



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ GLYCYRRHIZA
GLABRA (ΓΛΥΚΥΡΙΖΑ) ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ**

(Πειραματική μελέτη σε επίμυες)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Κ. ΓΑΛΑΝΗΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ
GLYCYRRHIZA GLABRA (ΓΛΥΚΥΡΙΖΑ) ΣΤΗΝ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ
(Πειραματική μελέτη σε επίμυες)**

Στους αγαπημένους μου γονείς Κωνσταντίνο και Αμαλία.

Στη σύζυγό μου Ευαγγελία και στις δύο κόρες μας Αναστασία και
Αμαλία.

Στα αδέρφια μου Λεωνίδα και Νεκτάριο.

Ευχαριστίες

Είναι αρκετά τα άτομα που συνέδραμαν καθοριστικά στο να φέρω σε πέρας το δύσκολο έργο της έρευνας που ανέλαβα, ώστε ο πιο δίκαιος τρόπος να τους ευχαριστήσω αντάξια, είναι να χρησιμοποιήσω χρονολογική σειρά.

Όλα άρχισαν όταν, ως ειδικευόμενος ορθοπαιδικής στο νοσοκομείο «Ασκληπιείο Βούλας», είχα την τύχη να έχω διευθυντή στην ΣΤ' Ορθοπαιδική Κλινική, όπου θήτευα, τον συντονιστή Δ/ντη κ. Γεώργιο Αδαμόπουλο, παράδειγμα για μένα ανθρώπου, επιστήμονα και συναδέλφου. Ήταν ο άνθρωπος που πίστεψε σε μένα και μου έδειξε το δρόμο προς την έρευνα. Χωρίς εκείνον τίποτε από όλα όσα ακολούθησαν, και τα οποία κατέληξαν σε αυτό το κείμενο, δεν θα είχε συμβεί. Δεν παραλείπω να του το θυμίζω και να τον ευχαριστώ για αυτό.

Εν συνεχεία ευχαριστώ θερμά την κα Σοφία Μητάκου, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής, τομέας Φαρμακογνωσίας, ΕΚΠΑ, της οποίας η συνδρομή υπήρξε καθοριστική σε όλα τα στάδια της διατριβής μου. Στήριξε την υποψηφιότητά μου από την αρχή και ήταν πάντα εκεί όταν χρειάστηκα την επιστημονική της βοήθεια για να προχωρήσω.

Θερμότερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην κα Ισμήνη Δοντά, επίσης μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, Καθηγήτρια Πειραματικής Χειρουργικής Έρευνας ΕΚΠΑ, η οποία για εμένα ήταν σταθμός έμπνευσης και ισχυρός παράγοντας της επιστημονικής μου ωρίμανσης. Επέδειξε τη μεγαλύτερη ίσως υπομονή απέναντί μου και πάντοτε προσφερόταν, με αδιαπραγμάτευτη ευγένεια και βαθύ ακαδημαϊκό υπόβαθρο, να δίνει λύσεις στα επιστημονικά ερωτήματα.

Η επόμενη ευχαριστία μου θεωρώ ότι είναι ιδιαίτερη και αφορά στον επιβλέποντά μου στην παρούσα διατριβή, τον συνάδελφο Ορθοπαιδικό Χειρουργό και επιπρόσθετα Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής ΕΚΠΑ κ. Κωνσταντίνο Σουλτάνη. Ο κ. Σουλτάνης μου έδωσε αρχικώς την ευκαιρία να ξεκινήσω τη διατριβή και μεριμνούσε για την απρόσκοπτη εξέλιξή της, μέχρι το τέλος. Όντας ο ίδιος συνάδελφος και υπόδειγμα ισορροπημένης σκέψης, καθαρής κρίσης, επιστημονικής πληρότητας και ηθικής ακεραιότητας, με εξώθησε σιωπηρά σε ανώτερα επίπεδα αναζήτησης και ενασχόλησης, τόσο εντός όσο και εκτός του πεδίου της διατριβής.

Περαιτέρω θέλω να ευχαριστήσω τους Παύλο Λελόβα και Αλέξανδρο Ζέρβα, κτηνίατρους στο εργαστήριο, οι οποίοι υπήρξαν εξαιρετικοί συνεργάτες και βοήθησαν τα μέγιστα όποτε τους χρειάστηκα.

Ειδική ευχαριστία θέλω να απευθύνω στον πολύπειρο βιοστατιστικολόγο κ. Αντώνη Γαλανό, ο οποίος με την εμμονική του τελειοθρία ανέβαζε διαρκώς και συνολικά το επίπεδο της έρευνας, καθώς δεν άφηνε περιθώρια για λάθη.

Το ερευνητικό πείραμα έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος Ε.Ε.Π.Μ.Σ, εντός του νοσοκομείου «ΚΑΤ» στην Κηφισιά, και νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό που συνέδραμε τα μέγιστα για την ομαλή διεξαγωγή του πειράματος, το οποίο είχε αρκετές δύσκολες φάσεις τόσο οργανωτικά, όσο και διαχειριστικά. Οι νοσηλεύτριες, οι ζωοκόμοι, οι γραμματείς, οι διαχειριστές τεχνικών μηχανημάτων, όλοι υπήρξαν άριστοι βοηθοί και συνεργάτες.

Θέλω να ευχαριστήσω εκείνους που συνέβαλαν στη δημοσίευση της διατριβής μου, τον καθένα για τους δικούς του μοναδικούς λόγους. Πρόκειται για τους συνάδελφος ορθοπαιδικούς Παναγιώτη Παπαδόπουλο και Σπύρο Ζωίτση, τον Πολιτικό Μηχανικό Καθηγητή ΕΜΠ κ. Σταύρο Κουρκουλή, τη Μαρία Μακροπούλου και την κτηνίατρο Επίκουρη Καθηγήτρια στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης κ. Αναστασία Τσιγκοτζίδου.

Τέλος θέλω να απευθύνω θερμότερες ευχαριστίες στα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κυρίους και κυρίες Δοντά Ισμήνη, Μουτσάτσου-Λαδίκου Παρασκευή, Μητάκου Σοφία, Σκαλτσούνη Λέανδρο-Αλέξιο, Σουλτάνη Κωνσταντίνο, Νικολάου Βασίλειο και Μαυρογένη Ανδρέα για την καθοριστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Κ. ΓΑΛΑΝΗΣ
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης διατριβής στην Ιατρική Σχολή: 5
Φεβρουαρίου 2014 (Αρ.Πρωτ: 2015)

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 15 Απριλίου 2014 (Αρ. Πρωτ:
4877, η συνεδρίαση έλαβε χώρα την 9^η Απριλίου 2014).

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- 1) Ως επιβλέπων τη διατριβή, **Κωνσταντίνος Σουλτάνης**, Επίκουρος Καθηγητής
(νυν Αναπληρωτής Καθηγητής).
- 2) **Ισμήνη Δοντά**, Καθηγήτρια
- 3) **Σοφία Μητάκου**, Καθηγήτρια

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος και ερευνητικού πρωτοκόλλου στην Ιατρική Σχολή:

11 Ιουλίου 2014 (Απ.Πρωτ: 7613).

Ημερομηνία κατάθεσης τροποποίησης θέματος (αφαιρέθηκε με ομοφωνία της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής το ένα εκ των δύο φυτών που είχαν προγραμματιστεί αρχικώς για μελέτη): 22 Νοεμβρίου 2017 (Αρ.Πρωτ: 1718009605/23-11-2017).

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: Απρίλιος 2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Ονόματα μελών 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής (κατά σειρά όπως ορίστηκαν από τη Γενική Συνέλευση της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ την 01/04/2020 αρ.πρωτ: 192002433):

- 1) Δοντά Ισμήνη – Νίκη, Καθηγήτρια
- 2) Μουτσάτσου – Λαδικού Παρασκευή, Καθηγήτρια
- 3) Μητάκου Σοφία, Καθηγήτρια
- 4) Σκαλτσούνης Λέανδρος – Αλέξιος, Καθηγητής
- 5) Σουλτάνης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 6) Νικολάου Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 7) Μαυρογένης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής

Βαθμός με τον οποίο έγινε δεκτή η διατριβή: **ΑΡΙΣΤΑ**

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

(αρχαίο κείμενο)

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

(νεοελληνική μετάφραση)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Δημήτριος Κων/νου Γαλάνης**Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα**

Η καταγωγή μου είναι από το χωριό Αθαμάνιο της Άρτας. Γεννήθηκα στη Χαλκίδα και μεγάλωσα στη Νέα Αρτάκη Εύβοιας. Σε όλες τις σχολικές βαθμίδες υπήρξα αριστούχος μαθητής.

Εισάχθηκα με πανελλαδικές εξετάσεις αριστούχος στην Ιατρική Σχολή Λάρισας, από όπου αποφοίτησα με επίδοση "Λίαν Καλώς" το 2004.

Διορίστηκα ως Αγροτικός Ιατρός στο νησί της Χίου, όπου εργάστηκα για τρεις μήνες αποκλειστικά στο Γ.Ν Χίου και κατόπιν για 12 μήνες ως ιατρός Περιφερειακού Ιατρείου Καμποχώρων Χίου, κατά τη διάρκεια των οποίων υπηρετούσα ενεργά με 24ωρες εφημερίες, τόσο στο Κέντρο Υγείας Πυργίου όσο και στο Γ.Ν Χίου.

Εκπλήρωσα τις στρατιωτικές μου υποχρεώσεις στο Πεζικό, όπου θήτευσα για 12 μήνες, εκ των οποίων τους 3 πρώτους στην Άρτα και τους υπόλοιπους ως Ιατρός στο ΣΤΕΠ Χίου.

Ειδικεύτηκα στην Χειρουργική Ορθοπαιδική στην Γερμανία και στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα εργάστηκα για 1 έτος στην Χειρουργική Κλινική Τραύματος του Νοσοκομείου Muehlacker των κλινικών Enzkreis και κατόπιν για 1 έτος στο Παιδοορθοπαιδικό τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων "Παίδων Πεντέλης". Ολοκλήρωσα την ειδίκευσή μου στο Νοσοκομείο "Ασκληπιείο Βούλας", στο οποίο επί 4 και πλέον έτη οικοδόμησα σημαντική εμπειρία σε όλο το φάσμα της Ορθοπαιδικής Ενηλίκων. Κατά τη διάρκεια της ειδίκευσής μου στην Ορθοπαιδική Ενηλίκων, εκπαιδεύτηκα επί 2 διαδοχικά εξάμηνα στο τμήμα Πλαστικής Χειρουργικής στο Γενικού Νοσοκομείου Αττικής «ΚΑΤ» και στο Τμήμα Ογκοορθοπαιδικής του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι». Μετά το πέρας της ειδίκευσής μου και κατόπιν γραπτών και προφορικών εξετάσεων, μου απονεμήθηκε το 2014 ο τίτλος ειδικότητας του Ορθοπαιδικού από τη Νομαρχία Αττικής.

Εργάστηκα για σχεδόν έναν χρόνο ως ειδικευμένος Ορθοπαιδικός στα Τακτικά Ιατρεία και στα Επείγοντα στο ιδιωτικό Νοσοκομείο "Νέο Αθήναιον" στην Αθήνα και από το 2016 λειτουργώ το προσωπικό μου ιατρείο στη Νέα Αρτάκη (Δήμος Χαλκιδέων, Εύβοια), ενώ παράλληλα συνεργάζομαι με ιδιωτικές κλινικές των Αθηνών.

Τον Οκτώβριο 2015 βραβεύτηκα στη Θεσσαλονίκη με το 1ο Πανελλήνιο Βραβείο από την Ελληνική Εταιρία Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών (ΕΕΜΜΟ), για την παρουσίαση τμήματος των αποτελεσμάτων της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

Είμαι κάτοχος μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης στην "Διοίκηση Μονάδων Υγείας", Master of Science (MSc) "Healthcare Management", από το Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο (ΕΑΠ, 2018).

Παράλληλα ασχολούμαι με τον τομέα της Ποιότητας γενικώς και ειδικότερα στην Υγεία και έλαβα κατόπιν εξετάσεων τη διεθνή πιστοποίηση του Επιθεωρητή από τον διεθνή φορέα επιθεωρητών IRCA (<http://www.irca.org/>). Είμαι πλέον Επικεφαλής Επιθεωρητής (Lead Auditor) στα πρότυπα ISO 9001 και DIN EN 15224, και παρέχω τις υπηρεσίες μου στον ιδιωτικό όμιλο εταιριών Swiss Approval International (<https://swissapproval.ch/>). Περαιτέρω είμαι Επικεφαλής Επιθεωρητής στη γερμανική εταιρία διαπίστευσης και πιστοποίησης Temos International (<https://www.temos-worldwide.com/>) και του ελληνικού γραφείου της, Temos Hellas (<http://temos-aegean.info/ins/>), στο οποίο πρόσφατα τιμηθήκαμε με το αργυρό βραβείο Silver Healthcare Business Award 2018 για την προσφορά μας στην Υγεία.

Δημοσίευση που προέκυψε από την παρούσα διατριβή, μέχρι τη στιγμή της κατάθεσής της:

- Protective effect of Glycyrrhiza glabra roots extract on bone mineral density of ovariectomized rats.

Galanis D, Soultanis K, Lelovas P, Zervas A, Papadopoulos P, Galanos A, Argyropoulou K, Makropoulou M, Patsaki A, Passali C, Tsingotjidou A, Kourkoulis S, Mitakou S, Dontas I.

Biomedicine (Taipei). 2019 Jun;9(2):8. doi: 10.1051/bmdcn/2019090208

Προφορικές και γραπτές ανακοινώσεις που προέκυψαν από τα δεδομένα της διατριβής (σε Ελλάδα και Ευρώπη):

- Cytologic Evaluation of vaginal smears in ovariectomized rats on special diets as an index of estrogenic effect.

P. Mikou, **D. Galanis**, S. Zoitsis, A. Pepe, P. Lelovas, S. Mitakou, I. Dontas

European Congress of Cytology, Liverpool 2016.

- Protective effect of Glycyrrhiza glabra root extract on bone mineral density of ovariectomized rat.

Galanis D., Galanos A., Lelovas P., Zervas, A., Vontzalidou A., Makropoulou M., Aligiannis N., Soultanis K., Mitakou S., Dontas I.

13th Felasa Congress, Brussels 2016.

- The effect of olive extract administration on body and organ weights of adult female ovariectomized rats.

AS Zervas, PP Lelovas, A Galanos, **D Galanis**, M Makropoulou, D Abatis, E Chronopoulos, A-L Skaltsounis, S Mitakou, IA Dontas

13th Felasa Congress, Brussels 2016.

- Προστατευτική επίδραση εκχυλίσματος ριζών του φυτού *Glycyrrhiza glabra* στην οστική πυκνότητα ωθηκεκτομημένων επίμυων. (Η προφορική παρουσίαση έλαβε το 1^ο Βραβείο του Συνεδρίου).

Γαλάνης Δ., Γαλανός Α., Λελόβας Π., Ζέρβας Α., Παπαδόπουλος Π., Μακροπούλου, Μ., Αληγιάννης Ν., Σουλτάνης Κ., Μητάκου Σ., Δοντά Ι.

23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών, Θεσσαλονίκη 2015.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ
GLYCYRRHIZA GLABRA (ΓΛΥΚΥΡΙΖΑ) ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ (Πειραματική μελέτη σε
επίμυες)**

Περιεχόμενα	Σελίδα
Περιεχόμενα.....	14
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1. Εισαγωγή.....	17
2. Περί οστού.....	19
2.1. Οστίτης ιστός.....	19
2.2. Μεσοκυττάρια ουσία.....	22
2.3. Κύτταρα του οστίτη ιστού.....	23
2.4. Δομή και διάταξη του οστίτη ιστού.....	27
3. Πειραματικές μελέτες.....	28
3.1. Σύγκριση πειραματικών και κλινικών μελετών.....	28
3.2. Ηθικό πλαίσιο.....	30
3.3. Κριτήρια επιλογής ζωικού προτύπου.....	31
3.4. Επιλογή Επίμυος ως Ζωικό Πρότυπο.....	33
3.5. Πειραματικά επαγόμενη οστεοπόρωση στον επίμυ.....	36
3.6. Το πρότυπο του ωθηκεκτομημένου επίμυος.....	37
4. Μέθοδοι μέτρησης της ποιότητας των οστών.....	39
4.1. Πυκνομετρία.....	40
4.2. Βιοχημικοί δείκτες.....	42
4.3. Ιστομορφομετρία.....	45
4.4. Μηχανική αντοχή.....	46
4.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τις δοκιμές.....	51
4.4.1.α. Εμβιομηχανικές δοκιμές και ζωικά πρότυπα.....	51
4.4.1.β. Συντήρηση των δοκιμών.....	55
4.4.1.γ. Ενυδάτωση.....	56
4.4.1.δ. Θερμοκρασία.....	57
4.4.1.ε. Ρυθμός φόρτισης.....	57
5. Οστεοπόρωση.....	57
5.1. Οιστρογόνα.....	61
5.2. Οιστρογόνα φυτικής προέλευσης.....	64
6. Γλυκύριζα (<i>Glycyrrhiza glabra</i>).....	68

6.1. Εκχύλισμα <i>Glycyrrhiza glabra</i>	69
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	71
1. Εισαγωγή – Σκοπός μελέτης.....	72
2. Υλικά και μέθοδος.....	73
2.1. Ζώα εργαστηρίου.....	73
2.2. Μετρήσεις οστικής μάζας.....	74
2.3. Ωοθηκεκτομές.....	78
2.4. Εκχύλισμα.....	79
2.4.1. Ανάλυση και προετοιμασία.....	79
2.4.2. Υπολογισμός και χορήγηση.....	82
2.5. Σχετικά με τη συλλογή των ιστών.....	83
2.6. Σχετικά με τον μηχανικό έλεγχο των οστών.....	84
2.7. Στατιστική ανάλυση.....	87
2.8. Αποτελέσματα.....	88
2.8.1. Απόλυτες τιμές BMD.....	88
2.8.1.α. Ολική κνήμη.....	88
2.8.1.β. Εγγύς κνήμη.....	90
2.8.2. Ποσοστιαίες μεταβολές BMD.....	91
2.8.3. Έλεγχος μηχανικής αντοχής.....	92
2.8.4. Σωματικά βάρη.....	93
2.8.5. Βάρη μήτρας.....	95
2.8.6 Ιστολογική εξέταση μήτρας.....	96
2.9. Συζήτηση.....	97
Περίληψη.....	103
Abstract.....	105
Βιβλιογραφία.....	106

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

Η θραύση των οστών του ανθρώπου, αλλιώς το κάταγμα, υπήρξε διαχρονικά ένα ανεπιθύμητο πρόβλημα, τόσο λόγω της εντόνως επώδυνης κλινικής εικόνας, όσο και της δυσλειτουργικότητας που κατέλειπε στον παθόντα, συχνά μάλιστα μόνιμη αναπηρία, όταν επρόκειτο για τα μεγάλα μακρά οστά των άκρων. Ο Ιπποκράτης μάλιστα είχε περιγράψει πληθώρα καταγμάτων και πρωτόκολλα διαχείρισης αυτών, με έμφαση στην άμεση ανάταξη και ακινητοποίηση, με σκοπό τη μείωση των επιπλοκών και τη βελτίωση της αποκατάστασης. Πέρα από τους προφανείς λόγους επίπτωσης των καταγμάτων (π.χ εργώδης τραυματισμός, νεοπλάσματα, σημαντικές μεταβολικές διαταραχές) υπάρχουν και περιπτώσεις που η αιτία δεν είναι ξεκάθαρη, όπως συμβαίνει σε ηλικιωμένα άτομα που παθαίνουν κατάγματα χωρίς να έχει προηγηθεί η αναμενόμενη εργώδης πλήξη ή φόρτιση των οστών, γι' αυτό και αναφέρονται ως κατάγματα χαμηλής βίας. Η τρέχουσα απάντηση της επιστήμης στο υπαρκτό πρόβλημα της ευθραυστότητας των οστών είναι η τεκμηριωμένη θεωρία της οστεοπόρωσης. Η οστεοπόρωση είναι πολυπαραγοντική νόσος, χαρακτηρίζεται από μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένη ευθραυστότητα των οστών και υποκινείται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις γενετικών, μεταβολικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, που έχουν σοβαρή επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του μυοσκελετικού συστήματος¹. Πρόκειται για σιωπηλή επιδημία, η οποία συχνά δεν προκαλεί συμπτώματα παρά μόνο μέχρι να συμβεί ένα κάταγμα¹. Επηρεάζει περί τα 200 εκατομμύρια ανθρώπων ανά τον κόσμο και έχει σημαντικό αντίκτυπο στα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, αλλά και μείζονες κοινωνικο-οικονομικές επιβαρύνσεις ¹.

Η έρευνα σχετικά με το πρόβλημα της ευθραυστότητας των οστών ασχολείται με την παθογένεια, την πρόληψη και την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Οι περισσότερες προληπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις στην οστεοπόρωση έχουν περάσει από το στάδιο της προκλινικής μελέτης σε ζώα εργαστηρίου, όπως άλλωστε τα περισσότερα βιοϊατρικά επιτεύγματα, τα οποία θεμελιώθηκαν ύστερα από έρευνες σε ζώα, ειδικότερα σε ζώα εργαστηρίου τις τελευταίες δεκαετίες². Οι προκλινικές μελέτες νέων θεραπευτικών ουσιών είναι σημαντικές διότι επιτρέπουν τη συγκέντρωση δεδομένων για τη δράση και

ασφάλεια των υπό έλεγχο ουσιών στα ζώα, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτόν την εκτίμηση ασφαλούς ωφέλιμης χορήγησης στον άνθρωπό². Πιο συγκεκριμένα στα ζώα εργαστηρίου ελέγχεται η βραχυ- και μακροχρόνια τοξικότητα από παρατεταμένη χορήγηση όπως π.χ η συσσώρευση σε όργανα ή καρκινογόνος δράση². Επιπλέον ελέγχονται η δυνητική τοξική επίδραση στην αναπαραγωγή (γονιμότητα, περι- και μετα- γεννητική τοξικότητα) καθώς και η πιθανή τερατογόνος και μεταλλαξιογόνος δράση². Τα τρωκτικά αποτελούν ιδανικό πρότυπο εργαστηριακού ζώου για προκλινικές μελέτες μικρής διάρκειας, διότι έχουν διάρκεια ζωής περίπου 3 έτη και σύντομο αναπαραγωγικό κύκλο². Οι λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες των προκλινικών ερευνών αναφορικά με τα είδη ζώων εργαστηρίου και τις ειδικές συνθήκες διεξαγωγής (π.χ χρονικό διάστημα ελέγχου), καθορίζονται από εθνικούς και διεθνείς κανονισμούς². Πάντως ακόμη και η εκτενέστερη προκλινική έρευνα σε πολλά είδη ζώων εργαστηρίου δεν μπορεί να αποκλείσει την εμφάνιση τοξικότητας ή λοιπών παρενεργειών στον άνθρωπο, επομένως η φαρμακοεπαγρύπνηση είναι απαραίτητη².

Κάθε προκλινική έρευνα, παράλληλα με τους στόχους που θέτει για αναζήτηση αποτελεσματικών και ασφαλών φαρμάκων, οφείλει να σέβεται τους ζώντες οργανισμούς και να ακολουθεί σε κάθε στάδιο τις αρχές των τριών R (Replacement, Reduction, Refinement), δηλαδή αντικατάσταση, μείωση και εξευγένιση της χρήσης του ζώου³. Στα πλαίσια αυτά και ειδικά για την οστεοπόρωση, ένα σημαντικό τμήμα της μελέτης ξεκινά από το εργαστήριο σε *in vitro* δοκιμές νέων φαρμάκων σε κυτταροκαλλιέργειες οστεοβλαστών, από τις οποίες προκύπτουν αρχικές ενδείξεις ικανές να προκρίνουν μια ουσία για προκλινική μελέτη ή να την απορρίψουν. Ωστόσο το *in vivo* τμήμα μελέτης σε ζώα εργαστηρίου είναι απαραίτητο, διότι μόνο έτσι μπορούν να μελετηθούν η συστημική επίδραση των ουσιών και οι πολυοργανικές αλληλεπιδράσεις στις λειτουργίες του ζώντος οργανισμού. Περαιτέρω, η έννοια του Πειραματικού Ζωικού Προτύπου περιγράφει τα είδη εργαστηρίου, στα οποία μια επίκτητη παθολογική συνθήκη -συχνά προκλητή, και η οποία μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με παρόμοια κατάσταση στον άνθρωπο- καθίσταται δυνατόν να μελετηθεί. Στην παρούσα μελέτη, όπως θα εξηγηθεί αναλυτικά στη συνέχεια, ως Πειραματικό Ζωικό Πρότυπο επιλέχθηκε ο

θηλυκός επίμυος, στον οποίο προκλήθηκε -και κατέστη δυνατόν να μελετηθεί- πειραματικώς επαγόμενη οστεοπόρωση με την χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών.

2. Περί οστού

Η λέξη **οστό** προέρχεται από την αρχαίο **όστειον** που περιγράφει καθένα από τα σκληρά τμήματα που συνολικά σχηματίζουν το σκελετό του ανθρώπου και των σπονδυλωτών. Το οστό αποτελείται από τον οστίτη ιστό, στη δομή και την οργάνωση του οποίου οφείλονται οι ιδιαίτερες και σημαντικές μηχανικές του ιδιότητες. Το οστό αποτελεί υποσύνολο του σκελετού, ο οποίος συντίθεται από την οργανωμένη σύζευξη των διαφόρων οστών μεταξύ των, με τρόπο που να παρέχει τελικώς στήριξη σε ολόκληρο το σώμα και προστασία των ζωτικών οργάνων με το σχηματισμό περίφραξης ή αμιγώς οστέινης θήκης (θωρακικός κλωβός και κρανίο αντίστοιχα). Επίσης γνωρίζουμε πλέον ότι τα οστά κατέχουν δυναμικό ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου⁴ ενώ περαιτέρω παρέχουν τα απαραίτητα σταθερά σημεία για την πρόσφυση των μυών, επιτρέποντας έτσι την κίνηση του οργανισμού ως ένα είδος εξελικτικής εξυπηρέτησης.

2.1 Οστίτης ιστός

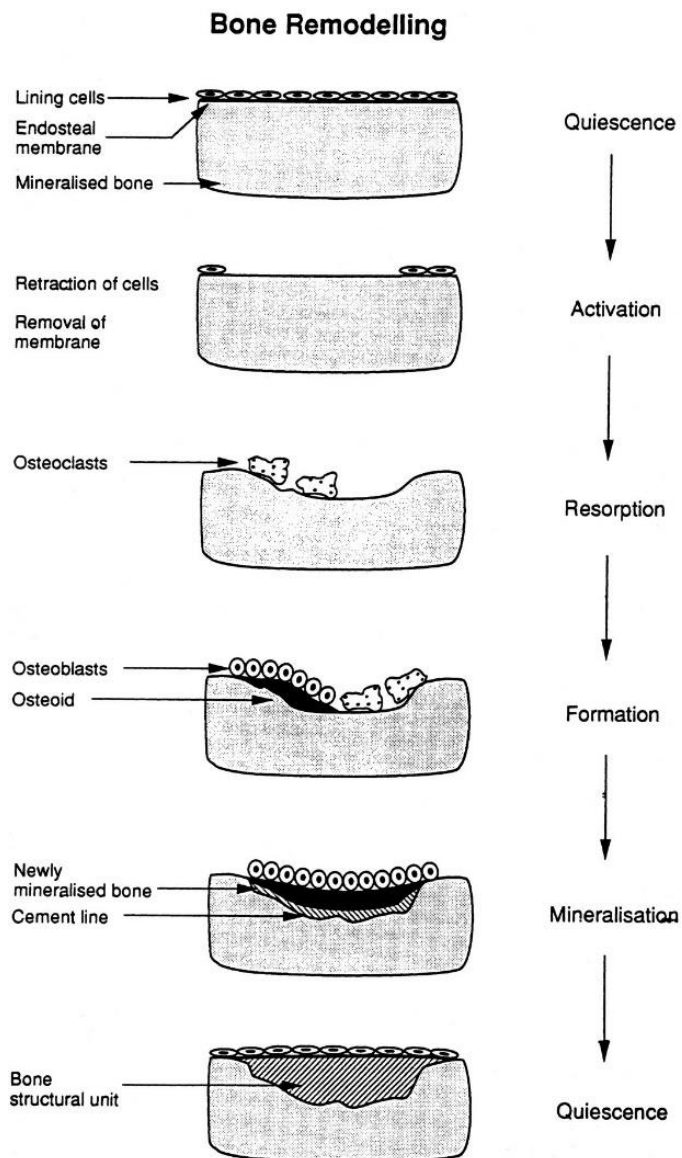
Πράγματι ο οστίτης ιστός, αναπτύχθηκε τελευταίος κατά την εξέλιξη των ειδών και αποτελεί ένα είδος συνδετικού ιστού, του οποίου τα κύτταρα περιβάλλονται από αποτιτανωμένη μεσοκυττάρια, εμποτισμένη με κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Ο οστίτης ιστός βρίσκεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μας σε συνεχή ανακατασκευή και ανανέωση με σκοπό να διατηρήσει τη δομή του, την ποσότητα και την ποιότητά του, συνιστώσες που εξασφαλίζουν τη μηχανική αντοχή του. Αυτό επιτυγχάνεται με μια αξιοθαύμαστη ισορροπία παράλληλης απορρόφησης και κατασκευής οστίτη ιστού, η οποία εξυπηρετείται από την ανταγωνιστική δράση δύο βασικών κυτταρικών ομάδων, των **οστεοκλαστών** (τρώγουν οστό) και των **οστεοβλαστών** (γεννούν οστό). Αυτή η **οστική ανακατασκευή** συντελείται αδιάκοπα σε 6 φάσεις.

1. Φάση ηρεμίας, κατά την οποία δεν συμβαίνει τίποτα, γι' αυτό λέγεται και ανενεργή φάση.
2. Φάση ενεργοποίησης, κατά την οποία οι προ-οστεοκλάστες μετατρέπονται, με την επίδραση κυτοκινών και άλλων ενεργοποιητών, σε ώριμους οστεοκλάστες.
3. Φάση οστικής απορρόφησης, κατά την οποία οι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται και αρχίζουν να απορροφούν οστό.
4. Φάση αναστροφής, κατά την οποία αποσύρονται οι οστεοκλάστες και εμφανίζονται οι οστεοβλάστες.
5. Φάσης οστικής παραγωγής, κατά την οποία οι οστεοβλάστες ενεργοποιούνται και γεμίζουν με οστεοειδές τα πεδία που απορροφήθηκαν προηγουμένως.
6. Φάση επιμετάλλωσης, με την ολοκλήρωση της οποίας ξεκινά η φάση ηρεμίας.

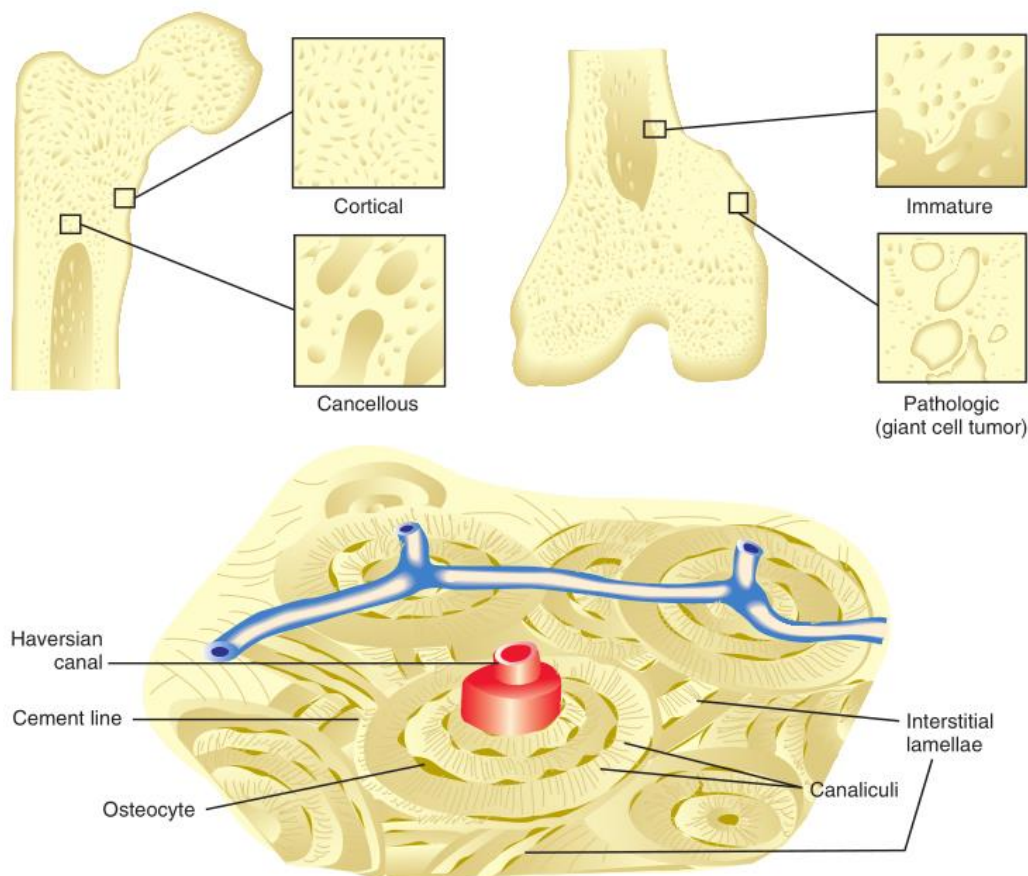
Η παραπάνω διαρκής ισορροπία που επιτυγχάνεται με τη συντονισμένη δράση οστεοκλαστών-οστεοβλαστών (εικ.1) ονομάζεται **φαινόμενο σύζευξης**, και υπό φυσιολογικές συνθήκες αυτό οδηγεί στην ανανέωση 5-10% οστού ανά έτος στον άνθρωπο⁵. Οποιαδήποτε αποσύζευξη έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της σύζευξης, άρα την αποδιοργάνωση της οστικής απορρόφησης/κατασκευής σε άλλοτε άλλο βαθμό, οδηγώντας έτσι σε μεταβολική οστική πάθηση (εικ.2).

Ο ώριμος οστίτης ιστός παρουσιάζεται σε δύο μορφές, το **σπογγώδες οστό** (cancellous) με δοκιδωτή μορφή σαν σφουγγάρι και το **φλοιώδες οστό** (cortical), με συμπαγή επιφανειακή δομή σαν φλούδα (εξ ων και η ονομασία αμφότερων). Σε μικροσκοπικό επίπεδο και οι δύο μορφές οστού χαρακτηρίζονται από την ίδια δομική μονάδα, τον **οστεώνα**. Στο φλοιώδες οστό, οι οστεώνες έχουν κυλινδρικό σχήμα σαν σωλήνες, ονομάζονται **Αβερσιανά (Haversian) κανάλια ή συστήματα**, διατάσσονται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του οστού και διαθέτουν ένα αρτηρίδιο και ένα φλεβίδιο (εικ.2). Στο σπογγώδες οστό οι οστεώνες σχηματίζουν δοκίδες με ποικίλη διάταξη αναλόγως των εκάστοτε μηχανικών φορτίων, ενώ στις σχηματιζόμενες ενδιάμεσες κοιλότητες περιέχεται μυελός των οστών ή λίπος (εικ.2). Το σπογγώδες οστό είναι περισσότερο ενεργό μεταβολικά από ότι το φλοιώδες, το

οποίο αναλαμβάνει κυρίως ρόλους μηχανικής στήριξης. Ειδικότερα σε περιπτώσεις ταχείας ανακατασκευής του οστού όπως σε περίπτωση πώρωσης του κατάγματος, εμφανίζεται αρχικώς μια άλλη μορφή οστικής δομής, το εν είδει υφαντού οστό (woven bone), το οποίο λειτουργεί ως ικρίωμα πάνω στο οποίο οργανώνεται, αντικαθιστώντας το, το ώριμο πεταλιώδες οστό (lamellar bone).



Εικόνα 1 Σχηματική διαδικασία οστικής ανακατασκευής (Πηγή: Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. Recent Prog Horm Res. 2002).⁶



Εικόνα 2 Αβερσιανά συστήματα και θέση σπογγώδους και φλοιώδους οστού. Επιπλέον φαίνεται ότι η διαταραχή του φαινομένου σύζευξης, οδηγεί σε παθολογικό ή ανώριμο οστό (Πηγή: Miller MD, Thompson SR. Miller’s Review of Orthopaedics. 7th ed. Elsevier; 2015).⁴

2.2 Μεσοκυττάρια ουσία

Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελεί συντριπτικά το μεγαλύτερο μέρος του συνόλου της ιστικής μάζας (>90%) και αποτελείται από **ανόργανα** και **οργανικά** συστατικά (κολλαγόνο κυρίως τύπου 1, σάκχαρα, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, πεπτίδια, λιπίδια, οργανικά και ανόργανα ιόντα και νερό).

Πιο συγκεκριμένα, η **οργανική μεσοκυττάρια ουσία** (οστεοειδές) αποτελείται από το ινώδες στρώμα και την θεμέλια ουσία. Το κολλαγόνο, κυρίως τύπου 1, είναι το κυρίαρχο συστατικό σε ποσοστό 90%, αποτελείται από τριπλή έλικα από δύο α_2 και μία α_1 αλυσύς, παρέχει αντίσταση σε δυνάμεις εφελκυσμού ενώ φαίνεται να αναστέλλει την επιμετάλλωση⁴. Οι πρωτεογλυκάνες είναι μερικώς υπεύθυνες για προστασία σε δυνάμεις συμπίεσης και αποτελούν συμπλέγματα

γλυκοζαμινογλυκανών. Οι μη-κολλαγονοειδείς πρωτεΐνες της οργανικής ουσίας προάγουν την επιμετάλλωση και τον οστικό σχηματισμό⁴. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η οστεοκαλσίνη και η οστεονεκτίνη, που θεωρείται ότι εκκρίνονται από αιμοπετάλια και οστεοβλάστες, ελκύουν τους οστεοβλάστες, ενώ μάλλον φαίνεται να παίζουν ρόλο και στη ρύθμιση ασβεστίου ή στην οργάνωση των μετάλλων στη μεσοκυττάρια ουσία⁴. Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η οστεοποντίνη, που είναι κυτταροσυνδεδετική πρωτεΐνη, παρόμοια με τις ιντεγκρίνες⁴. Τέλος στην οργανική ουσία, σε πολύ μικρά ποσά, συναντούμε αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες (TGF-β, IGF, IL-1, IL-6, BMPs), που συμβάλλουν στην κυτταρική διαφοροποίηση, ενεργοποίηση, αύξηση και εναλλαγή⁴.

Η **ανόργανη μεσοκυττάρια ουσία** αποτελείται κυρίως από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], που παρέχουν αντίσταση σε δυνάμεις συμπίεσης, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποτελείται από φωσφορικό ασβέστιο⁴. Φαίνεται ότι αρχικώς η επιμετάλλωση συμβαίνει στα κενά του κολλαγόνου (τρύπες και πόροι) και δευτερευόντως στην περιφέρεια⁴.

2.3 Κύτταρα του οστίτη ιστού

Ο οστίτης ιστός περιέχει πληθώρα κυττάρων, μερικά από τα οποία αναφέρθηκαν ήδη, με διαφορετικούς ρόλους και κοινό σκοπό τη διατήρηση της ομοιοστασίας των οστών. Δύο είναι οι κυτταρικές σειρές που συναντούμε, τα κύτταρα οστεοπαραγωγής και τα κύτταρα οστεόλυσης. Τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα, είναι μονοπύρηνια και έχουν ως αφετηρία τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα, που με τη σειρά τους διαφοροποιούνται κατόπιν μιτωτικών αλληλουχιών σε οστεοβλάστες. Αντιθέτως, τα οστεολυτικά κύτταρα, είναι πολυπύρηνια κύτταρα της αιμοποιητικής αλυσίδας, προέρχονται από συγχώνευση μακροφάγων και διαφοροποιούνται στα κύτταρα που ονομάζονται οστεοκλάστες. Και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι απαραίτητες για την ομοιοστασία του σκελετού⁷.

Μεσεγχυματικά κύτταρα. Πρόκειται για αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται διάσπαρτα στον οστίτη ιστό και είναι έτοιμα να διαφοροποιηθούν προς τα

οστεοπρογονικά κύτταρα. Τα τελευταία μετατρέπονται σε οστεοβλάστες σε συνθήκες χαμηλής καταπόνησης και αυξημένης τάσης οξυγόνου⁴. Μετατρέπονται σε χόνδρο σε συνθήκες μέσης καταπόνησης και χαμηλής τάσης οξυγόνου, και σε ινώδη ιστό σε συνθήκες υψηλής καταπόνησης⁴. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα παίρνουν θέση στα αβερσιανά κανάλια, στο ενδόστεο και στο περίοστεο αναμένοντας το ερέθισμα για διαφοροποίηση⁴.

Οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες προέρχονται από αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα και είναι κυβοειδή κύτταρα διαταγμένα σε στρώσεις κατά μήκος ανώριμου οστεοειδούς⁴. Έχουν δύο κύριες λειτουργίες, την παραγωγή οστού και τη ρύθμιση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας⁴. Οι οστεοβλάστες που βρίσκονται κοντά στην οστική επιφάνεια είναι περισσότερο διαφοροποιημένοι, πιο ογκώδεις και μεταβολικά ενεργοί, ενώ οι βαθύτερα «παγιδευμένοι» σε ήρεμες περιοχές είναι λιγότερο ενεργοί, πιο αποπλατυσμένοι και συμβάλλουν στη διατήρηση του ιονικού περιβάλλοντος του οστού⁴. Οι τελευταίοι ενεργοποιούνται σε περίπτωση διάσπασης της εξωτερικής σειράς οστεοβλαστών⁴. Οι οστεοβλάστες μεταξύ άλλων (αυξητικοί παράγοντες όπως BMPs, Wnt πρωτεΐνες, RANKL) παράγουν αλκαλική φωσφατάση, οστεοκαλσίνη (διέγερση από 1,25 διυδροξύ-βιταμίνη-D), κολλαγόνο τύπου 1, οστική σιαλοπρωτεΐνη και οστεοπροτεγερίνη, η οποία συνδεόμενη με το RANKL περιορίζει τη δραστηριότητά του⁴. Η οστεοβλαστική δραστηριότητα διεγείρεται από την διακοπτόμενη έκθεση στην παραθυρεοειδική ορμόνη (PTH), ενώ αναστέλλεται από τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF- α ⁴. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε και κατανοήθηκε η σημασία του υποδοχέα LRP5 (συνυποδοχέας των πρωτεϊνών Wnt) και της σκληροστίνης, των οποίων η δράση ή αδράνεια μπορεί να οδηγήσει σε οστεοπόρωση ή οστεοσκλήρυνση (σύνδρομο Van Buchem).

Οστεοκλάστες. Είναι μεγάλα ακανόνιστα πολυπύρρηνα κύτταρα που προέρχονται από την αιμοποιητική κύτταρα της σειράς των μακροφάγων. Με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών αγκυροβολούν στην οστική επιφάνεια και δημιουργούν κυματοειδείς σχηματισμούς (λάχνες) στους οποίους περικλείεται οστό με αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας απορρόφησης. Τα σημεία απορρόφησης σχηματίζουν μικρές κοιλότητες που ονομάζονται κοιλότητες του Howship (Howships

lacunae). Αρχικώς απομονώνουν αποτελεσματικά το διάκενο μεταξύ οστού και οστεοκλάστη και έπειτα παράγουν στην επιφάνεια των λαχνών ιόντα υδρογόνου με τη βοήθεια της καρβονικής ανυδράσης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του pH και την αύξηση της διαλυτότητας των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, οπότε ακολουθεί απομάκρυνση του οργανικού υποστρώματος με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων μέσω της δραστηριότητας του λυσοσωμικού ενζύμου **καθειψίνη K**.

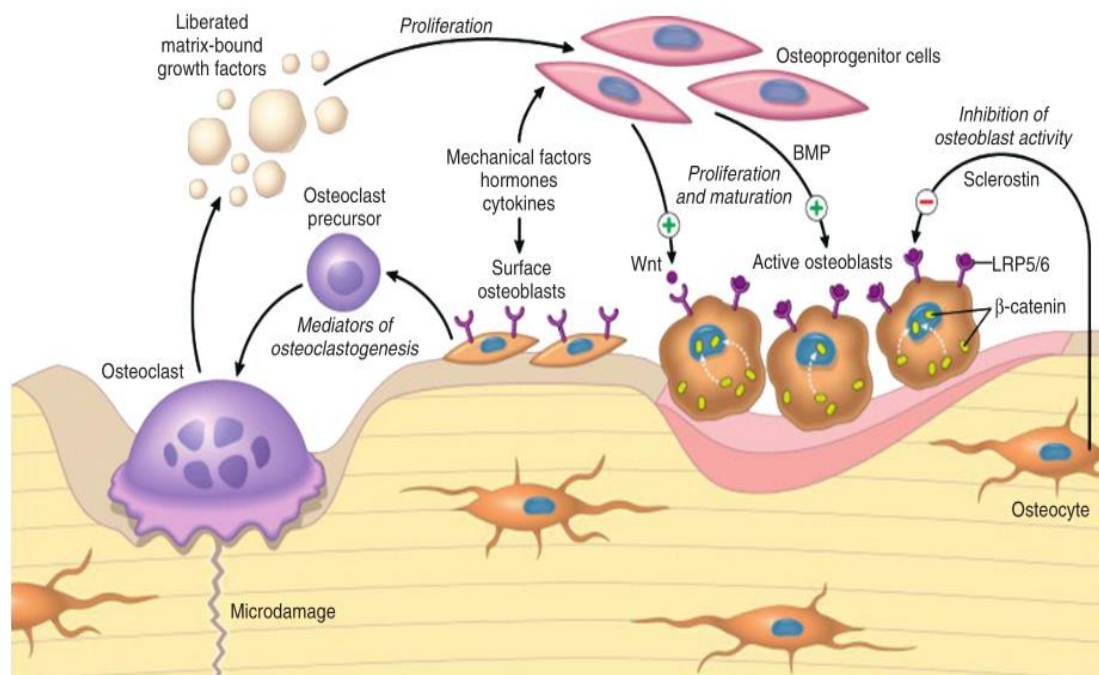
Οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα είναι οστεοβλάστες που παγιδεύονται στη νεοσχηματιζόμενη θεμέλια ουσία και είναι λιγότερο ενεργοί μεταβολικά απ' τους οστεοβλάστες όσον αφορά στην παραγωγή μεσοκυττάριας ουσίας. Παρ' όλα αυτά είναι σημαντικοί στον έλεγχο της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου ασβεστίου και φωσφόρου. Ενεργοποιούνται απευθείας από την καλσιτονίνη και αναστέλλονται από την PTH. Επιπλέον η σκληροσίνη που εκκρίνεται από τα οστεοκύτταρα βοηθά στην αρνητική ανατροφοδότηση της απόθεσης οστού από τους οστεοβλάστες. Σε περιοχές μάλιστα συγκεντρωμένης καταπόνησης παρατηρείται μείωση σκληροσίνης στα πλαίσια ρύθμισης της οστεοπαραγωγής με βάση τις μηχανικές φορτίσεις. Τα οστεοκύτταρα είναι αυτά που διατηρούν το οστό και αποτελούν το 90% των κυττάρων στον ώριμο σκελετό, ενώ φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο στην πώρωση καταγμάτων, στην οστική απώλεια, στην οστεοενσωμάτωση μοσχευμάτων και στις γενετικές οστικές παθήσεις.⁴

Επενδυματικά κύτταρα. Τα επενδυματικά κύτταρα είναι επίπεδα πλακώδη κύτταρα με επικύματη πυρήνα και επενδύουν εκείνες τις επιφάνειες στις οποίες υπάρχει οστική ηρεμία, δεν συμβαίνει δηλαδή απορρόφηση ή σχηματισμός. Αναφέρονται από διάφορους συγγραφείς και ως ανενεργοί οστεοβλάστες, οστεοπρογονικά ή μεσεγγυματικά κύτταρα. Επικοινωνούν με τα οστεοκύτταρα και έτσι υπάρχει έλεγχος στη συντονισμένη οστική απορρόφηση και παραγωγή.

Η εικόνα 3 αναπαριστά τον παρακρινή διάλογο ανάμεσα σε οστεοβλάστες και οστεοκλάστες, όπου επίσης φαίνεται η συμμετοχή των οστεοκυττάρων στην αναχαίτιση των οστεοβλαστών, η παραγωγή νέου οστού υπό των οστεοβλαστών και οι ανενεργοί οστεοβλάστες που ρυθμίζουν κατόπιν ερεθίσματος την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Πρόκειται για εξαιρετικά σύνθετες, διαπλεκόμενες και δυναμικές εν

ισορροπία διεργασίες, που κανένα σχήμα ή εικόνα δεν μπορεί να αποδώσει στην ολότητά τους.

Τα οστά περιβάλλονται εξωτερικά, εκτός απ' τις αρθρικές επιφάνειες, από το **περιόστεο**, το οποίο αποτελείται από μια ινώδη και μια κυτταρική στιβάδα. Η πρώτη αποτελείται από πυκνό συνδετικό οστό και αφομοιώνεται με το κολλαγόνο τενόντων και συνδέσμων, ενώ η δεύτερη αποτελείται από μεσεγχυματικά κύτταρα, οστεοπρογονικά κύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες. Το περιόστεο έχει πλούσια αγγείωση και νεύρωση, και σε περίπτωση κατάγματος είναι πολύ επώδυνο. Το **ενδόστεο** είναι στο αντίστοιχο περίβλημα στις εσωτερικές επιφάνειες των οστών, δηλαδή της μυελικής κοιλότητας, του σπογγώδους οστού αυτής και των Αβερσιανών σωλήνων (φλοιώδες, σπογγώδες και αβερσιανό αντίστοιχα).



Εικόνα 3 Παρακρινής διάλογος οστεοβλαστών-οστεοκλαστών. BMP, οστεομορφογενική πρωτεΐνη. LRP5/6, LDL υποδοχέας σχετιζόμενος με τις πρωτεΐνες 5 και 6 (Πηγή: Miller MD, Thompson SR. Miller's Review of Orthopaedics. 7th ed. Elsevier; 2015).⁴

2.4 Δομή και διάταξη του οστίτη ιστού

Η διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου στη μεσοκυττάρια ουσία διαφέρει ανάλογα με τη λειτουργία που εξυπηρετεί του παραγόμενο οστό, γεγονός που διαφοροποιεί τον οστίτη ιστό σε **πρωτογενή ή άωρο** και **δευτερογενή ή πεταλιώδη**.

Ο **πρωτογενής οστίτης ιστός** βρίθκει κυττάρων και διαθέτει ευρείες οστικές κοιλότητες ακανόνιστα διαταγμένες. Οι ίνες κολλαγόνου έχουν τυχαία διάταξη και η μεσοκυττάρια ουσία είναι πλημμελώς επιμεταλλωμένη. Αυτός ο τύπος ιστού παράγεται στα εμβρυικά κέντρα οστεοποίησης αλλά και ως πρώτη αντίδραση σε οστικό κάταγμα, αποτελώντας συνήθως την πρώτη μη οργανωμένη οστική πλήρωση της περιοχής που έχει ανάγκη από οστό, η οποία αντικαθίσταται τελικώς από τον οργανωμένο δευτερογενή οστίτη ιστό. Ο **δευτερογενής οστίτης ιστός** έχει λιγότερα κύτταρα από τον πρωτογενή και οι οστικές του κοιλότητες είναι στενότερες και νεφροειδείς, ενώ έχουν οργανωμένη διάταξη στη μεσοκυττάρια ουσία.

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο ώριμος οστίτης ιστός παρουσιάζεται σε δύο μορφές, το **σπογγώδες οστό** (cancellous) και το **φλοιώδες οστό** (cortical). Σε μικροσκοπικό επίπεδο και οι δύο μορφές οστού χαρακτηρίζονται από την ίδια δομική μονάδα, τον **οστεώνα**. Στο φλοιώδες οστό, οι οστεώνες έχουν κυλινδρικό σχήμα σαν σωλήνες, ονομάζονται **Αβερσιανά (Haversian) κανάλια ή συστήματα**, διατάσσονται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του οστού και διαθέτουν ένα αρτηρίδιο και ένα φλεβίδιο (εικ.2). Είναι πυκνό οστό και λειτουργεί ως κέλυφος προστασίας για το εσωτερικό του. Στο σπογγώδες οστό οι οστεώνες σχηματίζουν δοκίδες με ποικίλη διάταξη αναλόγως των εκάστοτε μηχανικών φορτίων, ενώ στις σχηματιζόμενες ενδιάμεσες κοιλότητες περιέχεται μυελός των οστών ή λίπος (εικ.2). Το σπογγώδες οστό είναι περισσότερο ενεργό μεταβολικά από ότι το φλοιώδες, το οποίο αναλαμβάνει κυρίως ρόλους μηχανικής στήριξης. Σε περιπτώσεις ανάγκης για ταχεία ανακατασκευή του οστού όπως σε περίπτωση πώρωσης του κατάγματος, εμφανίζεται αρχικώς μια άλλη μορφή οστικής δομής, το **εν είδει υφαντού οστού (woven bone)**, το οποίο λειτουργεί ως ικρίωμα πάνω στο οποίο οργανώνεται, αντικαθιστώντας το, το ώριμο **πεταλιώδες οστό (lamellar bone)**.

3. Πειραματικές μελέτες

3.1 Σύγκριση πειραματικών και κλινικών μελετών

Η κλινική μελέτη στον άνθρωπο θεωρητικά αποτελεί το ιδανικό πλαίσιο μελέτης μιας θεραπείας, μιας και διενεργείται στο καθεαυτό βιολογικό περιβάλλον για το οποίο προορίζεται. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες παράμετροι που εμποδίζουν την άρτια και ασφαλή ως προς τα συμπεράσματά της μελέτη, ειδικά σε παθήσεις που διαδράμουν εις μακρόν, όπως είναι η οστεοπόρωση. Καταρχάς η οστεοπόρωση εμφανίζεται σε άλλοτε άλλη ηλικία στους ανθρώπους, κυρίως σε προχωρημένες ηλικίες, οπότε είναι εξαιρετικά απαιτητική και χρονοβόρα διαδικασία η επιλογή ενός ορθού δείγματος με παρόμοια δημογραφικά και βιολογικά χαρακτηριστικά με ταυτόχρονη ίδια ηλικία εμφάνισης παρόμοιας -ποσοτικά μετρούμενης- απώλειας οστικής μάζας. Επιπλέον η θεραπεία είναι μακροχρόνια και η παρακολούθηση απαιτεί αρκετό χρονικό διάστημα εποπτείας, κατά τη διάρκεια του οποίου υπάρχει η πιθανότητα να αποσυρθούν κάποια άτομα για οποιονδήποτε λόγο, από προσωπική άρνηση ή μη συμμόρφωση στη θεραπεία μέχρι εμφάνιση παρενεργειών ή και θάνατο (από άλλα αίτια). Στην περίπτωση αυτή η στατιστική αξιοπιστία είναι δυνατό να πληγεί σημαντικά. Το ίδιο μπορεί να συμβεί σε περίπτωση που υπάρχουν συγχυτικοί παράγοντες (κυρίως άγνωστοι), οι οποίοι αλλοιώνουν τα δεδομένα, όπως ο πολύ διαφορετικός τρόπος ζωής των συμμετεχόντων, που ειδικά στην περίπτωση της οστεοπόρωσης συμβάλλει στην αλλοίωση του αποτελέσματος (πχ κατάχρηση αλκοόλ, φαρμάκων ή αντιθέτως υγιεινός τρόπος ζωής με άσκηση και σωστή διατροφή). Οι ίδιοι οι ερευνητές επίσης μπορεί να εγκαταλείψουν μια μακροχρόνια έρευνα όταν ο έλεγχος επί του δείγματος αρχίζει να γίνεται χρονοβόρος και επίπονος.

Οι πειραματικές μελέτες παρ' ότι μειονεκτούν ως προς το ότι η έρευνα γίνεται σε βιολογικό και μεταβολικό περιβάλλον που δεν είναι ταυτόσημο αλλά ομοιάζουν με το περιβάλλον στόχο (ανθρώπινος οργανισμός), διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των κλινικών μελετών της οστεοπόρωσης. Ένα βασικό πλεονέκτημα είναι ότι ο κύκλος ζωής πολλών ειδών ζώων είναι μικρός με αντίστοιχα μικρό περιοδικό αναπαραγωγικό κύκλο, με αποτέλεσμα να απαιτείται δραστικά μικρότερη χρονική διάρκεια μελέτης σε σχέση με τον άνθρωπο. Επί παραδείγματι

όσον αφορά τους επίμυες, που είναι το ζωικό πρότυπο που επιλέχθηκε για την παρούσα μελέτη, 13,2 μέρες ζωής του αντιστοιχούν σε 1 έτος ζωής του ανθρώπου⁸ (εικ.4). Πολλές φορές μάλιστα μπορούν τα ίδια τα ζώα να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου και ομάδα παρέμβασης.

Ειδικότερα τα ζώα εργαστηρίου συγκεντρώνουν κι άλλα πλεονεκτήματα, τα οποία προκύπτουν από το γεγονός ότι γεννώνται και εκτρέφονται με σκοπό να εξυπηρετήσουν την έρευνα. Με τα ζώα εργαστηρίου δίνεται πλέον η δυνατότητα να έχουμε ομοιογενές δείγμα ως προς το γενετικό υπόβαθρο, το είδος, την ηλικία και το φύλο ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε μελέτης (όπως θα περιγραφτεί αργότερα για την παρούσα μελέτη). Επιπλέον το επίπεδο της υγείας τους είναι γνωστό και ελεγχόμενο και, εφόσον οι εργαστηριακές συνθήκες της μελέτης είναι αυστηρών προδιαγραφών με κατάλληλο εξοπλισμό, μπορεί να παραμείνει σταθερό για όλη τη διάρκεια μιας μελέτης. Επίσης στα ζώα είναι δυνατόν να δοκιμασθούν περισσότερο επιθετικά θεραπευτικά σχήματα, που θα ήταν αδύνατο να εφαρμοσθούν στον άνθρωπο ενώ τέλος στα ζώα έχουμε τη δυνατότητα να λάβουμε δείγματα ιστών και ολόκληρων οργάνων για μελέτη *ex vivo*, όπως ο έλεγχος της μηχανικής αντοχής των οστών⁹, κατά τον οποίο αφαιρείται χειρουργικά ολόκληρο το οστό από το ζώο και υπόκειται σε ειδικές δοκιμασίες φόρτισης.

Correlating human year with rat days with different phases of life		
Entire life span	13.2 rat days	=1 human year
Weaning period	42.4 rat days	
Pre-pubertal period	3.3 rat days	
Adolescent period	10.5 rat days	
Adulthood	11.8 rat days	
Aged phase	17.1 rat days	
Average	16.4 rat days	
Rat age versus human age: Social maturity phase		
Rat age (years)	Human age (years)	
6 months (0.5)	18	
12 months (1.0)	30	
18 months (1.5)	45	
24 months (2.0)	60	
30 months (2.5)	75	
36 months (3.0)	90	
42 months (3.5)	105	
45 months (3.75)	113	
48 months (4.0)	120	

Εικόνα 4 Συσχετισμός ανθρώπινης ηλικίας με αυτήν των επίμυων (Πηγή: Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 2013).⁸

3.2 Ηθικό πλαίσιο

Κάθε ερευνητική μελέτη, είτε αφορά ανθρώπους, είτε ζώα, θα πρέπει να υπόκειται σε ηθική αξιολόγηση, από το σχεδιασμό της μέχρι την ολοκλήρωσή της. Αυτό δεν αποτελεί μόνο ηθικό χρέος των ερευνητών αλλά επιπλέον θεσμοθετημένη απαίτηση για διεξαγωγή μελετών με αναγκαία συνθήκη να σέβονται τη ζωή και να αξιοποιούν τα ζώα με τη λιγότερη δυνατή παρέμβαση και ταλαιπωρία προς όφελος της προαγωγής της υγείας και των ανθρώπων. Το παραπάνω πλαίσιο τίθεται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63/EU και το Προεδρικό Διάταγμα 56/2013 που επιβάλλει την τήρησή της. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε ήδη, για τη διεξαγωγή πρωτοκόλλων σε Ζώα Εργαστηρίου θα πρέπει να τεκμηριώνεται η συμμόρφωση στις αρχές των τριών R, και για το λόγο αυτό τα πρωτόκολλα ελέγχονται αυστηρά από

την Περιφερειακή Κτηνιατρική Αρχή ή οποία τελικώς εισηγείται στην εκάστοτε περιφέρεια για την έγκριση του πρωτοκόλλου.

Πιο συγκεκριμένα η εφαρμογή των τριών R στην πειραματική έρευνα με Ζώα Εργαστηρίου περιλαμβάνει αρκετές ηθικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη. Αρχικώς θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι η εκάστοτε έρευνα δεν έχει καλές πιθανότητες να γίνει με εναλλακτικούς τρόπος, ώστε έτσι να δικαιολογείται η χρήση ζώων ως τελικής γραμμής λύση. Επιπλέον θα πρέπει να γίνεται από τους ερευνητές τεκμηριωμένη ανάλυση του προσδοκώμενου οφέλους στην υγεία του ανθρώπου, των ζώων ή του περιβάλλοντος σε σχέση με τις βλάβες που θα υποστούν τα ζώα (harm/benefit analysis). Θα πρέπει επίσης η έρευνα να έχει σαφή δυνατότητα πρακτικής εφαρμογής. Επίσης θα πρέπει να μειώνεται στο μέγιστο δυνατό βαθμό η ταλαιπωρία των ζώων και να διασφαλίζεται η ευζωία τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και τέλος η ερευνητική ομάδα πρέπει να είναι εξοικειωμένη και κατάλληλα εκπαιδευμένη στη διαχείριση ζωικών ειδών σε εργαστηριακές συνθήκες.

3.3 Κριτήρια επιλογής ζωικού προτύπου

Πολλές θεραπευτικές μέθοδοι που έχουν εισαχθεί στην κλινική πρακτική, έχουν μελετηθεί αρχικώς σε διάφορα ζωικά πρότυπα^{10,11}. Όπως διατυπώθηκε υπάρχει η δυνατότητα για αυξημένη ομοιογένεια και η δυνατότητα για εκτεταμένες δοκιμές σε υποψήφιες νέες θεραπείες. Πέρα από τη γενική αυτή παραδοχή, δεν είναι όλα τα ζωικά πρότυπα κατάλληλα για όλες τις μελέτες και όλες τις παθήσεις. Πρέπει να πληρούνται κάποια κριτήρια, διαφορετικά κάθε φορά, ώστε το επιλεχθέν ζωικό πρότυπο να επιτρέψει την ομαλή διεξαγωγή της έρευνας αλλά και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

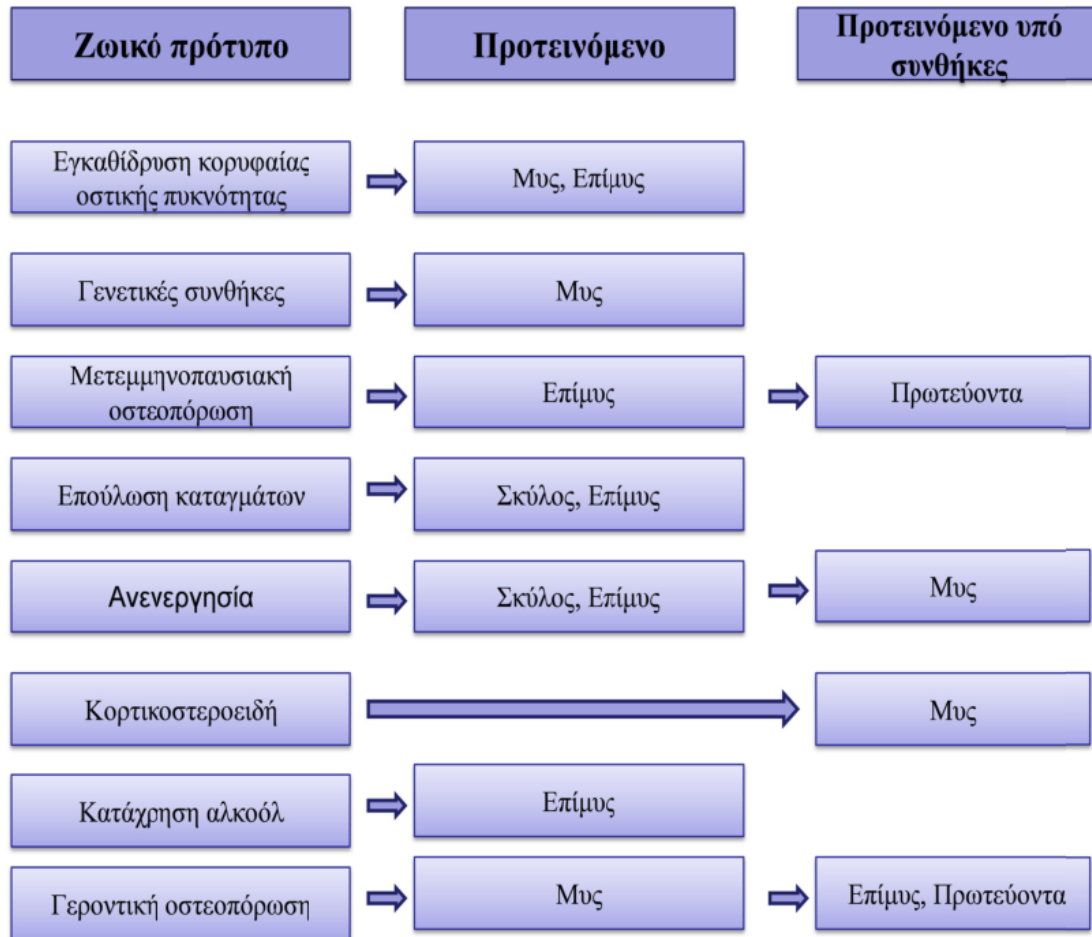
Καταρχάς το ζωικό πρότυπο πρέπει τεκμηριωμένα να μπορεί να αναπαράγει αξιόπιστα την πάθηση για την οποία επιλέγεται, να είναι εύκολα διαθέσιμο στο ερευνητικό κέντρο και με διαχειρίσιμο κόστος για την απόκτηση και παρακολούθηση, να μπορεί να υποστεί εργαστηριακό εγκλεισμό χωρίς ανεπιθύμητες επιπτώσεις. Το μέγεθος και το βάρος είναι επίσης ένας σημαντικός

παράγοντας στην επιλογή ζωικού προτύπου. Τα μικρόσωμα ζώα μπορούν να στεγαστούν εύκολα κατά ομάδες και σε μεγάλους αριθμούς, επιτρέποντας έτσι στατιστικώς ισχυρά αποτελέσματα. Επίσης επιτρέπουν ευκολότερη διεξαγωγή κάποιων απαραίτητων διαδικασιών (όπως ζύγιση ή υποβολή σε διαγνωστικές εξετάσεις, πχ ακτινογραφία ή μέτρηση οστικής μάζας). Τα μεγαλόσωμα ζώα έχουν το πλεονέκτημα ότι παρέχουν ευκολία λήψης βιολογικού υλικού (αίμα, ούρα, βιοψίες οργάνων και οστών) και πραγματοποίηση χειρουργικών επεμβάσεων. Επίσης η κοινωνική αποδοχή των πειραματικών πρωτοκόλλων είναι μια άλλη συνιστώσα που πρέπει να λαμβάνει κανείς υπ' όψη, τόσο ως προς τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους, όσο και ως προς το ζωικό είδος που υποβάλλεται σε αυτές⁹.

Για την οστεοπόρωση το κάθε υποψήφιο ζωικό είδος θα πρέπει να ελέγχεται για μερικές βασικές ιδιότητες του μυοσκελετικού του, ώστε να μπορεί θεωρηθεί ομοιάζον με τις ιδιότητες του ανθρώπινου μυοσκελετικού. Το ορμονικό προφίλ του οιστρικού κύκλου, η ηλικία απόκτησης της κορυφαίας οστικής πυκνότητας, η ύπαρξη (ή μη) ηλικιοεξαρτώμενης οστικής απώλειας είναι κάποιες βασικές ιδιότητες. Επιπλέον σημασία έχει η παρουσία εξαρτώμενης απ' τα οιστρογόνα οστικής απώλειας και η αντιστροφή της με οιστρογονική υποκατάσταση και η εμφάνιση στο ζωικό είδος αυθόρμητων ή χαμηλής βίας καταγμάτων. Ειδικά το τελευταίο είναι σημαντικό πρόβλημα, μιας και στα περισσότερα ζωικά είδη στην έρευνα της οστεοπόρωσης είναι εξαιρετικά δύσκολο να προκληθεί επιτηδευμένο κάταγμα χαμηλής βίας (αλλά και αυθόρμητο). Επομένως θα ήταν πιο σωστό να ομιλούμε για οστεοπενία στα ζωικά πρότυπα και όχι για οστεοπόρωση. Δεδομένου όμως ότι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας θέτει διάγνωση οστεοπόρωσης όταν η μέτρηση οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο μέτρησης DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) είναι μικρότερη των 2,5 μονάδων σταθερής απόκλισης από το μέσο όρο υγιών ενηλίκων, είναι σαφές ότι η συνθήκη της οστεοπόρωσης μπορεί να προκληθεί με πειραματικούς χειρισμούς στα ζωικά πρότυπα.¹²

Τα ζωικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί στις έρευνες για την οστεοπόρωση είναι τα πρωτεύοντα, τα πρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι, οι κόνικλοι, οι επίμυες και οι μύες⁹. Η καταλληλότητα βέβαια κάθε ζωικού προτύπου εξαρτάται από το

πρωτόκολλο και τα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους¹². Στην εικόνα 5 φαίνεται σχηματικά ο αλγόριθμος προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων Ζωικών Προτύπων στην έρευνα οστεοπόρωσης.

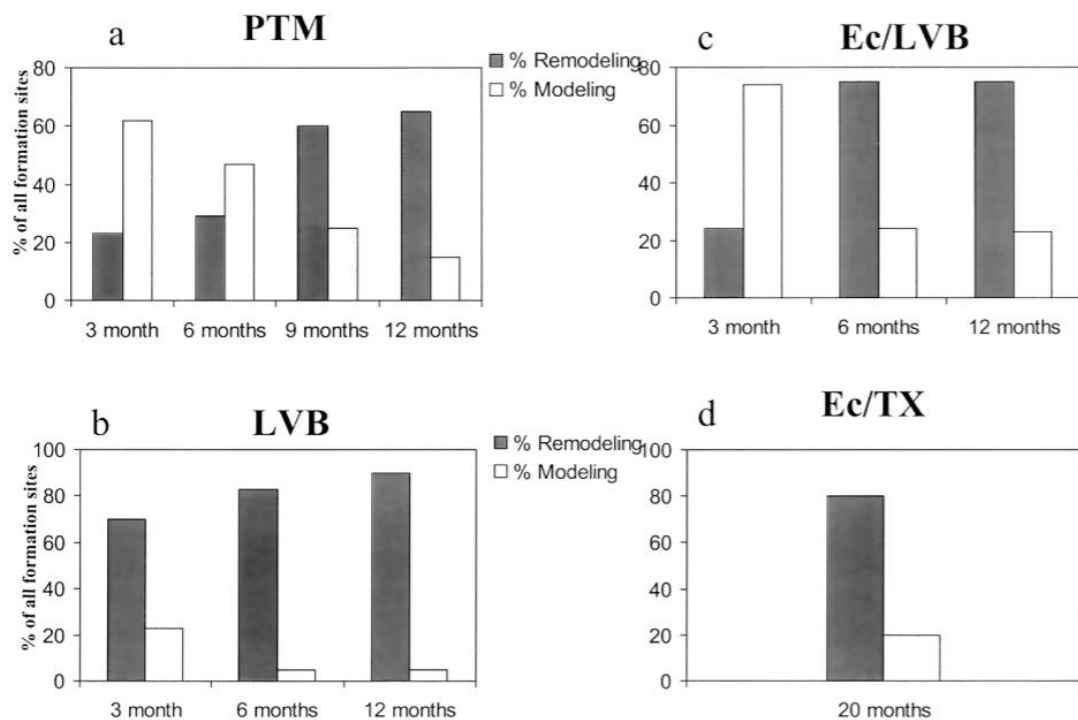


Εικόνα 5 Αλγόριθμος προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων Ζωικών Προτύπων στην έρευνα οστεοπόρωσης (Πηγή: Διδακτορική διατριβή Λελόβα Παύλου, 2011).¹²

3.4 Επιλογή Επίμυος ως Ζωικό Πρότυπο

Ο επίμυς αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης¹¹. Έχει αποδειχθεί ότι ο σκελετός του επίμυος πραγματοποιεί οστική κατασκευή αρχικώς (modeling), ενώ αργότερα μεταπίπτει σε οστική ανακατασκευή (remodeling)¹⁰, που είναι απαραίτητο για την

καταλληλότητά του ως ζωικό πρότυπο, μιας και στον ανθρώπινο σκελετό έχουμε διαρκή οστική ανακατασκευή (remodeling) με το φαινόμενο της σύζευξης όπως αναφέρθηκε ανωτέρω και φαίνεται στην εικόνα 1. Στην εικόνα 6 φαίνεται ότι η μετάβαση στην οστική ανακατασκευή επέρχεται στην ηλικία των 3 μηνών για το σπογγώδες οστό των οσφυϊκών σπονδύλων, ενώ επέρχεται στην ηλικία 6-9 μηνών για την εγγύς μετάφυση της κνήμης¹⁰. Όσον αφορά στο ενδοφλοιώδες οστό των παραπάνω σημείων, αυτή η μετάβαση γίνεται στην ηλικία 3-6 και 9-12 μηνών αντίστοιχα¹⁰.



Εικόνα 6 Οστική κατασκευή και ανακατασκευή στο σπογγώδες οστό θηλυκών επίμουσ τύπου Wistar με ηλικία 3-12 μήνες. Η οστική ανακατασκευή υπερσχύει συντριπτικά στα ηλικιωμένα ζώα (>12 μήνες). PTM, εγγύς μετάφυση κνήμης. Ec/LVB, ενδοφλοιώδες οστό οσφυϊκών σπονδύλων. LVB, σπογγώδες οστό οσφυϊκών σπονδύλων. Ec/TX, ενδοφλοιώδες οστό διάφυσης κνήμης. Modeling-Remodeling, Κατασκευή-Ανακατασκευή. (Πηγή: Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001).¹⁰

Μετά την ηλικία των 12 μηνών όπως φαίνεται στην εικόνα 6 κυριαρχεί πλέον η οστική ανακατασκευή στο σκελετό του επίμουσ, τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό. Πέραν τούτου, ορισμένα μακρά οστά στους επίμους συνεχίζουν να αυξάνονται κατά μήκος σχεδόν ισοβίως, ενώ σε αρσενικούς επίμους συναντούμε

ανοιχτές επιφύσεις και μετά την ηλικία των 30 μηνών¹⁰. Η οστική ανάπτυξη των εγγύς και άπω επιφύσεων κνήμης στους θηλυκούς επίμυες σταματά σε ηλικία 15 και 3 μηνών αντιστοίχως¹³ και στους οσφυϊκούς σπονδύλους στους 21 μήνες¹⁰.

Παρά την παρατεινόμενη αυτή αύξηση, ο ρυθμός φθίνει σημαντικά και έτσι μετά τους 10 μήνες, σημείο που σηματοδοτεί την απόκτηση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας, ο ρυθμός οστικής ανάπτυξης της εγγύς επίφυσης κνήμης είναι λιγότερος των 3 μm ημερησίως, όπερ σημαίνει ότι η απομένουσα επιμήκης ανάπτυξη του γειτονικού στην επιφυσιακή γραμμή οστού θα είναι μικρότερη του 1 mm. Επομένως οι οστικές μετρήσεις που στοχεύουν στην μέτρηση της οστικής ανακατασκευής θα πρέπει να γίνονται 1 mm μακριά από την επιφυσιακή γραμμή με κατεύθυνση τη διάφυση¹². Έτσι διασφαλίζεται ότι δεν θα μετρηθεί οστό σε φάση κατασκευής, πρωτογενές δηλαδή, το οποίο θα αναπτυσσόταν αναπόφευκτα στη θέση αυτή⁹. Στους οσφυϊκούς σπονδύλους αυτή η απόσταση είναι 0,5 mm από την επιφυσιακή γραμμή ενώ στην άπω επίφυση της κνήμης που η επίφυση κλείνει στους 3 μήνες όπως αναφέρθηκε, οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν στο οστό αμέσως κάτω από το χόνδρο της αρθρικής επιφάνειας¹⁴⁻¹⁶. Το γεγονός ότι υπάρχει αυτή η διαρκής αύξηση σε διάφορα οστικά τμήματα των επίμυων καθιστά απαραίτητη τη χρήση ομάδας ελέγχου, ώστε να μπορεί να γίνει διαφοροποίηση της οστικής μεταβολής που οφείλεται στην πειραματική παρέμβαση από εκείνη της φυσιολογικής οστικής εξέλιξης⁹.

Ένα πρόβλημα που προκύπτει με τη χρήση επίμυων για την έρευνα της οστεοπόρωσης είναι ότι στο φλοιώδες οστό δεν συναντούμε Αβερσιανή οστική ανακατασκευή, μιας και εκεί παρατηρείται αύξηση στο περιόστεο και απώλειες στο ενδόστεο¹⁷. Στο συγκεκριμένο πρόβλημα τα μεγαλύτερα ζωικά πρότυπα είναι πιο κοντά στην ανθρώπινη Αβερσιανή ανακατασκευή, όπως ο σκύλος, ο κόνικλος, ο μικρός χοίρος και το πρόβατο, ωστόσο υπάρχουν άλλα ενδογενή μειονεκτήματα που περιορίζουν σημαντικά την επιλογή τους για την πειραματική μελέτη της οστεοπόρωσης¹⁷. Επί παραδείγματι ο σκύλος, πέραν των ηθικών διλημάτων, έχει ακατάλληλο πρότυπο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και υψηλό κόστος συντήρησης¹⁷. τα πρωτεύοντα, επίσης πέραν των ηθικών προβληματισμών, έχουν υψηλό κόστος απόκτησης και συντήρησης, δεν διατίθεται εύκολα στα ερευνητικά

κέντρα, εκδηλώνουν βραδέως οστεοπενικές αλλοιώσεις ενώ φέρουν τον κίνδυνο μεταφοράς ζωανθρωπονόσων¹⁷. Τα πρόβατα, οι κόνικλοι και οι χοίροι δεν έχουν επαρκώς χαρακτηριστεί πρότυπα οστεοπόρωσης¹¹.

Το μεγαλύτερο μέρος της οστικής απώλειας στις έρευνες με ζωικά πρότυπα οστεοπόρωσης παρατηρείται στις ενδοστικές επιφάνειες και επιπλέον η ωθηκεκτομή στον ώριμο επίμυ επιφέρει συνθήκες που μοιάζουν με αυτές της εμμηνόπαυσης στον άνθρωπο¹². Ειδικότερα κατόπιν χειρουργικής ωθηκεκτομής παρατηρείται απώλεια στο σπογγώδες και στο ενδοφλοιώδες οστό, όπως και στον άνθρωπο που η Αβερσιανή ανακατασκευή διαδραματίζει μικρό ρόλο σε σχέση με την κυριαρχούσα απώλεια στο σπογγώδες και ενδοφλοιώδες οστό¹⁸. Επομένως, και κυρίως λόγω των δυσκολιών που έχουν τα άλλα πρότυπα, το πρόβλημα της έλλειψης Αβερσιανής ανακατασκευής στους επίμυες θα μπορούσε να αγνοηθεί^{9,10}. Αξίζει βέβαια να αναφερθεί ξανά ότι, παρά τις ομοιότητες της οστεοπενίας που εμφανίζεται στον επίμυ λόγω ηλικίας, ένδειας οιστρογόνων ή ανενεργησίας με την ανθρώπινη οστεοπόρωση, είναι εξαιρετικά δύσκολο να αναπαραχθεί το κατάγμα χαμηλής βίας εργαστηριακά, που είναι το κύριο χαρακτηριστικό στην ανθρώπινη οστεοπόρωση¹².

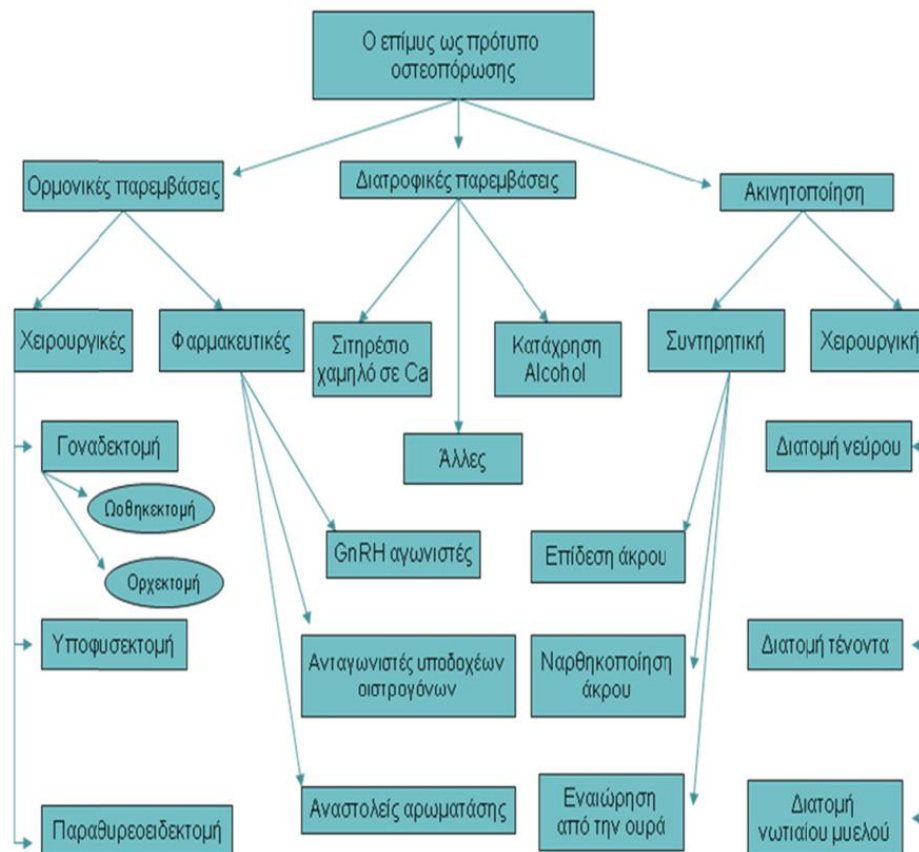
3.5 Πειραματικά επαγόμενη οστεοπόρωση στον επίμυ

Η πρόκληση οστεοπενίας στον επίμυ μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλούς τρόπους, καθένας από τους οποίους στοχεύει σε διαφορετική παράμετρο πρόκλησης. Μπορεί η παρέμβαση να είναι ορμονική, διατροφική ή να περιορίζει τη σωματική κίνηση. Ο ρυθμός οστικής απώλειας που θα επιτευχθεί εξαρτάται από τη μέθοδο που θα επιλεγεί, από τα σημεία των οστών που θα εκτιμηθούν και από το αν έχουμε απώλεια σπογγώδους ή φλοιώδους οστού¹⁰. Η εικόνα 7 δείχνει σχηματικά τους τρόπους πρόκλησης οστεοπόρωσης στον επίμυ. Όσον αφορά τον επίμυ, παρ' ότι φθάνει σε σεξουαλική ωριμότητα σε ηλικία 2,5 μηνών, θεωρείται ώριμος σκελετικά μετά τους 10 μήνες^{10,11}. Είναι αυτονόητο ότι ο ανώριμος σκελετικά επίμυς μπορεί να μελετηθεί ως προς την απόκτηση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας αλλά όχι για την οστεοπόρωση, για την οποία απαιτείται συντελεσμένη σκελετική

ωρίμανση ώστε να μπορεί να καταγραφεί πραγματική απώλεια χωρίς να υπάρχει παράλληλη αύξηση του οστού. Για το λόγο αυτό η ηλικία των επίμυων επιλέγεται να είναι άνω των 10 μηνών. Ο σκελετικά ώριμος επίμυος θεωρείται κατάλληλο πρότυπο για τη μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης¹¹.

3.6 Το πρότυπο του ωθηκεκτομημένου επίμυος

Παρά την ύπαρξη διαφόρων τρόπων επίτευξης οστεοπενίας/οστεοπόρωσης στον επίμυ, με κυριότερα της ωθηκεκτομής και της ανενεργησίας, το πρότυπο του ωθηκεκτομημένου επίμυος επικρατεί στις ερευνητικές αναζητήσεις διότι μοιάζει ως συνθήκη με την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση στον άνθρωπο, όπου έχουμε αιφνίδια πτώση οιστρογόνων στην κυκλοφορία. Η ανενεργησία ενδεχομένως θα ταίριαζε περισσότερο σε έλεγχο π.χ. της οστικής απώλειας του ανθρώπου σε συνθήκες έλλειψης βαρύτητας ή πλήρους ακινησίας λόγω τραυματισμού ή νευρολογικής πάθησης.



Εικόνα 7 Αλγόριθμος πειραματικά επαγόμενης οστεοπενίας/οστεοπόρωσης στον επίμυο. (Πηγή: Λελόβας Π, Παύλος. Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος *Sideritis eufoea* στην οστική απώλεια ωοθηκεκτομημένων επιμύων. 2011).¹²

Η ωοθηκεκτομή του επίμυος έχει σαν αποτέλεσμα την απότομη στέρση των οιστρογόνων, γεγονός που επιφέρει αρκετές μεταβολές στο μυοσκελετικό του σύστημα. Πράγματι ακολουθεί ταχεία απώλεια οστικής μάζας και αντοχής στο σπογγώδες οστό, με τελικώς επιβραδυμένο ρυθμό οστικής απώλειας¹⁹. Τα οστά παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής διαφορετικό σε κάθε σημείο των οστών¹⁰, και τα χαρακτηριστικά αυτής της απώλειας έχουν κοινές παραμέτρους με αυτήν που συμβαίνει στον άνθρωπο μετά από ωοθηκεκτομή ή εμμηνόπαυση¹⁸.

Περαιτέρω η οστική απώλεια μπορεί να παρατηρηθεί με στατιστική ασφάλεια και βεβαιότητα το νωρίτερο 14 μέρες στην εγγύς μετάφυση της κνήμης, 60 μέρες στους οσφυϊκούς σπονδύλους και 30 μέρες στον αυχένα του μηριαίου¹⁰. Η εξισορρόπηση αυτής της απώλειας γίνεται σε 90 μέρες στην εγγύς μετάφυση της

κνήμης και σε 270 μέρες για τους οσφυϊκούς σπονδύλους, οπότε η οστική απώλεια είναι παρόμοια με τον οστικό σχηματισμό^{20,21}. Όσον αφορά στο φλοιώδες οστό της διάφυσης του μηριαίου φαίνεται ότι σημαντικές αλλαγές στην αντοχή συμβαίνουν μετά τους 9 μήνες, παρ' ότι το εύρος του μειώνεται στους 6 μήνες¹⁰.

Όπως θα συζητηθεί αναλυτικότερα στο Ειδικό Μέρος, υπάρχουν πολλές έρευνες, και όχι σε πλήρη συμφωνία, ως προς τη διάρκεια στην οποία παρατηρούνται οι διάφορες μεταβολές στα οστά μετά από ωθηκεκτομή, δηλαδή σε πόσες μέρες παρατηρείται απώλεια οστού και αντοχής στις διαφύσεις και μεταφύσεις του ωθηκεκτομημένου επίμυος. Για το λόγο αυτό ποικίλει σε μεγάλο βαθμό η διάρκεια που επιλέγουν οι ερευνητές για τις πειραματικές μελέτες στο συγκεκριμένο πρότυπο οστεοπόρωσης. Η διάρκεια αυτή παρουσιάζει αρκετά διαφορετικό εύρος, που κυμαίνεται από 4 έως 24 εβδομάδες.

4. Μέθοδοι μέτρησης της ποιότητας των οστών

Ο εξοπλισμός και η διαδικασία εξέτασης των οστών στα ζώα είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο, ειδικά όταν δεν υπάρχουν περιορισμοί υποδοχής των ζώων στο εκάστοτε μηχάνημα. Βασική διαφορά είναι ότι λόγω της δυσκολίας στη διαχείριση των ζώων εργαστηρίου γίνεται χρήση ειδικών πρωτοκόλλων, τα οποία συχνά περιλαμβάνουν γενική αναισθητοποίηση για τη διενέργεια μιας απλής απεικονιστικής εξέτασης. Επιπλέον στα ζώα εργαστηρίου έχουμε τη δυνατότητα για πιο επιθετικές μετρήσεις, όπως είναι η χειρουργική αφαίρεση ολόκληρου του οστού και η υποβολή του σε δοκιμασίες μηχανικής αντοχής, γεγονός που συνεπάγεται την ευθανασία του ζώου και τη λήξη του πειραματικού σταδίου με ζώντα υποκείμενα. Από τη στιγμή της χειρουργικής αφαίρεσης του οστού δεν υπάρχει η δυνατότητα για περαιτέρω επίδραση στις μηχανικές του ιδιότητες, το οποίο αυτονόητα σηματοδοτεί το τέλος των πειραματικά επαγόμενων μεταβολών, οπότε απομένει η μελέτη επί των δειγμάτων. Τα στάδια που ακολουθούν είναι εξίσου σημαντικά, διότι τα οστά εξετάζονται για μηχανική αντοχή σε άλλο ειδικό πλαίσιο και διαφορετική ημέρα από αυτήν της χειρουργικής εκτομής, γεγονός που επιβάλλει την ανάγκη για προσεκτική διατήρηση των

δειγμάτων, ώστε να μην έχουμε αλλοίωση των αποτελεσμάτων, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κάθε ερευνητικό πλαίσιο επιλέγει τις μεθόδους μέτρησης ανάλογα με τις υποδομές που διαθέτει, γεγονός που δίνει διαφορετικές ευκαιρίες ανάλυσης στα διάφορα ιδρύματα. Ωστόσο η επιστημονική πληροφορία που συλλέγεται αποτελεί αναμφισβήτητα χρήσιμη προσθήκη, άλλοτε εναντίωσης, άλλοτε συμπλήρωσης και άλλοτε προστιθέμενης πληροφορίας, που συμβάλλει στη διαχρονική κατανόηση των μηχανικών ιδιοτήτων των οστών. Οι μεθοδολογία και οι εργαστηριακές δυνατότητες της παρούσης μελέτης θα αναλυθούν στο Ειδικό Μέρος, όπου θα συζητηθεί και η αποκτηθείσα επιστημονική γνώση.

4.1 Πυκνομετρία

Όπως και στους ανθρώπους, έτσι και στα ζώα εργαστηρίου, χρησιμοποιείται η μέθοδος της απορροφησιομετρίας μονής και διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων-Χ (Dual Energy X-ray Absorptiometry ή DEXA ή DXA), εφεξής DEXA, για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας (Bone Mineral Density, εφεξής BMD) και της οστικής μάζας (Bone Mineral Content, εφεξής BMC) των διαφόρων οστών²². Η εξέλιξη της ιατρικής τεχνολογίας έφερε αυξημένες δυνατότητες στις συσκευές μέτρησης οστικής πυκνότητας/μάζας, με αποτέλεσμα να μπορούμε να μετρούμε με λεπτομέρεια μικρές οστικές περιοχές, γεγονός που βρίσκει εξαιρετική εφαρμογή στην περίπτωση μικρών ζώων, όπως ο επίμυος, όπου μπορεί να γίνει κανονικά μέτρηση οστικής πυκνότητας στο ίδιο μηχάνημα μέτρησης του ανθρώπου και με τη χρήση ειδικού λογισμικού και πρωτοκόλλου (Small Animal Body protocol), όπως φαίνεται στην εικόνα 8.

Η μέτρηση οστικής πυκνότητας αναφέρεται στο επιμεταλλωμένο περιεχόμενο του οστού με αναγωγή του τρισδιάστατου οστού στις 2 διαστάσεις, μιας και το φιλμ που δέχεται τις ακτίνες Χ είναι μια δισδιάστατη μεμβράνη. Αυτό σημαίνει ότι στις περιπτώσεις που το οστό βρίσκεται σε ανάπτυξη, αυξάνεται τόσο σε μήκος όσο και σε πάχος με αποτέλεσμα να η μεταβολή της οστικής πυκνότητας

από την δισδιάστατη πληροφορία που λαμβάνουμε να μην είναι με ασφάλεια αντιπροσωπευτική της πραγματικής κατάστασης του καθατού οστού. Η επιφάνεια διατομής και η οστική μάζα αλλάζουν ταυτόχρονα και μπορεί η ωθηκεκτομή να επηρεάσει τις δύο αυτές παραμέτρους αναντίστοιχα ή και αντίθετα. Από την άλλη η μέτρηση οστικής μάζας παρέχει ποσοτική μόνο μέτρηση της επιμεταλλωμένης μάζας. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε κάθε μελέτη με ζώα εργαστηρίου. ¹¹

Patient:		Patient ID:	
Birth Date:		Measured:	10:04:22 ημ (7,51)
Height / Weight:	25,0 cm 0,3 kg	Analyzed:	7:01:11 ημ (7,51)
Sex / Ethnic:	Female White		

ANCILLARY RESULTS [Small Animal Body]

Region	BMD ¹² (g/cm ³)	Young-Adult (%) T-Score	Age-Matched (%) Z-Score	BMC ¹² (g)	Area ⁴ (cm ⁴)
Head	0,311	-	-	3,0	10
Arms	0,000	-	-	0,0	0
Legs	0,174	-	-	2,2	13
Trunk	0,185	-	-	7,0	38
Ribs	0,140	-	-	2,3	16
Pelvis	0,211	-	-	2,7	13
Spine	0,226	-	-	2,1	9
Total	0,203	-	-	12,3	61

BODY COMPOSITION ¹²

Region	Tissue (%Fat)	Region (%Fat)	Tissue (g)	Fat (g)	Lean (g)	BMC (g)	Total Mass (kg)
Left Arm	37,4	37,4	1	0	1	0,0	-
Left Leg	26,4	25,1	14	4	10	0,8	-
Left Trunk	31,0	30,1	115	36	79	3,3	-
Left Total	30,6	29,4	144	44	100	5,9	-
Right Arm	37,3	37,3	1	0	0	0,0	-
Right Leg	26,2	24,4	20	5	15	1,4	-
Right Trunk	31,0	30,1	126	39	87	3,8	-
Right Total	30,4	29,2	158	48	110	6,4	-
Arms	37,4	37,4	2	1	1	0,0	-
Legs	26,3	24,7	34	9	25	2,2	-
Trunk	31,0	30,1	241	75	166	7,0	-
Total	30,5	29,3	303	92	210	12,3	0,315

Εικόνα 8 Σε αυτό το δείγμα φαίνεται η μέτρηση οστικής πυκνότητας ανά περιοχή σε επίμου βάρους μόλις 300 γραμμαρίων.

Πέρα από την οστική πυκνομετρία παίρνουμε και πληροφορίες που αφορούν τα ποσοστά μυϊκού και λιπώδους ιστού, που μπορεί να είναι χρήσιμα στα πρωτόκολλα ωθηκεκτομής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μηχανική αντοχή των οστών δεν είναι αναλογικά συνδεδεμένη με την οστική πυκνότητα (BMD), το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι το πόσο ανθεκτικό είναι το οστό δεν εξαρτάται απαραίτητα

από την μετρούμενη οστική πυκνότητα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι επιδράσεις της ωθηκεκτομής στην BMD καθώς και στην μικροαρχιτεκτονική των οστών είναι εξαρτώμενη κάθε στιγμή από την ηλικία και το σημείο που μετράται, καθιστώντας το πεδίο αυτό ακόμα εξερευνησίμο^{23,24}. Έχει πάντως διατυπωθεί ότι η μετρούμενη BMD αποτυπώνει μόνο κατά 60-70% στην οστική αντοχή και παίζουν ρόλο κι άλλες παράμετροι όπως η αρχιτεκτονική και η ποιότητα του οστού⁹. Αυτό οδήγησε στην εφαρμογή κι άλλων τεχνικών μέτρησης, όπως η περιφερική υπολογιστική τομογραφία (peripheral Quantitative Computerized Tomography/pQCT), η μικροϋπολογιστική αξονική τομογραφία (micro Computed Tomography/μCT) και η μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging/MRI). Η pQCT μπορεί να εκτιμήσει το οστό σε τρισδιάστατες εικόνες και διαχωρίζει ευδιάκριτα το σπογγώδες από το φλοιώδες οστό, μη μπορώντας να εμβαθύνει σε επίπεδο οστεοδοκίδας, ενώ οι αλλαγές στην οστική μάζα ανιχνεύονται πρωιμότερα. Από την άλλη η μCT μπορεί να μας δώσει δεδομένα ακόμα κι από μία πολύ μικρή περιοχή όπως η οστεοδοκίδα, όπως και να μας αποκαλύψει πρώιμες αλλαγές στην οστική μικροαρχιτεκτονική, ακόμη και σε πολύ μικρό τοπικό περιβάλλον. Η MRI είναι πλέον γνωστή για την προηγμένη της δυνατότητα να απεικονίζει εικόνες συχνά εφάμιλλες ανατομικών τομών χωρίς μάλιστα τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας. Με τη μαγνητική τομογραφία μπορούμε να εκτιμήσουμε την μικροαρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού αλλά και τα υπόλοιπα στοιχεία του οστικού περιβάλλοντος όπως το λίπος και το υγρό του μυελού των οστών, την αγγείωση, οστικά οιδήματα και σε αρκετές περιπτώσεις οστικές ρωγμές, ανάλογα με το μέγεθος του υπό μελέτη τμήματος και τη δύναμη μαγνητικού πεδίου του μαγνητικού τομογράφου. Το κόστος του μαγνητικού τομογράφου ωστόσο παραμένει ακόμα υψηλό. Οι συνολικές δυνατότητες κάθε ερευνητικού πλαισίου προσδιορίζουν την επιλογή της τεχνικής ή τεχνικών που θα χρησιμοποιηθούν.

4.2 Βιοχημικοί δείκτες

Η οστεοπόρωση, ως μεταβολική κατάσταση, επηρεάζεται από πληθώρα στοιχείων στο αίμα, πολλά από τα οποία περιλαμβάνονται στις εξετάσεις ρουτίνας για οστεοπόρωση στον άνθρωπο, όπως ενδεικτικά το ασβέστιο, η 25-μονοϋδρόξυ-

βιταμίνη-D και οι ορμόνες θυρεοτροπίνη (TSH) και παραθορμόνη (PTH). Στα ζώα εργαστηρίου είναι εύκολη η μέτρηση πολλών μετάλλων (π.χ. ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορος) και ιχνοστοιχείων, τόσο *in vivo*, όσο και *ex vivo*. Εκεί που έχει ενδιαφέρον να εστιάσει κανείς σε πειραματικές συνθήκες είναι οι **βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού (εφεξής ΒΔΟΜ)**, δηλαδή εκείνες οι χημικές ενώσεις που προέρχονται από τους οστεοβλάστες ή οστεοκλάστες κατά τη διαδικασία σύνθεσης ή απορρόφησης του οστού αντίστοιχα. Η μέτρηση των δεικτών γίνεται στο αίμα ή στα ούρα αναλόγως του μεταβολικού κύκλου και της απέκκρισης κάθε ουσίας. Αυτοί οι δείκτες λοιπόν διακρίνονται σε **δείκτες οστικής παραγωγής** και **δείκτες οστικής απορρόφησης**. Οι ΒΔΟΜ είναι χρήσιμοι στη δυναμική μελέτη του οστικού μεταβολισμού σε συνδυασμό με τις μετρήσεις BMD, μπορούν να μας δείξουν εάν έχουμε οστική απορρόφηση ή παραγωγή στον οργανισμό και στους ανθρώπους βοηθούν στην εκτίμηση της ανταπόκρισης ενός ασθενούς στην αντιοστεοκλαστική θεραπεία. Ο πίνακας 1, δείχνει μερικούς σημαντικούς ΒΔΟΜ στον άνθρωπο²⁵.

Δείκτες οστικής παραγωγής	Δείκτες οστικής απορρόφησης
Αίμα	Αίμα
Αλκαλική φωσφατάση	Ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση
Οστικό κλάσμα αλκαλικής φωσφατάσης	C-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (PICP)
Οστεοκαλσίνη	N-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (NTX)
Οστεοπροτεγερίνη	Ουσία ενεργοποιούσα τον παράγοντα RANKL
N-τελικό προπεπτίδιο προκολλαγόνου τύπου I (PINP)	
C-τελικό προπεπτίδιο προκολλαγόνου τύπου I (PICP)	Ούρα Ασβέστιο/Κρεατινίνη Υδροξυπρολίνη/Κρεατινίνη Πυριδινολίνη/Κρεατινίνη Δεοξυπυριδινολίνη/Κρεατινίνη NTX/Κρεατινίνη

Πίνακας 1 Βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού στον άνθρωπο²⁵.

Όσον αφορά τα ζώα εργαστηρίου, η διαθεσιμότητα εξειδικευμένων βιοχημικών δεικτών είναι περιορισμένη. Και παρόλο που μπορούν να γίνουν μετρήσεις στα ζώα εργαστηρίου με κατάλληλες τροποποιήσεις των ανθρώπινων αντιδραστηρίων, το αποτέλεσμα συχνά στερείται ειδικότητας και ευαισθησίας¹¹. Επιπλέον στα ζωικά πρότυπα οστεοπόρωσης συμβαίνουν αλλαγές σε συγκεκριμένα σημεία του σκελετού συχνά ασύνδετα με τους βιοχημικούς δείκτες με αποτέλεσμα να μην μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για αυτές²⁶. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν τη χρήση των ΒΔΟΜ σε ζώα εργαστηρίου δύσκολη και προτείνεται να γίνεται η χρήση τους ως συμπληρωματική μιας άλλης μεθόδου, πιο άμεσης στη μέτρηση της οστικής μάζας και εναλλαγής¹¹. Στον άνθρωπο βέβαια η συνδυασμένη χρήση των ΒΔΟΜ με την μέτρηση DEXA αυξάνει την ειδικότητα πρόβλεψης για

μελλοντικό κάταγμα χωρίς να επηρεάζει αρνητικά την ευαισθησία²⁶. Ωστόσο και στον άνθρωπο η χρήση ΒΔΟΜ έχει τα μειονεκτήματά της, τα οποία είναι η έλλειψη ειδικότητας για τον οστίτη ιστό, η μεταβλητότητά τους και οι δυσκολίες χρήσης στην καθημερινή κλινική πράξη²⁵. Πρόσφατα μάλιστα διερευνάται στον άνθρωπο η γονιδιακή ιδιαιτερότητα οστικού μεταβολισμού κάθε ατόμου, η οποία πλέον μιλάει για πολύπλοκους γενετικούς δείκτες και εξατομικευμένη πλέον θεραπεία ανάλογα με το γονιδιακό υπόβαθρο²⁷. Εξάλλου η οστεοπόρωση έχει ισχυρή γενετική συσχέτιση και η διακύμανση της BMD εξαιτίας γενετικών παραγόντων φτάνει μέχρι 80%²⁷.

4.4 Ιστομορφομετρία

Η ιστομορφομετρία είναι μέθοδος που χρησιμοποιεί ιστολογικές τομές των οστών, από τις αντλούνται πολλές πληροφορίες στο μικροσκόπιο σχετικά με την κατάσταση του οστίτη ιστού σε επίπεδο πλέον κυτταρικής οργάνωσης, ενώ εμμέσως προκύπτουν και πληροφορίες που αφορούν και τις τρεις διαστάσεις του ιστού. Όλες αυτές οι πληροφορίες αποδίδουν με ακρίβεια την πραγματική μάζα, την αρχιτεκτονική και τη συνδετικότητα του ιστού²⁸. Με την ιστομορφομετρία παίρνουμε δομικές πληροφορίες άμεσα μετρήσιμες (π.χ. οστική περίμετρος, περίμετρος γύρω από οστεοκλάστες κ.ά), στατικές πληροφορίες που αφορούν παραμέτρους προκύπτουσες από μαθηματικούς υπολογισμούς (π.χ. εμβαδόν οστού, οστεοειδούς κ.ά) και δυναμικές πληροφορίες που αφορούν την *in vivo* λειτουργικότητα των οστικών κυττάρων (π.χ. ρυθμός επιμετάλλωσης, ρυθμός οστικής παραγωγής κ.ά)²⁸. Είναι λοιπόν πολύ ενδιαφέρουσες και χρήσιμες οι πληροφορίες που μας παρέχει η ιστομορφομετρία, ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην εφαρμογή της²⁶. Έτσι είναι αυτονόητο ότι η ιστολογική εκτίμηση ενός τμήματος αφενός μεν δεν αντιπροσωπεύει υποχρεωτικά τις μεταβολές που συμβαίνουν στον υπόλοιπο σκελετό, αφετέρου δε η εξ ορισμού δειγματοληπτική εφαρμογή της μεθόδου οδηγεί τελικώς σε αυτήν την μη επιθυμητή γενίκευση²⁶, γεγονός που αποτελεί επιπρόσθετα αδυναμία της μεθόδου (εκτός από περιορισμό). Η μέθοδος είναι αξιόπιστη μόνο όταν όλα τα δείγματα προέρχονται αυστηρά από την ίδια ακριβώς περιοχή και τμήμα κάθε ζώου²⁶. Επίσης το γεγονός της εξαγωγής

τριδιάστατων συμπερασμάτων από δισδιάστατη εικόνα εμπεριέχει τον παράγοντα του πιθανού σφάλματος κατά την αναγωγή αυτή²⁶. Πάντως η ιστομορφομετρία μας δίνει αποδεδειγμένα ασφαλείς πληροφορίες σχετικά με τη στερεολογική οργάνωση των οστών¹¹.

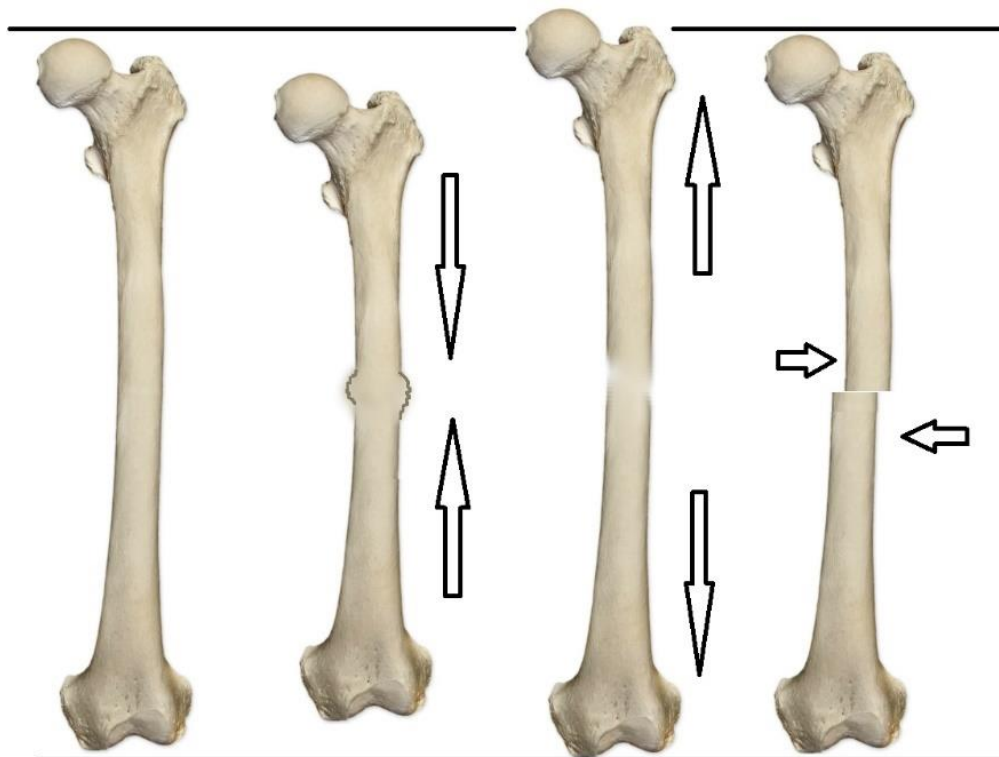
4.4 Μηχανική αντοχή των οστών

Όλες οι μέθοδοι που περιγράφηκαν παρέχουν πολλές και σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή και την πυκνότητα του οστού καθώς και τους οστικούς μετασχηματισμούς του οστίτη ιστού, που θεωρητικά συντελούν στη δομική του σταθερότητα και αντοχή. Όμως δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η πραγματική μηχανική αντοχή, ή αλλιώς η αντοχή σε πραγματικές συνθήκες, δηλαδή το κατά πόσο ανθεκτικό είναι το οστό σε συνθήκες φόρτισης, μπορεί να μελετηθεί ασφαλέστερα όταν το οστό υποβληθεί σε αυτές τις συνθήκες φόρτισης.

Η επιστήμη που ασχολείται με τη δομική κατασκευή και σταθερότητα των οστών λέγεται εμβιομηχανική. Δανείζεται τους νόμους, τους κανόνες και τη βασική ορολογία της φυσικής και προχωρά στην επαλήθευση μέσω ειδικών δοκιμών. Η τάση στα οστά εκφράζεται όπως ορίζει η φυσική, δηλαδή πρόκειται για τη δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας και στα οστά μιλούμε για τάση συμπίεσης, εφελκυσμού και διάτμησης. Τάσεις συμπίεσης (compressive forces) έχουμε όταν τα εφαρμοζόμενα φορτία ή δυνάμεις έχουν κατεύθυνση που οδηγεί σε βράχυνση του οστού κατά την διεύθυνση που μελετάμε. Τάσεις εφελκυσμού (tensile forces) έχουμε όταν τα φορτία τείνουν να επιμηκύνουν το οστό, ενώ τάσεις διάτμησης (shear forces) έχουμε όταν τα φορτία είναι τέτοια που τείνουν να μετακινήσουν παρακείμενες περιοχές του οστού προς αντίθετη κατεύθυνση (Εικόνα 9).

Τα πειραματικά τεστ μας τροφοδοτούν με διάφορες παραμέτρους, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ενδογενείς και εξωγενείς²⁹. Οι εξωγενείς προκύπτουν άμεσα από τα γραφήματα που προκύπτουν κατά τις δοκιμασίες, όπως για παράδειγμα η δύναμη σε σχέση με τη μετατόπιση που δίνει τη μέγιστη δύναμη που αντέχει το οστό, η μέγιστη μετατόπιση (ή παραμόρφωση) και η σκληρότητα του οστού²⁹. Οι εξωγενείς παράμετροι ποικίλουν ανάλογα με τη γεωμετρία του οστού,

με αποτέλεσμα δύο παρόμοια υλικά με διαφορετικό μέγεθος θα έχουν διαφορές στις παραμέτρους που αναφέρθηκαν²⁹. Έτσι μια μεγαλύτερη μέγιστη δύναμη που οδηγεί στη θραύση δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα μεγαλύτερη μηχανική αντοχή αλλά μπορεί να δηλώνει ότι το οστό είναι μεγαλύτερο από το αντιπαραβαλλόμενο²⁹. Οι ενδογενείς παράμετροι υπολογίζονται από τους εξωγενείς παράγοντες με συνυπολογισμό γεωμετρικών δεδομένων, γεγονός που τις καθιστά ανεξάρτητες από την οστική γεωμετρία²⁹. Όμως πέραν των ανωτέρω έχουμε και δυνάμεις συστολής (torsional forces), οι οποίες μαζί με τις δυνάμεις συμπίεσης και εφελκυσμού συνιστούν τις δυνάμεις στις οποίες υπόκεινται τα οστά κατά τις καθημερινές δραστηριότητες²⁹.

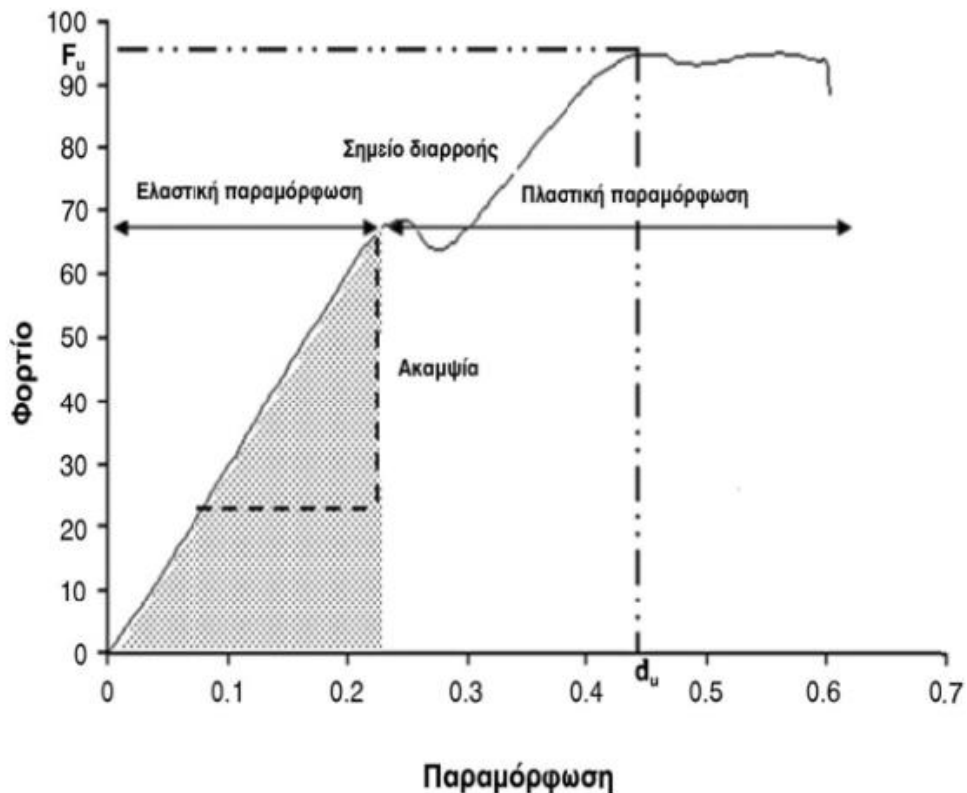


Εικόνα 9 Από αριστερά προς τα δεξιά, φυσιολογικό μήκος ανθρώπινου μηριαίου οστού, δυνάμεις συμπίεσης, εφελκυσμού και διάτμησης.

Τα οστά παραμορφώνονται από τις διάφορες δυνάμεις, σε καθημερινή μάλιστα βάση, ωστόσο η οστική ανακατασκευή επιδιορθώνει τις αλλοιώσεις σε επίπεδο ιστού και απομακρύνει τον κίνδυνο της εύκολης θραύσης από κόπωση

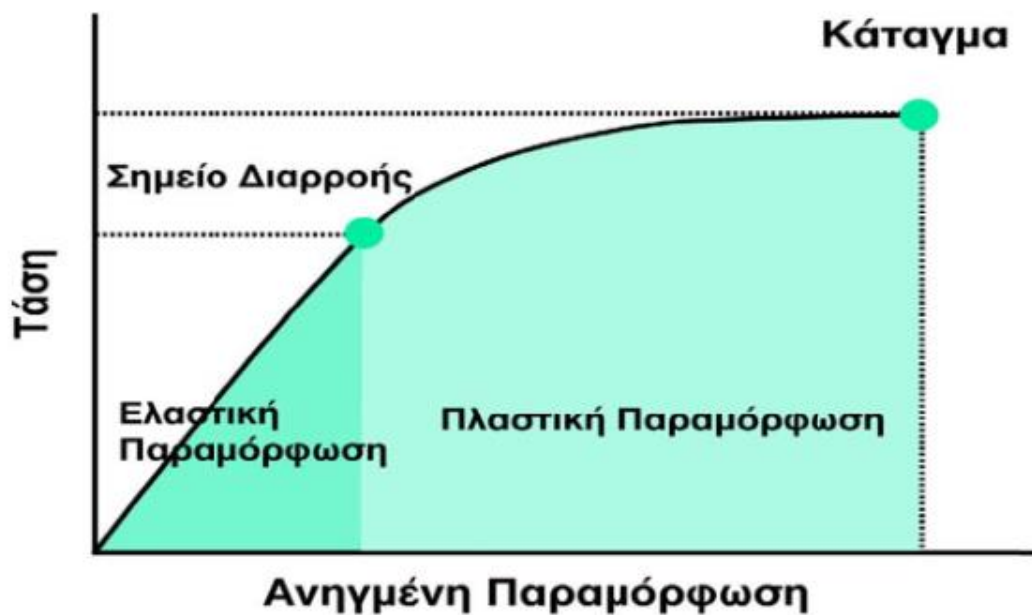
υλικού, κάτι το οποίο θα συνέβαινε γρήγορα εάν το οστό δεν ήταν ενεργό μεταβολικά (εάν π.χ. ήταν ένα κομμάτι ξύλου ή μετάλλου). Χρήσιμη έννοια για τις μετρήσεις παραμόρφωσης είναι η **σχετική ή ανηγμένη παραμόρφωση**, που υπολογίζεται από την ποσοστιαία εκατοστιαία μεταβολή του αρχικού μήκους του υπό εξέταση υλικού. Εάν π.χ. ένα υλικό τεντωθεί με αποτέλεσμα να αυξηθεί το μήκος του κατά 1% (γίνει δηλαδή 101% μακρύ σε σχέση με το αρχικό μήκος), τότε η σχετική παραμόρφωση είναι 0,01 (χωρίς μονάδα μέτρησης, εφόσον πρόκειται για κλάσμα μήκους προς μήκος). Όταν μάλιστα το οστό υπόκειται συμπίεση κατά τον επιμήκη άξονα, αυτό εκδηλώνει διεύρυνση στον κάθετο του επιμήκη άξονα, ενώ σε εφελκυσμό φαίνεται αντίστοιχα να λεπταίνει. Αυτό φαίνεται σχηματικά και στην εικόνα 9, στο 2^ο και 3^ο μηριαίο οστό, όπου δείχνεται η αντιστρόφως ανάλογη μεταβολή του μήκους σε σχέση με το πάχος. Ο λόγος της παραμόρφωσης του οριζώντιου άξονα σε σχέση με τον κάθετο ονομάζεται λόγος του Poisson και για το φλοιώδες οστό είναι μεταξύ 0,28 και 0,45, που σημαίνει ότι εάν το φλοιώδες οστό παραμορφώνεται σε ορισμένο άξονα κατά 1%, θα παραμορφωθεί επιπλέον κατά τον κάθετό του κατά 0,28-0,45%³⁰.

Κατά τη δοκιμασία φόρτισης με σταθερή δύναμη σε εργαστηριακές συνθήκες, προκύπτει μια γραφική αναπαράσταση της δύναμης σε σχέση με την παραμόρφωση. Αυτή η καμπύλη διακρίνεται σε δύο περιοχές που αντιστοιχούν στις δύο φάσεις παραμόρφωσης του οστού, την ελαστική και την πλαστική παραμόρφωση (Εικόνα 10). Ενδιαφέρον έχει και η καμπύλη τάσης-ανηγμένης παραμόρφωσης, η οποία φαίνεται στην εικόνα 11. Η κλίση αυτής της καμπύλης στο τμήμα της ελαστικής παραμόρφωσης αποτελεί το δείκτη ελαστικότητας ή δείκτη Young και εκφράζει την ενδογενή ακαμψία του οστού.²⁹



Εικόνα 10 Γραφική παράσταση φορτίου προς παραμόρφωση (Πηγή Beauried H, Lespessailles E, Benhamou CL. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. Jt Bone Spine. 2007).

Υπάρχουν δυσκολίες στον ορισμό της ακαμψίας για τα σπογγώδη οστά, διότι αυτά αποτελούνται από οστικές δοκίδες με ξεχωριστή ακαμψία η καθεμιά και ουσιαστικά συνθέτουν μια συνολική δομή με δική της ακαμψία, ως συνισταμένη των επιμέρους παραμέτρων κάθε δοκίδας¹². Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στο σπογγώδες οστό ως σύνολο και όχι σε κάθε δοκίδα ξεχωριστά, για λόγους διευκόλυνσης. Επίσης οι δοκιμές ιδιότητες του οστού ποικίλουν ανά τις διάφορες ανατομικές περιοχές και εξαρτώνται από την πυκνότητα και τον προσανατολισμό των δοκίδων¹². Έτσι τα οστά ανήκουν στα ανισότροπα υλικά, επειδή έχουν διαφορετικές ιδιότητες στους διάφορους άξονες. Επί παραδείγματι ο δείκτης ελαστικότητας, που επίσης ποικίλει ανάλογα με τη θέση του οστού, στο σπογγώδες μπορεί να κυμαίνεται από 0,1 έως 4,5 GPa (gigapascals, μονάδα μέτρησης του δείκτη) ανάλογα με το σημείο του οστού και την κατεύθυνση των οστικών δοκίδων³⁰.



Εικόνα 11 Γραφική παράσταση φορτίου προς παραμόρφωση (Πηγή Λελόβας Πάυλος. Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος *Sideritis euboica* στην οστική απώλεια ωθηκεκτομημένων επιμύων, 2011).

Το **σημείο διαρροής** που φαίνεται στην εικόνα 11 είναι το σημείο μετάβασης από την ελαστική στην πλαστική παραμόρφωση. Αυτό πρακτικά είναι το σημείο πέρα από το οποίο οι δυνάμεις προκαλούν μόνιμη παραμόρφωση στο οστό. Αυτές οι παραμορφώσεις αφορούν βλάβες σε μικροσκοπικό επίπεδο αρχικώς, ενώ όταν το οστό τελικώς σπάσει υπό τα φορτία έχει εξουδετερωθεί όλη η μηχανική αντοχή του στο σημείο του κατάγματος. Το άθροισμα των παραμορφώσεων από την πλαστική παραμόρφωση μέχρι το κάταγμα μας δείχνει το μέτρο ολκιμότητας του οστού. Η ολκιμότητα των οστών είναι περιορισμένη. Το εμβαδόν της πράσινης επιφάνειας στην εικόνα 11 είναι η ενέργεια που καταναλώνεται για την παραμόρφωση μέχρι και το κάταγμα, και χαρακτηρίζει την ανθεκτικότητα του οστού. Η ανθεκτικότητα στα οστά μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας.¹²

Κατά τις καθημερινές δραστηριότητες τα οστά δεν δέχονται συνεχείς δυνάμεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αλλά διάφορες και ποικιλοτρόπως επαναλαμβανόμενες φορτίσεις, ακόμα κι αν πρόκειται για ένα σημείο. Αυτές οι παραμορφώσεις που προκύπτουν στα πλαίσια της ελαστικής παραμόρφωσης οδηγούν θεωρητικά στη σταδιακή υποβάθμιση της μηχανικής σταθερότητας του

οστού, η οποία καλείται κόπωση (fatigue). Αυτή η υποβάθμιση οφείλεται στο σχηματισμό μικρορωγμών, η αύξηση των οποίων σε αριθμό και επικοινωνία μπορεί να οδηγήσει τελικώς στην έκπτωση της συνεκτικότητας του ιστού και στο κάταγμα (κάταγμα εκ κόπωσης, stress fracture). Η κόπωση αρχικώς εμφανίζεται με τις μικρορωγμές σε διάφορα σημεία, στα οποία συσσωρεύονται φορτίσεις, οι οποίες σταδιακά μεγαλώνουν όσο συνεχίζεται η φόρτιση και βαθμιαία οι ρωγμές αρχίζουν να αυξάνονται σε αριθμό και στο τέλος συνενώνονται προκαλώντας μαζική απώλεια συνοχής και στήριξης του ιστού. Αυτές οι τρεις φάσεις έχουν διαφορετική και ποικίλη διάρκεια ανάλογα με τη συχνότητα των φορτίσεων και συνήθως αποτελούν κατά σειρά το 25%, το 25-90% και το 10% της συνολικής διάρκειας από την έναρξη της πλαστικής παραμόρφωσης μέχρι το κάταγμα.

4.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τις δοκιμές

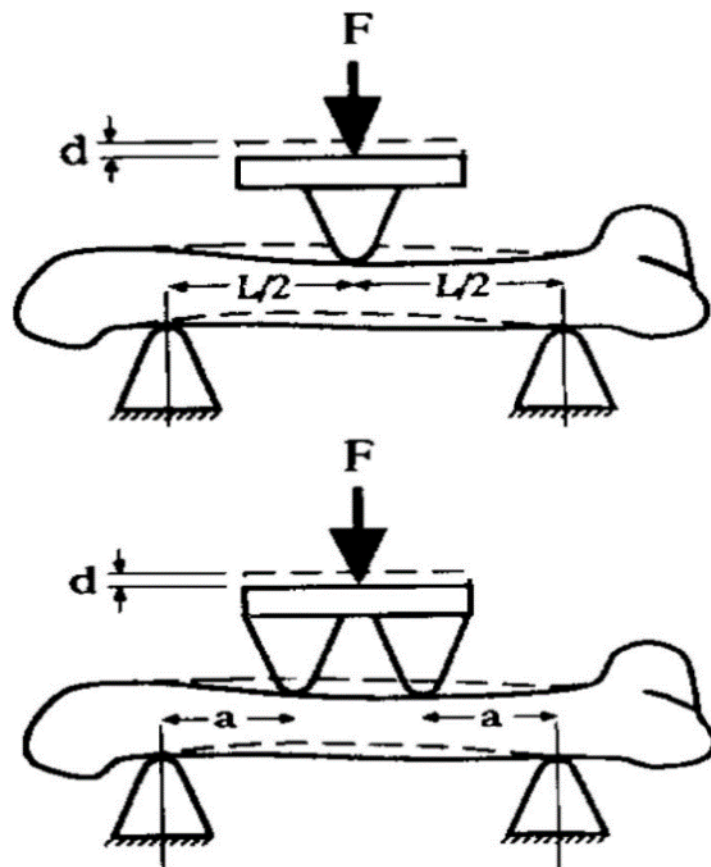
4.4.1.α Εμβιομηχανικές δοκιμές και ζωικά πρότυπα

Οι εμβιομηχανικές δοκιμές διακρίνονται σε δοκιμές εφελκυσμού, κάμψης, συμπίεσης, στρέψης, κόπωσης και εκτίμησης με υπέρηχο.

Η δοκιμές εφελκυσμού, σε φλοιώδες και σπογγώδες οστό, βρίσκουν εφαρμογή σε σχετικά μεγάλα οστικά δοκίμια, τα οποία πρέπει να είναι ειδικά προετοιμασμένα, ώστε αφενός να συσσωρεύονται οι φορτίσεις στο κεντρικό τμήμα του οστικού δοκιμίου, αφετέρου να αποφεύγεται κατά το δυνατόν η συνύπαρξη συνισταμένης δυνάμεων που οδηγεί σε κάμψη των δοκιμίων. Η τάση προκύπτει από την εφαρμοζόμενη δύναμη προς την επιφάνεια διατομής στο μέσο του δοκιμίου. Οι δοκιμασίες κάμψης είναι κατάλληλες για χρήση σε μικρόσωμα ζωικά πρότυπα όπως τα τρωκτικά, στα οποία ανήκει και ο επίμυς. Σε αυτές τις δοκιμές ολόκληρο το οστό τίθεται υπό τη συνεχή άσκηση φορτίου μέχρι πρόκλησης κατάγματος. Έτσι προκαλείται συμπίεση στη μια μεριά άσκησης φορτίου και εφελκυσμός στην απέναντι. Δεδομένου ότι τα οστά είναι πιο ευάλωτα σε εφελκυσμό, η αστοχία του υλικού συμβαίνει στην πλευρά του εφελκυσμού.

Οι δοκιμές κάμψης μπορεί να είναι τριών ή τεσσάρων σημείων (εικόνες 12) και το μήκος του δοκιμίου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τόσο, ώστε να επιτρέπει

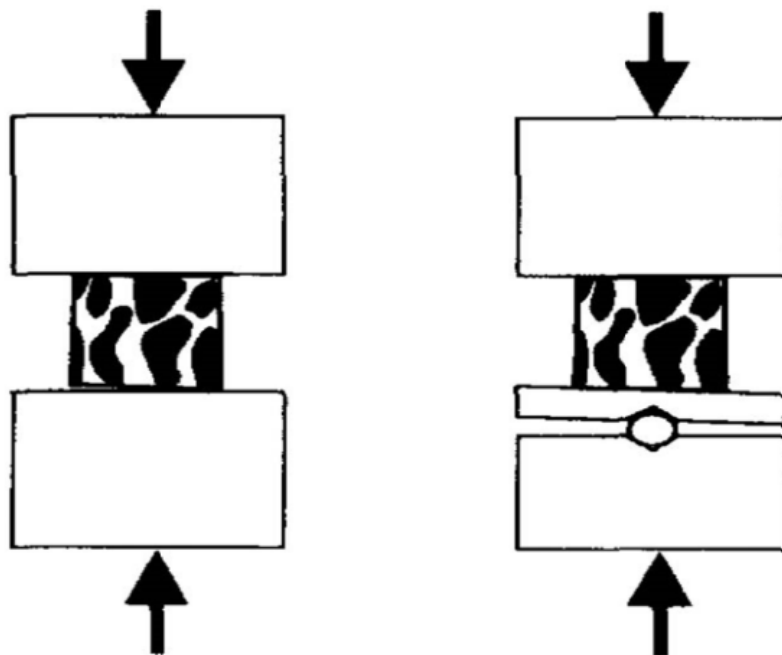
την κάμψη υπό τη φόρτιση και να μην έχουμε φαινόμενο διάτμησης. Γενικά το μήκος του του δείγματος πρέπει να είναι 16πλάσιο της διαμέτρου του, ώστε να ικανοποιείται αυτή η συνθήκη. Έχει διατυπωθεί ότι το μήκος των μηριαίων ενήλικων επίμυων θα πρέπει να είναι 15 mm για θηλυκούς και 20 mm για αρσενικούς, για να διασφαλίζεται ότι περίπου 90% της παραμόρφωσης θα οφείλεται σε κάμψη. Η ύπαρξη υψηλών διατμητικών δυνάμεων στη μεσότητα των οστών είναι ένα μειονέκτημα της μεθόδου τριών σημείων, που βελτιώνεται με την προσθήκη ακόμα ενός σημείου (δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων) μόνο εφόσον τα δύο σημεία φόρτισης είναι ισοδύναμα, γεγονός δύσκολο να συμβεί στα οστά που έχουν ακανόνιστο μη συμμετρικό σχήμα και δομή. Το τελευταίο καθιστά τη μέθοδο κάμψης τριών σημείων ως την πιο δημοφιλή για την εκτίμηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των οστών στους επίμυς.³⁰



Εικόνα 12 Δοκιμή κάμψης τριών και τεσσάρων σημείων. F η εφαρμοζόμενη δύναμη, d η παραμόρφωση, L η απόσταση των σταθερών σημείων στήριξης του δοκιμίου και a η απόσταση μεταξύ των σταθερών σημείων πίεσης (άνω και κάτω) (Πηγή Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial, 1993).³⁰

Οι δοκιμασίες συμπίεσης χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό και κυρίως για τα σπογγώδη οστά. Η ακρίβειά τους δεν είναι υψηλή διότι τα οστικά δοκίμια δεν ευθυγραμμίζονται εύκολα με τα σημεία της αμφίπλευρης φόρτισης. Ένας τρόπος να αντισταθμιστεί αυτό είναι η χρήση κινητής πλατφόρμας, όπως φαίνεται στην εικόνα 13, οπότε μειώνονται κατά πολύ τα ενδεχόμενα σφάλματα. Αυτές οι δοκιμασίες, παρότι δεν είναι ιδιαίτερα ακριβείς, μπορούν υπό συνθήκες να προσομοιώσουν καλύτερα το *in vivo* μοντέλο φόρτισης μερικών οστών, όπως πχ του σώματος των σπονδύλων. Τέλος το μέγεθος των δοκιμίων δεν είναι απαραίτητο να είναι μεγάλο.

30



Εικόνα 13 Δοκιμή συμπίεσης χωρίς και με κινητή πλατφόρμα, που βοηθά στην ευθυγράμμιση των δοκιμίων με τον άξονα φόρτισης (Πηγή Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial, 1993).³⁰

Οι δοκιμασίες στρέψης βοηθούν στις περιπτώσεις που έχουμε διάτμηση και συνήθως εφαρμόζονται σε μακρά οστά όπως κνήμη ή μηριαίο σκύλων, κονίκλων ή επίμυων, ενώ μελετούν φλοιώδες και σπογγώδες οστό²⁹. Ενδιαφέρον έχει και η

εκτίμηση της οστικής εμβιομηχανικής με τη χρήση υπερήχων. Καθώς ο ήχος προσκρούει τους ιστούς ένα μέρος του επιστρέφει στον πομπό και το υπόλοιπο συνεχίζει την πορεία μέχρι τον επόμενο ιστό, όπου συμβαίνει το ίδιο, με αποτέλεσμα να μπορεί να διαπιστωθεί η δομή του οστού από την απορροφητικότητα και ανακλαστικότητα που παρουσιάζει στην υπερηχητική πρόσκρουση. Η χρήση υπερήχου πραγματικά είναι μια τεχνική πολλά υποσχόμενη στο να μας δίνει πληροφορίες άμεσα σχετιζόμενες με τις μηχανικές ιδιότητες του οστού³¹. Τα πλεονεκτήματα του υπερήχου είναι ότι δεν απαιτεί ακριβός εξοπλισμός, ενώ η εξέταση δεν καταστρέφει τα δοκίμια και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές και σε πολλά σημεία επιτρέποντας την εξαγωγή μέσου όρου δεδομένων μειώνοντας έτσι το πιθανό σφάλμα³².

Τέλος οι δοκιμές κόπωσης γίνονται με εφελκυσμό, συμπίεση και κάμψη. Τα δοκίμια υπόκεινται σε επαναλαμβανόμενες φορτίσεις και ως αποτυχία ορίζεται ο αριθμός του κύκλου φορτίσεων που απαιτείται για την απώλεια περίπου του 1/3 της ενδογενούς ακαμψίας του δοκιμίου. Η κόπωση είναι σημαίνουσα ιδιότητα, διότι τα οστεοπορωτικά κατάγματα έχουν άμεση σχέση με αυτήν και είναι σημαντική όταν μελετάται η αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών παρεμβάσεων στην ανθεκτικότητα του οστεοπορωτικού οστού. Μειονέκτημα βέβαια αποτελεί η χρονοβόρος και απαιτητική εργασία για την άρτια εκτέλεσή της.³⁰

Όσον αφορά στα **ζωικά πρότυπα** και τις περιγραφείσες **εμβιομηχανικές δοκιμές**, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιλογή της μεθόδου πρέπει να είναι κατάλληλη για το υπό εξέταση εκάστοτε ζωικό πρότυπο. Τα μεγάλωζα ζώα μπορούν να υποβληθούν στις περισσότερες από αυτές τις δοκιμασίες, ωστόσο όταν μιλάμε για μικρόσωμα ζώα οι επιλογές είναι πιο περιορισμένες. Στους επίμυες, που είναι και το ζωικό πρότυπο της παρούσης διατριβής, μπορεί να γίνει χρήση της δοκιμασίας κάμψης ή στρέψης για τα μακρά οστά και της συμπίεσης για τους σπονδύλους. Περαιτέρω η ανάλυση της εμβιομηχανικής δομής του σπογγώδους οστού είναι εξαιρετικά δύσκολη, διότι οι οσφυϊκοί σπόνδυλοι, σε τμήματα των οποίων μελετάται, δεν μπορούν να αποδώσουν την αντοχή της συνεχούς δομής συστοιχίας σπονδύλων με αποτέλεσμα οι μετρήσεις να περιέχουν σημαντικό ποσοστό ανακρίβειας. Την ίδια ανακρίβεια προσθέτει η συμμετοχή του φλοιώδους

οστού στην αντοχή ενός ολόκληρου σώματος σπονδύλου, οπότε δεν μπορεί να απομονωθεί η αντοχή του σπογγώδους. Πάντως η ύπαρξη ομάδας ελέγχου είναι πάντα απαραίτητη, ώστε να εξουδετερώνει κατά το δυνατόν τα μειονεκτήματα που απορρέουν από το σχεδιασμό της μελέτης (συμπεριλαμβανομένης της επιλεγμένης μεθόδου δοκιμών μηχανικής οστικής αντοχής), τις συνθήκες συντήρησης, που θα αναφερθούν αμέσως πιο κάτω, και το ζωικό πρότυπο που χρησιμοποιείται.¹²

4.4.1.β Συντήρηση των δοκιμών

Αναφέρθηκαν παραπάνω οι δυσκολίες στην καθαυτή εξέταση της μηχανικής αντοχής των οστών. Έχοντας όμως κατά νου ότι οι μελέτες εμβιομηχανικής των οστών *ex vivo* απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και περιβάλλον, διαφορετικό από το εργαστηριακό περιβάλλον φύλαξης και διαχείρισης, προκύπτει ένας βασικός προβληματισμός σχετικά με αυτές τις δοκιμές. Ο χρόνος που θα μεσολαβήσει από τη στιγμή της χειρουργικής παρασκευής των οστικών δοκιμών μέχρι τη στιγμή που θα τοποθετηθούν αυτά στο μηχάνημα φορτίσεων μπορεί να μεταβάλλει τις μηχανικές ιδιότητες και, το σημαντικότερο, ο τρόπος που θα συντηρηθούν τα οστικά δοκίμια μέχρι το σημείο εκείνο μπορεί να είναι καθοριστικός για την επιτυχία ολόκληρου του εγχειρήματος. Καθοδηγούμενος από τις αρχές των τριών R σε κάθε στάδιο του πειράματος, ο ερευνητής πρέπει να είναι εξόχως προσεκτικός κατά τη συντήρηση των οστών, από τη στιγμή της χειρουργικής παρασκευής μέχρι το κάταγμα στις δοκιμές, διότι οποιοδήποτε λάθος σε αυτό το στάδιο υποβαθμίζει, έως αχρηστεύει, όλη την προηγούμενη χρονοβόρα και επίπονη πειραματική διαδικασία, η οποία βασίστηκε πρωτίστως στη θυσία ζώντων οργανισμών.

Υπάρχουν διάφορες προτάσεις σχετικά με τον πιο κατάλληλο τρόπο συντήρησης των οστικών δοκιμών. Μια από αυτές είναι η συντήρηση σε αιθανόλη, η οποία επιφέρει μικρές μόνο αλλοιώσεις στις μηχανικές ιδιότητες. Έτσι φύλαξη σε διάλυμα φυσιολογικού ορού με 50% αιθανόλη για 3 μήνες είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ελαστικότητας λιγότερο από 2%. Η φύλαξη σε αντίστοιχο διάλυμα 40% αιθανόλης απεδείχθη λιγότερο κατάλληλη, μιας και σε 5-10 μέρες μειώθηκε η ελαστικότητα κατά 2,5-4%. Για να γίνει αντιληπτή η επιτυχία της συντήρησης αρκεί

να λεχθεί ότι αφήνοντας τα οστικά δοκίμια σε θερμοκρασία για μία μόνο μέρα, χάνουν κατά 3% την ελαστικότητά τους. Βέβαια το διάλυμα αιθανόλης αφυδατώνει τα οστικά δοκίμια, για αυτό το λόγο θα πρέπει να εμβαπτίζονται σε φυσιολογικό ορό για αρκετό χρόνο προ της δοκιμασίας μηχανικής αντοχής με σκοπό την ανάκτηση της ενυδάτωσης.^{12,33}

Ένας άλλος τρόπος είναι η μονιμοποίηση σε φορμαλίνη ή γλουταραλδεΐδη, ο οποίος αλλοιώνει της μηχανικές ιδιότητες περισσότερο από ότι η αιθανόλη, αλλά δεν υπάρχει βιβλιογραφική συμφωνία για το κατά πόσο αλλοιώνει αυτές τις ιδιότητες. Ως καταλληλότερος τρόπος για τη μακρόχρονη συντήρηση των οστικών δοκιμίων που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμασία μηχανικής αντοχής, θεωρείται η περιέλιξη με εμποτισμένη σε φυσιολογικό ορό γάζα και η κατάψυξη τους σε θερμοκρασίες -20°C . Πράγματι σε ανθρώπινα μηριαία οστά που καταψύχθηκαν για 20 μέρες σε αυτή τη θερμοκρασία δεν παρατηρήθηκε ουδεμία αλλαγή στις μηχανικές ιδιότητες στις οποίες υποβλήθηκαν. Αντίστοιχα σε μηριαία οστά σκύλου που καταψύχθηκαν στην αυτή θερμοκρασία για 30 μέρες, το μέτρο ελαστικότητας μεταβλήθηκε λιγότερο 2%. Σε άλλη έρευνα δεν διαπιστώθηκαν αρνητικές συνέπειες στις στροφικές ιδιότητες και στην ακαμψία σε μηριαία που φυλάχθηκαν στους τόσο στους -20°C όσο και στους -70°C για 14 μέρες.^{30,34}

Πάντως η κατάψυξη των οστών για μεγάλο διάστημα έχει αρνητική επίδραση στην ιστολογία του οστίτη ιστού, στον οποίο σταδιακά καταστρέφονται οι πυρήνες και συμβαίνει μετουσίωση στο κολλαγόνο του φλοιώδους οστού ευθέως ανάλογα προς την μείωση θερμοκρασίας και της διάρκειας ψύξης. Αυτές οι αλλαγές θέτουν σε κίνδυνο την μορφολογία των ιστών όταν η ψύξη είναι -70°C για πάνω από 90-120 μέρες.³⁵

4.4.1.γ Ενυδάτωση

Η απώλεια της υγρασίας στα οστά έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη ελαστικότητας και του ορίου θραύσης, ενώ η ανθεκτικότητα μειώνεται. Με λιγότερη υγρασία παρατηρείται μικρότερη δυνατότητα απορρόφησης ενέργειας παρότι η δύναμη που απαιτείται για κάταγμα να είναι μεγαλύτερη. Για να είναι πιο

ασφαλείς και αξιόπιστες οι μετρήσεις θα πρέπει τα οστά να επανυδατώνονται με χρήση φυσιολογικού ορού πριν ή κατά την εξέλιξη της δοκιμασίας μηχανικής αντοχής.³⁰

4.4.1.δ Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι παράμετρος που επηρεάζει το αποτέλεσμα των οστικών δοκιμών. Η ιδανική θερμοκρασία ελέγχου των οστικών δοκιμών είναι 37° C, που δεν είναι πάντα εύκολο να επιτευχθεί. Στην περίπτωση των στατικών δοκιμών δεν παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλό σφάλμα, όπως συμβαίνει στις δοκιμές κόπωσης. Πάντως σε δοκιμές που έγιναν σε θερμοκρασίες 23° C και 37° C, βρέθηκε σημαντική διαφορά στο δείκτη ελαστικότητας και για το λόγο αυτό προτείνεται η εμβάπτιση των οστικών δοκιμών σε φυσιολογικό ορό θερμοκρασίας 37° C προ της δοκιμής αντοχής³⁰.

4.4.1.ε Ρυθμός φόρτισης

Ο ρυθμός φόρτισης είναι η ταχύτητα με την οποία εφαρμόζεται η επιλεγμένη δύναμη στον υπό εξέταση ιστό. Το υγρό των οστών μαζί με τις γραμμές τοιμέντου πέριξ των Αβερσιανών συστημάτων (Εικόνα 2) αποτελούν το ιξώδες στοιχείο του οστού και απορροφούν μέσω τριβών την ενέργεια που εφαρμόζεται. Τα οστά ως ιξωδοελαστικά υλικά συμπεριφέρονται ως τέλεια ελατήρια αν τους αφαιρεθεί το ιξώδες συστατικό, ουσιαστικά όταν έχουν αφυδατωθεί. Η αντίσταση του ιξώδους στοιχείου είναι ανάλογη του εφαρμοζόμενου ρυθμού φόρτισης.¹²

5. Οστεοπόρωση

Οστεοπόρωση είναι η ελάττωση της οστικής μάζας και η διαταραχή της ποιότητας των οστών που έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη μηχανική αντοχή τους και την επακόλουθη αύξηση της ευθραυστότητάς τους, καθιστώντας τα οστά

επιρρεπή σε κάταγμα. Στην παρούσα μελέτη λαμβάνεται υπόψη η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, ωστόσο θα γίνει μια σύντομη αναφορά στην οστεοπόρωση ως συνολική κλινική οντότητα.

Πίσω από τις αναλυτικές κατηγοριοποιήσεις της οστεοπόρωσης κρύβονται δύο βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί. Η μια αιτία είναι η αδυναμία επίτευξης επαρκούς κορυφαίας οστικής μάζας και η άλλη είναι η αυξημένη οστική απώλεια που εντάσσεται σε μεταβολικά πλαίσια. Η **κορυφαία οστική μάζα** είναι εκείνη η οστική μάζα που αποκτά ο άνθρωπος μέχρι μια ηλικία, μέχρι την οποία τα οστά προικίζονται με ολοένα περισσότερο οστίτη ιστό και πέρα από την οποία σταματά η επιπλέον παραγωγή και αρχίζει η αργή σταδιακή μείωση ως φυσικό επακόλουθο οστικής γήρανσης. Η απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας συμβαίνει στις αρχές της 3^{ης} δεκαετίας και στα δύο φύλα, με κάποιες διαφοροποιήσεις στο γυναικείο πληθυσμό που σχετίζεται με την ηλικία εμμηναρχής²⁵. Στους άνδρες η κορυφαία οστική μάζα είναι κατά 10-12% μεγαλύτερη από ότι στις γυναίκες, οι οποίες επιπλέον έχουν μικρότερα οστά αναλογικά απ' τους άνδρες²⁵. Το χρονικό σημείο από το οποίο αρχίζει η οστική απώλεια διαφέρει από οστό σε οστό και αυτή η απώλεια είναι απότομη στις γυναίκες λόγω της εμμηνόπαυσης, ενώ είναι πιο ομαλή στους άνδρες²⁵. Ο ρυθμός απώλειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά την εμμηνόπαυση κυμαίνεται μεταξύ 0,5% και 1,5% ετησίως, καθιστώντας τις γυναίκες πιο ευάλωτες στα κατάγματα· ήδη από τα πρώτα χρόνια μετά την εμμηνόπαυση παρατηρείται αύξηση των σπονδυλικών καταγμάτων στις γυναίκες, ενώ στους άνδρες αυτό συμβαίνει μετά τα 65²⁵.

Έχουν περιγραφεί ορισμένοι γνωστοί και τεκμηριωμένοι βασικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της οστεοπόρωσης, οι οποίοι μάλιστα έχουν συμπεριληφθεί στο πρόσφατο εργαλείο εκτίμησης καταγματικού κινδύνου FRAX που αναπτύχθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το οποίο πλέον χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες βασιζόμενο στις ιδιαιτερότητες καθεμιάς. Η **ηλικία** θεωρείται ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για κάταγμα, μιας και όπως αναφέρθηκε με την ηλικία επέρχεται μείωση της οστικής μάζας. Πράγματι αυτό αναδεικνύεται από μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, ενώ ο επιπολασμός των σπονδυλικών καταγμάτων αυξάνεται μετά τα 50 έτη, των καταγμάτων ισχίου μετά

τα 70 έτη και η επίπτωση των καταγμάτων ισχίου είναι 100-1000 φορές μεγαλύτερη μετά τα 60 έτη²⁵. Το **φύλο** είναι ένας ακόμα παράγοντας που αναφέρθηκε πιο πάνω και οι γυναίκες βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος μετά την οστεοπόρωση. Ο **δείκτης μάζας σώματος** επηρεάζει αντιστρόφως ανάλογα την εμφάνιση οστεοπόρωσης ενώ σημαντικό ρόλο παίζει και η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα. Η **κατάχρηση αλκοόλ** αυξάνει επιβεβαιωμένα την επίπτωση καταγμάτων, όχι όμως η λήψη λιγότερο από 2 μονάδων την ημέρα (1 μονάδα= 30 γραμμάρια)²⁵. Το **κάπνισμα** ακόμα και λίγων τσιγάρων την ημέρα έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη φυσιολογική οστεοπαραγωγή, καθιστώντας το ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καταγμάτων για τους ενεργούς καπνιστές²⁵. Η **λήψη κορτικοστεροειδών** αποτελεί από μόνη της ξεχωριστό κεφάλαιο, μιας και όχι μόνο έχει επιβεβαιωθεί η αρνητική επίδρασή τους στην οστική μάζα (οστεοκαταβολική επίδραση), αλλά αποτελεί και ανεξάρτητο παράγοντα πρόκλησης σπονδυλικών καταγμάτων²⁵. Τέλος η παρουσία προηγούμενου **κατάγματος χαμηλής βίας** και η **εμφάνιση οστεοπορωτικού κατάγματος σε γονέα** αυξάνουν τον καταγματικό κίνδυνο, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι σε άτομα με χαμηλή οστική πυκνότητα -με ή χωρίς συνύπαρξη προδιαθεσικών παραγόντων οστεοπόρωσης- η **πτώση** από μόνη της θέτει αιφνιδίως τα αποδυναμωμένα οστά σε συνθήκες μηχανικής φόρτισης αυξάνοντας την πιθανότητα για ένα κάταγμα, ανάλογα με την κατεύθυνση της πτώσης, το οστό που θα πληγεί (π.χ. ισχίο, σπόνδυλοι, αγκώνας, χείρα κ.ά.) και τις μηχανικές ιδιότητες της πλήξης (π.χ. στροφή, ταχύτητα κ.ά.). Πέρα από τους βασικούς παράγοντες, περιγράφονται κι άλλοι που θα αναφερθούν πιο κάτω στα πλαίσια της δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης.

Η οστεοπόρωση λοιπόν διακρίνεται σε **πρωτοπαθή** και **δευτεροπαθή**. Η πρωτοπαθής οστεοπόρωση δεν έχει σαφή αιτία έναρξης (παρά τη γνώση μας σχετικά με το μηχανισμό) και παρουσιάζεται με δύο τύπους, I και II, ενώ η δευτεροπαθής οστεοπόρωση έχει σαφή αιτία έναρξης και προκύπτει από γνωστούς παθογενετικούς δρόμους.

Αναφορικά με τη **δευτεροπαθή οστεοπόρωση**, τα φάρμακα, πέραν των κορτικοστεροειδών, μπορεί να επιφέρουν οστεοπόρωση κατά τη χρόνια λήψη τους. Τέτοια φάρμακα είναι, ενδεικτικά, η θυροξίνη, η ηπαρίνη, τα αντιεπιληπτικά, τα

κυτταροτοξικά, τα αντιόξινα, τα αντικαταθλιπτικά, ενώ πιθανόν να προκύψουν δεδομένα και για άλλες κατηγορίες. Η γενετική προδιάθεση παίζει επίσης ρόλο στη δευτεροπαθή οστεοπόρωση και υπάρχουν μάλιστα γνωστά γενετικά νοσήματα όπως η ατελής οστεογένεση ή οι αιμοσφαιρινοπάθειες. Οι διαταραχές του μεταβολισμού του ασβεστίου και επιπλέον διάφορες ενδοκρινικές παθήσεις (π.χ. σύνδρομο Cushing, Υπερθυρεοειδισμός, Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I κ.ά.) οδηγούν σε δευτεροπαθή οστεοπόρωση. Τέλος τα νοσήματα του γαστρεντερικού (π.χ. χρόνια ηπατική νόσος, σύνδρομο δυσαπορρόφησης) και άλλες παθήσεις (πολλαπλό μυέλωμα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νευρογενής ανορεξία, χρόνια νεφρική νόσος, λευχαιμία κ.ά) οδηγούν σε πρώιμη απώλεια της οστικής μάζας.

Η **πρωτοπαθής οστεοπόρωση** διακρίνεται σε δύο τύπους, I και II. Ο τύπος II, αλλιώς αναφερόμενος ως **γεροντική οστεοπόρωση**, είναι μάλλον το φυσικό ακόλουθο της συνολικής γήρανσης του οργανισμού και εμφανίζεται μετά τα 70 έτη με αναλογία φύλου άνδρες/γυναίκες= 1/2. Προσβάλλει το φλοιώδες οστό, κυρίως το ισχίο, και προκαλείται από σταδιακή έκπτωση της οστεοβλαστικής λειτουργίας λόγω αύξησης της παραθορμόνης ή μείωσης της βιταμίνης D²⁵. Ο τύπος I, αλλιώς **μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση** αποτελεί το επίκεντρο αναζήτησης γύρω από το οποίο κινείται η παρούσα έρευνα. Προσβάλλει τις γυναίκες περισσότερο από τους άντρες σε αναλογία 6/1, διότι εμφανίζεται περισσότερο σε αυτές και οφείλεται στην υπερλειτουργία των οστεοκλαστών λόγω μείωσης των ορμονών του φύλου. Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση αποτελεί μείζον γνωστό πρόβλημα υγείας που επηρεάζει κυρίως γυναίκες λευκής φυλής σε παγκόσμιο επίπεδο. Η διαταραχή της αρχιτεκτονικής του σπογγώδους οστού και η αποδυνάμωση του φλοιώδους, που αμφότερα οδηγούν σε σημαντική απώλεια της μηχανικής αντοχής, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης καταγμάτων στους οσφυικούς σπονδύλους, στο αντιβράχιο και στο ισχίο, με το τελευταίο να αποτελεί μείζον κοινωνικοοικονομικό ζήτημα διότι σχεδόν πάντοτε απαιτεί χειρουργική αντιμετώπιση και ο ρυθμός θνησιμότητας στο ένα έτος ξεπερνά το 15-30%³⁶⁻⁴¹.

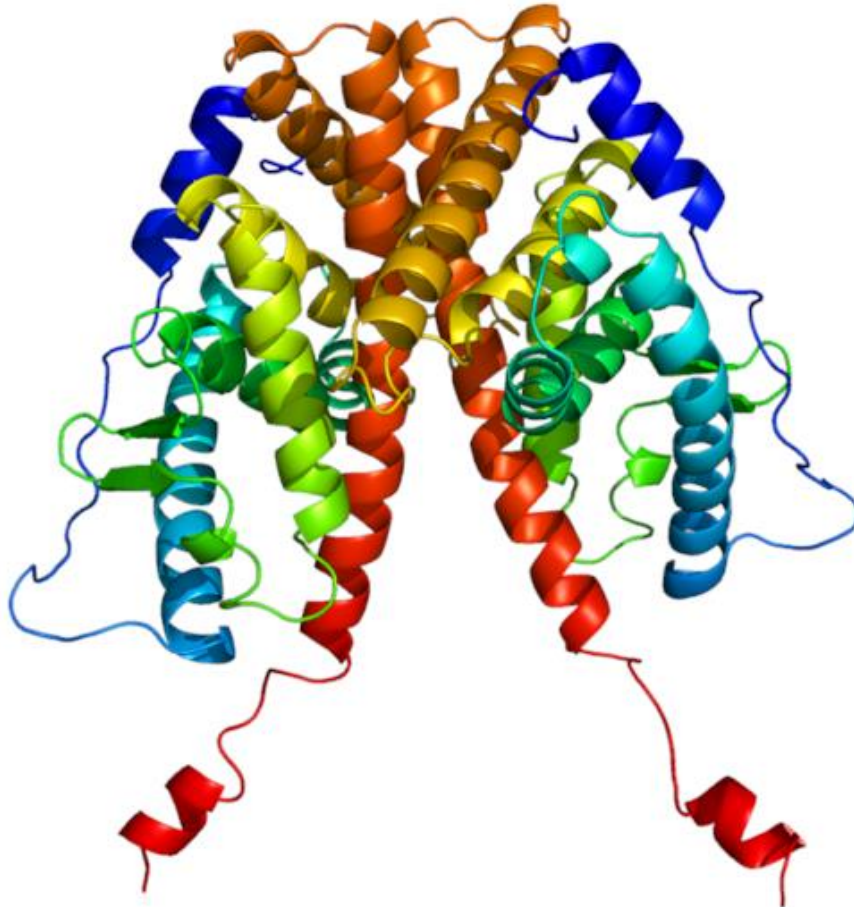
Στην εποχή μας η καλύτερη αντιμετώπιση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης θεωρείται η οστεοπροστατευτική φαρμακευτική παρέμβαση (ορμονική θεραπεία, καλσιτονίνη, διφωσφονικά, strontium ranelate, Selective

Estrogen Receptor Modulators/SERMs)⁴²⁻⁴⁴. Ωστόσο η μακροχρόνια συμμόρφωση στη φαρμακευτική αγωγή μπορεί να είναι χαμηλή⁴⁵⁻⁴⁸ λόγω ανεπιθύμητων επιδράσεων και επιπλοκών, όπως είναι η στεφανιαία νόσος, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ο καρκίνος μαστού και μήτρας, τα χαμηλής βίας κατάγματα μηριαίου και η οστεονέκρωση της κάτω γνάθου⁴⁹⁻⁵⁴. Για το λόγο αυτό ενισχύεται ολοένα και περισσότερο η ανάγκη για αναζήτηση μη φαρμακευτικών τρόπων αντιμετώπισης της οστεοπόρωσης, γεγονός που ενισχύεται από τις ενδείξεις ευεργετικής οστεοπροστατευτικής δράσης διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων, μερικά από τα οποία εμφανίζουν φυτο-οιστρογονικές ιδιότητες⁵⁵⁻⁵⁸. Όπως θα αναφερθεί πιο κάτω, τα φυτο-οιστρογόνα είναι φαινολικά συμπλέγματα που εξάγονται από τα φυτά και επιδεικνύουν οστεοπροστατευτικές ιδιότητες⁵⁶⁻⁵⁹. Επίσης, επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν χαμηλότερη επίπτωση στον καρκίνο μαστού και προστάτη σε πληθυσμούς που καταναλώνουν φυτο-οιστρογόνα⁵⁹. Στα πλαίσια αυτά οι *in vitro* μελέτες και ιδιαίτερα οι *in vivo* μελέτες σε ζώα -όπως η παρούσα- αποτελούν σημαντικό προθάλαμο για επιτυχείς κλινικές μελέτες, που επιθυμητά μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπίπλεκτη αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης⁶⁰⁻⁶⁵.

5.1 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα αποτελούν κατηγορία στεροειδών ορμονών που περιλαμβάνουν την οιστρόνη, οιστραδιόλη (E2) και οιστριόλη και την 17β-οιστραδιόλη, την πιο δραστική κυκλοφορούσα ορμόνη, που εμπλέκεται σε πληθώρα ζωτικών φυσιολογικών λειτουργιών που κυμαίνονται από την ανάπτυξη και διατήρηση των αναπαραγωγικών οργάνων μέχρι τη ρύθμιση της ομοιόστασης του καρδιαγγειακού, μυοσκελετικού, ανοσοποιητικού και κεντρικού νευρικού συστήματος⁶⁶. Η οιστραδιόλη επίσης συνεισφέρει στην έναρξη και ανάπτυξη των κακοηθικών ιστών στόχων⁶⁶. Η δράση της οιστραδιόλης επιτυγχάνεται μέσω των πυρηνικών υποδοχέων ERα και ERβ (Estrogen Receptor α και β). Φαίνεται ότι ο υποδοχέας ERα κυριαρχεί στη δράση (με μικρό μόνο ρόλο του υποδοχέα β) επί της μήτρας, των μαστικών αδένων, των βλεννογόνων αδένων, των σκελετικών μυών, του λιπώδους ιστού και του οστού⁶⁶. Αντίθετα ο ERβ είναι σημαντικός στη σηματοδότηση της οιστραδιόλης σε ωοθήκες, προστάτη, πνεύμονες, καρδιαγγειακό

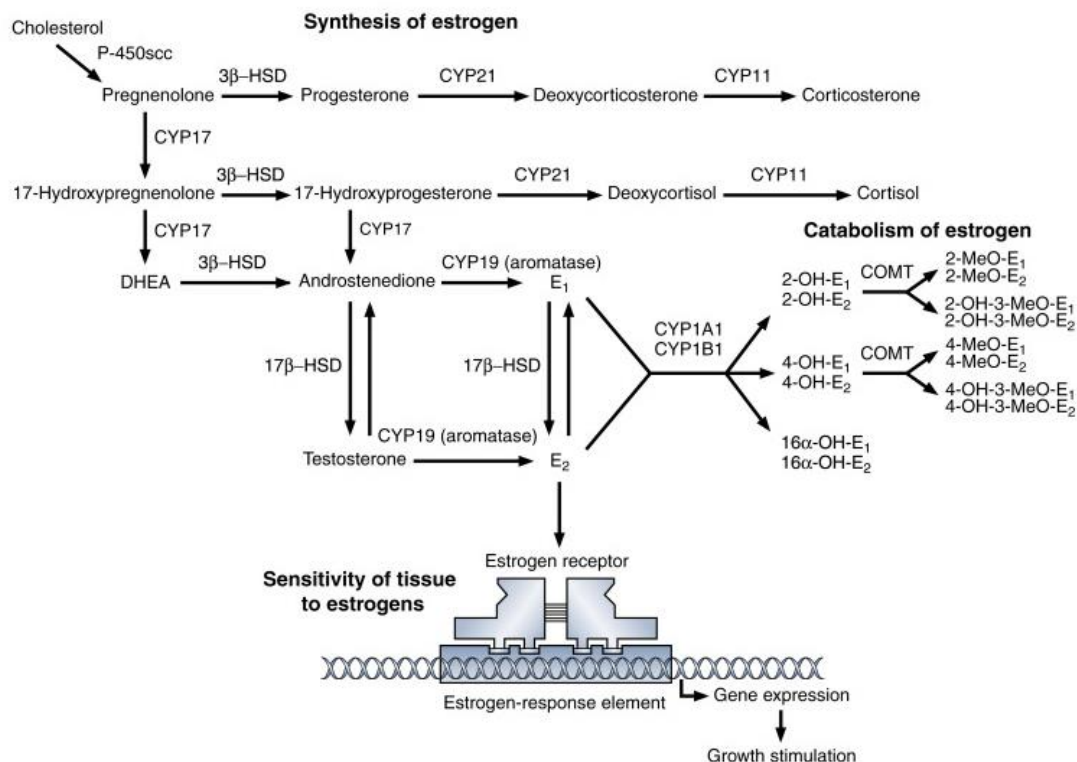
και κεντρικό νευρικό σύστημα⁶⁶. Βέβαια ακόμα και μέσα στον ίδιο ιστό, φαίνεται ότι η δράση κάθε υποδοχέα είναι εξαρτώμενη από τον τύπο του κυττάρου που εμπλέκεται, π.χ. στην ωοθήκη ο ERβ εκφράζεται σε άλλα κύτταρα ενώ ο ERα σε άλλα⁶⁶. Η εικόνα 14 δείχνει μια γραφική αναπαράσταση του οιστρογονικού υποδοχέα.



Εικόνα 14 Σχηματική απεικόνιση με 3D-rendering της δομής οιστρογονικού υποδοχέα (Πηγή: <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Emw>).

Οι **οιστρογονικοί υποδοχείς** (ER, Estrogen Receptors) είναι δομοστοιχειωτές πρωτεΐνες με τρόπο που διαφορετικά διακριτά δομικά τμήματα εκφράζουν μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Και οι δύο κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια και εκφράζονται σε ίδιους και διαφορετικούς ιστούς σε διάφορους βαθμούς. Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα α (ESR1) αποτελεί μεγάλο

γενετικό τμήμα που εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, περιοχές q24-q27, και ευθύνεται για την κωδικοποίηση μιας μεγάλης πρωτεΐνης 595 αμινοξέων. Παρόμοια το ελαφρώς μικρότερο γονίδιο του υποδοχέα β (ESR2) εδράζεται στο χρωμόσωμα 14, περιοχές q22-24, αποτελεί κι αυτό μεγάλο γενετικό τμήμα υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας τελικής πρωτεΐνης 530 αμινοξέων. Οι υποδοχείς των οιστρογόνων χωρίζονται σε 6 διακριτά λειτουργικά τμήματα. Τα **αμινοτελικά πεδία A/B** που παρουσιάζουν 17% ομοιότητα μεταξύ των ER. Η σχεδόν πανομοιότυπη στους υποδοχείς **κεντρική περιοχή C**, παρουσιάζει ομοιότητα 97% και είναι η περιοχή που συνδέεται με το DNA. Η **περιοχή D** που είναι σαν εύκαμπτος γίγγλυμος, παρουσιάζει ομοιότητα στους υποδοχείς κατά 36% και συνδέει το **τμήμα C** με το πολύ-λειτουργικό καρβοξυτελικό τμήμα E. Το **τμήμα E** παρουσιάζει ομοιότητα κατά 56% και είναι υπεύθυνο για την αγκυροβόληση στο σημείο της ορμονικής σύνδεσης. Το **τμήμα F** παρουσιάζει ομοιότητα 18% και βρίσκεται στο τελευταίο άκρο των υποδοχέων.⁶⁶



Εικόνα 15 Η σύνθεση των οιστρογόνων ξεκινά από τη χοληστερόλη με κύρια ενεργό τελική ουσία την οιστραδιόλη που ενεργεί επί του οιστρογονικού υποδοχέα (Πηγή: Marchand LR, A. Stewart J. Breast Cancer. In: Integrative Medicine. Elsevier; 2018).⁶⁷

Τα **φυσικά οιστρογόνα** είναι, όπως μαρτυρά ο χαρακτηρισμός τους, φυσικές ορμόνες που συντίθενται στις ωοθήκες των θηλαστικών και αποτελούν θεμελιώδεις ορμόνες για την ανάπτυξη και διατήρηση του αναπαραγωγικού συστήματος αλλά και για τη βιωσιμότητα του είδους μέσω της ουσιώδους επίδρασής τους στην κύηση και το θηλασμό. Οι ωοθήκες αποθηκεύουν χοληστερόλη και εξ αυτής συνθέτουν τα οιστρογόνα (Εικόνα 15) ⁶⁷, τα οποία απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, όπου συνδέονται με πρωτεΐνες. Μεταβολίζονται αρχικώς στο ήπαρ και εν συνεχεία μέσω της χολής φθάνουν στο έντερο απ' όπου επιστρέφουν στο ήπαρ, για να αποβληθούν τελικώς από τα ούρα και ένα μικρό ποσοστό από τα κόπρανα.

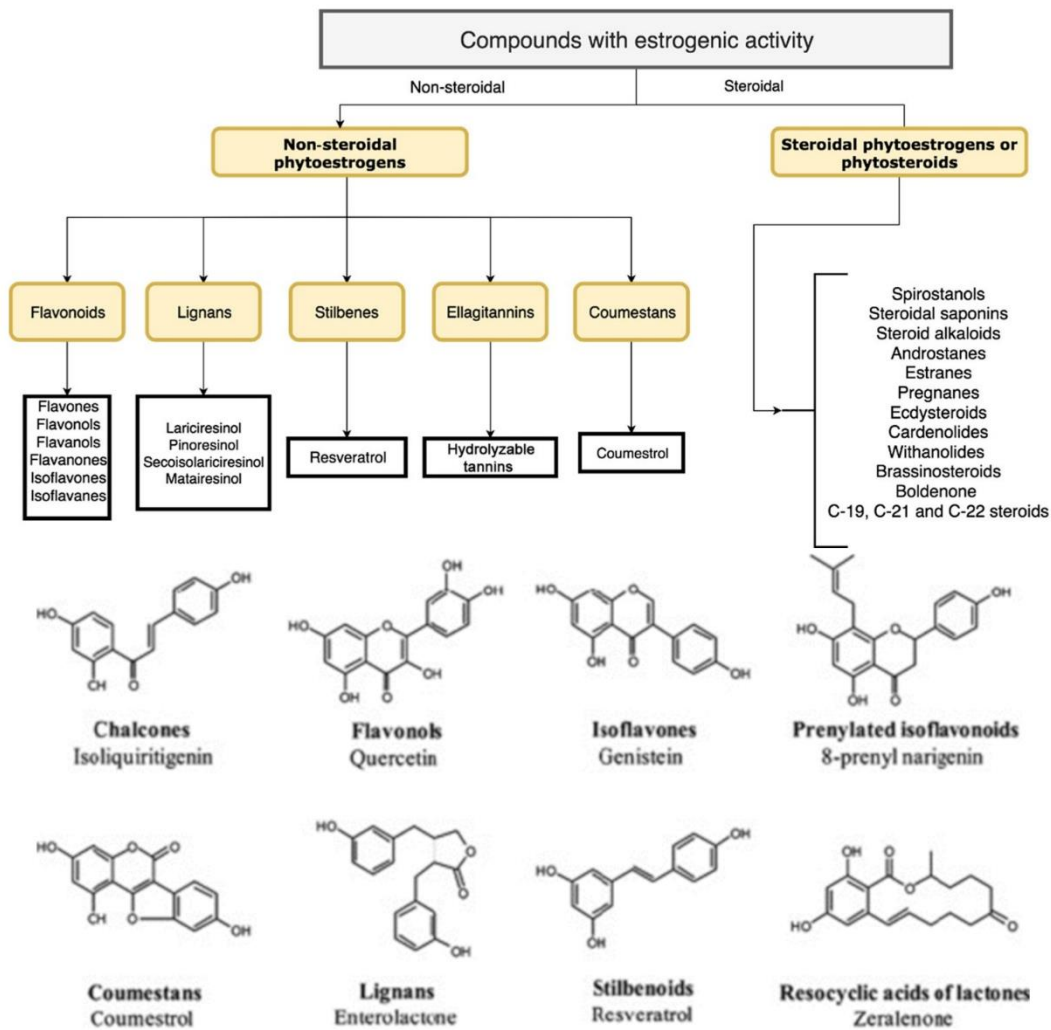
Εκτός από τα φυσικά οιστρογόνα, υπάρχουν κι άλλες ουσίες που παρουσιάζουν στενή ομοιότητα με τους οιστρογονικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα να μπορούν να προσδεθούν σε αυτούς και να προκαλέσουν δράση. Τέτοιες ουσίες είναι τα συνθετικά οιστρογόνα και επιπλέον, όπως θα αναφερθεί πιο κάτω, αρκετές φυσικές ουσίες που υπάρχουν στα φυτά αλλά όχι στα θηλαστικά. Ανάλογα με το αποτέλεσμα της σύνδεσης της ορμόνης με τον οιστρογονικό υποδοχέα, οι ορμόνες χαρακτηρίζονται ως αγωνιστές, ανταγωνιστές ή μερικώς αγωνιστές/ανταγωνιστές. Οι αγωνιστές προκαλούν δράση που μοιάζει με αυτή της οιστραδιόλης, ενώ οι ανταγωνιστές πρακτικώς αδρανοποιούν τον υποδοχέα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνδεθεί με ουσία-αγωνιστή. Τα φυσικά οιστρογόνα είναι αγωνιστές. Οι μερικώς αγωνιστές/ανταγωνιστές μπορούν να προκαλέσουν και τις δύο παραπάνω δράσεις ανάλογα με το είδος του κυττάρου που συνδέονται, τον ιστό, τον οργανισμό ή ακόμα και τη γονιδιακή αλυσίδα στην οποία εμπλέκονται. Οι τελευταίες ουσίες έχουν ήδη αναφερθεί πιο πάνω και ονομάζονται εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων οιστρογόνων ή αλλιώς SERMs.

5.2 Οιστρογόνα φυτικής προέλευσης

Τα οιστρογόνα φυτικής προέλευσης, ή αλλιώς φυτοοιστρογόνα, είναι φυσικά προϊόντα τα οποία παρουσιάζουν δομικές και κυρίως λειτουργικές αναλογίες με τα ενδογενή οιστρογόνα, με αποτέλεσμα να έχουν την ικανότητα να συνδέονται με

τους υποδοχείς οιστρογόνων μιμούμενα οιστρογονική δράση σε άλλοτε άλλο βαθμό. Παλαιότερες επιδημιολογικές μελέτες στην ασιατική ήπειρο είχαν δώσει τις ενδείξεις ότι σε ορισμένους πληθυσμούς τα ορμονοεξαρτώμενα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης και η ορμονοσχετιζόμενη επίπτωση καρκίνου του μαστού ήταν λιγότερο συχνά από ότι στους δυτικούς πληθυσμούς, γεγονός που συσχετίστηκε με τις διατροφικές συνήθειες αυτών των πληθυσμών⁶⁸. Αυτή η διαπίστωση σε συνδυασμό με προηγηθείσες παρατηρήσεις έφερε στο επιστημονικό προσκήνιο τον όρο του φυτοοιστρογόνου, της ουσίας δηλαδή που περιέχεται στα φυτικά τρόφιμα και μπορεί να προσομοιώσει τη δράση των οιστρογόνων.

Τα φυτά συχνά περιέχουν βιοδραστικά συστατικά ενώ μερικά από αυτά είναι πλούσια σε φυτοοιστρογόνα. Τα **φυτοοιστρογόνα** παρουσιάζουν δομικές και κυρίως λειτουργικές αναλογίες με τα ενδογενή οιστρογόνα, με αποτέλεσμα να μπορούν να μιμούνται ή να ανταγωνίζονται τη δράση των στεροειδών στα θηλαστικά. Χημικά μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες όπως λιγνάνια, флаβονοειδή, στυλβένια, κουμεστάνια, που υπάρχουν σε διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Τα **φυτοοιστρογόνα** μπορεί να παρουσιάζουν αγωνιστική, ανταγωνιστική ή μικτή δράση στους ανθρώπινους και ζωικούς υποδοχείς οιστρογόνων, αναλόγως της δομής και συγκέντρωσής τους, το είδος των υποδοχέων και το είδος του κυττάρου. Ειδικά τα флаβονοειδή, είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και θεωρούνται οι πιο συχνές ουσίες με οιστρογονική δράση (Στην εικόνα 16 φαίνεται η κατηγοριοποίηση των φυτοοιστρογόνων, σε **στεροειδή** και **μη στεροειδή**).⁶⁹



Εικόνα 16 Κατηγοριοποίηση φυτοοιστρογόνων (Πηγή: Di Gioia F, Petropoulos SA. Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. In: Advances in Food and Nutrition Research).⁶⁹

Ο κατάλογος με τα φυτοοιστρογόνα που έχουν ήδη ανακαλυφθεί είναι ήδη πολύ μεγάλος και διευρύνεται συνεχώς, ενώ διευρύνονται και οι γνώσεις μας σχετικά με τις ευεργετικές δράσεις αυτών των ουσιών στο ζωικό και ανθρώπινο μεταβολισμό. Τα λαχανικά θεωρούνται καλές πηγές φλαβονοειδών αλλά και νέο- και λιγνανίων. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη, η δεδζεΐνη, δεδζίνη, φορμονονετίνη, ονονίνη, ισοερυθρίνη Α, υδροξυερυθρίνη Α έχουν ισχυρή οιστρογονική δράση. Άλλες πηγές είναι τα μούρα, το σκόρδο, το μπρόκολο, το κολοκύθι, το καρότο και το παντζάρι. Άλλες έρευνες δείχνουν το λιναρόσπορο ως το

πιο πλούσιο σε λιγνάνια, ενώ δεν υπολείπονται τα καρότα, το κουνουπίδι, οι αγκινάρες και το μαρούλι τύπου iceberg. Οι ανακαλύψεις συνεχίζονται και στα παραπάνω προστίθενται τα φασόλια, η σόγια, το τριφύλλι, το κρεμμύδι, το πράσινο πιπέρι, το ραπανάκι και πολλά άλλα, κάθε ένα από τα οποία περιέχει ποικίλα φυτοοιστρογόνα, π.χ. φλαβόνες το μάραθο, ισοφλαβόνες το κουνουπίδι, λιγνάνια τα φασόλια, κουμεστρόλες ο βλαστός σόγιας, στερόλες το ραπανάκι, στιλβένες η τομάτα, σαπωνίνες το σπανάκι. Πολλά δε φυτά περιέχουν περισσότερα του ενός φυτοοιστρογόνα.⁶⁹

Σχετικά με την υγεία, υπάρχουν αρκετές κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν ότι η πρόσληψη φυτοοιστρογόνων μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση απέναντι σε διάφορες χρόνιες παθήσεις όπως μεταξύ άλλων ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος και η οστεοπόρωση. Πράγματι σε μια ανασκόπηση που έγινε πρόσφατα από τους Di Gioia και Petropoulos⁶⁹, αναδείχθηκαν πολλές μελετημένες και σημαντικές επιδράσεις στην υγεία ανθρώπου και ζώων, που καλύπτουν μάλιστα μεγάλο εύρος των φυτοοιστρογόνων. **Φλαβόνες:** η Απιγενίνη αναστέλλει το μαστικό καρκίνωμα στον άνθρωπο, καταστέλλει την προαγωγή δερματικού όγκου σε ποντίκια και επιπλέον έχει αντιβακτηριδιακή, αντιφλεγμονώδη, διουρητική, υποτασική και μυοχαλαρωτική δράση, ενώ επίσης προωθεί την κυτταρική νέκρωση της Candida. Η Λουτεολίνη έχει αντικαρκινική δράση στο μαστό, αντι-Candida δράση, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιόγones και αντιβακτηριακές δράσεις,. **Φλαβονόλες:** η Κεμπφερόλη παρουσιάζει δράση αντι-Candida, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική, όπως επίσης και η Κουερκετίνη. **Λιγνάνια:** πολλά λιγνάνια επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, οιστρογονική δράση, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, αντικαρκινική δράση, θετική επίδραση στην αϋπνία και σε γνωστικές λειτουργίες όπως στη νόσο Alzheimer, αντιμυκητιασική δράση και μείωση καρδιαγγειακού κινδύνου. **Ισοφλαβόνες:** πληθώρα ισοφλαβονών όπως η γενιστεΐνη, η ονονίνη κ.ά, παρουσιάζουν οιστρογονική και αντιοιστρογονική δράση και πολλές άλλες δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντι-ϊική, αντιβακτηριακή, καρδιοπροστατευτική, αντιαθηρωματική, υποχοληστεριναιμική, αντικαρκινική σε ωοθήκες, μαστό και προστάτη, νευροπροστατευτική, αντιμικροβιακή, αντιγηραντική. **Στιλβένια:** η

Ρεσβερατρόλη παρουσιάζει δράσεις αντιγήρανσης, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, υποχοληστεριναιμικές και αντιδιαβητικές. **Κουμestάνες:** η Κουμestρόλη μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου μαστού και προστάτη.

69

Λόγω της πολυπλοκότητας και του βάθους που χαρακτηρίζει την οικογένεια των φυτοοιστρογόνων, θα ακολουθήσει εστίαση στα φυτοοιστρογονικά συστατικά του φυτού που αφορά την παρούσα έρευνα, το οποίο είναι η *Glycyrrhiza glabra* (Γλυκύρριζα η λεία, εφεξής γλυκύρριζα).

6. Γλυκύρριζα (*Glycyrrhiza glabra*)

Η γλυκύρριζα ή γλυκόριζα που είναι ευρέως γνωστή και ως liquorice, με ιχνηλατήσιμη ιστορία 6000 χρόνων⁷⁰, είναι ένα ποώδες πολυετές φυτό που ανευρίσκεται στη νότια Ευρώπη, την Ινδία και περιοχές της Ασίας (Εικόνα 17). Φτάνει σε ύψος 1-1,2 μέτρα και έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για τις ρίζες του, που έχουν γλυκιά γεύση κυρίως λόγω της πολυδύναμης ουσίας γλυκυριζίνης^{71,72} που περιέχει. Αυτός είναι και ο λόγος της ετυμολογίας του φυτού, γλυκός/ύς+ρίζα= γλυκύρριζα, γλυκόριζα. Προηγούμενες έρευνες σχετικά με τη γλυκύρριζα έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία φυτοοιστρογόνων και άλλων ουσιών στις ρίζες του φυτού, που παρουσιάζουν οιστρογονική δράση⁷³, ενώ οι θετικές της δράσεις έχουν τεκμηριωθεί σε πολλές έρευνες και αφορούν την αντι-λιπιδαιμική δράση⁷⁴⁻⁷⁹, την υπο-χοληστεριναιμική δράση⁸⁰ και την αντιδιαβητική δράση⁸¹. Μολονότι η κατάχρηση της γλυκύρριζας μπορεί να είναι βλαπτική, η χαμηλή της τοξικότητα σε φυσιολογική χρήση την καθιστούν μια ασφαλή πηγή τροφίμου⁷¹. Εκτός των παραπάνω η γλυκύρριζα χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση και ως γλυκαντικό σε βρώσιμες και πόσιμες τροφές ενώ αποτελεί σημαντικό συστατικό στην κοσμετολογία, τη φαρμακολογία και τη βιομηχανία καπνού⁸²⁻⁸⁵.

Το γεγονός ότι *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν τεκμηριώσει τους ποικίλους βαθμούς οιστρογονικού αγωνιστή των εκχυλισμάτων ριζών γλυκύρριζας σε διάφορους ιστούς⁷³, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη της οιστρογονικής επίδρασης στα οστά *in vivo*.



Εικόνα 17 Φωτογραφία και γραφική απεικόνιση του φυτού της γλυκύριζας.

6.1 Εκχύλισμα *Glycyrrhiza glabra*

Για την παραγωγή του εκχυλίσματος στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ξηρές ρίζες του φυτού *Glycyrrhiza glabra*, οι οποίες εκχυλίστηκαν με μεθανόλη με τη μέθοδο υποβοηθούμενης εκχύλισης με υπερήχους. Το ξηρό

εκχύλισμα διαλύθηκε στο νερό και το τελικό εκχύλισμα που προέκυψε ήταν η μοναδική πηγή πρόσληψης υγρού από τα ζώα εργαστηρίου, όπως θα περιγραφεί πιο συγκεκριμένα στο Ειδικό Μέρος.

Η ανάλυση του τελικού εκχυλίσματος που προέκυψε, το οποίο χορηγήθηκε στους επίμυες της παρούσης μελέτης, αναλύθηκε και επιβεβαιώθηκε η παρουσία πληθώρας φυτοοιστρογόνων σε αυτό. Σε πολλά από αυτά τα φυτοοιστρογόνα έχουν αποδοθεί σημαντικές ευεργετικές δράσεις, τόσο προκλινικά όσο και κλινικά. Ενδεικτικά, τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές δράσεις⁸⁶. Επιπλέον το γλυκυρριζικό οξύ βρέθηκε ότι προστατεύει το μυοκάρδιο από ισχαιμία⁸⁷ και δείχνει σε μοντέλο τρωκτικών ισχυρή νευροπροστατευτική δράση σε χρόνια εγκεφαλική υποδιήθηση⁸⁸. Η ουσία Licoflavone προστάτευσε το γαστρικό βλενογόνο σε επίμυες ενισχύοντας την παραγωγή προσταγλανδινών E2⁸⁹, ενώ επίσης βρέθηκε να έχει ελκοπροστατευτική δράση σε επίμυες μέσω ρύθμισης των μεσολαβητών φλεγμονής και του μεταβολισμού των αμινοξέων⁹⁰. Περαιτέρω το φυτοοιστρογόνο Glabrone επέδειξε αντι-ϊική δράση⁹¹, ενώ η Glabrol πιθανή αντι-υπερχοληστεριναιμική δράση⁹². Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το φυτοοιστρογόνο Formononetin έδειξε σε επίμυες πιθανή δυνατότητα να ελέγξει τη νεφροπάθεια σε διαβήτη τύπου 2⁹³, ενώ επίσης έδειξε να έχει δράσεις αντι-οστεοσαρκώματος τόσο σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες⁹⁴.

Στο Ειδικό Μέρος θα ακολουθήσει η εστιασμένη ανάλυση των επιδράσεων των φυτοοιστρογόνων στα οστά των επίμυων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή – Σκοπός μελέτης.

Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση είναι αναγνωρισμένο πρόβλημα υγείας που επηρεάζει κυρίως γυναίκες της λευκής φυλής σε όλο τον κόσμο. Η διαταραχή της δοκιδωτής αρχιτεκτονικής και η φλοιώδης εξασθένηση των οστών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης των καταγμάτων οσφυϊκών σποδνύλων, αντιβραχίου και ισχίου, με το τελευταίο να αποτελεί σοβαρό κοινωνικό-οικονομικό πρόβλημα, μιας και η χειρουργική αποκατάσταση είναι συνήθως επιβεβλημένη και ο δείκτης θνησιμότητας στο ένα έτος ξεπερνά το 15-30%³⁶⁻⁴¹.

Η αναγκαιότητα για οστεοπροστατευτική φαρμακευτική παρέμβαση (ορμονική θεραπεία, δενοσουμάμπη, καλσιτονίνη, διφωσφονικά, strontium ranelate, SERM) θεωρείται ευρέως η καλύτερη προσέγγιση στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης⁴²⁻⁴⁴. Ωστόσο η μακροχρόνια συμμόρφωση στη θεραπεία μπορεί να προκύψει χαμηλή⁴⁵⁻⁴⁸, εξαιτίας ανεπιθύμητων ενεργειών και επιπλοκών, όπως η στεφανιαία νόσος, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ο καρκίνος μαστού και μήτρας, τα χαμηλής ενέργειας κατάγματα του μηριαίου και η οστεονέκρωση της γνάθου⁴⁹⁻⁵⁴. Η επιθυμία για μη-φαρμακευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης γίνεται ολοένα και πιο ισχυρή, όσο οι ενδείξεις της ευεργετικής επίδρασης μερικών φυτών οδηγεί σε μελέτες φυτικών εκχυλισμάτων, κάποια από τα οποία εκδηλώνουν φυτο-οιστρογονικές ιδιότητες⁵⁵⁻⁵⁸. Μάλιστα, επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν χαμηλότερη επίπτωση καρκίνου μαστού και προστάτη σε πληθυσμούς που καταναλώνουν φυτο-οιστρογόνα⁵⁹. Οι *in vitro* μελέτες σε ζώα αποτελούν σημαντικό προθάλαμο για επιτυχημένες κλινικές μελέτες, οι οποίες επιθυμητά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ελεύθερη από επιπλοκές αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης⁶⁰⁻⁶⁵.

Ως σύντομη υπενθύμιση από το Γενικό Μέρος, η γλυκύρριζα παρουσιάζει ιχνηλατήσιμη ιστορία 6000 χρόνων και είναι ένα ποώδες πολυετές φυτό που ανευρίσκεται στη νότια Ευρώπη, την Ινδία και περιοχές της Ασίας. Φτάνει σε ύψος 1-1,2 μέτρα και έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για τις ρίζες του, που έχουν γλυκιά γεύση κυρίως λόγω της πολυδύναμης ουσίας γλυκυριζίνης που περιέχει. Προηγούμενες έρευνες σχετικά με τη γλυκύρριζα έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία φυτοοιστρογόνων και άλλων ουσιών στις ρίζες του φυτού, που παρουσιάζουν οιστρογονική δράση, ενώ οι θετικές της δράσεις έχουν τεκμηριωθεί σε πολλές

έρευνες και αφορούν την αντι-λιπιδαιμική δράση, την υπο-χοληστεριναϊκή δράση και την αντιδιαβητική δράση. Επίσης χαρακτηρίζεται από χαμηλή τοξικότητα σε φυσιολογική χρήση και αποτελεί ασφαλή πηγή τροφίμου. Το γεγονός ότι *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν τεκμηριώσει τους ποικίλους βαθμούς οιστρογονικού αγωνιστή των εκχυλισμάτων ριζών γλυκύρριζας σε διάφορους ιστούς, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη της οιστρογονικής επίδρασης στα οστά *in vivo*. Για την παραγωγή του εκχυλίσματος στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ξηρές ρίζες του φυτού *Glycyrrhiza glabra*, οι οποίες εκχυλίστηκαν με μεθανόλη με τη μέθοδο υποβοηθούμενης εκχύλισης με υπερήχους, που θα αναλυθεί στη συνέχεια. Το ξηρό εκχύλισμα διαλύθηκε στο νερό και το τελικό εκχύλισμα που προέκυψε ήταν η μοναδική πηγή πρόσληψης υγρού από τα ζώα εργαστηρίου. Η ανάλυση του τελικού εκχυλίσματος που προέκυψε, το οποίο χορηγήθηκε στους επίμυες της παρούσης μελέτης, αναλύθηκε και επιβεβαιώθηκε η παρουσία πληθώρας φυτοοιστρογόνων σε αυτό, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Σε πολλά από αυτά τα φυτοοιστρογόνα έχουν αποδοθεί σημαντικές ευεργετικές δράσεις, τόσο προκλινικά όσο και κλινικά.

2. Υλικά και μέθοδος

Το πειραματικό μας πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής Νομαρχίας Αθήνας (αριθμός άδειας K4505/10-7-2014), σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, σε συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63/EU).

2.1 Ζώα εργαστηρίου

Η καταχωρημένη μονάδα ανατροφής του ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με έδρα την Αθήνα μας προμήθευσε με τριάντα (30) αρτιμελείς θηλυκούς επίμυες τύπου Wistar, ηλικίας τριών (3) μηνών, οι οποίοι αρχικώς ανατράφηκαν έως την ηλικία των δέκα (10) μηνών. Τα ζώα τοποθετήθηκαν σε εργαστηριακούς κλωβούς (45 x 30 x 20 cm, IFFA), ανά τρία ή τέσσερα σε κάθε κλωβό, σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες με θερμοκρασία εντός 19-22 βαθμών Κελσίου, σχετική

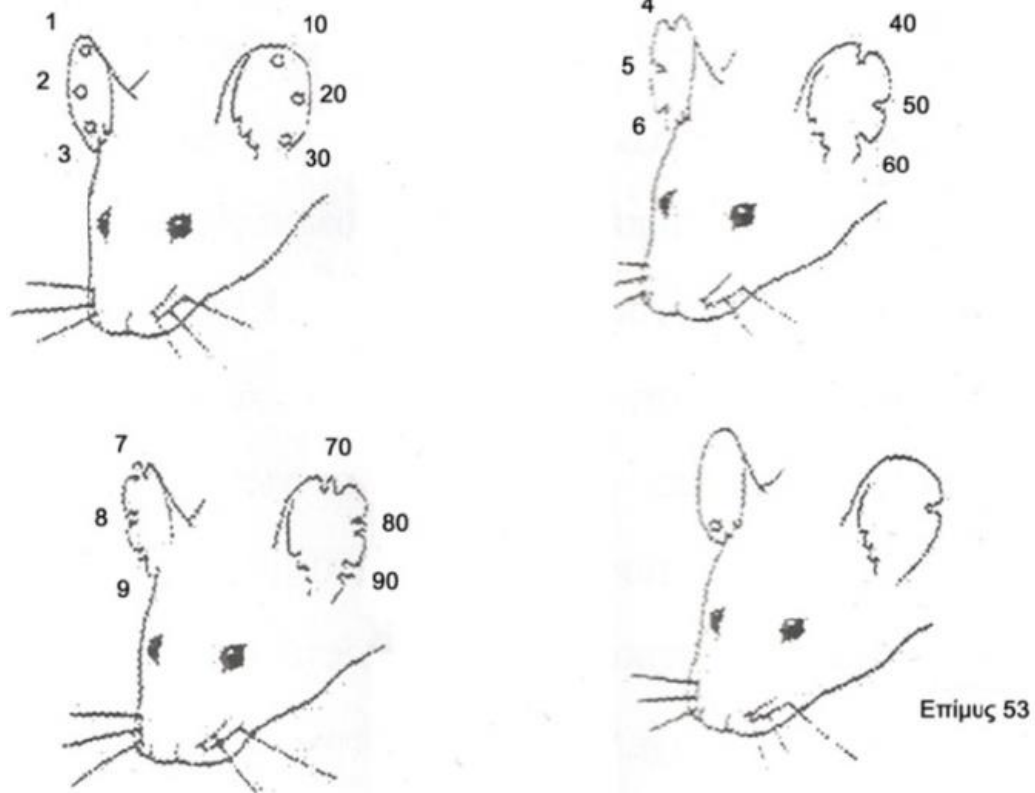
υγρασία μεταξύ 55% έως 65%, δεκαπέντε εναλλαγές αέρα ανά ώρα και κύκλο ημέρας/νύχτας ανά δώδεκα ώρες (06:00-18:00). Οι επίμυες υπεβλήθησαν σε μια αρχική μέτρηση σωματικού βάρους και κατόπιν μοιράστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες των δέκα: η Ομάδα Ελέγχου χωρίς καμία θεραπευτική παρέμβαση, εφεξής αναφερόμενη και ως Control (n=10), η Ομάδα Ωοθηκεκτομής, εφεξής αναφερόμενη και ως OVX (n=10), και η Ομάδα που κατόπιν ωοθηκεκτομής έλαβε το εκχύλισμα της Γλυκύριζας, εφεξής αναφερόμενη και ως OVX+G (n=10). Το σωματικό βάρος και οι τοκετοομάδες ελήφθησαν υπ'όψη στην ομαδοποίηση, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των πιθανών γενετικών διακυμάνσεων. Τα σωματικά βάρη και η κατανάλωση πρόσληψης στερεάς τροφής και υγρών τέθηκαν σε τουλάχιστον μια εβδομαδιαία μέτρηση, από την ηλικία των 26-29 εβδομάδων που ελήφθησαν, ως ένα μέτρο αξιολόγησης της κλινικής και αναπτυξιακής τους πορείας.

Κατά την αρχική εγκατάσταση των επίμυων στο εργαστήριο, δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στον εγκλιματισμό των ζώων, κατά τον οποίο για 2 εβδομάδες τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον ήρεμο χωρίς καμία εξωγενή-στρεσογόνο παρέμβαση. Επίσης για λόγους καραντίνας κρατήθηκαν αρχικά σε θάλαμο ξεχωριστό από τα υπόλοιπα ζώα που ήδη διαβιούσαν εντός της ευρύτερης δομής του εργαστηρίου. Οι χειρισμοί πάνω στα ζώα ήταν προσεκτικοί και ήπιοι ώστε να επιφέρουν το ελάχιστο δυνατό στρες. Τα ζώα είχαν δραστηριότητα εντός των κλωβών σε υπόστρωμα από ειδικό πριονίδι, το οποίο αλλαζόταν τακτικά.

Η σήμανση και **ταυτοποίηση** των επίμυων που ακολούθησε, χωρίστηκε σε δύο φάσεις, με σεβασμό στα τρία R. Μέχρι την πρώτη χορήγηση αναισθησίας, τα ζώα αριθμήθηκαν με τη χρήση γραμμών ανεξίτηλου χρώματος στην ουρά, διαφορετικό για κάθε ομάδα (μπλε, κόκκινο και μαύρο). Μια γραμμή στην άκρη της ουράς δήλωνε τις μονάδες και μια παχύτερη γραμμή στην αρχή της ουράς την πεντάδα. Η μόνιμη αρίθμηση των ζώων έγινε μετά τη χορήγηση της πρώτης αναισθησίας και χρησιμοποιήθηκε ανώδυνη τεχνική⁹⁵, όπως φαίνεται στην εικόνα 18.

2.2. Μετρήσεις οστικής μάζας

Για τις μετρήσεις οστικής μάζας BMD, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απορροφησιμετρίας ακτινών Χ διπλής ενέργειας με το μηχάνημα General Electric Lunar Prodigy Densitometry, το οποίο βρίσκεται εντός των εγκαταστάσεων του εργαστηρίου (Εικόνα 19) (Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος Ε.Ε.Π.Μ.Σ). Χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό για μικρά ζώα και διενεργείτο αρχικοποίηση και βαθμονόμηση του μηχανήματος πριν από κάθε μέτρηση της κάθε ομάδας, από τον ίδιο χρήστη. Πριν από κάθε μέτρηση χορηγήθηκε στα ζώα αναισθησία με δεξμεδετομιδίνη και κεταμίνη. Όλα τα ζώα μετρήθηκαν αρχικώς πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση και όντας όλα στην ίδια ηλικία, με απόκλιση μιας εβδομάδας, κατά τις μετρήσεις. Κατόπιν έλαβαν χώρα μετρήσεις στους τρεις και έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή, χρονικά διαστήματα με τα οποία συντονίστηκαν και οι μετρήσεις της ομάδας ελέγχου. Μετρήθηκαν οι οστικές πυκνότητες ολόκληρης της κνήμης και της εγγύς επίφυσης. Για την εγγύς επίφυση ορίστηκε ως επιφάνεια μέτρησης της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI, regions of interest) τετράγωνο με πλευρά 0,16 cm. Η καταγραφή των τιμών έγινε τυφλά από τον ίδιο ουδέτερο χρήστη.



Εικόνα 18 Σήμανση στα ώτα των επίμυων, δεξιά οι μονάδες και αριστερά οι δεκάδες. Κάτω δεξιά επιδεικνύεται ένα παράδειγμα επίμυος με αριθμό 53 (πηγή Δοντά Ι. Πειραματισμός στους μυς και επίμυς. Οστούν. 1993).⁹⁵



Εικόνα 19 Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμυος στο μηχάνημα μέτρησης BMD εντός του εργαστηρίου.

2.3. Ωοθηκεκτομές

Η ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της BMD των ωοθηκεκτομημένων επίμυων σε σύγκριση με την BMD ίδιων ηλικιακά επίμυων χωρίς παρέμβαση. Μετά την πρώτη μέτρηση BMD, ακολούθησε η πλήρης ωοθηκεκτομή των ομάδων OVX και OVX+G. Για αναισθησία χρησιμοποιήθηκε ενδομυϊκά όπως αναφέρθηκε δεξμεδετομιδίνη και κεταμίνη, ενώ για αναλγησία καρπροφένη. Κατόπιν άσηπτης προετοιμασίας ακολουθήθηκε προσέγγιση μέσης γραμμής με τομή στο ουραίο τρίτο της απόστασης ομφαλού – ηβοϊσχιακής σύμφυσης. Κατόπιν διάνοιξης του υποδόριου ιστού και τομής της λευκής γραμμής, αποκτήθηκε πρόσβαση στην περιτοναϊκή κοιλότητα, όπου ανευρέθηκε αρχικώς η αριστερή ωοθήκη και αφού διαχωρίστηκε ο πλατύς σύνδεσμος σε περιοχή με ελάχιστα αγγεία, έγινε απολίνωσή της με λεπτό απορροφήσιμο ράμμα στο ύψος του ιδίου συνδέσμου της ωοθήκης και τομή κεφαλικά αυτής. Έπειτα απολινώθηκαν τα ωοθηκικά αγγεία στο ύψος του κρεμαστήρα συνδέσμου της ωοθήκης και διατμήθηκαν κοιλιακά της απολίνωσης. Το κολόβωμα επεστράφη ομαλά στην κοιλιακή κοιλότητα αφού ελέγχθηκε για πιθανή αιμορραγία. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε για την δεξιά ωοθήκη και τελικώς έγινε κλείσιμο του τραύματος κατά στρώματα με μονές ραφές. Όλα τα παραπάνω επαναλήφθηκαν από την ίδια χειρουργική ομάδα σε κάθε ζώο (Εικόνα 20).



Εικόνα 20 Αριστερά η τομή στο δέρμα και δεξιά το δεξιό κέρασ της μήτρας με τη σύστοιχη ωοθήκη. Οι εικόνες είναι ευγενική παραχώρηση του συνεργάτη Παύλου Λελόβα.

2.4. Εκχύλισμα

2.4.1. Ανάλυση και προετοιμασία

Χρησιμοποιήθηκε υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας για την ανάλυση των συστατικών της γλυκύριζας (Ultra Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry (UPLC-HRMS) & High Resolution Mass Spectrometry / Mass Spectrometry (HRMS/MS). Για αυτήν την ανάλυση (LC-MS) χρησιμοποιήθηκε το σύστημα AQUITY UPLC (Waters), το οποίο ήταν συνδεδεμένο στον υβριδικό φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific). Έγινε ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και η διαδικασία έλαβε χώρα σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού.

Το σύστημα του διαλυτικού μέσου αποτελείτο από (A) υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0,1% και (B) ακετονιτρίλη, και ο ρυθμός ροής τέθηκε στα 0,4ml/min. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την έκλυση είχε ως εξής: 2% B για δύο λεπτά, 100% B για δεκαοκτώ λεπτά, διακοπή για δύο λεπτά, 2% B για ένα λεπτό. Η εξισορρόπηση της στήλης γινόταν στο τέλος για τέσσερα λεπτά. Περαιτέρω ο όγκος έγχυσης ορίστηκε στα 10 μL. Για την προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν ισομερώς νερό και ακετονιτρίλη (1:1) σε συγκέντρωση 0,3 mg/ml. Η χρωματογραφική στήλη ήταν Supelco Ascentis Express C18 (100 x 2.1 mm i.d 2,7μm μέγεθος σωματιδίου). Όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την ανάλυση HRMS & HRMS/MS ελήφθησαν σε εύρος μάζας 100-1000m/z. Οι ακόλουθες συνθήκες ESI εφαρμόστηκαν: τριχοειδική θερμοκρασία 320°C, τριχοειδικό δυναμικό -40V, σωλήνας φακού -120V, δυναμικό ESI 2,7kV.

Το άζωτο χρησίμευσε τόσο ως θήκη, όσο και ως βοηθητικό αέριο (40 Au και 8 Au, αντίστοιχα). Για τις λήψεις HRMS / MS, χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος εξαρτώμενη από δεδομένα, η οποία περιλαμβάνει την ανίχνευση (πλήρη σάρωση) και την θραυσματοποίηση των τριών πιο έντονων κορυφών για κάθε σάρωση. Όσον αφορά τα πειράματα HRMS / MS, η δύναμη ανάλυσης μάζας ήταν 30.000 για όλα τα επίπεδα και η κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης στην παγίδα ιόντων ρυθμίστηκε στο 35,0% (q=0,25). Προκειμένου να προσδιοριστούν τα συστατικά του εκχυλίσματος (π.χ. χρόνος κατακράτησης, ακριβής m/z, πολικότητα, προτεινόμενη

στοιχειακή σύνθεση, βαθμός ακορεστότητας και φάσματα HRMS/MS και τρόπος θραυσματοποίησης) χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικά και φασματομετρικά χαρακτηριστικά. Τα πρωτογενή δεδομένα ελήφθησαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χρήση της έκδοσης λογισμικού XCalibur 2.2.4 από την Thermo Scientific.

Για την ανάλυση HPLC του μεθανολικού εκχυλίσματος γλυκύριζας, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Thermo Finnigan HPLC-PDA (αντλία P4000, AS3000 Autosampler, PDA ανιχνευτής UV8000, λογισμικό Chromquest™ 4.1 Software) και Supelco RP18 Discovery HS-C18 (250 mm, 4,6 mm, 5 μm) χρωματογραφική στήλη. Η κινητή φάση ήταν 0,1% φορμικό οξύ (Διαλύτης A) και μεθανόλη (Διαλύτης B). Η έκλυση ξεκίνησε με 2% B, έφθασε το 40% B σε 10 λεπτά και διατηρήθηκε ισοκρατικά για 10 λεπτά, 50% B στα επόμενα 5 λεπτά και διατηρήθηκε ισοκρατικά επί 10 λεπτά, 100% B σε 25 λεπτά και διατηρήθηκε για 5 λεπτά πριν επιστρέψει στις αρχικές συνθήκες σε 2 λεπτά, για 5 λεπτά επανεξισορρόπηση. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 254 nm, 280 nm και 366 nm. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε σταθερός στα 1 ml/min και η θερμοκρασία στήλης στους 25°C.

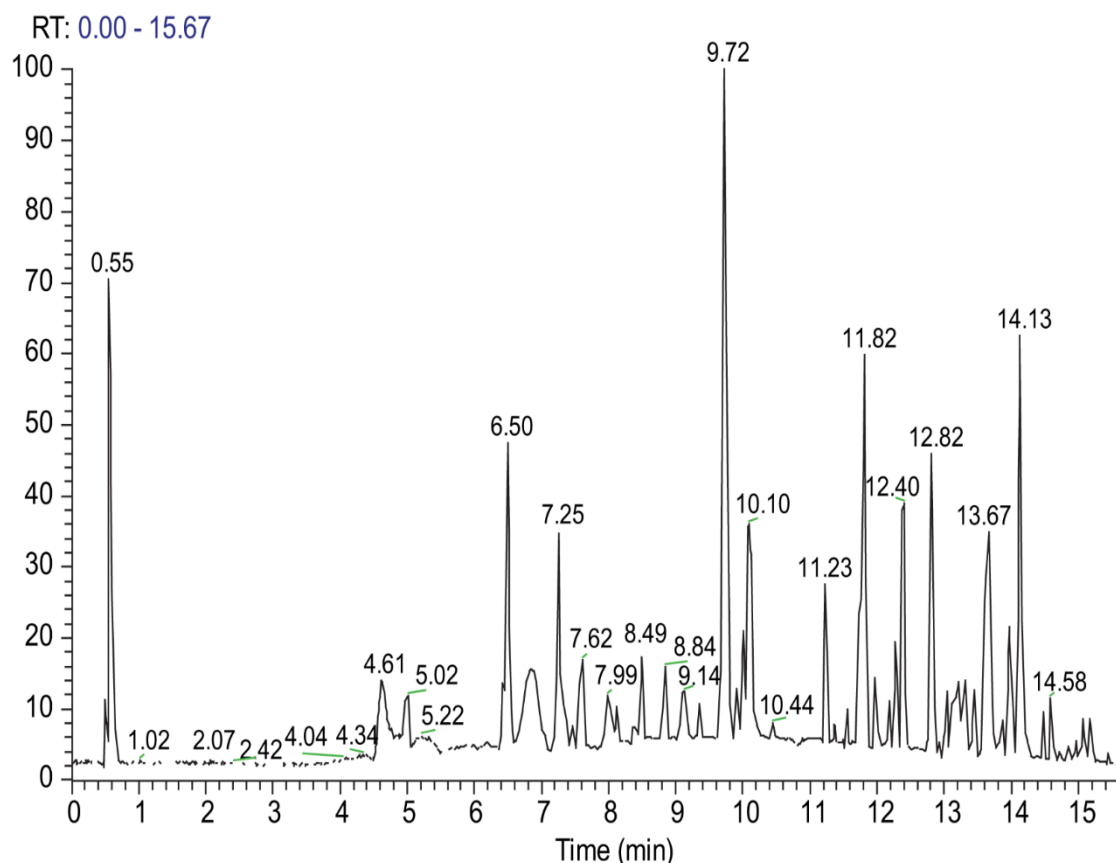
Για την ταυτοποίηση των δραστικών ενώσεων στο εκχύλισμα *G. glabra*, εφαρμόστηκε μια μέθοδος LC-HRMS. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτής μάζας Orbitrap υψηλής ανάλυσης και σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε με σύγκριση των δεδομένων HRMS και HRMS / MS των ανιχνευόμενων συστατικών με τα σχετικά δημοσιευμένα δεδομένα⁹⁶⁻⁹⁸ και τις βάσεις δεδομένων των φυσικών προϊόντων (PubChem, ChemSpider).

Επιπροσθέτως, η σχετική ποσοτική ανάλυση του εκχυλίσματος διεξήχθη χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που αναπτύχθηκε σε ένα σύστημα HPLC-DAD. Το εκχύλισμα ήταν ιδιαίτερα πλούσιο σε φαινολικά συστατικά και σαπωνίνες. Η γλυκυρριζίνη ήταν το κύριο συστατικό της γλυκύριζας, με συγκέντρωση 12,8% στο εκχύλισμα μεθανόλης. Τα άλλα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος ήταν η λικοτριτινοपुरιδίνη (4,1%), η 3-υδροξυγλαμπρόλη (3,2%), η γλαμπριδίνη (3,1%) και η κανζονόλη Υ (3,0%). Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα μεθανόλης της *G. glabra* χρησιμοποιώντας UPLC-ESI-HRMS & HRMS / MS

παρατίθενται στον πίνακα 2. Το χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος της *G. glabra* παρουσιάζεται στην εικόνα 21.

[M-H]-						
Compounds	t _R (min)	Theoretical m/z	Experimental m/z	Delta (ppm)	RDBeq	Molecular Formula
Liquiritin apioside	6.50	549.16136	549.16168	0.58	12.5	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃
Licorice-glycoside C1 or	7.62	725.20825	725.20871	-0.63	18.5	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆
Licorice-glycoside C2						
Naringenin	7.99	271.06120	271.06140	0.75	10.5	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Licorice glycoside A	8.13	725.20871	725.20825	-0.63	18.5	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆
Echinatin	8.39	269.08193	269.08215	0.82	10.5	C ₁₆ H ₁₄ O ₄
Licorice saponin G2	8.84	837.39142	837.39099	-0.52	12.5	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇
Liquiritigenin	9.14	255.06628	255.06654	1.03	10.5	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
Formononetin	9.36	267.06628	267.06650	0.81	11.5	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
Glycyrrhizic acid	9.72	821.39651	821.39612	-0.48	12.5	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
Glycybridin J	9.91	369.13436	369.13446	0.27	11.5	C ₂₁ H ₂₂ O ₆
Licorice saponin B2	10.10	807.41724	807.41748	0.29	11.5	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅
Licorice saponin K2/H2	10.13	821.39541	821.39636	1.16	12.5	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
Licoflavone C	10.44	337.10815	337.10831	0.47	12.5	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
Erybacin B	11.23	325.10815	325.10834	0.59	11.5	C ₁₉ H ₁₈ O ₅
Glabrone	11.37	335.09250	335.09259	0.28	13.5	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
Kanzonol A	11.56	339.12380	339.12375	-0.14	11.5	C ₂₀ H ₂₀ O ₅
Kanzonol W	11.72	335.09250	335.09262	0.37	13.5	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
Glabridin	11.82	323.12888	323.12906	0.55	11.5	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
Glabrene	11.97	321.11323	321.11337	0.44	12.5	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
Kanzonol Y	12.40	409.20205	409.20209	0.10	11.5	C ₂₅ H ₃₀ O ₅
Glycybridin C	12.82	409.20205	409.20227	0.55	11.5	C ₂₅ H ₃₀ O ₅
Phaseollin	13.67	643.23374	643.23376	0.04	23.5	C ₄₀ H ₃₆ O ₈
3-Hydroxyglabrol	14.13	407.18640	407.18671	0.76	12.5	C ₂₅ H ₂₈ O ₅
Glabrol	14.58	391.19148	391.19153	0.12	12.5	C ₂₅ H ₂₈ O ₄

Πίνακας 2. Χρωματογραφικά και φασματομετρικά χαρακτηριστικά ενώσεων ταυτοποιημένα στο εκχύλισμα μεθανόλης του *G. glabra* χρησιμοποιώντας UPLC-ESI (-) – HRMS.



Εικόνα 21 Χρωματογράφημα πλήρους σάρωσης UPLC-ESI (-) - HRMS του μεθανολικού εκχυλίσματος του *G. glabra*. Οι αντίστοιχες ενώσεις παρατίθενται στον Πίνακα 2. RT = Χρόνος συγκρατήσεως.

2.4.2. Υπολογισμός και χορήγηση

Οι ξηρές ρίζες της *Glycyrrhiza glabra* εκχυλίστηκαν με μεθανόλη (MeOH) χρησιμοποιώντας μέθοδο εκχύλισης με υποβοηθούμενη υπερήχους και το ξηρό εκχύλισμα διαλύθηκε σε πόσιμο νερό. Η συγκέντρωση αυτού του νερού ήταν 2 mg/ml.

Το διάλυμα της *Glycyrrhiza glabra* δόθηκε προς κατανάλωση στην ομάδα ONX+G στο πόσιμο νερό τους μία ημέρα μετά την ωθηκεκτομή. Ο όγκος του εκχυλίσματος που επρόκειτο να καταναλωθεί επανυπολογιζόταν εκ νέου κάθε τρεις ημέρες σύμφωνα με την παρακολούθηση της κατανάλωσης υγρών ανά κλωβό και προσαρμογή ανά αρουραίο. Η κατά προσέγγιση επιθυμητή συγκέντρωση προς κατανάλωση ανά αρουραίο υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη την ελάχιστη και μέγιστη προτεινόμενη κατανάλωση θρυμματισμένης φυτικής ουσίας ενός μέσου

ανθρώπου ημερησίως, χρησιμοποιώντας τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων, η οποία ορίζεται σε 3000-8000 mg ημερησίως για τον άνθρωπο που περιέχεται σε 500-1000 ml ημερησίως⁹⁹. Επιπλέον, με τη μεγαλύτερη εστίαση στη γλυκυρριζίνη, τη βασική δραστική ουσία της *G. glabra*, η μέγιστη ημερήσια δόση χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες βασισμένη σε παλαιότερη μελέτη με γυναίκες εθελοντές περιγράφηκε ως η δόση 2 mg/kg/ημέρα⁷¹, η οποία χρησιμοποιείται ακόμη ως αναφορά στις πρόσφατες δημοσιεύσεις. Η δοσολογία στη μελέτη μας επανυπολογιζόταν συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης με βάση τις αλλαγές σωματικού βάρους των επίμυων, χρησιμοποιώντας έναν δημοσιευμένο αλγόριθμο για τη μετατροπή της δοσολογίας του ανθρώπου στη δοσολογία των ζώων¹⁰⁰, η οποία στην περίπτωσή μας μετατράπηκε σε επιθυμητό ανώτερο όριο 12,4 mg/kg γλυκυρριζίνης ανά επίμου ανά ημέρα.

Στόχος μας ήταν να παραμείνουμε κάτω από τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια κατανάλωσης γλυκυρριζίνης σύμφωνα με τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων. Η γλυκυρριζίνη παρουσιάζει πτωχή βιοδιαθεσιμότητα μετά την από του στόματος λήψη⁷¹ και ανευρίσκεται σε ποσοστά 10-20% στα υγρά εκχυλίσματα γλυκύριζας⁷¹. Με βάση τα παραπάνω και επαναπροσδιορίζοντας τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος κάθε τρεις ημέρες, η κατανάλωση των επίμυων στη μελέτη μας δεν υπερέβη τα ανώτατα όρια της κατανάλωσης γλυκύριζας. Επιπλέον, δεν παρατηρήσαμε καμία κλινική δυσμενή επίδραση στους επίμυες που λάμβαναν το εκχύλισμα της γλυκύριζας κατά τη διάρκεια της μελέτης.

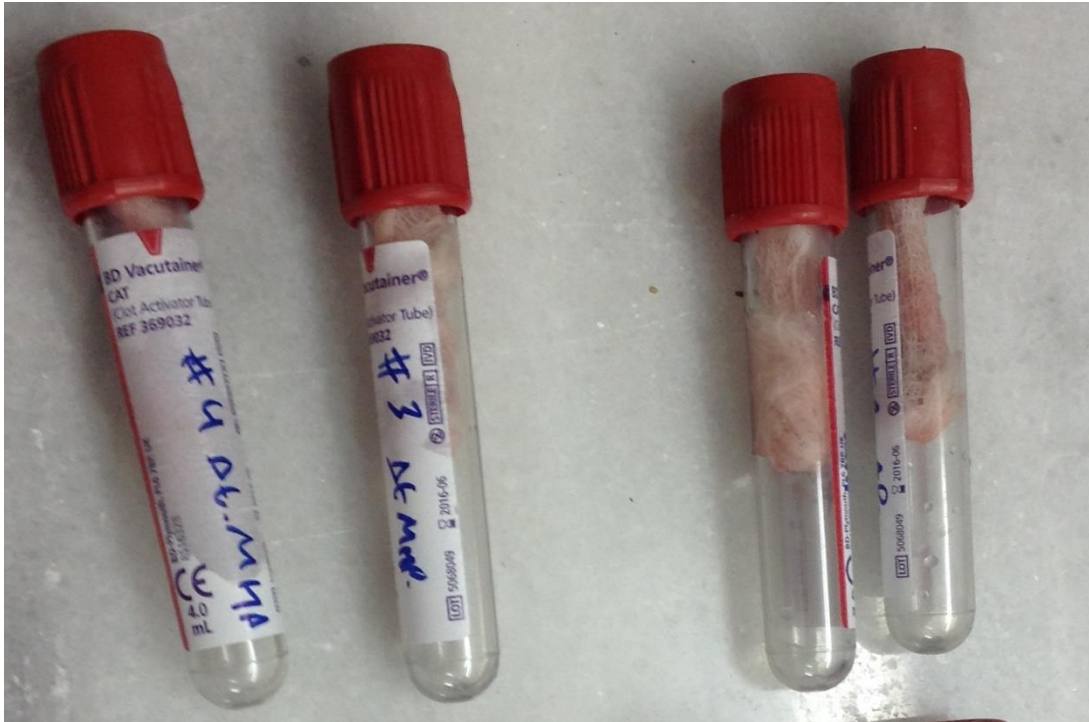
2.5. Σχετικά με τη συλλογή των ιστών

Η ευθανασία πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση υπερδοσολογημένης αναισθησίας με ακόλουθη αφαιμάξη από την κοιλιακή αορτή. Όλα τα ζώα υπεβλήθησαν σε νεκροψία με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχημένης ωθηκεκτομής, αλλά και τον έλεγχο των ιστών για πιθανώς παθολογικά ευρήματα όπως κακοήθειες, υπερτροφίες κ.ά. Ως κριτήρια επαλήθευσης επιτυχούς ωθηκεκτομής χρησιμοποιήθηκαν η ανεύρεση ατροφίας των κεράτων της μήτρας και η απουσία ορατών ιχνών ωθηκικών υπολειμμάτων. Κατά τη νεκροψία, οι

μήτρες καθαρίστηκαν από πέριξ ιστούς και αφαιρέθηκαν προς ζύγιση και κατοπινή ιστολογική εξέταση. Αφαιρέθηκαν επίσης αμφότερα τα μηριαία οστά από κάθε ζώο με σκοπό να υποβληθούν σε έλεγχο μηχανικής αντοχής. Επίσης, για λόγους μελλοντικών μελετών, καθαρίστηκαν και συλλέχθηκαν οι ιστοί επιπλέον οργάνων, όπως η καρδιά, ο αριστερός νεφρός, λίπος, γαστροκνήμιοι μύες, εγκέφαλος, ήπαρ και τμήμα δέρματος από την αυχενική περιοχή. Στα όργανα και τους ιστούς που συλλέχθηκαν δεν εντοπίστηκαν μακροσκοπικά οποιεσδήποτε αλλοιώσεις/παραμορφώσεις/παθολογίες.

2.6. Σχετικά με τον μηχανικό έλεγχο των οστών

Ο έλεγχος της μηχανικής αντοχής των οστών πραγματοποιήθηκε *ex vivo* μετά την ευθανασία με χρήση της δοκιμασίας κάμψης τριών σημείων (three-point-bending, 3PB), όπως αναλύθηκε στο Γενικό Μέρος. Μετά την αφαίρεση των μηριαίων οστών, αυτά περιτυλίχθηκαν με γάζες εμποτισμένες σε φυσιολογικό ορό και διατηρήθηκαν στους -20°C , μέχρι την ημέρα των μηχανικών δοκιμασιών επτά μέρες αργότερα (Εικόνα 22,23). Αυτός θεωρείται ο ενδεδειγμένος τρόπος μακρόχρονης διατήρησης των οστών πριν τον μηχανικό έλεγχο³⁰. Οι δοκιμές έγιναν στις εγκαταστάσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ) και χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα MTS 858 Mini Bionix frame, στο οποίο γινόταν αρχικοποίηση και βαθμονόμηση (calibration) πριν από κάθε έναρξη των ημερήσιων δοκιμών.



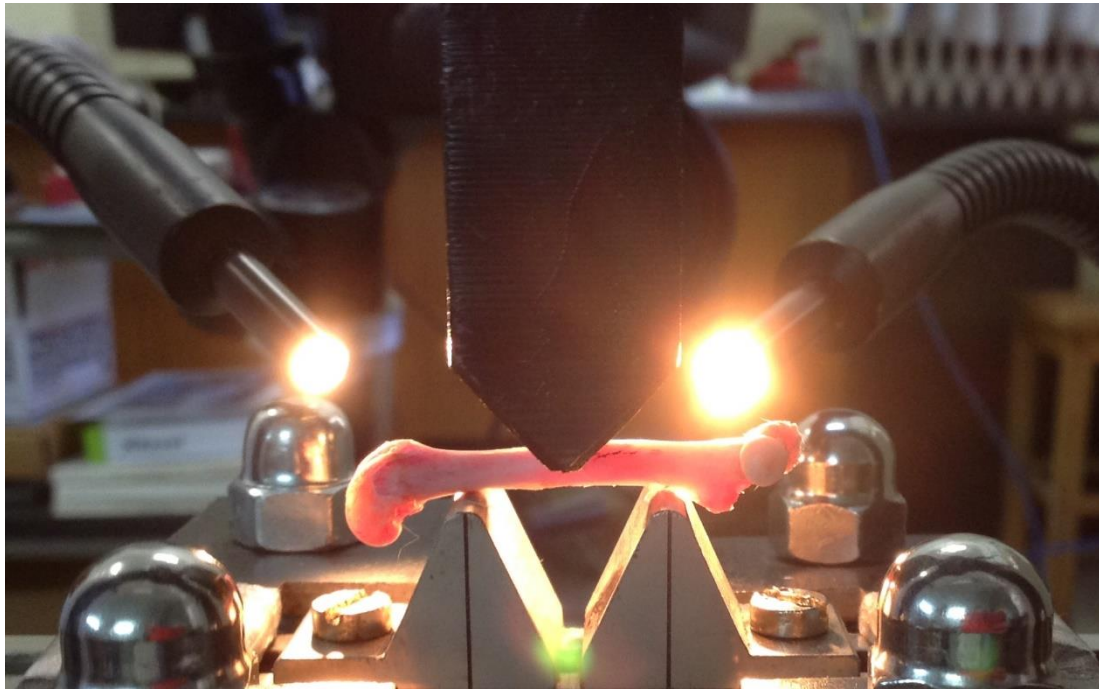
Εικόνα 22 Διατηρημένα μηριαία περιτυλιγμένα σε γάζα εμποτισμένη σε φυσιολογικό ορό. Στην εικόνα έχουν μόλις βγει απ' την κατάψυξη.



Εικόνα 23 Τα μηριαία απελευθερώνονται από τις συνθήκες διατήρησής τους και επανέρχονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη δοκιμασία μηχανικής αντοχής.

Οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν τυφλά από ουδέτερο χειριστή και οι τιμές που εξήχθησαν καταγράφηκαν απευθείας στον υπολογιστή για την περαιτέρω ανάλυση. Κάθε μηριαίου τοποθετείτο σε δύο στρογγυλεμένες άκρες με απόσταση

22 mm. Η τοποθέτηση γινόταν πάντοτε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, ώστε τα μηριαία να ακουμπάνε με ίδιο προσανατολισμό και στροφική σταθερότητα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα λάθους διαφυγής ενέργειας λόγω εσφαλμένης θέσης αλλά και η πιθανότητα κακοποίησης των δειγμάτων και αλλοίωση ή ακύρωση του αποτελέσματος (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Το μηριαίο οστό δεν εκτελεί καμία περιστροφή πλέον κατά την πίεση που δέχεται από το έμβολο, επιβεβαιώνοντας την ορθή τοποθέτηση και καθιστώντας το δείγμα και τη μέτρηση αποδεκτά.

Σε περίπτωση μη ορθής τοποθέτησης εξαιτίας ανατομικών παραλλαγών, μπορούσε να παρατηρηθεί στροφή των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της φόρτισης, με αποτέλεσμα αυτά να αποκλείονται από τη στατιστική ανάλυση. Αρχικά τοποθετείτο το έμβολο σε απόσταση από το δείγμα και τότε ξεκινούσε η διαδικασία καθόδου προς τη μεσότητα του οστού, στο οποίο το έμβολο προσέκρουε κάθετα με ταχύτητα 1 mm/min (Εικόνα 25). Ενόσω το έμβολο προχωρούσε, το οστό υφίστατο παραμόρφωση, μέχρι ενός ορίου δύναμης στο οποίο το οστό έσπαγε, οπότε και τελείωνε η διαδικασία. Ο υπολογιστής κατέγραφε τις δυνάμεις σε συνάρτηση με το χρόνο και έτσι προέκυπτε για κάθε οστό ένα γράφημα, το οποίο τελείωνε στη μέγιστη δύναμη υπό την οποία έσπασε το οστό (Εικόνα 26).



Εικόνα 25 Το έμβολο ξεκινά σε απόσταση απ' το οστό με ρυθμό 1mm/min, μέχρι να το ακουμπήσει και να αρχίσει το γράφημα να διαμορφώνεται από τις πληροφορίες εφαρμοζόμενης δύναμης και χρόνου.

2.7. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση \pm τυπική απόκλιση (SD). Η δοκιμή Shapiro-Wilks χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση κανονικότητας των παραμέτρων.

Η σύγκριση των παραμέτρων BMD σε κάθε χρονικό σημείο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο ANOVA μονής κατεύθυνσης. Το Bonferroni test χρησιμοποιήθηκε για τις πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη.

Ένα μοντέλο επαναληπτικών μετρήσεων ενός παράγοντα ANOVA χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των διαφορετικών χρονικών μετρήσεων των

παραμέτρων BMD για κάθε ομάδα. Το Bonferroni test χρησιμοποιήθηκε για τις πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη.

Για να επισημανθεί η τάση σε 6 μήνες παρατήρησης/θεραπείας, υπολογίστηκαν οι μέσες μεταβολές επί τοις εκατό από την αρχική τιμή στους 3 και 6 μήνες αντίστοιχα. Η σύγκριση της ποσοστιαίας μεταβολής των παραμέτρων της BMD από την βασική μέτρηση BMD και κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης μεταξύ των ομάδων αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο ANOVA μονής κατεύθυνσης. Το Bonferroni test χρησιμοποιήθηκε για τις πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη. Σε περιπτώσεις παραβίασης της κανονικότητας χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές Kruskal Wallis και Mann-Whitney.

Για την ανάλυση της μεταβλητής μέγιστης εφαρμοζόμενης δύναμης χρησιμοποιήθηκε το αμφίδρομο μοντέλο Ανάλυσης Διακύμανσης θέτοντας ως παράγοντες την «ομάδα θεραπείας/treatment group)» (Control - OVX - OVX + G) και το "μηριαίο/leg)" (δεξιά - αριστερά). Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως μέσο \pm τυπικό σφάλμα (SE).

Όλες οι δοκιμές είναι διπλής όψης. Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίστηκε σε $P < 0.05$. Για όλες τις αναλύσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοσης 17.00 (Στατιστικό πακέτο για τις κοινωνικές επιστήμες, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

2.8. Αποτελέσματα

2.8.1. Απόλυτες τιμές BMD.

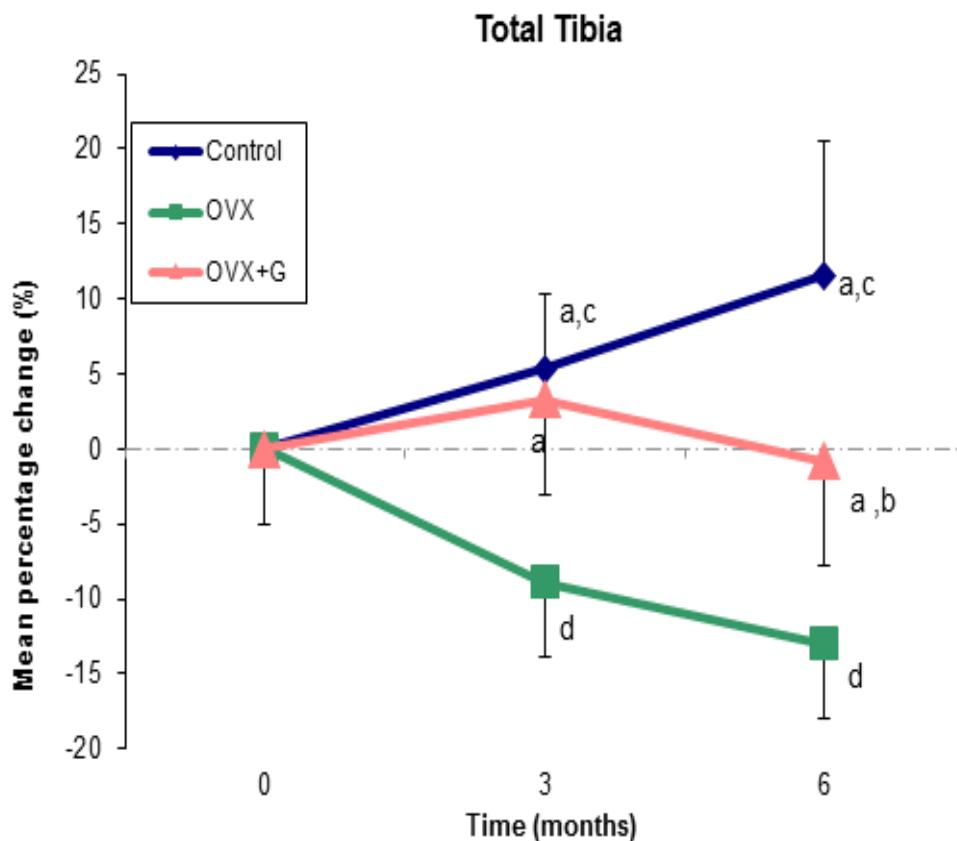
2.8.1.α. Ολική κνήμη

Οι μετρήσεις BMD της ολικής κνήμης, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν προ της ωοθηκεκτομής, τρεις και έξι μήνες μετά την ωοθηκεκτομή με DEXA (αλλιώς DXA) για τις τρεις ομάδες, παρουσιάζονται στον πίνακα 3 και στο Σχήμα 1. Στους 3 μήνες η ομάδα OVX παρουσιάζει σημαντική μείωση της BMD. Αντίθετα, η ομάδα OVX + G έχει παρόμοιες τιμές με την ομάδα ελέγχου, διατηρώντας την BMD της ολικής κνήμης. Στους 6 μήνες η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει μια περαιτέρω αύξηση της

BMD και η ομάδα OVX μια περαιτέρω μείωση του BMD, και οι δύο σημαντικά διαφορετικές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες βασικές τιμές τους. Στην ομάδα OVX + G επίσης μειώνεται η BMD, αλλά λιγότερο από τα ζώα OVX, γεγονός που δείχνει προστατευτική επίδραση από το φυτικό εκχύλισμα.

Total tibial BMD								
Group	Baseline, mean ± SD	3 months, mean ± SD	6 months, mean ± SD	P value within group	% change baseline-3 months, mean ± SD	P value between groups 3 months	% change baseline-6 months, mean ± SD	P value between groups 6 months
Control	0.214 ± 0.032	0.215 ± 0.010	0.228 ± 0.015	0.224	5.31 ± 4.75	= 0.003	11.59 ± 9.12	< 0.001
OVX	0.225 ± 0.015	0.204 ± 0.007	0.195 ± 0.009	0.040	-8.87 ± 3.80		-13.03 ± 5.11	
OVX + G	0.209 ± 0.013	0.215 ± 0.016	0.206 ± 0.017	<0.0005	3.30 ± 6.31		-0.84 ± 7.63	

Πίνακας 3 Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm²) και μέσωσων ποσοστιαίων μεταβολών από τη βασική μέτρηση BMD (baseline) ολικής κνήμης ανάμεσα στις τρεις ομάδες, που μετρήθηκαν κατά την έναρξη (πριν από την ωθηκεκτομή), τρεις και έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή. BMD: οστική πυκνότητα, OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*, SD: Τυπική απόκλιση.



Σχήμα 1 Γραφική παρουσίαση των μέσων ποσοστιαίων BMD ολικής κνήμης από τη βασική μέτρηση (baseline) μέχρι τους 3 και 6 μήνες, και στις τρεις ομάδες. a: $P < 0.005$ vs. OVX, b: $P = 0.005$ vs. Control, c: $P < 0.05$ vs. baseline, d: $P < 0.001$ vs. baseline. Control $n = 10$, OVX $n = 8$, OVX+G $n = 8$. OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*.

2.8.1.β. Εγγύς κνήμη

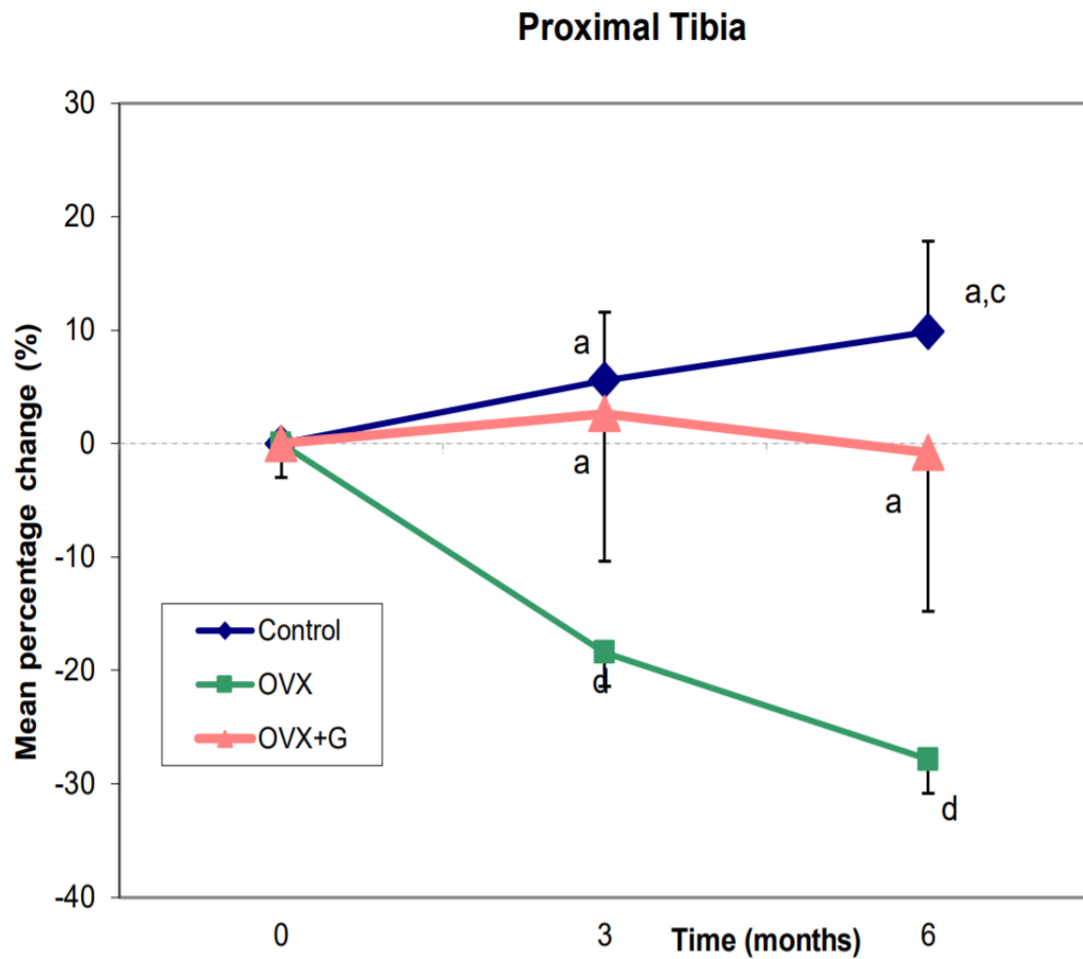
Οι μετρήσεις της BMD της εγγύς κνήμης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 και στο Σχήμα 2. Η οστεοπροστατευτική επίδραση της *Glycyrrhiza glabra* παρατηρείται επίσης σε αυτή τη θέση του οστού, δεδομένου ότι η BMD της ομάδας OVX+G παραμένει παρόμοια με εκείνη της ομάδας ελέγχου στους 3 μήνες και κοντά στην αρχική μέτρηση (baseline) στους 6 μήνες (0.427 ± 0.025 έναντι 0.390 ± 0.082 και 0.410 ± 0.019 έναντι 0.406 ± 0.073 αντιστοίχως, $P =$ μη σημαντική), ενώ η BMD της ομάδας OVX μειώνεται σημαντικά (0.332 ± 0.019 στους 3 μήνες και 0.293 ± 0.011 στους 6 μήνες, $P < 0.001$ μεταξύ της baseline, των τριών και των έξι μηνών).

Proximal tibial BMD								
Group	Baseline, mean ± SD	3 months, mean ± SD	6 months, mean ± SD	P value within group	% change baseline- 3 months, mean ± SD	P value between groups 3 months	% change baseline- 6 months, mean ± SD	P value between groups 6 months
Control	0.390 ± 0.025	0.410 ± 0.019	0.427 ± 0.025	0.002	5.58 ± 6.92	< 0.001	9.84 ± 8.63	< 0.001
OVX	0.407 ± 0.020	0.332 ± 0.019	0.293 ± 0.011	<0.001	-18.42 ± 3.05		-27.86 ± 3.69	
OVX + G	0.394 ± 0.035	0.406 ± 0.073	0.390 ± 0.082	<0.663	2.61 ± 13.62		-0.81 ± 14.85	

Πίνακας 4 Σύγκριση των τιμών απόλυτων τιμών (g/cm²) και των μέσων ποσοστιαίων μεταβολών από την αρχική τιμή της BMD της εγγύς κνήμης ανάμεσα στις τρεις ομάδες, που μετρήθηκαν κατά την έναρξη (πριν από την ωθηκεκτομή), τρεις και έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή. BMD: οστική πυκνότητα, OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*. SD: Τυπική απόκλιση.

2.8.2. Ποσοστιαίες μεταβολές BMD

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία μεταβολή BMD της ολικής κνήμης από την baseline στους 3 μήνες μεταξύ των ομάδων Control και OVX+G (+5.31%±4.75 και +3.30%±6.31 αντίστοιχα, P=μη σημαντικό) και της εγγύς κνήμης (+5.58%±6.92 και +2.61%±13.62, P=μη σημαντικό), γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει προστατευτικό αποτέλεσμα επί του οστού (σχήμα 1 και σχήμα 2 αντίστοιχως). Υπήρξε αξιοσημείωτη διαφορά στις ποσοστιαίες μεταβολές της BMD μεταξύ των ομάδων OVX και OVX + G της ολικής κνήμης, από την baseline έως τους 6 μήνες (-13.03%±5.11 και -0.84%±7.63 αντίστοιχα, P<0.005) και της εγγύς κνήμης (-27.86%±3.69 και -0.81%±14.85 αντίστοιχα, P<0.001) (Σχήμα 2), γεγονός που δείχνει την προστατευτική επίδραση του εκχυλίσματος *Glycyrrhiza glabra* στη διατήρηση της BMD της ομάδας OVX+G.

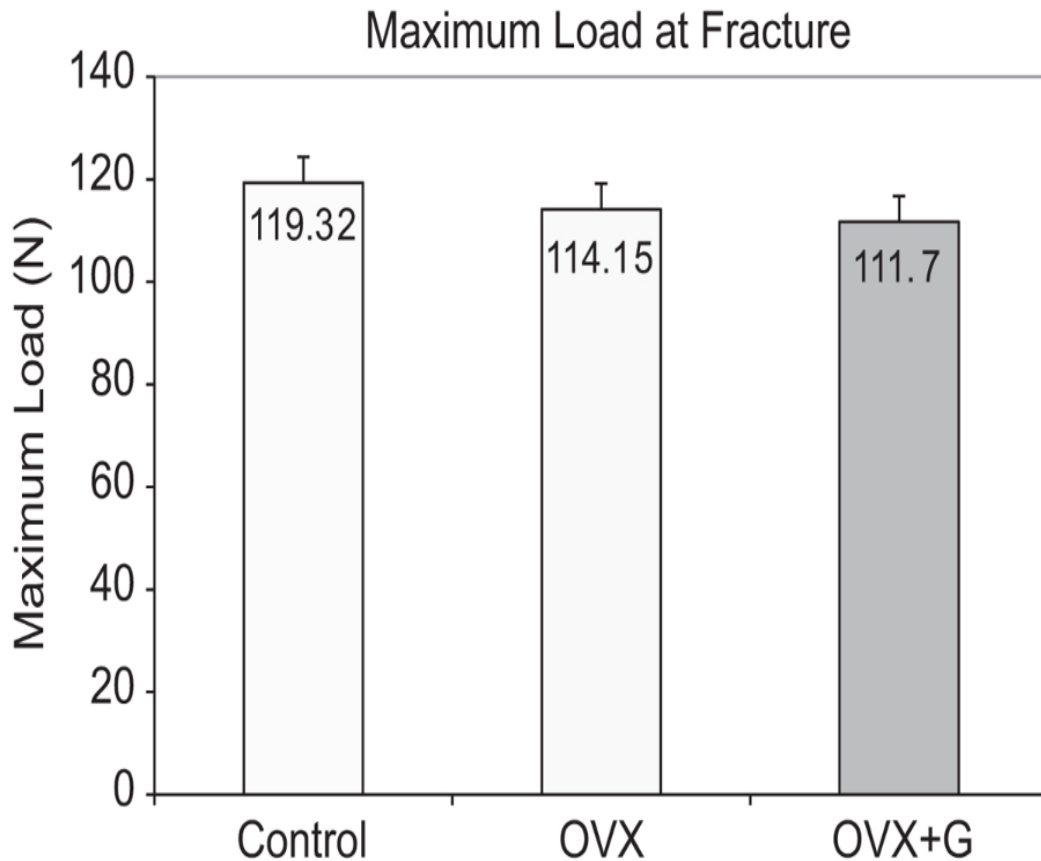


Σχήμα 2 Γραφική παρουσίαση των μέσων ποσοστιαίων BMD εγγύς κνήμης από τη βασική μέτρηση (baseline) μέχρι τους 3 και 6 μήνες, και στις τρεις ομάδες. a: $P < 0.001$ vs. OVX, c: $P = 0.05$ vs. baseline, d: $P < 0.001$ vs. baseline. Control $n = 10$, OVX $n = 8$, OVX+G $n = 8$. OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*.

2.8.3. Έλεγχος μηχανικής αντοχής

Τα αποτελέσματα σχετικά με τη μέγιστη δύναμη στην οποία έσπασαν τα οστά, για όλες τις ομάδες, φαίνονται στο σχήμα 3. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στους παράγοντες «ομάδα/group» και «μηριαίο/right or left femur» ($P = 0.489$).

Η μηχανική αντοχή με τη μέθοδο της κάμψης τριών σημείων (3PB) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ($P = 0.569$).



Σχήμα 3 Μέσες τιμές μέγιστης δύναμης κατά τη θραύση (δύναμη που μετρήθηκε σε Newton) των μηριαίων οστών στις τρεις ομάδες στο τέλος της μελέτης *ex vivo*. Αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (SE): Control=5.13 , OVX=4.83 , OVX+G=5.13 , OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*.

2.8.4 Σωματικά βάρη

Η ανάλυση των σωματικών βαρών και ο έλεγχος της διαχρονικής μεταβολής τους παρουσιάζεται στους παρακάτω Πίνακες 5 και 6.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στην θεραπεία και τον χρόνο σε σχέση με την μεταβολή του βάρους ($p=0.45$), όπερ σημαίνει ότι η διαχρονική μεταβολή του βάρους είναι ίδια ανάμεσα σε όλες τις ομάδες.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των σωματικών βαρών διαχρονικά και γίνεται σύγκριση αυτού ανάμεσα στις ομάδες. Όπως φαίνεται προκύπτει ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις ομάδες σε σχέση με το βάρος, ανεξάρτητα του χρόνου ($P=0.107$).

Συνοπτικά, και οι τρεις ομάδες ζώων αύξησαν το σωματικό βάρος τους παράλληλα κατά τη διάρκεια της μελέτης με μικρές διακυμάνσεις βάρους. Κατά την έναρξη της μελέτης, τα ζώα είχαν παρόμοιο σωματικό βάρος και κατά την ολοκλήρωση της μελέτης οι τιμές σωματικού τους βάρους σε τάξη μεγέθους ήταν $OVX > OVX+G > Control$, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Δύο ζώα από την ομάδα ελέγχου και δύο από την ομάδα $OVX+G$ δεν ανένηψαν από την αναισθησία κατά τη διάρκεια της μέτρησης της BMD στις χρονικές στιγμές μηδέν (πρώτη αναισθησία) και τρεις μήνες αντίστοιχα.

Descriptive Statistics						
	Group					
	Control		OVX		Γλυκύριζα	
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation
tim0	304.38	17.41	317.90	34.53	309.22	30.76
time15	302.25	25.98	322.20	40.91	331.00	24.42
time30	296.38	26.22	302.40	19.75	322.56	27.49
time45	318.38	30.89	342.80	50.68	351.00	29.73
time60	299.50	26.48	321.90	30.18	344.89	30.32
time75	326.63	38.85	356.50	53.16	344.89	30.32
time90	329.75	43.45	358.70	54.15	361.44	27.04
time105	332.00	46.73	367.90	55.23	349.11	31.21
time120	337.50	37.46	382.80	55.96	356.89	28.99
time135	341.00	44.61	377.60	56.85	363.00	26.87
time150	335.75	37.67	383.40	62.21	372.44	26.64

Tests of Within-Subjects Effects		
Source		Sig.
weight	Sphericity Assumed	.000
weight * Group	Sphericity Assumed	0.450
Error(weight)	Sphericity Assumed	

Πίνακας 5 Διαχρονικές τιμές μέσου όρου σωματικών βαρών από την αρχή (tim0) μέχρι το τέλος του πειράματος (time150) και σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων.

Estimates

Group	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Control	320.318	9.774	300.145	340.491
OVX	348.555	8.742	330.511	366.598
Γλυκίριζα	346.040	9.215	327.021	365.060

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	33710683.553	1	33710683.553	4009.768	.000
Group	45625.480	2	22812.740	2.713	0.107
Error	201771.375	24	8407.141		

Πίνακας 6 Μέσος όρος σωματικού βάρους διαχρονικά, δηλαδή από την αρχή μέχρι το τέλος του πειράματος, και σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων.

2.8.5. Βάρη μήτρας

Τα μέσα βάρη των μητρών των τριών ομάδων φαίνονται στον πίνακα 7.

<u>Uterine weight, grams</u>				
<u>Group</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>SD</u>	<u>P value between groups</u>
<u>Control</u>	8	0.628	0.118	= 0.015
OVX	10	0.350 *	0.218	
OVX+G	8	0.526	0.205	

Πίνακας 7 Βάρη μήτρας (σε γραμμάρια, grams) των τριών ομάδων. OVX: ομάδα ωθηκεκτομής, G: ομάδα *Glycyrrhiza glabra*. *P=0.015 vs Control. SD: τυπική απόκλιση

Ο μέσος όρος βαρών μήτρας της ομάδας ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικώς υψηλότερος από αυτόν της ομάδας ωθηκεκτομής OVX ($P=0.015$). Ο μέσος όρος βαρών μήτρας της ομάδας OVX+G βρισκόταν μεταξύ των άλλων δύο ομάδων χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά, ούτε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου Control ($P=0.878$), ούτε σε σχέση με την ομάδα ωθηκεκτομής OVX ($P=0.184$).

2.8.6 Ιστολογική εξέταση μήτρας

Τα δείγματα της μήτρας διατηρήθηκαν σε φορμαλίνη και επεξεργάστηκαν με ενσωμάτωση παραφίνης. Τα δείγματα κόπηκαν σε πάχος 7 μm εγκάρσια και/ή οριζόντια και επιμήκως. Όλα τα διαφορετικά αναμενόμενα στρώματα ιστών υπήρχαν στις εγκάρσιες τομές. Στις οριζόντιες τομές, και σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν περιλαμβάνονταν όλα τα στρώματα. Η χρώση H & E εφαρμόστηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Τα τρία κύρια τμήματα αναγνωρίστηκαν (ενδομήτριο, μυομήτριο και περιμήτριο) και αξιολογήθηκαν. Ελέγχθηκε η ανατομία του αυλού της μήτρας και το αντίστοιχο επιθήλιο. Ελέγχθηκε το αδενικό επιθήλιο και αναζητήθηκε ο αριθμός των αδένων. Ελέγχθηκε η παρουσία μιτωτικών κυττάρων, αλλά και κυττάρων φλεγμονής. Ελέγχθηκε το στρώμα της μήτρας για οίδημα και αξιολογήθηκε η αγγείωσή του.

Αν και η ιστολογία μεταξύ των τριών ομάδων παρουσίαζε αλληλεπικάλυψη, υπήρχε μια τάση στις μήτρες της ομάδας OVX+G το ενδομήτριο να είναι λεπτό με απλό κυβοειδές επιθήλιο και ο υποεπιθηλιακός ιστός πυκνός με μέτρια ανάπτυξη απλού κυβοειδούς επιθηλίου. Τα υπόλοιπα στρώματα ήταν διακριτά και με πλούσια αγγείωση. Η συνολική σύγκριση μεταξύ όλων των ομάδων έδειξε ότι οι αδένες ήταν πολυάριθμοι στις μήτρες των ζώων της ομάδας Control, διακριτοί στην ομάδα OVX και περιορισμένοι στην ομάδα OVX+G. Επιπρόσθετα, οι μήτρες της ομάδας OVX είχαν αδένες μεγαλύτερης διαμέτρου, που δεν ήταν εμφανείς στα ζώα ελέγχου και πολύ λιγότερο στην ομάδα OVX+G. Η περαιτέρω αξιολόγηση της μήτρας και των τριών ομάδων δεν έδειξε κανένα προφανές σημάδι υπερτροφίας, φλεγμονής ή

κυτταρικής αλλοιώσεως, υποδεικνύοντας έτσι την απουσία επιδράσεων στην μήτρα από το εκχύλισμα *G. glabra*.

2.9. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την επίδραση της χορήγησης *G. glabra* σε ωθηκεκτομημένους επίμυες. Όπως ήταν αναμενόμενο η ομάδα OVX παρουσίασε σημαντική μείωση της τιμής BMD στους πρώτους 3 μήνες, η οποία συνεχίστηκε μέχρι τους 6 μήνες. Αντιθέτως, η ομάδα OVX+G είχε παρόμοιες τιμές BMD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μετά τους 3 μήνες, γεγονός που έδειξε αύξηση της BMD σε ολική και εγγύς κνήμη με τη χορήγηση της *G. glabra*. Περαιτέρω είναι σημαντικό ότι ενώ από τους 3 μέχρι τους 6 μήνες η BMD της ομάδας OVX+G παρουσίασε μικρή πτώση, αυτή ήταν τόση ώστε η BMD να φτάσει περίπου στα επίπεδα της αρχικής μέτρησης σε αντίθεση με την ομάδα OVX, όπου η BMD είχε δραματική μείωση στους 6 μήνες. Αυτή η τάση στην ομάδα OVX+G να διατηρεί τα επίπεδα BMD αποτελεί ισχυρή ένδειξη της οστεοπροστατευτικής επίδρασης του εκχυλίσματος της *G. glabra*.

Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί αρκετές παρόμοιες μελέτες, οι οποίες παρουσιάζουν μοντέλα οστεοπόρωσης με ωθηκεκτομημένους επίμυες, στους οποίους δείχθηκε η οστεοπροστατευτική επίδραση από τη χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων. Η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος *Onobrychis ebnoides* έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της BMD σε επίμυες που το λάμβαναν σε σύγκριση με την ομάδα OVX (-12.75% vs. -27.65% αντίστοιχα)¹⁰¹. Παρομοίως η χορήγηση για 12 εβδομάδες υψηλής δόσης εκχυλίσματος *Drynariae rhizoma* αύξησε σημαντικά την BMD σε σχέση με την ομάδα OVX¹⁰². Επιπλέον, μετά από τρεις μήνες κατανάλωσης του φλαβονοειδούς εσπεριδοειδών Rutin, οι επίμυες που υποβλήθηκαν σε αγωγή έδειξαν σημαντική αύξηση της BMD τους σε σύγκριση με την ομάδα OVX¹⁰³. Το φυτικό εκχύλισμα από τον *Sideritis euboica* διατήρησε σημαντικά την BMD της εγγύς κνήμης στους επίμυες που χορηγήθηκε σε σύγκριση με την ομάδα OVX, τόσο από την έναρξη έως τους τρεις και έξι μήνες¹⁰⁴. Επιπλέον υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία απώλεια της BMD από την αρχική τιμή στους τρεις μήνες και στους έξι μήνες μεταξύ της ομάδας OVX και της ομάδας που υποβλήθηκε σε

θεραπεία με εκχύλισμα *Sideritis euboica* (-26.47% έναντι -15.57% και -31.22% έναντι -16.57% αντίστοιχα)¹⁰⁴.

Η δοκιμή κάμψης τριών σημείων της μελέτης μας δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+G, γεγονός ίσως μη αναμενόμενο διότι θα περίμενε κανείς η αυξημένη BMD να συνοδεύεται από ανθεκτικότερα οστά. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως να οφείλεται στη διεξαγωγή της δοκιμής της μηχανικής αντοχής στον μηριαίο άξονα, στον οποίο κυριαρχεί το φλοιώδες οστό και έτσι ενδεχομένως επιβραδύνεται η εμφάνιση της θεραπευτικής επίδρασης. Η μέση δύναμη που εφαρμόστηκε μέχρι τη θραύση ήταν ελαφρώς χαμηλότερη στην ομάδα OVX+G από την ομάδα OVX, γεγονός που θεωρήθηκε απροσδόκητο. Η μηριαία διάφυση αποτελείται κυρίως από φλοιώδες οστό και στο ζωικό μας πρότυπο η απώλεια δοκιδωτού οστού είναι αυτή που εμφανίζεται νωρίς^{105,106}, αφήνοντας έτσι την αντοχή του οστού της μηριαίας διάφυσης ανεπηρέαστη¹⁰⁵.

Εντούτοις, μια μελέτη 13 εβδομάδων χορήγησης πολυσακχαρίτη τσαγιού σε ωθηκεκτομημένους επίμυες έδειξε μια ορισμένη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων των μηριαίων¹⁰⁷. Παρομοίως, η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος *Sideritis euboica* σε μια 6μηνη μελέτη παρόμοια με την δική μας έδειξε ότι η μέγιστη δύναμη πριν από το κάταγμα ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία σε σύγκριση με την ομάδα OVX¹⁰⁴. Παρομοίως, η χορήγηση εκχυλίσματος ορχιδέας *Dendrobium officinale* σε επίμυες για 13 εβδομάδες έδειξε ότι η μέγιστη δύναμη του μηριαίου αυξήθηκε στην ομάδα θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα OVX, αν και όχι σημαντικά¹⁰⁷. Αντίθετα, μια μελέτη σχετικά με το φυτοοιστρογόνο Διαρυλεπτανοειδές σε ωθηκεκτομημένους επίμυες με κατέληξε στο συμπέρασμα ότι αυτή η δραστική ουσία προστατεύει την απώλεια μόνο του δοκιδωτού οστού και όχι του φλοιώδους¹⁰⁶, πράγμα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των δοκιμών μας όσον αφορά τη μηχανική αντοχή των οστών στη διάφυση χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα *G. glabra*. Σε μια άλλη μελέτη διάρκειας 5 μηνών σε μοντέλο OVX με 17α-αιθινυλοιστραδιόλη, οι συγγραφείς εξέτασαν την εμβιομηχανική ποιότητα του μηριαίου οστού και διαπίστωσαν ότι η χορήγηση 17α-αιθινυλοιστραδιόλης δεν είχε σημαντική

επίδραση στις μετρήσεις ενέργειας και μέγιστης δύναμης σε σύγκριση με την ομάδα OVX¹⁰⁸. Επιπλέον, μια ερευνητική μελέτη που εξέτασε την επίδραση της χορήγησης φλαβονοειδών από *Drynariae rhizoma* σε ωθηκεκτομημένους επίμυες επί 12 εβδομάδες, έδειξε ότι αν και η μέγιστη δύναμη ήταν υψηλότερη στην εικονική ομάδα (Sham), δεν υπήρξε σημαντική επίδραση στη μέγιστη δύναμη μεταξύ της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή και της ομάδας OVX¹⁰². Έχει επίσης αναφερθεί ότι η μείωση της οστικής μηχανικής αντοχής της μεσότητας της διάφυσης των μηριαίων μπορεί να παρατηρηθεί το νωρίτερο στους 9 μήνες μετά τον OVX¹⁰, χρονικό διάστημα το οποίο είναι μεγαλύτερο από το χρονικό διάστημα των δικών μας δοκιμών.

Στη μελέτη μας, τα βάρη της μήτρας OVX ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η ομάδα OVX+G έδειξε αύξηση των βαρών της μήτρας σε σύγκριση με την ομάδα OVX. Ωστόσο, τα βάρη της μήτρας ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα βάρη της μήτρας στην ομάδα ελέγχου και δεν εμφάνισαν στοιχεία υπερτροφικής επίδρασης, κάτι που θα ήταν ανεπιθύμητη ενέργεια. Σε δύο μελέτες 6 μηνών παρόμοιες με τις δικές μας αναφέρθηκε ότι το μέσο βάρος των μητρών της ομάδας OVX ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ταυτόσημο με την ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία^{101,104}. Στην μελέτη των 13 εβδομάδων σχετικά με το *Dendrobium officinale* παρατηρήθηκε επίσης η ίδια σημαντική απώλεια βάρους της μήτρας στην ομάδα OVX, αλλά η ομάδα που έλαβε θεραπεία παρουσίασε σημαντικά αυξημένα βάρη της μήτρας¹⁰⁷. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση 16-εβδομάδων από εκχύλισμα φλοιού *Du-Zhong* έδειξε ότι η ομάδα OVX παρουσίασε σημαντική μείωση του βάρους της μήτρας, ενώ στα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, το βάρος της μήτρας ήταν παρόμοιο και επιπλέον δεν φάνηκε υπερτροφική επίδραση¹⁰⁸.

Μολονότι οι δράσεις των διαφόρων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος της *G. glabra* έχουν μελετηθεί ευρέως σε πολλά όργανα και ιστούς, υπάρχουν λίγες πληροφορίες που σχετίζονται άμεσα με τις οστικές ιδιότητες. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν κάποιες αρκετά ενδιαφέρουσες πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις στα οστά ορισμένων από αυτά τα συστατικά (όλα τα συστατικά αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 2). Συγκεκριμένα, σε μία 2μηνιαία μελέτη η από του

στόματος χορήγηση γλυκυρριζικού οξέος σε επίμυες ηλικίας 3 μηνών προστάτευσε το μηριαίο οστό έναντι της επαγόμενης από γλυκοκορτικοειδή οστεοπόρωσης και οδήγησε στη βελτίωση της δομής και της αντοχής των οστών¹⁰⁹. Μια άλλη μελέτη με χρήση επίμυων έδειξε ότι η γλαβριδίνη και το γλυκυρριζικό οξύ είχαν ελαφρώς θετική επίδραση στον οστεοπορωτικό οστικό ιστό, ενώ το γλυκυρριζικό οξύ είχε ελάχιστη επίδραση στο σκελετικό σύστημα¹¹⁰. Έχει επίσης τεκμηριωθεί ότι η γλαβριδίνη έχει θετική δράση στους υποδοχείς οιστρογόνων, καθιστώντας την πιθανό εκλεκτικό ενεργοποιητή υποδοχέα οιστρογόνου¹¹¹. Επιπλέον, η γλαβριδίνη και η γλαβρίνη από τις ρίζες γλυκόριζας έδειξαν οιστρογονική δραστηριότητα σε οστίτες ιστούς επίμυων στην προεφηβική φάση και σε ανθρώπινους οστεοβλάστες που περιέχονταν σε κυτταρικές καλλιέργειες από προ- και μετα-εμμηνόπαυσιακές γυναίκες¹¹². Σε μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη, βρέθηκε ότι η γλυκυρριζίνη έχει κατασταλτική δράση στην οστεοκλαστογένεση που επάγεται από το RANKL, και επομένως είναι ένα δυνητικά αποτελεσματικό αντι-οστεοπορωτικό σχήμα, όπως προτείνεται από τους συγγραφείς αυτής της μελέτης¹¹³.

Ένα άλλο συστατικό του εκχυλίσματος ρίζας *G. glabra*, η μεθοξυ ισοφλαβόνη που ονομάζεται Φορμονονετίνη, βρέθηκε ότι προάγει την επούλωση του πειραματικά επαγόμενου τραύματος βλάβης της μεσότητας του μηριαίου οστού και ενισχύει σημαντικά την αναγέννηση των οστών σε θηλυκά ποντίκια¹¹⁴. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε μία μελέτη διάρκειας 12 εβδομάδων, η Φορμονονετίνη έδειξε την ικανότητα να αντιστρέφει την οστεοπενία και να προάγει τον σχηματισμό νέου οστού σε ενήλικους ωθηκεκτομημένους επίμυες²³. Σε μια μελέτη 4 εβδομάδων όπου χρησιμοποιήθηκαν επίμυες τύπου Wistar, τεκμηριώθηκε ότι το φλαβονοειδές Ναρινγενίνη είχε μικρό θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά στην μικροαρχιτεκτονική σε οστεοπορωτικούς οστίτες ιστούς, αλλά δεν επηρέασε τις μηχανικές και χημικές ιδιότητες των οστών¹¹⁵. Επιπλέον, το φλαβονοειδές Λικουιριτιγενίνη παρουσίασε μια διπλή επίδραση στα κύτταρα των οστών, τόσο προωθώντας την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, όσο και την αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών¹¹⁶.

Εκτός από τις δράσεις σχετιζόμενες τον μεταβολισμό των οστών, τα περισσότερα από τα συστατικά του εκχυλίσματος *G. glabra* παρουσιάζουν πρόσθετα ευεργετικά αποτελέσματα, μερικά από τα οποία αξίζουν μια σύντομη αναφορά. Στη βιβλιογραφία έχει περιγραφεί ότι τα φλαβονοειδή που εξάγονται από την γλυκκύριζα εκδηλώνουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση⁸⁶. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το γλυκυρριζικό οξύ προστατεύει το μυοκάρδιο από την ισχαιμία⁸⁷ και παρουσιάζει ισχυρή νευροπροστασία σε μοντέλο χρόνιας εγκεφαλικής υποδιήθησης σε τρωκτικά⁸⁸. Η Λικοφλαβόνη προφύλαξε τον γαστρικό βλεννογόνο σε επίμυες ρυθμίζοντας τα επίπεδα της προσταγλανδίνης E2 στον ορό⁸⁹ και βρέθηκε επίσης ότι έχει επίδραση κατά του έλκους στους επίμυες μέσω της ρύθμισης των μεσολαβητών της φλεγμονής και του μεταβολισμού των αμινοξέων⁹⁰. Επιπλέον, η Γλαβρόνη έδειξε αντι-ϊική δράση⁹¹, ενώ η Γλαβρόλη έδειξε πιθανή αντι-υπερχοληστερολαιμική επίδραση⁹².

Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση επί 16 εβδομάδες Φορμονονετίνης σε επίμυες έδειξε μια πιθανή ικανότητα να ελέγχει νεφροπάθεια στο διαβήτη τύπου 2⁹³. Η φορμονετίνη βρέθηκε επίσης να εκδηλώνει δράσεις αντι-οστεοσαρκώματος τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vitro* μελέτες⁹⁴.

Οι γνώσεις που βασίζονται σε προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι σε μακρά οστά παρατηρείται συχνά απώλεια οστού στις εγγύς και άπω θέσεις και η αλλαγές στη διάφυση είναι ανεπαίσθητες¹¹⁷. Πρόσφατη έρευνα των μεταβολών του μηριαίου οστού στους επίμυες μετά από ωθηκεκτομή έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη περιοστική απόθεση στο μηρό στον έναν και στους δύο μήνες μετά την ωθηκεκτομή, η οποία φαίνεται χρήσιμη για την υποστήριξη του αυξανόμενου σωματικού βάρους σε καθεστώς επαγόμενης οστεοπόρωσης¹¹⁸. Η κλασσική άποψη σχετικά με την οστική απώλεια λόγω οστεοπόρωσης τίθεται σε αμφισβήτηση και υπονοείται ότι οι επίμυες μετά την ωθηκεκτομή είναι ικανοί να προσαρμόζονται στις μεταβολές των οστικών ιδιοτήτων που σχετίζονται με την ωθηκεκτομή¹¹⁸. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι επιδράσεις της ωθηκεκτομής στην οστική πυκνότητα και στην οστική μικροαρχιτεκτονική είναι εξαρτώμενες από την ηλικία του επίμου και την περιοχή του οστού που ελέγχεται^{10,24}, γεγονός που καθιστά το πεδίο ελέγχου της μηριαίας οστικής αντοχής ιδιαίτερα εξερευνησιμο. Η οστική

εναλλαγή είναι μια διαδικασία με μεγάλη διάρκεια και επομένως απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες και πολλαπλά σημεία ελέγχου¹¹⁹ για την περαιτέρω αξιολόγηση των παραπάνω συσχετισμών μεταξύ OVX, BMD και αντοχής των οστών.

Μπορεί να θεωρηθεί ότι η μελέτη μας έχει τους ακόλουθους περιορισμούς: δεν συμπεριλάβαμε μια πρόσθετη ομάδα οιστραδιόλης σύμφωνα με την αρχή της μείωσης των "3R" όσον αφορά τη χρήση των ζώων σε επιστημονικές διαδικασίες³. Η οιστραδιόλη μελετάται ευρέως και είναι γνωστή για τη θετική επίδρασή της στην οστική πυκνότητα αλλά και για τις παρενέργειες της στα ζώα και τους ανθρώπους. Ο κύριος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε εναλλακτικές θεραπείες ως προς την οιστραδιόλη, που να επικεντρώνονται στην πρόληψη της οστικής απώλειας. Επιπλέον, λόγω περιορισμών του τεχνικού εξοπλισμού μας, δεν ήταν δυνατό να εξεταστεί η μηχανική αντοχή των οσφυϊκών σπονδύλων.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα ρίζας *Glycyrrhiza glabra* αξιοσημείωτα προστάτευσε την απώλεια οστικής πυκνότητας της κνήμης σε ωθηκεκτομημένους επίμυες που έλαβαν το εκχύλισμα σε σύγκριση με ωθηκεκτομημένους επίμυες που δεν το έλαβαν, αλλά δεν βελτίωσε τη μηχανική αντοχή στη μηριαία διάφυση, η οποία ήταν η μοναδική θέση που δοκιμάστηκε για μηχανική αντοχή. Το πεδίο παραμένει ανοιχτό και συνιστάται ο έλεγχος περισσότερων οστικών περιοχών και ενδεχομένως μελέτες με μεγαλύτερη διάρκεια για την αξιόπιστη εξαγωγή συμπερασμάτων.

Περίληψη

Σκοπός: σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η δυνητική επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Glycyrrhiza glabra* στην οστική πυκνότητα και την αντοχή των μηριαίων οστών των επίμυων που έχουν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή.

Μέθοδος: τριάντα επίμυες Wistar ηλικίας 10 μηνών χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες των δέκα, Control, ωοθηκεκτομής (OVX) και Ωοθηκεκτομής+Γλυκύρριζας (OVX+G) στο πόσιμο νερό τους. Η οστική πυκνότητα ολικής και εγγύς κνήμης μετρήθηκε σε όλες τις ομάδες πριν από την ωοθηκεκτομή (baseline) και μετά από 3 και 6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή. Η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων των μηριαίων και το βάρος και η ιστολογία της μήτρας εξετάστηκαν στο τέλος της μελέτης.

Αποτελέσματα: δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία μεταβολή της συνολικής οστικής πυκνότητας της ολικής κνήμης από την αρχική τιμή στους 3 μήνες μεταξύ των ομάδων Control και OVX+G (+5.31%±4.75 και +3.30%±6.31 αντίστοιχα, P=μη σημαντικό) και της εγγύς κνήμης αντίστοιχα (+5.58%±6.92 και +2.61%±13.62, P=μη σημαντικό), γεγονός που αναδεικνύει ισχυρή οστεοπροστατευτική επίδραση. Υπήρξε αξιοσημείωτη διαφορά στην ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας της ολικής κνήμης από την αρχική τιμή σε 6 μήνες μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+G (-13.03±5.11 και -0.84%±7.63 αντίστοιχα, P <0.005) και της εγγύς κνήμης αντίστοιχα (-27.9%±3.69 και -0.81%±14.85 αντίστοιχα, P <0.001), επιβεβαιώνοντας την προστατευτική επίδραση του εκχυλίσματος *Glycyrrhiza glabra* στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας της ομάδας OVX+G. Η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+G. Τα βάρη της μήτρας της ομάδας OVX+G κυμαίνονταν μεταξύ των άλλων δύο ομάδων χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά σε κάθε μία.

Συμπεράσματα: Το εκχύλισμα ρίζας *Glycyrrhiza glabra* προστάτευσε σημαντικά την απώλεια οστικής πυκνότητας της κνήμης σε επίμυες της ομάδας

ONX+G σε σύγκριση με την ομάδα ONX, αλλά δεν βελτίωσε την εμβιομηχανική αντοχή των μηριαίων οστών.

Λέξεις-κλειδιά: Επίμυος / Οστεοπόρωση / Ovariectomy / Απορροφησιμετρία / Κάμψη τριών σημείων

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the potential effect of the methanolic extract of plant *Glycyrrhiza glabra* roots on bone mineral density and femoral bone strength of ovariectomized rats.

Methods: Thirty 10-month-old Wistar rats were randomly separated into three groups of ten, Control, Ovariectomy and Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza in their drinking water. Total and proximal tibial bone mineral density was measured in all groups before ovariectomy (baseline) and after 3 and 6 months post ovariectomy. Three-point-bending of the femurs and uterine weight and histology were examined at the end of the study.

Results: No significant difference was noted in bone density percentage change of total tibia from baseline to 3 months between Control and Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza groups ($+5.31\% \pm 4.75$ and $+3.30\% \pm 6.31$ respectively, P =non significant), and of proximal tibia accordingly ($+5.58\% \pm 6.92$ and $+2.61\% \pm 13.62$, P =non significant) demonstrating a strong osteoprotective effect. There was notable difference in percentage change of total tibia bone density from baseline to 6 months between groups Ovariectomy and Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza ($-13.03\% \pm 5.11$ and $-0.84\% \pm 7.63$ respectively, $P < 0.005$), and of proximal tibia accordingly ($-27.9\% \pm 3.69$ and $-0.81\% \pm 14.85$ respectively, $P < 0.001$), confirming the protective effect of *Glycyrrhiza glabra* extract in preserving bone density of the Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza group. Three-point-bending did not reveal any statistically significant difference between Ovariectomy and Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza groups. Uterine weights of the Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza group ranged between the other two groups with no statistically significant difference to each.

Conclusions: *Glycyrrhiza glabra* root extract notably protected tibial bone mineral density loss in Ovariectomy-plus-Glycyrrhiza rats in comparison with ovariectomized rats, but did not improve biomechanical strength.

Key words: Rat / Osteoporosis / Ovariectomy / Absorptiometry / Three-point-bending

Βιβλιογραφία

1. Al Anouti F, Taha Z, Shamim S, Khalaf K, Al Kaabi L, Alsafar H. An insight into the paradigms of osteoporosis: From genetics to biomechanics. *Bone Reports*. 2019;11:100216. doi:10.1016/j.bonr.2019.100216
2. DONTA (I. ΔONTA) I. Experimental biomedical research: achievements and future aims. *J Hell Vet Med Soc*. 2017;60(3):206. doi:10.12681/jhvms.14926
3. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. *Methuen Co, Ltd*. 1959. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
4. Miller MD, Thompson SR. *Miller's Review of Orthopaedics*. 7th ed. Elsevier; 2015.
5. Isabel F Tresguerres, Alobera MA, Pingarron MDC, Blanco LJ. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):151-157. https://www.researchgate.net/publication/7271541_Physiological_bases_of_bone_regeneration_II_The_remolding_process. Accessed August 21, 2019.
6. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57(1):385-409. doi:10.1210/rp.57.1.385
7. Δοντά Ι. Ανατομική και βιολογία των οστικών κυττάρων και της θεμέλιας ουσίας. In: Λυρίτης ΓΠ, ed. *Μεταβολικά Νοσήματα Των Οστών*. 4η. Λυκόβρυση: Hylonome edition; 2007:13-22.
8. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624-630. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3733029&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 15, 2015.
9. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-430. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2707131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 3, 2015.
10. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(3):193-207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758493>. Accessed October 13, 2015.
11. Turner RT, Maran A, Lotinun S, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):117-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704974>. Accessed November 3, 2015.
12. Λελόβας Π, Παύλος. Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος Sideritis euboica στην οστική απώλεια ωθηκεκτομημένων επιμύων. December 2011. doi:10.12681/eadd/28063
13. Ke HZ, Jee WSS, Ito H, et al. Greater bone formation induction occurred in aged

- than young cancellous bone sites. *Bone*. 1993. doi:10.1016/8756-3282(93)90183-B
14. Li XJ, Jee WSS. Adaptation of diaphyseal structure to aging and decreased mechanical loading in the adult rat: A densitometric and histomorphometric study. *Anat Rec*. 1991;229(3):291-297. doi:10.1002/ar.1092290302
 15. Li X, S. S. Jee W, Ke H, Mori S, Akamine T. Age-Related Changes of Cancellous and Cortical Bone Histomorphometry in Female Sprague-Dawley Rats. 1991;1.
 16. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1997. doi:10.1016/S8756-3282(96)00317-1
 17. Aubin JE. Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001. doi:10.1023/A:1010011209064
 18. Iwaniec UT, Turner RT. Animal Models for Osteoporosis. In: *Osteoporosis*. Academic Press; 2013:939-961. doi:10.1016/B978-0-12-415853-5.00039-X
 19. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991. doi:10.1016/0169-6009(91)90124-I
 20. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988. doi:10.1007/BF02571317
 21. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1989. doi:10.1016/8756-3282(89)90067-7
 22. Li XJ, Jee WSS, Chow S -Y, Woodbury DM. Adaptation of cancellous bone to aging and immobilization in the rat: A single photon absorptiometry and histomorphometry study. *Anat Rec*. 1990. doi:10.1002/ar.1092270103
 23. Tyagi AM, Srivastava K, Singh AK, et al. Formononetin reverses established osteopenia in adult ovariectomized rats. *Menopause*. 2012;19(8):856-863. doi:10.1097/gme.0b013e31824f9306
 24. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res*. 2011;29(2):189-196. doi:10.1002/jor.21217
 25. Καπετάνιος Γ. *Η Οστεοπόρωση Και ο Ορθοπαιδικός*. Θεσσαλονίκη: UNIVERSITY STUDIO PRESS A.E; 2012.
 26. Μαρίνου Κ, Δοντά Ι. Ηθική πειραματισμού. Ηθική αξιολόγηση πειραματικού πρωτοκόλλου. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*. 2009;(60):217-221.
 27. Marozik P, Alekna V, Rudenko E, et al. Bone metabolism genes variation and response to bisphosphonate treatment in women with postmenopausal osteoporosis. Williams BO, ed. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221511. doi:10.1371/journal.pone.0221511
 28. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, et al. Bone microarchitecture

- evaluated by histomorphometry. *Micron*. 2005;36(7-8):609-616. doi:10.1016/j.micron.2005.07.007
29. Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou CL. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Jt Bone Spine*. 2007;74(3):233-239. doi:10.1016/j.jbspin.2007.01.019
30. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 14(4):595-608. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274302>. Accessed November 1, 2015.
31. Nicholson PHF. Ultrasound and the biomechanical competence of bone. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2008;55(7):1539-1545. doi:10.1109/TUFFC.2008.830
32. Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P. The Evaluation of Cortical Bone Remodeling with a New Ultrasonic Technique. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1990;37(5):433-441. doi:10.1109/10.55634
33. Ashman RB, Jae Young Rho. Elastic modulus of trabecular bone material. *J Biomech*. 1988;21(3):177-181. doi:10.1016/0021-9290(88)90167-4
34. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*. 1983;1(4):405-411. doi:10.1002/jor.1100010409
35. Andrade MGS, Sá CN, Marchionni AMT, Bório dos Santos Calmonde Bittencourt TC, Sadigursky M. Effects of freezing on bone histological morphology. *Cell Tissue Bank*. 2008;9(4):279-287. doi:10.1007/s10561-008-9065-4
36. Brozek W, Reichardt B, Kimberger O, et al. Mortality after hip fracture in Austria 2008-2011. *Calcif Tissue Int*. 2014;95(3):257-266. doi:10.1007/s00223-014-9889-9
37. Klop C, Welsing PMJ, Cooper C, et al. Mortality in British hip fracture patients, 2000-2010: a population-based retrospective cohort study. *Bone*. 2014;66:171-177. doi:10.1016/j.bone.2014.06.011
38. Lund CA, Moller AM, Wetterslev J, Lundstrom LH. Organizational factors and long-term mortality after hip fracture surgery. A cohort study of 6143 consecutive patients undergoing hip fracture surgery. *PLoS One*. 2014;9(6):e99308. doi:10.1371/journal.pone.0099308
39. Meessen JMTA, Pisani S, Gambino ML, et al. Assessment of Mortality Risk in Elderly Patients After Proximal Femoral Fracture. *Orthopedics*. 2014;37(2):e194-e200. doi:10.3928/01477447-20140124-25
40. Ribeiro TA, Premaor MO, Larangeira JA, et al. Predictors of hip fracture mortality at a general hospital in South Brazil: an unacceptable surgical delay. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(4):253-258. doi:10.6061/clinics/2014(04)06
41. Smith T, Pelpola K, Ball M, Ong A, Myint PK. Pre-operative indicators for

- mortality following hip fracture surgery: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing*. 2014;43(4):464-471. doi:10.1093/ageing/afu065
42. Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Prevention of incident fractures in patients with prevalent fragility fractures: Current and future approaches. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2013;27(6):805-820. doi:10.1016/j.berh.2014.01.010
 43. Binkley N, Bone H, Gilligan JP, Krause DS. Efficacy and safety of oral recombinant calcitonin tablets in postmenopausal women with low bone mass and increased fracture risk: a randomized, placebo-controlled trial. *Osteoporos Int*. 2014;25(11):2649-2656. doi:10.1007/s00198-014-2796-0
 44. Ghirardi A, Di Bari M, Zambon A, et al. Effectiveness of oral bisphosphonates for primary prevention of osteoporotic fractures: Evidence from the AIFA-BEST observational study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70(9):1129-1137. doi:10.1007/s00228-014-1708-8
 45. Abobului M, Berghea F, Vlad V, et al. Evaluation of adherence to anti-osteoporosis treatment from the socio-economic context. *J Med Life*. 2015;8 Spec Iss:119-123. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4564035&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 1, 2015.
 46. Alarcón T, González-Montalvo JI, Martín-Vega A, Gotor P. Improving persistence and adherence to osteoporosis treatment: a challenge to solve. *Osteoporos Int*. September 2015. doi:10.1007/s00198-015-3323-7
 47. Fuksa L, Vytrisalova M. Adherence to denosumab in the treatment of osteoporosis and its utilization in the Czech Republic. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(9):1645-1653. doi:10.1185/03007995.2015.1065241
 48. Kishimoto H, Maehara M. Compliance and persistence with daily, weekly, and monthly bisphosphonates for osteoporosis in Japan: analysis of data from the CISA. *Arch Osteoporos*. 2015;10:231. doi:10.1007/s11657-015-0231-6
 49. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*. 2002;288(7):872-881. doi:10.1001/jama.288.7.872.
 50. Tomková S, Telepková D, Vaňuga P, et al. Therapeutic adherence to osteoporosis treatment. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2014;52(08):663-668. doi:10.5414/cp202072
 51. Reid IR. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(7):418-428. doi:10.1038/nrendo.2015.71
 52. Jang SW, Lee JW, Ryu DS, Son M, Kang MJ. Design of pH-responsive alginate raft formulation of risedronate for reduced esophageal irritation. *Int J Biol Macromol*. 2014;70:174-178. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.048
 53. Lenart BA, Neviasser AS, Lyman S, et al. Association of low-energy femoral fractures with prolonged bisphosphonate use: A case control study.

- Osteoporos Int.* 2009;20(8):1353-1362. doi:10.1007/s00198-008-0805-x
54. Borromeo GL, Brand C, Clement JG, et al. A large case-control study reveals a positive association between bisphosphonate use and delayed dental healing and Osteonecrosis of the jaw. *J Bone Miner Res.* 2014;29(6):1363-1368. doi:10.1002/jbmr.2179
55. Dittfeld A, Koszowska A, Brończyk AP, Nowak J, Gwizdek K, Zubelewicz-Szkodzińska B. [Phytoestrogens--whether can they be an alternative to hormone replacement therapy for women during menopause period?]. *Wiad Lek.* 2015;68(2):163-167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181151>. Accessed November 26, 2015.
56. Yuan T-T, Zhang N-D, He Y-J, Li M, Xu H-T, Zhang Q-Y. [Research progress of phytoestrogens-like chemical constituents in natural medicines]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2014;39(23):4526-4531. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911795>. Accessed November 26, 2015.
57. Gambacciani M. Selective estrogen modulators in menopause. *Minerva Ginecol.* 2013;65(6):621-630. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346250>. Accessed November 1, 2015.
58. Pinkerton J V, Thomas S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142:142-154. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.12.011
59. Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr.* 2007;91(04):513. doi:10.1079/BJN20031075
60. Fu S wen, Zeng G feng, Zong S hui, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutr Res.* 2014;34(6):467-477. doi:10.1016/j.nutres.2014.05.003
61. Gambacciani M, Levancini M. Management of postmenopausal osteoporosis and the prevention of fractures. *Panminerva Med.* 2014;56(2):115-131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942322>. Accessed November 1, 2015.
62. Messina M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2014;100 Suppl:423S-30S. doi:10.3945/ajcn.113.071464
63. Torella M, La Rezza F, Labriola D, et al. [Phytoestrogens and menopause]. *Minerva Ginecol.* 2013;65(6):679-696. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881390>. Accessed September 25, 2015.
64. Wang C, Meng MX, Tang XL, et al. The proliferation, differentiation, and mineralization effects of puerarin on osteoblasts in vitro. *Chin J Nat Med.*

- 2014;12(6):436-442. doi:10.1016/S1875-5364(14)60068-6
65. Xiao HH, Fung CY, Mok SK, et al. Flavonoids from Herba epimedii selectively activate estrogen receptor alpha (ER α) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:141-151. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.02.019
66. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2017;16(1):4-20. doi:10.1002/rmb2.12006
67. Marchand LR, A. Stewart J. Breast Cancer. In: *Integrative Medicine*. Elsevier; 2018:772-784.e7. doi:10.1016/B978-0-323-35868-2.00078-5
68. Maxwell Parkin D. Cancers of the breast, endometrium and ovary: Geographic correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989. doi:10.1016/0277-5379(89)90373-8
69. Di Gioia F, Petropoulos SA. Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol 90. Academic Press; 2019:351-421. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.004
70. Mitscher LA, Drake S, Gollapudi SR, Harris JA, Shankel DM. Isolation and identification of higher plant agents active in antimutagenic assay systems: Glycyrrhiza glabra. *Basic Life Sci*. 1986;39:153-165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3094492>. Accessed November 23, 2015.
71. Omar HR, Komarova I, Abdelmalak HD, et al. Licorice abuse: Time to send a warning message. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2012;3(4):125-138. doi:10.1177/2042018812454322
72. Gantait A, Pandit S, Nema NK, Mukjerjee PK. Quantification of glycyrrhizin in Glycyrrhiza glabra extract by validated HPTLC densitometry. *J AOAC Int*. 93(2):492-495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480894>. Accessed November 26, 2015.
73. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Izrael S, Vaya J. Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;78(3):291-298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595510>. Accessed November 3, 2015.
74. Birari RB, Gupta S, Mohan CG, Bhutani KK. Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine*. 2011;18(8-9):795-801. doi:10.1016/j.phymed.2011.01.002
75. Eu CHA, Lim WYA, Ton SH, bin Abdul Kadir K. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis*. 2010;9:81. doi:10.1186/1476-511X-9-81

76. Maurya SK, Raj K, Srivastava AK. Antidyslipidaemic activity of *Glycyrrhiza glabra* in high fructose diet induced dyslipidaemic Syrian golden hamsters. *Indian J Clin Biochem*. 2009;24(4):404-409. doi:10.1007/s12291-009-0072-4
77. Nakagawa K, Kishida H, Arai N, Nishiyama T, Mae T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A(y) mice. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(11):1775-1778. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516721>. Accessed November 3, 2015.
78. Sitohy MZ, el-Massry RA, el-Saadany SS, Labib SM. Metabolic effects of licorice roots (*Glycyrrhiza glabra*) on lipid distribution pattern, liver and renal functions of albino rats. *MS. Nahrung*. 1991;35(8):799-806. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1780004>. Accessed November 3, 2015.
79. Visavadiya NP, Narasimhacharya AVRL. Ameliorative effects of herbal combinations in hyperlipidemia. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:160408. doi:10.1155/2011/160408
80. Visavadiya NP, Narasimhacharya AVRL. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* (Linn) in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(11):1080-1086. doi:10.1002/mnfr.200600063
81. Sen S, Roy M, Chakraborti AS. Ameliorative effects of glycyrrhizin on streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(2):287-296. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01217.x
82. Cronin H, Draelos ZD. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. *J Cosmet Dermatol*. 2010;9(3):218-225. doi:10.1111/j.1473-2165.2010.00516.x
83. Lee KT, Kim BJ, Kim JH, Heo MY, Kim HP. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Int J Cosmet Sci*. 1997;19(6):291-298. doi:10.1046/j.1467-2494.1997.171725.x
84. Peng F, Du Q, Peng C, et al. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phyther Res*. 2015;29(7):969-977. doi:10.1002/ptr.5348
85. Kao TC, Wu CH, Yen GC. Bioactivity and potential health benefits of licorice. *J Agric Food Chem*. 2014;62(3):542-553. doi:10.1021/jf404939f
86. Wei M, Ma Y, Liu Y, et al. Urinary metabolomics study on the anti-inflammation effects of flavonoids obtained from *Glycyrrhiza*. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2018;1086:1-10. doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.007
87. Xu C, Liang C, Sun W, Chen J, Chen X. Glycyrrhizic acid ameliorates myocardial ischemic injury by the regulation of inflammation and oxidative state. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:1311-1319. doi:10.2147/DDDT.S165225
88. Sathyamoorthy Y, Kaliappan K, Nambi P, Radhakrishnan R. Glycyrrhizic acid renders robust neuroprotection in rodent model of vascular dementia by

- controlling oxidative stress and curtailing cytochrome-c release. *Nutr Neurosci.* February 2019;1-16. doi:10.1080/1028415X.2019.1580935
89. Lin X-C, Chen Y-Y, Bai S-T, Zheng J, Tong L. [Protective effect of licoflavone on gastric mucosa in rats with chronic superficial gastritis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013;33(2):299-304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443794>. Accessed March 3, 2019.
90. Yang Y, Wang S, Bao Y rui, et al. Anti-ulcer effect and potential mechanism of licoflavone by regulating inflammation mediators and amino acid metabolism. *J Ethnopharmacol.* 2017;199:175-182. doi:10.1016/j.jep.2017.01.053
91. Grienke U, Braun H, Seidel N, et al. Computer-guided approach to access the anti-influenza activity of licorice constituents. *J Nat Prod.* 2014;77(3):563-570. doi:10.1021/np400817j
92. Choi JH, Rho MC, Lee SW, et al. Glabrol, an acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase inhibitor from licorice roots. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(3):563-566. doi:10.1016/j.jep.2006.10.012
93. Oza MJ, Kulkarni YA. Formononetin attenuates kidney damage in type 2 diabetic rats. *Life Sci.* 2019;219:109-121. doi:10.1016/j.lfs.2019.01.013
94. Hu W, Wu X, Tang J, et al. In vitro and in vivo studies of antiosteosarcoma activities of formononetin. *J Cell Physiol.* February 2019. doi:10.1002/jcp.28349
95. Δοντά Ι. Πειραματισμός στους μυς και επίμυος. *Οστούν.* 1993;(4):164-172.
96. Farag MA, Porzel A, Wessjohann LA. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry.* 2012;76:60-72. doi:10.1016/j.phytochem.2011.12.010
97. Li K, Ji S, Song W, et al. Glycybridins A-K, Bioactive Phenolic Compounds from *Glycyrrhiza glabra*. *J Nat Prod.* 2017;80(2):334-346. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00783
98. Li YJ, Chen J, Li Y, et al. Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218(45):8181-8191. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.030
99. *Community Herbal Monograph on Glycyrrhiza Glabra L. and/or Glycyrrhiza Inflata Bat. and/or Glycyrrhiza Uralensis Fisch, Radix.* EUROPEAN MEDICINES AGENCY; 2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/08/WC500110647.pdf.
100. Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27. doi:10.4103/0976-0105.177703
101. Dontas I, Halabalaki M, Moutsatsou P, et al. Protective effect of plant extract

- from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas*. 2006;53(2):234-242. doi:10.1016/j.maturitas.2005.05.007
102. Song S hong, Zhai Y kun, Li C qin, et al. Effects of total flavonoids from *Drynariae Rhizoma* prevent bone loss in vivo and in vitro. *Bone Reports*. 2016;5:262-273. doi:10.1016/j.bonr.2016.09.001
103. Wang Q-L, Huo X-C, Wang J-H, et al. Rutin prevents the ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(8):1911-1917. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28485786>. Accessed April 1, 2018.
104. Dontas IA, Lelovas PP, Kourkoulis SK, et al. Protective effect of *Sideritis euboica* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause*. 2011;18(8):915-922. doi:10.1097/gme.0b013e31820ce580
105. Cui G, Leng H, Wang K, et al. Effects of Remifemin treatment on bone integrity and remodeling in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. Pietropaolo M, ed. *PLoS One*. 2013;8(12):e82815. doi:10.1371/journal.pone.0082815
106. Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, et al. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. Smith B, ed. *PLoS One*. 2013;8(11):e78739. doi:10.1371/journal.pone.0078739
107. Wang Q, Zi CT, Wang J, et al. *Dendrobium officinale* orchid extract prevents ovariectomy-induced osteoporosis in vivo and Inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in vitro. *Front Pharmacol*. 2018;8(JAN):966. doi:10.3389/fphar.2017.00966
108. Zhang R, Liu ZG, Li C, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *Bone*. 2009;45(3):553-559. doi:10.1016/j.bone.2008.08.127
109. Ramli ESM, Suhaimi F, Asri SFM, Ahmad F, Soelaiman IN. Glycyrrhizic acid (GCA) as 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor exerts protective effect against glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2013;31(3):262-273. doi:10.1007/s00774-012-0413-x
110. Klasik-Ciszewska S, Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W. EFFECT OF GLABRIDIN AND GLYCYRRHIZIC ACID ON HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONES IN OVARIECTOMIZED RATS. *Acta Pol Pharm*. 73(2):517-527. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180445>. Accessed March 3, 2019.
111. Simmler C, Pauli GF, Chen SN. Phytochemistry and biological properties of glabridin. *Fitoterapia*. 2013;90:160-184. doi:10.1016/j.fitote.2013.07.003
112. Somjen D, Katzburg S, Vaya J, et al. Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;91(4-5):241-246. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.04.008
113. Li Z, Chen C, Zhu X, Li Y, Yu R, Xu W. Glycyrrhizin Suppresses RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Oxidative Stress Through Inhibiting NF- κ B and MAPK

- and Activating AMPK/Nrf2. *Calcif Tissue Int.* 2018;103(3):324-337. doi:10.1007/s00223-018-0425-1
114. Singh KB, Dixit M, Dev K, Maurya R, Singh D. Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect. *Br J Nutr.* 2017;117(11):1511-1522. doi:10.1017/S0007114517001556
115. Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, Ozimina-Kamińska E, Bońka A. EFFECT OF DIETARY FLAVONOID NARINGENIN ON BONES IN RATS WITH OVARECTOMY-INDUCED OSTEOPOROSIS. *Acta Pol Pharm.* 2016;73(4):1073-1081. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29648734>. Accessed March 3, 2019.
116. Uchino K, Okamoto K, Sakai E, et al. Dual Effects of Liquiritigenin on the Proliferation of Bone Cells: Promotion of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Differentiation. *Phyther Res.* 2015;29(11):1714-1721. doi:10.1002/ptr.5416
117. Chon C-S, Yun H-S, Kim H, Ko C. Elastic Modulus of Osteoporotic Mouse Femur Based on Femoral Head Compression Test. *Appl bionics Biomech.* 2017;2017:7201769. doi:10.1155/2017/7201769
118. Shah FA, Stoica A, Cardemil C, Palmquist A. Multiscale characterization of cortical bone composition, microstructure, and nanomechanical properties in experimentally induced osteoporosis. *J Biomed Mater Res Part A.* 2017;106(4):997-1007. doi:10.1002/jbm.a.36294
119. Kruger MC, Morel PCH. Experimental Control for the Ovariectomized Rat Model: Use of Sham Versus Nonmanipulated Animal. *J Appl Anim Welf Sci.* 2016;19(1):73-80. doi:10.1080/10888705.2015.1107727