας τιμές από 173% έως 315%, συγκρινόμενα με τους διαφοροποιητικούς παράγοντες. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.1, η δράση τους ήταν ικανοποιητικότερη και εκείνης της οιστραδιόλης (10 nM), προβάλλοντας τις ιριδάλες ως εξαιρετικά σημαντικούς παράγοντες στη διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης.



Εικόνα 6.1 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ .Π.: 50 μ g/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β -γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχρηγήση των απομονωμένων ενώσεων (10 μ M) 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 \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Μεταξύ των απλών φαινολικών παραγώγων, σημαντική ικανότητα προαγωγής της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1 επέδειξαν τόσο η Ακετοβανιλλόνη (NC3), όσο και η Ιριφλοφαινόνη (NC19), δίνοντας επαγωγή της έκφρασης AlkP 124% και 165% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους Δ.Π.. Αντίθετα, ο γλυκοσίδης της Ακετοβανιλλόνης (NC14) και η Μανγκιφερίνη (NC22) δεν παρουσίασαν καμία δραστικότητα (εικόνα 6.2).



Εικόνα 6.2 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 μg/ml ασκορβικό οξύ και 10 mM β-γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχρηγήνηση των απομονωμένων ενώσεων (10 μM), a: απλά φαινολικά παράγωγα, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Μεταξύ των ισοφλαβονών που αξιολογήθηκαν, εκείνες που δεν έφεραν 6,7-μεθυλενοδιόξυ ομάδα παρουσίασαν σχεδόν στο σύνολό τους υψηλότερη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, δίνοντας επαγωγή της AlkP από 116% έως 241%. Από τις ισοφλαβόνες που έφεραν 6,7-μεθυλενοδιόξυ ομάδα, προαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1 παρουσίασαν τα γλυκοσιδικά παράγωγα της Ιρισολόνης, NC12, NC15 και NC18, ενώ η ίδια η γενίνη δεν παρουσίασε αντίστοιχη δραστηριότητα. Οι υπόλοιπες ισοφλαβόνες χαρακτηρίστηκαν από έλλειψη δραστηριότητας, ενώ ο γλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC26) προκάλεσε μερική καταστολή της οστεοβλαστογένεσης (12%) και η Ιριλόνη (NC23) πολύ σημαντικότερη (70%), σε επίπεδο που οριακά θα μπορούσε να χαρακτηριστεί κυτταροτοξική (εικόνα 6.2)

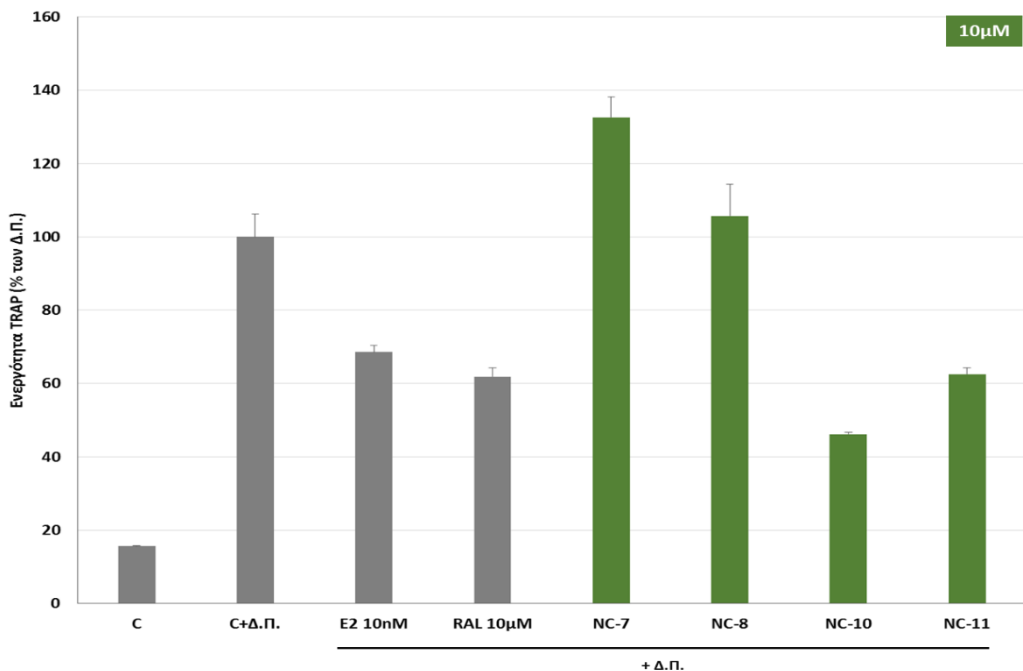
6.2. Αξιολόγηση της επίδρασης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του *Iris germanica* στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης

Η ικανότητα των απομονωμένων ενώσεων να επεμβαίνουν στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τα μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε πολυπύρηνους ώριμους οστεοκλάστες, παρουσία της κυτταροκίνης RANKL. Η καταστολή της διαφοροποίησης των RAW264.7 προσδιορίζεται μέσω της μείωσης της έκφρασης της Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP), η οποία εκκρίνεται από τους ώριμους οστεοκλάστες. Το πειραματικό μέρος έχει περιγραφεί αναλυτικά στις παραγράφους 1.2.4.6 και 4.3.2.

Συνοπτικά, τα μακροφάγα επώαστηκαν παρουσία του διαφοροποιητικού παραγόντα (RANKL) και των υπό μελέτη ενώσεων για 4 ημέρες και η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε στα κύτταρα χρωματομετρικά, με προσθήκη διαλύματος p-nitrophenyl phosphate, ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Όλες οι ενώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 10 μ M και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τις εκατό της έκφρασης TRAP του υλικού διαφοροποίησης (RANKL 50 ng/ml). Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η οιστραδιόλη (10 nM) και η ραλοξιφαίνη (10 μ M). Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την κατασταλτική επίδραση τόσο της ραλοξιφαίνης, όσο και της οιστραδιόλης στην επαγόμενη από την κυτταροκίνη RANKL έκφραση της TRAP.

Καταστολή της επαγόμενης από το RANKL διαφοροποίησης των μακροφάγων κυττάρων, προκάλεσαν ενώσεις που ανήκουν σε όλες τις ομάδες των απομονωμένων μεταβολιτών. Οι

εστέρες της α-ιριγερμανάλης NC10 και NC11 παρουσίασαν 57% και 37% καταστολή της οστεοκλαστογένεσης, σε σχέση με τους Δ.Π.. Αντίθετα, οι δύο ισομορφές της α-ιριγερμανάλης NC7 και NC8 όχι μόνο δεν δρούσαν κατασταλτικά, αλλά προκάλεσαν επαγωγή της έκφρασης της TRAP (εικόνα 6.3).

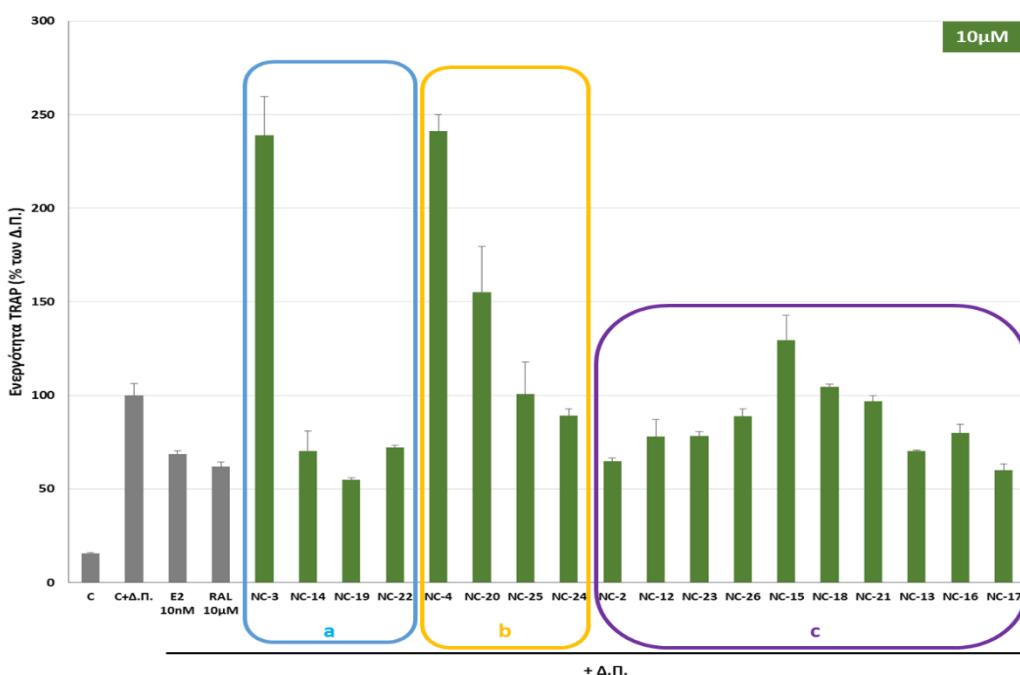


Εικόνα 6.3 Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 ng/ml RANKL) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο ενώσεων. Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate, παρουσία τρυγικού οξέος και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Ο έλεγχος των απλών φαινολικών και των ισοφλαβονών ανέδειξε την Ιριφλοφαινόνη (NC19) ως την πλέον δραστική ένωση, μιας και προκάλεσε καταστολή της οστεοκλαστογένεσης κατά 45% σε σχέση με τους Δ.Π. και συγχρόνως προκαλούσε σημαντική προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.

Αναλυτικότερα, ο ακετοφαινολικός γλυκοσίδης NC14 προκάλεσε 30% καταστολή της έκφρασης TRAP, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε και στην γενίνη NC3, η οποία χαρακτηρίστηκε από επαγωγή της TRAP (εικόνα 6.4, α). Ανάλογη δραστικότητα επέδειξε και η Μανγκιφερίνη (NC22) καταστέλλοντας κατά 28% την οστεοκλαστογένεση, αλλά μη επάγοντας την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Οι ισοφλαβόνες που στερούνται 6,7-μεθυλενοδιόξυ ομάδας, αν

και χαρακτηρίστηκαν όλες ικανές έως πολύ ικανές να επάγουν την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, δεν παρουσίασαν στο σύνολό τους κατασταλτική δράση στην οστεοκλαστογένεση. Η Ιριστεκτοριγενίνη (NC24) κατέστειλε την RANKL-επαγόμενη έκφραση της TRAP κατά 11% και επιπρόσθετα έδρασε ευεργετικά και στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Όλες οι υπόλοιπες ενώσεις της ομάδας χαρακτηρίστηκαν ως αδρανείς ή προκάλεσαν επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης (εικόνα 6.4, b).



Εικόνα 6.4 Έκφραση Οξινής 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 (10 μM), a: απλά φαινολικά παράγωγα, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7. Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate, παρουσία τρυγικού οξέος και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

Μεταξύ των 10 ισοφλαβονικών παραγώγων που φέρουν 6,7-μεθυλενοδιόξυ ομάδα, επτά ενώσεις παρουσίασαν σημαντική 10-40% καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (εικόνα 6.4, c). Πρόκειται για τα παράγωγα NC2, NC23, NC12, NC13, NC26, NC16 και NC17 και μεταξύ αυτών μόνο οι μεταβολίτες NC12, NC15 και NC18 ασκούσαν την επιθυμητή

δραστικότητα και στους δύο τύπους οστικών κυττάρων. Οι υπόλοιπες, αν και κατέστειλαν την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών δεν παρουσιάστηκαν ικανές να επάγουν την έκφραση της AlkP στα κύτταρα MC3T3-E1, ενώ η Ιριλόνη (NC23) είχε αντίθετη δράση, καταστέλλοντας τη διαφοροποίησή τους. Παρατηρώντας τη χημική δομή των μορίων της ομάδας που επέδειξε σημαντική ικανότητα καταστολής της έκφρασης της TRAP, διαπιστώνεται ότι όλοι οι μεταβολίτες, πλην των NC23 και NC26 έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη μεθόξυ-ομάδας στη θέση 5 του Α-δακτυλίου, που πιθανόν να συνδράμει στην εκδήλωση της δραστηριότητας αυτών των ενώσεων (πίνακας 6.4).

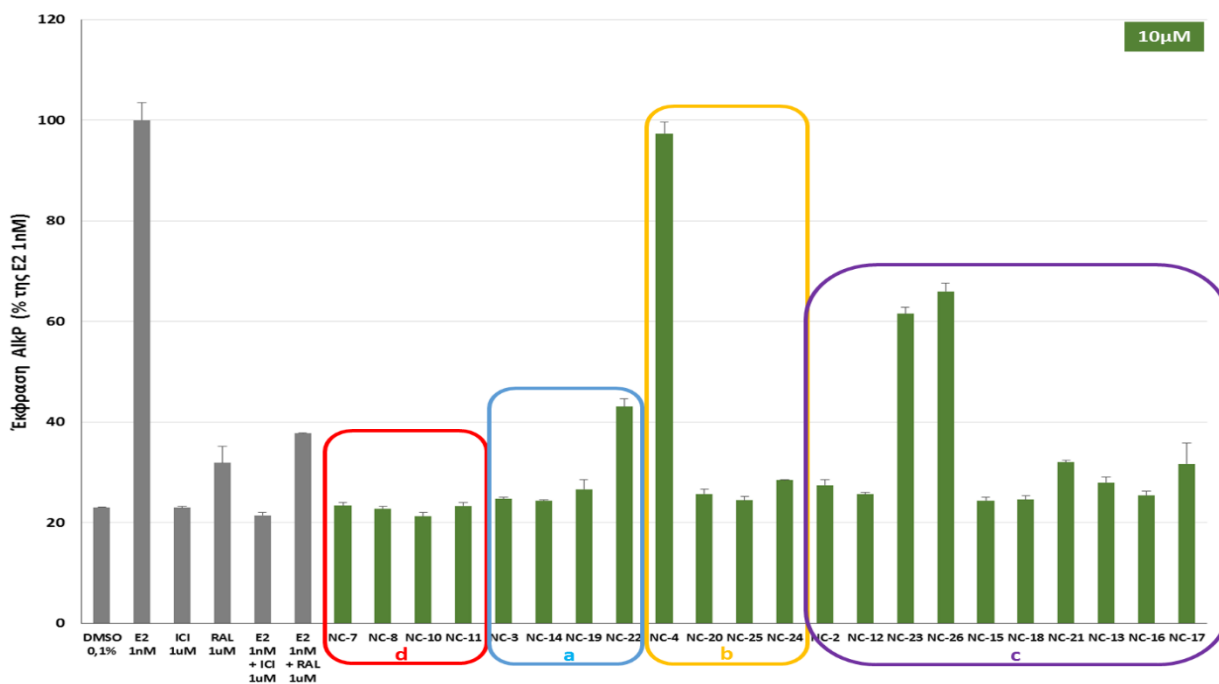
6.3. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του *Iris germanica* στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Όπως και κατά την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων, έτσι και στην περίπτωση των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών, η πιθανή οιστρογονική δράση τους προσδιορίστηκε μέσω της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa. Τα κύτταρα Ishikawa προέρχονται από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων, ERα & ERβ και η έκφραση της AlkP θεωρείται δείκτης της εγγενούς οιστρογονικής δράσης του υπό εξέταση δείγματος στη μήτρα. Ο πειραματικός σχεδιασμός έχει αναλυτικά περιγραφεί στην § 1.2.4.3 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. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες ελέγχθησαν σε συγκέντρωση 10 μM και η δραστηριότητά τους παρουσιάζεται ως % της έκφρασης AlkP της οιστραδιόλης (E2 1 nM) στο ιστόγραμμα της εικόνας 6.5, αλλά και ως αγωνισμός των εξεταζόμενων ενώσεων σε σχέση με εκείνον της E2 1 nM (πίνακες 6.1 έως 6.4).

Ο αγωνισμός των υπό εξέταση δειγμάτων σε σχέση με εκείνον της οιστραδιόλης (E₂, 1 nM) υπολογίστηκε ως εξής:

$\% \text{ αγωνισμός} = (\text{OD}_{\text{δείγματος}} - \text{OD}_{\text{εκδόχου}}) * 100 / (\text{OD}_{\text{E2}} - \text{OD}_{\text{εκδόχου}})$, OD: 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 $\geq 67\%$, 34-66%, 33-10% και $< 10\%$.

Ο έλεγχος της οιστρογονικότητας των ενώσεων στα κύτταρα Ishikawa, έδειξε ότι μόνο τρία ισοφλαβονικά παράγωγα διέθεταν σημαντική οιστρογονική δράση σε συγκέντρωση 10 μ M, δρώντας ως μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές ως προς την οιστραδιόλη. Ισχυρό αγωνισμό επέδειξε η ισοφλαβόνη Τεκτοριγενίνη (NC4), με τιμή αγωνισμού 96.6%, ενώ η Ιριλόνη (NC23) και ο 4'-*O*- β -γλυκοκυρανοσίδης της (NC26) χαρακτηρίστηκαν ως μερικοί αγωνιστές με τιμές 49.8% και 55.7%, αντίστοιχα. Όλοι οι υπόλοιποι μεταβολίτες στερούταν οιστρογονικότητας (εικόνα 6.5). Η παρουσία δεύτερου σακχάρου και η μεθόξυ-ομάδα στη θέση 6 φαίνεται ότι παρεμποδίζουν την οιστρογονική δράση της Ιριλόνης.



Εικόνα 6.5 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των ενώσεων (10 μ M) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Τα πλαίσια διαχωρίζουν τις ομάδες μεταβολιτών, a: απλά φαινολικά παράγωγα, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7 και d: παράγωγα ιριδαλών. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E₂ (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

6.4. Προσδιορισμός της οιστρογόνου δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών των ριζών του *Iris germanica* στην κυτταρική σειρά MCF-7

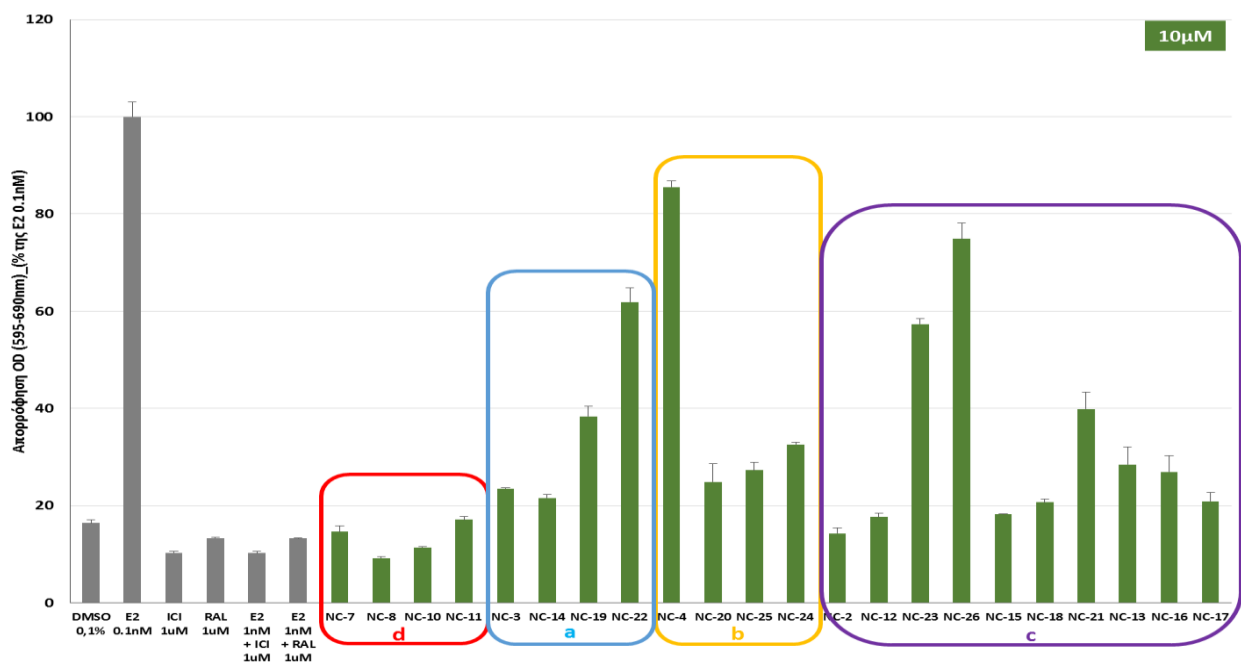
Πέραν του προσδιορισμού της οιστρογονικής δράσης των ενώσεων στα κύτταρα ενδομητρίου (Ishikawa), αξιολογήθηκε και η ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7. Τα MCF-7 είναι ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού που εκφράζουν μόνο τον ERα υποδοχέα και χρησιμοποιούνται για *in vitro* εκτίμηση της ικανότητας προαγωγής ήδη εγκατεστημένου καρκίνου του μαστού. Μιας και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων MCF-7 είναι ορμονοεξαρτώμενος, τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται απουσία οιστρογόνων και ανταποκρίνονται στην αυξανόμενη συγκέντρωση οιστραδιόλης, με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, όπως έχει περιγραφεί στην § 4.1.3.

Ο πειραματικός σχεδιασμός έχει παρουσιαστεί αναλυτικά στην § 1.2.4.2 και εν συντομία, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων σε συγκέντρωση 10 μM , για διάστημα 6 ημερών και ο σχετικός αριθμός τους 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. Η δραστηριότητα των ενώσεων παρουσιάζεται ως % του πολλαπλασιασμού της οιστραδιόλης (E2 0.1 nM) στο ιστόγραμμα της εικόνας 6.6, αλλά και ως αγωνισμός των εξεταζόμενων ενώσεων σε σχέση με εκείνον της E2 0.1 nM (πίνακες 6.1 έως 6.4).

Ο έλεγχος της οιστρογονικότητας των ενώσεων στα καρκινικά κύτταρα μαστού, ανέδειξε τρία ισοφλαβονικά παράγωγα και μία ξανθόνη με σημαντική ικανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 σε συγκέντρωση 10 μM , δρώντας ως μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές ως προς την οιστραδιόλη (0.1 nM). Ισχυρή αγωνιστική των οιστρογόνων δράση επέδειξε η Τεκτοριγενίνη (NC4) και ο 4'-O- β -γλυκοκυρανοσίδης της Ιριλόνης (NC26), με τιμές αγωνισμού 87.5% και 69.5%, αντίστοιχα. Δράση μερικού αγωνιστή αποδόθηκε στην Ιριλόνη (NC23) και τη Μεγκκιφερίνη (NC22), επιδεικνύοντας αγωνισμό 48.2% και 53.7% έναντι της οιστραδιόλης, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα των ενώσεων στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, διαπιστώνεται ότι οι τρεις ισοφλαβόνες (NC4, NC23 και NC26) και η ξανθόνη Μεγκκιφερίνη (NC22) που παρουσίασαν σημαντική οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa, διατήρησαν τη

δραστικότητά τους και στην κυτταρική σειρά MCF-7. Μόνο η Ιριφλοφαινόνη (NC19) και η Ιριστεκτοριγενίνη-A (NC24) φάνηκαν να επάγουν ασθενώς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, ενώ δεν είχαν δείξει ασθενή οιστρογονικότητα στα κύτταρα ενδομητρίου, υποδηλώνοντας για μια ακόμη φορά ότι τα κύτταρα Ishikawa χαρακτηρίζονται από ειδικότητα και ευαισθησία ανίχνευσης οιστρογονικής δράσης, ενώ τα κύτταρα MCF-7 από ευαισθησία αλλά όχι ειδικότητα ανίχνευσης ενώσεων με οιστρογονική δράση. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των πινάκων 6.1-6.4 έδειξε πολύ ισχυρή θετική συσχέτιση του αγωνισμού στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7 [$r(\text{Pearson's correlation coefficient})=0,923$, $p(2\text{-tailed})=0,000$], αλλά καθόλου συσχέτιση και των δύο με την προαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων MC3T3-E1 και τη καταστολή της διαφοροποίησης των RAW264.7, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση τους οφείλεται σε κάποιο άλλο μηχανισμό, πέραν της σύνδεσής τους με τους υποδοχείς οιστρογόνων.



Εικόνα 6.6 Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Τα πλαίσια διαχωρίζουν τις ομάδες μεταβολιτών, a: απλά φαινολικά παράγωγα, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7 και d: παράγωγα ιριδαλών. 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.

Συμπερασματικά, αξιολογήθηκαν 22 απομονωμένες ενώσεις από τις ρίζες του *Iris germanica* και μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται 4 παράγωγα ιριδάλης, 4 απλές φαινολικές ενώσεις, 4 ισοφλαβόνες και γλυκοσίδες τους, με ελεύθερες τις θέσεις 3' (οι δυο) και 7 (όλες) του Α-δακτυλίου και 10 ισοφλαβόνες και γλυκοσίδες τους με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στις θέσεις 6 και 7.

Τα τριπερπένια τύπου ιριδάλης (NC7, NC8, NC10 και NC11) επέδειξαν αξιοσημείωτη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και σημαντικά καλύτερη, συγκρινόμενη με την δράση της οιστραδιόλης, ενώ επιπρόσθετα τα εστεροποιημένα παράγωγα NC10 και NC11 κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση στην κυτταρική σειρά RAW264.7. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις προαναφερόμενες ενώσεις στερούταν οιστρογονικότητας, όπως προέκυψε κατά την αξιολόγησή τους στις κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, γεγονός που συμφωνεί με τη γενικότερη διαπίστωση ότι η *in vitro* οστεοπροστατευτική δράση τους οφείλεται σε κάποιο άλλο μηχανισμό, πέραν τις σύνδεσής τους με τους υποδοχείς οιστρογόνων.

Τα συγκεκριμένα τριπερπένια δεν έχουν αξιολογηθεί μέχρι σήμερα για τις οστεοπροστατευτικές και οιστρογονικές ιδιότητές τους, ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται αντι-αγγειογενετικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες σε τριπερπενικά παράγωγα αντίστοιχης δομής [487, 488] και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης του μηχανισμού εκδήλωσης της δράσης τους.

Η αξιολόγηση των απλών φαινολικών παραγώγων ανέδειξε την Ακετοβανιλλόνη ή Αποσυνίνη (NC3, Aprocynin) και την Ιριφλοφαινόνη (NC19, Iriflophenone) ως σημαντικούς παράγοντες επαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, υπερτερώντας κατά πολύ της οιστραδιόλης, ενώ η Ιριφλοφαινόνη κατέστειλε σημαντικά και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, προκρίνοντας τη σε σημαντικό οστεοπροστατευτικό παράγοντα. Αντίθετα, η Ανδροσίνη (NC14, Androsin) και η Μανγκιφερίνη (NC22, Mangiferin) παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα μόνο στην καταστολή της οστεοκλαστογένεσης και στερούταν δραστηριότητας στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών. Πρέπει να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις προαναφερόμενες ενώσεις δεν παρουσίασαν οιστρογονική δράση, οδηγώντας μας και σε αυτή την περίπτωση στην υπόθεση παρουσίας ενός άλλου μηχανισμού οστεοπροστασίας πέραν της δράσης μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων.

Η ευεργετική επίδραση της Ακετοβανιλλόνης (NC3) στην διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης πιθανόν να συνδέεται με την αντιφλεγμονώδη δράση της καθώς και την πιθανή αντιοξειδωτική δράση της, με δεδομένο την ανάγκη παρουσίας αντιοξειδωτικών παραγόντων (βλ. ασκορβικό οξύ) για τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1. Έχει χαρακτηριστεί ως σημαντικός μη τοξικός αντιφλεγμονώδης παράγοντας αναστέλλοντας την NADPH-οξειδάση και κατ' επέκταση την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου [489, 490]. Η δράση της ακετοβανιλλόνης έχει περιγραφεί σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα φλεγμονής, όπου έχει διαπιστωθεί η αναστολή της NF-κB σηματοδότησης, της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, TNF-α κ.ά.) και η μείωση του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων, με επακόλουθο την αναστολή της φλεγμονώδους διαδικασίας που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες [491, 492, 493]. Πειράματα των Choi & Lee το 2012, ανέδειξαν την προστατευτική δράση της Ακετοβανιλλόνης στην επαγόμενη από την μυκοτοξίνη, αντιμυκίνη-A καταστροφή των οστεοβλαστικών κυττάρων MC3T3-E1 [494]. Η φαινόλη εμπόδισε την επαγωγή της έκφρασης των MMPs (μεταλλοπρωτεΐνες), την απώλεια ενδοκυττάρου ασβεστίου και το προκαλούμενο οξειδωτικό στρες, ενώ ενίσχυσε την επαγωγή της ενεργοποίησης των PI3K, Akt και CREB πρωτεϊνών, που είχαν ανασταλεί από τη μυκοτοξίνη. Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα είναι συνηγορητικά της ευεργετικής δράσης της Ακετοβανιλλόνης στους οστεοβλάστες σε διάφορες εκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης και της οστεοπόρωσης.

Την ισορροπητική δράση μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών που φάνηκε να ασκεί η Ιριφλοφαινόνη (NC19) θα μπορούσαμε να τη συσχετίσουμε με την καταγεγραμμένη αντιφλεγμονώδη δράση των βενζοφαινολών. Είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσπάθεια διερεύνησης της οστεοπροστατευτικής δράσης της Ιριφλοφαινόνης, και αν και δεν έχει καταγραφεί μέχρι τώρα η συμβολή της στη φλεγμονώδη διαδικασία, υπάρχουν αναφορές που περιγράφουν την αντιφλεγμονώδη δράση άλλων βενζοφαινολών, κυρίως όμως πρενυλιωμένων. Οι Couteau *et al.*, το 2012, περιέγραψαν την αντιφλεγμονώδη δράση βενζοφαινολών σε *in vivo* μοντέλο μυών [495] και μεταγενέστερες αναφορές αποδεικνύουν την δράση της Γκαρσινόλης (Garcinol), μιας φυτικής προέλευσης πρενυλιωμένης βενζοφαινόνης, στη φλεγμονώδη διαδικασία τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μοντέλα φλεγμονής [496, 497].

Η ξανθόνη Μανγκιφερίνη (NC22), ως φυσικό προϊόν έχει χαρακτηριστεί για τις αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές, αλλά και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της [482, 498, 499], με τις τελευταίες να προσδιορίζονται μέσω παρέμβασης της ξανθόνης στην NF-κB και MAPK

σηματοδότηση. Η πρώτη αναφορά για τη δράση της Μανγκιφερίνης στα οστά, φαίνεται να είναι εκείνη των Li *et al.*, το 1998 [500]. Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε η δράση ενός σκευάσματος (“Kampo formulae”), που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην Κίνα και την Ιαπωνία για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης και μεταξύ άλλων περιέχει Μανγκιφερίνη. Το “Kampo formulae” αξιολογήθηκε σε ωθηκεκτομημένους μύες και διαπιστώθηκε η ικανότητά του να αντιστρέφει την προκαλούμενη μείωση της οστικής πυκνότητας, ενώ η περιεχόμενη Μανγκιφερίνη προκάλεσε καταστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών *in vitro*. Μεταγενέστερη μελέτη, που αφορούσε πάλι σκεύασμα της παραδοσιακής Κινέζικης θεραπευτικής για την οστεοπόρωση, είχε αντίστοιχα αποτελέσματα σε ωθηκεκτομημένους επίμυες, ενώ η περιεχόμενη Μανγκιφερίνη διέθετε σημαντική ικανότητα καταστολής της έκφρασης της TRAP, αλλά στερούταν δραστηριότητας σε κύτταρα οστεοβλαστών [501]. Επιπρόσθετα, από τους Ang *et al.*, το 2011 περιγράφηκε η κατασταλτική δράση της Μανγκιφερίνης στην οστεοκλαστογένεση και διαπιστώθηκε η μείωση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, μέσω παρεμβολής της στην RANKL σηματοδότηση [502]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της στην καταστολή της επαγόμενης από τον NF-κΒ, ενεργοποίησης της RANKL, φαίνεται να είναι μέσω αναστολής της αποδόμησης της IκB-α και της πυρηνικής μετατόπισης της υπομονάδας p65 του NF-κΒ.

Ο έλεγχος των ισοφλαβονικών παραγώγων σε όλες τις κυτταρικές σειρές, οδήγησε στην ομαδοποίησή τους σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη δράση τους. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι ενώσεις που προκάλεσαν προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, καταστολή της οστεοκλαστογένεσης και επίσης στερούταν οιστρογονικότητας. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται η Ιριστεκτοριγενίνη-A (NC24, Iristectorigenin-A) και το γλυκοσιδικό παράγωγο Germanaism-A (NC12), τα οποία παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης AikP 116% και 120%, αντίστοιχα και καταστολή της ενεργότητας TRAP κατά 11% και 22%, αντίστοιχα.

Στη δεύτερη ομάδα εντάσσονται οι ισοφλαβόνες που ήταν ικανές να προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αλλά είτε δεν είχαν καμία επίδραση στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, είτε προκαλούσαν επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης. Η Ιριδίνη (NC25) και ο διγλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC18) επάγουν την έκφραση AikP (126% και 114%, αντίστοιχα), δεν έχουν καμία επίδραση στους οστεοκλάστες και στερούνται οιστρογονικότητας. Αντίστοιχα, η Ιριγενίνη (NC20), ο διγλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC15) και η Τεκτοριγενίνη (NC4), ενώ συνεισφέρουν σημαντικά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση με τιμές έκφρασης AikP 170%,

110% και 241% αντίστοιχα, παρουσιάζουν και σημαντική επαγωγή της έκφρασης TRAP. Μεταξύ των προαναφερόμενων μεταβολιτών, μόνο η Τεκτοριγενίνη (NC4) χαρακτηρίζεται από υψηλή οιστρογονικότητα, τόσο στα κύτταρα του ενδομητρίου (Ishikawa), όσο και στα καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7).

Στην τρίτη ομάδα εντάσσονται οι ισοφλαβόνες, οι οποίες δεν ήταν ικανές να επάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αλλά κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση. Σε αυτές ανήκουν η Ιρισφλορεντίνη (NC2) με καταστολή της έκφρασης TRAP κατά 35%, καθώς και η Ιριλόνη (NC23) και ο γλυκοσίδης της (NC26) με καταστολή της έκφρασης TRAP κατά 22% και 11% αντίστοιχα. Μεταξύ αυτών τόσο η Ιριλόνη, όσο και ο γλυκοσίδης της είχαν σημαντική οιστρογονική δράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην τρίτη ομάδα ανήκουν όλα τα παράγωγα Ιρισολόνης, η γενίνη και τα τρία γλυκοσιδικά παράγωγά της (NC21, NC13, NC16 και NC17). Μεταξύ αυτών την ασθενέστερη καταστολή της έκφρασης TRAP (3%) παρουσιάζει η γενίνη (NC21), ενώ τα γλυκοσιδικά παράγωγα κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση, παρουσιάζοντας μείωση της ενεργότητας της TRAP από 20% έως 40% και κανένα εξ' αυτών δεν παρουσίασε σημαντική οιστρογονική δράση. Παρατηρώντας τις δομικές ομοιότητες των ενώσεων της τρίτης ομάδας, διαπιστώνεται ότι όλες, εκτός της Ιριλόνης και του γλυκοσίδη της, διαθέτουν μια μεθοξυλομάδα στη θέση 5 του Α-δακτυλίου, που πιθανόν να δρα καταλυτικά στη δραστηριότητα των μορίων.

Οι ισοφλαβόνες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, στην πλειονότητά τους δεν έχουν εκτενώς αξιολογηθεί ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η πλέον μελετημένη εξ' αυτών είναι η Τεκτοριγενίνη (NC4), η οποία σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία χαρακτηρίζεται από αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και οιστρογονικές ιδιότητες. Αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση έχει αποδοθεί στην Ιριγενίνη (NC20) και στον γλυκοσίδη της Ιριλόνης (NC26), ενώ για την Ιριγενίνη (NC20), την Ιριστεκτοριγενίνη (NC24), την Ιρισφλορεντίνη (NC2) και την Ιρισολόνη (NC21) υπάρχουν αναφορές μόνο για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους.

Η Τεκτοριγενίνη (NC4) στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκε από σημαντική επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, αλλά και ως ισχυρός αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ένας από τους μηχανισμούς δράσης της στους οστεοβλάστες πιθανόν να είναι η σύνδεσής της με τους υποδοχείς οιστρογόνων και κατ' επέκταση η επαγωγή της διαφοροποίησής τους. Η οιστρογονικότητά της είχε προσδιοριστεί σε *in vitro* πειράματα πρόσδεσης στους υποδοχείς ERα

και ERβ, όπου φάνηκε η ικανότητά της να προσδένεται ισχυρά και στους δύο υποδοχείς [435, 503]. Οι Seidlová-Wuttke *et al.*, το 2004, μελέτησαν περαιτέρω τη δράση της Τεκτοριγενίνης, χορηγώντας την σε ωθηκεκτομημένους επίμυες και διαπιστώθηκε η ικανότητά της να δρα στην υπόφυση, αναστέλλοντας την έκκριση ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH), η οποία έχει συσχετιστεί, μεταξύ άλλων και με τις εξάψεις (hot flashes) κατά την εμμηνόπαυση [503]. Επιπρόσθετα, όταν χορηγήθηκε εκχύλισμα που περιείχε Τεκτοριγενίνη στο ίδιο μοντέλο πειραματοζώων, διαπιστώθηκε η ευεργετική επίδρασή του στα οστά, αυξάνοντας την οστική τους πυκνότητα, ενώ δεν είχε καμία επίδραση τόσο στη μήτρα, όσο και στο μαστό. Οι προαναφερόμενες παρατηρήσεις φάνηκαν ικανές για να κατατάξουν την Τεκτοριγενίνη στους Επιλεκτικούς Τροποποιητές των Υποδοχέων Οιστρογόνων (SERMs). Παρόλα ταύτα, σε μεταγενέστερες *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε η οιστρογονική δράση της Τεκτοριγενίνης σε κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7, T47D), στις οποίες προκαλούσε σημαντική επαγωγή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού [421, 504].

Αν και στην παρούσα μελέτη, η Ιριλόνη (NC23) και ο γλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC26) φάνηκε να διαθέτουν σημαντική οιστρογονική δράση, δεν έχει διαπιστωθεί στη βιβλιογραφία, η μελέτη των συγκεκριμένων ενώσεων, καθώς και των υπόλοιπων ισοφλαβονικών παραγώγων, ως προς την οιστρογονικότητά τους.

Η έλλειψη οιστρογονικότητας που χαρακτηρίζει τις περισσότερες ισοφλαβόνες που μελετήθηκαν, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση ή/και καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση δεν είναι η σύνδεση με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Μιας και το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή αποτελούν σημαντικές διαδικασίες κατά την εξέλιξη της οστεοπόρωσης, η διαμεσολάβησή των ισοφλαβονών στις συγκεκριμένες διεργασίες πιθανόν να δρα ευεργετικά στην διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των δύο τύπων οστικών κυττάρων.

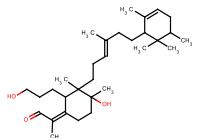
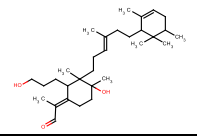
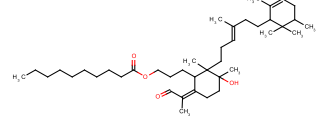
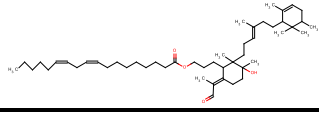
Η Τεκτοριγενίνη (NC4) έκτος της οιστρογονικότητας, παρουσιάζει και σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση. Οι Lee *et al.* σε πρόσφατη μελέτη τους το 2015, περιέγραψαν την ικανότητα τόσο της Τεκτοριγενίνης, όσο και άλλων παραγώγων, μεταξύ αυτών και της Ιριστεκτοριγενίνης (NC24), της Ιρισφλορεντίνης (NC2) και της Ιριγενίνης (NC20), να παρεμβαίνουν στην προκαλούμενη από ενδοτοξίνη (LPS) φλεγμονή μακροφάγων κυττάρων, καταστέλλοντας την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) [423]. Η αντιφλεγμονώδης δράση της Ιριγενίνης (NC20), Ιριστεκτοριγενίνης (NC24) και Ιριλόνης (NC26) διαπιστώθηκε και κατά

την χορήγησή τους σε ενεργοποιημένα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, όπου η δραστηριότητα των ισοφλαβονών ήταν ανάλογη της ασπιρίνης και ινδομεθακίνης, γνωστών αντιφλεγμονωδών παραγόντων [120].

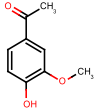
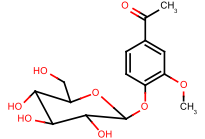
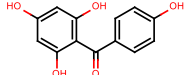

Επιπρόσθετα, για την Τεκτοριγενίνη και την Ιριγενίνη έχουν περιγραφεί και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν στη φλεγμονή, αναφέροντας ότι η μείωση του NO, πραγματοποιείται μέσω καταστολής της έκφρασης της συνθετάσης του (iNOS), ενώ παρατηρήθηκε και καταστολή της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και της προσταγλανδίνης-2 (PEG-2), σημαντικών μορίων για την εξέλιξη της φλεγμονής, μέσω αναστολής της NF-κB σηματοδότησης [419, 439].

Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα της Τεκτοριγενίνης (NC4) και Ιριγενίνης (NC20) έχει προσδιοριστεί σε *in vitro* πειράματα στερούμενα κυττάρων, κατά τα οποία οι προαναφερόμενες ισοφλαβόνες αποτελούσαν τα κύρια συστατικά κλασμάτων φυτικού εκχυλίσματος με αξιολογημένη αντιοξειδωτική ικανότητα [505]. Ο γλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC26), από την άλλη, είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένας από τους πιο δραστικούς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το είδος *Iris pseudopumila* και αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση [459], ενώ συντοίμως άλλης, στην παρούσα μελέτη παρουσίασε σημαντική οιστρογονική δράση. Η οιστρογονικότητα, μαζί με την αντιοξειδωτική του ικανότητα πιθανόν δικαιολογούν την κατασταλτική του δράση στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης.

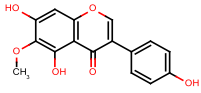
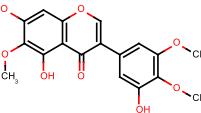
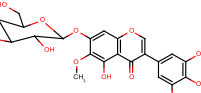
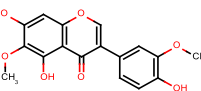
Συνοπτικοί πίνακες αποτελεσμάτων

		<u>MC3T3-E1</u> Έκφρασης AlkP (% των ΔΠ)	<u>RAW264.7</u> Έκφρασης TRAP (% των ΔΠ)	<u>ISHIKAWA</u> Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM)	<u>MCF-7</u> Κυτ. Πολ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM)
NC	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
7		315.1±1.0	132.6±5.6	M	M
8		227.7±24.5	119.8±8.6	M	M
10		299.1±10.7	46.2±0.6	M	M
11		173.1±13.5	62.6±1.7	M	M

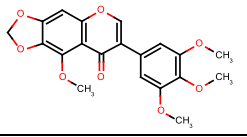
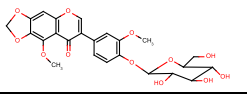
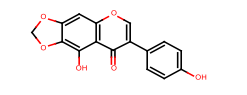
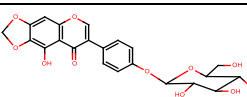
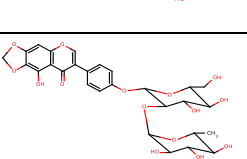
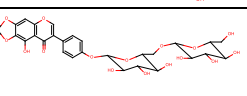
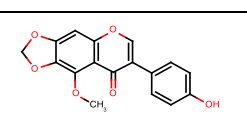
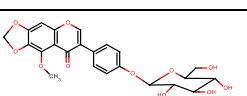
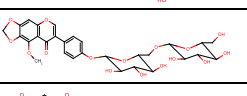
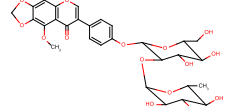
Πίνακας 6.1 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των τριτερπενικών παραγώγων τύπου ιριδάλης, στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).

NC	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	MC3T3-E1 Έκφρασης AlkP (% των ΔΠ) 10 μM	RAW264.7 Έκφρασης TRAP (% των ΔΠ) 10 μM	ISHIKAWA Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM) 10 μM	MCF-7 Κυτ. Πολ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM) 10 μM
3		124.35±2.9	238.9±20.7	M	M
14		96.3±4.1	70.4±10.7	M	M
19		165.3±7.0	54.8±1.2	M	W (28.8±2.6)
22		94.9±2.4	72.3±0.9	W (25.9±2.0)	P (53.7±3.6)

Πίνακας 6.2 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των απλών φαινολικών παραγώγων, 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).

		MC3T3-E1 Έκφρασης AlkP (% των ΔΠ)	RAW264.7 Έκφρασης TRAP (% των ΔΠ)	ISHIKAWA Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM)	MCF-7 Κυτ. Πολλ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM)
NC	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
4		240.9±12.7	241.0±8.9	F (96.6±3.0)	F (87.5±1.6)
20		169.4±12.6	155.1±24.5	M	M
25		125.85±4.6	100.5±17.4	M	M
24		115.7±4.0	89.1±3.6	M	W (18.2±0.6)

Πίνακας 6.3 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των ισοφλαβονών, 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).

		MC3T3-E1 Έκφρασης AlkP (% των ΔΠ)	RAW264.7 Έκφρασης TRAP (% των ΔΠ)	ISHIKAWA Έκφρασης AlkP (αγωνισμός % της E2 1 nM)	MCF-7 Κυτ. Πολ/σμος (αγωνισμός % της E2 0.1 nM)
NC	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
2		96.6±0.1	64.8±1.9	M	M
12		119.5±1.4	77.8±9.4	M	M
23		30.0±0.3	78.2±2.3	P (49.8±1.7)	P (48.2±1.4)
26		88.4±1.7	88.8±4.1	P (55.7±2.2)	F (69.5±4.0)
15		110.0±2.2	129.6±13.2	M	M
18		114.0±5.2	104.5±1.5	M	M
21		104.7±3.7	96.8±2.9	W (11.4±0.6)	W(31.2±0.2)
13		96.5±4.7	70.1±0.6	M	M
16		107.6±8.2	80.0±4.5	M	M
17		99.8±5.1	59.9±3.3	M	M

Πίνακας 6.4 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των ισοφλαβονών με 6,7-μεθυλενοδιόξυ-ομάδα, 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).

7. Παρασκευή και *in vivo* αξιολόγηση μεθανολικού εκχυλίσματος ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* σε πειραματικό πρότυπο θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμυος

7.1. Παρασκευή του εκχυλίσματος των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (IUCM)

Προκειμένου να είναι εφικτή η χορήγηση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* στα πειραματόζωα για έξι μήνες, κρίθηκε απαραίτητη η παρασκευή του σε μεγαλύτερη κλίμακα. Για το σκοπό αυτό οι κονιοποιημένες ρίζες του φυτού εκχυλίστηκαν με μεθανόλη με χρήση υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, σε 300 g δρόγης προστέθηκε μεθανόλη και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, χωρίς θέρμανση σε υδατόλουτρο υπερήχων και σε τρεις κύκλους των 30 λεπτών ο καθένας. Ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος μέχρι ξηρού υπό κενό και ζύγιση του τελικού ξηρού εκχυλίσματος (απόδοση ~13%).

Προκειμένου να χορηγηθεί το εκχύλισμα στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων ακολούθησε επαναδιάλυσή του σε πόσιμο νερό και σε συγκέντρωση 2 g/L. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση χορήγησης 200 mg / kg / ημέρα και δεδομένου ότι οι επίμυες καταναλώνουν περίπου 30 ml νερού την ημέρα. Έτσι, το υδατικό παρασκεύασμα του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* χορηγήθηκε στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων της ομάδας OVX+IUCM αμέσως μετά την ωθηκεκτομή 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. Ο μέσος όρος κατανάλωσης εκχυλίσματος και νερού ήταν πράγματι περίπου 30ml / 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.

7.2. Προσδιορισμός οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry)

Η μέθοδος απορροφησιμετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων-X (DEXA) χρησιμοποιείται συχνά σε πρωτόκολλα προκαλούμενης οστεοπόρωσης σε ζώα εργαστηρίου για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας και της οστικής μάζας [506]. Η ανάλυση που χαρακτηρίζει τα σύγχρονα μηχανήματα παρέχει επίσης τη δυνατότητα εκτίμησης των οστικών παραμέτρων σε συγκεκριμένα σημεία των οστών των πειραματοζώων, μέσω λογισμικού, ικανού να ορίζει αυτές τις περιοχές μέτρησης (ROI).

7.2.1. Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας της κνήμης των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκαν αμέσως πριν την ωθηκεκτομή, αλλά και στους τρεις και έξι μήνες του πειράματος με τη χρήση συσκευής απορροφησιμετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-X (DEXA). Οι τιμές υπολογίστηκαν σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό (g/cm^2) και παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Όπως περιεγράφηκε στην § 1.3.1, αν και οι επίμυες διαμοιράστηκαν τυχαία ανάμεσα στις ομάδες, διαπιστώθηκε ότι στην αρχική μέτρηση των απόλυτων τιμών της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης, η ομάδα OVX παρουσίασε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη οστική πυκνότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Από τη διαχρονική σύγκριση των τιμών της ολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης εντός των ομάδων, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντικής αύξησης της οστικής πυκνότητας στην ομάδα ελέγχου (CONTROL), τόσο στους τρεις (0.215 ± 0.01), όσο και στους έξι μήνες (0.228 ± 0.02), σε σχέση με την αρχική μέτρηση (0.204 ± 0.01). Στις ομάδες OVX και OVX + IUCM, η οστική πυκνότητα μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά στους τρεις αλλά και στους έξι μήνες συγκρινόμενη με την αρχική μέτρηση (Πίνακας 7.1). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην ομάδα OVX η στατιστικά σημαντική μείωση οστικής πυκνότητας που παρατηρήθηκε μεταξύ της τρίμηνης και εξάμηνης μέτρησης δεν διαπιστώθηκε και στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX + IUCM). Η παρατήρηση αυτή αναδεικνύει την προστατευτική δράση του εκχυλίσματος μετά τους πρώτους τρεις μήνες χορήγησής του.

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης					
ΟΜΑΔΕΣ	N	Αρχική μέτρηση	3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή	6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή	Τιμή p εντός των ομάδων
CONTROL	8	0.204±0.01	0.215±0.01*	0.228±0.02*	0.001
OVX	10	0.225±0.02	0.204±0.01* ⁺	0.195±0.01*	<0.0005
OVX + IUCM	10	0.204±0.01	0.198±0.01*	0.192±0.01*	<0.0005

Πίνακας 7.1 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * $p < 0.05$ σε σχέση με την αρχική μέτρηση, + $p < 0.05$ σε σχέση με την μέτρηση στους 6 μήνες

Η σύγκριση της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων κατά την αρχική μέτρηση. Η διαχρονική σύγκριση των τιμών για την ομάδα CONTROL ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της οστικής πυκνότητας της εξάμηνης μέτρησης σε σχέση τόσο με την τρίμηνη, όσο και με την αρχική (0.427 έναντι 0.410 και 0.390 g/cm², αντίστοιχα). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην ομάδα OVX, αλλά διαπιστώθηκε επιπλέον στατιστικά σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας και μεταξύ της τρίμηνης μέτρησης και της αρχικής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρότι η ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX + IUCM) επέδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας τον 3^ο και 6^ο μήνα σε σχέση με την αρχική, δεν χαρακτηρίστηκε από σημαντική διαφορά μεταξύ της τρίμηνης και εξάμηνης μέτρησης. Από τις συγκρίσεις των ομάδων ανά ζεύγη, αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στις ομάδες OVX και (OVX + IUCM) τόσο στους τρεις, όσο και στους έξι μήνες. Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και μεταξύ της ομάδας παρέμβασης (OVX + IUCM) και της OVX στους 6 μήνες (0.328 και 0.293 g/cm², αντίστοιχα) (Πίνακας 7.2).

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης					
ΟΜΑΔΕΣ	N	Αρχική μέτρηση	3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή	6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή	Τιμή p εντός των ομάδων
CONTROL	8	0.390±0.02	0.410±0.02 ⁺	0.427±0.02*	0.002
OVX	10	0.407±0.02	0.332±0.02* ⁺	0.293±0.01*	<0.0005
OVX + IUCM	10	0.408±0.01	0.351±0.04*	0.328±0.04*	<0.0005

Πίνακας 7.2 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * p<0.05 σε σχέση με την αρχική μέτρηση, + p<0.05 σε σχέση με την μέτρηση στους 6 μήνες

Αν και μετά τους έξι μήνες χορήγησης, η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος δεν ήταν τόσο ικανοποιητική, συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου, παρόλα αυτά συγκρινόμενη με την ομάδα OVX διέφερε στατιστικώς σημαντικά στην εξάμηνη μέτρηση. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την σταθερότητα της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης, που επέδειξε η ομάδα παρέμβασης κατά την τρίμηνη και εξάμηνη μέτρηση υποδεικνύει την προστατευτική επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος, κυρίως στο σπογγώδες τμήμα της άπω μετάφυσης της κνήμης μετά τους τρεις μήνες χορήγησής του και μέχρι το τέλος του πειράματος.

7.2.2. Ποσοστιαίες αλλαγές της οστικής πυκνότητας

Οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας που προέκυψαν με τη μέθοδο DEXA, μετατράπηκαν σε ποσοστιαίες μεταβολές μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 7.3).

Η σύγκριση των ποσοστιαίων αλλαγών της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης, ανέδειξαν σημαντικές διαφορές από την αρχική μέτρηση στους τρεις και έξι μήνες μεταξύ όλων των ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκρίσεις από την αρχική μέτρηση στους τρεις και έξι μήνες μεταξύ της ομάδας ελέγχου (CONTROL) και της (OVX + IUCM) έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας (-3.0% έναντι 5.3% και -5.7% έναντι 11.6% αντίστοιχα), με αποτέλεσμα η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος να μην θεωρείται αρκετά αποτελεσματική ώστε να αντισταθμίσει την οστική απώλεια που προκαλείται μετά την ωοθηκεκτομή. Παρόλα ταύτα, οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές που προέκυψαν μετά τη σύγκριση των ομάδων OVX και (OVX + IUCM) τόσο στους τρεις, όσο και στους έξι μήνες, ανέδειξαν τη σημαντική οστεοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος (-8.9% έναντι -3.0% και -13.0% έναντι -5.7% αντίστοιχα), όπως φαίνεται στους πίνακες 7.4 και 7.5.

Στην περίπτωση του σπογγώδους οστού της εγγύς μετάφυσης της κνήμης, από τη σύγκριση των ποσοστιαίων αλλαγών προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων κατά την σύγκριση της αρχικής με την τρίμηνη και εξάμηνη μέτρηση. Όσον αφορά την σύγκριση των ομάδων OVX και (OVX + IUCM), παρατηρήθηκε μια μικρή διαφορά μεταξύ της αρχικής και της τρίμηνης μέτρησης (-18.4% έναντι -14.0%), η οποία κατέστη στατιστικώς σημαντική στην τελική μέτρηση στους έξι μήνες (-27.9% έναντι -19.7%) όπως φαίνεται στους πίνακες 7.4 και 7.6.

Συμπερασματικά, η χορήγηση του εκχυλίσματος μπορεί να μην ήταν ικανή να αντισταθμίσει πλήρως τη μείωση της οστικής απώλειας του σπογγώδους οστού που προκαλείται μετά την ωοθηκεκτομή στους επίμυες, ήταν όμως ικανή να μειώσει την οστική απώλεια σε σχέση με την ομάδα που δεν λάμβανε το εκχύλισμα.

Ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας (%)				
	CONTROL	OVX	OVX + IUCM	
Πυκνότητα κνήμης	5.31	-8.87	-3.03	0-3 μήνες
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης	5.58	-18.42	-14.02	
Πυκνότητα κνήμης	11.59	-13.03	-5.72	0-6 μήνες
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης	9.84	-27.86	-19.69	

Πίνακας 7.3 Ποσοστιαίες μεταβολές των παραμέτρων DEXA στους 3 και 6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας.

Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών DEXA				
	CONTROL vs OVX	CONTROL vs (OVX + IUCM)	OVX vs (OVX + IUCM)	
Πυκνότητα κνήμης	<0.0005	<0.0005	0.007	0-3 μήνες
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης	<0.0005	<0.0005	0.314	
Πυκνότητα κνήμης	<0.0005	<0.0005	0.045	0-6 μήνες
Πυκνότητα εγγύς μετάφυσης κνήμης	<0.0005	<0.0005	0.037	

Πίνακας 7.4 Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών ανά ζεύγη ομάδων

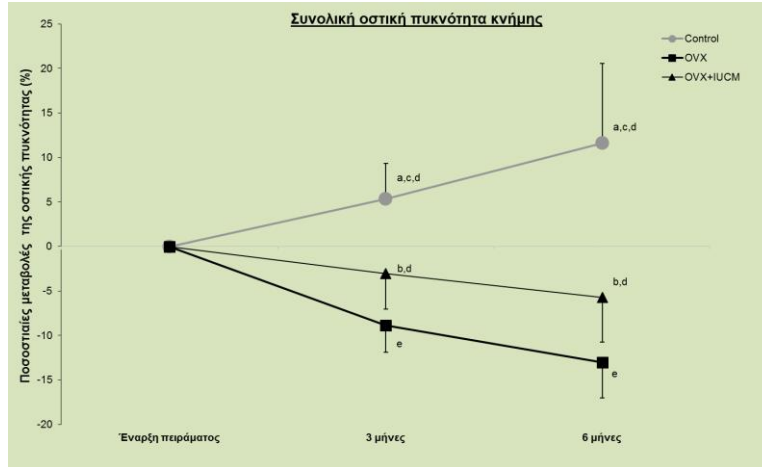
Ποσοστιαίες μεταβολές οστικής πυκνότητας κνήμης (%)				
	0-3 μήνες		0-6 μήνες	
ΟΜΑΔΕΣ	Μέση τιμή	Τιμή p μεταξύ των ομάδων	Μέση τιμή	Τιμή p μεταξύ των ομάδων
CONTROL	5.3	<0.0005	11.6	<0.0005
OVX	-8.9*		-13.0*	
OVX + IUCM	-3.0* ⁺		-5.7* ⁺	

Πίνακας 7.5 Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης: * p<0.05 σε σχέση με το CONTROL, + p<0.05 σε σχέση με το OVX

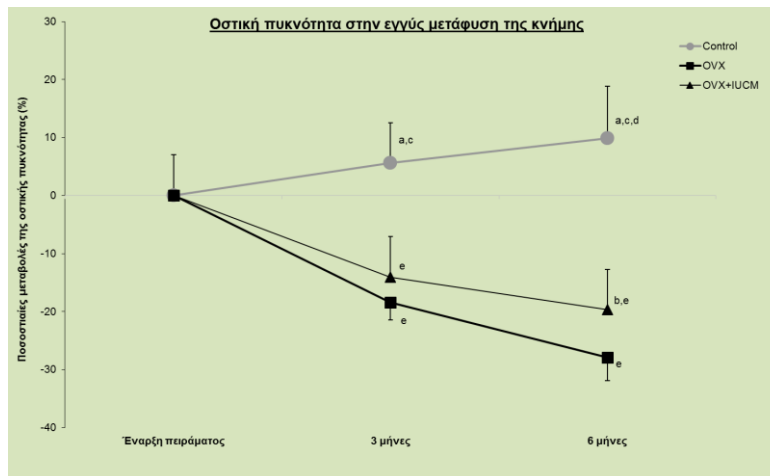
Ποσοστιαίες μεταβολές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης (%)				
	0-3 μήνες		0-6 μήνες	
ΟΜΑΔΕΣ	Μέση τιμή	Τιμή p μεταξύ των ομάδων	Μέση τιμή	Τιμή p μεταξύ των ομάδων
CONTROL	5.6	<0.0005	9.8	<0.0005
OVX	-18.4*		-27.9*	
OVX + IUCM	-14.0*		-19.7* ⁺	

Πίνακας 7.6 Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης: * p<0.05 σε σχέση με το CONTROL, + p<0.05 σε σχέση με το OVX

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 7.1 Διάγραμμα ποσοστιαία μεταβολή της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: a: $p < 0.005$ σε σχέση με το OVX, b: $p < 0.05$ σε σχέση με το OVX, c: $p < 0.005$ σε σχέση με το OVX+IUCM, d: $p < 0.05$ σε σχέση με την baseline και e: $p < 0.005$ σε σχέση με την baseline. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.



Εικόνα 7.2 Διάγραμμα ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση κνήμης: a: $p < 0.005$ σε σχέση με το OVX, b: $p < 0.05$ σε σχέση με το OVX, c: $p < 0.005$ σε σχέση με το OVX+IUCM, d: $p < 0.05$ σε σχέση με την baseline και e: $p < 0.005$ σε σχέση με την baseline. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

7.3. Προσδιορισμός οστικών παραμέτρων με χρήση Περιφερικής Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT, Peripheral Quantitative Computerized Tomography)

Η περιφερική ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (pQCT) αποτελεί μια δυναμική απεικονιστική τεχνική, ικανή να εκτιμά τρισδιάστατες εικόνες συγκεκριμένου πάχους. Επίσης, επιτρέπει τον προσδιορισμό της ογκομετρικής οστικής πυκνότητας ξεχωριστά στο σπογγώδες και στο φλοιώδες τμήμα των οστών καθώς και των γεωμετρικών παραμέτρων του [60]. Η ευαισθησία της μεθόδου στη διάκριση οστεοπορωτικών και φυσιολογικών δειγμάτων είναι ανάλογη της μεθόδου DEXA και χρησιμοποιείται συμπληρωματικά σε μοντέλα οστεοπόρωσης.

Με την περιφερική ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (pQCT) προσδιορίστηκαν *ex vivo* η ολική οστική πυκνότητα (TOT_DEN), το συνολικό εμβαδό (TOT_A), η οστική πυκνότητα και το εμβαδόν του σπογγώδους (TRAB_DEN, TRAB_A αντίστοιχα), του υποφλοιώδους (SUBCRT_DEN, SUBCRT_A αντίστοιχα) και του φλοιώδους οστού (CRT_DEN, CRT_A αντίστοιχα), καθώς και η ογκομετρική πυκνότητα ή αλλιώς ο δείκτης εκτίμησης της μηχανικής αντοχής του δοκιμίου (SSI). Οι θέσεις των τομών έγιναν μετά από τη σάρωση ολόκληρου του μήκους του οστικού δοκιμίου και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε απόσταση 3mm, 4mm και 20mm από την γραμμή αναφοράς (εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης). Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν ανά τομή φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν.

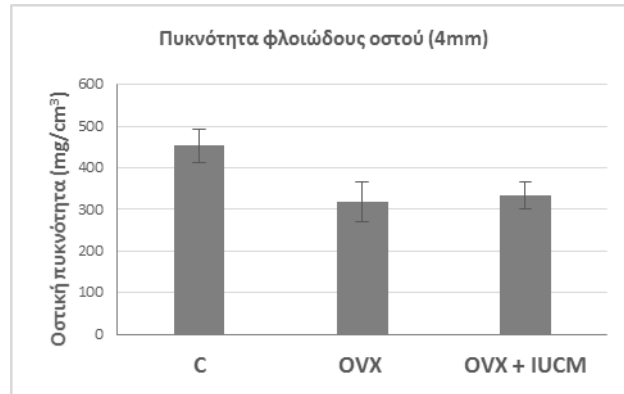
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΟΜΑΔΕΣ	3mm			4mm		
		N	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση	N	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση
TOT_DEN(mg/cm ³)	CONTROL	8	650.25	66.6	8	650.09	51.8
	OVX	10	476.7	12.0	10	452.8	30.7
	OVX + IUCM	10	457.6	50.0	10	437.8	63.3
TOT_A (mm ²)	CONTROL	8	18.25	2.7	8	14.43	1.8
	OVX	10	19.93	3.7	10	16.37	2.2
	OVX + IUCM	10	17.75	3.8	10	17.33	5.2
TRAB_DEN(mg/cm ³)	CONTROL	8	472.93	13.0	8	452.8	40.0
	OVX	10	386.9	15.6	10	318.5	47.3
	OVX + IUCM	10	362.6	52.6	10	332.4	32.5
TRAB_A (mm ²)	CONTROL	8	2.7	1.1	8	2.48	1.1
	OVX	10	6.66	2.7	10	5.9	0.9
	OVX + IUCM	10	6.93	3.0	10	7.13	3.2
SUBCRT_DEN(mg/cm ³)	CONTROL	8	662.11	57.4	8	675.59	33.5
	OVX	10	536.1	25.3	10	550.8	34.1
	OVX + IUCM	10	536.9	36.0	10	482.2	47.3
SUBCRT_A (mm ²)	CONTROL	8	16.9	3.5	8	12.6	1.9
	OVX	10	12.3	1.8	10	11.11	1.5
	OVX + IUCM	10	12.1	1.3	10	11.3	1.6

Πίνακας 7.7 Παράμετροι pQCT στα 3mm και 4mm από την εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΟΜΑΔΕΣ	20mm		
		N	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση
CRT_DEN(mg/cm ³)	CONTROL	8	908.86	31.8
	OVX	10	854.3	26.7
	OVX + IUCM	10	860.4	32.8
CRT_A (mm ²)	CONTROL	8	5.74	0.6
	OVX	10	6.05	0.5
	OVX + IUCM	10	5.69	0.5
SSI _{polar} (mm ³)	CONTROL	8	3.26	0.4
	OVX	10	3.36	0.4
	OVX + IUCM	10	3.2	0.3

Πίνακας 7.8 Παράμετροι pQCT στο 20mm από την εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης.

Σε όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου (CONTROL) και των ομάδων ωοθηκεκτομής (OVX, OVX+IUCM), οι οποίες ήταν στατιστικώς σημαντικές σε όλες τις παραμέτρους οστικής πυκνότητας. Στην ομάδα OVX+IUCM στην πρώτη τομή (3mm) που πραγματοποιήθηκε στην κνήμη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις τιμές των μετρούμενων παραμέτρων μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+IUCM (πίνακας 7.7). Στη δεύτερη τομή σε απόσταση 4mm από την γραμμή αναφοράς, διαπιστώθηκε μια μικρή αύξηση της οστικής πυκνότητας του σπογγώδους οστού της ομάδας OVX+IUCM ($332.4 \pm 32.5 \text{ mg/cm}^3$) συγκρινόμενη με OVX ($318.5 \pm 47.3 \text{ mg/cm}^3$), όχι όμως στατιστικώς σημαντική (πίνακας 7.7).



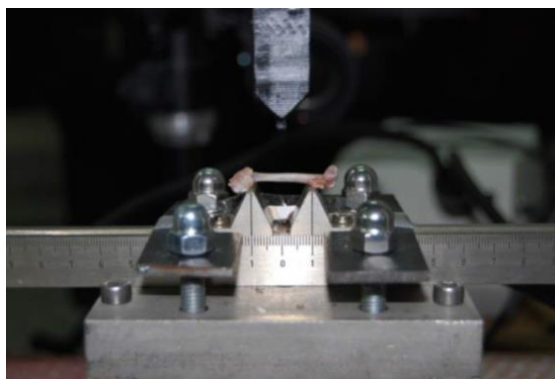
Εικόνα 7.3 Ιστόγραμμα της οστικής πυκνότητας του φλοιώδους οστού στα 4mm από τη διάφυση της κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Στην τρίτη τομή της κνήμης (20mm) στην περιοχή της διάφυσης, η οστική πυκνότητα του φλοιώδους οστού για την ομάδα CONTROL ήταν $908.86 \pm 31.8 \text{ mg/cm}^3$, για την OVX $854.3 \pm 26.7 \text{ mg/cm}^3$ και για την ομάδα OVX+IUCM $860.4 \pm 32.8 \text{ mg/cm}^3$. Διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων παρατηρήθηκαν και στις τιμές του εμβαδού του φλοιώδους οστού στη συγκεκριμένη τομή, με την ομάδα OVX+IUCM να δίνει τιμές ενδιάμεσες σε σχέση με την CONTROL και OVX ομάδα. Τέλος, ο προσδιορισμός του δείκτη εκτίμησης της μηχανικής αντοχής του δοκιμίου (SSI), έδωσε για την ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX+IUCM) τιμή πλησιέστερη εκείνης της CONTROL και όχι της OVX ομάδας, όχι όμως στατιστικώς σημαντική (πίνακας 7.8).

7.4. Εμβιομηχανικές παράμετροι – Κάμψη τριών σημείων

7.4.1. Υπολογισμός δύναμης θραύσεως – δαπανηθείσας ενέργειας - στιβαρότητας

Με τη λήξη της *in vivo* πειραματικής διαδικασίας, τα μηριαία οστά καθαρίστηκαν από τους παρακείμενους ιστούς και διατηρήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.3.5. Η μελέτη των μηχανικών χαρακτηριστικών των δοκιμίων πραγματοποιήθηκε μέσω του πειράματος κάμψης-καταπόνησης τριών σημείων. Μέσω της συγκεκριμένης πειραματικής μεθόδου προσδιορίστηκε η αντοχή και η στιβαρότητα του οστίτη ιστού με χρήση των παραμέτρων της μέγιστης δύναμης θραύσης, στιβαρότητας, τάσης θραύσης και της απορροφούμενης ενέργειας παραμορφώσεων ανά μονάδα όγκου ιστού. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κάμψη καταγράφηκαν σε ειδικό λογισμικό, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ακριβούς καταγραφής του ασκούμενου φορτίου κάθε χρονική στιγμή μέσω κατάλληλης εξαιρετικά ευαίσθητης μικροκυψελίδας (ευαισθησία 0.01 N). Με χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού υπολογίστηκε το φορτίο αστοχίας (Newton) και κατόπιν περαιτέρω επεξεργασίας των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν οι χαρακτηριστικές καμπύλες φόρτισης-παραμόρφωσης των δοκιμίων.



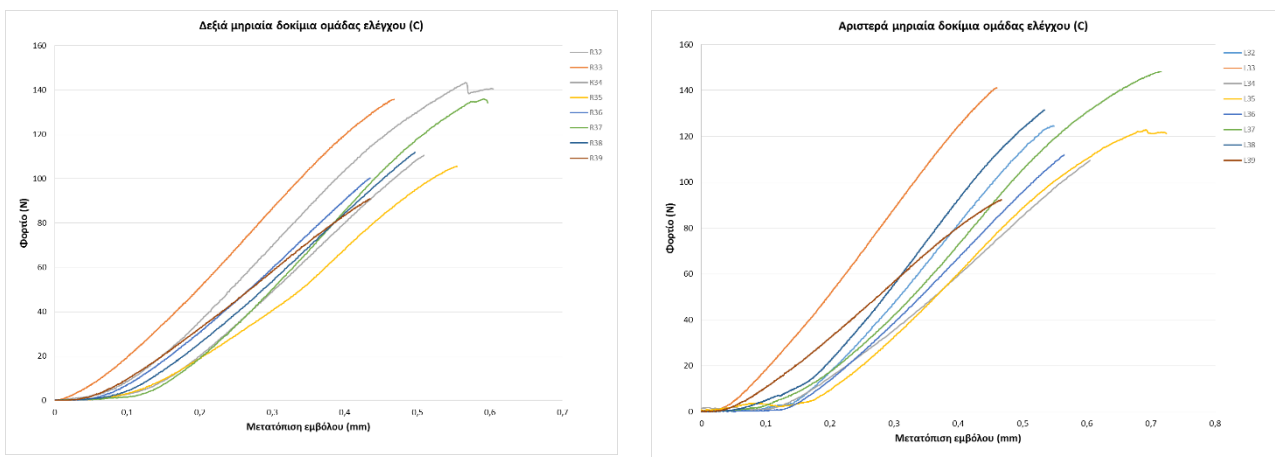
Διάταξη τοποθέτησης των δοκιμίων στο πλαίσιο φόρτισης

Σε μια τυπική καμπύλη φόρτισης-παραμόρφωσης διακρίνονται τρία τμήματα: το εναρκτήριο μη γραμμικό τμήμα, το οποίο αντιστοιχεί στην προσαρμογή του δοκιμίου στις στρογγυλεμένες άκρες της συσκευής φόρτισης, το γραμμικό τμήμα, που αντικατοπτρίζει τη γραμμική ελαστική συμπεριφορά του οστού και το τελικό μη γραμμικό μέρος, που αντιστοιχεί

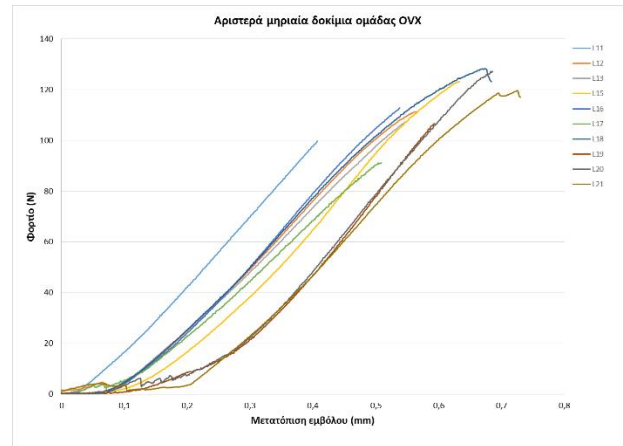
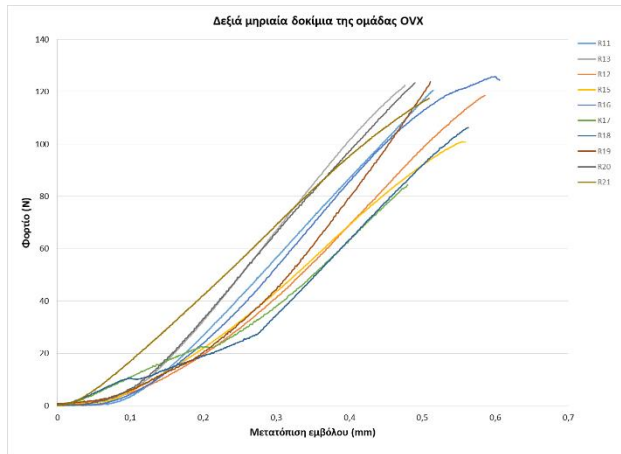
στη μη ελαστική συμπεριφορά του οστού και καταλήγει στο σημείο που αντιπροσωπεύει την μέγιστη φόρτιση του εκάστοτε δοκιμίου. Από την καμπύλη φόρτισης-παραμόρφωσης υπολογίζονται η απορροφούμενη (δαπανηθείσα) ενέργεια παραμόρφωσης ανά μονάδα όγκου ιστού (mJ), που αντιστοιχεί στο εμβαδό που περικλείεται από την καμπύλη, καθώς και η στιβαρότητα (δυσκαμψία) των δοκιμίων που προκύπτει από την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης (N/mm).

Για τον προσδιορισμό της τάσης αστοχίας (σ) των δοκιμίων έγινε η παραδοχή της κυκλικής διατομής των οστών και η τάση αστοχίας υπολογίστηκε θεωρώντας το οστό στο σημείο αστοχίας τόσο κυκλικό δίσκο, όσο και κυλινδρικό δίσκο μέσου πάχους.

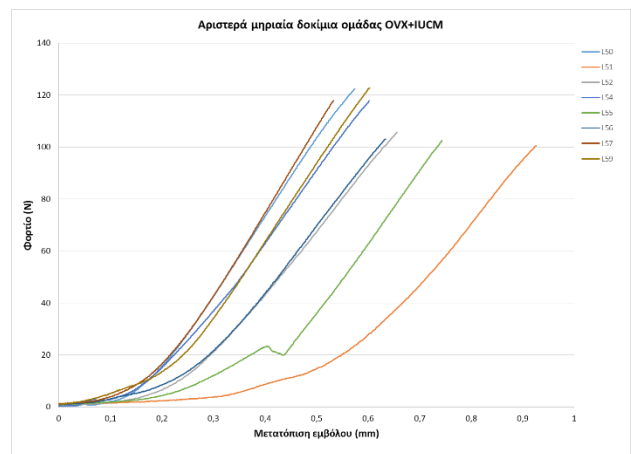
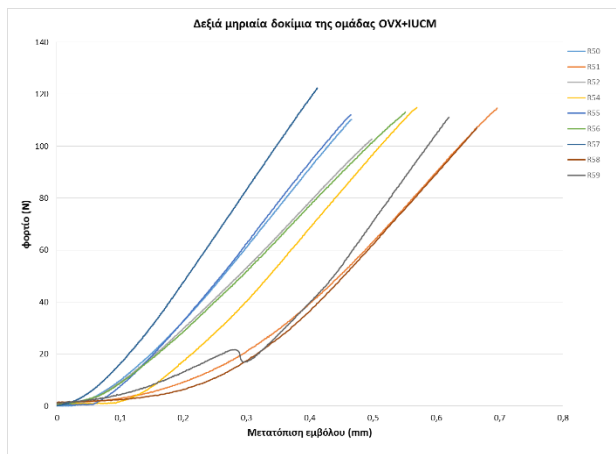
Στη συνέχεια παρατίθενται οι καμπύλες φόρτισης-παραμόρφωσης των οστών όλων των ομάδων που ελέγχθηκαν (εικόνες 7.4, 7.5 και 7.6).



Εικόνα 7.4 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας ελέγχου (C).



Εικόνα 7.5 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας OVX.



Εικόνα 7.6 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας OVX+IUCM.

Όλες οι παράμετροι εμβιομηχανικής υπολογίστηκαν τόσο στα δεξιά, όσο και στα αριστερά μηριαία οστά και η μέση τιμή τους ανά ομάδα παρατίθεται στον πίνακα 7.9, αλλά και στο σύνολό τους, μιας και δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιού και αριστερού δοκιμίου (Πίνακας 7.10).

ΟΜΑΔΕΣ	Μέγιστη δύναμη (N)		Ενέργεια (mJ)		Στιβαρότητα (N/mm)	
	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο
CONTROL	116.2 ± 6.5	122.5 ± 6.4	28.9 ± 3.0	29.9 ± 3.2	307.9 ± 13.6	306.6 ± 17.3
OVX	113.7 ± 5.1	111.9 ± 3.6	24.8 ± 1.6	26.7 ± 1.9	278.6 ± 9.9	271.4 ± 6.8
OVX + IUCM	113.2 ± 1.4	117.3 ± 2.2	23.6 ± 0.8	24.9 ± 0.6	289.9 ± 12.7	279.5 ± 8.6

Πίνακας 7.9 Μέγιστες τιμές δύναμης, δαπανηθείσας ενέργειας και στιβαρότητας δεξιών και αριστερών μηριαίων οστών όλων των ομάδων ελέγχου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής.

ΟΜΑΔΕΣ	Μέγιστη δύναμη (N)	Ενέργεια (mJ)	Στιβαρότητα (N/mm)
CONTROL	119.3 ± 4.5	29.5 ± 2.1	307.2 ± 10.6
OVX	112.7 ± 3.0	25.6 ± 1.2	276.4 ± 5.9
OVX + IUCM	114.8 ± 1.3	24.2 ± 0.5	284.7 ± 7.5

Πίνακας 7.10 Μέγιστες τιμές δύναμης, δαπανηθείσας ενέργειας και στιβαρότητας όλων των ομάδων ελέγχου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής.

Η μέγιστη φόρτιση (F_{max}) πριν το κάταγμα που υπέμειναν τα οστά κατά την διαδικασία μηχανικής αντοχής τριών σημείων, ήταν για την ομάδα ελέγχου 119.3 ± 4.5 N, για την ομάδα OVX 112.7 ± 3.0 N, ενώ για την ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα 114.8 ± 1.3 N. Σε ότι αφορά την δαπανηθείσα ενέργεια δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+IUCM, ενώ η στιβαρότητα των οστών των πειραματοζώων που λάμβαναν το εκχύλισμα (284.7 ± 7.5 N/mm) φάνηκε να είναι λίγο υψηλότερη συγκρινόμενη με την ομάδα των ωοθηκεκτομηθέντων (276.4 ± 5.9 N/mm), όχι όμως στατιστικώς σημαντική και όχι στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (307.2 ± 10.6 N/mm). Η αστοχία του υλικού εκδηλώθηκε με την εξάπλωση μιας σχεδόν κάθετης ρωγμής, η οποία ξεκινούσε από την αντίθετη πλευρά του οστού σε σχέση με την πλευρά που εφαρμοζόταν η φόρτιση (χαρακτηριστικό ψαθυρών υλικών, όπως τα οστά). Στις λίγες περιπτώσεις που οι ρωγμές ήταν επικλινής σε σχέση με τον επιμήκη άξονα, τα οστά εξαιρέθηκαν από τη στατιστική ανάλυση.

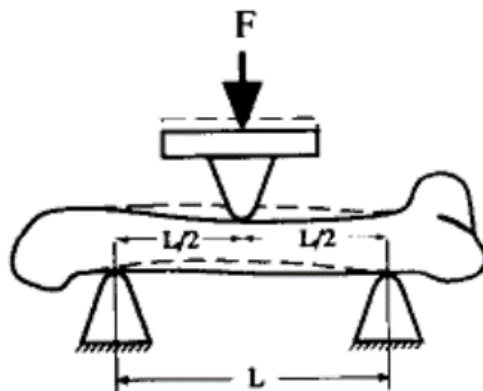
7.4.2. Υπολογισμός τάσης θραύσης (σ)

Οι τάσεις θραύσης των δοκιμίων προσδιορίστηκαν με δύο τρόπους. Αν και το οστό δεν αποτελεί απόλυτα συμμετρικό κύλινδρο, στον πρώτο τρόπο υπολογισμού των τάσεων που δημιουργήθηκαν στο οστό κατά την επιβολή καταπόνησης τριών σημείων, χρησιμοποιήθηκε η παραδοχή ότι το δοκίμιο αποτελεί συμπαγής κύλινδρος και θεωρήθηκε ότι η δύναμη που του ασκήθηκε συμπίπτει με τον κάθετο άξονα του συστήματος του κέντρου βάρους. Ο τύπος προσδιορισμού της τάσεως φαίνεται στη εικόνα 7.7.

$$\sigma = \frac{M}{I} y$$
$$M = \frac{F_{max} a}{2} = \frac{F_{max}}{4} L$$
$$I = \frac{\pi}{4} R^4$$

Εικόνα 7.7 Μαθηματικοί τύποι υπολογισμού της τάσης θραύσης κυκλικού δίσκου

Όπου “M” είναι η μέγιστη καμπτική ροπή, “I” η ροπή αδράνειας του οστού, “y” η απόσταση από τον ουδέτερο άξονα, η οποία ταυτίζεται με την ακτίνα (R) στο μέσο του οστού (όπου ασκείται το φορτίο), “a” είναι η απόσταση μεταξύ του σημείου επιβολής του φορτίου και του κοντινότερου σε αυτό σημείου στήριξης στο πλαίσιο φόρτισης, “L” η απόσταση στήριξης του οστού στα δύο σημεία της αρπάγης και “F_{max}” το μέγιστο φορτίο πριν το κάταγμα. Προκειμένου να προσδιοριστεί η ακτίνα του δοκιμίου στο σημείο φόρτισης, μετρήθηκε με παχύμετρο η διάμετρος σε τέσσερα σημεία του μέσου του οστού, υπολογίστηκε η μέση τιμή των διαμέτρων και κατ’ επέκταση η ακτίνα R. Η διάταξη του πειράματος περιγράφεται στην εικόνα 7.8.



Εικόνα 7.8 Σχηματική παράσταση της διάταξης του οστού στην αρπάγη. Η απόσταση L είναι σταθερή (20mm) και το οστό πιέζεται από το έμβολο με μια δύναμη F , που κατά την πλήρη αστοχία αντιστοιχεί σε F_{max} .

Όλα τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού της τάσης θραύσης προσδιορίστηκαν σε όλα τα δοκίμια (δεξί-αριστερό) και η μέση τιμή τους και οι τάσεις θραύσης ανά ομάδα παρουσιάζονται στους πίνακες 7.11, 7.12 και 7.13.

Σύνολο οστών						
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L (mm)	M (Nmm)	R (mm)	I (mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	119.32±4.47	20	596.62±22.35	1.72±0.02	6.96±0.28	148.31±3.51
OVX	112.69±2.95	20	552.67±17.47	1.74±0.02	7.51±0.36	130.85±2.87
OVX + IUCM	114.78±1.26	20	562.41±9.85	1.75±0.01	7.4±0.23	133.69±2.32

Πίνακας 7.11 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για το σύνολο των δοκιμών όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Δεξιά μηριαία οστά						
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L (mm)	M (Nmm)	R(mm)	I(mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	116.19±6.47	20	580.89±32.35	1.71±0.02	6.82±0.41	146.75±5.52
OVX	113.66±5.08	20	556.97±36.41	1.75±0.04	7.50±0.64	131.81±5.51
OVX + IUCM	113.20±1.41	20	566.01±7.88	1.75±0.02	7.45±0.3	134.03±2.49

Πίνακας 7.12 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για τα δεξιά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Αριστερά μηριαία οστά						
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L (mm)	M (Nmm)	R(mm)	I(mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	122.46±6.41	20	612.34±31.99	1.73±0.02	7.10±0.39	149.88±4.67
OVX	111.92±3.56	20	549.44±20.66	1.74±0.03	7.53±0.39	129.91±2.34
OVX + IUCM	117.30±2.19	20	557.6±21.56	1.75±0.02	7.35±0.37	133.22±4.58

Πίνακας 7.13 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για τα αριστερά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Στον δεύτερο τρόπο υπολογισμού των τάσεων θραύσης, χρησιμοποιήθηκε η παραδοχή ότι το οστό στη περιοχή διατομής του είναι κυκλικός δακτύλιος μέσου πάχους. Ο υπολογισμός της τάσης θραύσης σε αυτή την περίπτωση στηρίζεται στην παραδοχή του Bernoulli και ο τύπος υπολογισμού φαίνεται στη εικόνα 7.9.

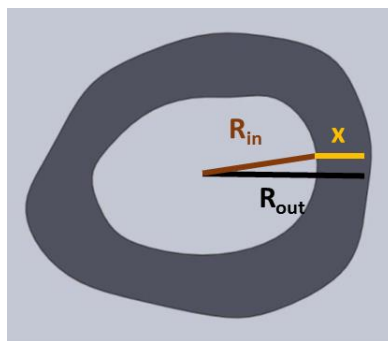
$$\sigma = \frac{M}{I} y$$

$$M = \frac{F_{max} a}{2} = \frac{F_{max}}{4} L$$

$$I = \frac{\pi R_{out}^4}{4} - \frac{\pi R_{in}^4}{4}$$

Εικόνα 7.9 Μαθηματικοί τύποι υπολογισμού της τάσης θραύσης κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους.

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι ίδιες με εκείνες της πρώτης προσέγγισης, με τη διαφορά ότι στη παρούσα περίπτωση είναι απαραίτητος και ο προσδιορισμός της εσωτερικής ακτίνας του κυλινδρικού δίσκου. Προκειμένου να προσδιοριστεί η εσωτερική ακτίνα του δοκιμίου στο σημείο φόρτισης, μετρήθηκε με παχύμετρο το πάχος του οστού (x) σε τέσσερα σημεία στο σημείο αστοχίας και υπολογίστηκε η μέση τιμή του και κατ' επέκταση η ακτίνα R_{in} (εικόνα 7.10).



Εικόνα 7.10 Διατομή μηριαίου οστού στο σημείο αστοχίας

Όλα τα απαραίτητα μεγέθη για τον υπολογισμό της τάσης θραύσης με τη συγκεκριμένη προσέγγιση, προσδιορίστηκαν σε όλα τα δοκίμια (δεξί-αριστερό) και η μέση τιμή των απαραίτητων παραμέτρων και οι τάσεις ανά ομάδα, τόσο στο σύνολο των δοκιμίων, όσο και ξεχωριστά στα δεξιά και αριστερά δοκίμια παρουσιάζονται στους πίνακες 7.14, 7.15 και 7.16.

Σύνολο οστών							
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L(mm)	M (Nmm)	R_{out} (mm)	R_{in} (mm)	I(mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	119.32±4.47	20	596.62±22.35	1.72±0.02	0.76±0.02	6.68±0.26	154.33±3.43
OVX	112.69±2.95	20	552.67±17.47	1.74±0.02	0.87±0.03	6.88±0.37	140.72±3.47
OVX + IUCM	114.78±1.26	20	562.41±9.85	1.75±0.01	0.84±0.02	6.96±0.24	142.28±2.71

Πίνακας 7.14 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για το σύνολο των δοκιμίων όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Δεξιά μηριαία οστά							
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L (mm)	M (Nmm)	R_{out} (mm)	R_{in} (mm)	I(mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	116.19±6.47	20	580.89±32.35	1.71±0.02	0.76±0.02	6.55±0.39	152.63±5.46
OVX	113.66±5.08	20	556.97±36.41	1.75±0.04	0.87±0.04	7.02±0.71	139.06±7.40
OVX + IUCM	113.20±1.41	20	566.01±7.88	1.75±0.02	0.88±0.03	6.93±0.37	144.60±2.87

Πίνακας 7.15 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για τα δεξιά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Αριστερά μηριαία οστά							
ΟΜΑΔΕΣ	F_{max} (N)	L (mm)	M (Nmm)	R_{out} (mm)	R_{in} (mm)	I(mm ⁴)	σ (N/mm ²)
CONTROL	122.46±6.41	20	612.34±31.99	1.73±0.02	0.77±0.03	6.81±0.36	156.04±4.43
OVX	111.92±3.56	20	549.44±20.66	1.74±0.03	0.87±0.04	6.78±0.42	141.90±3.36
OVX + IUCM	117.30±2.19	20	557.6±21.56	1.75±0.02	0.81±0.03	6.99±0.34	139.95±4.68

Πίνακας 7.16 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για τα αριστερά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρότι η διαδικασία κάμψης τριών σημείων εκτελέστηκε με τον ίδιο τρόπο για όλο το πλήθος των οστών, η τελική αστοχία δεν ήταν ίδια σε όλα τα δοκίμια. Στις δοκιμές παρατηρήθηκε ότι, σε ένα μικρό αριθμό δοκιμίων το κάταγμα δεν πραγματοποιήθηκε στο σημείο που ασκήθηκε το φορτίο. Πιο συγκεκριμένα το αριστερό και το δεξί οστό ενός πειραματόζωου της ομάδας OVX, αλλά και ένα δεξί μηριαίο της ομάδας παρέμβασης (OVX+IUCM) έσπασαν λοξά, προς το ένα άκρο του άξονα κοντά στο γόνατο. Στα συγκεκριμένα δοκίμια ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός της εσωτερικής τους ακτίνας και γι' αυτό δεν συμπεριλήφθηκαν στο προσδιορισμό της τάσης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της τάσης θραύσης και με τους δύο τρόπους υπολογισμού, ανέδειξαν μείωση της τάσεως στις ομάδες ωθηκεκτομής (OVX) και παρέμβασης (OVX+IUCM) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (CONTROL) όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά και μια μικρή αύξηση της τάσης θραύσης της ομάδας OVX+IUCM σε σχέση με την OVX ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, στο σύνολο των δοκιμίων (δεξί-αριστερό) η τάση θραύσης στην περίπτωση της πρώτης παραδοχής (διατομή κυκλικού δίσκου) για την ομάδα ελέγχου (CONTROL) ήταν 148.31 ± 3.51 N/mm², στην ομάδα ωθηκεκτομής (OVX) 130.85 ± 2.87 N/mm², ενώ στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX+IUCM) 133.69 ± 2.32 N/mm² (πίνακας 7.11). Οι τιμές τάσης θραύσης που προέκυψαν με την δεύτερη προσέγγιση (διατομή κυκλικού δακτυλίου μέσου πάχους) ήταν λίγο υψηλότερες σε σχέση με την πρώτη εκδοχή, αλλά έδωσαν αντίστοιχες διαφορές μεταξύ των ομάδων. Σε αυτή την περίπτωση η μέση τιμή τάσης θραύσης για την CONTROL ομάδα ήταν

154.33±3.43 N/mm², για την ομάδα OVX 140.72±3.47 N/mm², ενώ για την ομάδα παρέμβασης (OVX+IUCM) 142.28±2.71 N/mm² (πίνακας 7.14). Αν και φαίνεται να υπάρχει μια μικρή τάση αύξησης της τάσεως θραύσης στα δοκίμια της ομάδας που λάμβανε το εκχύλισμα, αυτή δεν κατέστη στατιστικώς σημαντική.

Σημαντικό χαρακτηρίστηκε το γεγονός ότι εξετάστηκαν ξεχωριστά τα μηριαία οστά κάθε πειραματοζώου, μιας και παρατηρήθηκαν μικρές μεν, αλλά υπαρκτές διαφορές μεταξύ δεξιού και αριστερού μηριαίου οστού. Αν και πρόκειται για το ίδιο οστό που διατελεί την ίδια λειτουργία στο σώμα του πειραματοζώου και έχει την ίδια ανατομία, παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές τόσο στο φορτίο αστοχίας, όσο και στη διατομή μεταξύ δεξιού και αριστερού μηριαίου, με αποτέλεσμα το καθένα να σπάει με διαφορετικό τρόπο. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για τον υπολογισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των οστών είναι το πάχος τους σε σχέση με την υπόλοιπη γεωμετρία του οστού, το οποίο καθορίζει τόσο το φορτίο αστοχίας του, όσο και την τάση θραύσης όταν η διατομή του δοκιμίου θεωρείται κυλινδρικός δακτύλιος.

Η σύγκριση των τιμών τάσης θραύσης, όταν η διατομή του οστού θεωρήθηκε κυκλικός δίσκος, δεν έδωσε σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιών και αριστερών δοκιμίων. Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή τάσης για τα δεξιά και αριστερά δοκίμια της CONTROL ομάδας ήταν 146.75±5.52 N/mm² και 149.88±4.67 N/mm² αντίστοιχα, για την ομάδα OVX 131.81±5.51 N/mm² και 129.91±2.34 N/mm² και τέλος για την ομάδα OVX+IUCM 134.03±2.49 N/mm² και 133.22±4.58 N/mm² αντίστοιχα (πίνακες 7.12, 7.13).

Στην περίπτωση που η διατομή του οστού θεωρήθηκε κυκλικός δακτύλιος μέσου πάχους, στη συνάρτηση υπολογισμού των τάσεων χρησιμοποιήθηκε και το πάχος του δοκιμίου, με αποτέλεσμα οι τελικές τιμές να τροποποιούνται σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση. Σε αυτή την παραδοχή η μέση τιμή τάσεως για τα δεξιά και αριστερά δοκίμια της CONTROL ομάδας ήταν 152.63±5.46 N/mm² και 156.04±4.43 N/mm² αντίστοιχα, για την ομάδα OVX 139.06±7.40 N/mm² και 141.9±3.36 N/mm² και τέλος για την ομάδα παρέμβασης (OVX+IUCM) 144.60±2.87 N/mm² και 139.95±4.68 N/mm² αντίστοιχα (πίνακες 7.15, 7.16). Διαπιστώνεται λοιπόν ότι στην ομάδα CONTROL και στην OVX, τα αριστερά δοκίμια ανταποκρίθηκαν λίγο καλύτερα στην καταπόνηση σε σχέση με τα δεξιά, ενώ το αντίστροφο συνέβη στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX+IUCM), όχι όμως στατιστικώς σημαντικά.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους θα μπορούσαμε να πούμε ότι για την CONTROL ομάδα η διαφορά στην τάση θραύσης μεταξύ δεξιού και αριστερού μηριαίου οστού παρέμεινε ίδια και

στους δύο τρόπους γεωμετρικής προσέγγισης των οστών, ενώ στις άλλες δύο ομάδες παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές. Οι διαφορές των μέσων τιμών τάσης για τις ομάδες των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων οδήγησαν στη διαπίστωση ότι με την δεύτερη προσέγγιση (διατομής κυκλικού δακτυλίου μέσου πάχους), η ανταπόκριση των δεξιών μηριαίων οστών της ομάδας OVX+IUCM στην καταπόνηση, σε σχέση με την OVX ($144.60 \pm 2.87 \text{ N/mm}^2$ έναντι $139.06 \pm 7.40 \text{ N/mm}^2$) ήταν ακόμη καλύτερη, συγκρινόμενη με τον πρώτο τρόπο υπολογισμού των τάσεων ($134.03 \pm 2.49 \text{ N/mm}^2$ έναντι $131.81 \pm 5.51 \text{ N/mm}^2$). Το φαινόμενο αυτό δεν επαναλήφθηκε και στα αριστερά μηριαία δοκίμια, παρότι το μέσο μέγιστο φορτίο αστοχίας τους ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με τα δεξιά. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την σημαντική συμβολή του πάχους των οστών και ειδικότερα του φλοιώδους τμήματός τους στον καθορισμό των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων τους και κατ' επέκταση στην ανθεκτικότητάς τους.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι στο σύνολο των εμβιομηχανικών παραμέτρων, τα μηριαία οστά της ομάδας παρέμβασης (OVX+IUCM) ανταποκρίθηκαν λίγο καλύτερα στην καταπόνηση σε σχέση με εκείνα της OVX ομάδας, όχι όμως τόσο όσο τα οστά της CONTROL ομάδας. Σε ότι αφορά το μέγιστο φορτίο, τα αριστερά μηριαία της ομάδας OVX+IUCM επέδειξαν μεγαλύτερη αντοχή στην καταπόνηση, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων που δεν λάμβαναν το εκχύλισμα. Στην περίπτωση της αξιολόγησης της στιβαρότητας ή σκληρότητας των δοκιμίων των OVX+IUCM πειραματοζώων, αλλά και της τάσης θραύσης τους με την παραδοχή του κυκλικού δίσκου, τόσο τα δεξιά όσο και τα αριστερά οστά επέδειξαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με εκείνες της ομάδας OVX. Οι διαφορές αυτές, αν και δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές, έδειξαν ότι υπάρχει μια τάση βελτίωσης των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων στα δοκίμια των πειραματοζώων που λάμβαναν το εκχύλισμα, αλλά δεν είναι ικανές για να χαρακτηρίσουν το εκχύλισμα ως αποτελεσματικό παράγοντα μηχανικής αντοχής των οστών.

7.5. Σωματικά βάρη – Βάρη οργάνων

Κατά την διάρκεια του *in vivo* πειράματος δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια στους επίμυες που λάμβαναν το εκχύλισμα και η κατανάλωση νερού και εκχυλίσματος ήταν αντίστοιχη στις τρεις πειραματικές ομάδες. Τα σωματικά βάρη (ΣΒ) των πειραματοζώων στην έναρξη του πειράματος δεν διέφεραν μεταξύ τους, ενώ η σύγκριση των σωματικών βαρών τόσο στο πρώτο τρίμηνο, όσο και στο τέλος του πειράματος έδειξε μικρές διαφορές εντός των ομάδων, αλλά και κατά την σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της τάξης 10% του μέσου βάρους κατά την τρίμηνη και εξάμηνη μέτρηση σε σχέση με την αρχική, η οποία στην ομάδα ωθηκεκτομής ήταν 13% και 21% αντίστοιχα. Τέλος στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα διαπιστώθηκε αύξηση 26% του βάρους των πειραματοζώων στην τρίμηνη μέτρηση, χωρίς ουσιαστική περαιτέρω αύξηση μέχρι το τέλος του πειράματος (πίνακας 7.17). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στους παράγοντες παρέμβαση και το χρόνο, γεγονός που δείχνει ότι η μεταβολή τους βάρους στις τρεις ομάδες είναι διαφορετική. Η σύγκριση των ομάδων ανεξάρτητα του χρόνου, αλλά και η σύγκριση του ΣΒ μεταξύ των ομάδων για κάθε χρονική εκτίμηση δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν κατά τη σύγκριση του ΣΒ ανάμεσα στις χρονικές εκτιμήσεις για κάθε ομάδα ξεχωριστά. Πιο συγκεκριμένα, για την CONTROL ομάδα υπήρξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στην αρχική ζύγιση και στην τρίμηνη ($p < 0.05$), αλλά και την εξάμηνη ($p < 0.05$), όχι όμως μεταξύ τρίμηνης και εξάμηνης. Η ομάδα των OVX επίμυων έδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε όλες τις χρονικές εκτιμήσεις ($p < 0.05$), ενώ η ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX+IUCM) ακολούθησε το μοτίβο της CONTROL ομάδας, χαρακτηριζόμενη από σημαντικές διαφορές κατά την σύγκριση του βάρους της τρίμηνης και εξάμηνης ζύγισης σε σχέση με την αρχική ($p < 0.05$).

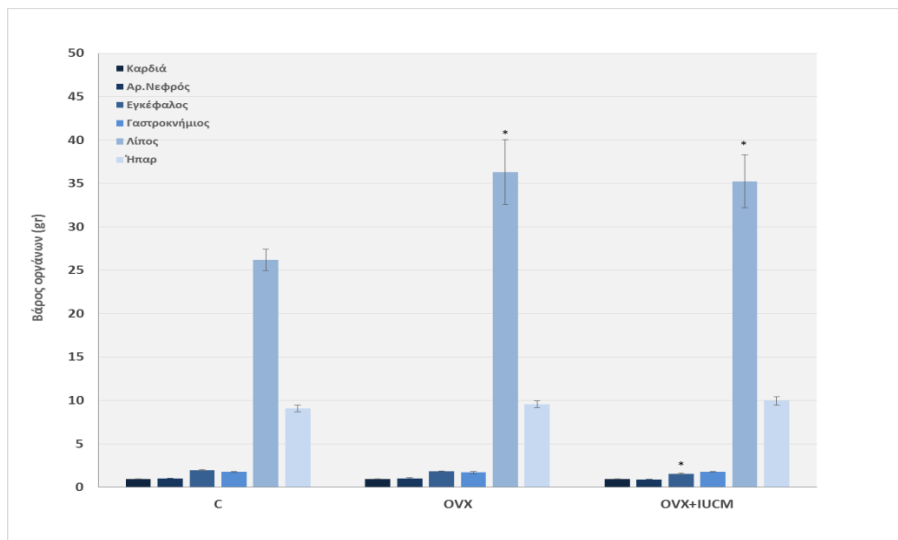
Σωματικά βάρη					
ΟΜΑΔΕΣ	Αρχική μέτρηση	Τρίμηνη μέτρηση	Εξάμηνη μέτρηση	% μεταβολή 0-3 μήνες	% μεταβολή 0-6 μήνες
CONTROL	299.4±24.0	329.8±43.4	338.4±36.3	9.8±7.2	13.0±7.1
OVX	315.9±37.1	356.8±55.0	383.4±62.2	12.6±7.6	20.9±9.1
OVX + IUCM	302.3±19.3	380.2±31.5	388.3±34.2	25.8±6.2	28.5±8.8

Πίνακας 7.17 Σωματικά βάρη των επίμων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας, στην έναρξη του πειράματος, τον 3^ο και τον 6^ο μήνα της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

Κατά την νεκροψία δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό εύρημα και ακολούθησε συλλογή και ζύγιση βασικών οργάνων των πειραματοζώων όλων των ομάδων (καρδιά, νεφρό, εγκέφαλος, γαστροκνήμιος μυς, ήπαρ, ενδοκοιλιακό λίπος και μήτρα). Η σύγκριση του βάρους της καρδιάς, του νεφρού, του γαστροκνήμιου μυ και του ήπατος δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ των ομάδων, ενώ το βάρος του εγκεφάλου φάνηκε να μειώνεται στα ωθηκεκτομηθέντα ζώα, δίνοντας τιμές $1.97 \pm 0.08g$, $1.82 \pm 0.06g$ και $1.56 \pm 0.06g$ στις ομάδες CONTROL, OVX και OVX+IUCM αντίστοιχα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+IUCM. Επίσης παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος του ενδοκοιλιακού λίπους των πειραματοζώων. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες OVX και OVX+IUCM είχαν παρόμοιο βάρος λίπους ($36.3 \pm 3.8g$ και $35.3 \pm 3.1g$ αντίστοιχα), χωρίς να εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε ανάμεσα και στις δύο ομάδες των ωθηκεκτομηθέντων σε σχέση με την CONTROL ομάδα ($26.2 \pm 1.2g$) (Εικόνα 7.11).

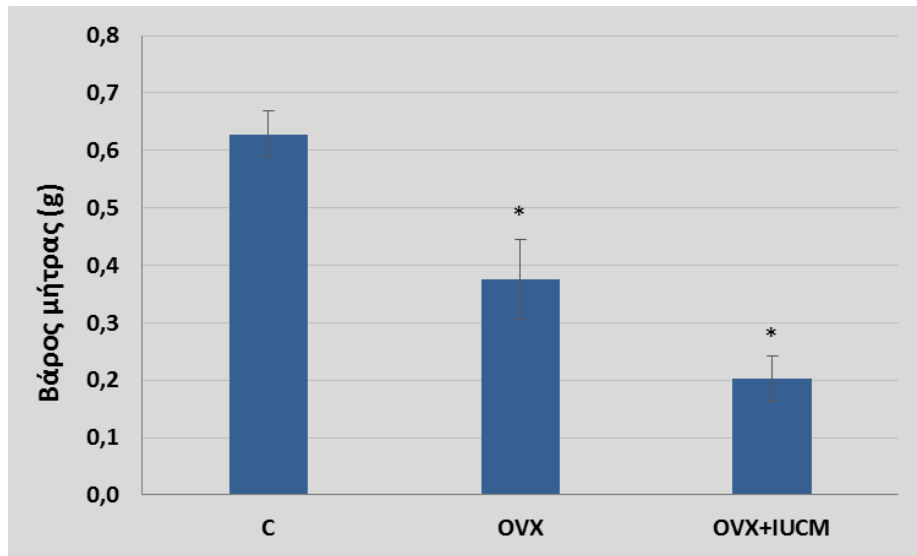
Όταν τα βάρη οργάνων συσχετίστηκαν με το σωματικό βάρος του πειραματοζώου, οι % αναλογίες δεν ανέτρεψαν τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει από τη σύγκριση των απόλυτων τιμών βάρους μεταξύ των ομάδων. Στην περίπτωση του ενδοκοιλιακού λίπους, όταν αυτό προσδιορίστηκε σε σχέση με το βάρος των πειραματοζώων $[(\text{βάρος λίπους}/\text{σωματικό βάρος}) \times 100]$ δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η επί τις εκατό αναλογία λίπους/ΣΒ ήταν για την CONTROL ομάδα 7.737 ± 0.56 , για την ομάδα OVX 9.006 ± 2.12 και για την OVX+IUCM 8.982 ± 1.78 . Στηριζόμενοι στο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, θα μπορούσαμε να

πούμε ότι τόσο τα ωοθηκεκτομηθέντα πειραματόζωα (OVX), όσο και εκείνα που λάμβαναν το εκχύλισμα (OVX+IUCM) παρουσίασαν τάση παχυσαρκίας, όχι όμως τόσο ικανή ώστε να χαρακτηριστούν παχύσαρκα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (CONTROL).



Εικόνα 7.11 Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος και του ενδοκοιλιακού λίπους των πειραματοζώων που ελήφθησαν κατά την νεκροψία στο τέλος του πειράματος. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Όσον αφορά τη μορφολογία της μήτρας, κατά την επισκόπηση στην νεκροψία φάνηκε ότι στις ομάδες OVX και OVX+IUCM οι μήτρες ήταν ατροφικές, διαπίστωση που επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση του βάρους τους. Αναλυτικότερα, οι μήτρες της CONTROL ομάδας είχαν βάρος $0.628 \pm 0.04g$, ενώ στην ομάδα OVX παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους στα $0.375 \pm 0.07g$. Επιπρόσθετα, στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα (OVX+IUCM) διαπιστώθηκε ακόμη μεγαλύτερη ατροφία στις μήτρες, με βάρος $0.203 \pm 0.04g$, με στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα ελέγχου, όχι όμως και από την OVX (εικόνα 7.12). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την απουσία δράσης του εκχυλίσματος στον ιστό της μήτρας και φαίνεται να τον προφυλάσσει από υπερπλασία και πιθανόν από τις επακόλουθες ανεπιθύμητες ενέργειες μιας πιθανής καρκινογένεσης.



Εικόνα 7.12 Βάρος μήτρας πειραματόζων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της μήτρας των πειραματόζων που ελήφθη κατά την νεκροψία στο τέλος του πειράματος. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * $p < 0.05$ σε σχέση με το CONTROL.

Συμπεράσματα-Προοπτικές

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής καταβλήθηκε μία συστηματική προσπάθεια τόσο αξιοποίησης πληροφοριών της ελληνικής και διεθνούς παραδοσιακής θεραπευτικής, όσο και ανάδειξης των δυνατοτήτων της ελληνικής χλωρίδας μέσω της ανακάλυψης φυσικών προϊόντων με ευεργετικές επιδράσεις στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Πιο συγκεκριμένα, σε κείμενα των αρχαίων Ελλήνων Ιατρών-Συγγραφέων αναζητήθηκαν πληροφορίες οι οποίες σχετίζονται με τη χρήση δρογών έναντι παθήσεων των οστών, ως εκτρωτικά αλλά και για την αντιμετώπιση γυναικολογικών προβλημάτων, όπως η αμηνόρροια, η δυσμηνόρροια, η γαλακτόρροια κ.ά. Επίσης, δεδομένα τα οποία εντοπίστηκαν είτε σε συγγράμματα παραδοσιακής θεραπευτικής, είτε σε σύγχρονες επιστημονικές δημοσιεύσεις αξιοποιήθηκαν για την επιλογή των φυτικών ειδών – στόχων. Έτσι, καταρτίστηκε μία λίστα η οποία αποτελείται από 85 δρόγες που ανήκουν στις οικογένειες Acanthaceae (1), Anacardiaceae (9), Berberidaceae (2), Caprifoliaceae (2), Cupressaceae (5), Iridaceae (3), Labiatae (12), Leguminosae (22), Liliaceae (1), Moraceae (1), Morinaceae (1), Pinaceae (3), Plantaginaceae (5), Platanaceae (1), Polygonaceae (3), Punicaceae (1), Rhamnaceae (4), Rosaceae (1), Styracaceae (1), Taxaceae (2), Umbelliferae (1), Verbenaceae (2), Zingiberaceae (1) και Vitaceae (1). Τα περισσότερα από τα επιλεγμένα είδη αποτελούσαν μέρος της συλλογής φυτών της ελληνικής χλωρίδας, η οποία υπάρχει στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν συλλογές φυτικού υλικού σύμφωνα με τους κανόνες ορθής συλλεκτικής πρακτικής.

Στη συνέχεια, με τη χρήση κυρίως της τεχνικής της επιταχυνόμενης εκχύλισης και διαλύτες οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη, παρασκευάστηκαν 169 φυτικά παρασκευάσματα, τα οποία αρχικά αξιολογήθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο με τις μεθόδους της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδεδεμένης με ανιχνευτή φωτοδιόδων υπεριώδους (UV/Diode Array Detector). Ο προκαταρκτικός φυτοχημικός έλεγχος έδειξε ότι αρκετά από τα παραχθέντα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φαινόλες και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν σε κατηγορίες που έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοοιστρογόνα, όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι ισοφλαβόνες, οι ακετοφαινόλες κ.ά. Βασιζόμενοι στο φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν τα πλέον ενδιαφέροντα για να αξιολογηθούν ως προς την οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο και

οστεοπροστατευτική δραστηριότητά τους. Ο έλεγχος της οιστρογόνου / αντιοιστρογόνου δράσης των επιλεγμένων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε τόσο σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου (Ishikawa), τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση παρουσία οιστρογόνων, όσο και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7), στα οποία αξιολογήθηκε ο πολλαπλασιασμός και η βιωσιμότητά τους. Ο προσδιορισμό της οστεοπροστατευτικής ικανότητας των παρασκευασμάτων αξιολογήθηκε σε πρώιμα οστεοβλαστικά κύτταρα (MC3T3-E1), ικανά να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες και ως δείκτης διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης.

Από τα αποτελέσματα του ελέγχου στα κύτταρα MC3T3-E1 διαπιστώθηκε ότι το 78% των εκχυλισμάτων (73 από τα 94) που ελέγχθηκαν ήταν ικανά να προάγουν την οστεοβλαστογένεση και επιπρόσθετα το 51% (48 από τα 94) χαρακτηρίστηκαν από δραστηριότητα καλύτερη εκείνης που επέδειξε η οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 10 nM. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δραστηριότητα καλύτερη της οιστραδιόλης επέδειξαν 8 εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 1 µg/ml, καθώς και 6 στη μικρότερη συγκέντρωση ελέγχου 0.1 µg/ml. Από τα 48 δραστηκότερα παρασκευάσματα στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1, τα 14 χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικοί αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων και στις δύο κυτταρικές σειρές ελέγχου, ενώ μόλις 5 παρουσίασαν σημαντική οιστρογονικότητα μόνο στα κύτταρα Ishikawa. Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (60%, 29 εκχυλίσματα) είχαν πολύ ασθενή ή καθόλου οιστρογονική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Μεταξύ των δειγμάτων που εμφάνισαν αξιοσημείωτες βιολογικές ιδιότητες σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου στις προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές, εκείνα του γένους *Iris* (*I. germanica*, *I. unguicularis* subsp. *cretensis* και *I. attica*) της οικογένειας Iridaceae αναδείχθηκαν ως σημαντικοί παράγοντες προαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και όλα, εκτός του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του *Iris unguicularis* subsp. *cretensis*, στερούνταν προαγωγικής του καρκίνου στη κυτταρική σειρά αναφοράς (MCF-7). Τα εκχυλίσματα των ριζών του *Iris germanica* επέδειξαν την καλύτερη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, διατηρώντας τη δραστηριότητά τους σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου (10 µg/ml, 1 µg/ml και 0.1 µg/ml) και παράλληλα στερούνταν οιστρογονικότητας, γεγονός που τα καθιστά πιο ασφαλή για πιθανή μελλοντική χορήγηση ακόμα και σε ομάδες υψηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού.

Τα προαναφερόμενα εκχύλισμα, τα οποία προήλθαν από το ρίζωμα του *I. germanica*, μελετήθηκαν περαιτέρω με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι υπεύθυνοι για την αξιόλογη οστεοπροστατευτική δράση τους. Αρχικά, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα κλασματώθηκε με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής και συγκεκριμένα με εφαρμογή της μεθοδολογίας της βαθμιδωτής έκλουσης – εξώθησης και την χρήση πέντε διαφασικών συστημάτων. Έτσι προέκυψαν 27 κλάσματα από τα οποία με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ταυτοποιήθηκαν 27 δευτερογενείς μεταβολίτες και απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή οι 18. Μεταξύ των απομονωμένων ενώσεων, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με βάση τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα, περιλαμβάνονται πέντε ιριδάλες (NC6, NC7, NC8, NC10, NC11), μία ακετοφαινόνη (NC3) και ο γλυκοσίδης της (NC14), μία βενζοφαινόνη (NC19), δέκα ισοφλαβόνες (NC2, NC4, NC12, NC13, NC16, NC17, NC18, NC20, NC21, NC26) και ένα μονοτερπένιο (NC9). Με αντίστοιχη μεθοδολογία, από το μεθανολικό εκχύλισμα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 15 μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των ισοφλαβονοειδών (NC2, NC13, NC15, NC16, NC17, NC18, NC20, NC21, NC23, NC24, NC25, NC26), των ακετοφαινονών (NC3, NC14) και των ξανθονών (NC22).

Απομονωμένοι μεταβολίτες		Πηγή προέλευσης	
Κωδικός	Κοινόχρηστο όνομα	Εκχύλισμα EtOAc	Εκχύλισμα MeOH
NC7	<i>α</i> -Ιριγερμανάλη	√	-
NC8	<i>α</i> -Ισοιριγερμανάλη	√	-
NC10	Δεκανοϊκός εστέρας της <i>α</i> -Ιριγερμανάλης	√	-
NC11	Λινολεϊκός εστέρας της <i>α</i> -Ισοιριγερμανάλης	√	-
NC9	<i>α</i> -Διϋδροιρόνη	√	-
NC3	Ακετοβανιλλόνη	√	√
NC14	Ανδροσίνη	√	√
NC19	Ιριφλοφαινόνη	√	-
NC22	Μανγκιφερίνη	-	√
NC4	Τεκτοριγενίνη	√	-
NC20	Ιριγενίνη	√	√
NC25	Ιριδίνη	-	√
NC24	Ιριστεκτοριγενίνη-B	-	√
NC2	Ιρισφλορεντίνη	√	√
NC12	Germanaism-A	√	-
NC23	Ιριλόνη	-	√
NC26	4'-Ο-γλυκοσίδης της Ιριλόνης	√	√
NC15	Βιοσίδης της Ιριλόνης	-	√
NC18	Γεντιοβιοσίδης της Ιριλόνης	√	√
NC21	Ιρισολόνη	√	√
NC13	Germanaism-B	√	√
NC16	Γεντιοβιοσίδης της Ιρισολόνης	√	√
NC17	Βιοσίδης Ιρισολόνης	√	√

Συνολικά εντοπίστηκαν 26 ενώσεις, ενώ σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε από την αναζήτησή μας στις βάσεις των φυσικών προϊόντων, οι μεταβολίτες NC10 και NC11 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα. Από τη συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων, τα οποία προήλθαν από τα είδη του γένους *Iris*, φάνηκε ότι τα περισσότερα από τα προαναφερόμενα φυσικά προϊόντα, που ταυτοποιήθηκαν στα παρασκευάσματα του *I. germanica* αποτελούν μεταβολίτες και των άλλων ειδών.

Οι προαναφερόμενες ενώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 10 μM , ως προς τις οιστρογονικές και οστεοπροστατευτικές τους ιδιότητες σε κυτταρικές σειρές Ishikawa και MCF-7, MC3T3-E1 και RAW264.7, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τριτερπένια τύπου ιριδάλης διαθέτουν αξιοσημείωτη ικανότητα επαγωγής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, στερούνται οιστρογονικότητας και επιπρόσθετα τα εστεροποιημένα παράγωγα τους NC10 και NC11 κατέστειλαν σημαντικά την οστεοκλαστογένεση, προκρίνοντάς τα σε σημαντικούς οστεοπροστατευτικούς παράγοντες. Μεταξύ των φαινολικών παραγώγων, ως σημαντικότεροι οστεοπροστατευτικοί παράγοντες αναδείχθηκαν η Ιριφλοφαινόνη (NC19) και οι ισοφλαβόνες Ιριστεκτοριγενίνη-A (NC24) και Germanaism-A (NC12), καθώς διέθεταν την επιθυμητή δραστηριότητα σε όλες τις κυτταρικές σειρές (επαγωγή οστεοβλαστών, καταστολή οστεοκλαστών, έλλειψη οιστρογονικότητας).

Σημαντική ικανότητα επαγωγής της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, αλλά καμία δραστηριότητα στους οστεοκλάστες επέδειξαν οι ισοφλαβόνες Ιριδίνη (NC25) και ο γεντιοβιοσίδης της Ιριλόνης (NC18), ενώ η Ιριγενίνη (NC20), ο βιοσίδης της Ιριλόνης (NC15) και η Ακετοβαννιλόνη (NC3), να μην προκάλεσαν επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, αλλά προήγαγαν και την οστεοκλαστογένεση. Τέλος, όλα τα υπόλοιπα φαινολικά παράγωγα χαρακτηρίστηκαν μόνο ως αναστολείς της οστεοκλαστογένεσης και στερούνταν διεγερτικής δράσης στους οστεοβλάστες. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα παράγωγα Ιρισολόνης (NC21, NC13, NC16 και NC17), τα οποία φέρουν μεθοξυλομάδα στη θέση 5 του Α-δακτυλίου, που πιθανόν δρα καταλυτικά στη δραστηριότητα των μορίων. Σημαντική επίσης ήταν και η διαπίστωση ότι και οι 22 μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν παρουσίασαν οστεοπροστατευτική δράση επάγοντας την οστεοβλαστογένεση ή/και καταστέλλοντας την οστεοκλαστογένεση, αλλά μόνο τέσσερις εξ' αυτών χαρακτηρίστηκαν από σημαντική οιστρογονική δράση (συμβαδίζει και με την ενεργότητα των εκχυλισμάτων), στην

οποία είναι αναγκαίο να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή όταν εκχυλίσματα ή καθαρές ενώσεις χορηγούνται σε άτομα με προδιάθεση για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού και της μήτρας.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, στην πλειονότητά τους δεν έχουν εκτενώς αξιολογηθεί ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες. Μελέτες έχουν αποδώσει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε κάποια φαινολικά παράγωγα, ενώ οιστρογονικότητα έχει αποδοθεί μόνο στην ισοφλαβόνη Τεκτοριγενίνη. Η ξανθόνη Μανγκιφερίνη είναι η μόνη μεταξύ των απομονωμένων ενώσεων, που έχει αξιολογηθεί ως προς τις οστεοπροστατευτικές της ιδιότητες και οι μελέτες έχουν αναδείξει την ικανότητά της να καταστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών *in vitro*, μη έχοντας επίδραση στους οστεοβλάστες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Η οστεοπροστατευτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος που προήλθε από το ρίζωμα του είδους *I. unguicularis* subsp. *cretensis*, η επιλογή του οποίου βασίστηκε στη διαθεσιμότητα της απαιτούμενης ποσότητας φυτικής μάζας και στο χημικό του φορτίο, αξιολογήθηκε *in vivo* σε μοντέλο οστεοπόρωσης. Τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης, κατά την οποία το εκχύλισμα χορηγήθηκε για διάστημα έξι μηνών σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες και σε δόση 200 mg/kg/ημέρα, έδειξαν ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος ήταν ικανή να μειώσει την οστική απώλεια, σε σχέση με την ομάδα που δεν λάμβανε παρέμβαση, όχι όμως σε τέτοιο βαθμό που να μην διαφέρει από την ομάδα ελέγχου, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DEXA. Επιπλέον, οι τοπογραφικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν *ex vivo* με τη μέθοδο pQCT, έδειξαν μια τάση για βελτίωση των μετρούμενων παραμέτρων στην ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα, όχι όμως στατιστικώς σημαντική. Αντίστοιχα συμπεράσματα εξήχθησαν και για τις εμβιομηχανικές παραμέτρους, μετά από υποβολή των μηριαίων οστών σε δοκιμασία καταπόνησης τριών σημείων. Τέλος, η μακροσκοπική αξιολόγηση της μήτρας των πειραματοζώων ανέδειξε την ύπαρξη ατροφίας στους επίμυες που λάμβαναν το εκχύλισμα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και κατόπιν προσδιορισμού του βάρους τους. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την απουσία δράση του εκχυλίσματος στον ιστό της μήτρας και φαίνεται να τον προφυλάσσει από υπερπλασία και πιθανόν από τις επακόλουθες ανεπιθύμητες ενέργειες μιας πιθανής καρκινογένεσης.

Στους μελλοντικούς στόχους της ερευνητικής ομάδας περιλαμβάνονται:

➤ Η αναζήτηση περισσότερων πληροφοριών παραδοσιακής θεραπευτικής, οι οποίες σχετίζονται είτε με την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, είτε έχουν ευεργετική επίδραση σε άλλες παθολογικές καταστάσεων που συνδέονται με την εμμηνόπαυση.

➤ Η συλλογή και άλλων φυτών της οικογένειας *Iruidaceae* και άλλων ειδών της ελληνικής χλωρίδας, για τα οποία έχουν ανευρεθεί σημαντικά δεδομένα τα οποία σχετίζονται με την πιθανή οστεοπροστατευτική τους δράση.

➤ Η παρασκευή εκχυλισμάτων με σύγχρονες φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές και η αξιολόγηση τόσο του χημικού τους περιεχομένου, όσο και των τους βιολογικών ιδιοτήτων.

➤ 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 απομονωμένων μεταβολιτών σε οστεοβλαστικά και οστεοκλαστικά κύτταρα.

➤ Η πραγματοποίηση *in vivo* αξιολόγησης του μεθανολικού εκχυλίσματος του *I. germanica* στο μοντέλο οστεοπόρωσης θήλεων ωοθηκεκτομηθέντων επίμυων.

Απώτερος στόχος της ερευνητικής μας ομάδας παραμένει η αξιοποίηση των αξιόλογων ιδιοτήτων των ελληνικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών και η ανάδειξη των δυνατοτήτων της παραδοσιακής μας θεραπευτικής, με σκοπό την ανάπτυξη αποτελεσματικών και καινοτόμων φυσικών προϊόντων με ευεργετική επίδραση στις διαταραχές που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση.

Παράρτημα Εικόνων

Εικόνα 3.1 Ενδεικτικά χρωματογραφήματα HPTLC. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα HPTLC εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα (A) και μεθανόλης (B).....117

Εικόνα 4.1 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του εκδόχου. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....147

Εικόνα 4.2 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (1 µg/ml) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E₂ (1 nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....153

Εικόνα 4.3 Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επώαστηκαν 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. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....160

Εικόνα 4.4 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 συγχρόνηση των ενώσεων αναφοράς για 6 ημέρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού αναφοράς. E₂: οιστραδιόλη, ICI: φουλβεστράνη, Ral: ραλοξιφαίνη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....169

Εικόνα 4.5 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά 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 συγχρόνηση 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.....170

Εικόνα 4.6 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά 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 συγχρόνηση 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.....171

Εικόνα 4.7 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά 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.....172

Εικόνα 4.8 Χρώση ερυθρού της αλιζαρίνης (ARS) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Παρουσιάζεται η απόθεση φωσφορικού στους ώριμους οστεοβλάστες (B) μετά από επώαση 21 ημερών στο υλικό διαφοροποίησης [a-MEM+10% FBS+Δ.Π. (10 mM β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο και 50 µg/ml ασκορβικό οξύ)] σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (A).....185

Εικόνα 4.9 Απόθεση Φωσφορικού Ασβεστίου κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων MC3T3-E1. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θρεπτικού υλικού (C), είτε του υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 µg/ml ασκορβικό οξύ + 10 mM β-glycerophosphate) με προσθήκη μόνο του εκδόχου (C + Δ.Π.) ή των υπό έλεγχο δειγμάτων. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....186

Εικόνα 4.10 Χρώση με Naphthol-AS για την πιστοποίηση της οστεοκλαστογένεσης στα κύτταρα RAW264.7. Παρουσιάζεται η δημιουργία ώριμων πολυπύρηνων οστεοκλαστών (B, C) μετά από επώαση των μακροφάγων κυττάρων για διάστημα 4 ημερών στο υλικό διαφοροποίησης (a-MEM + 10% HI-FBS + 50 ng/ml RANKL) σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (A).....187

Εικόνα 4.11 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. 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).....188

Εικόνα 5.1 *Iris germanica* (A) και *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (B).....191

Εικόνα 5.2 TLC χρωματογράφημα των κλασμάτων που προέκυψαν από το IGE με τη βαθμιδωτή έκλυση – εξόθηση μετά από A) παρατήρηση στα 254 nm B) εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης.....195

Εικόνα 5.3 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-10.....	199
Εικόνα 5.4 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-11.....	202
Εικόνα 5.5 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-7.....	207
Εικόνα 5.6 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-8.....	211
Εικόνα 5.7 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-2.....	214
Εικόνα 5.8 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-2 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με t _R =22.00 min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M+H] ⁺ της κορυφής t _R =22.00 min με m/z=387.1073, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιρισοφλορεντίνη (NC2)	215
Εικόνα 5.9 Φάσμα Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-3.....	217
Εικόνα 5.10 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-3 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με t _R =12.85 min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M+H] ⁺ της κορυφής t _R =12.85 min με m/z=167.0700, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ακετοβανιλλόνη (NC3)	218
Εικόνα 5.11 Φάσμα ¹ H-NMR της ουσίας IGE-4.....	219
Εικόνα 5.12 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-4 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με t _R =20.31 min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M+H] ⁺ της κορυφής t _R =20.31 min με m/z=301.0707, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Τεκτοριγενίνη (NC4)	221
Εικόνα 5.13 Φάσμα ¹ H-NMR του μίγματος των ουσιών IGE-5a, IGE-5b και IGE-20.....	225
Εικόνα 5.14 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με t _R =20.65 min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M+H] ⁺ της κορυφής t _R =20.65 min με m/z=361.0916, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριγενίνη (NC20)	226
Εικόνα 5.15 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με t _R =20.49 min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M+H] ⁺	

της κορυφής $t_R=20.49$ min με $m/z=331.0810$, το οποίο αντιστοιχεί στα φυσικά προϊόντα Ιριστεκτοριγενίνη-A και B (NC5 και NC24)	227
Εικόνα 5.16 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-6.....	229
Εικόνα 5.17 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-6 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=20.66$ min με $m/z=361.0917$, το οποίο αντιστοιχεί στα φυσικά προϊόντα Ιριγενίνη (NC20)	230
Εικόνα 5.18 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας IGE-20.....	233
Εικόνα 5.19 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE_20 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.64$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=20.64$ min με $m/z=361.0916$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριγενίνη (NC20)	234
Εικόνα 5.20 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος των ουσιών IGE-20 και IGE-21.....	236
Εικόνα 5.21 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.39$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=20.39$ min με $m/z=313.0706$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιρισολόνη (NC21)	237
Εικόνα 5.22 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=20.65$ min με $m/z=361.0916$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριγενίνη (NC20)	238
Εικόνα 5.23 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-19.....	240
Εικόνα 5.24 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-19 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=13.81$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_R=13.81$ min με $m/z=247.0602$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριφλοφαινόνη (NC19)	242
Εικόνα 5.25 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-12.....	245

Εικόνα 5.26 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-12 επιπέδου συγκέντρωσης 1 µg/ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.67$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.67$ min με $m/z=505.1327$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Germanaism-A (NC12)	247
Εικόνα 5.27 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGE-13.....	249
Εικόνα 5.28 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13 επιπέδου συγκέντρωσης 1µg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.45$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.45$ min με $m/z=475.1229$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Germanaism-B (NC13)	251
Εικόνα 5.29 Φάσμα 1H -NMR του μίγματος των ενώσεων IGE-13 και IGE-13a.....	253
Εικόνα 5.30 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13a επιπέδου συγκέντρωσης 1µg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.46$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.46$ min με $m/z=475.1225$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Germanaism-B (NC13)	254
Εικόνα 5.31 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-13a επιπέδου συγκέντρωσης 1µg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=16.62$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=16.62$ min με $m/z=523.1436$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριδίνη (NC25)	255
Εικόνα 5.32 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGE-14.....	258
Εικόνα 5.33 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-14 επιπέδου συγκέντρωσης 1µg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=7.76$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M-CO_2H_2-H]^+$ της κορυφής $t_R=7.76$ min με $m/z=373.1138$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ανδροσίνη (NC14)	259
Εικόνα 5.34 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGE-16.....	261
Εικόνα 5.35 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-16 επιπέδου συγκέντρωσης 1µg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=15.73$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=15.73$ min με $m/z=637.1752$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Γεντιοβιοσίδη της Ιριολόνης (NC16)	263

Εικόνα 5.36 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-17.....	266
Εικόνα 5.37 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-17 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_{\text{R}}=17.28$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_{\text{R}}=17.28$ min με $m/z=621.1805$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Βιοσίδη της Ιρισολόνης (NC17)	268
Εικόνα 5.38 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-18.....	269
Εικόνα 5.39 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-18 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_{\text{R}}=17.35$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_{\text{R}}=17.35$ min με $m/z=623.1604$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Γεντιοβιοσίδη της Ιριλόνης (NC18)	271
Εικόνα 5.40 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-26.....	274
Εικόνα 5.41 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGE-26 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_{\text{R}}=18.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_{\text{R}}=18.66$ min με $m/z=461.1071$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν 4'-O-γλυκοσίδης της Ιριλόνης (NC26)	275
Εικόνα 5.42 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του κλάσματος C1F15 της αρχικής κλασμάτωσης του ολικού εκχυλίσματος EtOAc.....	277
Εικόνα 5.43 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGE-9.....	281
Εικόνα 5.44 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-1.....	287
Εικόνα 5.45 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-1 επιπέδου συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_{\text{R}}=22.13$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ της κορυφής $t_{\text{R}}=22.13$ min με $m/z=299.0550$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριλόνη (NC23)	288
Εικόνα 5.46 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης IGM-2.....	290

Εικόνα 5.47 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-2 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=22.01$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=22.01$ min με $m/z=387.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιρισφλορεντίνη (NC2)290	290
Εικόνα 5.48 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-14.....291	291
Εικόνα 5.49 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-14 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.48$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.48$ min με $m/z=331.0811$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριστεκτοριγενίνη-B (NC24)292	292
Εικόνα 5.50 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-20.....294	294
Εικόνα 5.51 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-20 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.40$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.40$ min με $m/z=313.0707$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριγενίνη (NC21)294	294
Εικόνα 5.52 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-21.....295	295
Εικόνα 5.53 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-21 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=21.99$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=21.99$ min με $m/z=387.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιρισφλορεντίνη (NC2)296	296
Εικόνα 5.54 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-13.....297	297
Εικόνα 5.55 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-13 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.65$ min με $m/z=361.0915$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν Ιριγενίνη (NC20)298	298
Εικόνα 5.56 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-23.....299	299
Εικόνα 5.57 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-23 επιπέδου συγκέντρωσης 1μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum	

HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=12.85$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=12.85$ min με $m/z=167.0699$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ακετοβανιλλόνη (NC3)**.....300

Εικόνα 5.58 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-12.....302

Εικόνα 5.59 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-12 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=20.40$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=20.40$ min με $m/z=313.0702$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιρισολόνη (NC21)**.....303

Εικόνα 5.60 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-13b.....304

Εικόνα 5.61 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-8.....306

Εικόνα 5.62 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-8 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=16.58$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=16.58$ min με $m/z=523.1438$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ιριδίνη (NC25)**.....307

Εικόνα 5.63 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-11.....308

Εικόνα 5.64 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-11 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=18.66$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=18.66$ min με $m/z=461.1072$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **4'-O- β -D-γλυκοπυρανοσίδης της Ιριλόνης (NC26)**.....309

Εικόνα 5.65 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-5.....312

Εικόνα 5.66 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-5 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=7.79$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M-CO_2H_2-H]^+$ της κορυφής $t_R=7.79$ min με $m/z=373.1131$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Ανδροσίνη (NC14)**.....313

Εικόνα 5.67 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-6.....314

Εικόνα 5.68 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-6 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum

HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.29$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.29$ min με $m/z=621.1807$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Βιοσίδη της Ιρισολόνης (NC17)**.....315

Εικόνα 5.69 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-3.....316

Εικόνα 5.70 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-3 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=15.71$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=15.71$ min με $m/z=637.1757$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Γεντιοβιοσίδη της Ιρισολόνης (NC16)**.....316

Εικόνα 5.71 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-7.....317

Εικόνα 5.72 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-7 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.45$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=17.45$ min με $m/z=475.1229$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Germanaism-B (NC13)**.....318

Εικόνα 5.73 Φάσμα 1H -NMR της ένωσης IGM-9.....321

Εικόνα 5.74 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-9 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=18.32$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=18.32$ min με $m/z=607.1653$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Βιοσίδη της Ιριλόνης (NC15)**.....323

Εικόνα 5.75 Φάσμα 1H -NMR του δείγματος IGM-10.....325

Εικόνα 5.76 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(+)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-10 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=10.65$ min σε θετικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ της κορυφής $t_R=10.65$ με $m/z=423.0919$, το οποίο αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν **Μανγκιφερίνη (NC22)**.....326

Εικόνα 5.77 Φάσμα 1H -NMR του δείγματος IGM-4.....329

Εικόνα 5.78 (A) Χρωματογράφημα (Base Peak Ion Chromatogram) HPLC-(-)ESI-HRMS διαλύματος του IGM-4 επιπέδου συγκέντρωσης 1 μg /ml, (B) Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full scan High Resolution Mass Spectrum

HRMS) της βασικής κορυφής με $t_R=17.36$ min σε αρνητικό ιονισμό (ESI). Απεικονίζεται το ψευδομοριακό ιόν $[M-CO_2H_2-H]^+$ της κορυφής $t_R=17.36$ min με $m/z=667.1500$ και το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^+$ της κορυφής $t_R=17.36$ min με $m/z=621.1445$, τα οποία αντιστοιχούν στο φυσικό προϊόν **Γεντιοβιοσίδη της Ιριλόνης (NC18)**.....330

Εικόνα 6.1 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 $\mu\text{g/ml}$ ασκορβικό οξύ και 10 mM β -γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχρηγήγηση των απομονωμένων ενώσεων (10 μM) 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 \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....336

Εικόνα 6.2 Έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Κύτταρα MC3T3-E1 καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες παρουσία είτε υλικού αναφοράς (C), είτε υλικού διαφοροποίησης (C + Δ.Π.: 50 $\mu\text{g/ml}$ ασκορβικό οξύ και 10 mM β -γλυκεροφωσφορικού νατρίου) και συγχρηγήγηση των απομονωμένων ενώσεων (10 μM), a: απλά φαινολικά παράγωγά, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7. Η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά και η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % επί του υλικού διαφοροποίησης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....337

Εικόνα 6.3 Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θεραπευτικού 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. Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate, παρουσία τρυγικού οξέος και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....339

Εικόνα 6.4 Έκφραση Όξινης Φωσφατάσης Ανθεκτικής στο Τρυγικό (TRAP) στα κύτταρα RAW264.7. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε παρουσία μόνο του θεραπευτικού 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 (10 μM), a: απλά φαινολικά παράγωγά, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7. Η έκφραση της TRAP προσδιορίστηκε με χρήση του υποστρώματος p-nitrophenyl phosphate, παρουσία τρυγικού οξέος και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....340

Εικόνα 6.5 Επαγωγή της έκφρασης AlkP στην κυτταρική σειρά Ishikawa. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των ενώσεων (10 μM) για 72 ώρες και η έκφραση της AlkP προσδιορίστηκε χρωματομετρικά. Τα πλαίσια διαχωρίζουν τις ομάδες μεταβολιτών, a: απλά φαινολικά παράγωγά, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7 και d: παράγωγα ιριδαλών. Η ενεργότητα της AlkP εκφράζεται ως % της E_2 (1

nM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....342

Εικόνα 6.6 Επαγωγή του πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά MCF-7. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 6 ημέρες. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet). Τα πλαίσια διαχωρίζουν τις ομάδες μεταβολιτών, a: απλά φαινολικά παράγωγα, b: ισοφλαβόνες, c: ισοφλαβόνες με μεθυλενοδιόξυ-ομάδα στη θέση-6,7 και d: παράγωγα ιριδαλών. Ο σχετικός αριθμός κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό επί της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0.1 nM. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.....344

Εικόνα 7.1 Διάγραμμα ποσοστιαία μεταβολή της συνολικής οστικής πυκνότητας της κνήμης: a: $p<0.005$ σε σχέση με το OVX, b: $p<0.05$ σε σχέση με το OVX, c: $p<0.005$ σε σχέση με το OVX+IUCM, d: $p<0.05$ σε σχέση με την baseline και e: $p<0.005$ σε σχέση με την baseline. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....362

Εικόνα 7.2 Διάγραμμα ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση κνήμης: a: $p<0.005$ σε σχέση με το OVX, b: $p<0.05$ σε σχέση με το OVX, c: $p<0.005$ σε σχέση με το OVX+IUCM, d: $p<0.05$ σε σχέση με την baseline και e: $p<0.005$ σε σχέση με την baseline. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....362

Εικόνα 7.3 Ιστόγραμμα της οστικής πυκνότητας του φλοιώδους οστού στα 4mm από τη διάφυση της κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....366

Εικόνα 7.4 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας ελέγχου (C).....368

Εικόνα 7.5 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας OVX.....369

Εικόνα 7.6 Καμπύλες φόρτισης – παραμόρφωσης των μηριαίων οστών της ομάδας OVX+IUCM.....369

Εικόνα 7.7 Μαθηματικοί τύποι υπολογισμού της τάσης θραύσης κυκλικού δίσκου.....371

Εικόνα 7.8 Σχηματική παράσταση της διάταξης του οστού στην αρπάγη. Η απόσταση L είναι σταθερή (20mm) και το οστό πιέζεται από το έμβολο με μια δύναμη F, που κατά την πλήρη αστοχία αντιστοιχεί σε F_{max}372

Εικόνα 7.9 Μαθηματικοί τύποι υπολογισμού της τάσης θραύσης κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους.....374

Εικόνα 7.10 Διατομή μηριαίου οστού στο σημείο αστοχίας.....374

Εικόνα 7.11 Βάρη οργάνων πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της καρδιάς, του νεφρού, του εγκεφάλου, του γαστροκνήμιου μυός, του ήπατος και του ενδοκοιλιακού λίπους των πειραματοζώων που ελήφθησαν

κατά την νεκροψία στο τέλος του πειράματος. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....381

Εικόνα 7.12 Βάρος μήτρας πειραματοζώων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του βάρους της μήτρας των πειραματοζώων που ελήφθη κατά την νεκροψία στο τέλος του πειράματος. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής, * $p < 0.05$ σε σχέση με το CONTROL.....382

Παράρτημα Πινάκων

Πίνακας 3.1 Πρωτόκολλο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Παρουσιάζονται το πρόγραμμα έκλουσης, καθώς και οι αναλογίες διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο..... 116

Πίνακας 3.2 Συστήματα ανάπτυξης Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης. Παρουσιάζονται τα συστήματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα εκχυλισμάτων..... 116

Πίνακας 4.1 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).....149

Πίνακας 4.2 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae 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).....150

Πίνακας 4.3 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae 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).....151

Πίνακας 4.4 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae 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).....152

Πίνακας 4.5 Δράση εκχυλισμάτων της οικογένειας Leguminosae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής)..... 155

Πίνακας 4.6 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....156

Πίνακας 4.7 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....157

Πίνακας 4.8 Δράση εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Punicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae ως ανταγωνιστών της έκφρασης της AlkP στα κύτταρα Ishikawa. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως % ανταγωνισμός του εκχυλίσματος ως προς αυτόν του ICI σε συγκέντρωση 0.1 μM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....158

Πίνακας 4.9 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 E₂ σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....161

Πίνακας 4.10 Επίδραση των εκχυλισμάτων των οικ. Anacardiaceae, Berberidaceae, Iridaceae, Labiatae, Liliaceae, Pinaceae, Punicaceae 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 E₂ σε συγκέντρωση 0.1 nM (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....162

Πίνακας 4.11 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 E₂ (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....166

Πίνακας 4.12 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).....174

Πίνακας 4.13 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Acanthaceae, Anacardiaceae, Berberidaceae, Cupressaceae και Iridaceae 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).....176

Πίνακας 4.14 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Labiatae, Liliaceae, Moraceae, Morinaceae και Pinaceae 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).....177

Πίνακας 4.15 Επαγωγή της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) των εκχυλισμάτων των οικ. Plantaginaceae, Polygonaceae, Runicaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Taxaceae, Verbenaceae, Vitaceae και Zingiberaceae 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).....	179
Πίνακας 4.16 Συνοπτικός πίνακας των πλέον δραστικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα MC3T3-E1 καθώς και της δράσης τους ως αγωνιστές στα κύτταρα Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....	181
Πίνακας 4.17 Συνοπτικός πίνακας της δραστικότητας των εκχυλισμάτων του γένους Iris 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).....	189
Πίνακας 5.1 Τα διφασικά συστήματα διαλυτών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος IGE με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης.....	193
Πίνακας 5.2. Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού (FCPC1 ή C1) του εκχυλίσματος IGE.....	194
Πίνακας 5.3 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F2 με υγρή χρωματογραφία στήλης (C1CL2).....	196
Πίνακας 5.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-10.....	200
Πίνακας 5.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-11 (*, **, ***: παρατηρήθηκε αλληλεπικάλυψη των αντίστοιχων σημάτων).....	203
Πίνακας 5.6 Τα κλάσματα της επεξεργασίας των C1F3 και C1F4 με υγρή χρωματογραφία στήλης (C1CL1).....	204
Πίνακας 5.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-7.....	208
Πίνακας 5.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-8.....	211
Πίνακας 5.9 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-2.....	214
Πίνακας 5.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-3.....	217
Πίνακας 5.11 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-4.....	220
Πίνακας 5.12 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹ H-NMR και ¹³ C-NMR της ένωσης IGE-5a.....	222

Πίνακας 5.13 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-5b.....	223
Πίνακας 5.14 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-20.....	224
Πίνακας 5.15 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F18 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S5).....	231
Πίνακας 5.16 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-20.....	233
Πίνακας 5.17 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-21.....	236
Πίνακας 5.18 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F20 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S4).....	239
Πίνακας 5.19 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-19.....	241
Πίνακας 5.20 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F26 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S1).....	243
Πίνακας 5.21 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE12.....	246
Πίνακας 5.22 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE13.....	250
Πίνακας 5.23 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-13a.....	253
Πίνακας 5.24 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F27 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S2).....	256
Πίνακας 5.25 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-14.....	258
Πίνακας 5.26 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-16.....	262
Πίνακας 5.27 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-17.....	266
Πίνακας 5.28 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-18 (* αλληλεπικάλυψη σημάτων).....	270
Πίνακας 5.29 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C1F23 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C1S3).....	272

Πίνακας 5.30 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-26 (* αλληλεπικάλυψη σημάτων).....	274
Πίνακας 5.31 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-1.....	278
Πίνακας 5.32 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-2.....	279
Πίνακας 5.33 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-9.....	281
Πίνακας 5.34 Τα διφασικά συστήματα διαλυτών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος IGM με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης.....	283
Πίνακας 5.35 Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού (FCPC2 ή C2) του εκχυλίσματος IGM.....	283
Πίνακας 5.36 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGE-23.....	287
Πίνακας 5.37 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F22 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S3).....	301
Πίνακας 5.38 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F24 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S4).....	305
Πίνακας 5.39 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F25 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S5).....	310
Πίνακας 5.40 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F28 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S2).....	311
Πίνακας 5.41 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGM-9.....	322
Πίνακας 5.42 Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης IGM-10.....	325
Πίνακας 5.43 Τα κλάσματα της επεξεργασίας του C2F32 με υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (C2S1).....	328
Πίνακας 6.1 Συνοπτικός πίνακας της δραστηρότητας των τριτερπενικών παραγώγων τύπου ιριδάλης, στις κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, RAW264.7, Ishikawa και MCF-7. Τα δεδομένα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής).....	351

Πίνακας 6.2 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των απλών φαινολικών παραγώγων, 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).....	352
Πίνακας 6.3 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των ισοφλαβονών, 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).....	353
Πίνακας 6.4 Συνοπτικός πίνακας της δραστηριότητας των ισοφλαβονών με 6,7-μεθυλενοδιόξυ-ομάδα, 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).....	354
Πίνακας 7.1 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * $p<0.05$ σε σχέση με την αρχική μέτρηση, + $p<0.05$ σε σχέση με την μέτρηση στους 6 μήνες.....	357
Πίνακας 7.2 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, * $p<0.05$ σε σχέση με την αρχική μέτρηση, + $p<0.05$ σε σχέση με την μέτρηση στους 6 μήνες.....	358
Πίνακας 7.3 Ποσοστιαίες μεταβολές των παραμέτρων DEXA στους 3 και 6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας.....	360
Πίνακας 7.4 Στατιστικές σημαντικότητες των ποσοστιαίων μεταβολών ανά ζεύγη ομάδων.....	360
Πίνακας 7.5 Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης: * $p<0.05$ σε σχέση με το CONTROL, + $p<0.05$ σε σχέση με το OVX.....	361
Πίνακας 7.6 Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας εγγύς μετάφυσης κνήμης: * $p<0.05$ σε σχέση με το CONTROL, + $p<0.05$ σε σχέση με το OVX.....	361
Πίνακας 7.7 Παράμετροι pQCT στα 3mm και 4mm από την εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης.....	364
Πίνακας 7.8 Παράμετροι pQCT στο 20mm από την εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης.....	365
Πίνακας 7.9 Μέγιστες τιμές δύναμης, δαπανηθείσας ενέργειας και στιβαρότητας δεξιών και αριστερών μηριαίων οστών όλων των ομάδων ελέγχου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας ± σταθερό σφάλμα μέσης τιμής.....	370

Πίνακας 7.10 Μέγιστες τιμές δύναμης, δαπανηθείσας ενέργειας και στιβαρότητας όλων των ομάδων ελέγχου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm σταθερό σφάλμα μέσης τιμής.....370

Πίνακας 7.11 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για το σύνολο των δοκιμών όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.....372

Πίνακας 7.12 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για τα δεξιά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.....373

Πίνακας 7.13 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση συμπαγούς κυλίνδρου για τα αριστερά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R ακτίνα του κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.373

Πίνακας 7.14 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για το σύνολο των δοκιμών όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.375

Πίνακας 7.15 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για τα δεξιά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.....375

Πίνακας 7.16 Μέγιστες εφελκυστικές τάσεις (σ) με την προσέγγιση κυλινδρικού δίσκου μέσου πάχους για τα αριστερά δοκίμια όλων των ομάδων και τα απαραίτητα μεγέθη υπολογισμού τους. F_{max} μέγιστο φορτίο, L η απόσταση στήριξης στην αρπάγη, M μέγιστη καμπτική ροπή, R_{out} εξωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου, R_{in} εσωτερική ακτίνα κυκλικού δίσκου και I η επιφανειακή ροπή. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής.....376

Πίνακας 7.17 Σωματικά βάρη των επίμυων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή του σωματικού βάρους των πειραματοζώων (g) κάθε ομάδας, στην έναρξη του πειράματος, τον 3^ο και τον 6^ο μήνα της πειραματικής διαδικασίας,

καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές εντός των ομάδων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας \pm τυπική απόκλιση μέσης τιμής.....380

Συντομογραφίες

¹H-NMR: Φάσμα πρωτονίου

3PB: three-point-bending, μηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων δοκιμίων

Akt: Protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B

AlkP: Alkaline phosphate, Αλκαλική φωσφατάση

a-MEM: alpha Modification Minimum Essential Media, α-τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υλικό

Analytical TLC: Analytical Thin Layer Chromatography, Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

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

CD₃OD: δευτεριωμένη μεθανόλη

CDCl₃: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο

CH₂Cl₂: διχλωρομεθάνιο

cHex: κυκλοεξάνιο

COSY: Correlation Spectroscopy, Ομοπυρηνικό φάσμα συσχέτισης πρωτονίων

CRT_A: cortical area, εμβαδόν φλοιώδους οστού

CRT_DEN: cortical density, οστική πυκνότητα φλοιώδους οστού

D₂O: δευτεριωμένο ύδωρ

DCC: dextran coated charcoal, άνθρακας επικαλυμμένος με δεξτράνη

DCC-FBS: Dextran Coated Charcoal-FBS, ορός έμβριου βοός, επεξεργασμένος με ενεργό άνθρακα για την απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών

DEXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry, απορροφησιομετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-X

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium, Dulbecco-τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υλικό

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

DMSO-D6: δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ελεύθερη ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικριλυδραζυλικής ρίζα

E₂: 17β-οιστραδιόλη

ER α : estrogen receptor- α , υποδοχέας οιστρογόνων- α

ER β : 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 έμβριου βοός

FCPC: Fast Centrifugal Partition Chromatography, Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση

FGF-2: fibroblast growth factor-2, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών-2

Fmax: μέγιστη φόρτιση ή δύναμη

GBC: άλας του 2-methyl-4-([2-methylphenyl]azo)benzenediazonium

GC-MS: Gas chromatography – Mass spectrometry, Αέριο Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας

HI-FBS: Heat Inactivated FBS, θερμικά κατεργασμένος ορός έμβριου βοός

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation, Ετεροπυρηνικό φάσμα συσχετισμού άνθρακα με τα πρωτόνια των γειτονικών ανθράκων

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, Ετεροπυρηνικό φάσμα συσχετισμού άνθρακα με τα πρωτόνια 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

L: απόσταση στήριξης του οστού στα δύο σημεία της αρπάγης

LC: Liquid Chromatography, Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση

LC-MS: Liquid chromatography – Mass spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας

LF: left femur, αριστερό μηριαίο δοκίμιο

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- κB

n-Heptane: n-επτάνιο

NMR: Nuclear Magnetic Resonance, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

OD: optical density, οπτική απορρόφηση

OHP: hydroxyproline, υδροξυπρολίνη

OPG: osteoprotegerin, οστεοπροτεγερίνη

OVX: ovariectomy, ωθηκεκτομή

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

R: ακτίνα στο μέσο του δοκιμίου

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-κβ

RF: right femur, δεξιό μηριαίο δοκίμιο

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

SSI: polar strength strain index, ογκομετρική πυκνότητα ή δείκτης εκτίμησης της μηχανικής αντοχής δοκιμίων

SUBCRT_A: subcortical area, εμβαδόν υποφλοιώδους οστού

SUBCRT_DEN: subcortical density, οστική πυκνότητα υποφλοιώδους οστού

TGF-β2: Transforming growth factor-beta 2, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β2

TLC: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

TOT_A: total area, συνολικό εμβαδό οστού

TOT_DEN: total density, ολική οστική πυκνότητα

TRAB_A: trabecular area, εμβαδόν σπογγώδους οστού

TRAB_DEN: trabecular density, οστική πυκνότητα σπογγώδους οστού

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

y: απόσταση από τον ουδέτερο άξονα

A.Φ.: απόθεση φωσφορικού ασβεστίου

α: απόσταση μεταξύ του σημείου επιβολής του φορτίου και του κοντινότερου σε αυτό σημείου στήριξης στο πλαίσιο φόρτισης

Δ.Π.: διαφοροποιητικοί παράγοντες

δ: χημική μετατόπιση

I: ροπή αδράνειας δοκιμίου

M.T.: μοριακός τύπος

M: μέγιστη καμπτική ροπή

μCT: micro-Computerized Tomography, Μικροϋπολογιστική Τομογραφία

MMP-1: Matrix metalloproteinase-1, κολλαγενάση

Σ.Β.: σωματικά βάρη επίμυων

σ: τάσης αστοχίας των δοκιμίων

Βιβλιογραφία

- Ag[1] Feng X., McDonald J.M. Disorders of bone remodeling. *Annu. Rev. Pathol.*, 2011, 6, 121-145.
- [2] Junqueira C.L., Carneiro J., Kelley R.O. (Μετάφραση: Οικονομόπουλος Π.), “Βασική Ιστολογία”, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης (6η Έκδοση), 1991, 186-205.
- [3] Bonewald L.F. Osteocytes as multifunctional cells. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 2006, 6, 331-333.
- [4] Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Italian J. Anat. Embryol.*, 1996, 101, 25-79.
- [5] Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J. Muskuloskel. Neuron. Interact.*, 2000, 1 (2), 133-136.
- [6] Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: classic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(2), 115-137.
- [7] Sommerfeldt D.W., Rubin C.T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine J.*, 2001, 10, S86-S95.
- [8] 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. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411), 143-147.
- [9] Harada S., Rodan G. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 2003, 423, 349-355.
- [10] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*, 2000, 289, 1501-1504.
- [11] Goltzman D. Discoveries, Drugs and Skeletal Disorders, *Nature*, 2002, 1, 784-796.
- [12] Ducy P, Karsenty G. Genetic Control of Cell Differentiation in the Skeleton. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 10, 614-619.
- [13] Bostrom M., Boskey A., Kaufman J., Einhorn T. Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System on CDROM, Chapter 13 - Form and function of bone, *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2000.
- [14] Aubin J.E., Triffitt J. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. Principles of Bone Biology, *Academic Press*, (ed. Bilezikian J. P., Raisz L. G., Rodan G. A.), 2002, 59-81.
- [15] Aubin JE. Advances in the Osteoblast Lineage. *Biochem. Cell. Biol.*, 1998, 76 (6), 899-910.

- [16] Aubin JE. Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2001, 2, 81-94.
- [17] Parfitt A.M. Bone Forming Cells in Clinical Conditions. Bone. The Osteoblast and Osteocyte. *The Telford Press*, London, 1991, 351-429.
- [18] Cohen M.M. The new bone biology: pathologic, molecular and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2006, 140 (23), 2646-2706.
- [19] Roodman D.G. Cell Biology of the Osteoclast. *Exp. Hematol.*, 1999, 27, 1229-1241.
- [20] Nakamura H., Tsuji T., Hirata A., Yamamoto T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, 50 (7), 945-953.
- [21] Luxenburg C., Addadi L., Geiger B., The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur. J. Cell Biol.*, 2006, 85, 203-211.
- [22] Sakiyama H., Masuda R., Inoue N., Yamamoto K., Kuriwa K., Nakagawa K., Yoshida K. Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. *J. Bone Miner. Metab.*, 2001, 19 (4), 220-227.
- [23] Quinn J.M., Morfis M., Lam M.H., Elliott J., Kartsogiannis V., Williams E.D., Gillespie M.T., Martin T.J., Sexton P.M. Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone*, 1999, 25(1), 1-8.
- [24] Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, 69 (1), 11-25.
- [25] Razzouk S., Brunn J.C., Qin C., Tye C.E., Goldberg H.A., Butler W.T. Osteopontin post-translational modifications, possibly phosphorylation are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*, 2002, 30 (1), 40-47.
- [26] Teitelbaum S.L. Osteoclasts, Integrins and Osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.*, 2000, 18, 344-349.
- [27] Teitelbaum S.L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am. J. Pathol.*, 2007, 170 (2), 427-435.
- [28] Duong L., Rodan G.A. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2001, 2 (1), 95-104.
- [29] Xing L., Boyce B.F. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 328 (3), 709-720.
- [30] Sims N.A., Martin T.J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Reports*, 2014, 3, 481.

- [31] Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390, 175–179.
- [32] Parfitt A.M. The Mechanism of Coupling: A Role for the Vasculature. *Bone*, 2000, 26 (4), 319-323.
- [33] McCormick R.K. Osteoporosis: intergrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Alter. Med. Rev.*, 2007, 12 (2), 113-45.
- [34] Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M.A., del-Canto-Pingarrón M., Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2006, 11, 1571-157.
- [35] Raggatt L.J. & Partridge N.C. Cellular and molecular mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285 (33), 25.103-25.108.
- [36] Cooper A., & Cooper B.B. A treatise on dislocations, and on fractures of the joints. *Churchill.*, London, United Kingdom. 1822, 425.
- [37] Lobstein J. Von der Knochenbreichigkeit oder Osteopsathyrose. *Lehrbuch der Pathologischen Anatomie*, 1835, 2, 179-179.
- [38] Alwens W. Spatrachitis, Osteomalazie, Senile Osteoporosis, Hungerosteopati. *Handbuch der Inneren Medizin. Springer Verlag*, 1926, 584.
- [39] Albright F., Bloomberg E., Smith P.H. Postmenopausal osteoporosis. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 1940, 55, 298-305.
- [40] Riggs B.L., Wahner H.W., Seeman E., Offord K.P., Dunn W.L., Mazess R.B., Johnson K.A., Melton L.J. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J. Clin. Invest.*, 1982, 70, 716-723.
- [41] Raisz L.G., Rodan G.A. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 2003, 32, 15-24.
- [42] Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. Conference report. *Am. J. Med.*, 1991, 90 (1), 107-110.
- [43] Nishizawa Y., Nakamura T., Ohta H., Kushida K., Gorai I., Shiraki M., Fukunaga M., Hosoi T., Miki T., Chaki O., Ichimura S., Nakatsuka K., Miura M. Guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.*, 2005, 23, 97-104.
- [44] Miller P.D., Bonnick S.L. In primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 4th ed. *Favus, MJ ed. Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 1999, 128-134.

- [45] Nordin B.E., Aaron J., Speed R., Crilly R.G. Bone formation and resorption in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1981, 2 (8245), 277-279.
- [46] Tannirandorn P., Epstein S. Drug-induced bone loss. *Osteoporos. Int.*, 2000, 11 (8), 637-659.
- [47] Marcus R., Bouxsein M.L. The Nature of Osteoporosis. In *Osteoporosis IIIe*. ed: R. Marcus, J. Kelsey, C. Rosen and D. Feldman, *Academic Press, Inc.*, San Diego, 2007, 27-33.
- [48] Fallon M.D., Perry H.M., Bergfeld M. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Arch. Intern. Med.*, 1983, 143, 442-444.
- [49] Shils M.E., Shike M., Ross A.C., Caballero B, Cousins R.J. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th edition, Lippincott, *Williams & Wilkins*, Philadelphia, 2006, 10, 537-544.
- [50] Hughes D.E., Dai A., Tiffée J.C., Li H.H., Mundy G.R., Boyce B.F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat. Med.*, 1996, 2 (10), 1132-1136.
- [51] Krall E.A., Dawson-Hughes B. Heritable and life style determinants of BMD. *J. Bone Miner. Res.*, 1993, 8, 1-9.
- [52] Seeman E., Hopper J.L., Bach L.A. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 320, 554-558.
- [53] Kanis J.A. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *Osteoporos. Int.*, 1994, 4 (6), 368-381.
- [54] Pollitzer W.S., Anderson J.J.B. Ethnic and genetic differences in bone mass: a review with a hereditary versus environmental perspective. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, 50, 1244-1259.
- [55] Lanyon, L.E. Strain related bone modelling and remodeling. *Top geriatr. Rehabil.*, 1989, 4, 13-24.
- [56] Marshall D., Johnell O., Wedel H. Meta-analysis of How Well Measures of Bone Mineral Density Predict Occurrence of Osteoporotic Fractures. *Br. Med. J.*, 1996, 312, 1254-1259.
- [57] Cummings S.R., Black D.M., Nevitt M.C., Browner W., Cauley J., Ensrud K., Genant H.K., Palermo L., Scott J., Vogt T.M. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*, 1993, 341 (8837), 72-75.
- [58] Kanis J.A., Melton L.J., Christiansen C., Johnston C.C., Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, 1994, 9 (8), 1137-1141.
- [59] Gasser J. Quantitative Assessment of Bone Mass and Geometry by pQCT in Rats in Vivo and Site Specificity of Changes at Different Skeletal Sites. *J. Jpn. Soc. Bone Morphom.*, 1997, 7, 107-114.

- [60] Breen S.A., Loveday B.E., Millett A.J., Waterton J.C. Stimulation and inhibition of bone formation: use of peripheral quantitative computed tomography in the mouse *in vivo*. *Lab. Anim.*, 1998, 32, 467-476.
- [61] Njeh C.F., Boivin C.M., Langton C.M. The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis: A review. *Osteoporos. Int.*, 1997, 7, 7-22.
- [62] Damilakis J., Maris T.G., Karantanas A.H. An update on the assessment of osteoporosis using radiologic techniques. *Eur. Radiol.*, 2007, 17 (6), 1591-602.
- [63] Link T.M. Radiology of Osteoporosis. *Can. Assoc. Radiol. J.*, 2016, 67 (1), 28-40.
- [64] Swaminathan R. Biochemical Markers of Bone Turnover. *Clin. Chim. Acta.*, 2001, 313, 95-105.
- [65] Fink E., Cormier C., Steinmetz P., Kindermans C., Le Bouc Y., Souberbielle J.C. Differences in the Capacity of Several Biochemical Markers to Assess High Bone Turnover in Early Menopause and Response to Alendronate Therapy. *Osteoporos. Int.*, 2000, 11, 295-303.
- [66] Delmas P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 2002, 359, 2018-2026.
- [67] Das S., Crockett J.C. Osteoporosis – a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2013, 7, 435-448.
- [68] Harvey R.A, Champe P.C. “Φαρμακολογία (3η έκδοση)”. *Παρισιάνου Α.Ε.*, 2007, Αθήνα.
- [69] Wells G., Tugwell P., Shea B., Guyatt G., Peterson J., Zytaruk N., Robinson V., Henry D., O'Connell D., Cranney A. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocrine Rev.*, 2002, 23 (4), 529-539.
- [70] Lufkin E. G., Wong M., Deal C. The role of selective estrogen receptor modulators in the prevention and treatment of osteoporosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2001, 27, 163-185.
- [71] Rossouw J., Anderson G., Prentice R. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *J.A.M.A.*, 2002, 288 (3), 321-333.
- [72] Beral V., Bull D., Doll R., Key T., Peto R., Reeves G. (Analysis and writing committee). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer *Lancet*, 1997, 350 (9084), 1047-1059.
- [73] Delmas P.D., Bjarnason N., Mitlak B. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*, 1997, 337 (23), 1641-1647.

- [74] Russell R.G., Watts N.B., Ebetino F.H., Rogers M.J., Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influences of clinical efficacy. *Osteoporos. Int.*, 2008, 19, 733-759.
- [75] Black D., Thompson D., Bauer D. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: The fracture intervention trial. FIT research group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85 (11), 4118-4124.
- [76] Rizzoli R. Zoledronic acid for the treatment and prevention of primary and secondary osteoporosis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2010, 2 (1), 3-16.
- [77] Chesnut C.H. 3rd, 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. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am. J. Med.*, 2000, 109, 267-276.
- [78] Prestwood K.M., Pilbeam C.C., Raisz L.G. Treatment of osteoporosis. *Annu. Rev. Med.*, 1995, 46, 249-56.
- [79] Reginster J.Y., Deroisy R., Lecart M.P., Sarlet N., Zegels B., Jupsin I. A double blind, placebo-controlled, dose-finding trial of intermittent nasal salmon calcitonin for prevention of postmenopausal lumbar spine bone loss. *Am. J. Med.*, 1995, 98, 452-458.
- [80] Watson P., Hanley D. Parathyroid hormone: Regulation of synthesis and secretion. *Clin. Invest. Med.*, 1993, 16 (1), 58-77.
- [81] Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., Hodsmen A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O., Mitlak B.H. Effect of parathyroid hormone (1-84) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344, 1434-1441.
- [82] Kawai M., Mödder U. I., Khosla S., Rosen C.J. Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011, 10 (2), 141-156.
- [83] Briancon D., Meunier P.J. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. *Orthop. Clin. North Am.*, 1981, 12, 629-648.
- [84] Mamelle N., Meunier P.J., Dusan R. Risk-benefit ratio of sodium fluoride treatment in primary vertebral osteoporosis. *Lancet*, 1988, 2, 361-365.
- [85] Pak C.Y., Sakhaee K., Piziak V. Slow-release sodium fluoride in the management of post menopausal osteoporosis. A randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 1994, 120, 625-632.
- [86] 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. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 2009, 361 (8), 756-765.

- [87] 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. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2009, 361 (8), 745-755.
- [88] Al-Anazi A.F., Qureshi V.F., Javaid K., Qureshi S.J. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J. Nat. Sc. Biol. Med.*, 2011, 2, 154-163.
- [89] Jeong J.C., Lee B.T., Yoon C.H., Kim H.M., Kim C.H. Effects of *Drynariae rhizoma* on the proliferation of human bone cells and the immunomodulatory activity. *Pharmacol. Res.*, 2005, 51 (2), 125-136.
- [90] Jeong J.C., Lee J.W., Yoon C.H., Kim H.M., Kim C.H. *Drynariae rhizoma* promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells through regulation of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, type I collagen and collagenase-1. *Toxicol. In Vitro*, 2004, 18 (6), 829-834.
- [91] Xu M.L., Liu J., Zhu C., Gao Y., Zhao S., Liu W., Zhang Y. Interactions between soy isoflavones and other bioactive compounds: a review of their potentially beneficial health effects. *Phytochem. Rev.*, 2015, 14, 459-467.
- [92] Suh K.S., Koh G., Park C.Y., Woo J.T., Kim S.W., Kim J.W., Park I.K., Kim Y.S. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry*, 2003, 63, 209-215.
- [93] Duncan A.M., Phipps W.R., Kurzer M.S. Phyto-estrogens. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 17 (2), 253-271.
- [94] Viereck V., Gründker C., Friess S.C., Frosch K.H., Raddatz D., Schoppet M., Nisslein T., Emons G., Hofbaue L.C. Isopropanolic Extract of Black Cohosh Stimulates Osteoprotegerin Production by Human Osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, 20, 2036-2043.
- [95] Kim C., Ha H., Lee J.H., Kim J.S., Song K., Park S.W. Herbal extract prevents bone loss in ovariectomized rats. *Arch. Pharm. Res.*, 2003, 26 (11), 917-924.
- [96] Dontas I., Halabalaki M., Moutsatsou P., Mitakou S., Papoutsi Z., Khaldi L., Galanos A., Lyritis G.P. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas*, 2006, 53 (2), 234-242.
- [97] Senthilkumara K., Venkatesana, J., Kim S.K. Marine derived natural products for osteoporosis. *Br. J. Nutr.*, 2014, 4, 1-7.
- [98] Heidari Z., Hamidreza Mahmoudzadeh-Sagheb H., Mohammad Hashemi M., Ayub Rigi-Ladiz M. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2014, 143, 61-71.

- [99] Reinwald S., Weaver C.M. Soy isoflavones and bone health: A doubleedged sword? *J. Nat. Prod.*, 2006, 69, 450-9.
- [100] Johnson E.B., Muto M.G., Yanushpolsky E.H., Mutter G.L. Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer. *Obstet. Gynecol.*, 2001, 98, 947-50.
- [101] McLachlan J.A., Simpson E., Martin M. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, 20, 63-75.
- [102] Bassar K., Demirci B., Orhan I. Composition of volatiles from three *Iris* species of Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 2011, 23 (4), 66-71.
- [103] Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A. & Tzanoudakis D. Vascular plants of Greece: An annotated checklist., Berlin: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin; Athens: *Hellenic Botanical Society*, Englera, 2013, 31, 1-370.
- [104] Ευσταθίου Ι. Τα δημόδια ονόματα των φυτών της Ελληνικής χλωρίδος. 2003.
- [105] Goodyer J.A.D. The Herbal of Dioscorides the Greek, BOOK ONE: AROMATICS, Englished by John Goodyer, A.D. 1655, edited and first printed, A.D. 1933, by Robert T. Gunther.
- [106] Grieve M. A modern Herbal. *Dover publications*, 1971, New York.
- [107] Wu Y., Xu L. Analysis of isoflavones in *Belamcanda chinensis* and *Iris tectorum* by square wave voltammetry. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1992, 27, 64-68.
- [108] Morita N., Shimokoriyama M., Shimizu M. Studies on medicinal resources XXXIII. The Components of rhizome of *Iris tectorum* (Iridaceae). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1972, 92 (8), 1052-1054.
- [109] Seki K., Tomihari T., Haga K. Iristectorones A-H, spirotriterpene- quinine adducts from *Iris tectorum*. *Phytochemistry*, 1994, 37 (3), 807-815.
- [110] Farag S., Backheet E., El-Emary N. and Niwa M. Isoflavonoids and flavones glycosides from rhizomes of *Iris carthaliniae*. *Phytochemistry*, 1999, 50 (8), 1407-1410.
- [111] Kukula-Koch W., Sieniawska E., Widelski J., Urjin O., Głowniak P., Skalicka-Wozniak K. Major secondary metabolites of *Iris* spp. *Phytochem. Rev.*, 2015, 14, 51-80.
- [112] Mosihuzzman M., Naheed S., Hareem S., Talib S., Abbas G., Khan S., Choudhary M., Sener B., Tareen R., Israr M. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*. *Life Sciences*, 2013, 92, 187-192.

- [113] Krick W., Marner F., Jaenicke L. Isolation and structure determination of the precursors of alpha-irone and gamma-irone and homologous compounds from *Iris pallida* and *Iris florentina*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 1983, 38, 179-184.
- [114] Buer C., Imin N., Djordjevic M. Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *J. Integr. Plant. Biol.*, 2010, 52, 98-111.
- [115] Harborne J.B., Mabry T.J. The Flavonoids: Advances in Research Since 1980. *Chapman and Hall*, 1982, London.
- [116] Pathak, D., Pathak, K., Sigla, A.K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia*, 1991, 62, 371-388.
- [117] Sanduja R., Martin G., Weinheimer A., Alam M., Hossain M., Van der Helm D. Secondary metabolites of the coelenterate *Echinopora lamellöse*. *J. Heterocyclic Chem.*, 1984, 21, 845-848.
- [118] Marchelli R, Vining L. The biosynthetic origin of chlorflavonin, a flavonoid antibiotic from *Aspergillus candidus*. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1973, 51, 1624-1629.
- [119] Bohm B. Chalcones, aurones and dihydrochalcones. *The Flavonoids*, 1975, 442-404.
- [120] Rahman A., Nasim S., Baig I. Antiinflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 86, 177-180.
- [121] Iwashina T., Ootani S. Flavonoids of genus *Iris*; structures, distribution and function. *Ann. Tsukuba Bot. Gard.*, 1998, 17, 147-183.
- [122] Hanawa F., Tahara S., Mizutani J. Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*, 1991, 30, 157-163.
- [123] Marner F. Iridals and cycloiridals, products of an unusual squalene metabolism in sword lilies (iridaceae). *Curr. Org. Chem.*, 1997, 1 (2), 153-186.
- [124] Orhan I., Nasim S., Tener B., Ayanoglu F., Özgüven M., Choudhary M., Rahman A. Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. *Phytother. Res.*, 2003, 17, 575-577.
- [125] Rahman A., Nasim S., Baig I. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. *Helv. Chim. Acta.*, 2003, 86, 3354-3362.
- [126] Nikaido T., Ohmoto T., Sankawa U., Hamanaka T., Totsuka K. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. *Planta Med.*, 1982, 46, 162-166.

- [127] Negi J., Bisht V., Singh P., Rawat M., Joshi G. Naturally Occurring Xanthones: Chemistry and Biology. *Journal of Applied Chemistry*, 2013, Article ID 621459, 9 pages.
- [128] Asghar S.F., Habib-ur-Rehman, Atta-ur-Rahman, Choudhary M.I. Phytochemical investigations on *Iris germanica*. *Nat. Prod. Res.*, 2010, 24 (2), 131-139.
- [129] Πουλή Ν., Μαράκος Π., (2014). “ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ IV”. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, 21.
- [130] Marner F.J., Krick W., Gellrich B., Jaenicke L., Winter W. Irigermanal and iridogermanal. Two new triterpenoids from rhizomes of *Iris germanica* L. *J. Org. Chem.*, 1982, 47, 2531-2538.
- [131] Bonfils J., Bonfils C., Larroque C., Surjus A., Gleize D., Sauvaire Y. Lipid composition of microsomes of *Iris germanica* rhizomes. *Phytochemistry*, 1995, 38 (3), 585-587.
- [132] Anwar F., Jamil A., Iqbal S., Sheikh M. Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. *Grasas y Aceites*, 2006, 57 (2), 189-197.
- [133] Ibrahim S., Mohamed G., Al-Musayeib N. New Constituents from the Rhizomes of Egyptian *Iris germanica* L. *Molecules*, 2012, 17, 2587-2598.
- [134] Wollenweber E., Stevens J., Klimo K., Knauff J., Frank N., Gerhäuser C. Cancer chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Med.*, 2003, 69, 15-20.
- [135] Burcu B., Aysel U., Nurdan S. Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. *Ind. Crops. Prod.*, 2014, 61, 526-530.
- [136] Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 4113-4117.
- [137] Bonfils J.P., Pinguet F., Culine S., Sauvaire Y. Cytotoxicity of Iridals, Triterpenoids from *Iris*, on Human Tumor Cell Lines A2780 and K562. *Planta Med.*, 2001, 67, 79-81.
- [138] Belcour B., Courtois D., Ehret Ch., Petiard V. Rapid Production of Irones by Maturation of *Orris* Rhizomes with Two Bacterial Strains. *Phytochemistry*, 1993, 34 (5), 1313-1315.
- [139] Choudhary M., Naheed S., Jalil S., Alamb J., Rahmana A. Effects of ethanolic extract of *Iris germanica* on lipid profile of rats fed on a high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 98, 217220.
- [140] Benoit-Vical F., Imbert C., Bonfils J-P, Sauvaire Y. Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid. *Phytochemistry*, 2003, 62, 747-751.

- [141] Kim J.L., Li H.M., Kim Y.H., Lee Y.J., Shim J.H., Lim S.S., Kang Y.H. Osteogenic activity of yellow flag iris (*Iris pseudacorus*) extract modulating differentiation of osteoblasts and osteoclasts. *Am. J. Chin. Med.*, 2012, 40 (6), 1289-1305
- [142] Kassak P. Secondary metabolites of the chosen genus *iris* species. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, 2012, 60 (8), 269-280.
- [143] Lin J., Puckree T., Mvelose T. Antidiarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 79, 53-56.
- [144] Wu Z.F., Xiong C.M. Comparison of the pharmacological effects of *Belamcada chinensis* (L.) DC., *Iris dichotoma* Pall. and *Iris tectorium* Maxim. *Pharmacol. Clin. Chin. Mater. Med.*, 1990, 6, 28-33.
- [145] Wei Y., Shu P., Honga J. Qualitative and quantitative evaluation of phenolic compounds in *Iris dichotoma* Pall. *Phytochem. Anal.*, 2012, 23, 197-207.
- [146] Huang L., Ma WH., Liu YZ. Iridichotins A-C, three new flavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris dichotoma* Pall. *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, 2011, 13, 744-748.
- [147] Baytop T. Therapy with medical plant in Turkey. 1984, *Istanbul University Press*, Istanbul, No. 3255.
- [148] Schütz C., Quitschau M., Hamburger M., Potterat O. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC-PDA-MS analysis. *Fitoterapia*, 2011, 82 (7), 1021-1026.
- [149] Reich E., Schibli A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. *Thieme Medical Publishers Inc.*, New York, NY: 2007.
- [150] Scott R.P.W. Liquid Chromatography Detectors. *Library for Science*, 2003, 41-59.
- [151] Colegate S.M., Molyneux R.J. Bioactive Natural Products Detection, Isolation and Structural Determination. *CRC press / Taylor & Francis* (2nd edition), 2008.
- [152] Littlefield B.A., Gurpide. E., Markiewicz L., McKinley B., Hochberg R. B. 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*, 1990, 127, 2757-2762.
- [153] Markiewicz L., Garey J., Adlercreutz H., Gurpide E. *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1993, 45, 399-405.
- [154] Gregory C.A., Gunn W.G., Peister A., Prockop D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.*, 2004, 329 (1), 77-84.

- [155] Panjabi M.M., Krag M., Summers D., Videman T. Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J. Orthop. Res.*, 1985, 3 (3), 292-300.
- [156] Gayathri G.A., Mahalingam G., Nathiya R. Quantitative phytochemical analysis, in vitro reducing power and anti-oxidant activity of methanol leaf extract of *Acanthus ilicifolius*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2015, 7 (1), 181-186.
- [157] Huo C-H., Wang B., Lin W-H., Zhao Y-Y. Benzoxazinones from *Acanthus ilicifolius*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005, 33, 643-645.
- [158] Asha K.K., Mathew S., Lakshmanan P.T. Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. *Indian J. Mar. Sci.*, 2012, 41 (3), 259-264.
- [159] Firdaus M., Prihanto A.A., Nurdiani R. Antioxidant and cytotoxic activity of *Acanthus ilicifolius* flower. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2013, 3 (1), 17-21.
- [160] Van Kiem P., Quang T.H., Huong T.T., Nhung L.T.H., Cuong N.X., Van Minh C., Choi E.M., Kim Y.H. Chemical constituents of *Acanthus ilicifolius* L. and effect on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 2008, 31 (7), 823-829.
- [161] Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Surmaghi M.H.S., Mohammad Reza Shams-Ardekani M.R., Rahimi R. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Scientific World J.*, 2013, Article ID 219815, 33 pages.
- [162] Matic´ S., Stanic´ S., Mihailovic´ M., Bogojevic´ D. *Cotinus coggygia* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2015, in press.
- [163] Demirbükler D.K., Altıok E., Bayraktar O., Ülkü S. *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible -glucuronidase inhibitor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, 64, 167-171.
- [164] Marzouk M.S., Moharram F.A., Haggag E.G., Ibrahim M.T., Badary O.A. Antioxidant Flavonol Glycosides from *Schinus molle*. *Phytother. Res.*, 2006, 20, 200-205.
- [165] Ding Y., Nguyen H.T., Choi E.M., Bae K., Kim Y.H. Rhusonoside A, a New Megastigmane Glycoside from *Rhus sylvestris*, Increases the Function of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Planta Med.*, 2009, 75 (2), 158-162.
- [166] Song N.J., Kwon S.M., Kim S., Yoon H.J., Seo C.R., Jang B., Chang S.H., Ku J.M., Lee J.S., Park K.M., Hong J.W., Kim G.H., Park K.W. Sulfuretin induces osteoblast differentiation through activation of TGF- β signaling. *Mol. Cell. Biochem.*, 2015, 410, 55-63.

- [167] Choi H.J., Eun J.S., Park Y.R., Kim D.K., Li R., Moon W.S., Park J.M., Kim H.S., Cho N.P., Cho S.D., Soh Y. Ikarisoid A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, 601, 171-178.
- [168] Choi H.J., Park Y.R., Nepal M., Choi B.-Y., Cho N.-P., Choi S.H., Heo S.R., Kim H.S., Yang M.-S., Soh Y. Inhibition of osteoclastogenic differentiation by Ikarisoid A in RAW 264.7 cells via JNK and NF- κ B signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, 636, 28-35.
- [169] Zhang J.F., Li G, Me9ng C.L., Dong Q., Chan C.Y., He M.L., Leung P.C., Zhang Y.O., Kung H.F. Total flavonoids of Herba Epimedii improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells. *Phytomedicine*, 2009, (16), 521-529.
- [170] Hsieh T.P., Sheu S.Y., Sun J.S., Chen M.H. Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE(2) synthesis. *Phytomedicine*, 2011, (18), 176-185.
- [171] Zhang D.W., Cheng Y., Wang N.L., Zhang J.C., Yang M.S., Yao X.S. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine*, 2008, (15), 55-61.
- [172] Zhang G., Qin L., Hung W.Y., Shi Y.Y., Leung P.C., Yeung H.Y., Leung K.S. Flavonoids derived from herbal *Epimedium Brevicornum* Maxim prevent OVX-induced osteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption. *Bone*, 2006, 38 (6), 818-825.
- [173] Nian H., Ma M.H., Nian S.S., Xu L.L. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 2009, 16 (4), 320-326.
- [174] Zhang G., Qin L., Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, 22, 1072-1079.
- [175] Kulkarni P.H., Shahida A. The Ayurvedic Plants. Indian Medical Science Series No.132, *Satguru Publications*, Delhi, 2004, XIV.
- [176] Caliceti C., Rizzo P., Cicero A.F.G., Potential Benefits of Berberine in the Management of Perimenopausal Syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015, Article ID 723093, 9 pages.
- [177] Potdar D., Hirwani R.R., Dhulap S. Phyto-chemical and pharmacological applications of *Berberis aristata*. *Fitoterapia*, 2012, 83, 817-830.
- [178] Hu J.P., Nishishita K., Sakai E., Yoshida H., Kato Y., Tsukuba T., Okamoto K. Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF-kappaB and Akt pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, 580, 70-79.

- [179] Li H., Miyahara T., Tezuka Y., Namba T., Suzuki T., Dowaki R., Watanabe M., Nemoto N., Tonami S., Seto H., Kadota S. The effect of kampo formulae on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. II. Detailed study of berberine. *Biol. Pharm. Bull.*, 1999, 22, 391-396.
- [180] Yogesh H.S., Chandrashekar V.M., Katti H.R., Ganapaty S., Raghavendra H.L., Gowda G.K., Goplakrishna B. Anti-osteoporotic activity of aqueous-methanol extract of *Berberis aristata* in ovariectomized rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 134, 334-338.
- [181] Liu W., Wu C.F., Guo Y.Y., Yu Q.H. Anti-inflammatory activity of aqueous extract of the root of *Sambucus williamsii*. *Fitoterapia*, 1991, 62, 83-85.
- [182] Xiao H.H., Dai Y., Wan H.Y., Wong M.S., Yao X.S. Bone-protective effects of bioactive fractions and ingredients in *Sambucus williamsii* HANCE. *Br. J. Nutr.*, 2011, 106, 1802-1809.
- [183] Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine, "Chinese Bencao", *Shanghai Science and Technology Press*, 2000, 545-547.
- [184] Yang X.J., Wong M.S., Wang N.L., Chan S.C., Yao X.S. Studies of triterpenoids isolated from *Sambucus williamsii* Hance and their effects on UMR106 cell proliferation and alkaline phosphatase activity. *J. Shenyang Pharm. Univ.*, 2005, 22, 449-452, 457.
- [185] Yang X.J., Wong M.S., Wang N.L., Chan S.C., Yao X.S. Effect of phenolic acids isolated from *Sambucus williamsii* on proliferation and differentiation of rat osteoblastic UMR106 cells. *Chin. Trad. Herb. Drugs*, 2005, 36, 1604-1607.
- [186] Ouyang F., Liu Y., Li R., Li L., Wang N.L., Yao X.S. Five lignans and an iridoid from *Sambucus williamsii*. *Chin. J. Nat. Med.*, 2011, 9 (1), 26-29.
- [187] Yang X.J., Wong M.S., Wang N.L., Chan S.C., Yao X.S. Lignans from the stems of *Sambucus williamsii* and their effects on osteoblastic UMR106 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2007, 9, 583-591.
- [188] Xiao H.H., Dai Y., Wong M.S., Yao X.S. New lignans from the bioactive fraction of *Sambucus williamsii* Hance and proliferation activities on osteoblastic-like UMR106 cells. *Fitoterapia*, 2014, 94, 29-35.
- [189] Xie F., Wu C.F., Zhang Y., Yao X.S., Cheung P.Y., Chan A.S., Wong M.S. Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* HANCE in ovariectomized rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 28 (10), 1879-1885.
- [190] Zhang Y., Li Q., Wan H.Y., Xiao H.H., Lai W.P., Yao X.S., Wong M.S. Study of the mechanisms by which *Sambucus williamsii* HANCE extract exert protective effects against ovariectomy-induced osteoporosis *in vivo*. *Osteoporos. Int.*, 2011, 22, 703-709.

- [191] Li H., Li J., Prasain J.K., Tezuka Y., Namba T., Miyahara T., Tonami S., Seto H., Tada T., Kadota S. Antiosteoporotic activity of the stems of *Sambucus sieboldiana*. *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, 21 (6), 594-598.
- [192] Badescu L., Badulescu O., Badescu M., Ciocoiu M. Mechanism by *Sambucus nigra* Extract Improves Bone Mineral Density in Experimental Diabetes, Hindawi Publishing Corporation, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, Article ID 848269, 6 pages.
- [193] Akkol E.K., Güvenç A., Yesilada E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J. Ethnopharmacol.*, 2009, 125 (2), 330-336.
- [194] Dzharullaeva S.S. Phytochemical investigation of *Juniper rufescens* leaves and fruits. *Georgian Med. News*, 2009, 168, 107-111.
- [195] Pisarev D.I., Novikov O.O., Novikova M.Y., Zhilyakova E.T. Flavonoid composition of *Juniperus oblonga* Bieb. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, 150 (6), 714-717.
- [196] Uskun E., Akdogan M., Yildiz M., Sonmez Y. Bone mineral density and the relationship between lipid profile and bone mineral density in the rats administered *Juniperus communis* Linn. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2012, 34 (4), 802-806.
- [197] Miceli N., Trovato A., Marino A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Güvenç A., De Pasquale R., Taviano M.F. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, 49 (10), 2600-2608.
- [198] Moeina S., Moeinb M. Antioxidant Activities and Phenolic Content of *Juniperus excelsa* Extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 6 (2), 133-140.
- [199] Nuñez Y.O., Salabarría I.S., Collado I.G., Hernández-Galán R. Sesquiterpenes from the wood of *Juniperus lucayana*. *Phytochemistry*, 2007, 68 (19), 2409-2414.
- [200] Seca, A.M.L., Silva, A.M.S., Bazzocchi, I.L., Jimenez, I.A. Diterpene constituents of leaves from *Juniperus brevifolia*. *Phytochemistry*, 2008, 69 (2), 498-505.
- [201] Martin A. M., Queiroz E. F., Marston A., Hostettmann K. Labdane diterpenes from *Juniperus communis* L. berries. *Phytochem. Anal.*, 2006, 17 (1), 32-35.
- [202] Nakanishi T., Iida N., Inatomi Y., Murata H., Inada A., Murata J., Lang FA., Iinuma M., Tanaka T. Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*. *Phytochemistry*, 2004, 65 (2), 207-213.
- [203] Maatooq G.T., El-Sharkawy S.H., Afifi M.S., Rosazza J.P.N. Flavonoids from two Cupressaceae plants. *Nat. Prod. Sci.*, 1998, 4 (1), 9-14.

- [204] Rawat P., Khan M.F., Kumar M., Tamarkar A.K., Srivastava A.K., Arya K.R., Maurya R. Constituents from fruits of *Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia*, 2010, 81 (3), 162-166.
- [205] Ibrahim N.A., El-Seedi H.R., Mohammed M.M. Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves growing in Egypt. *Nat. Prod. Res.*, 2007, 21 (10), 857-866.
- [206] Xu J.F., Tan N.H. Studies on the chemical constituents from the branches and leaves of *Cupressus duolouxiana*. *Zhong Yao Cai.*, 2007, 30 (6), 669-671.
- [207] Lin Y., Li R.J., Li Y., McGarvey B.D., Wu H.F., Wang X.L. A new modified sesquiterpene glycoside from *Cupressus chengiana*. *Nat. Prod. Res.*, 2014, 28 (9), 611-615.
- [208] Khan M.F., Dev K., Lahiri S., Dixit M., Trivedi R., Singh D., Maurya R. Osteogenic activity of natural diterpenoids isolated from *Cupressus sempervirens* fruits in calvarial derived osteoblast cells via differentiation and mineralization. *Phytomedicine*, 2014, 21 (14), 1794-1800.
- [209] Siddiqui J.A., Swarnkar G., Sharan K., Chakravarti B., Sharma G., Rawat P., Kumar M., Khan F.M., Pierroz D., Maurya R., Chattopadhyay N. 8,8"- Biapigeninyl stimulates osteoblast functions and inhibits osteoclast and adipocyte functions: Osteoprotective action of 8,8"-biapigeninyl in ovariectomized mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010, 323 (2), 256-267.
- [210] Rahman A.U., Nasim S., Baig I., Ara Jahan I., Sener B., Orhan I., Choudhary M.I. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2002, 50 (8), 1100-1102.
- [211] Ali A.A., El-Emary N.A., El-Moghazi M.A., Darwish F.M., Frahm A.W. Three isoflavonoids from *Iris germanica*. *Phytochemistry*, 1983, 22 (9), 2061-2063.
- [212] Ito H., Miyake Y., Yoshida T. New piscicidal triterpenes from *Iris germanica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43 (7), 1260-1262.
- [213] Bonfils J.P., Sauvaire Y., Localization of iridals in *Iris germanica* rhizomes. *Phytochemistry*, 1996, 41 (5), 1281-1285.
- [214] Cui Y., Bhandary B., Marahatta A., Lee G.H., Li B., Kim D.S., Chae S.W., Kim H.R., Chae H.J. Characterization of *Salvia miltiorrhiza* ethanol extract as an anti-osteoporotic agent. *BMC Complement Altern. Med.*, 2011, 11, 120.
- [215] Kim H.K., Woo E.R., Lee H.W., Park H.R., Kim H.N., Jung Y.K., Choi J.Y., Chae S.W., Kim H.R., Chae H.J. The correlation of *Salvia miltiorrhiza* extract-induced regulation of osteoclastogenesis with the amount of components tanshinone I, tanshinone IIA, cryptotanshinone, and dihydrotanshinone. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2008, 30 (2), 347-364.

- [216] Chae H.J., Chae S.W., Yun D.H., Keum K.S., Yoo S.K., Kim H.R. Prevention of bone loss in ovariectomized rats: the effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2004, 26 (1), 135-144.
- [217] Cui L., Zou L.Y., Liu Y.Y., Ai C.M., Wu T., Wu Y. Preventing cancellous bone loss in steroid-treated rats and stimulating bone formation by water extract of *Salvia miltiorrhiza* and danshensu. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2004, 20 (3), 286-291.
- [218] Cui L., Li T., Liu Y., Zhou L., Li P., Xu B., Huang L., Chen Y., Liu Y., Tian X., Jee W.S., Wu T. Salvianolic acid B prevents bone loss in prednisone-treated rats through stimulation of osteogenesis and bone marrow angiogenesis. *PLoS One*, 2012, 7 (4), e34647.
- [219] Nicolin V., Dal Piaz F., Nori S.L., Narducci P., De Tommasi N. Inhibition of bone resorption by Tanshinone VI isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Eur. J. Histochem.*, 2010, 54 (2), e21.
- [220] Lee S.Y., Choi D.Y., Woo E.R. Inhibition of osteoclast differentiation by tanshinones from the root of *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Arch. Pharm. Res.*, 2005, 28 (8), 909-913.
- [221] Kwak H.B., Yang D., Ha H., Lee J.H., Kim H.N., Woo E.R., Lee S., Kim H.H., Lee Z.H. Tanshinone IIA inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. *Exp. Mol. Med.*, 2006, 38 (3), 256-264.
- [222] Kassi E., Papoutsis Z., Fokialakis N., Messari I., Mitakou S., Moutsatsou P. Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (23), 6956-6961.
- [223] 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. Protective effect of *Sideritis euboica* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause*, 2011, 18 (8), 915-922.
- [224] Arfan, M., Khan, G.A., Ahmad, N. Steroids and terpenoids of the genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 1996, 18 (2), 170-174.
- [225] Israili Z.H., Lyoussi B. Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2009, 22 (4), 425-462.
- [226] Pereira O.R., Cardoso S.M. Overview on mentha and thymus polyphenols. *Curr. Anal. Chem.*, 2013, 9 (3), 382-396.
- [227] Ono Y., Fukaya Y., Imai S., Yamakuni T. Beneficial effects of *Ajuga decumbens* on osteoporosis and arthritis. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 31 (6), 1199-1204.
- [228] 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. Effects of Chia-wei-hsiao-yao-san on bone loss in ovariectomized rats. *J. Food Drug Anal.*, 2005, 13, 232-238.

- [229] Mühlbauer R.C., Lozano A., Palacio S., Reinli A., Felix R. Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone*, 2003, 32 (4), 372-380.
- [230] Spichiger M., Brenneisen R., Felix R., Mühlbauer R.C. The inhibition of bone resorption in rats treated with (-)-menthol is due to its metabolites. *Planta Med.*, 2006, 72 (14), 1290-1295.
- [231] Bertrand M., Tillequin F., Bailleul F. Two major flavonoids from *Ballota nigra*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, 28 (10), 1031-1033.
- [232] Siciliano T., Bader A., Vassallo A., Braca A., Morelli I., Pizza C., Tommasi N. Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005, 33, 341-351.
- [233] Farooq U., Khan A., Khan A.F., Khan S.S., Sarwar R., Ahmad V.U., Waseem A. Two new ballonigrin-type diterpenoids from the roots of *Ballota limbata*. *Nat. Prod. Commun.*, 2012, 7 (2), 149-150.
- [234] Ahmad V.U., Farooq U., Abbaskhan A., Hussain J., Abbasi M.A., Nawaz S.A., Choudhary M.I. Four New Diterpenoids from *Ballota limbata*. *Helv. Chim. Acta*, 2004, 87 (3), 682-689.
- [235] Waheed I., Ahmad M., Syed N.H., Ashraf R. Investigation of Phytochemical and Antioxidant Properties of Methanol Extract and Fractions of *Ballota limbata* (Lamiaceae). *Indian J. Pharm. Sci.*, 2014, 76 (3), 251-256.
- [236] Yilmaza B.S., Özbek H., Çitoğlua G.S. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of *Ballota inaequidens*. *Pharm. Biol.*, 2006, 44 (8), 636-641.
- [237] Ozbek H., Citoğlu G.S., Dülger H., Uğraş S., Sever B. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Ballota glandulosissima*. *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 95 (2-3), 143-149.
- [238] Kanai S., Taniguchi N., Higashino H. Effect of kami-kihi-to (jia-wei-gui-pi-tang) for experimental osteopenia. *Am. J. Chin. Med.*, 2005, 33 (1), 41-48.
- [239] Jung Koo H., Sohn E.H., Kim Y.J., Jang S.A., Namkoong S., Chan Kang S. Effect of the combinatory mixture of *Rubus coreanus* Miquel and *Astragalus membranaceus* Bunge extracts on ovariectomy-induced osteoporosis in mice and anti-RANK signaling effect. *J. Ethnopharmacol.*, 2014, 151 (2), 951-959.
- [240] Ou L., Wei P.F., Miao Y.X., Effect of Radix Astragali combined with prepared Radix Rehmanniae root on osteoporosis in ovariectomized rats. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.*, 2013, 27 (3), 363-366.
- [241] Kang S.C., Kim H.J., Kim M.H. Effects of *Astragalus membranaceus* with supplemental calcium on bone mineral density and bone metabolism in calcium-deficient ovariectomized rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2013, 151 (1), 68-74.

- [242] Xie Q.F., Xie J.H., Dong T.T., Su J.Y., Cai D.K., Chen J.P., Liu L.F., Li Y.C., Lai X.P., Tsim K.W., Su Z.R. Effect of a derived herbal recipe from an ancient Chinese formula, Danggui Buxue Tang, on ovariectomized rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 144 (3), 567-575.
- [243] Yang L.P., Shen J.G., Xu W.C., Li J., Jiang J.Q. Secondary metabolites of the genus *Astragalus*: structure and biological-activity update. *Chem. Biodivers.*, 2013, 10 (6), 1004-1054.
- [244] Bian Q., Huang J.H., Liang Q.Q., Shu B., Hou W., Xu H., Zhao Y.J., Lu S., Shi Q., Wang Y.J. The osteogenic effect of astragaloside IV with centrifugating pressure on the OCT-1 cells. *Pharmazie*, 2011, 66 (1), 63-68.
- [245] Kong X.H., Niu Y.B., Song X.M., Zhao D.D., Wang J., Wu X.L., Zhang R., Mei Q.B. Astragaloside II induces osteogenic activities of osteoblasts through the bone morphogenetic protein-2/MAPK and Smad1/5/8 pathways. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, 29 (6), 1090-1098.
- [246] Zhang X., Zhao W., Wang Y., Lu J., Chen X. The Chemical Constituents and Bioactivities of *Psoralea corylifolia* Linn.: A Review. *Am. J. Chin. Med.*, 2016, 44 (1), 35-60.
- [247] Yang Z., Huang J.H., Liu S.F., Zhao Y.J., Shen Z.Y., Wang Y.J., Bian Q. The osteoprotective effect of psoralen in ovariectomy-induced osteoporotic rats via stimulating the osteoblastic differentiation from bone mesenchymal stem cells. *Menopause*, 2012, 19 (10), 1156-1164.
- [248] Zhai Y.K., Pan Y.L., Niu Y.B., Wu X.L., Mei Q.B. Comparative studies on the differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts by psoralen and isopsoralen *in vitro*. *Chin. Pharmacol. Bull.*, 2012, 28 (3), 355-361.
- [249] Don M.J., Lin L.C., Chiou W.F. Neobavaisoflavone stimulates osteogenesis via p38-mediated up-regulation of transcription factors and osteoid genes expression in MC3T3-E1 cells. *Phytomedicine*, 2012, 19 (6), 551-561.
- [250] Wang D., Li F., Jiang Z. Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia* extracts and two of its flavonoids. *Planta Med.*, 2001, 67 (8), 748-749.
- [251] Lim S.H., Ha T.Y., Kim S.R., Ahn J., Park H.J., Kim S. Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats. *Br. J. Nutr.*, 2009, 101 (7), 1031-1039.
- [252] Li W.D., Yan C.P., Wu Y., Weng Z.B., Yin F.Z., Yang G.M., Cai B.C., Chen Z.P. Osteoblasts proliferation and differentiation stimulating activities of the main components of Fructus *Psoraleae corylifoliae*. *Phytomedicine*, 2014, 21 (4), 400-405.
- [253] Cai Y.X., Zhang J.Y. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on bone metabolism in ovariectomized osteoporotic rats. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13 (2), 268-271.

- [254] Tsai M.H., Huang G.S., Hung Y.C., Bin L., Liao L.T., Lin L.W. *Psoralea corylifolia* extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats. *Am. J. Chin. Med.*, 2007, 35 (4), 669-680.
- [255] Chae H.J., Yun D.H., Chin H.Y., Yoo S.K., Kim H.M., Kim S.B., Kim H.R. Effect of dang-gui-ji-hwang-yeum on osteoporosis in ovariectomized rats. *Am. J. Chin. Med.*, 2004, 32 (3), 351-360.
- [256] Chen M., Feng W., Cao H., Zou L., Chen C., Baatrup A., Nielsen A.B., Li H., Kassem M., Zou X., Bünger C. A traditional Chinese medicine formula extracts stimulate proliferation and inhibit mineralization of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.*, 2009, 125 (1), 75-82.
- [257] Seo C.R., Byun J.S., An J.J., Lee J.H., Hong J.W., Jang S.H., Park K.W. Effects of *Glycyrrhiza inflata* batall extracts on adipocyte and osteoblast differentiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2013, 42 (7), 1015-1021.
- [258] Somjen D., Katzburg S., Vaya J., Kaye A.M., Hendel D., Posner G.H., Tamir S. Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004, 91, 241-246.
- [259] Choi E.M., The licorice root derived isoflavan glabridin increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 70 (3), 363-368.
- [260] Choi E.M., Liquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* stimulates osteoblast function in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, 12 (1), 139-143.
- [261] Suh K.S., Rhee S.Y., Kim Y.S., Choi E.M. Protective effect of liquiritigenin against methylglyoxal cytotoxicity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Food Funct.*, 2014, 5 (7), 1432-1440.
- [262] Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Zych M., Ozimina-Kaminska E., Taranowicz J., Siwek A. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2013, Article ID 457052, 10 pages.
- [263] Aisyah S., Vincken J.P., Andini S., Mardiah Z., Gruppen H. Compositional changes in (iso)flavonoids and estrogenic activity of three edible *Lupinus* species by germination and *Rhizopus*-elicitation. *Phytochemistry*, 2016, 122, 65.
- [264] Pinto B., Bertoli A., Noccioli C., Garritano S., Reali D., Pistelli L. Estradiol-antagonistic Activity of Phenolic Compounds from Leguminous Plants. *Phytother. Res.*, 2008, 22, 362-366.
- [265] Garritano S., Pinto B., Giachi I., Pistelli L., Reali D. Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test. *Phytomedicine*, 2005, 12, 143-147.
- [266] Millán-Linares M.D.C., Yust M.D.M., Alcaide-Hidalgo J.M., Millán F., Pedroche J. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem.*, 2014, 151, 141-147.

- [267] Millán-Linares M.D.C., Millán F., Pedroche J., Yust M.D.M. GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *J. Funct. Foods*, 2015, 18, 358-367.
- [268] Kiss B., Popa D.S., Paltinean R., Loghin F. A high-throughput UPLC-MS/MS for the simultaneous analysis of six phytoestrogens from *Genista tinctoria* extracts. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2012, 35 (19), 2735-2752.
- [269] Sugimoto E., Yamaguchi M. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2000, 5 (5), 515-520.
- [270] Sugimoto E., Yamaguchi M. Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 59 (5), 471-475.
- [271] Custódio L., Fernandes E., Romano A. Quantification of polyphenols in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) fruits and leaves in portuguese cultivars. *Acta Hort.*, 2009, 841, 503-506.
- [272] Gohar A., Gedara S.R., Baraka H.N. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. *J. Med. Plants Res.*, 2009, 3 (5), 424-428.
- [273] Fadel F., Fattouch S., Tahrouch S., Lahmar R., Benddou A., Hatimi A. The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds. *J. Mater. Environ. Sci.*, 2011, 2 (3), 285-292.
- [274] Gampe N., Darcsi A., Lohner S., Béni S., Kursinszki L. Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of *Spiny restharrow* (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *J. Pharma Biomed. Analysis*, 2016, 123, 74-81.
- [275] Benedec D., Vlase L., Oniga I., Toiu A., Tamas M., Tiperciuc B. Isoflavonoids from *Glycyrrhiza* sp. and *Ononis spinosa*. *Farmacia*, 2012, 60 (5), 615-620.
- [276] Mhamdi, B., Abbassi, F., Abdelly C. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal *Ononis natrix* growing wild in Tunisia. *Nat. Pro. Res.*, 2015, 29 (12), 1157-1160.
- [277] Yang J., Wang L.L., Zhou X.T., Yuan J.Z., Zhang T.J., Liu F. Chemical constituents from *Melilotus officinalis*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45 (5), 622-625.
- [278] Khodakov G.V. Triterpene and steroidal glycosides from the genus *Melilotus* and their genins. V. Melilotosides A1, B1, and C1 from *Melilotus officinalis* roots. *Chem. Nat. Compd.*, 2010, 46 (4), 572-575.
- [279] Choi E.M. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, 49 (8), 1800-1805.
- [280] Ding S.Q., Yang F.Q., Zhang W., Ma X.Q. Anti-osteoporotic activity of kaempferol in ovariectomized rats. *Chinese Journal of New Drugs*, 2014, 23 (24), 2925-2929, 2932.

- [281] Pleșca-Manea L., Pârvu A.E., Pârvu M., Taămaș M., Buia R., Puia M. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytother. Res.*, 2002, 16 (4), 316-319.
- [282] Sashidhara K.V., Kumar M., Khedgikar V., Kushwaha P., Modukuri R.K., Kumar A., Gautam J., Singh D., Sridhar B., Trivedi R. Discovery of coumarin-dihydropyridine hybrids as bone anabolic agents. *J. Med. Chem.*, 2013, 56 (1), 109-122.
- [283] Zhang Q., Qin L., He W., Van Puyvelde L., Maes D., Adams A., Zheng H., De Kimpe N. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med.*, 2007, 73 (1), 13-19.
- [284] Ranabahu, P., Harborne, J.B. The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparison of flavonoid patterns within the tribe viciaeae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1993, 21 (6-7), 715-722.
- [285] Gamal-Eldeen A.M., Kawashty S.A., Ibrahim L.F., Shabana M.M., El-Negoumy S.I. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive properties of aerial parts of *Vicia sativa* and its flavonoids. *Journal of Natural Remedies*, 2004, 4 (1), 81-96.
- [286] Jin A., Ozga J.A., Lopes-Lutz D., Schieber A., Reinecke D.M. Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. *Food Res. Int.*, 2012, 46 (2), 528-535.
- [287] Khan NA. Two antifungal active triterpenoid saponins from the seeds of *Lathyrus* plants. *Nat. Prod. Res.*, 2011, 25 (18), 1687-1694.
- [288] Amarowicz R., Yoshiki Y., Okubo K. Two new saponins from faba bean (*Vicia faba* L.). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C. J. Biosci.*, 1998, 53 (9-10), 918-920.
- [289] Lee S.H., Jin N., Paik D.J., Kim D.Y., Chung I.M., Park Y. Consumption of legumes improves certain bone markers in ovariectomized rats. *Nutr. Res.*, 2011, 31 (5), 397-403.
- [290] Marotti M., Piccaglia R. Characterization of flavonoids in different cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *J. Food Sci.*, 2002, 67, 1229-1232.
- [291] Tedesco I., Carbone V., Spagnuolo C., Minasi P., Russo G.L. Identification and Quantification of Flavonoids from Two Southern Italian Cultivars of *Allium cepa* L., Tropea (Red Onion) and Montoro (Copper Onion), and Their Capacity to Protect Human Erythrocytes from Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63 (21), 5229-5238.
- [292] Pontin M., Bottini R., Burba J.L., Piccoli P. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. *Phytochemistry*, 2015, 115, 152-160.
- [293] Ameh G.I., Eze S.C., Omeje F.U. Phytochemical screening and antimicrobial studies on the methanolic bulb extract of *Allium sativum* L. *Afr. J. Biotechnol.*, 2013, 12 (14), 1665-1668.

- [294] El-Shenawy S.M.A., Yassin N.A.Z., Badary O.A., EL-Moneem M.A., AL-Shafeiy H.M. Study of the effect of *Allium porrum* on osteoporosis induced in rats. *Der Pharmacia Lettre*, 2013, 5 (1), 188-198.
- [295] Oliveira T., Figueiredo C.A., Brito C., Stavroullakis A., Ferreira A.C., Nogueira-Filho G., Prakki A. *Allium cepa* L. and Quercetin Inhibit RANKL/Porphyromonas gingivalis LPS-Induced Osteoclastogenesis by Downregulating NF- κ B Signaling Pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015, Article ID 704781, 11 pages.
- [296] Rassi C.M., Lieberherr M., Chaumaz G., Pointillart A., Courot G. Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin. *Cell Tissue Res.*, 2005, 319, 383-393.
- [297] Tsuji M., Yamamoto H., Sato T., Mizuha Y., Kawai Y., Taketani Y., Kato S., Terao J., Inakuma T., Takeda E. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.*, 2009, 27 (6), 673-681.
- [298] Horcajada-Molteni M.N., Crespy V., Coxam V., Davicco M.J., Rémésy C., Barlet P. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, 15, 2251-2258.
- [299] Mukherjee M., Das A.S., Mitra S., Mitra C. Prevention of bone loss by oil extract of garlic (*Allium sativum* Linn.) in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Phytother. Res.*, 2004, 18 (5), 389-394.
- [300] Mukherjee M., Das A.S., Das D., Mukherjee S., Mitra S., Mitra C. 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.*, 2006, 20 (5), 408-415.
- [301] Wetli H.A., Brenneisen R., Tschudi I., Langos M., Bigler P., Sprang T., Schürch S., Mühlbauer R.C. A gamma-glutamyl peptide isolated from onion (*Allium cepa* L.) by bioassay-guided fractionation inhibits resorption activity of osteoclasts. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (9), 3408-3414.
- [302] Yang Y., Wang H.Q., Chen R.Y. Flavonoids from the leaves of *Morus alba* L. *Yao Xue Xue Bao*, 2010, 45 (1), 77-81.
- [303] Dat N.T., Binh P.T., Quynh le T.P., Van Minh C., Huong H.T., Lee J.J. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. *Fitoterapia*, 2010, 81 (8), 1224-1227.
- [304] Ali A., Ali M. New triterpenoids from *Morus alba* L. stem bark. *Nat. Prod. Res.*, 2013, 27 (6), 524-531.
- [305] Chang L.W., Juang L.J., Wang B.S., Wang M.Y., Tai H.M., Hung W.J., Chen Y.J., Huang M.H. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, 49 (4), 785-790.

- [306] Chung K.O., Kim B.Y., Lee M.H., Kim Y.R., Chung H.Y., Park J.H., Moon J.O. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003, 55 (12), 1695-1700.
- [307] Phung T.X., Tran T.H., Dan T.T., Chau V.M., Hoang T.H., Nguyen T.D. Chalcone-derived Diels-Alder adducts as NF- κ B inhibitors from *Morus alba*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2012, 14 (6), 596-600.
- [308] Jiang M.M., Gao H., Dai Y., Zhang X., Wang N.L., Yao X.S. Phenylpropanoid and lignan derivatives from *Antiaris toxicaria* and their effects on proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Planta Med.*, 2009, 75 (4), 340-345.
- [309] Sungkamane S., Wattanathorn J., Muchimapura S., Thukham-mee W. Antiosteoporotic Effect of Combined Extract of *Morus alba* and *Polygonum odoratum*. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, Article ID 579305, 9 pages.
- [310] Patel J.P., Gami B., Patel K. Solanki R. Antibacterial activity of methanolic and acetone extract of some medicinal plants used in indian folklore. *Int. J. Phytomed.*, 2011, 3, 261-269.
- [311] Yousuf S., Bachheti R.K., Joshi A., Mathur A. Evaluation of antioxidant potential and phytochemicals of *Morina longifolia*. *Int. J. Pharm. Pharm Sci.*, 2014, 6 (6), 208-212.
- [312] Teng R.W., Zheng Q.A., Wang D.Z., Yang C.R. Two new triterpenoid saponins from *Morina nepalensis* var. *alba*. *Acta Bot. Sinica*, 2003, 45 (1), 122-126.
- [313] Zhu Y., Lü Z.P., Xue C.B., Wu W.S. New Triterpenoid Saponins and Neolignans from *Morina kokonorica*. *Helv. Chim. Acta*, 2009, 92 (3), 536-545.
- [314] Zhang Z.F., Lu L.Y., Luo P., Qing L.S., Liu Y. Two new ursolic acid saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand-Mazz. *Nat. Prod. Res.*, 2013, 27 (24), 2256-2262.
- [315] Su B.N., Takaishi Y., Kusumi, T. Morinols A-L, twelve novel sesquiterpeneolignans and neolignans with a new carbon skeleton from *Morina chinensis*. *Tetrahedron*, 1999, 55 (51), 14571-14586.
- [316] Teng R., Xie H., Li H.Z., Liu X., Wang D., Yang C. Two new acylated flavonoid glycosides from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand-Mazz. *Magn. Reson. Chem.*, 2002, 40 (6), 415-420.
- [317] Li B., Shen Y.H., He Y.R., Zhang W.D. Chemical Constituents and Biological Activities of *Pinus* Species. *Chem. Biodivers.*, 2013, 10, 2133-2160.
- [318] Yang X.W., Li S.M., Shen Y.H., Zhang W.D. Phytochemical and Biological Studies of *Abies* Species. *Chem. Biodivers.*, 2008, 5, 56-81.
- [319] Yang X.W., Zeng H.W., Liu X.H., Li S.M., Xu W., Shen Y.H., Zhang C., Zhang W.D. Anti-inflammatory and anti-tumour effects of *Abies georgei* extracts. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2008, 60 (7), 937-941.

- [320] Tumen I., Akkol E.K., Süntar I., Keleş H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 137 (3), 1215-1220.
- [321] Li Y.Y., Feng J., Zhang X.L., Cui Y.Y. Pine bark extracts: nutraceutical, pharmacological, and toxicological evaluation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2015, 353 (1), 9-16.
- [322] Sharma A., Goyal R., Chauhan S., Bhattacharya S. Potential Role of *PinusRoxburghii* and *BombaxCeiba* in Bone Remodelling in Surgical Ovariectomy induced Osteoporosis in Rats. *Indian J. Pharmacol.*, 2014, 46, S37-S37.
- [323] Mei L., Mochizuki M., Hasegawa N. Protective effect of Pycnogenol® on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Phytother. Res.*, 2012, 26 (1), 153-155.
- [324] Huang G., Wu J., Wang S., Wei Y., Chen F., Chen J., Shi J., Xia J. Pycnogenol(®) treatment inhibits bone mineral density loss and trabecular deterioration in ovariectomized rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, 8 (7), 10893-10901.
- [325] Samuelsen A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J. Ethnopharmacol.*, 2000, 71 (1-2), 1-21.
- [326] Grubešič R.J., Vladimir-Knežević S. Biologically active compounds of *Plantago* species. *Farmaceutski Glasnik*, 2004, 60 (3), 79-89.
- [327] Ştef D.S., Gergen I., Ştef L., Hărmănescu M., Pop C., Drugă M., Bujancă G., PopaM. Determination of the Macro Elements Content of Some Medicinal Herbs. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2010, 43 (1), 122-126.
- [328] Doyle B.J., Frasor J., Bellows L.E., Locklear T.D., Perez A., Gomez-Laurito J., Mahady G.B. Estrogenic effects of herbal medicines from Costa Rica used for the management of menopausal symptoms. *Menopause*, 2009, 16 (4), 748-755.
- [329] Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, 1998, 61 (10), 1212-1215.
- [330] Tantry M.A., Akbar S., Dar J.A., Irtiza S., Galal A., Khuroo M.A., Ghazanfar K. Acylated flavonol glycoside from *Platanus orientalis*. *Fitoterapia*. 2012, 83 (2), 281-285.
- [331] Lin X., Liu J., Qin M., Yang C. Chemical constituents from the bark of *Platanus acerifolia* Wild. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2013, 44 (3), 210-212.
- [332] El-Alfy T.S., El-Gohary H.M.A., Sokkar N.M., Sleem A.A., Al-Mahdy D.A. Phenolic constituents of *Platanus orientalis* L. leaves. *Nat. Prod. Commun.*, 2008, 3 (2), 199-203.

- [333] Mitrokotsa D., Mitaku S., Demetzos C., Harvala C., Mentis A., Perez S., Kokkinopoulos D. Bioactive compounds from the buds of *Platanus orientalis* and isolation of a new kaempferol glycoside. *Planta Med.*, 1993, 59 (6), 517-520.
- [334] Kaouadji M., Morand J.M., Garcia J. Further Acylated Kaempferol Rhamnosides from *Platanus acerifolia* Buds. *J. Nat. Prod.*, 1993, 56 (9), 1618-1621.
- [335] Mazaki T., Kitajima T., Shiozaki Y., Sato M., Mino M., Yoshida A., Nakamura M., Yoshida Y., Tanaka M., Ozaki T., Matsukawa A., Ito Y. *In vitro* and *in vivo* enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells. *J. Funct. Foods*, 2014, 6, 241-247.
- [336] Trivedi R., Kumar S., Kumar A., Siddiqui J.A., Swarnkar G., Gupta V., Kendurker A., Dwivedi A.K., Romero J.R., Chattopadhyay N. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2008, 289, 85-93.
- [337] Zhang J.K., Yang L., Meng G.L., Fan J., Chen J.Z., He Q.Z., Chen S., Fan J.Z., Luo Z.J., Liu J. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, 689 (1-3), 31-37.
- [338] Do Y.J., Ku S.K., Kim H.T., Oh T.H., Cho Y.M., Kim S.W., Ryu I.S., Lee K.W. Antiosteoporotic effects of *Polygoni multiflori* radix (PMR) in ovariectomized (OVX)-induced osteoporosis ddY mice. *J. Vet. Clin.*, 2011, 28 (4), 375-386.
- [339] Liu Z.P., Li W.X., Yu B., Huang J., Sun J., Huo J.S., Liu C.X. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J. Med. Food.*, 2005, 8 (1) 14-19.
- [340] Sharaf A., Nigm S. The oestrogenic activity of pomegranate seed oil. *J. Endocrinol.*, 1964, 29, 91-92.
- [341] Kim N.D., Mehta B., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B., Lansky E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002, 71, 203-217.
- [342] Mori-Okamoto J., Otawara-Hamamoto Y., Yamato H., Yoshimura H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 92 (1), 93-101.
- [343] Satpathy S., Patra A., Purohit A.P. Estrogenic activity of *Punica granatum* l. peel extract. *Asian Pac. J. Reprod.*, 2013, 2 (1), 19-24.
- [344] Spilmont M., Léotoing L., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Miot-Noirault E., Pilet P., Rios L., Wittrant Y., Coxam V. Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *J. Nutr. Biochem.*, 2013, 24 (11), 1840-1848.

- [345] Spilmont M., Léotoing J., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Miot-Noirault E., Pilet P., Rios L., Wittrant Y., Coxam V. Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *Eur. J. Nutr.*, 2014, 53 (5), 1155-1164.
- [346] Prasad D., Pant G., Rawat M.S., Nagatsu A. Constituents of *Rhamnus virgatus* (Rhamnaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, 28 (10), 1027-1030.
- [347] Tebrencu C.E., Crețu R.M., Mitroi, G.R., Iacob E., Ionescu, E. Phytochemical evaluation and HPTLC investigation of bark and extracts of *Rhamnus frangula* Linn. *Phytochem. Rev.*, 2015, 14, 613-621.
- [348] Cuoco G., Mathe C., Vieillescazes C. Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. *Microchem. J.*, 2014, 115, 130-137.
- [349] Lee S-U, Shin H-K, Min Y-K, Kim S-H. Emodin accelerates osteoblast differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase activation and bone morphogenetic protein-2 gene expression. *Int. Immunopharmacol.*, 2008, 8 (5), 741-747.
- [350] Cha P.H., Shin W., Zahoor M., Kim H.Y., Min do S., Choi K.Y. *Hovenia dulcis* Thunb extract and its ingredient methyl vanillate activate Wnt/ β -catenin pathway and increase bone mass in growing or ovariectomized mice. *PLoS One*, 2014, 9 (1), e85546.
- [351] Hwang Y-H, Kim K-J, Kim J-J, Kang K-Y, Lee S-J, Jeong G-Y, Choi K-H, Son Y-J, Yee S-T. Antiosteoporosis Activity of New Oriental Medicine Preparation (Kyungokgo Mixed with Water Extract of *Hovenia dulcis*) on the Ovariectomized Mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015, Article ID 373145, 17 pages
- [352] Poonam V., Raunak, Kumar G., Reddy L. C.S., Jain R., Sharma S.K., Prasad A.K., Parmar V.S. Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18 (25), 3758-3824.
- [353] Kono R., Okuno Y., Inada K., Tokuda A., Hashizume H., Yoshida M., Nakamura M., Utsunomiya H. A *Prunus mume* extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75 (10), 1907-1911.
- [354] Yan X.T., Lee S.H., Li W., Sun Y.N., Yang S.Y., Jang H.D., Kim Y.H. Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. *Food Chem.*, 2014, 156, 408-415.
- [355] Yan X.T., Li W., Sun Y.N., Yang S.Y., Lee S.H., Chen J.B., Jang H.D., Kim Y.H. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24 (5), 1397-1402.
- [356] Yan X.T., Lee S.H., Li W., Jang H.D., Kim Y.H. Terpenes and sterols from the fruits of *Prunus mume* and their inhibitory effects on osteoclast differentiation by suppressing tartrate-resistant acid phosphatase activity. *Arch. Pharm. Res.*, 2015, 38 (2), 186-192.

- [357] Bu S.Y., Lerner M., Stoecker B.J., Boldrin E., Brackett D.J., Lucas E.A., Smith B.J. Dried plum polyphenols inhibit osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 and inflammatory mediators. *Calcif. Tissue Int.*, 2008, 82, 475-488.
- [358] Smith B.J., Bu S.Y., Wang Y., Rendina E., Lim Y.F., Marlow D., Clarke S.L., Cullen D.M., Lucas E.A. A comparative study of the bone metabolic response to dried plum supplementation and PTH treatment in adult, osteopenic ovariectomized rat. *Bone*, 2014, 58, 151-159.
- [359] Bu S.Y., Hunt T.S., Smith B.J. Dried plum polyphenols attenuate the detrimental effects of TNF-alpha on osteoblast function coincident with up-regulation of Runx2, Osterix and IGF-I. *J. Nutr. Biochem.*, 2009, 20 (1), 35-44.
- [360] Bu S.Y., Lucas E.A., Franklin M., Marlow D., Brackett D.J., Boldrin E.A., Devareddy L., Arjmandi B.H., Smith B.J. Comparison of dried plum supplementation and intermittent PTH in restoring bone in osteopenic orchidectomized rats. *Osteoporosis Int.*, 2007, 18, 931-942.
- [361] Rendina E., Hembree K.D., Davis M.R., Marlow D., Clarke S.L., Halloran B.P., Lucas E.A., Smith B.J. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. *PLoS One*, 2013, 8 (3), 60569.
- [362] Deyhim F., Stoecker B.J., Bruswitz G.H., Devareddy L., Arjmandi B.H. Dried plum reverses bone loss in an osteopenic rat model of osteoporosis. *Menopause*, 2005, 12 (6), 755-762.
- [36] Arjmandi B.H., Khalil D.A., Lucas E.A., Georgis A., Stoecker B.J., Hardin C., Payton M.E., Wild R.A. Dried plums improve indices of bone formation in postmenopausal women. *J. Womens Health Gend. Based Med.*, 2002, 11 (1), 61-68.
- [364] Hooshmand S., Chai S.C., Saadat R.L., Payton M.E., Brummel-Smith K., Arjmandi B.H. Comparative effects of dried plum and dried apple on bone in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.*, 2011, 106 (6), 923-930.
- [365] Hooshmand S., Brisco J.R., Arjmandi B.H. The effect of dried plum on serum levels of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin and sclerostin in osteopenic postmenopausal women: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.*, 2014, 112 (1), 55-60.
- [366] Akgul Y.Y., Anil H. Benzofurans and another constituent from seeds of *Styrax officinalis*. *Phytochemistry*, 2003, 63 (8), 939-943.
- [367] Pazar E., Akgül Y. Chemical composition of the endocarps of fruits of *Styrax officinalis* L. *Nat. Prod. Res.*, 2015, 29 (15), 1466-1468.
- [368] Yayla Y., Alankuş-Calışkan O., Anil H., Bates R.B., Stessman C.C., Kane V.V. Saponins from *Styrax officinalis*. *Fitoterapia*, 2002, 73 (4), 320-326.

- [369] Papoutsi Z., Kassi E., Papaevangelidou D., Pratsinis H., Zoumpourlis V., Halabalaki M., Mitakou S., Kalofoutis A., Moutsatsou P. Plant 2-arylobenzofurans demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile. *Steroids*, 2004, 69 (11-12), 727-734.
- [370] Lu D., Yang L., Li Q., Gao X., Wang F., Zhang G. Egonol gentiobioside and egonol gentiotrioside from *Styrax perkinsiae* promote the biosynthesis of estrogen by aromatase. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, 691 (1-3), 275-282.
- [371] Guo H.F., Shao H.Y., Yang Z.Y., Xue S.T., Li X., Liu Z.Y., He X.B., Jiang J.D., Zhang Y.Q., Si S.Y., Li Z.R. Substituted benzothiophene or benzofuran derivatives as a novel class of bone morphogenetic protein-2 up-regulators: synthesis, structure-activity relationships, and preventive bone loss efficacies in senescence accelerated mice (SAMP6) and ovariectomized rats. *J. Med. Chem.*, 2010, 53 (4), 1819-1829.
- [372] Mantle D., Lennard T.W., Pickering A.T. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.*, 2000, 19 (3), 223-240.
- [373] Li Y., Qin F., Wang S.M., Guo R.X., Zhang Y.F., Gu Y.C., Shi Q.W. Chemical Studies on *Taxus Canadensis*. *Chem. Biodivers.*, 2013, 10, 1729-1753.
- [374] Zhang J., Chen J., Liang Z., Zhao C. New Lignans and Their Biological Activities. *Chem. Biodivers.*, 2014, 11, 1-54.
- [375] Yin J., Tezuka Y., Subehan, S.L., Nobukawa M., Nobukawa T., Kadota S. *In vivo* anti-osteoporotic activity of isotaxiresinol, a lignan from wood of *Taxus yunnanensis*. *Phytomedicine*, 2006, 13 (1-2), 37-42.
- [376] Li X., Takahashi M., Kushida K., Inoue T. The less potent estrogenic effect of tamoxifen on bone in ovariectomized rats with established osteopenia. *Calcif. Tissue Int.*, 1998, 62 (6), 502-505.
- [377] Han J.L., Wang Y.M., Liu J. Effects of tamoxifen on biomechanical properties of bone in ovariectomized rats. *Aging Health*, 2002, 7 (1), 13-14.
- [378] Ashour M.L., Wink M. Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2011, 63 (3), 305-321.
- [379] Sassa S., Sakamoto S., Zhou Y.F., Mori T., Kikuchi T., Shinoda H. Preventive effects of a Chinese herbal medicine, hochu-ekki-to, on bone loss in ovariectomized rats. *In Vivo*, 2001, 15 (1), 25-28.
- [380] Sun Y., Cai T.T., Zhou X.B., Xu Q. Saikosaponin a inhibits the proliferation and activation of T cells through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Int. Immunopharmacol.*, 2009, 9 (7-8), 978-983.

- [381] Lu C.N., Yuan Z.G., Zhang X.L., Yan R., Zhao Y.Q., Liao M., Chen J.X. Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF- κ B signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, 14 (1), 121-126.
- [382] Shin J.E., Kim H.J., Kim K.R., Lee S.K., Park J., Kim H., Park K.K., Chung W.Y. Type I saikosaponins a and d inhibit osteoclastogenesis in bone marrow-derived macrophages and osteolytic activity of metastatic breast cancer cells. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2015, 582437.
- [383] Zhou C., Liu W., He W., Wang H., Chen Q., Song H. Saikosaponin a inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B and MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.*, 2015, 25 (1), 49-54.
- [384] Chhabra G.S., Kulkarni K.S. *Vitex agnus castus* -An overview. *J. Nat. Remedies*, 2011, 11, 90-97.
- [385] Kumar M., Rawat P., Dixit P., Mishra D., Gautam A.K., Pandey R., Singh D., Chattopadhyay N., Maurya R. Anti-osteoporotic constituents from Indian medicinal plants. *Phytomedicine*, 2010, 17 (13), 993-999.
- [386] Pantelić J., Filipović B., Šošić-Jurjević B., Ajdžanović V., Trifunović S., Medigović I., Milošević V. *Vitex agnus-castus* essential oil affects thyroid C cells and bone metabolism in middle-aged male rats. *Acta Veterinaria*, 2013, 63 (1), 23-35.
- [387] Sehmisch S., Boeckhoff J., Wille J., Seidlova-Wuttke D., Rack T., Tezval M., Wuttke W., Stuermer K.M., Stuermer E.K. *Vitex agnus castus* as prophylaxis for osteopenia after orchidectomy in rats compared with estradiol and testosterone supplementation. *Phytother. Res.*, 2009, 23 (6), 851-858.
- [388] Langner E., Greifenberg S., Gruenwald J. Ginger: history and use. *Adv. Ther.*, 1998, 15 (1), 25-44.
- [389] Setty A.R., Sigal L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2005, 34 (6), 773-784.
- [390] Im N.K., Kim H.J., Kim M.J., Lee, E.J., Kim H.I., Lee I.S. Effects of medicinal herb extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 2010, 42, 637-642.
- [391] Habold C., Momken I., Ouadi A., Bekaert V., Brasse D. Effect of prior treatment with resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. *J. Bone Miner. Metab.*, 2011, 29, 15-22.
- [392] Gehm B.D., McAndrews J.M., Chien P.Y., Jameson J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 25, 14138-14143.
- [393] Bowers J.L., Tyulmenkov V.V., Jernigan S.C., Klinge C.M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 2000, 141, 3657-3667.
- [394] Lee Y.S., Kim Y.S., Lee S.Y., Kim G.H., Kim B.J., Lee S.H., Lee K.U., Kim G.S., Kim S.W., Koh J.M. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone*, 2010, 47, 926-937.

- [395] He X., Andersson G., Lindgren U., Li Y. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 22, 356-362.
- [396] Shakibaei M., Buhrmann C., Mobasheri A. Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 11492-11505.
- [397] Boissy P., Andersen T.L., Abdallah B.M., Kassem M., Plesner T., Delaissé J.M. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res.*, 2005, 65, 9943-9952.
- [398] Chang J.K., Hsu Y.L., Teng I.C., Kuo P.L. Piceatannol stimulates osteoblast differentiation that may be mediated by increased bone morphogenetic protein-2 production. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 551, 1-9.
- [399] Mizutani K., Ikeda K., Kawai Y., Yamori Y. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2000, 46, 78-83.
- [400] Zhang T.J., Zhang W., Bian L.G., Liu S. C., Yan J., Zong Y., Gui L., Lu D. Protective effects and mechanisms of resveratrol on the rats suffering with osteoporosis. *Acta Anatomica Sinica*, 2012, 43 (5), 679-684.
- [401] Huang Y.L., Liu Y.W., Huang Y.J., Chiou W.F. A Special Ingredient (VtR) Containing Oligostilbenes Isolated from *Vitis thunbergii* Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice: *In Vitro* and *In Vivo* Study. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2013, 409421.
- [402] Alexi X., Kasiotis K.M., Fokialakis N., Lambrinidis G., Meligova A.K., Mikros E., Haroutounian S.A., Alexis M.N. 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.*, 2009, 117 (4-5), 159-167.
- [403] Fokialakis N., Lambrinidis G., Mitsiou D.J., Aligiannis N., Mitakou S., Skaltsounis A.L., Pratsinis H., Mikros E., Alexis M.N. A new class of phytoestrogens: evaluation of the estrogenic activity of deoxybenzoins. *Chem. Biol.*, 2004, 11 (3), 397-406.
- [404] Lazennec G., Bresson D., Lucas A., Chauveau C., Vignon, F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, 2001, 142, 4120-30.
- [405] Hawse J.R., Subramaniam M., Monroe D.G., Hemmingsen A.H., Ingle J.N., Khosla S., Oursler M.J., Spelsberg T.C. 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.*, 2008, 22 (7), 1579-1595.

- [406] Spelsberg T.C., Subramaniam M., Riggs B.L., Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol. Endocrinol.*, 1999, 13 (6), 819-828.
- [407] 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. Effects of CP-336,156, a new, nonsteroidal estrogen agonist/antagonist, on bone, serum cholesterol, uterus and body composition in rat models. *Endocrinology*, 1998, 139 (4), 2068-2076.
- [408] Kanno S., Hirano S., Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology*, 2004, 196 (1-2), 137-145.
- [409] Garcia Palacios V., Robinson L.J., Borysenko C.W., Lehmann T., Kalla S.E., Blair H.C. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. *J. Bio. Chem.*, 2005, 280, 13720-13727.
- [410] Kim M.H., Ryu S.Y., Choi J.S., Min Y.K., Kim S.H. Sauro lactam inhibits osteoclast differentiation and stimulates apoptosis of mature osteoclasts. *J. Cell Physiol.*, 2009, 221, 618-628.
- [411] Morita N., Arisawa M., Kondo Y., Takemoto T. Studies on Constituents of Iris Genus Plants. III. The Constituents of *Iris florentina* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 1973, 21 (3), 600-603.
- [412] Arisawa M., Morita N., Kondo Y., Takemoto T. Studies on Constituents of *Iris* Genus Plants. IV. The Constituents of *Iris florentina* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 1973, 21(10), 2323-2328.
- [413] Shaw S.C., Srivastava B.K. Jha U. Syntheses of 5,3',4',5'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone and 5,3',4'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone isolated from *Iris germanica* rhizomes. *J. Indian Chem. Soc.*, 1990, 67 (2), 144-147.
- [414] Agarwal W. K., Thappa R. K., Agarwal S. G., Mehra M. S., Dhar, K. L. Isoflavones of two *Iris* species. *Phytochemistry*, 1984, 23 (11), 2703 – 2704.
- [415] El-Emary, N. A., Kobayashi Y., Ogihara Y. Two Isoflavonoids from the fresh bulbs of *Iris tingitana*. *Phytochemistry*, 1980, 19, 1878-1879.
- [416] Purev O., Purevsuren C., Narantuya S., Lkhagvasuren S., Mizukami H., Nagatsu A. New isoflavones and flavanol from *Iris potaninii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2002, 50 (10), 1367-1369.
- [417] Ito H., Onoue S., Yoshida T. Isoflavonoids from *Belamcanda chinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, 49 (9), 1229-1231.
- [418] Kang S.W., Kim M.C., Kim C.Y., Jung S.H., Um B.H. The rapid identification of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* by LC-NMR and LC-MS. *Chem. Pharm. Bull.*, 2008, 56 (10), 1452-1454.

- [419] Ahn K.S., Noh E.J., Cha K.H., Kim Y.S., Lim S.S., Shin K.H., Jung S.H. Inhibitory effects of Iridogenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E(2) production in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Life Sci.*, 2006, 78 (20), 2336-2342.
- [420] Zhu J.T., Choi R.C., Chu G.K., Cheung A.W., Gao Q.T., Li J., Jiang Z.Y., Dong T.T., Tsim K.W. Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: a comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing beta-amyloid-induced cell death. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (6), 2438-2445.
- [421] Monthakantirat O., De-Eknamkul W., Umehara K., Yoshinaga Y., Miyase T., Warashina T., Noguchi H. Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *Belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *J. Nat. Prod.*, 2005, 68 (3), 361-364.
- [422] Jung S.H., Lee Y.S., Lee S., Lim S.S., Kim Y.S., Shin K.H. Isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues. *Arch. Pharm. Res.*, 2002, 25 (3), 306-312.
- [423] Lee J.W., Lee C., Jin Q., Lee M.S., Kim Y., Hong J.T., Lee M.K., Hwang B.Y. Chemical constituents from *Belamcanda chinensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Arch. Pharm. Res.*, 2015, 38 (6), 991-997.
- [424] Hacibekiroglu I., Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase constituents from petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytother. Res.*, 2011, 25 (4), 522-529
- [425] Shawl A.S., Kumar T. Isoflavonoids from *Iris crocea*. *Phytochemistry*, 1992, 31 (4), 1399-1401.
- [426] Agarwal W.K., Thappa R. K., Agarwal S.G., Dhar, K. L. Phenolic constituents of *Iris milesii* rhizomes. *Phytochemistry*, 1984, 23 (6), 1342 – 1343.
- [427] Minami H., Okubo A., Kodama M., Fukuyama Y. Highly oxygenated isoflavones from *Iris japonica*. *Phytochemistry*, 1996, 41 (4), 1219-1221.
- [428] Mahmood U., Kaul V.K., Jirovetz L. Alkylated benzoquinones from *Iris kumaonensis*. *Phytochemistry*, 2002, 61 (8), 923-926.
- [429] Carman R.M., Russel-Maynard J.K.L., Schumann R.C. Isoflavones from *Podocarpus amarus*. *Australian J. Chem.*, 1985, 38 (3), 485 – 496.
- [430] Gupta B.B., Bhattacharyya A., Mitra S.R., Adityachaudhury N. Isoaurmillone, an isoflavone from the pods of *Milletia auriculata*. *Phytochemistry*, 1983, 22 (5), 1306-1307.

- [431] Kulesh N.I., Maksimov O.B., Denisenko V.A., Glazunov V.P. Isoflavonoids from Heartwood of *Maackia amurensis*. *Chem. Natural Comp.*, 2001, 37 (1), 29-31.
- [432] Miyazawa M., Sakano K., Nakamura S., Kosaka H. Antimutagenic activity of isoflavone from *Pueraria lobata*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (1), 336-341.
- [433] Shin K.H., Kim Y.P., Lim S.S., Lee S., Ryu N., Yamada M., Ohuchi K. Inhibition of prostaglandin E2 production by the isoflavones tectorigenin and tectoridin isolated from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. *Planta Med.*, 1999, 65 (8), 778-777.
- [434] Oh K.B., Kang H., Matsuoka H. Detection of antifungal activity in *Belamcanda chinensis* by a single-cell bioassay method and isolation of its active compound, tectorigenin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65 (4), 939-942.
- [435] Morito K., Aomori T., Hirose T., Kinjo J., Hasegawa J., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, 25 (1), 48-52.
- [436] Jung S.H., Lee Y.S., Lee S., Lim S.S., Kim Y.S., Ohuchi K., Shin K.H. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. *Planta Med.*, 2003, 69 (7), 617-622.
- [437] Moon H.I., Jung J.C., Lee J. Aldose reductase inhibitory effect by tectorigenin derivatives from *Viola hondoensis*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14 (22), 7592-7594.
- [438] Lee K.T., Sohn I.C., Kim Y.K., Choi J.H., Choi J.W., Park H.J., Itoh Y., Miyamoto K. Tectorigenin, an isoflavone of *Pueraria thunbergiana* BENTH., induces differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24 (10), 1117-1121.
- [439] Pan C.H., Kim E.S., Jung S.H., Nho C.W., Lee J.K. Tectorigenin inhibits IFN- γ /LPS-induced inflammatory responses in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 2008, 31 (11), 1447-1456.
- [440] Jung S.H., Lee Y.S., Lim S.S., Lee S., Shin K.H., Kim Y.S. Antioxidant activities of isoflavones from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Arch. Pharm. Res.*, 2004, 27 (2), 184-188.
- [441] Kang K.A., Lee K.H., Chae S., Zhang R., Jung M.S., Kim S.Y., Kim H.S., Kim D.H., Hyun J.W. Cytoprotective effect of tectorigenin, a metabolite formed by transformation of tectoridin by intestinal microflora, on oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Eur. J. Pharmacol.*, 2005, 5, 519 (1-2), 16-23.
- [442] Arisawa M., Morita N. Studies on constituents of genus *Iris*. VII. The constituents of *Iris unguicularis* Poir. *Chem. Pharm. Bull.*, 1976, 24 (4), 815-817.

- [443] Shawl A.S, Vishwapaul, Zaman A., Kalla A.K. Isoflavones of *Iris spuria*. *Phytochemistry*, 1984, 23 (10), 2405-2406.
- [444] Albuquerque F.B., Braz F.R., Gottlieb O.R., Magalhaes M.T., Maia J.G.S., de Oliveira A.B., de Oliveira G.G., Wilberg V.C. Isoflavone evolution in *Monopteryx*. *Phytochemistry*, 1981, 20 (2), 235–236.
- [445] Tanaka T., Inuma M., Asai F., Ohya M., Burandt C.L. Flavonoids from the root and stem of *Sophora tomentosa*. *Phytochemistry*, 1997, 46 (8), 1431-1437.
- [446] Mingchuan L., Shengjie Y., Linhong J., Deyu H., Zhibing W., Song Y. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities. *Molecules*, 2012, 17 (5), 6156-6169.
- [447] Singh N., Mahmood U., Kaul V.K. Isoflavonoids from *Iris kumaonensis*. *J. Indian Chem. Society*, 2005, 82 (1), 86-87.
- [448] Al-Qudah M.A., Saleh A.M., Al-Jaber H.I., Tashtoush H.I., Lahham J.N., Abu Zarga M.H., Afifi F.U., Abu Orabi S.T. New isoflavones from *Gynandrisis sisyrinchium* and their antioxidant and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 2015, 107, 15-21.
- [449] Dixit P., Chand K., Khan M.P., Siddiqui J.A., Tewari D., Ngueguim F.T., Chattopadhyay N., Maurya R. Phytoceramides and acylated phytosterol glucosides from *Pterospermum acerifolium* Willd. seed coat and their osteogenic activity. *Phytochemistry*, 2012, 81, 117-125.
- [450] Xu Q., Xie H., Wu P., Wei X. Flavonoids from the capitula of *Eriocaulon australe*. *Food Chem.*, 2013, 139 (1-4), 149-154.
- [451] Kachroo K., Razdan T.K., Qurishi M.A., Khuroo M.A., Koul S., Dhar K.L. Two isoflavones from *Iris kashmiriana*. *Phytochemistry*, 1990, 29 (3), 1014-1016.
- [452] Jin L., Jin Y.S., Chen H.S., Shen Y., Liang S., Xiang Z.B. Phenolic constituents of *Belamcanda chinensis*. *Chem. Nat. Compounds*, 2007, 43 (6), 700-701.
- [453] Mesaik M.A., Jabeen A., Halim S.A., Begum A., Khali A. S., Asif M., Fatima B., Ul-Haq Z., Choudhary M.I. In Silico and *in vitro* immunomodulatory studies on compounds of *Lindelofia stylosa*. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, 79, 290-299.
- [454] Hara H., Ise Y., Morimoto N., Shimazawa M., Ichihashi K., Ohya M., Inuma M. Laxative effect of agarwood leaves and its mechanism. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, 72 (2), 335-345.
- [455] Dhar K.L., Kalla K.A. 2,4,6,4'-Tetrahydroxybenzophenone in *Iris germanica*. *Phytochemistry*, 1974, 13, 2894.
- [456] Qi J., Lu J.J., Liu J.H., Yu B.Y. Flavonoid and a rare benzophenone glycoside from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2009, 57 (2), 134-137.

- [457] Feng J., Yang X-W., Wang R-F. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, 2011, 72, 242–247.
- [458] Xie G.Y., Qin X.Y., Liu R., Wang Q., Lin B.B., Wang G.K., Xu G.K., Wen R., Qin M.J. New isoflavones with cytotoxic activity from the rhizomes of *Iris germanica* L. *Nat. Prod. Res.*, 2013, 27 (23), 2173-2177.
- [459] Rigano D., Formisano C., Grassia A., Grassia G., Perrone A., Piacente S., Vuotto M.L., Senatore F. Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of *Iris pseudopumila*. *Planta Med.*, 2007, 73 (1), 93-96.
- [460] Conforti F., Rigano D., Menichini F., Loizzo M.R., Senatore F. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia*, 2009, 80 (1), 62-67.
- [461] De Rosa S., De Giulio A., Tommonar G. Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of *Lycopersion esculentum*. *Phytochemistry*, 1996, 42 (4), 1031-1034.
- [462] Do T. M. L., Truong A. V., Vo T. N., Pinnock T. G., Pratt L. M., Guillaume D., Nguyen K. P. P. New derivatives from the aerial parts of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae). *Phytochem. Lett.*, 2013, 6, 544-551.
- [463] Huang S.X., Liao X., Nie Q.J., Ding L.S., Peng S.L. Phenyl and Phenylethyl Glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Helv. Chim. Acta*, 2004, 87, 598-604.
- [464] Wang M., Kikuzaki H., Lin C.-C., Kahyaoglu A., Huang M.-T., Nakatani N., Ho C.-T. Acetophenone Glycosides from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 (5), 1911-1914.
- [465] Chen X.-Y., Wang H.-Q., Zhang T., Liu C., Kang J., Chen R.-Y., Yu D.-Q. Aromatic Glucosides from the Seeds of *Prunus davidiana*. *J. Nat. Prod.*, 2013, 76, 1528–1534.
- [466] Shu P., Hong J.-L. Wu G., Yu B.-Y., Qin M.-J. Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Chin. J. Nat. Med.*, 2010, 8 (3), 202-207.
- [467] Akther N., Andrabi K., Nissar A., Ganaie S., Chandan B.K., Gupta A.P., Khuswant M., Sultana S., Shawl A. S. Hepatoprotective activity of LC–ESI-MS standardized *Iris spuria* rhizome extract on its main bioactive constituents. *Phytomedicine*, 2014, 21, 1202–1207.
- [468] Wang H., Sun Y., Ye W.C., Xiong F., Wu J.J., Yang C.H., Zhao S.X. Antioxidative phenylethanoid and phenolic glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, 52 (5), 615-617.
- [469] Zajdel S.M., Graikou K., Sotiroudis G., Główniak K., Chinou I. Two new iridoids from selected Penstemon species--antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.*, 2013, 27 (24), 2263-2271.
- [470] Conforti F., Menichini F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18 (8), 1137-1145.

- [471] Fukui K., Matsumoto T., Nakamura S. The Synthesis of Tlatlancuayin and Some Related Compounds. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1965, 38, 1168.
- [472] Rao C.V., Gunasekar D. Squarrosin a new isoflavone from *Ochna squarrosa* linn. *Indian J. Chem., Sect B*, 1989, 28 (9), 780-781.
- [473] Veitch N.C., Sutton P.S., Kite G.C., Ireland H.E. Six new isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleiaherbert-smithii*. *J. Nat. Prod.*, 2003, 66 (2), 210-216.
- [474] Maurer B., Hauser A., Froidevaux J.-C. New Irone-Related Constituents from the Essential Oil of *Iris germanica* L. *Helv. Chim. Acta*, 1989, 72, 1400-1415.
- [475] Tarbeeva D. V., Fedoreev S. A., Veselova M. V., Kalinovskii A.I., Gorovoi P. G. Polyphenolic Metabolites from *Iris pseudacorus*. *Chem. Nat. Compounds*, 2014, 50 (2), 363-365.
- [476] Messanga B.B., Kimbu S.F., Sondengam B.L., Bodo B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, 2002, 59 (4), 435-438.
- [477] Qin M.-J., Li R., Wang X., Te W.-C. New isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris leptophylla* Lingelsh. *J. Integr. Plant Biol.*, 2007, 49 (2), 213-217.
- [478] Tanaka T., Sueyasu T., Nonaka G., Nishioka I. Tannins and Related Compounds. XXI. Isolation and Characterization of Galloyl and p-Hydroxybenzoyl Esters of Benzophenone and Xanthone C-Glucosides from *Mangifera indica* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, 32 (7), 2676-2686.
- [479] Fujita M., Inoue T. Studies on the constituents of *Iris florentina* L. II. C-glucosides of xanthenes and flavones from the leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30 (7), 2342-2348.
- [480] Salvi A., Bruehlmann C., Migliavacca E., Carrupt P.-A., Hostettmann K., Testa B. Protein protection by antioxidants: Development of a convenient assay and structure-activity relationships of natural polyphenols. *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85 (3), 867-881.
- [481] Dar A., Faizi S., Naqvi S., Roome T., Zikr-ur-Rehman S., Ali M., Firdous S., Moin S.T. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 28 (4), 596-600.
- [482] Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, 25 (1), 72-76.
- [483] Ichiki H., Miura T., Kubo M., Ishihara E., Komatsu Y., Tanigawa K., Okada M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, 21 (12), 1389-1390.

- [484] Muruganandan S., Gupta S., Kataria M., Lal J., Gupta P.K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, 2002, 176 (3), 165-173.
- [485] Carvalho A.C.S., Guedes M.M., De Souza A.L., Trevisan M.T.S., Lima A.F., Santos F.A., Rao V.S.N. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Planta Med.*, 2007, 73 (13), 1372 – 1376.
- [486] Rajendran P., Ekambaram G., Sakthisekaran D. Protective role of mangiferin against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 31 (6), 1053-1058.
- [487] Woźniak D., Matkowski A. *Belamcandae chinensis* rhizoma - A review of phytochemistry and bioactivity. *Fitoterapia*, 2015, 107, 1-14.
- [488] Xin R.H., Zheng J.F., Cheng L., Peng W.J., Luo Y.J. *Belamcanda chinensis* (L.) Dc: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 2015, 12 (6), 39-70.
- [489] Stolk J., Hiltermann T.J., Dijkman J.H., Verhoeven A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxysubstituted catechol. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1994, 11, 95-102.
- [490] Van den Worm E., Beukelman C.J., Van den Berg A.J., Kroes B.H., Labadie R.P., Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 433 (2-3), 225-230.
- [491] Kim S.Y., Moon K.A., Jo H.Y., Jeong S., Seon S.H., Jung E., Cho Y.S., Chun E., Lee K.Y. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunol. Cell. Biol.*, 2012, 90 (4), 441-448.
- [492] Lau W.K., Cui L.Y., Chan S.C., Ip M.S., Mak J.C. The presence of serotonin in cigarette smoke - a possible mechanistic link to 5-HT-induced airway inflammation. *Immunol. Cell. Biol.*, 2012, 90 (4), 441-448.
- [493] Impellizzeri D., Esposito E., Mazzon E., Paterniti I., Di Paola R., Bramanti P., Cuzzocrea S. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, 2011, 81 (5), 636-648.
- [494] Choi E.M., Lee Y.S. Protective effect of apocynin on antimycin A-induced cell damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Appl. Toxicol.*, 2012, 32 (9), 714-721.
- [495] Couteau C., Chauvet C., Papis E., Coiffard L. UV filters, ingredients with a recognized anti-inflammatory effect. *PLoS One*, 2012, 7 (12), e46187.

- [496] Li F., Shanmugam M.K., Chen L., Chatterjee S., Basha J., Kumar A.P., Kundu T.K., Sethi G. Garcinol, a polyisoprenylated benzophenone modulates multiple proinflammatory signaling cascades leading to the suppression of growth and survival of head and neck carcinoma. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 2013, 6 (8), 843-854.
- [497] Tsai M.L., Chiou Y.S., Chiou L.Y., Ho C.T., Pan M.H. Garcinol suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2014, 58 (9), 1820-1829.
- [498] Pauletti P.M., Castro-Gamboa I., Siqueira Silva D.H., Young M.C., Tomazela D.M., Eberlin M.N., da Silva Bolzani V. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. *J. Nat. Prod.*, 2003, 66 (10), 1384-1387.
- [499] Dou W., Zhang J., Ren G., Ding L., Sun A., Deng C., Wu X., Wei X., Mani S., Wang Z. Mangiferin attenuates the symptoms of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via NF- κ B and MAPK signaling inactivation. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, 23 (1), 170-178.
- [500] Li H., Miyahara T., Tezuka Y., Namba T., Nemoto N., Tonami S., Seto H., Tada T., Kadota S. The effect of Kampo formulae on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. I. Active constituents of Tsu-kan-gan. *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, 21 (12), 1322-1326.
- [501] Qin L., Han T., Zhang Q., Cao D., Nian H., Rahman K., Zheng H. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula. *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 118 (2), 271-279.
- [502] Ang E., Liu Q., Qi M., Liu H.G., Yang X., Chen H., Zheng M.H., Xu J. Mangiferin attenuates osteoclastogenesis, bone resorption, and RANKL-induced activation of NF- κ B and ERK. *J. Cell. Biochem.*, 2011, 112 (1), 89-97.
- [503] Seidlová-Wuttke D., Hesse O., Jarry H., Rimoldi G., Thelen P., Christoffel V., Wuttke W. *Belamcanda chinensis* and the thereof purified tectorigenin have selective estrogen receptor modulator activities. *Phytomedicine*, 2004, 11 (5), 392-403.
- [504] Umehara K., Nemoto K., Matsushita A., Terada E., Monthakantirat O., De-Eknamkul W., Miyase T., Warashina T., Degawa M., Noguchi H. Flavonoids from the heartwood of the Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells. *J. Nat. Prod.*, 2009, 72 (12), 2163-2168.
- [505] Wozniak D., Janda B., Kapusta I., Oleszek W., Matkowski A. Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Mutat. Res.*, 2010, 696 (2), 148-153.
- [506] Li X.J., Jee W.S.S., Chow S.Y., Woodbury D.M. Adaptation of cancellous bone to aging and immobilization in the rat: A single photon absorptiometry and histomorphometry study. *Anat. Rec.*, 1990, 227, 12-24.