



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ
(ΠΕΓΑ)**

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

**Πρόγραμμα Δια Βίου Μάθησης ΑΕΙ για την Επικαιροποίηση
Γνώσεων Αποφοίτων ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)**

***Φυτο-οιστρογόνα
Απομόνωση, ανάλυση και αξιολόγηση βιολογικής
δράσης***



**Ρωξάνη Τέντα
Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ

Τα οστά αποτελούνται από το στερεότυπο τύπο συνδετικού ιστού του ανθρώπινου σώματος, τον οστίτη ιστό. Αποτελούν περίπου το 12-15% του σωματικού βάρους στους ενήλικες άντρες και γυναίκες αντίστοιχα και η σύσταση τους κατά προσέγγιση είναι: 70% μεταλλικά άλατα, 22% πρωτεΐνη και 8% νερό. Τα οστά αποτελούνται από ειδικό συνδετικό ιστό αρκετών κυττάρων διαφορετικού τύπου: τους οστεοβλάστες (που είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό οστού), τους οστεοκλάστες (που είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση οστού) και τα οστεοκύτταρα (που είναι τελικού σταδίου διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες), τα οποία περιβάλλονται από ένα πλέγμα κολλαγόνου (εξωκυττάρια θεμέλια ουσία), ονομαζόμενο οστεοειδές, πάνω στο οποίο εναποτίθενται μέταλλα και ειδικότερα κρύσταλλοι ασβεστίου και φωσφόρου που είναι γνωστοί ως άλατα υδροξυαπατίτη. Το 90% των πρωτεϊνών του οστεοειδούς αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I. Η σκληρότητα όμως της θεμέλιας εξωκυττάριας ουσίας και κατ' επέκταση του οστού οφείλεται στο κρυσταλλικό σύμπλεγμα ασβεστίου και φωσφορικών του υδροξυαπατίτη.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΟΣΤΩΝ

Ο σκελετός εκτελεί δύο σημαντικές λειτουργίες. Η πρώτη λειτουργία είναι συνεργική με τα άλλα στοιχεία του μυοσκελετικού συστήματος (αρθρώσεις, μύες, σύνδεσμοι) και δίνει την κινητικότητα που χαρακτηρίζει τα σπονδυλωτά ζώα καθώς και τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των μικροφθορών και η δεύτερη είναι η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου. Στην πράξη ο σκελετός αποτελεί μια τεράστια αποθήκη ασβεστίου και όταν υπάρχει επείγουσα ανάγκη ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο είναι δυνατόν αυτό να απελευθερωθεί από τα οστά. Οι διαδικασίες της οστικής αναδιαμόρφωσης, που εξυπηρετούν τόσο στις μηχανικές ανάγκες του σκελετού όσο και την ομοιοστασία του ασβεστίου (συνεργική δράση παραθορμόνης, βιταμίνης D και καλσιτονίνης), αποτελούν κεφαλαιώδη γνώση για την κατανόηση της

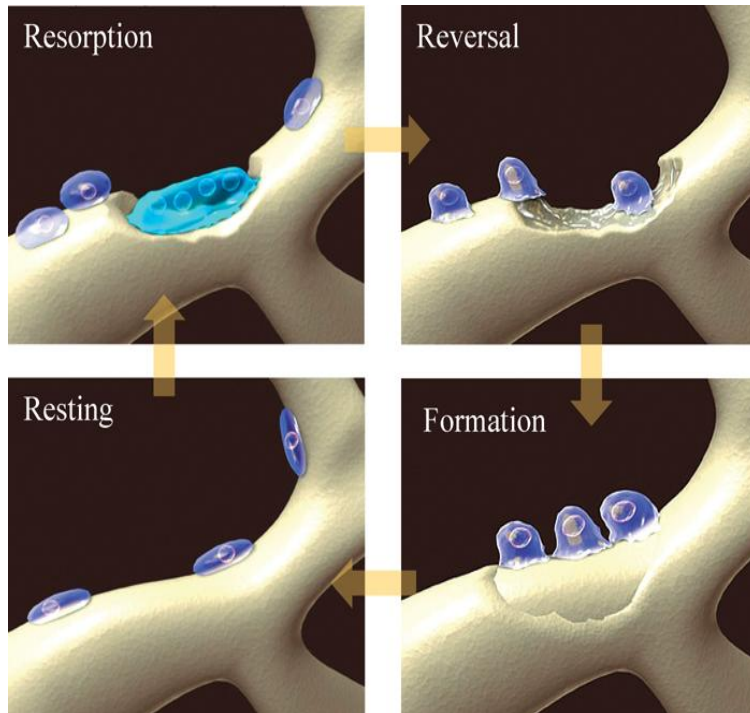
φυσιολογίας του οστίτη ιστού καθώς επίσης και για την κατανόηση της παθογένειας των μεταβολικών νοσημάτων των οστών.

ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ

Η οστική αναδιαμόρφωση είναι η διαδικασία ανανέωσης των μικρομονάδων των οστών, με διαδοχική ενεργοποίηση και λειτουργία των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών με σκοπό την επιδιόρθωση των μικροφθορών, καθώς και τη διατήρηση σταθερών τιμών ιονισμένου ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο. Η οστική αναδιαμόρφωση διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μονάδων του σπογγώδους και του φλοιώδους οστού. Μια βασική διαφορά είναι και ο χρόνος που απαιτείται για ολοκλήρωση ενός κύκλου ανακατασκευής. Στο φλοιώδες οστό η οστική ανακατασκευή διαρκεί πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (συνολικά περίπου 7 μήνες), ενώ στο σπογγώδες οστό η διαδικασία αυτή είναι συντομότερη (περίπου 3-4 μήνες). Οι φάσεις που διενεργείται η οστική αναδιαμόρφωση είναι πέντε:

1. Φάση ηρεμίας: Η ελεύθερη επιφάνεια της μονάδος επιστρώνεται από άφθονα αποπλατυσμένα επενδυτικά κύτταρα, τα οποία είναι για την ώρα ανενεργά.
2. Φάση ενεργοποίησης: Στη φάση αυτή ένας διεγέρτης των οστεοκλαστών κινητοποιεί τους προ-οστεοκλάστες, που συντηκόμενοι σε πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα σχηματίζουν τους οστεοκλάστες, οι οποίοι συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της μονάδας.
3. Φάση οστικής απορρόφησης: Η φάση αυτή διαρκεί 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες και 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής οι επιστρατευμένοι στην ελεύθερη επιφάνεια οστεοκλάστες απορροφούν προοδευτικά την αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία αδειάζοντας έτσι το περιεχόμενο της μεταβολικής μονάδας.
4. Φάση κυτταρικής αναστροφής: στη φάση αυτή οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από τον πυθμένα της μεταβολικής μονάδας και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες.
5. Φάση οστικής παραγωγής: Στη φάση αυτή, που διαρκεί 2-3 μήνες στο φλοιώδες οστό και 145 περίπου ημέρες στο σπογγώδες, οι

οστεοβλάστες εναποθέτουν προοδευτικά οστό, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ισόποσο με εκείνο που απορροφήθηκε στην προηγούμενη φάση.



Διαδικασία οστικής αναδιαμόρφωσης

Προκειμένου να μπορεί να αξιολογηθεί τόσο η οστική παραγωγή όσο και η οστική απορρόφηση έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που βασίζονται στην ανίχνευση μοριακών δεικτών στον ορό ή το πλάσμα. Αυτοί οι βιοδείκτες εάν μετρηθούν και ερμηνευθούν σωστά αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στην κατανόηση της παθογένειας και στη θεραπευτική αντιμετώπιση των μεταβολικών νοσημάτων των οστών.

Δείκτες Οστικής Παραγωγής

Οι δείκτες οστικής παραγωγής αποτελούν άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των ενεργοποιημένων οστεοβλαστών. Παράγονται κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων της ανάπτυξης των οστεβλαστών, αντανακλώντας την οστεοβλαστική λειτουργία και κατ'επέκταση την οστική παραγωγή. Όλοι οι δείκτες οστικής παραγωγής μπορούν να προσδιοριστούν στον ορό ή στο πλάσμα του αίματος *Οστεοκαλσίνη*, *Οστική αλκαλική φωσφατάση* *Αμινο- και Καρβοξυτελικό Προπεπτίδιο του Προκολλαγόνου Τύπου I (PINP, PICP)*.

Δείκτες Οστικής απορρόφησης

Οι περισσότεροι από τους δείκτες οστικής απορρόφησης είναι προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου των οστών αλλά μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες και ένζυμα μπορεί επίσης να δώσουν ενδεικτικές απαντήσεις για το βαθμό της οστικής απορρόφησης (πχ ανθεκτική στο τρυγικό οξύ όξινη φωσφατάση- TRAP, Διασταυρούμενα τελοπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου I- NTx, CTx, Πυριδινολίνη (PYD) και Δεσοξυπυριδινολίνη (DPD)).

ΔΙΚΤΥΟ RANK-RANKL-OPG

Ο RANKL (Receptor activator of Nuclear factor- Kappa β Ligand) είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες και συνδέεται με τον RANK υποδοχέα των οστεοκλαστών με αποτέλεσμα να προάγεται η διαφοροποίηση, η λειτουργικότητα και η επιβίωση των οστεοκλαστών. Ωρίμανση και σύντηξη των οστεοκλαστών σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα γίνεται μόνο εφόσον ο RANK συνδεθεί με τον RANKL. Η οστεοπροτεγερίνη OPG (μέλος της οικογένειας TNF) παράγεται από τους οστεοβλάστες και συνδέεται με τον RANKL με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η οστική απορρόφηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διατήρηση της ισορροπίας OPG-RANKL είναι σημαντικότερος παράγων για την ισορροπία της οστικής αναδιαμόρφωσης. Επομένως, η αναλογία OPG/RANKL καθορίζουν το βαθμό σχηματισμού και δραστηριότητας των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, αντίστοιχα.

ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Η οστεοπόρωση αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θανάτου σε προχωρημένες ηλικίες και την πλέον συνήθη νόσο των οστών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O.), προειδοποιεί ότι, από πλευράς συχνότητας, η οστεοπόρωση καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση μετά τις καρδιαγγειακές νόσους και χαρακτηρίζεται πλέον ως ασθένεια επιδημικού χαρακτήρα. Εξαπλώνεται δε με ταχύτατο ρυθμό, καθώς ο πληθυσμός και το προσδόκιμο ζωής αυξάνονται. Η οστεοπόρωση προκαλεί ένα κάταγμα κάθε 30 λεπτά στην Ευρώπη, σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Οστεοπόρωσης (I.O.F.), ενώ εκτιμάται ότι το 25% -

60% των γυναικών άνω των 60 ετών, θα αντιμετωπίσει τουλάχιστον ένα περιστατικό κατάγματος στη σπονδυλική στήλη. Από στατιστικής άποψης οι γυναίκες βρίσκονται σε δυσμενέστερη θέση, αφού σε οποιαδήποτε ηλικία, η πιθανότητα κατάγματος από οστεοπόρωση είναι 2 φορές μεγαλύτερη από ότι στους άνδρες. Οι γυναίκες αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εξαιτίας της μικρότερης κατά κανόνα οστικής πυκνότητας σε σχέση με τους άνδρες και την έλλειψη οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση.

Η πιο διαδεδομένη μορφή της νόσου είναι η **μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση**, η οποία εμφανίζεται σε γυναίκες πάνω από την ηλικία των 50 χρόνων. Υπολογίζεται ότι 10 εκ. μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες πάσχουν από οστεοπόρωση και 25 εκ. από οστεοπενία αυτήν τη στιγμή στις ΗΠΑ, ενώ τα ποσοστά αναμένονται να αυξηθούν δραματικά φτάνοντας τα 40 εκ. στην επόμενη πενταετία.

Ο όρος "οστεοπόρωση" χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από διάχυτη οστική αραίωση και ποσοτική μείωση του οστού, δηλαδή οστική ατροφία. Η σύνθεση και ο όγκος του σκελετού παραμένουν φυσιολογικά αλλά ελαττώνεται η μάζα του οστού σε σχέση με το όγκο του. Παρατηρείται αυξημένη διαφοροποίηση και δραστηριότητα των οστεοκλαστών και μειωμένη ενεργοποίηση των οστεοβλαστών στην ανάπλαση των οστών. Η διαταραχή της ισορροπίας των εξειδικευμένων αυτών κυττάρων συνοδεύεται από μείωση της οστικής μάζας, με αρνητικές συνέπειες στην αντοχή των οστών και στην αρχιτεκτονική τους, που συχνά οδηγούν σε παραμορφώσεις (μείωση ύψους, κύφωση), μειωμένη λειτουργικότητα και κατάγματα. Η αναδόμηση και προσαρμοστικότητα του οστού ελαχιστοποιείται, τα οστά γίνονται λιγότερο ελαστικά και πιο εύθραυστα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα καταγμάτων και να γίνεται πολύ δύσκολη η αποκατάσταση των βλαβών.

Η αξιολόγηση της οστικής πυκνότητας πραγματοποιείται με τη μέθοδο Απορροφησιομετρίας Διπλής Ενέργειας Ακτίνων Χ (Dual X-Ray Absorptiometry – DXA). Από τη μέτρηση με τη μέθοδο DXA μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η οστική μάζα και η οστική πυκνότητα σε όλο το σώμα ή σε ορισμένες οστικές περιοχές, που είναι περισσότερο ευάλωτες σε κατάγματα, όπως στο ισχίο, στον αυχένα της κεφαλής του μηριαίου οστού, στον αντιβράχιο και στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Εκτός

από τις απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας που προκύπτουν από τη μέτρηση DXA, πρακτικό ενδιαφέρον έχουν και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση της οστικής πυκνότητας με αντίστοιχες τιμές ενός πληθυσμού αναφοράς που επιλέγεται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου ατόμου (π.χ φύλο, ηλικία, φυλή).



Μέθοδος DXA

Δεν είναι ακριβώς γνωστό τι προκαλεί την οστεοπόρωση, αν και έχουν καταγραφεί πολλοί προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η προχωρημένη ηλικία, το γυναικείο φύλο, η λευκή φυλή, η πρόωρη εμμηνόπαυση, θετικό οικογενειακό ιστορικό, ανεπαρκής πρόσληψη ασβεστίου, φάρμακα, η συχνότερη όμως αιτία θεωρείται η ελάττωση της οστικής μάζας που συμβαίνει στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.

Η πιο έντονη μείωση της οστικής μάζας παρατηρείται στα οστά που είναι πλούσια σε σπογγώδες οστίτη ιστό όπως οι σπόνδυλοι, τα ισχία και οι καρποί, με αποτέλεσμα τα κατάγματα στα σημεία αυτά να είναι πολύ πιο συχνά. Οι ρυθμοί απώλειας σπογγώδους και φλοιώδους οστίτη ιστού κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της εμμηνόπαυσης είναι περίπου 2-4% και 1-2% το χρόνο, αντίστοιχα.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης και της διατροφής, με τη γενετική πληροφορία κάθε ατόμου, καθορίζει την κορυφαία οστική μάζα, που παίζει καθοριστικό ρόλο στον τελικό καθορισμό της οστικής πυκνότητας, δεδομένης της ετήσιας απώλειας οστίτη ιστού.

ΦΥΤΟ-ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Η ανάπτυξη και η λειτουργικότητα πολλών τυπικών ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος της γυναίκας, όπως είναι η μήτρα, οι ωοθήκες και ο μαστικός αδένας επηρεάζονται από την οιστραδιόλη. Επίσης, τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη συντήρηση των οστών και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση βασικό ρόλο και ίσως τον πιο σημαντικό κατέχουν τα **οιστρογόνα**. Κατά την εγκατάσταση εμμηνόπαυσης (φυσικά, χειρουργικά ή φαρμακευτικά), τα μειωμένα επίπεδα της οιστραδιόλης συνδέονται άμεσα με τη μείωση της οστικής πυκνότητας (Bone Mineral Density - BMD), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά, τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, παρατηρείται αυξημένος ρυθμός διαφοροποίησης και ενεργοποίηση των οστεοβλαστών και μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών, με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης των οστών και την αναδόμησή τους.

Η ορμονική υποκατάσταση με οιστρογόνα αποτελεί μια από τις δημοφιλέστερες φαρμακευτικές προσεγγίσεις για την πρόληψη της οστικής απώλειας σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Η οιστρογονική υποκατάσταση είναι αποτελεσματική στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, όμως συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες, όπως από υπερπλασία του ενδομητρίου και από αυξανόμενη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Το μέγεθος του προβλήματος γίνεται φανερό από το γεγονός και μόνο ότι δύο ανεξάρτητες κλινικές μελέτες οι οποίες διεξάχθηκαν σε Αγγλία και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Million Women Study και Women's Health Initiative study, αντίστοιχα) ανεστάλησαν εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης σοβαρών παρενεργειών στους συμμετέχοντες. Εξαιτίας των σοβαρών αρνητικών συνεπειών της χρήσης των οιστρογόνων, η θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα τέθηκε σε ισχυρή αμφισβήτηση και αρκετές προσπάθειες ξεκίνησαν για την εύρεση μιας άλλης θεραπευτικής οδού. Οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη των **SERMs** (εξειδικευμένων ενεργοποιητών των οιστρογονικών υποδοχέων) οι οποίοι εμφανίζουν τις θετικές δράσεις των οιστρογόνων στα οστά και σημαντικά μειωμένες τις αρνητικές συνέπειές τους στο μαστό και τη μήτρα (μείωση της εμφάνισης ορμονοεξαρτώμενων μορφών καρκίνου).

Η ομάδα των SERMs περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό μορίων, που χαρακτηρίζονται από ανομοιογένεια στην προέλευση, στην χημική δομή και στην δράση. Η ραλοξιφαίνη ήταν ο πρώτος SERM ο οποίος εγκρίθηκε και χρησιμοποιείται τόσο για την πρόληψη, όσο και για την θεραπεία της οστεοπόρωσης, σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Λειτουργώντας ως αγωνιστής οιστρογόνων στα οστά και στο μεταβολισμό των λιπών, επάγει την διατήρηση της οστικής πυκνότητας και αποτρέπει τη δημιουργία καταγμάτων. Σε αντίθεση με άλλους SERMs (π.χ. ταμοξιφαίνη) δεν επιδρά αγωνιστικά στο ενδομήτριο και το μαστό. Η ραλοξιφαίνη είναι σήμερα φάρμακο επιλογής για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Παρόλα αυτά, η συμβολή της στη διατήρηση της οστικής μάζας και του λιπιδαιμικού προφίλ είναι σχετικά πτωχή και σε κάθε περίπτωση μικρότερη αυτής που παρατηρείται με θεραπείες ορμονικής υποκατάστασης. Όμως πρέπει να τονιστεί ότι η ανάπτυξη SERMs με δράση ανταγωνιστή των οιστρογόνων στο μαστό και τη μήτρα και με δράση αγωνιστή των οιστρογόνων στα οστά σχεδιάστηκε πρωτίστως για μακροχρόνια χορήγηση προληπτικά σε άτομα υψηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού και δεν συμβάλλει σημαντικά στην αντιμετώπιση των διαφόρων συνδρόμων της εμμηνόπαυσης σε άτομα φυσιολογικού κινδύνου.

Η θεραπευτική αντιμετώπιση που ακολουθείται αυτή τη στιγμή κατά της οστεοπόρωσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, περιλαμβάνει εκτός από συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D, τη χορήγηση διφωσφονικών ενώσεων (π.χ. αλεδρονάτης, ζολεδρονικού οξέος) που αναστέλλουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα του οστίτη ιστού, αναβολικούς παράγοντες (τεριπαρατίδη – συνδετικό τμήμα της ενδογενούς παραθορμόνης), το ρανελικό στρόντιο, τα στεροειδή αναβολικά (νανδρολόνη), την καλσιτονίνη (κυρίως ως αναλγητικό για τον πόνο των οστεοπορωτικών καταγμάτων) και τους εκλεκτικούς ρυθμιστές των υποδοχέων των οιστρογόνων (SERMs).

Καθώς όμως τα νοσήματα του μεταβολισμού των οστών πλήττουν όλο και περισσότερες πληθυσμιακές ομάδες, καθίσταται απαραίτητη η ανακάλυψη πιο αποτελεσματικών μορίων με λιγότερες παρενέργειες. Στα πλαίσια των ερευνών για την ανεύρεση νέων, βελτιωμένων και κυρίως πιο ασφαλών μορίων για την αντιμετώπιση ορμονοεξαρτώμενων παθήσεων και ειδικότερα της οστεοπόρωσης, άρχισε να κερδίζει έδαφος η αναζήτηση

SERMs φυτικής προέλευσης μεταξύ των φυσικών προϊόντων που είναι γνωστά ως **φυτο-οιστρογόνα**. Πρόκειται για φυσικά μόρια, προερχόμενα από φυτικούς οργανισμούς τα οποία εισέρχονται στο σώμα κυρίως με την τροφή και που διαθέτουν οιστρογονική και αντιοξειδωτική δράση. Ο όρος φυτο-οιστρογόνα χρησιμοποιείται για να περιγράψει, φυσικά μόρια (μη στεροειδή), μεταβολίτες τους, ημισυνθετικά παράγωγα και συνθετικά ανάλογα, τα οποία εμφανίζουν δομικές και κυρίως λειτουργικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Οι σπουδαιότερες χημικές ομάδες που διαθέτουν οιστρογονικότητα είναι οι εξής α) φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβόνες, φλαβόνες, φλαβανόνες και χαλκόνες) β) κουμεστάνια (κουμεστρόλη) γ) λιγνάνια (εντερολακτόνη, εντεροδιόλη) δ) ρεσοκυκλικά οξέα λακτονών και ε) παράγωγα φαινολοξέων.

ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Ως φυσικά προϊόντα ορίζονται όλες εκείνες οι οργανικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται από φυσικές πηγές. Ο όρος «φυσικά προϊόντα» έχει σχεδόν ταυτιστεί με τον όρο «δευτερογενείς μεταβολίτες» που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόρια μικρού μοριακού βάρους τα οποία λειτουργικά δεν εμπλέκονται άμεσα με τον πρωτογενή μεταβολισμό και αντίθετα με τους πρωτογενείς μεταβολίτες (πεπτίδια, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες) δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις βασικές λειτουργίες του οργανισμού. Παρά το γεγονός ότι δεν αποτελούν χημικές ενώσεις απαραίτητες για την εξασφάλιση ή τη συντήρηση της ζωής, εμπλέκονται στην αναπαραγωγική διαδικασία και στην άμυνα του οργανισμού. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προερχόμενοι κυρίως από φυτικούς, θαλάσσιους ή μικροβιακούς οργανισμούς είναι πολύ συχνά υποψήφια μόρια για την ανάπτυξη φαρμάκων ενώ αποτελούν σε πολλές περιπτώσεις έμπνευση για την παραγωγή συνθετικών βιοδραστικών μορίων. Το συγκριτικό αυτό πλεονέκτημα των φυσικών προϊόντων έναντι των συνθετικών οφείλεται στη δομική πρωτοτυπία και πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν. Αδιαμφισβήτητα διαθέτουν εξαιρετική δομική ποικιλομορφία και ποικιλία η οποία είναι αδύνατον να παραλληλισθεί με τα συνθετικά προϊόντα ή να επιτευχθεί σε ένα συνθετικό εργαστήριο.

Πολλά από τα αυτά τα φυσικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την ρύθμιση του κύκλου της έμμηνου ρύσης αλλά και στην πρόληψη και αντιμετώπιση διαταραχών και δυσλειτουργιών του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου. Την τελευταία δεκαετία ιδιαίτερα, καταβάλλονται προσπάθειες για τον εντοπισμό φυτών και δευτερογενών μεταβολιτών με φυτοοιστρογονική δράση. Παρότι έχουν προκύψει σημαντικές πληροφορίες για τις φυτοοιστρογόνες ιδιότητες αρκετών φυσικών προϊόντων, τα οποία ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες (απλά φαινολικά παράγωγα, βενζοφουράνια, τερπένια, φαινυλαιθανοϊδιοί γλυκοσίδες κ.ά.), η διερεύνηση της επίδρασής τους στην αντιμετώπιση των συνεπειών της εμμηνόπαυσης δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση τόσο για την επιλογή φυτών με αντίστοιχο χημικό περιεχόμενο, και κατά συνέπεια τη στοχευμένη παραλαβή και απομόνωση ουσιών, όσο και για τη συνθετική παρασκευή αναλόγων τους με βελτιωμένες ιδιότητες.

Στοιχεία ερευνητικών εργασιών στις οποίες περιλαμβάνονται πληροφορίες της λαϊκής θεραπευτικής αλλά και σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα:

Τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτο-οιστρογόνα είναι τα φασόλια σόγιας, τα διάφορα προϊόντα σόγιας, τα όσπρια, οι ξηροί καρποί, φρούτα, λαχανικά. Τα λιγνάνια αποτελούν κύρια πηγή φυτο-οιστρογόνων στους ξηρούς καρπούς, και τα έλαια όπως ο λιναρόσπορος, ενώ βρίσκονται και στα όσπρια, στα φρούτα και διάφορα λαχανικά.

Οι Κινέζοι και γενικότερα οι λαοί της Ασίας, έχουν μεγάλη παράδοση στη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (δρυγών) για τη θεραπεία διαφόρων γυναικολογικών διαταραχών και της οστεοπόρωσης. Για παράδειγμα το ρίζωμα 'Drynariae' είναι ένα παραδοσιακό κορεάτικο φάρμακο, το οποίο απαντάται ως ένα από τα κύρια συστατικά σε διάφορες συνταγές αντιμετώπισης οστικών βλαβών. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το υδατικό εκχύλισμα του φυτού αυτού ενισχύει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Επίσης, η φυτοχημική ανάλυση έδειξε ότι η δρόγη αυτή είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα, τα οποία διαθέτουν σημαντική οιστρογονική δράση.

Υπάρχουν πολλές αναφορές για δρόγες οι οποίες είναι γνωστές για τις οιστρογονικές ιδιότητές τους όσο και σε φυτά τα οποία, αν και δεν είναι γνωστά για ανάλογες δράσεις, φέρουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των κλασικών φυτο-οιστρογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το είδος *Astragalus membranaceus*, το οποίο περιέχει ισοφλαβονοειδή και το οποίο ανέστειλε την - προκαλούμενη από ωοθηκεκτομή - ελάττωση της οστικής μάζας σε αρουραίους.

Αναφορικά με τις ορμονοεξαρτώμενες παθήσεις, ένας μεγάλος αριθμός φυτών και φυσικών προϊόντων έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των δυσλειτουργιών του ορμονικού συστήματος, ενώ αρκετά είναι και τα σκευάσματα τα οποία κυκλοφορούν στην αγορά για το σκοπό αυτό και περιέχουν φυτο-οιστρογόνα. Μεγάλες ποσότητες φυτο-οιστρογόνων εντοπίζονται στη σόγια (*Glycine max* της οικογένειας Leguminosae) η οποία χρησιμοποιείται ως τροφή, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και για φαρμακευτικούς σκοπούς και συγκεκριμένα για παθήσεις του αναπαραγωγικού συστήματος. Εκχυλίσματα σόγιας ή οι λεγόμενες "ισοφλαβόνες της σόγιας" αποτελούν από τα πλέον συνήθη συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων διατροφής για την αντιμετώπιση του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου και τα προϊόντα αυτά καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της ασιατικής αγοράς.

Το τριφύλλι (*Trifolium pretense* της οικογένειας Leguminosae) είναι πλούσιο σε ισοφλαβόνες (βιοχανίνη Α, φορμονονετίνη) και πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εκτίμηση των οιστρογονικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων του. Το φυτό *Cimicifuga racemosa* γνωστό ως Black cohosh της οικογένειας Ranunculaceae είναι ευρέως γνωστό για την επίδρασή του στο ενδοκρινικό σύστημα. Σήμερα στην Ευρώπη κυκλοφορούν πολλά σκευάσματα εκχυλίσματος που χρησιμοποιούνται κυρίως στην αντιμετώπιση του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου. Διακρίνεται για την ύπαρξη φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και υδροξυκινναμωμικών εστέρων, στα οποία πιθανά οφείλεται η φυτοοιστρογονική του δράση.

Το λινάρι (*Linum usitatissimum* της οικογένειας Linaceae), διακρίνεται για την μεγάλη περιεκτικότητά του σε λιγνάνια. Έχει απασχολήσει έντονα τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα αφού οι σπόροι του λιναριού χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην βόρεια και κεντρική Ευρώπη για την παρασκευή αρτοσκευασμάτων και πολλές μελέτες

έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση του βιολογικού του ρόλου. Η γλυκύρριζα (*Glycyrrhiza glabra* της οικογένειας Leguminosae), καταναλώνεται εδώ και χιλιάδες χρόνια, κυρίως στην Ασία και στη βόρεια Ευρώπη, στη μαγειρική και τη ζαχαροπλαστική ενώ έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη θεραπευτική. Παρουσιάζει οιστρογονική δράση, πιθανά λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού χαλκονών. Τέλος, ο λυκίσκος, (*Humulus lupulus* της οικογένεια Cannabaceae), χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για την παρασκευή της μπύρας. Περιέχει ισοφλαβόνες (φορμονονετίνη, γενιστεΐνη, βιοχανίνη Α) ενώ πρόσφατα απομονώθηκαν από την μπύρα και τα άνθη του λυκίσκου, τα οποία διαθέτουν ισχυρές οιστρογονικές ιδιότητες. Ήδη κυκλοφορεί στην αγορά μπύρα εμπλουτισμένη σε φυτο-οιστρογόνα.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι στην Ευρώπη εντοπίζονται σημαντικές διαφορές ως προς τα οστεοπορωτικά συμβάντα με τη μικρότερη συχνότητα να καταγράφεται στην περιοχή της Μεσογείου.

Παρότι η Ελλάδα είναι ένα από τα μεγαλύτερα κέντρα πλούσιας χλωριδικής ποικιλότητας ('hot spot') του πλανήτη, ελάχιστες είναι οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που συσχετίζουν φυτά της ελληνικής χλωρίδας με την οστεοπόρωση. Η Ελλάδα, αναλογικά με το μέγεθός της, έχει τον μεγαλύτερο αριθμό φυτικών ειδών και τα περισσότερα ενδημικά είδη στην Ευρώπη (6.000 είδη από τα οποία 950 εξαπλώνονται μόνο στην Ελλάδα). Σε μερικές οικογένειες ο αριθμός των ειδών είναι πάρα πολύ μεγάλος. Για παράδειγμα, η οικογένεια Leguminosae, η οποία περιλαμβάνει σημαντικό αριθμό δρογών με οιστρογονική δράση, έχει 540 εκπροσώπους στην ελληνική χλωρίδα. Η μεγάλη αυτή χλωριδική ποικιλότητα, με έμφαση στα εδώδιμα είδη, αναμένεται να εκφραστεί σε επίπεδο δευτερογενών μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές δράσεις.

Φρέσκα και αποξηραμένα φρούτα, όσπρια, ενδημικά άγρια αρωματικά φυτά, δημητριακά, το ελληνικό τσάϊ του βουνού (*Sideritis clandestina*) και το *Cichorium spinosum*, γνωστό ως 'Σταμναγκάθι' αποτελούν τη βάση της παραδοσιακής Κρητικής διατροφής. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, παρουσιάζει επομένως, η μελέτη της δράσης εκχυλισμάτων ποικιλίας

φυτών της Ελληνικής χλωρίδας, με σκοπό την ανακάλυψη και άλλων πηγών φυτο-οιστρογόνων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία και με βάση τη φυτοχημικό δυναμικό τους, ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν, ως προς την οιστρογονική τους δράση, αρκετά βρώσιμα φυτικά είδη της ελληνικής χλωρίδας τα οποία συγκεντρώνουν, παγκόσμιο ενδιαφέρον.

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ / ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Βάσει προηγούμενων αποτελεσμάτων, τα οποία σχετίζονται με την αξιολόγηση της οιστρογονικής δράσης εκχυλισμάτων και απομονωμένων ουσιών που προέρχονται από εδώδιμα κυρίως φυτικά είδη, αλλά και τη μελέτη με μεθόδους μοριακής προσομοίωσης φυσικών προϊόντων και συνθετικών ετεροκυκλικών ενώσεων, επιλέγονται οι πιο αξιόλογοι εκπρόσωποι φυσικής προέλευσης για περαιτέρω έρευνα. Ακολουθεί βιοκατευθυνόμενη μελέτη φυτών, με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών προϊόντων. Βιολογικές δοκιμασίες προκαταρτικού ελέγχου (screening) και ανίχνευσης βιολογικού μηχανισμού *in vitro*, οδηγούν στην εκλεκτική και εστιασμένη ανάδειξη των δραστικότερων μορίων. Τέλος, αξιολογείται η δυναμική ανάδειξης των μορίων με το μεγαλύτερο βιολογικό / φαρμακολογικό ενδιαφέρον ως πιθανών θεραπειών, στην προκειμένη περίπτωση, για την οστεοπόρωση.

Φάση 1^η

- Συλλογή και χαρτογράφηση των φυτικών εκχυλισμάτων

Φάση 2^η

- Απομόνωση δραστικών συστατικών

Φάση 3^η

- Βιολογικές δοκιμασίες προκαταρτικού ελέγχου (screening)

Φάση 4^η

- Ταυτοποίηση μορίων με πιθανή φαρμακολογική δράση στην πρόληψη ή θεραπεία της οστεοπόρωσης

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Το πρώτο βήμα στη φυτοχημική διαδικασία και στην απομόνωση φυσικών προϊόντων είναι η εκχύλιση του φυτικού οργανισμού και η παραγωγή των εκχυλισμάτων τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων και των εμπλουτισμένων κλασμάτων, τα οποία θα έχουν

παρασκευασθεί, όπως επίσης και απομόνωση και ταυτοποίηση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα και τα εμπλουτισμένα κλάσματα ελέγχονται ποιοτικά με αναλυτικές τεχνικές χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας προκειμένου να διερευνηθεί και να περιγραφεί το φυτοχημικό τους προφίλ. Με βάση το μεταβολικό προφίλ των εκχυλισμάτων ιεραρχούνται ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε μόρια-στόχους (φλαβονοειδή, ισολαβονοειδή, χαλκόνες, δεοξυβενζοΐνες, φαινυλοπροπάνια, βενζοφουράνια, λιγνάνια κ.ά.) και ακολουθεί το στάδιο της στοχευμένης απομόνωσής τους.

Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών

- ✓ Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
- ✓ Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης
- ✓ Παρασκευαστική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
- ✓ Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση

Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών

- ✓ Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV - Vis)
- ✓ Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)
- ✓ Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- ✓ Φασματοσκοπία μάζας (MS)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ / ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

- Προκαταρκτικός έλεγχος *in vitro* (screening) σε κυτταρικές σειρές (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, κύτταρα μαστού και μήτρας) για την επιλογή των φυτο-οιστρογόνων με ιστοεκλεκτική δράση (εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνων -SERMs).
- *In vitro* μελέτες σε οστεοβλάστες και διερεύνηση του μηχανισμού δράσης (μηχανισμοί απόπτωσης) με κυτταρομετρία ροής και τεχνικές ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού. Ταυτοποίηση των

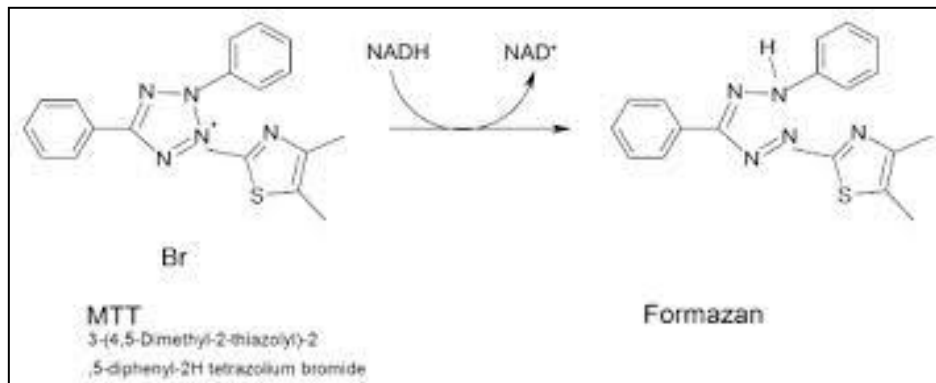
ενδοκυττάρων μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο από τα υπό δοκιμή φυτο-οιστρογόνα, σε οστεοκλάστες και οστεοβλάστες. Ανάλυση κυτταρικών συστημάτων με χρήση της μεταβολομικής - NMR (πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού).

- *In vivo* αξιολόγηση των προεπιλεγμένων φυτο-οιστρογόνων σε πειραματικά ζωικά μοντέλα οστεοπόρωσης (πειραματική πρόκληση προτύπου μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης - ωθηκεκτομημένος θηλυκός επίμυς). Μετρήσεις οστικής μάζας / Μέτρηση δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό αίματος πειραματοζώων (*OPG* – *RANKL*) πριν και μετά τη χορήγηση των φυτοοιστρογόνων).

***In vitro* προκαταρκτική μελέτη (screening):** Αποτελεί το πρώτο στάδιο για την αξιολόγηση της βιολογικής / φαρμακολογικής δράσης των εκχυλισμάτων και παρατίθεται πιο αναλυτικά.

Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού - Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας / κυτταροστατικότητας MTT

Πρόκειται για χρωματομετρική δοκιμή με την ουσία MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γρήγορη και ακριβής, δεν απαιτεί την χρήση ραδιοϊσοτόπων και μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Τα κύτταρα επωάζονται με διαφορετικές συγκεντρώσεις του παράγοντα που θέλουμε να μελετήσουμε. Μετά από τέσσερις χρόνους διπλασιασμού της κυτταρικής σειράς, τα ζωντανά κύτταρα βάφονται για 4 ώρες από το MTT.



Το άλας του τετραζολίου διασπάται από τα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων και παράγει ένα σκούρο μπλε-μωβ χρώμα που είναι οι κρύσταλλοι φορμαζανίου οι οποίοι στη συνέχεια διαλύονται με DMSO και μετράται η απορρόφηση στα 540nm. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στην καλλιέργεια και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται προσδιορισμός του ποσοστού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων και ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας των επιδράσεων.

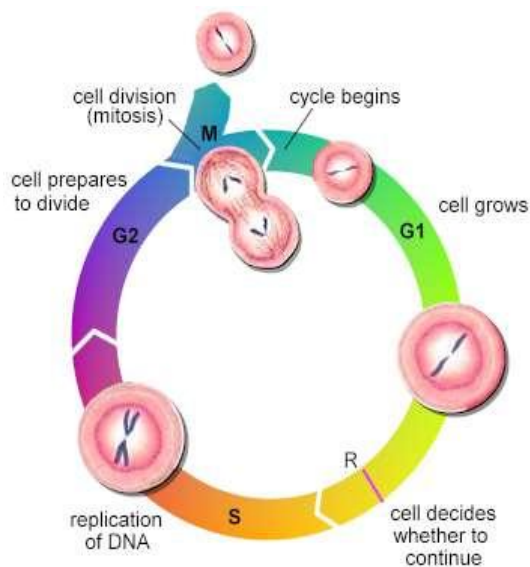
Μελέτη κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος ορίζεται ως η διαδικασία μέσω της οποίας το κύτταρο αναπαράγει το γενετικό του υλικό και είναι το διάστημα μεταξύ δύο διαιρέσεων. Υπόκειται σε αυστηρούς ελεγκτικούς μηχανισμούς η δυσλειτουργία ή έλλειψη των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ο κυτταρικός κύκλος δεν έχει την ίδια διάρκεια για όλα τα είδη κυττάρων και διαιρείται σε τέσσερις φάσεις:

- ✓ **G1**: Πρόκειται για μεταβολικά ενεργή φάση στην διάρκεια της οποίας αναπαράγονται οργανίδια και συστατικά του κυτταροπλάσματος αλλά όχι το γενετικό υλικό.
- ✓ **S**: Λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA και του κεντροσώματος
- ✓ **G2**: Η αύξηση του κυττάρου συνεχίζεται ενώ συντίθενται ένζυμα και πρωτεΐνες. Προετοιμασία για την είσοδο στην μίτωση.

- ✓ **M**: Λαμβάνει χώρα η μίτωση και η κυτταροπλασματική διαίρεση. Υποδιαιρείται σε τέσσερις φάσεις: πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση.

Επιπλέον υπάρχει και η λεγόμενη φάση ηρεμίας **G0** στην οποία μπορεί να εισέλθει το διαιρεμένο κύτταρο ανάλογα με τις συνθήκες και να μην προχωρήσει στην G1 φάση και σε νέα διαίρεση. Η μετάβαση από την G0 στην G1 φάση επηρεάζεται από εξωτερικά ερεθίσματα όπως η επάρκεια ή έλλειψη αυξητικών παραγόντων. Τα φάρμακα και τα φυτικά εκχυλίσματα εφόσον επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο, μπορούν είτε να δρουν εξειδικευμένα σε μια συγκεκριμένη φάση του κύκλου είτε να δρουν σε οποιαδήποτε φάση του κύκλου.



Ο κυτταρικός κύκλος. Διακρίνονται οι φάσεις του.

Για την μελέτη του κυτταρικού κύκλου τα κύτταρα επωάζονται με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα με χρόνο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Ακολούθως τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε αιθανόλη και βάφονται με ένα διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (PI). Στη συνέχεια αναλύεται το περιεχόμενό τους σε γενετικό υλικό (DNA) σε κυτταρομετρητή ροής.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Πειραματική Προσέγγιση – Μελέτη με Φυτο-οιστρογόνα

Μελέτη με θέμα "Ανάδειξη φυτικών εκχυλισμάτων της Ελληνικής χλωρίδας ως πιθανών θεραπειών για την οστεοπόρωση" - Κοινωφελές Ίδρυμα Ιωάννη Σ. Λάτση

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων, που προέρχονται από την ελληνική χλωρίδα και αποτελούν συστατικά της μεσογειακής διατροφής, στο μεταβολισμό των οστών. Στο πλαίσιο αυτού του προγράμματος μελετήθηκαν, ως προς την πιθανή επίδρασή τους στην οστεοπόρωση, τα φυτά: τσάι του βουνού (*Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina*) που φύεται στον Πάρνωνα και στον Ταΰγετο, τσάι του βουνού (*Sideritis clandestina* subsp. *Peloponnesiaca*) που φύεται στην Κυλλήνη και στο Χελμό και το σταμναγκάθι (*Cichorium spinosum*) που φύεται στην παραλία της Αργολίδας.

Τα φυτά συλλέχθηκαν από την ελληνική περιφέρεια και μελετήθηκαν τα φυτοχημικά χαρακτηριστικά τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των φυτών και απομόνωση των συστατικών τους. Τέλος, τα φυτικά εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε κυτταρική σειρά οστεοβλαστών, για μελέτη της βιολογικής τους δράσης.

Sideritis

Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει είδη, που φύονται στις παραμεσογείους χώρες, τις Καναρίους νήσους και την Βόρειο Ασία. Στην περιοχή της Μεσογείου, όπου φαίνεται να είναι και το κέντρο καταγωγής του φυτού, έχουν καταγραφεί πάνω από 100 διαφορετικά είδη του γένους *Sideritis*. Η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών συναντάται στην Ιβηρική Χερσόνησο, με 45 τουλάχιστον είδη τα περισσότερα των οποίων είναι ενδημικά, ενώ 14 από αυτά απειλούνται σήμερα με εξαφάνιση. Χώρες πλούσιες σε πληθυσμούς και ποικιλία ειδών είναι επίσης η Ελλάδα, η Ιταλία και χώρες των ακτών της βόρειας Αφρικής. Σε όλες σχεδόν τις Μεσογειακές χώρες είδη του γένους αυτού είναι γνωστά, σε τοπική κλίμακα, ως βότανα για διάφορες χρήσεις. Όμως χρήση για την παρασκευή τσαγιού γίνεται μόνο στην Ισπανία και κυρίως στην Ελλάδα, όπου το ρόφημα των φυτών αυτών είναι πολύ δημοφιλές και διαδεδομένο.

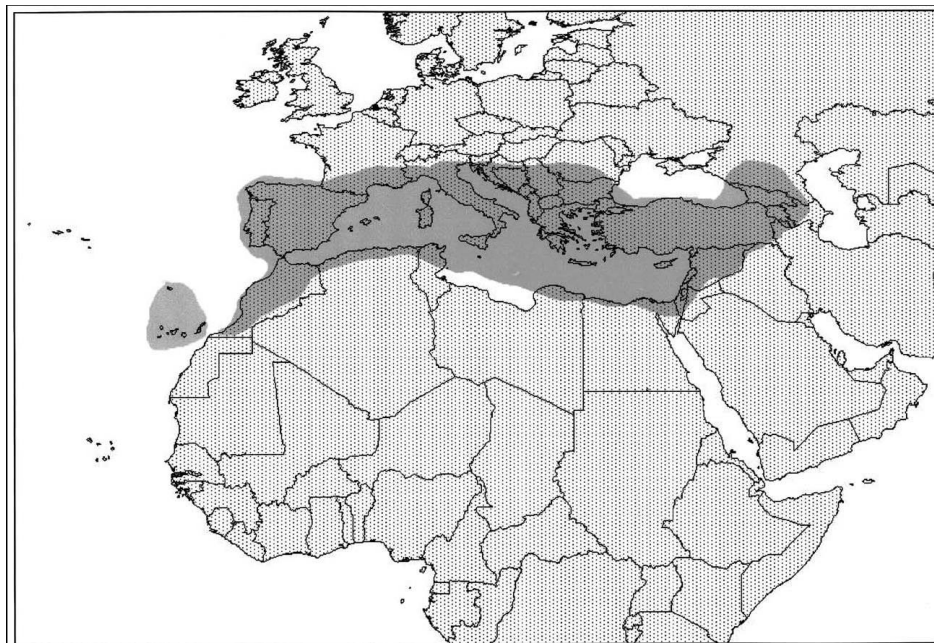
Το παρασκευαζόμενο αφέψημα με το όνομα «Τσάι του Βουνού» παρουσιάζει πολλές ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στα συστατικά του αιθέριου ελαίου του, όπως για παράδειγμα στα φλαβονοειδή. Το αφέψημα από το φυτό προτιμάται πολύ από τους Έλληνες, ειδικά τους χειμερινούς μήνες, λόγω της ευεργετικής του επίδρασης σε κρυολογήματα. Οι ευεργετικές επιδράσεις του οφείλονται στην αντιφλεγμονώδη, βακτηριοστατική και αντιοξειδωτική δράση του. Ακόμη θεωρείται διουρητικό και τονωτικό.

Στην Ελλάδα το τσάι του βουνού είναι γνωστό από την αρχαιότητα και αναφέρεται από το Θεόφραστο (372-287 π.Χ.) και τον Διοσκουρίδη (10 μ.Χ. αιώνα). Το επιστημονικό του όνομα **Sideritis** προέρχεται από τη λέξη **σίδηρος** και κατά μια εκδοχή δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με άλλη, επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος. Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης.

Μέχρι τώρα καλλιέργεια ειδών του φυτού, γίνεται μόνο στην Ελλάδα. Δυστυχώς δεν έχουν γίνει συστηματικές προσπάθειες προώθησης σε χώρες της Ευρώπης, όπου η κατανάλωση αφεψημάτων είναι αρκετά μεγάλη. Κοινό χαρακτηριστικό των ειδών αυτών αλλά και γενικά του γένους *Sideritis* L. είναι ότι πρόκειται για φυτά ιδιαίτερα προσαρμοσμένα για να επιβιώνουν σε απόκρημνες βραχώδεις περιοχές με υψόμετρο άνω των 1000 μέτρων. Τα είδη αυτά είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Συναντώνται ιδιαίτερα σε σχισμές βράχων όπου ελάχιστα είδη φυτών θα μπορούσαν να επιβιώσουν.

Κατανομή του γένους *Sideritis*

Ο *Sideritis* L. περιλαμβάνει περίπου 150 μονοετή και πολυετή είδη που διανέμονται κυρίως στη Μεσογειακή περιοχή.



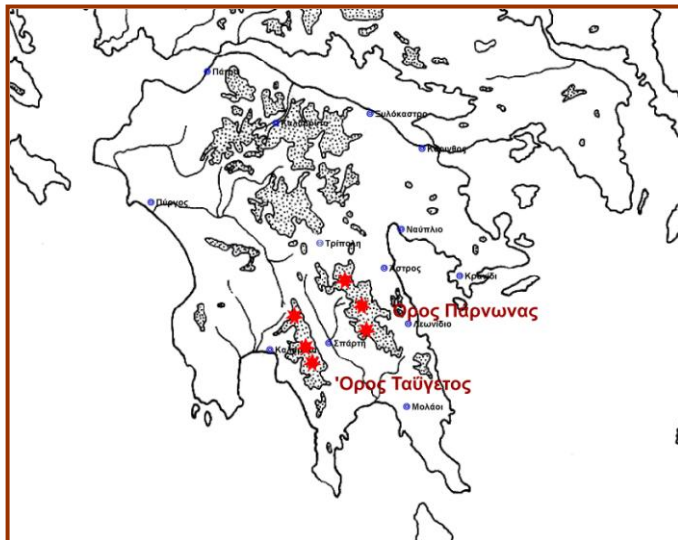
Δυο συγκεκριμένα είδη σιδερίτη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον :

- 1) *Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina*
- 2) *Sideritis clandestina* subsp. *Peloponnesiaca*

Φύονται σε ανοικτούς πετρώδεις τόπους της αλπικής και υποαλπικής ζώνης, ή σε ανοίγματα δάσους *Abies cephalonica* (Έλατο της Κεφαλλονιάς) ή *Pinus nigra* (Μαύρη Πεύκη), σε ασβεστολιθικό υπόστρωμα και σε υψόμετρο 1200 – 2300 m. (*Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina*) και 1400 – 2000 m. (*Sideritis clandestina* subsp. *Peloponnesiaca*).

***Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Οικ. Lamiaceae (Labiatae)**

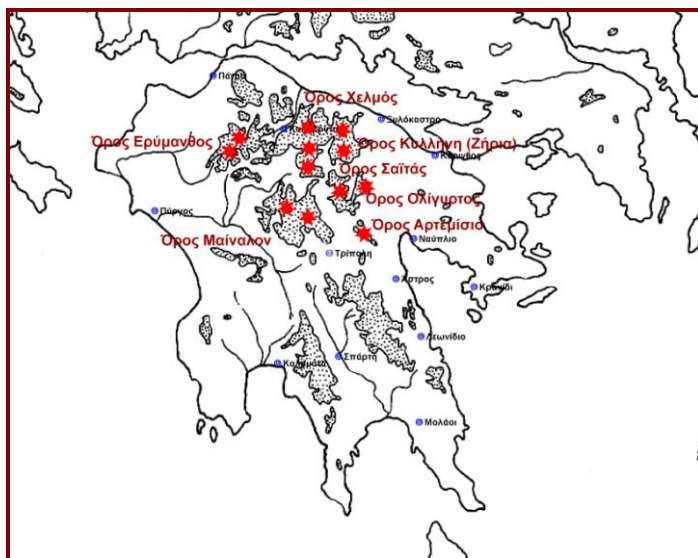
Είναι ενδημικό της νότιας Πελοποννήσου και φύεται μόνο στα όρη Πάρνωνας και Ταΰγετος. Τελευταία, ξεκίνησε συστηματική καλλιέργεια του στο όρος Πάρνωνας.



Η παγκόσμια εξάπλωση του *Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina*

Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca

Είναι ενδημικό των ορέων της βόρειας Πελοποννήσου και φύεται στα όρη Μαίναλον, Ολίγυρτος, Σαϊτάς, Κυλλήνη, Χελμός, Ερύμανθος, Αρτεμίσιο.



Η παγκόσμια εξάπλωση του *Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca*

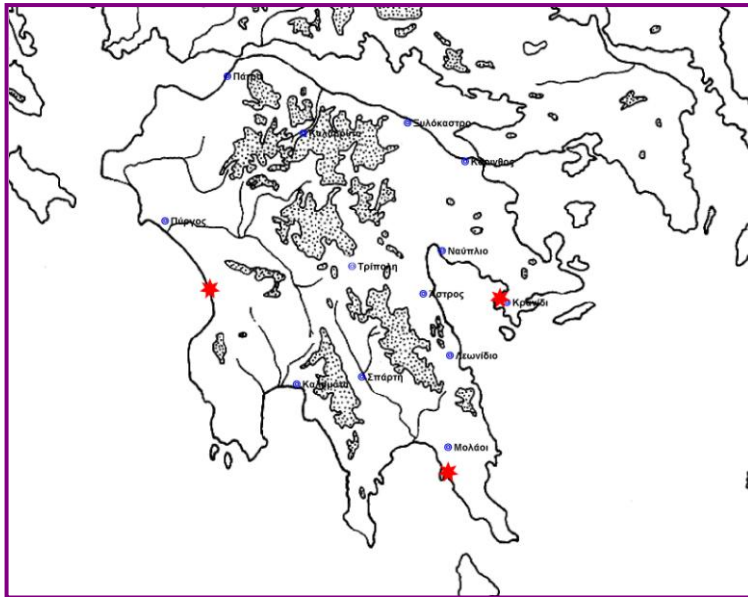
***Cichorium spinosum*. Οικ. Asteraceae (Compositae) - Σταμναγκάθι**

Στην επιστημονική του ονομασία, το σταμναγκάθι λέγεται *Cichorium Spinosum* και όσον αφορά στη λεκτική συνύπαρξη της στάμνας με το αγκάθι, λέγεται ότι ευθύνεται μια παλιά συνήθεια των Κρητικών να καλύπτουν με αυτά τα χόρτα τα στόμια των σταμνών με το νερό για να εμποδίζεται η είσοδος εντόμων.

Πρόκειται για μια πολυετή πόα η οποία αναβλαστάνει κάθε χρόνο από τη ξυλώδη βάση της, σχηματίζοντας πλήθος από ρόδακες φύλλων. Τα ανθοφόρα στελέχη, τα οποία εκπύσσονται από το κέντρο του κάθε ρόδακα φύλλων, διακλαδίζονται και κάθε τελική διακλάδωση καταλήγει σε ένα αγκάθι.

Εξαπλώνεται στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο και είναι γνωστό με το κοινό όνομα < *Σταμναγκάθι* > (η Κρητική ονομασία του). Οι άγριοι πληθυσμοί του κινδυνεύουν από την υπερσυλλογή. Φύεται σε παραθαλάσσιους τόπους, σε χαλικώδη ή βραχώδη σημεία, όχι όμως σε αλατωμένα εδάφη. Επίσης φύεται σε οροπέδια τα οποία βρίσκονται σε υψόμετρο 1000 – 1500 m. Η θερμοκρασία και η υγρασία του αέρα αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξή του. Στην Πελοπόννησο έχει βρεθεί, προς το παρόν, μόνο σε παραθαλάσσιους τόπους, κυρίως στην παραλία της Αργολίδας. Στην Κρήτη συναντάται κυρίως στο οροπέδιο του Ομαλού, αλλά και σε παραθαλάσσιες περιοχές.

Εκτεταμένες αναφορές στο σταμναγκάθι κάνει ο Διοσκουρίδης, που το χαρακτηρίζει φάρμακο για πολλές παθήσεις και συστήνει αρκετές εφαρμογές του, και κυρίως τις αντισηπτικές αλλά και τις αντιρρευματικές. Επίσης, θεωρείται χολαγωγό, διουρητικό, αντιασθματικό και υπογλυκαιμικό. Επιπρόσθετα, το σταμναγκάθι είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, ω-3 λιπαρά και πολλά θρεπτικά συστατικά, που θεωρούνται ευεργετικά για την υγεία, ενώ είναι τονωτικό χάρη στα πικρά συστατικά του λακτουκίνη και λακτουκοπικρίνη.



Η εξάπλωση του *Cichorium spinosum* στην Πελοπόννησο

ΜΕΛΕΤΗ – ΣΥΛΛΟΓΗ – ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

Στάδια επεξεργασίας φυτικού υλικού

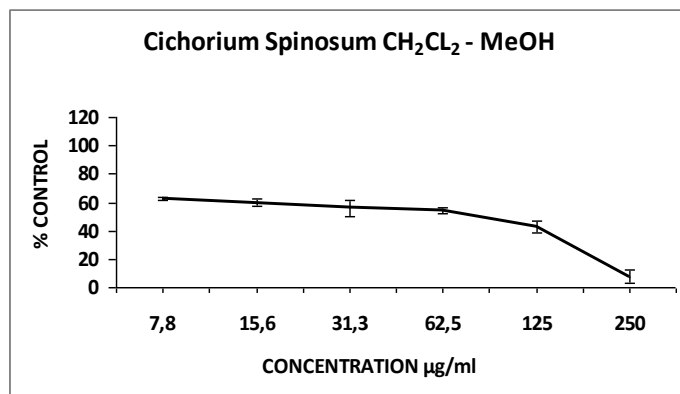
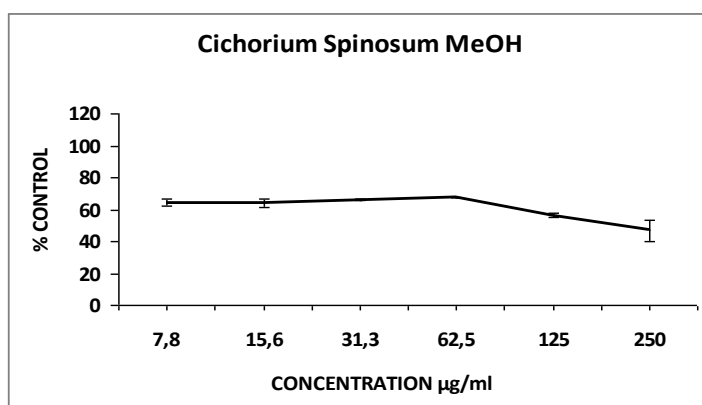
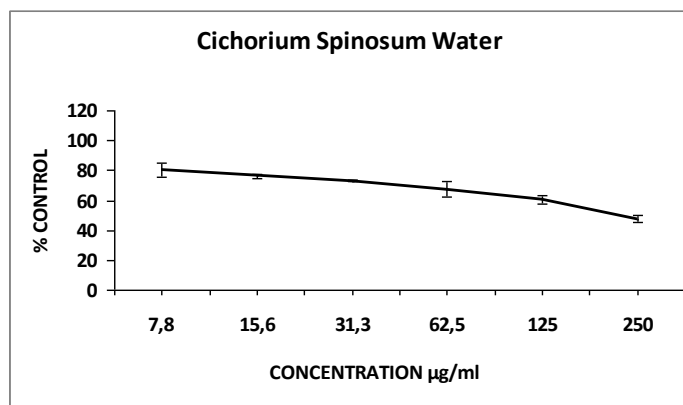
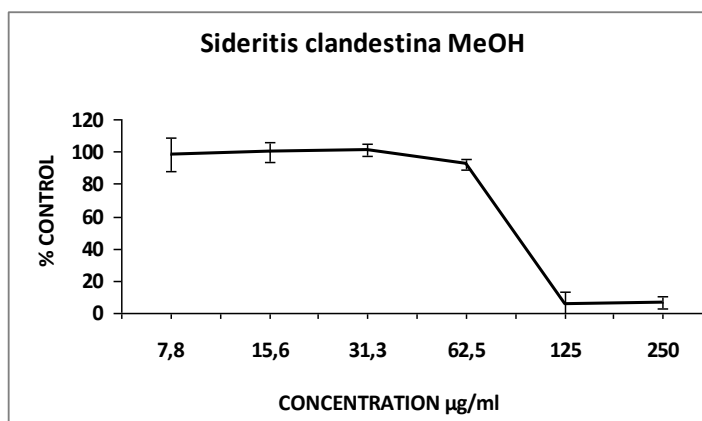
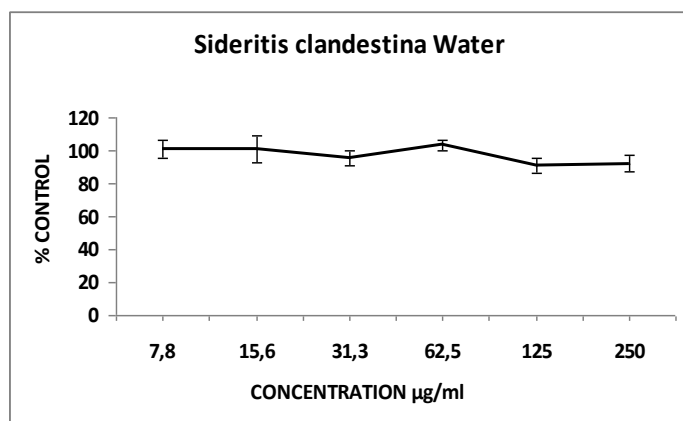
Η επεξεργασία του φυτικού υλικού - *Sideritis clandestina* και *Cichorium spinosum* - αρχικά περιλαμβάνει

- Διαδοχική εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), μεθανόλη (MeOH) και νερό (H_2O)

Από τη διαδικασία των διαδοχικών εκχυλίσεων προκύπτουν τα εξής κλάσματα με βάση τα οποία πραγματοποιείται και η βιολογική αξιολόγηση:

- *Sideritis clandestina* water (υδατικό εκχύλισμα)
- *Sideritis clandestina* MeOH (μεθανολικό εκχύλισμα)
- *Cichorium spinosum* water (υδατικό εκχύλισμα)
- *Cichorium spinosum* MeOH (μεθανολικό εκχύλισμα)
- *Cichorium spinosum* CH_2Cl_2 -MeOH (εκχύλισμα διχλωρομεθανίου-μεθανόλης)

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ



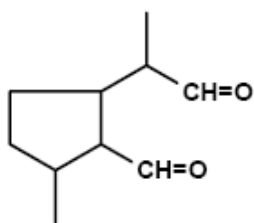
Από τις μελέτες βιολογικής αξιολόγησης σε οστεοβλάστες προκύπτει ότι το πιο υποσχόμενο από τα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina* (*Sideritis clandestina* MeOH), ενώ αξιόλογη δράση παρουσίασε και το εκχύλισμα διχλωρομεθανίου-μεθανόλης του *Cichorium spinosum* (*Cichorium spinosum* CH₂Cl₂-MeOH).

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

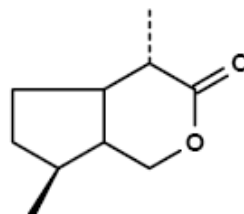
Για την απομόνωση των βιοδραστικών συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από συμβατικές (παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, υγρή χρωματογραφία μέσης και υψηλής πίεσης, υγρή χρωματογραφία στήλης) και σύγχρονες (χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση) χρωματογραφικές τεχνικές. Για την ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών εφαρμόστηκαν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές, με κυριότερες τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Οι ουσίες που τελικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες: Φλαβονοειδή, Φαινυλαιθανοϊδικοί γλυκοσίδες, Ιριδοειδικοί γλυκοσίδες, Διτερπένια τύπου καουρανίου.

ΙΡΙΔΟΕΙΔΗ

Το όνομα ιριδοειδές, προέρχεται από τα ονόματα των ουσιών ιριδομυρμηκίνη, ιριδολακτόνη και ιριδοδιάλη που προέρχονται από μερικά είδη του γένους *Iridomyrmex* (γένος μυρμηγκιών της Αυστραλίας) και αποτελούν συστατικά διαφόρων αμυντικών εκκρίσεων. Επειδή τα περισσότερα είναι πικρά είχαν ονομασθεί και *αμαροειδή*.



I



II

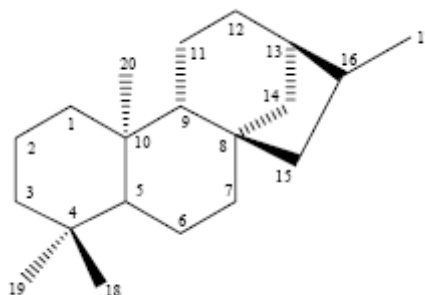
Χημικές δομές ιριδοδιάλης (I) και ιριδομυρμηκίνης (II)

Πολλοί ιριδοειδικοί γλυκοσίδες παρουσιάζουν μεγάλη φαρμακολογική αξία. Μερικές από τις σημαντικότερες δράσεις είναι: διουρητική, καθαρτική, τονωτική και κατευναστική. Συγκεκριμένα όσον αφορά στην κατευναστική δράση, οι βαλεπροτριάτες (βαλτράτη, ισοβαλτράτη, διϋδροβαλτράτη και ακετοξυ-βαλεπροτριάτη), ένα μίγμα από ιριδοειδή βαλεριανικού τύπου που έχουν απομονωθεί από τις ρίζες και τα ριζώματα του φυτού *Valeriana officinalis* οικ. *Valerianaceae*, παρουσιάζουν ήπια ηρεμιστική δράση. Τα

γαληνικά σκευάσματα του φυτού (βάμμα = tinctura, υδραλκοολικό εκχύλισμα νωπής δρόγης), που είναι πλούσια σε αυτά τα προϊόντα, χρησιμοποιούνται ως αντισπασμωδικά, ηρεμιστικά και κατευναστικά του Κ.Ν.Σ. Εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν τέτοιες ουσίες χρησιμοποιούνται ως αγχολυτικά.

ΔΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΤΥΠΟΥ ΚΑΟΥΡΑΝΙΟΥ

Τα *ent*-καουράνια ανήκουν στα τετρακυκλικά διτερπένια, έχουν μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$ και προσελκύουν το ενδιαφέρον λόγω της δομής τους και της βιολογικής τους δραστηριότητας (ως πιθανά αντιφλεγμονώδη, αντιϊικά HIV και αντιβακτηριακά). Ο δομικός σκελετός τους παρουσιάζεται παρακάτω:

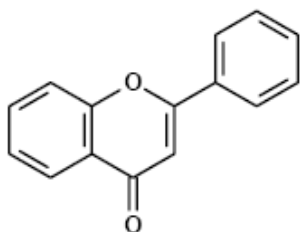


Βασικός σκελετός *ent*-καουρανίων

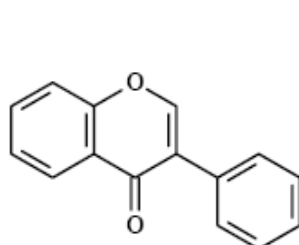
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων. Περισσότερα από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, ενώ ο αριθμός αυτός αυξάνεται σταθερά λόγω της πολύ μεγάλης δομικής ποικιλομορφίας των προϊόντων αυτών. Κάποια από αυτά είναι ισχυρώς χρωματισμένα, π.χ. ανθοκυάνες και προσδίδουν ένα ευρύ φάσμα χρωματισμού από κόκκινο σε μπλε, σε διάφορα άνθη, καρπούς και φύλλα. Το πιο συνηθισμένο χρώμα τους είναι το κίτρινο και σ' αυτό οφείλουν και το όνομά τους (flavus=κίτρινο). Η ημερήσια λήψη φλαβονοειδών από τον άνθρωπο στις Δυτικές χώρες υπολογίζεται στα 23 mg περίπου, με τα φρούτα και τα λαχανικά να αποτελούν πλούσιες πηγές.

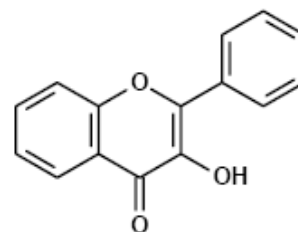
Η βενζο-γ-πυρόνη (χρωμόνη) είναι βασική πρόδρομη ουσία για τον σχηματισμό των φλαβονοειδών, ενώ οι βασικές υποκατηγορίες φαίνονται ακολούθως:



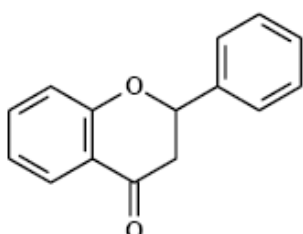
Φλαβόνη



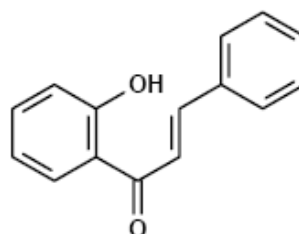
Ισοφλαβόνη



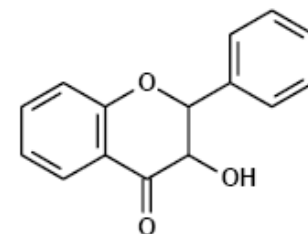
Φλαβονόλη



Φλαβανόνη



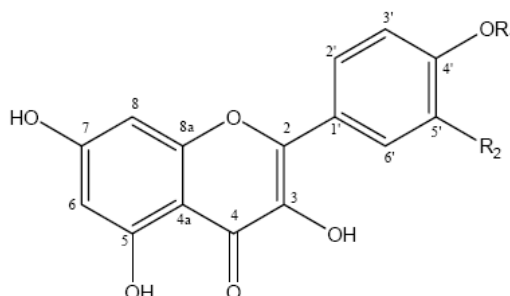
Χαλκόνη



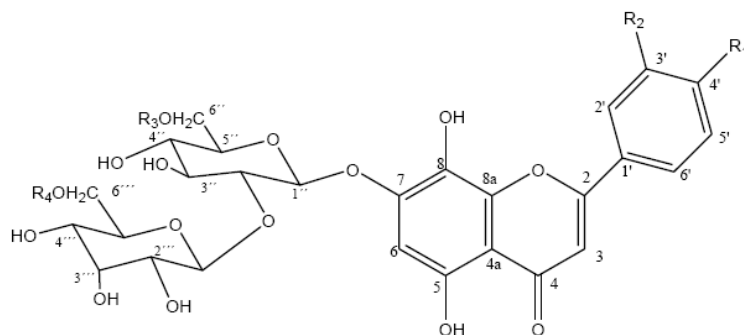
Φλαβανονόλη

Η οικογένεια Labiatae και το γένος *Sideritis* έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση φλαβονοειδών και *O*-γλυκοσιδών τους και τη μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους.

Η φαρμακολογική δράση των φλαβονοειδών υπήρξε αντικείμενο πολυάριθμων ερευνών, στραμμένων κυρίως σε δυο κατευθύνσεις, στην εξακρίβωση της δράσης τους *επί των τριχοειδών αγγείων και επί της καρδιάς* (θετική ινοτρόπος δράση).



I

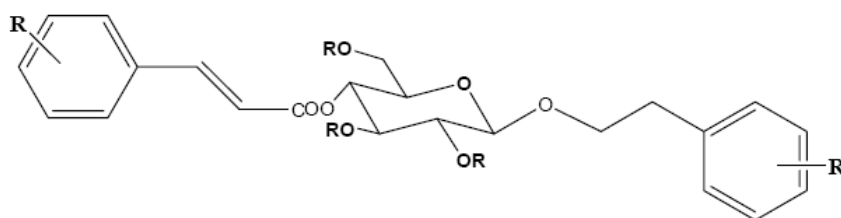


II

Αντιπροσωπευτικές χημικές δομές φλαβονοειδών του γένους *Sideritis*

ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΑΝΟΪΔΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Οι φαινυλαιθανοΐδιοί γλυκοσίδες (PhGs) είναι μία ομάδα υδατοδιαλυτών προϊόντων, ευρέως διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο, των οποίων η μελέτη έχει αρχίσει σχετικά πρόσφατα (μετά το 1960). Πειράματα που διεξήχθησαν για πολύ καιρό στους *βερμπασκοσίδες*, για τις φαρμακολογικές και βιολογικές τους ιδιότητες, έδειξαν κυρίως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιϊική και αντιηπατοξική δράση και επουλωτική δράση.



Βασικός δομικός σκελετός των φαινυλαιθανοΐδικών γλυκοσιδών

Τα *φλαβονοειδή* και οι *φαινυλαιθανοΐδιοί γλυκοσίδες* πιθανότατα ευθύνονται για τη βιολογική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Sideritis clandestina*.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η οστεοπόρωση αποτελεί μια συστηματική νόσο των οστών. Υπολογίζεται ότι η οστεοπόρωση προσβάλλει το 6-7% του πληθυσμού. Η πάθηση αυτή είναι πολύ συχνή στις ανεπτυγμένες χώρες του Δυτικού κόσμου και πλήττει ειδικότερα τις γυναίκες. Είναι επομένως

πολύ σημαντικό να ανακαλυφθούν νέες ενώσεις με φαρμακολογική δράση για την πρόληψη ή θεραπεία της οστεοπόρωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν φυσικά μόρια που έχουν απομονωθεί από φυτά, γνωστά ως φυτο-οιστρογόνα, τα οποία διαθέτουν οιστρογονική και αντιοξειδωτική δράση. Τα φυσικά προϊόντα μπορεί στο μέλλον να αποτελέσουν αποτελεσματικές θεραπείες για την οστεοπόρωση καθώς έχει ήδη αρχίσει να γνωστοποιείται ότι σημαντικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν τον οστικό σχηματισμό.

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
- Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2:154-163.
- Albertazzi P, Purdie D. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 2002;42(3):173-185.
- Becker C, Crow S, Toman J, Lipton C, McMahon DJ, Macaulay W, Siris E. Characteristics of elderly patients admitted to an urban tertiary care hospital with osteoporotic fractures: correlations with risk factors, fracture type, gender and ethnicity. *Osteoporos Int.* 2006; 17(3):410-416.
- Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- κ B pathway. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:453-472.
- Broussard DL, Magnus JH. Risk assessment and screening for low bone mineral density in a multi-ethnic population of women and men: does one approach fit all? *Osteoporos Int.* 2004; 15(5):349-360.
- Fraga BM, Hernandez MG, Diaz CE. On the ent kaurene diterpenes from *Sideritis athoa*. *Nat. Prod. Res.* 2003; 17:141-144.
- Garritano S, Pinto B, Giachi I, Pistelli L, Reali D. Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test. *Phytomedicine* 2005; 12:143-147.

- Karasik D, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP. Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham Study. *Bone* 2003; 33(3):308-316.
- Michel T, Halabalaki M, Skaltsounis AL. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med.* 2013;79(7):514-532.
- Ming LG, Chen KM, Xian CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *J Cell Physiol.* 2013; (3):513-521.
- Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med.* 2008;74:1656-1665.
- Simonet WS et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-319
- Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005; 115(12):3318-3325.
- Riggs L, Hartmann L. Selective Estrogen-Receptor Modulators - Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med* 2003; 348:618-629.
- West SL, Scheid JL, De Souza MJ. The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women. *Bone* 2009;44(1):137-144.
- Wuttke W, Jarry H, Becker T et al. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 2008;61:159-170.