

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

**Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος
Amphimas pterocarpoides σε δύο
συγκεντρώσεις στην οστική απώλεια
του ωθηκεκτομημένου επίμουσ**

ΣΚΟΠΟΣ Διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος *Amphimas pterocarpoides* (AP) στο πειραματικό πρότυπο του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμουσ. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 55 θηλυκοί επίμουσ Wistar (ηλικίας 10 μηνών). Διενεργήθηκε ωθηκεκτομή στους 44 επίμους, ενώ οι υπόλοιποι 11 υποβλήθηκαν σε εικονική επέμβαση (control group). Οι ωθηκεκτομημένοι επίμουσ διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες: την ομάδα ωθηκεκτομής (OVX group, n=13), την ομάδα ωθηκεκτομής που έλαβε το φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ALow group, n=15) και την ομάδα ωθηκεκτομής που έλαβε το φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 150 mg/kg (AHigh group, n=16). Σε όλα τα ζώα, ο προσδιορισμός της οστικής τους πυκνότητας πραγματοποιήθηκε με απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων Χ (DEXA) πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση, στους 3 και στους 6 μήνες. Μετά το πέρασμα των 6 μηνών, οι επίμουσ ευθανατώθηκαν και τα μηριαία οστά συλλέχθηκαν για τη διενέργεια μετρήσεων μηχανικής αντοχής. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Στις μετρήσεις DEXA, 3 μήνες μετά την ωθηκεκτομή, η ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης ανερχόταν στο 6,254% για την ομάδα ελέγχου, στο -21,822% για την ομάδα OVX, στο -14,512% για την ομάδα ALow και στο -8,144% για την ομάδα AHigh, με σημαντικές διαφορές μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$). Η ευεργετική επίδραση συνεχίστηκε και στους 6 μήνες, όπου οι ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας των ομάδων ήταν: Ελέγχου 8,108%, OVX -32,134%, ALow -23,985%, AHigh -8,144%, με σημαντικές διαφορές μεταξύ αρχικής μέτρησης σε όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$). Η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων αποκάλυψε ότι η μέγιστη φόρτιση (Fmax) που απαιτήθηκε για την πρόκληση κατάγματος για την ομάδα ALow ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα OVX (112,69 N έναντι 96,9 N, $p < 0,001$). Επιπρόσθετα, η τάση θραύσης (Stress) της ομάδας OVX ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με την ομάδα ALow (158,48 MPa έναντι 180,5 MPa, $p = 0,011$). Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν και για την ομάδα AHigh και στις δύο παραμέτρους, αν και οι τιμές παρέμειναν υψηλότερες από την ομάδα OVX. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι το φυτικό εκχύλισμα *Amphimas pterocarpoides* είναι ικανό να αποτρέψει την ταχεία αποδόμηση και συμβάλλει στη διατήρηση τόσο της ποσότητας όσο και της ποιότητας του οστού, καθοριστικούς παράγοντες για την αποφυγή πρόκλησης κατάγματος.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2017, 34(5):690-699
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2017, 34(5):690-699

Α. Πατσάκη,¹
J. Tchoumtchoua,^{2,3}
Χ. Πασαλή,¹
Π. Λελόβας,¹
Σ. Μητάκου,²
Ν. Παπαϊωάννου,¹
J. Mbanya,⁵
D. Njamen,⁵
Μ. Χαλαμπαλάκη,²
Σ. Κουρκουλής,⁴
Ι. Δοντά¹

¹Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

³Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Καμερούν

⁴Τμήμα Εμβιομηχανικής, Τομέας Μηχανικής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα

⁵Department of Internal Medicine and Specialties, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde I, Καμερούν

Dose-dependent effect of *Amphimas pterocarpoides* plant extract on bone loss in estrogen-deficient ovariectomized rats

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Εμβιομηχανικές ιδιότητες
Οστεοπόρωση
Οστική πυκνότητα
Φυτοοιστρογόνα
Ωθηκεκτομή

Υποβλήθηκε 14.11.2016
Εγκρίθηκε 23.11.2016

Ο όρος οστεοπόρωση προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις πορώδες οστό και ορίζει τη συστηματική σκελετική νόσο, κατά την οποία παρατηρείται μείωση της οστικής μάζας με συνεπακόλουθη διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού. Η μείωση της οστικής μάζας και η δομική εκφύλιση του οστίτη ιστού οδηγούν στην ελάττωση της μηχανικής αντοχής του οστού και στην αύξηση του κινδύνου πρόκλησης αναίτιων καταγμάτων.^{1,2} Η εμμηνόπαυση αποτελεί την πιο συχνή αιτία της οστεοπόρωσης παγκοσμίως.³ Παρά το γεγονός ότι η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (ΘΟΥ) συνιστά μια από τις πλέον διαδεδομένες φαρμακευτικές θεραπείες για την πρόληψη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τον αυξημένο κίνδυνο που διατρέχει αυτή η ομάδα των γυναικών να αναπτύξει καρκίνο του μαστού και της μήτρας, μετά τη μακροχρόνια χορήγηση τέτοιων ορμονικών σκευασμάτων.⁴⁻⁶ Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης νέων εναλλακτικών θεραπειών με αποδεδειγμένη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα.

Τα φυτοοιστρογόνα είναι μη στεροειδείς φυτικές ενώσεις που παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τη 17β-οιστραδιόλη και διαθέτουν οιστρογονική ή αντι-οιστρογονική δράση ανάλογα με τον «ιστό-στόχο» μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων, ERα και ERβ.^{7,8} Ο εκλεκτικός τρόπος δράσης τους καθώς και η ευρεία διαθεσιμότητά τους σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος τους, τα καθιστά ελκυστική εναλλακτική επιλογή για την πρόληψη της εμμηνόπαυσιακής οστεοπόρωσης.⁹

Σε παγκόσμιο επίπεδο υπάρχει μεγάλη ποικιλία φυτών, το εκχύλισμα των οποίων έχει «οιστρογονική» φαρμακευτική δράση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το φυλλοβόλο δένδρο *Amphimas pterocarpoides* (AP), της οικογένειας Leguminosa, το οποίο ευδοκιμεί στην κεντρική και στη δυτική Αφρική. Εκχυλίσματα από τον φλοιό καθώς και τους καρπούς του δένδρου χρησιμοποιούνται ευρέως σε εμπειρική βάση από τον τοπικό πληθυσμό για τη θεραπεία ορμονοεξαρτώμενων διαταραχών.¹⁰ Παρά τη διαδεδομένη όμως χρήση του AP, η βιοδραστικότητά του έχει μελετηθεί ελάχιστα και οι υπάρχουσες μελέτες αναφέρονται μόνο στην αντιοξειδωτική και στην αντιφλεγμονώδη δράση του.¹¹ Από πρόσφατη φυτοχημική ανάλυση του εκχυλίσματος, που διενεργήθηκε από μέλη της επιστημονικής μας ομάδας, ανιχνεύθηκε η παρουσία 11 ισοφλαβονών με ισχυρή οιστρογονική δράση.¹² Έως σήμερα δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη που να αναφέρεται στις αντιοστεοπορωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος πάρα την πληθώρα των ισοφλαβονών που περιέχονται σε αυτό. Για τους λόγους αυτούς, η συγκεκριμένη πειραματική μελέτη διερευνά τον ρόλο του φυτικού εκχυλίσματος AP στην πρόληψη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Για τη διεξαγωγή

της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό μοντέλο του ωθηκεκτομημένου επίμυος, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της πρόληψης και της θεραπείας της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, καθώς παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με την ανθρώπινη νόσο.^{13,14}

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Σχεδιασμός πειράματος

Μετά την έγκριση του πειραματικού πρωτοκόλλου από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχίας Αθηνών, με αριθμ. πρωτ. 262/13.1.2011, 55 ενήλικοι (10 μηνών) θηλυκοί επίμυες της φυλής Wistar, με σωματικό βάρος 300±50 g, αποκτήθηκαν από την καταχωρημένη μονάδα αναπαραγωγής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Σε όλα τα ζώα, ο προσδιορισμός της οστικής τους πυκνότητας (bone mineral density, BMD) πραγματοποιήθηκε με απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων X (dual energy X-ray absorptiometry, DEXA) πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση, στους 3 και στους 6 μήνες. Σύμφωνα με το σωματικό τους βάρος και κατανέμοντας ομοιόμορφα πειραματόζωα από τις ίδιες τοκετοομάδες, οι επίμυες διαιρέθηκαν σε τέσσερις υποομάδες. Διενεργήθηκε ωθηκεκτομή (OVX) στους 44 επίμυες, ενώ οι υπόλοιποι 11 υποβλήθηκαν σε εικονική επέμβαση (ομάδα ελέγχου). Οι ωθηκεκτομημένοι επίμυες διαιρέθηκαν σε τρεις υποομάδες: την ομάδα ωθηκεκτομής (OVX, n=13), η οποία έλαβε πόσιμο νερό *ad libitum*, την ομάδα ωθηκεκτομής, που έλαβε το φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50 mg/kg (ALow, n=15), και την ομάδα ωθηκεκτομής, η οποία έλαβε το φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 150 mg/kg (AHigh, n=16). Η χορήγηση του εκχυλίσματος άρχισε αμέσως μετά το χειρουργείο και ολοκληρώθηκε με τη λήξη του πειράματος.

Όλοι οι επίμυες μετά την ωθηκεκτομή, έως και τη λήξη του πειράματος, έλαβαν ειδική τροφή χωρίς προσθήκη σόγιας (Diete Speciali 4RF21 modified, Mucedola, Italy) για την αποφυγή λήψης επιπρόσθετου φυτοοιστρογόνου που θα οδηγούσε στην αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, οι επίμυες ζυγίζονταν σε δεκαπενθήμερη βάση και εξετάζονταν καθημερινά. Μετά το πέρας των 6 μηνών, που σηματοδοτούσε και τη λήξη του πειράματος, οι επίμυες υποβλήθηκαν σε ευθανασία με τη χορήγηση ενδομυϊκής αναισθησίας με 3 mg/kg ξυλαζίνης και 100 mg/kg κεταμίνης και αφαιμάξης από την οπίσθια κοίλη φλέβα. Τα ζωτικά όργανα και το λίπος ζυγίστηκαν άμεσα σε μικροζυγό ακριβείας (Sartorius handy microbalance H60) και διατηρήθηκαν στους -80 °C. Όλοι οι επίμυες υποβλήθηκαν σε νεκροτομική εξέταση για κακοήθεια ή άλλη παθολογία. Τα μηριαία οστά συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για τη διενέργεια των μετρήσεων μηχανικής αντοχής σε δεύτερο χρόνο.

Μετρήσεις οστικής πυκνότητας

Για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας, οι τομές της κνήμης ελήφθησαν με λειτουργικό υψηλής ανάλυσης, ειδικό για μικρά θηλαστικά. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η οστική πυκνότητα όλης

της κνήμης, περιλαμβανομένου του φλοιώδους και του σπογγώδους οστού, με την τοποθέτηση περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest, ROI) να περιλαμβάνει ολόκληρη την κνήμη. Για την εκτίμηση της BMD του σπογγώδους οστού, το ROI (διαστάσεων 2x2 mm) τοποθετήθηκε στην εγγύς μετάφυση της κνήμης, 3 mm περιφερικά της κνημιαίας αρθρικής επιφάνειας. Βαθμονόμηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε πριν από την κάθε μέτρηση της εκάστοτε ομάδας και η *in vitro* ακρίβεια (συντελεστής μεταβλητότητας) του συστήματος ήταν 0,5%.

Μέτρηση εμβιομηχανικών ιδιοτήτων

Τα ζωικά πρότυπα οστεοπενίας και οστεοπόρωσης, όπως είναι και ο επίμυς, δεν υφίστανται αυτόματα ή χαμηλής έντασης κατάγματα και αυτό δυσχεραίνει την εκτίμηση της επίδρασης της υπό μελέτη ουσίας στη μηχανική αντοχή των οστών. Το εν λόγω μειονέκτημα μπορεί να υπερκεραστεί μελετώντας τις εμβιομηχανικές ιδιότητες των οστών.¹⁵⁻¹⁷ Η εκτίμηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των μηριαίων οστών μετά τη λήξη της πειραματικής μελέτης εκτιμήθηκε *ex vivo* με τη μηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων (Three Point Bending test, 3TPB). Σκοπό της παρούσας πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε ο προσδιορισμός της αντοχής και της στιβαρότητας της διάφυσης του μηριαίου οστού, καθώς και ο υπολογισμός της τάσης θραύσης.¹⁸

Τα μηριαία οστά τοποθετήθηκαν οριζόντια σε στρογγυλεμένες αρπάγες που βρίσκονταν σε απόσταση 20 mm μεταξύ τους και στη συνέχεια εφαρμόστηκε φόρτιση στο μέσο της διάφυσης του μηριαίου οστού με ρυθμό 1 mm/min μέσω εμβόλου με στρογγυλεμένη άκρη, έως ότου επέλθει κάταγμα στο δοκίμιο. Στη συνέχεια καταγράφηκαν οι καμπύλες φόρτισης-παραμόρφωσης και η μέγιστη φόρτιση κατά τη στιγμή του κατάγματος.

Στη δεύτερη φάση της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκε η ακριβής γεωμετρία και η διατομή του οστού που αστόχησε κατά τη διαδικασία της κάμψης. Γ' αυτόν τον λόγο, επιλέχθηκε το ένα από τα δύο μέρη του κατεαγόμενου οστού και, συγκεκριμένα, το άπω άκρο προς το γόνατο. Δοκίμια που είχαν κατεαγεί μακριά από το σημείο φόρτισης κοντά στους κονδύλους του γόνατος, εγκιβωτίστηκαν σε ρητίνη από την πλευρά του ισχίου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν κάθετα με τη βοήθεια πλαστελίνης σε μικρά κυλινδρικά δοχεία, τα οποία εμβαπτίστηκαν σε ρητίνη. Το σύμπλοκο οστού/ρητίνης λειάνθηκε σε μηχανήμα λείανσης. Ακολούθησε φωτογράφιση των δοκιμίων οστού/ρητίνης στο στερεοσκόπιο και με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Image Pro Plus κατέστη δυνατός ο υπολογισμός των γεωμετρικών μεγεθών και ο υπολογισμός της ακριβούς τάσης θραύσης.

Προετοιμασία και ανάλυση εκχυλίσματος

Τον Μάρτιο του 2010 τμήματα από τον φλοιό του δένδρου AP συλλέχθηκαν από το βουνό Ελούμντεμ, στην κεντρική περιοχή του Καμερούν, κατόπιν έγκρισης και επικύρωσης του πρωτοκόλλου από τον κ. Victor Nana, βοτανολόγο στο Εθνικό Ερμπαρίο του Καμερούν (άδεια πειραματισμού 52563/HNC). Για την προετοιμα-

σία του εκχυλίσματος, διενεργήθηκε αποξήρανση τμημάτων του φλοιού υπό σκιά και κονιοποίηση του υλικού, χρησιμοποιώντας μύλο αλευριού. Στη συνέχεια, η κόνις από τον φλοιό του δένδρου AP εμπλουτίστηκε με οργανικό διαλύτη μεθανόλης, με τη χρήση της συσκευής της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE). Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των ουσιών στο εκχύλισμα και το περιεχόμενο σε ισοφλαβόνες στο μείγμα ανήλθε στο 30%. Μετά την εκχύλιση ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού μεταβαλλόμενου μήκους κύματος διάταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD) προκειμένου να διερευνηθεί το βιοχημικό προφίλ του εκχυλίσματος. Τα φασματογράμματα μετρήθηκαν στα 254, 280 και 365 nm.

Στατιστική ανάλυση

Οι μέσες τιμές (mean) και οι τυπικές αποκλίσεις (standard deviation, SD) εφαρμόστηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των τεσσάρων ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο παραμετρικός έλεγχος ανάλυσης διασποράς (ANOVA). Για τον έλεγχο του σφάλματος τύπου I, λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, σύμφωνα με την οποία το επίπεδο σημαντικότητας είναι 0,05/κ (κ= αριθμός των συγκρίσεων). Η ανάλυση διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθούν διαφορές στις μετρήσεις οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης (total tibia) και της εγγύς μετάφυσης της κνήμης (proximal tibia) μεταξύ των ομάδων, αλλά και χρονικά. Επίσης, με την ανωτέρω μέθοδο εκτιμήθηκε εάν ο βαθμός μεταβολής στον χρόνο των υπό μελέτη παραμέτρων ήταν διαφορετικός μεταξύ των δύο ομάδων. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS), έκδοση 19.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το δείγμα αποτελείτο από 55 αρουραίους, χωρισμένους σε τέσσερις ομάδες. Συγκεκριμένα, 11 (20%) αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, 13 (23,6%) την ομάδα OVX, 15 (27,3%) την ομάδα ALow και οι υπόλοιποι 16 (29,1%) την ομάδα AHigh. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται η μεταβολή της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης, ξεχωριστά για κάθε ομάδα. Στην αρχική μέτρηση δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Στους 3 μήνες, οι τιμές της ομάδας ελέγχου ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις τιμές των ομάδων OVX και ALow, ενώ με την ομάδα AHigh δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά. Επίσης, στους 3 μήνες οι ομάδες OVX, ALow και AHigh είχαν παρόμοιες τιμές οστικής πυκνότητας σε ολόκληρη την κνήμη. Στους 6 μήνες, οι τιμές της ομάδας ελέγχου

Πίνακας 1. Η μεταβολή της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης (total tibia) ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Ομάδα	Ολόκληρη η κνήμη			Μεταβολή (%) στους 3 μήνες	Μεταβολή (%) στους 6 μήνες	p** Αρχική έναντι 3 μήνες	p** Αρχική έναντι 6 μήνες	p** 3 έναντι 6 μήνες	p‡
	Αρχική μέτρηση	3 μήνες	6 μήνες						
	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)				
Ελέγχου ¹	0,213 (0,011)	0,215 (0,012)	0,217 (0,011)	1,043 (2,876)	1,684 (3,447)	0,978	0,574	1,000	<0,001
OVX ²	0,213 (0,009)	0,200 (0,006)	0,190 (0,007)	-6,016 (2,646)	-10,727 (3,720)	<0,001	<0,001	<0,001	
ALow ³	0,217 (0,010)	0,199 (0,008)	0,193 (0,007)	-8,526 (3,015)	-11,321 (2,779)	<0,001	<0,001	<0,001	
AHigh ⁴	0,215 (0,010)	0,207 (0,009)	0,202 (0,011)	-3,802 (4,042)	-6,077 (4,943)	<0,001	<0,001	0,003	
p* ¹ έναντι 2	1,000	<0,001	<0,001						
p* ¹ έναντι 3	1,000	<0,001	<0,001						
p* ¹ έναντι 4	1,000	0,095	0,001						
p* ² έναντι 3	1,000	1,000	1,000						
p* ² έναντι 4	1,000	0,258	0,006						
p* ³ έναντι 4	1,000	0,093	0,047						

*Διαφορά μεταξύ των ομάδων, **Διαφορά μεταξύ των μετρήσεων, †Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA. Διαφορές στη μεταβολή από τη μια μέτρηση στην άλλη μεταξύ των ομάδων, SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις τιμές όλων των υπολοίπων ομάδων. Επίσης, οι τιμές της ομάδας AHigh ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις τιμές των ομάδων OVX και ALow.

Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης, οι τιμές της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης στην ομάδα ελέγχου παρέμειναν σταθερές. Αντίθετα, στις υπόλοιπες ομάδες σημειώθηκε σημαντική μείωση τόσο από μέτρηση σε μέτρηση όσο και συνολικά από την αρχική μέτρηση στους 6 μήνες. Πιο αναλυτικά, η μείωση που σημειώθηκε στην ομάδα OVX στους 6 μήνες ήταν -10,727% (SD=3,720%), στην ομάδα ALow -11,321% (SD=2,779%) και στην ομάδα AHigh -6,077% (SD=4,943%).

Ο βαθμός μείωσης της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης στην ομάδα ελέγχου διέφερε σημαντικά από τον βαθμό μείωσης όλων των υπολοίπων ομάδων (p<0,001 για όλες τις συγκρίσεις). Αντίθετα, ο βαθμός μείωσης της ομάδας OVX δεν διέφερε σημαντικά από τον βαθμό μείωσης της ομάδας ALow (p=0,547). Ακόμη, ο βαθμός μείωσης στην ομάδα AHigh ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά τόσο με την ομάδα OVX (p=0,014), όσο και με την ομάδα ALow (p=0,001).

Στην αρχική μέτρηση, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Τόσο στους 3 όσο και στους 6 μήνες, οι τιμές της ομάδας ελέγχου ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις τιμές όλων των υπολοίπων ομάδων. Επίσης, και στους 3 αλλά και στους 6 μήνες οι τιμές των ομάδων AHigh και ALow ήταν σημα-

ντικά υψηλότερες συγκριτικά με εκείνες της ομάδας OVX. Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης, οι τιμές της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης στην ομάδα ελέγχου αυξήθηκαν σημαντικά από την αρχική μέτρηση στους 3 και στους 6 μήνες, ενώ από τους 3 στους 6 μήνες δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή. Επιπρόσθετα, στις υπόλοιπες ομάδες σημειώθηκε σημαντική μείωση τόσο από μέτρηση σε μέτρηση όσο και συνολικά από την αρχική μέτρηση στους 6 μήνες. Πιο αναλυτικά, η μείωση που σημειώθηκε στην ομάδα OVX στους 6 μήνες ήταν -32,134% (SD=5,905%), στην ομάδα ALow -23,985% (SD=5,191%) και στην ομάδα AHigh -8,144% (SD=5,134%). Ο βαθμός μείωσης διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων (πίν. 2). Πιο αναλυτικά, ο βαθμός μείωσης της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης της ομάδας ελέγχου διέφερε σημαντικά από τον βαθμό μείωσης όλων των υπολοίπων ομάδων (p<0,001 για όλες τις συγκρίσεις). Επίσης, ο βαθμός μείωσης της ομάδας OVX ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τον βαθμό μείωσης της ομάδας ALow (p=0,013). Ακόμη, ο βαθμός μείωσης στην ομάδα AHigh ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά τόσο με την ομάδα OVX (p<0,001) όσο και με την ομάδα ALow (p<0,001).

Κατά την εκτίμηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της δύναμης και της τάσης θραύσης μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα, μετά τη διόρθωση κατά Bonferroni, βρέθηκε ότι οι τιμές της δύναμης ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα ALow σε σύγκριση με εκείνες, τόσο της ομάδας OVX (p<0,001) όσο και της ομάδας AHigh (p=0,007). Επίσης, οι τιμές της δύναμης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην

Πίνακας 2. Η μεταβολή της οστικής πυκνότητας για την εγγύς μετάφυση της κνήμης (proximal tibia) ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Ομάδα	Εγγύς μετάφυση της κνήμης			Μεταβολή (%) στους 3 μήνες Μέση τιμή (SD)	Μεταβολή (%) στους 6 μήνες Μέση τιμή (SD)	p** Αρχική έναντι 3 μήνες	p** Αρχική έναντι 6 μήνες	p** 3 έναντι 6 μήνες	p†
	Αρχική μέτρηση Μέση τιμή (SD)	3 μήνες Μέση τιμή (SD)	6 μήνες Μέση τιμή (SD)						
Ελέγχου ¹	0,331 (0,022)	0,351 (0,018)	0,357 (0,017)	6,254 (3,392)	8,108 (3,125)	<0,001	<0,001	0,680	<0,001
OVX ²	0,330 (0,023)	0,258 (0,031)	0,224 (0,024)	-21,822 (7,035)	-32,134 (5,905)	<0,001	<0,001	<0,001	
ALow ³	0,352 (0,017)	0,301 (0,011)	0,267 (0,017)	-14,512 (3,182)	-23,985 (5,191)	<0,001	<0,001	<0,001	
AHigh ⁴	0,343 (0,021)	0,327 (0,017)	0,314 (0,018)	-4,421 (2,436)	-8,144 (5,134)	<0,001	<0,001	<0,001	
p* _{1 έναντι 2}	1,000	<0,001	<0,001						
p* _{1 έναντι 3}	0,078	<0,001	<0,001						
p* _{1 έναντι 4}	0,901	0,027	<0,001						
p* _{2 έναντι 3}	0,037	<0,001	<0,001						
p* _{2 έναντι 4}	0,570	<0,001	<0,001						
p* _{3 έναντι 4}	1,000	0,004	<0,001						

*Διαφορά μεταξύ των ομάδων, **Διαφορά μεταξύ των μετρήσεων, †Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA. Διαφορές στη μεταβολή από τη μια μέτρηση στην άλλη μεταξύ των ομάδων, SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

ομάδα OVX σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,050$). Οι τιμές της δύναμης στις ομάδες ελέγχου και ALow ήταν παρόμοιες ($p=0,147$). Επίσης, οι τιμές ήταν παρόμοιες και στις ομάδες OVX και AHigh ($p=0,318$). Τέλος, οι τιμές της τάσης θραύσης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα OVX σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τόσο της ομάδας ελέγχου ($p=0,024$) όσο και της ομάδας ALow ($p=0,011$, πίν. 3). Επιπρόσθετα, οι τιμές της τάσης θραύσης στην ομάδα AHigh ήταν παρόμοιες με αυτές της ομάδας ελέγχου ($p=1,000$) και της ομάδας ALow ($p=0,309$).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν στο σωματικό βάρος, στο βάρος της μήτρας και στο λίπος ανάμεσα στις ομάδες. Συγκεκριμένα, μετά τη διόρθωση κατά Bonferroni βρέθηκε ότι στην ομάδα ελέγχου το σωματικό βάρος ήταν σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με εκείνο των ομάδων OVX ($p=0,017$), ALow ($p=0,004$) και AHigh ($p=0,018$). Ακόμη, το μέσο βάρος μήτρας ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα ελέγχου συγκριτικά με εκείνο των ομάδων OVX ($p=0,015$), ALow ($p=0,019$) και AHigh ($p=0,032$). Επίσης, οι τιμές λίπους ήταν σημαντικά

υψηλότερες στην ομάδα ALow συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου και AHigh ($p<0,001$ και $p=0,009$, αντίστοιχα, πίν. 4).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη πειραματική μελέτη που υποδεικνύει ότι το φυτικό εκχύλισμα AP είναι ικανό να αποτρέψει την ταχεία οστική απώλεια που παρατηρείται μετά από ωθηκεκτομή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επί πλέον, το εκχύλισμα συντελεί στη διατήρηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων του οστού, καθιστώντας το πιο ανθεκτικό στα κατάγματα. Η ασφάλεια του εκχυλίσματος, όσον αφορά στη μη επιθυμητή «οιστρογονικού τύπου» δράση στη μήτρα των πειραματοζώων, εκτιμήθηκε και επιβεβαιώθηκε με τη διατήρηση του νωπού βάρους της μήτρας στα επίπεδα της ομάδας OVX μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος για διάστημα 6 μηνών.

Η ταχεία οστική απώλεια που συνοδεύει την εμμηνόπαυση αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου και επιβεβαιώθηκε και στο πείραμά μας με την εκτίμηση

Πίνακας 3. Τιμές μετρήσεων τάσης θραύσης (MPa) και δύναμης (N) κατά τη λήξη της πειραματικής διαδικασίας χωριστά για κάθε ομάδα.

	Ομάδα				p ANOVA
	Ελέγχου ^a	OVX ^b	ALow ^c	AHigh ^d	
	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	
Δύναμη (Force, N)	110,8 (12,14) ^b	96,90 (11,74) ^{a,c}	112,69 (12,41) ^{b,d}	106,24 (13,41) ^c	0,004
Τάση θραύσης (Stress, MPa)	179,68 (11,57) ^b	158,48 (13,78) ^{a,c}	180,5 (11,84) ^b	173,3 (15,18)	0,043

a, b, c, d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μετά τη διόρθωση Bonferroni, SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

Πίνακας 4. Μέτρηση σωματικού βάρους και βάρους ζωτικών οργάνων κατά τη λήξη της πειραματικής περιόδου, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

	Ομάδα				P ANOVA
	Ελέγχου ^a Μέση τιμή (SD)	OVX ^b Μέση τιμή (SD)	ALow ^c Μέση τιμή (SD)	AHigh ^d Μέση τιμή (SD)	
Σωματικό βάρος (g)	330,91 (33,33) ^{b,c,d}	377,08 (35,84) ^a	383,5 (42,27) ^a	365,44 (31,68) ^a	0,004
Βάρος εγκεφάλου	1,99 (0,08)	1,97 (0,12)	1,97 (0,08)	1,99 (0,10)	0,856
Βάρος καρδιάς	0,86 (0,12)	0,89 (0,10)	0,89 (0,10)	0,89 (0,10)	0,909
Βάρος νεφρού	0,78 (0,09)	0,79 (0,09)	0,82 (0,12)	0,79 (0,08)	0,803
Βάρος ήπατος	7,68 (1,08)	7,35 (1,64)	8,41 (0,79)	7,63 (1,21)	0,137
Βάρος μήτρας	0,42 (0,09) ^{b,c,d}	0,15 (0,03) ^a	0,22 (0,27) ^a	0,27 (0,27) ^a	0,019
Λίπος	22,94 (5,19) ^c	29,72 (7,75)	34,53 (7,10) ^{a,d}	26,16 (6,58) ^c	0,001

a, b, c, d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μετά τη διόρθωση Bonferroni, SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

της οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA.¹⁹ Οι τιμές της οστικής πυκνότητας στην ομάδα ελέγχου ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις τιμές όλων των υπόλοιπων ωθηκετομημένων ομάδων, όπως ήταν αναμενόμενο να συμβεί.¹³ Η ποσοστιαία μείωση της οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης για τους ωθηκετομημένους χωρίς παρέμβαση επίμυες ανήλθε στο -21,822% κατά το πρώτο τρίμηνο και στο -32,134% κατά το δεύτερο. Αντίθετα, η μείωση της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης εκτιμήθηκε στο -6,016% στους 3 μήνες και στο -10,727% στους 6 μήνες μετά την ωθηκετομή. Η παραδοξότητα των αποτελεσμάτων οφείλεται στη μεγάλη αναλογία φλοιώδους οστού σε ολόκληρη την κνήμη, το οποίο δεν υφίσταται τόσο δραματική απώλεια κατά την πρώιμη περίοδο μετά την ωθηκετομή. Αντίθετα, στην εγγύς μετάφυση της κνήμης κυριαρχεί το σπογγώδες οστό, το οποίο είναι ευάλωτο στις αλλαγές του οστικού μεταβολισμού και οι επιπτώσεις της ωθηκετομής επ' αυτού γίνονται εμφανείς σε διάστημα μόλις 14 ημερών.^{13,20,21}

Παρόμοιες μελέτες με από του στόματος χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων με διαφορετικά είδη φυτοοιστρογόνων έχουν αποδείξει την ευεργετική τους δράση για το χρονικό διάστημα των πρώτων 3 μηνών μετά την ωθηκετομή, διάστημα κατά το οποίο παρατηρείται η ταχεία οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό στο πλαίσιο της ένδειας των οιστρογόνων.^{9,22-26} Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε και η φάση της απώτερης βραδείας απώλειας του οστού (φάση plateau). Οι επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκετομή παρουσίασαν επιπρόσθετη μείωση της οστικής πυκνότητας στο διάστημα ανάμεσα στους 3 και στους 6 μήνες, η οποία ήταν μικρότερου μεν βαθμού αλλά σημαντική. Τα ευρήματα αυτά δικαιολογούνται από τον σχηματισμό νέου ιστού και την επίτευξη μιας νέας ισορροπίας στον μεταβολισμό του οστού.^{13,27}

Συγκριτικά με την ομάδα OVX, η χορήγηση του φυτικού

εκχυλίσματος AP απέτρεψε σε μεγάλο βαθμό τη μείωση της BMD στην εγγύς μετάφυση της κνήμης και στις δύο χορηγούμενες συγκεντρώσεις (50 mg/kg και 150 mg/kg) για το χρονικό διάστημα των 3 και των 6 μηνών. Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι το ισχυρό ευεργετικό αποτέλεσμα του εκχυλίσματος AP είναι ικανό όχι μόνο να αποτρέψει την πρώιμη απώλεια του σπογγώδους οστού, αλλά και να διατηρήσει το ευεργετικό αυτό αποτέλεσμα και για τους επόμενους 3 μήνες που αντιστοιχούν στη φάση του "plateau".

Το φλοιώδες οστό δεν υφίσταται αντίστοιχες δραματικές απώλειες στην πρώιμη μετά την ωθηκετομή περίοδο όπως το σπογγώδες οστό, αλλά παρουσιάζει καθυστερημένη απώλεια ιστού. Οι πιο πρώιμες αναφερόμενες αλλαγές στο φλοιώδες οστό στον επίμυ παρατηρούνται 3-4 μήνες μετά την ωθηκετομή, ενώ η επίτευξη σταθερής κατάστασης επέρχεται μετά την πάροδο των 6 μηνών.^{13,27,28} Η χαμηλή δόση του εκχυλίσματος απέτρεψε σχεδόν κατά 50% την απώλεια του φλοιώδους ιστού κατά την περίοδο ανάμεσα στους 3 και στους 6 μήνες, χωρίς όμως αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό. Στους 6 μήνες δε και μόνο, οι τιμές της οστικής πυκνότητας για την ομάδα AHigh ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση τόσο με την ομάδα OVX ($p=0,006$) όσο και με την ομάδα ALow ($p=0,047$). Η εν λόγω παρατήρηση αναδεικνύει την ισχυρή προστατευτική δράση της υψηλής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε βάθος χρόνου και για το φλοιώδες οστό.

Η πιθανότητα εμφάνισης κατάγματος δεν εξαρτάται μόνο από την ελάττωση της οστικής πυκνότητας, αλλά και από τη διαταραχή της δομής και της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, που για τις ανάγκες του πειράματός μας αξιολογήθηκαν με τη μέτρηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων στο πέρας των 6 μηνών.^{26,29} Η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων στα μηριαία οστά ανέδειξε ότι τόσο η μέγιστη φόρτιση που απαιτήθηκε για την πρόκληση κατάγματος,

όσο και η τάση θραύσης για την ομάδα της χαμηλής δόσης του φυτικού εκχυλίσματος ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα της ωθηκεκτομής (Fmax, ALow 112,69 N έναντι OVX 96,9 N, $p < 0,001$ /Stress, ALow 180,5 MPa έναντι OVX 158,48 MPa, $p = 0,005$).

Αντίθετα, τα σχετικά αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν και για την ομάδα AHigh. Στη δόση αυτή, τα επίπεδα της τάσης θραύσης και η μέγιστη φόρτιση που απαιτείται για την πρόκληση κατάγματος ήταν αυξημένα σε σχέση με την ομάδα OVX, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η χορήγηση ισοφλαβονών σε συγκέντρωση που υπερβαίνει τα 100 mg/kg παρουσιάζει διφορούμενα αποτελέσματα κατά την εκτίμηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων. Το εν λόγω φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στον τρόπο δράσης τους, αλλά ενδέχεται να είναι και απόρροια των διαφορετικών πειραματικών μεθόδων που ακολουθήθηκαν.³⁰⁻³³ Είναι κρίσιμο να επισημανθεί ο μικρός αριθμός των διαθέσιμων δοκιμών της ομάδας AHigh (n=6) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αρκετά από τα δοκίμια της ομάδας AHigh αποκλείστηκαν από τη στατιστική επεξεργασία εξ αιτίας ανατομικής παραλλαγής ή εσφαλμένης τοποθέτησής τους στις αρπαγές του μηχανήματος. Επομένως, κρίνεται σκόπιμη η διενέργεια νέων πειραματικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων.

Στο πλαίσιο της μελέτης, εκτιμήθηκε και το προφίλ ασφάλειας κατά τη χορήγηση του εκχυλίσματος AP. Κατά τη νεκροτομή που πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας των 6 μηνών δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα σε όργανα-στόχους, όπως ο μαστός και η μήτρα και στις δύο χορηγούμενες συγκεντρώσεις. Από τις μετρήσεις του νωπού βάρους της μήτρας στους επίμους που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, ανεξάρτητα από τη λήψη του εκχυλίσματος, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές. Η απουσία υπερτροφίας της μήτρας υποδηλώνει τη χαμηλή πιθανότητα καρκινογένεσης, γνωστής επιπλοκής της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης.^{34,35}

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι ισοφλαβόνες μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων σε όργανα-στόχους μέσω των άλφα (α) και των βήτα (β) οιστρογονικών υποδοχέων (ER). Οι ER-β είναι περισσότεροι από τους ER-α στον οστίτη ιστό, ενώ οι ER-α υπερτερούν σε όργανα-στόχους όπως ο μαστός και η μήτρα.^{36,37} Από τα δεδομένα της μελέτης μας μπορεί να διατυπωθεί η εικασία ότι το φυτικό εκχύλισμα AP έχει εκλεκτική δράση στους ER-β υποδοχείς και για τον λόγο αυτόν ασκεί την ευεργετική του επίδραση στα οστά απαλλαγμένο από σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος από τον φλοιό του δένδρου AP στην ταχεία απώλεια της οστικής πυκνότητας και στη διατήρηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των οστών πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία 11 διαφορετικών ειδών ισοφλαβονών, οι οποίες ανιχνεύτηκαν με χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης.¹² Κάποια από τα είδη ισοφλαβονών που ανιχνεύτηκαν στο φυτικό μας εκχύλισμα, όπως η δαϊζδεΐνη, η γλυκικεΐνη και η φορμονονετίνη, έχουν ήδη αποδεδειγμένη αναβολική δράση στον μεταβολισμό των οστών και αποτρέπουν την ταχεία απώλεια οστού που ακολουθεί την ωθηκεκτομή.³⁸⁻⁴² Αξίζει να σημειωθεί ακόμη ότι η υψηλή περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε αντιοξειδωτικές ουσίες έχει ήδη περιγραφεί,¹⁰ ενώ ο ρόλος του οξειδωτικού stress στην παθογένεση της οστεοπόρωσης είναι καλά τεκμηριωμένος.^{43,44}

Κατά τη λήξη της πειραματικής περιόδου, η σύγκριση των μέσων όρων του σωματικού βάρους των επίμους ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση του βάρους μεταξύ των ομάδων ελέγχου και OVX, καθώς και μεταξύ των ομάδων ελέγχου και παρέμβασης, παρ' όλο που όλες οι ομάδες έλαβαν την ίδια ποσότητα θερμίδων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της νεκροτομής παρατηρήθηκε σημαντική εναπόθεση λίπους στην κοιλιακή χώρα σε όλα τα ζώα που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αύξηση του βάρους και της κοιλιακής εναπόθεσης λίπους αποτελούν κάποιες από τις κυριότερες επιπτώσεις της εμμηνόπαυσης, οι οποίες σχετίζονται με την ενδογενή έλλειψη οιστρογόνων, κατά κύριο λόγο της οιστραδιόλης, και τη μειωμένη διέγερση των ER-α οιστρογονικών υποδοχέων.^{45,46} Η παχυσαρκία έχει «προστατευτική» δράση στα οστά, προάγοντας την οστική παραγωγή, παραμένει όμως μια ανεπιθύμητη επίπτωση της εμμηνόπαυσης καθώς συσχετίζεται με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου.^{47,48} Η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος AP δεν κατόρθωσε να αποτρέψει την αύξηση του βάρους και την εναπόθεση λίπους στους 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή, καθώς η δράση των ισοφλαβονών στη μήτρα και στον λιπώδη ιστό είναι σαφώς ασθενέστερη σε σύγκριση με τον οστίτη ιστό.³⁰

Συμπερασματικά, η από του στόματος χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος AP για χρονικό διάστημα 6 μηνών στο πειραματικό πρότυπο του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμους και στις δύο συγκεντρώσεις (50 mg/kg/150 mg/kg) κατάφερε να αποτρέψει την ταχεία αποδόμηση του οστού και έδρασε ευεργετικά ως προς τη διατήρηση της οστικής πυκνότητας και τη συνεπακόλουθη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και των εμβιομηχανικών του ιδιοτήτων. Η εν λόγω δράση του εκχυλίσματος δεν συνοδεύτηκε από την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών

στα όργανα-στόχους, όπως η μήτρα και ο μαστός. Ως εκ τούτου, το υπό μελέτη φυτικό εκχύλισμα θα μπορούσε να αποτελέσει μια ελκυστική εναλλακτική φυτική επιλογή για την πρόληψη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Πειραματικές και κλινικές μελέτες απαιτούνται για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του συγκεκριμένου φυτικού εκχυλίσματος και την αξιολόγηση του ρόλου του στην πρόληψη της εμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) και το πρόγραμμα «Υποτροφίες Αριστείας ΙΚΥ Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Ελλάδα – Πρόγραμμα Siemens» για τη διεξαγωγή της μελέτης.

Το Διεθνές Ίδρυμα Επιστημών, για τη συμβολή του στην εθνοβοτανική μελέτη και τη συλλογή της πρώτης ύλης από τον φλοιό του δένδρου *Amphimas pterocarpoides*, μέσω του δανείου F/3336-2F στον Dieudonné Njamèn.

ABSTRACT

Dose-dependent effect of *Amphimas pterocarpoides* plant extract on bone loss in estrogen-deficient ovariectomized rats

A. PATSAKI,¹ J. TCHOUMCHOUA,^{2,3} C. PASSALI,¹ P. LELOVAS,¹ S. MITAKOU,² N. PAPAIOANNOU,¹ J. MBANYA,⁵ D. NJAMEN,⁵ M. HALABALAKI,² S. KOURKOULIS,⁴ I. DONTAS¹

¹Laboratory for Research of the Musculoskeletal System, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, ²Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece, ³Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Cameroon, ⁴Unit of Biomechanics, Department of Mechanics, School of Applied Mathematical and Physical Sciences, National Technical University of Athens, Athens, Greece, ⁵Department of Internal Medicine and Specialties, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde I, Cameroon

Archives of Hellenic Medicine 2017, 34(5):690–699

OBJECTIVE To assess the phytoestrogenic potential of *Amphimas pterocarpoides* plant extract on ovariectomy induced bone loss in rats at two different dosages. **METHOD** The study used 55 female, 10 month-old Wistar rats. Ovariectomy was performed on 44 rats, while sham operation was performed on the remaining 11 rats (control group). The ovariectomized animals were separated into an untreated group (OVX, n=13) which received drinking water *ad libitum* right after the surgery and until the end of the experiment, and two treated groups, one of which received *Amphimas pterocarpoides* extract at 50 mg/kg (ALow group, n=15) and the other at 150 mg/kg (AHigh group, n=16). Measurements of bone mineral density (BMD) were made using dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) at baseline, and 3 and 6 months after ovariectomy. After 6 months treatment, the rats were euthanized, and their femurs were extracted. The femoral biomechanical properties were evaluated using the 3-point bending test (3PB). **RESULTS** The percentage changes of the mean values of the proximal tibia BMD from baseline to 3 months for the control, OVX, ALow and AHigh groups were 6.254%, -21.822%, -14.512% and -4.421% whereas, the percentage changes from baseline to 6 months were 8.108%, -32.134%, -23.985% and -8.144, respectively. The 3PB test revealed that the maximal load before fracture (Fmax) demonstrated a significantly higher value in the ALow group compared to the OVX group (112.69 N vs 96.9 N, p<0.001). In addition, the mean value for Stress in the OVX group was significantly lower than in the ALow group (158.48 MPa vs 180.5 MPa, p=0.011). The AHigh group presented higher values in Fmax and Stress than the OVX group, but there was no statistically significant difference between groups. **CONCLUSIONS** This study suggests that *Amphimas pterocarpoides* administered orally for 6 months can prevent the rapid degradation of bone after ovariectomy, and is effective in terms of improving both bone quantity (bone density) and bone quality (biomechanical parameters), which are surrogate markers of fracture risk.

Key words: Biomechanical properties, Bone mineral density, Osteoporosis, Ovariectomy, Phytoestrogens

Βιβλιογραφία

1. QUEALLY JM, KIERNAN C, SHAIKH M, ROWAN F, BENNETT D. Initiation of osteoporosis assessment in the fracture clinic results in improved osteoporosis management: A randomised controlled trial. *Osteoporos Int* 2013, 24:1089–1094
2. ADACHI JD, ADAMI S, GEHLBACH S, ANDERSON FA Jr, BOONEN S, CHAPURLAT RD ET AL. Impact of prevalent fractures on quality of life: Baseline results from the global longitudinal study of osteoporosis in women. *Mayo Clin Proc* 2010, 85:806–813
3. STUENKEL CA, DAVIS SR, GOMPEL A, LUMSDEN MA, MURAD MH, PINKERTON JV ET AL. Treatment of symptoms of the menopause: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2015, 100:3975–4011
4. LIU JY, CHEN TJ, HWANG SJ. The risk of breast cancer in women using menopausal hormone replacement therapy in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health* 2016, 13:pii:E482
5. GAMBACCIANI M, LEVANCINI M. Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny* 2014, 13:213–220
6. LUKES A. Evolving issues in the clinical and managed care settings on the management of menopause following the women's health initiative. *J Manag Care Pharm* 2008, 14(Suppl 3):7–13
7. POLUZZI E, PICCINNI C, RASCHI E, RAMPA A, RECANATINI M, DE PONTI F. Phytoestrogens in postmenopause: The state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *Curr Med Chem* 2014, 21:417–423
8. VITALE DC, PIAZZA C, MELILLI B, DRAGO F, SALOMONE S. Isoflavones: Estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2013, 38:15–25
9. FU SW, ZENG GF, ZONG SH, ZHANG ZY, ZOU B, FANG Y ET AL. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nutr Res* 2014, 34:467–477
10. BIAPA PC, AGBOR GA, OBEN JE, NGOGANG JY. Phytochemical studies and antioxidant properties of four medicinal plants used in Cameroon. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2007, 4:495–500
11. SAAH EPF, SIELINOVA VT, KUETE V, LACMATA ST, NKENGFAK AE. Antimicrobial and antioxidant isoflavonoid derivatives from the roots of *Amphimas pterocarpoides*. *J Chem Sci* 2013, 68:931–938
12. TCHOUMTCHOUA J, NJAMEN D, MBANYA JC, SKALTSOUNIS AL, HALABALAKI M. Structure-oriented UHPLC-LTQ Orbitrap-based approach as a dereplication strategy for the identification of isoflavonoids from *Amphimas pterocarpoides* crude extract. *J Mass Spectrom* 2013, 48:561–575
13. LELOVAS PP, XANTHOS TT, THOMA SE, LYRITIS GP, DONTAS IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008, 58:424–430
14. JEE WS, YAO W. Overview: Animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001, 1:193–207
15. YOSHITAKE K, YOKOTA K, KASUGAI Y, KAGAWA M, SUKAMOTO T, NAKAMURA T. Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a low-calcium diet. *Bone* 1999, 25:311–319
16. VERBRUGGEN SW, MCGARRIGLE MJ, HAUGH MG, VOISIN MC, MCNAMARA LM. Altered mechanical environment of bone cells in an animal model of short- and long-term osteoporosis. *Biophys J* 2015, 108:1587–1598
17. TURNER CH, BURR DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 1993, 14:595–608
18. SEO SH, LEE J, PARK IH. Efficacy of dual energy X-ray absorptiometry for evaluation of biomechanical properties: Bone mineral density and actual bone strength. *J Bone Metab* 2014, 21:205–212
19. BATES DW, BLACK DM, CUMMINGS SR. Clinical use of bone densitometry: Clinical applications. *JAMA* 2002, 288:1898–1900
20. WRONSKI TJ, DANN LM, HORNER SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1989, 10:295–301
21. HE CC, HUI RR, TEZUKA Y, KADOTA S, LI JX. Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes bidentata* in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol* 2010, 127:229–234
22. ZHANG R, HU SJ, LI C, ZHANG F, GAN HQ, MEI QB. *Achyranthes bidentata* root extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *J Ethnopharmacol* 2012, 139:12–18
23. SHUID AN, PING LL, MUHAMMAD N, MOHAMED N, SOELAIMAN IN. The effects of *Labisia pumila* var. *alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *J Ethnopharmacol* 2011, 133:538–542
24. DONTAS IA, LELOVAS PP, KOURKOULIS SK, ALIGIANNIS N, PALIOGIANNI A, MITAKOU S ET AL. Protective effect of *Sideritis euboica* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause* 2011, 18:915–922
25. DONTAS I, HALABALAKI M, MOUTSATSOU P, MITAKOU S, PAPOUTSI Z, KHALDIL I ET AL. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas* 2006, 53:234–242
26. ZHAO X, WU ZX, ZHANG Y, YAN YB, HE Q, CAO PC ET AL. Anti-osteoporosis activity of *Cibotium barometz* extract on ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Ethnopharmacol* 2011, 137:1083–1088
27. SEEMAN E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47(Suppl 4):iv2–iv8
28. DANIELSEN CC, MOSEKILDE L, SVENSTRUP B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 1993, 52:26–33
29. ZHANG Y, LAI WP, LEUNG PC, WU CF, WONG MS. Short- to mid-term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. *Biol Pharm Bull* 2007, 30:898–903
30. DANG ZC, LOWIK C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab* 2005, 16:207–213
31. ZHENG X, LEE SK, CHUN OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: A review with an emphasis on modulation of bone remodeling. *J Med Food* 2016, 19:1–14
32. ZHANG Y, LI XL, LAI WP, CHEN B, CHOW HK, WU CF ET AL. Anti-osteoporotic effect of *Erythrina variegata* L. in ovariectomized

- rats. *J Ethnopharmacol* 2007, 109:165–169
33. MOHD EFFENDY N, ABDULLAH S, YUNOH MF, SHUID AN. Time and dose-dependent effects of *Labisia pumila* on the bone strength of postmenopausal osteoporosis rat model. *BMC Complement Altern Med* 2015, 15:58
34. BURROWS LJ, BASHA M, GOLDSTEIN AT. The effects of hormonal contraceptives on female sexuality: A review. *J Sex Med* 2012, 9:2213–2223
35. WEIDERPASS E, ADAMI HO, BARON JA, MAGNUSSON C, BERGSTRÖM R, LINDGREN A ET AL. Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:1131–1137
36. PILŠÁKOVÁ L, RIEČANSKÝ I, JAGLA F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 2010, 59:651–664
37. WEI P, LIU M, CHEN Y, CHEN DC. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. *Asian Pac J Trop Med* 2012, 5:243–248
38. KACZMARCZYK-SEDLAK I, WOJNAR W, ZYCH M, OZIMINA-KAMIŃSKA E, TARANOWICZ J, SIWEK A. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 2013:457052
39. TYAGI AM, SRIVASTAVA K, SINGH AK, KUMAR A, CHANGKIJA B, PANDHEY R ET AL. Formononetin reverses established osteopenia in adult ovariectomized rats. *Menopause* 2012, 19:856–863
40. BECK V, ROHR U, JUNGBAUER A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, 94:499–518
41. MANSOORI MN, TYAGI AM, SHUKLA P, SRIVASTAVA K, DEV K, CHILLARA R ET AL. Methoxyisoflavones formononetin and isoformononetin inhibit the differentiation of Th17 cells and B-cell lymphopoiesis to promote osteogenesis in estrogen-deficient bone loss conditions. *Menopause* 2016, 23:565–576
42. URASOPON N, HAMADA Y, CHERDSHEWASART W, MALAIVIJITNOND S. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas* 2008, 59:137–148
43. BRYNIN R. Soy and its isoflavones: A review of their effects on bone density. *Altern Med Rev* 2002, 7:317–327
44. PIETSCHMANN P, MECHTCHERIAKOVA D, MESHCHERYAKOVA A, FÖGERSAMWALD U, ELLINGER I. Immunology of osteoporosis: A mini-review. *Gerontology* 2016, 62:128–137
45. GRAVENA AA, BRISCHILIARI SC, LOPES TC, AGNOLO CM, CARVALHO MD, PELLOSO SM. Excess weight and abdominal obesity in postmenopausal Brazilian women: A population-based study. *BMC Womens Health* 2013, 13:46
46. STEFANSKA A, BERGMANN K, SYPNIEWSKA G. Metabolic syndrome and menopause: Pathophysiology, clinical and diagnostic significance. *Adv Clin Chem* 2015, 72:1–75
47. NEUHOUSER ML, ARAGAKI AK, PRENTICE RL, MANSON JE, CHLEBOWSKI R, CARTY CL ET AL. Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk: A secondary analysis of the women's health initiative randomized clinical trials. *JAMA Oncol* 2015, 1:611–621
48. FARAHMAND M, RAMEZANI TEHRANI F, BAHRI KHOMAMI M, NOROOZ-ZADEH M, AZIZI F. Surgical menopause versus natural menopause and cardio-metabolic disturbances: A 12-year population-based cohort study. *J Endocrinol Invest* 2015, 38:761–767

Corresponding author:

A. Patsaki, 10 Doukissis Plakentias street, GR-115 23 Athens, Greece
e-mail: apatsaki@gmail.com
