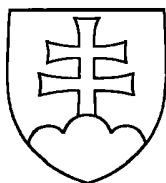


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 03.10.95
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 317 226
(32) Dátum priority: 03.10.94
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 04.02.98
(86) Číslo PCT: PCT/US95/12963, 03.10.95

(21) Číslo dokumentu:

434-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶ :

A 61K 31/35
A 01N 43/16
C 07D 313/00

(71) Prihlasovateľ: MARS, INCORPORATED, McLean, VA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Romanczyk Jr. Leo J., Hackettstown, NJ, US;
Hammerstone Jr., John F., Nazareth, PA, US;
Buck Margaret M., Morristown, NJ, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Antineoplastické výt'ažky kakaa, spôsob ich výroby a použitia**

(57) Anotácia:
Protinádorové, protirakovinové alebo protinovo-tvarové kompozície, antioxidačné kompozície alebo inhibičné kompozície DNA topoizomerázy II, ktoré obsahujú čistý kakaový extrakt alebo syntetické kakaové polyfenoly obohatené prokyanidínmi a vhodný nosič.

Antineoplastické výťažky kakaa, spôsob ich výroby a použitia

Oblasť techniky

Vynález sa týka výťažkov kakaa, napríklad polyfenolov, výhodne polyfenolov obohatených prokyanidínmi. Vynález a takisto týka spôsobu prípravy týchto extraktov a ich použitia, napríklad ako antineoplastických činidiel a antioxidantov.

Doterajší stav techniky

Polyfenoly predstavujú veľmi pestrú skupinu zlúčenín (Ferreira, D. Stenberg, J.P., Roux, D.D. a Brandt, E.V., Diversity of Structure and Function in Oligomeric Flavanoids, Tetrahedron, 48:10, 1743-1803, (1992)), ktoré sa v širokom rozsahu objavujú v rôznych rastlinách, z ktorých niektoré vstupujú do potravinového reťazca. V niektorých prípadoch reprezentujú dôležitú triedu zlúčenín pre ľudskú diétu stravu. Aj keď je možné niektoré polyfenoly považovať za nevyživné, narastá záujem o tieto zlúčeniny, vzhľadom na ich možné priaznivé účinky na zdravie. Ukázalo sa, že napríklad kvercetín (flavonoid) vykazuje protirakovinové účinky pri experimentálnych štúdiách na zvieratách (Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G. a Newmark, H.L., Quercetin and Rutin as Inhibitors of Asoxymethanol-Included Colonic Neoplasia, Carcinogenesis, 7, 1193-1196 (1991) a Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S. a Sugimura, T., Inhibition of 12-O-Tetradecynoylphorbol-13-Acetate Tumor Promotion and Omithyne Decarboxylase Activity by Quercetin: Possible Involvement of Lipoxygenase Inhibition, Carcinogenesis, 4, 1301-1305 (1983)). Ukázalo sa, že (+)-katechín a (-)-epikatechín (3-flavanoly) inhibujú reverznú transkriptázovú aktivitu vírusu leukémie (Chu, S.C., Hsieh, Y.S. a Lim, J.Y., Inhibitory Effects of Flavonoids on Maloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Activity J. of Natural Products, 55:2, 179-83 (1992)). Takisto sa zistilo že novotanin (polygomérny hydrolyzovateľný tannin) vykazuje protinádorové účinky (Okuda, T., Yoshida, T., a Hatano, T., Molecular

Structures and Pharmacological Activities of Polyphenols-Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Others - prezentované na 16. medzinárodnej konferencii skupiny Groupe Polyphenols v Lisabone (Portugalsko) 13.-16. júla 1992). Štatistické správy takisto ukazujú, že úmrtnosť na rakovinu žalúdka je podstatne nižšia v oblastiach Japonska, ktoré produkujú čaj. Epigallokatechingallát bol značený za farmakologicky účinný materiál obsiahnutý v zelenom čaji, ktorý inhibuje kožné nádory u myši (Okuda, T., Yoshida, T., a Hatano, T., Molecular Structures nad Pharmacological Acitivities of Polyphenols-Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Others - prezentovanej na 16. medzinárodnej konferencii skupiny Groupe Polyphenols v Lisabone (Portugalsko) 13.-16. júla 1992). Takisto sa ukázalo, že kyselina ellagová vykazuje protirakovinové aktivity na rôznych modeloch nádorov u zvierat (Boukharta, M., Jalbert, G. a Gastonguay, A., Efficacy of Ellagitannins and Ellagis Acid as Cancer Chemopreventive Agents - prezentovanej na 16. medzinárodnej konferencii skupiny Groupe Polyphenols v Lisabone (Portugalsko) 13.-16. júla 1992). Nedávno si spoločnosť Kikkoman Corporation nechala patentovať antimutagénne použitie proanthokyanidových polygomérov. Nedávno bola na 202. národnom stretnutí Amerických chemických vied prezentovaná oblasť fenolových zlúčenín, nachádzajúcich sa v potravinách a ich schopnosť modulovať nádorový vývoj v experimentálnych modeloch zvierat (Ho a kol., Huang a kol., (1992)).

Avšak žiadna z týchto správ sa netýka výťažkov kakaa, spôsobu prípravy týchto výťažkov ani použitia týchto výťažkov ako antineoplastických činidiel.

Pretože nefermentované kakaové bôby majú vysoký obsah polyfenolu, je možné sa domnievať, že extrakcia týchto zlúčenín z kakaa a mapovanie aktivít týchto extraktov odhalí účinky kakaových extraktov. Národný inštitút, zaoberajúci sa výskumom rakoviny, zisťoval v rámci programu týkajúceho sa selekcie prírodných produktov protirakovinové účinky rôznych druhov *Theobroma* a *Herrania*. Tieto testy zaznamenali len nízku

protirakovinovú aktivitu niektorých extraktov z kakaových pletív, takže odborníci v oblasti výskumu antineoplastických a protikarcinogénnych účinkov nedoporučovali používanie kakaa a jeho extraktov pre liečebné terapie pri liečení rakoviny. Pretože bolo vyvinutých mnoho analytických postupov, ktorých cieľom bolo určenie, akou mierou prispievajú kakaové polyfenoly k vývoju chuti (Clapperton, J., Hammerstone, J.F. Jr., Romanczyk, L.J. Jr., Chan, J., Yow, S., Lim, D. a Lockwood, R., Polyphenols and Cocoa Flavor - prezentovanej na 16. medzinárodnej konferencii skupiny Groupe Polyphenols v Lisabone (Portugalsko) 13.-16. júla 1992), rozhodli sa vynálezcovia aplikovať analogické metódy na pripravené vzorky s cieľom stanovenia ich protirakovinových účinkov, napriek už známym skutočnostiam. Prekvapivo sa zistilo, že kakaové polyfenolové výťažky, ktoré obsahujú prokyanidy, majú významnú použiteľnosť ako protirakovinové alebo antineoplastické činidlá. Okrem toho vynálezcovia demonštrujú, že kakaové extrakty, obsahujúce prokyanidy, je možné použiť ako antioxidanty.

Podstata vynálezu

Ako už bolo uvedené, cieľom vynálezu je poskytnutie spôsobu výroby kakaového výťažku.

Cieľom vynálezu je takisto poskytnutie kakaového výťažku.

Ďalším cieľom vynálezu je poskytnutie antioxidačnej kompozície.

Cieľom vynálezu je takisto demonštrácia inhibície aktivity DNA topoizomerázového II enzýmu.

Ďalším cieľom vynálezu je poskytnutie spôsobu liečenia nádoru alebo rakoviny.

Cieľom vynálezu je takisto poskytnutie protirakovinovej, protinádorovej alebo protinovotvarovej kompozície.

Cieľom vynálezu je tiež poskytnutie spôsobu výroby protirakovinovej, protinádorovej alebo protinovotvarovej kompozície.

Cieľom vynálezu je napokon poskytnutie sadu použiteľnú pri liečení nádorov alebo rakoviny.

Prekvapivo sa zistilo, že kakaový výťažok má protinádorové, protirakovinové alebo protinovotvarové účinky, alebo že predstavuje antioxidantnú kompozície, alebo že inhibuje účinky DNA topoizomerázového II enzýmu. Vynález poskytuje v podstate čistý kakaový výťažok. Tento výťažok výhodne obsahuje polyfenoly, napr. polyfenoly obohatené kakaovými prokyanidmi, predovšetkým polyfenoly s aspoň jedným kakaovým prokyanidom, zvoleným zo skupiny zahrnujúcej (-)-epikatechín, prokyanid B-2, prokyanidové oligoméry 2 až 12, výhodne 2 až 5 alebo 4 až 12, prokyanidín B-5, prokyanidín A-2 a prokyanidín C-1. Vynález takisto poskytuje protinádorovú, protirakovinovú alebo protinovotvarovú kompozíciu, alebo antioxidantnú kompozíciu alebo inhibičnú kompozíciu DNA topoizomerázy II, ktorá obsahuje v podstate čistý kakaový extrakt alebo syntetické kakaové polyfenoly, napr. polyfenoly obohatené prokyanidínmi, a vhodný nosič. Tento extrakt výhodne obsahuje kakaové prokyanidíny. Kakaový výťažok je možné výhodne získať spôsobom zahrnujúcim redukovanie kakaových bôbov na prášok, zbavenie tohoto prášku tukov a extrahovanie účinných zložiek z tohoto prášku.

Okrem toho vynález poskytuje sadu na liečenie pacientov, ktorí vyžadujú liečenie pomocou protinádorového, protirakovinového alebo protinovotvarového činidla, pomocou antioxidantu alebo pomocou DNA topoizomerázového II inhibítora, pričom táto sada obsahuje kakaový výťažok alebo syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly alebo prokyanidín(y) a nosič vhodný na zmiešanie s týmto výťažkom alebo syntetickými polyfenolmi alebo prokyanidmi.

Tieto a ďalšie ciele realizácie vynálezu sa stanú zrejmejšími po preštudovaní nasledujúcej popisnej časti.

Stručný popis obrázkov

Pre názornosť je popisná časť doplnená odkazmi na sprievodné výkresy, na ktorých:

Obr. 1 znázorňuje reprezentatívny gélový permeačný chromatogram z frakcie surových kakaových prokyanidínov;

Obr. 2A znázorňuje reprezentatívny chromatogram vysokovýkonnostnej kvapalinovej chromatografie (ďalej len HPLC) s prevrátenými fázami, ktorý ukazuje separáciu (elučný profil) kakaových prokyanidínov extrahovaných z nefermentovaného kakaa;

Obr. 2B znázorňuje reprezentatívny HPLC chromatogram s normálnymi fázami, ktorý ukazuje separáciu kakaových prokyanidínov extrahovaných z nefermentovaného kakaa;

Obr. 3 znázorňuje šesť reprezentatívnych prokyanidínových štruktúr;

Obr. 4A až 4E znázorňujú reprezentatívne HPLC chromatogramy piatich frakcií použitých pri testovaní protirakovinových alebo protinovitvarových účinkov;

Obr. 5 a obr. 6A až 6D znázorňujú závislosť dávky a odpovede medzi kakaovými extraktmi a rakovinovými bunkami ACHN (obr. 5) a PC-3 (obr. 6A až 6D) (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); M&M2 F4/92, M&MA+E U12P1, M&MB+E Z192P1, M&MC+E U12P2, M&MD+E U12P2;

Obr. 7A až 7H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, A+B, A+E a A+D a PC-3 bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 0212P3, MM-1 B 0162P1, MM-1 C 0122P3, MM-1 D 0122P3, MM-1 E 0292P8, MM-1 A/B 0292P6, MM-1 A/E 0292P6, MM-1

A/D 0292/P6;

Obr. 8A až 8H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, A+B, B+E a D+E a KB Nazofaryngálnou/HeLa bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 092K3, MM-1 B 0212K5, MM-1 C 0162K3, MM-1 D 0212K5, MM-1 E 0292K5, MM-1 A/B 0292K3, MM-1 B/E 0292K4, MM-1 D/E 0292K5;

Obr. 9A až 9H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, B+D, A+E a D+E a HCT-116 bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 C 0192H5, MM-1 D 0192H5, MM-1 E 0192H5, MM-1 B&D 0262H2, MM-1 A/E 0262H3, MM-1 D&E 0262H1;

Obr. 10A až 10H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, B+D a A+E obličkovou bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 092A5, MM-1 B 092A5, MM-1 C 0192A7, MM-1 D 0192A7, M&M-1 E 0192A7, MM-1 B&D 0302A6, MM-1 C&D 0302A6, MM/1 A&E 0262A6;

Obr. 11A až 11H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, A+B, B+E a C+E A/549 pľúcnou bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 019258, MM-1 B 09265, MM-1 C 019259, MM-1 D 019258, MM-1 E 019258, MM-1 A/E 026254, MM-1 B&E 030255, MM-1 C&E N6255;

Obr. 12A až 12H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, A+C, C+D a D+E a SK-5 melanómovou bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 0212S4, MM-1 B 0212S4, MM-1 C 0212S4, MM-1 D 0212S4, MM-1 E N32S1, MM-1 B&C N32S3, MM/1 D&E N32S3;

Obr. 13A až 13H znázorňujú typickú závislosť dávka-odpoveď medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami A, B, C, D, E, B+C,

C+E a D+E a MCF-7 prsnou bunkovou líniou (frakčné prežitie vs. dávka, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A N22M4, MM-1 B N22M4, MM-1 C N22M4, MM-1 D N22M3, MM-1 E O302M2, MM-1 B&C O302M4, MM-1 C&E N22M3, MM-1 D&E N22M3;

Obr. 14 znázorňuje typický stav dávka-odpoveď prokyanidín (predovšetkým frakcia D) a bunková línia CCRF-CEM T-bunkovej leukémie (bunky/ml vs. dni rastu; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú frakciu, plné kolieska znamenajú 125 μg frakcie D, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 250 μg frakcie D, plné obrátené trojuholníky znamenajú 500 μg frakcie D);

Obr. 15A znázorňuje porovnanie testov XTT a kryštalického fialového testu na MCF-7 p168 prsných rakovinových bunkách ošetrovaných frakciou D+E (prázdne kolieska znamenajú XTT a plné kolieska znamenajú kryštalickú fialovú);

Obr. 15B znázorňuje typickú krivku dávka-odpoveď získanú z MDA MB231 prsnej bunkovej línie ošetrenej rôznymi koncentraciami surových polyfenolov získaných z kakaového genotypu UTT-1 (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú vehikulum, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 250 $\mu\text{g/ml}$, plné obrátené trojuholníky znamenajú 100 $\mu\text{g/ml}$, prázdne štvorčeky znamenajú 10 $\mu\text{g/ml}$; absorbancia 2,0 je maximálnou hodnotou doskového čítača a nemusí nevyhnutne reprezentovať bunkový počet);

Obr. 15C znázorňuje typickú krivku dávka-odpoveď získanú z bunkovej línie PC-3 buniek rakoviny predstojnice ošetrenej rôznymi koncentraciami surových polyfenolov získaných z kakaového genotypu UTT-1 (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú vehikulum, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 250 $\mu\text{g/ml}$, plné obrátené trojuholníky znamenajú 100 $\mu\text{g/ml}$, prázdne štvorčeky znamenajú 10 $\mu\text{g/ml}$);

Obr. 15D znázorňuje typickú krivku dávka-odpoveď získanú

z bunkovej línie MCF-7 p168 prsných rakovinových buniek ošetrenej rôznymi koncentraciami surových polyfenolov získaných z kakaového genotypu UTT-1 (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú vehikulum, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 250 µg/ml, plné obrátené trojuholníky znamenajú 100 µg/ml, prázdne štvorčeky znamenajú 10 µg/ml, plné štvorčeky znamenajú 1 µg/ml; absorbancia 2,0 je maximálnou hodnotou doskového čítača a nemusí nevyhnutne reprezentovať bunkový počet);

Obr. 15E znázorňuje typickú krivku dávka-odpoveď získanú z HeLa cervikálnej bunkovej línie ošetrenej rôznymi koncentraciami surových polyfenolov získaných z kakaového genotypu UTT-1 (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú vehikulum, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 250 µg/ml, plné obrátené trojuholníky znamenajú 100 µg/ml, prázdne štvorčeky znamenajú 10 µg/ml; absorbancia 2,0 je maximálnou hodnotou doskového čítača a nemusí nevyhnutne reprezentovať bunkový počet);

Obr. 15F znázorňuje cytotoxické účinky proti HeLa cervikálnej rakovinovej bunkovej línii ošetrenej rôznymi frakciami kakaového polyfenylu (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú 100 µg/ml frakcií A-E, plné kolieska znamenajú 100 µg/ml frakcií A-C, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 100 µg/ml frakcií D&E; absorbancia 2,0 je maximálnou hodnotou doskového čítača a nemusí nevyhnutne reprezentovať bunkový počet);

Obr. 15G znázorňuje cytotoxické účinky pri 100 µl/ml proti SKBE-3 pľúcnej rakovinovej bunkovej línii ošetrenej rôznymi frakciami kakaového polyfenylu (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú frakciu A-E, plné kolieska znamenajú frakciu A-C, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú frakciu D&E);

Obr. 15H znázorňuje typický vzťah dávka-odpoveď medzi

kakaovou prokyanidínovou frakciou D+E na Hela bunkách (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú 100 µg/ml, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 75 µg/ml, plné obrátené trojuholníky znamenajú 50 µg/ml, prázdne štvorčeky znamenajú 25 µg/ml, plné štvorčeky znamenajú 10 µg/ml; absorbancia 2,0 je maximálnou hodnotou doskového čítača a nemusí nevyhnutne reprezentovať bunkový počet);

Obr. 15I znázorňuje typický vzťah dávka-odpoveď medzi kakaovou prokyanidínovou frakciou D+E na SKBR-3 bunkách (absorbancia (540 nm) vs. dni; prázdne kolieska znamenajú kontrolnú vzorku, plné kolieska znamenajú 100 µg/ml, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú 75 µg/ml, plné obrátené trojuholníky znamenajú 50 µg/ml, prázdne štvorčeky znamenajú 25 µg/ml, plné štvorčeky znamenajú 10 µg/ml);

Obr. 15J znázorňuje typický vzťah dávka-odpoveď medzi kakaovou prokyanidínovou frakciou D+E na Hela bunkách získaných použitím testu klonovania mäkkého agaru (stípcový graf; počet kolónií vs. kontrolná vzorka, 1, 10, 50 a 100 µg/ml);

Obr. 15K znázorňuje rastovú inhibíciu Hela buniek pri ich ošetrovaní surovými výťažkami získanými z ôsmich rôznych kakaových genotypov (percentá kontrolnej vzorky vs. koncentrácie, µg/ml; prázdne kolieska znamenajú C-1, plné kolieska znamenajú C-2, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú C-3, plné obrátené trojuholníky znamenajú C-4, prázdne štvorčeky znamenajú C-5, plné štvorčeky znamenajú C-6, prázdne trojuholníky znamenajú C-7, plné trojuholníky znamenajú C-8; C-1=UF-12, poľnohospodárska odroda Criollo, surové výťažky UF-12 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-2=NA-33, poľnohospodárska odroda Forastero, surové výťažky NA-33 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-3=EEG-48, poľnohospodárska odroda Forastero, surové výťažky EEG-12 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-4=neznámy, poľnohospodárska odroda

Forastero, surové výťažky neznáme (západná Afrika) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-5=UF-613, poľnohospodárska odroda Trinitario, surové výťažky UF-613 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-6=ICS-100, poľnohospodárska odroda Trinitario, surové výťažky ICS-100 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-7=ICS-139, poľnohospodárska odroda Trinitario, surové výťažky ICS-139 (Brazília) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných); C-8=UIT-1, poľnohospodárska odroda Trinitario, surové výťažky UIT-1 (Malajzia) kakaových polyfenolov dekofeinovaných/deteobrominovaných);

Obr. 15L znázorňuje rastovú inhibíciu Hela buniek pri ich ošetrovaní surovými výťažkami získanými z fermentovaných kakaových bôbov (štádiá úplnej fermentácie a slnečného sušenia; percentá kontrolnej vzorky v závislosti od koncentrácie, $\mu\text{g/ml}$; prázdne kolieska znamenajú frakciu 0. deň, plné kolieska znamenajú frakciu 1. deň, prázdne obrátené trojuholníky znamenajú frakciu 2. deň, plné obrátené trojuholníky znamenajú frakciu 3. deň, prázdne štvorčeky znamenajú frakciu 4. deň, plné štvorčeky znamenajú frakciu 9. deň);

Obr. 15M znázorňuje účinok enzymaticky zoxidovaných kakaových prokyanidínov proti Hela bunkám (krivka-dávka-odpoveď pre surový kakaový polyfenol ošetrovaný polyfenoxidázou; percentá kontrolnej vzorky vs. koncentrácia, $\mu\text{g/ml}$; plné štvorčeky znamenajú surový UIT-1 (s kofeínom a teobromínom), prázdne kolieska znamenajú UIT-1 (bez kofeínu a teobromínu) a plné kolieska znamenajú surový UIT-1 (katalyzovaný polyfenoxidázou);

Obr. 15N znázorňuje reprezentatívnu polopreparatívnu HPLC separáciu s obrátenými fázami pre kombinované frakcie kakaového prokyanidínu D a E;

Obr. 15O znázorňuje reprezentatívnu polopreparatívnu HPLC separáciu s normálnou fázou surového kakaového polyfenolového

výťažku;

Obr. 16 znázorňuje typické rancimátové oxidačné krivky pre kakaový prokyanidínový výťažok a frakcie v porovnaní so syntetickými antioxidantmi BHA a BHT (zvolené jednotky vs. čas; bodkovaná čiara a krížik (+) znamená BHA a BHT; * znamená D-E; x znamená surový výťažok; prázdne štvorčeky znamenajú A-C; prázdne kosoštvorce znamenajú kontrolnú vzorku);

Obr. 17 znázorňuje typickú indikáciu agarózovým gélom inhibície topoizomerázou II katalyzovaného štiepenia reťazca kinetoplastovej DNA kakaovými prokyanidínovými frakciami (priechod 1 obsahuje 0,5 μg značkovacích (N) kinetoplastových DNA cyklov s monomérou dĺžkou; priechody 2 a 20 obsahujú kinetoplastickú DNA, ktorá bola inkubovaná topoizomerázou II v prítomnosti 4 % DSMO, ale v neprítomnosti kakaových prokyanidínov. (Kontrolné -C); priechody 3 a 4 obsahujú kinetoplastickú DNA, ktorá sa inkubovala topoizomerázou II v prítomnosti 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$ kakaovej prokyanidínovej frakcie A; priechody 5 a 6 obsahujú kinetoplastovú DNA, ktorá sa inkubovala topoizomerázou II v prítomnosti 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$ kakaovej prokyanidínovej frakcie B; priechody 7, 8, 9, 13, 14 a 15 sú replikami kinetoplastových DNA, ktorá sa inkubovala topoizomerázou II v prítomnosti 0,05, 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$ kakaovej prokyanidínovej frakcie D; Priechody 10, 11, 12, 16, 17 a 18 sú replikami kinetoplastových DNA, ktorá sa inkubovala topoizomerázou II v prítomnosti 0,05, 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$ kakaovej prokyanidínovej frakcie E; priechod 19 je replikou kinetoplastovej DNA, ktorá sa inkubovala topoizomerázou II v prítomnosti 5,0 $\mu\text{g/ml}$ kakaovej prokyanidínovej frakcie E);

Obr. 18 znázorňuje dve závislosti dávka-odpoveď kakaovej prokyanidínovej frakcie D proti DNA dostatočne a nedostatočne opravených bunkových línii (frakčné prežitie vs. $\mu\text{g/ml}$; ľavá strana xrs-6 DNA nedostatočne opravená bunková línia, MM-1 D D282X1; pravá strana BR1 dostatočne opravená DNA bunková línia, MM-1 D D282B1);

Obr. 19 znázorňuje krivky závislosti dávka-odpoveď pre MCF-7 bunky rezistentné voči adriamycínu a pre MCF-7 p168 parentálnu bunkovú líniu, ktorá bola ošetrovaná kakaovou frakciou D+E (percentá kontrolnej vzorky vs. koncentrácie, $\mu\text{g/ml}$; prázdne kolieska znamenajú MCF-7 p168; plné kolieska znamenajú MCF-7 ADR); a

Obr. 20 znázorňuje účinky dávky-odpovede na Hela bunky, ktoré boli ošetrované 12 frakciami pripravenými pomocou polopreparatívnej HPLC s normálnou fázou pri koncentráciách 100 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$ (stípcový graf, percentá kontrolné v závislosti od kontrolnej vzorky a frakcií 1 až 12).

Ako už bolo uvedené, teraz sa prekvapivo zistilo, že kakaové výťažky vykazujú protirakovinové, protinádorové alebo protinovotvarové účinky, antioxidačné účinky a inhibujú DNA topoizomerázový II enzým. Výťažky sa zvyčajne pripravujú redukciou kakaových bôbov na prášok, odtučnením tohoto prášku a extrahovaním účinnej zlúčeniny alebo zlúčenín z takto odtučneného prášku. Prášok je možné pripraviť vymrazením kakaových bôbov a dužiny, vylupovaním kakaových bôbov a dužiny, zbavením vymrazených kakaových bôbov šupiek a rozomletím zbavených bôbov. Extrakciu účinnej zlúčeniny alebo zlúčenín je možné uskutočniť ako rozpúšťadlovú extrakciu. Takto získané výťažky je možné očistiť napr. gélovou permeačnou chromatografiou alebo preparatívnu vysokovýkonnou kvapalnou chromatografiou (HPLC) alebo kombináciou týchto techník. Bez toho, aby sme sa opierali o určitú teóriu, identifikovali sa výťažky, ktoré majú účinnosť ako kakaové polyfenoly napr. prokyanidínmi. Tieto kakaové prokyanidíny majú vysokú protirakovinovú, protinádorovú alebo protinovotvarovú účinnosť, antioxidačnú účinnosť a inhibujú DNA topoizomerázový II enzým.

Protirakovinové, protinádorové alebo protinovotvarové, antioxidačné a DNA topoizomerázový II enzým inhibujúce kompozície, ktoré obsahujú kakaové polyfenoly alebo prokyanidíny

podľa vynálezu, je možné pripraviť použitím štandardných techník vo farmaceutickom priemysle dobre známých. Tieto kompozície môžu byť pacientovi v prípade potreby takéhoto podania podávané v dávkach spôsobmi v lekárstve dobre známymi, pričom pri voľbe dávok a spôsobov podania je potrebné vziať do úvahy také faktory, ako je vek, pohlavie, hmotnosť a celkový stav príslušného pacienta. Kompozície môžu byť podávané súčasne s ďalšími antineoplastickými, protirakovinovými alebo protinádorovými činidlami alebo antioxidantmi alebo DNA topoizomerázový II enzým inhibujúcimi činidlami a/alebo s činidlami, ktoré zmierňujú nežiadúce účinky antineoplastických, protirakovinových, protinádorových, antioxidačných alebo DNA topoizomerázový II enzým inhibujúcich činidiel, popr. následne po podaní týchto činidiel, pričom je opäť nutné zobrať do úvahy také faktory, ako je vek, pohlavie, hmotnosť a celkový stav príslušného pacienta a spôsob podania.

Medzi príklady kompozícií podľa vynálezu je možné zahrnúť pevné kompozície pre orálne podanie, napr. kapsulky, tablety, pilulky a pod., rovnako ako aj žuvateľné pevné kompozície, ktoré sú pre vynález veľmi vhodné, pretože pochádzajú z požívateľných zdrojov (napr. pevné kompozície s kakaovou, príp. čokoládovou príchuťou); kvapalné preparáty, napr. pre orálne, nazálne, análne a vaginálne podanie, napr. suspenzie, sirupy alebo elixíry; a prípravky pre parenterálne, subkutánne, intradermálne, intramuskulárne alebo intravenózne podanie (napr. injekovateľné podanie), predovšetkým sterilné suspenzie alebo emulzie. Avšak účinná zložka v kompozíciách môže tvoriť komplex s proteínmi, napr. vtedy, ak sa aplikuje do krvného prúdu, pričom v tomto prípade môže dôjsť k zrážaniu v dôsledku vyzrážania krvných proteínov, čo by mal odborný lekár zobrať do úvahy. V týchto kompozíciách môže byť účinný kakaový extrakt v predzmesi s vhodným nosičom, riedidlom alebo masťovým základom, napr. sterilnou vodou, fyziologickým roztokom alebo glukózou. Účinný kakaový výťažok podľa vynálezu môže byť poskytnutý v lyofilizovanej forme, napr. v izotonickom vodnom, soľnom pufrí.

Vynález takisto zahrnuje sadu poskytujúcu účinný kakaový výťažok. Táto sada môže zahrnovať samostatný zásobník obsahujúci vhodný nosič, riedidlo alebo masťový základ. Táto sada môže takisto zahrnovať ďalšie protirakovinové, protinádorové alebo protinovotvarové činidlo alebo antioxidant alebo činidlo inhibujúce DNA topoizomerázový II enzým a/alebo činidlo, ktoré zmierňuje nežiadúce účinky antineoplastických protirakovinových, protinádorových, antioxidačných alebo DNA topoizomerázový II enzým inhibujúcich činidiel pre súbežné alebo následné podanie. Toto ďalšie činidlo, alebo činidlá, môže byť poskytované v samostatnom zásobníku, alebo zásobníkoch, alebo v zmesi s účinným kakaovým výťažkom. Okrem toho môže táto sada zahrnovať inštrukcie na zmiešavanie alebo kombinovanie jednotlivých zložiek a/alebo podania.

Vynález sa teda týka syntetických kakaových polyfenolov alebo prokyanidínov alebo ich derivátov, ktoré zahrnujú napr. glykozidy, galláty, estery, atď.

Nasledujúce neobmedzujúce príklady majú prezentovať niektoré varianty realizácie vynálezu bez toho, aby obmedzovali rozsah vynálezu, ktorý je jednoznačne vymedzený priloženými patentovými nárokmi.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1: Zdroj kakaa a spôsob prípravy

Z troch hlavných svetových oblastí produkujúcich kakao sa získalo niekoľko genotypov *Theobroma cacao*, ktoré reprezentujú tri poľnohospodárske odrody kakaa (Enriquez, G.A. a Soria, J.V., Cocoa Cultivars Register IICA, Turrialba, Costa Rica (1967); Engels, J.M.M., Genetic Resources of Cacao: katalog CATIE Collection, technický buletin 7, Turrialba, Costa Rica (1981)). Zoznam genotypov použitých v tejto štúdií je uvedený v tabuľke 1. Zozbierané kakaové tobolky sa otvorili a bôby s dužinou sa separovali vymrazením. Dužina sa ručne vybrala z vymrazenej hmoty

a bôby sa podrobili potom analýze. Nefermentované, vymrazené kakaové bôby sa najprv ručne zbavili šupiek a pomocou mlyna TEKMAR namleli na jemnú práškovitú hmotu. Výsledná hmotu sa potom cez noc odtučňovala použitím Soxhletovej extrakcie, pri ktorej sa ako rozpúšťadlo použil preddestilovaný hexán. Zvyšok rozpúšťadla sa z odmastenej hmoty odstránil pomocou vákua pri izbovej teplote.

T a b u ľ k a 1

Popis materiálového zdroja *Theobroma cacao*

Genotyp	Pôvod	Zahradnícka odroda
UIT-1	Malajzia	Trinitario
Neznámy	Západná Afrika	Forastero
ICS-100	Brazília	Trinitario
ICS-39	Brazília	Trinitario
UF-613	Brazília	Trinitario
EEG-48	Brazília	Forastero
UF-12	Brazília	Criollo
NA-33	Brazília	Forastero

Príklad 2: Prokyanidínové extrakčné postupy

A. Metóda 1

Prokyanidíny sa extrahovali z odtučnených nefermentovaných vymrazených kakaových bôbov z príkladu 1 pri použití modifikácie metódy popísanej Jalalom, M.A.F a Collinom, H.A. v článku "Polyphenols of Mature Plant, Seedling and Tissue Cultures of *Theobroma cacao*" *Phytochemistry*, 6, 1377-1380 (1978). Prokyanidíny sa extrahovali z 50 g dávok odtučnenej kakaovej hmoty dvakrát 400 ml 70 % roztoku acetónu v deionizovanej vode a potom 400 ml 70 % metanolu v deionizovanej vode. Po zhromaždení sa rozpúšťadlá odparili pri teplote 45 °C pomocou rotačnej

odparky udržiavanej v parciálnom podtlaku. Výsledná vodná fáza sa doriedila do jedného litra deionizovanou vodou a extrahovala dvakrát 400 ml CHCl_3 . Rozpúšťadlová fáza sa zlikvidovala. Vodná fáza sa potom extrahovala štyrikrát 500 ml acetátu. Výsledné emulzie sa odstreďovali na odstredivke Sorvall RC 28S, pracujúcej pri 2 000 xg za 30 minút pri 10 °C. K zlúčeným etylacetátovým extraktom sa pridalo 100 až 200 ml deionizovanej vody. Rozpúšťadlo sa opäť odparilo pri 45 °C pomocou rotačnej odparky udržiavanej pod parciálnym podtlakom. Výsledná vodná fáza sa vymrazila v kvapalnom dusíku a potom na vymrazovacom systéme LABCONCO. Výťažky surových prokyanidínov, ktoré boli získané z rôznych kakaových genotypov sú zhrnuté v tabuľke 2.

T a b u ľ k a 2

Výťažky surových prokyanidínov

Genotyp	Pôvod	Výťažky (g)
UIT-1	Malajzia	3,81
Neznámy	Západná Afrika	2,55
ICS-100	Brazília	3,42
ICS-39	Brazília	3,45
UF-613	Brazília	2,98
EEG-48	Brazília	3,15
UF-12	Brazília	1,21
NA-33	Brazília	2,23

B. Metóda 2

Alternatívne je možné prokyanidíny extrahovať z odtučnených nefermentovaných vymrazených kakaových bôbov z príkladu 1 70 % vodným roztokom acetónu. 10 g odtučneného materiálu sa 5 až 10 min suspenzovalo v 100 ml rozpúšťadla. Táto suspenzia sa odstreďovala 15 min pri 4 °C pri 3 000 xg a supernatant sa nechal prejsť sklenenou vatou. Získaný filtrát sa podrobil destilácii v

parciálnom podtlaku a výsledná vodná fáza sa vymrazila v kvapalnom dusíku a potom vo vymrazovacom systéme LABCONCO. Výťažky surových prokyanidínov sa pohybovali v rozmedzí od 15 do 20 %. Bez toho, aby sme sa viazali na určitú teóriu, je zrejmé, že rozdiely v surových výťažkoch odrážajú variácie, ktoré sa dosiahli pri použití rôznych genotypov, geografických pôvodov, poľnohospodárskych odrôd a spôsobov prípravy.

Príklad 5: Čiastočné čistenie kakaových prokyanidínov

A. Gélová permeačná chromatografia

Prokyanidíny získané z príkladu 2 sa čiastočne vyčistili kvapalinovou chromatografiou v kolóne SEPHADEX LH-20 (28 x 2,5 cm). Na separovanie sa použije krokový gradient do deionizovanej vody. Separácia sa začal s gradientným zložením 15 % metanolu v deionizovanej vode, pričom ďalej krokovo každých 30 min nasledovala postupne separácia pomocou 25 % metanolu v deionizovanej vode, 35 % metanolu v deionizovanej vode, 75 % metanolu v deionizovanej vode a nakoniec 100 % metanolu. Plynule eluované xantínové alkaloidy (kofeín a teobromín) sa zhromaždili ako jediná frakcia. Frakcie poskytujúce podfrakciu neobsahujúcu xantínové alkaloidy bola podrobená ďalšej separácii, ktorá poskytla 5 podfrakcií, označených MM2A až MM2E. Rozpúšťadlo sa z jednotlivých podfrakcií odstránilo odparením pri 45 °C pomocou rotačnej odparky udržiavanej pod čiastočným podtlakom. Výsledná vodná fáza sa zmrazila v kvapalnom dusíku a cez noc vymrazovala na vymrazovacom systéme LABCONCO. Reprezentatívny chromatogram gélovej permeácie znázorňujúci túto frakciu je zobrazený na obrázku 1. Týmto spôsobom sa frakcionovalo približne 100 mg materiálu.

Obrázok 1 znázorňuje gélový permeačný chromatogram surových prokyanidínov získaný na Sephadexe LH-20.

Chromatografické podmienky: kolóna Sephadex LH-20, 28 x 2,5 cm, mobilné fázy: krokový gradient metanolu a vody 15:85, 25:75,

35:65, 70:30 a 100:0, krokovaný v polhodinových intervaloch, prietok: 1,5 ml/min, detektor UVE $\lambda_1=254$ nm a $\lambda_2=365$ nm, rýchlosť posunu papiera zapisovača: 0,5 mm/min, hmotnosť pevnej fázy: 120 mg.

B. Polopreparatívna vysokovýkonnostná kvapalná chromatografia (HPLC)

Metóda 1: Separácia s reverznými fázami

Prokyanidíny získané z príkladu 2 a/alebo 3A sa čiastočne vyčistili polopreparatívnou HPLC. HPLC systém Hewlett Packard 1050, vybavený detektorom s premenlivou vlnovou dĺžkou, vstrekovacím ventilom Rheodyne 7010 s 1 ml injektážnou slučkou, sa skompletizoval s frakčným kolektorom Pharmacia FRAC-100. Separácia sa uskutočňovali na kolóne Phenomenex Ultracarb 10 μ ODS (250 x 22,5 mm) spojené s ochrannou kolónou Phenomenex Ultracarb 10 μ ODS (60 x 10 mm). Mobilná fáza tvorila A=voda; B=metanol, použité pri nasledujúcich lineárnych gradienčných podmienkach: [čas, % A]; (0, 85), (60, 50), (90, 0) a (110, 0) pri prietoku 5 ml/min. Reprezentatívny záznam polopreparatívnej HPLC je znázornený na obrázku 15n a ukazuje separáciu prokyanidínov prítomných vo frakcii D+E. Jednotlivé piky alebo selektívne chromatografické oblasti sa zhromaždili v určitých časových intervaloch. Hmotnosť pevnej fázy sa pohybovala v rozmedzí od 25 do 100 mg materiálu.

Metóda 2: Normálna fázová separácia

Prokyanidínové výťažky získané z príkladov 2 a/alebo 3A sa čiastočne vyčistili polopreparatívnou HPLC. HPLC systém Hewlett Packard 1050 a detektor Millipore-Waters model 480 LC nastavený na 254 nm sa skompletizovali s frakčným kolektorom Pharmacia FRAC-100 nastaveným v pikovom kóde. Separácie sa uskutočňovali v kolóne Supelco 5 μ Supelcosil LC-Si (250 x 100 mm) spojenej ochrannou kolónou Supelco 5 μ Supelguard LC-Si (20 x 4,6 mm). Prokyanidíny sa eluovali lineárnym gradientom pri nasledujúcich

podmienkach: (čas, % A, % B); (0, 82, 14), (30, 67,6, 28,4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70, 10, 86) a potom nasledovalo 10-minútové ustálenie. Mobilné fázy tvorili A=dichlórmetán; B=metanol; C=zmes kyseliny octovej a vody (1:1). Použitým prietokom bol prietok 3 ml/min. Zložky sa detegovali pomocou UV žiarenia pri 254 nm a zaznamenali na záznamník Kipp & Zonan VD41. Vstrekané objemy sa pohybovali v rozmedzí od 100 do 250 μ l 10 mg prokyanidínových výťažkov rozpustených v 0,25 ml 70 % vodného roztoku acetónu. Reprezentatívny záznam polopreparatívnej HPLC znázorňuje obrázok 15o. Jednotlivé piky alebo selektívne chromatografické oblasti sa zhromaždili v časových intervaloch alebo ručne zhromaždením frakcií pre ďalšie čistenie a následné vyhodnotenie.

Podmienky HPLC: polopreparatívna kolóna Supelco 5 μ Supelcosil LC-Si (250 x 100 mm) spojená ochrannou kolónou Supelco 5 μ Supelguard LC-Si (20 x 4,6 mm) a detektor Millipore-Waters model 480 LC nastavený na 254 nm, prietok: 3 ml/min, teplota kolóny: teplota okolia, vstrekovanie: 250 μ l 70 % vodného acetónového výťažku.

Gradient		Kyselina	
Čas (min)	CH ₂ Cl ₂	Metanol	octová/H ₂ O (1:1)
0	82	14	4
30	67,6	28,4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

Týmto spôsobom sa získali tieto frakcie:

Frakcia	Typ
1	diméry
2	triméry
3	tetraméry
4	pentaméry.
5	hexaméry
6	heptaméry
7	oktaméry
8	nonaméry
9	dekaméry
10	undekaméry
11	dodekaméry
12	vyššie oligoméry

Príklad 4: Analytická HPLC analýza prokyanidínových výťažkov

Metóda 1: Separácia s reverznými fázami

Prokyanidínové extrakty získané z príkladu 3 sa prefiltrovali cez 0,45 μ filter a analyzovali pomocou HPLC ternárneho systému Hewlett Packard 1090 s výbavou diódového detektora a programovateľného fluorescenčného detektora HP model 1046A. Separácie sa uskutočňovali pri 45 °C na kolóne Hewlett Packard 5 μ Hypersil ODS (200 \times 2,1 mm). Flavanoly a prokyanidíny sa eluovali lineárnym gradientom 60 % B v a potom sa kolóna premyla elučnou zložkou B, ktorej prietok bol 0,3 ml/min. Mobilná fáza bola tvorená (B) 0,5 % kyselinou octovou v metanole a (A) 0,5 % kyselinou octovou vo vode. Koncentrácia kyseliny octovej v mobilných fázach A a B sa mohla zvýšiť až na 2 %. Zložky boli detegované fluorescenčnou metódou, pričom $\lambda_{\text{ex}}=276$ nm a $\lambda_{\text{em}}=316$ nm. Koncentrácie (+)-katechínónu a (-)-epikatechínu sa určili vzhľadom na referenčné štandardné roztoky. Koncentrácie

prokyanidínu sa určili pomocou odpovedového faktora určeného pre (-)-epikatechín. Reprezentatívny HPLC chromatogram ukazujúci separáciu rôznych zložiek je znázornený na obrázku 2A pre jeden kakaový genotyp. Podobné HPLC profily je možné získať aj z ďalších kakaových genotypov.

HPLC podmienky: kolóna: Hewlett Packard 5 μ Hypersil ODS (200 x 2,1 mm) spojené ochrannou kolónou Hewlett Packard 5 μ Hypersil ODS (200 x 2,1 mm) s výbavou diódového detektora nastaveného na 289 nm a programovateľného fluorescenčného detektora, kde λ_{ex} =276 nm a λ_{em} =316 nm. Prietok: 3 ml/min. Teplota kolóny: 45.

Gradient:	0,5 % kyseliny octovej v deionizovanej H ₂ O	0,5 % kyseliny octovej v metanole
Čas (min)		
0	100	0
50	40	60
60	0	100

Metóda 2: Normálna fázová separácia

Prokyanidínové extrakty získané z príkladu 3 sa prefiltrovali cez 0,45 μ filter a analyzovali pomocou HPLC ternárneho systému Hewlett Packard 1090 s výbavou diódového detektora a programovateľného fluorescenčného detektora HP model 1046A. Separácie sa uskutočňovali pri 38 °C na kolóne 5 μ Phenomenex Lichosphere Silica 100 (250 x 3,2 mm) spojenej s ochrannou kolónou Supelco Supelguard LC-Si 5 μ (20 x 4,6 mm). Prokyanidíny sa eluovali lineárnym gradientom pri nasledujúcich podmienkach (čas, % A, % B): (0, 82, 14), (30, 67,6, 28,4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70, 10, 86) a potom nasledovalo 8-minútové ustálenie s cieľom dosiahnutia rovnováhy. Mobilné fázy tvorili A=dichlórmetán; B=metanol; C=zmes kyseliny octovej a vody (objemový pomer 1:1). Použitým prietokom bol prietok 0,5 ml/min.

Zložky sa stanovili fluorescenčnou metódou, pri ktorej $\lambda_{ex}=276$ nm a $\lambda_{em}=316$ nm alebo UV metódou pri 280 nm. Reprezentatívny HPLC chromatogram, ktorý ukazuje separáciu rôznych prokyanidínov, je pre jeden genotyp znázornený na obrázku 2B. Podobné HPLC profily je možné získať aj z ďalších kakaových genotypov.

HPLC podmienky: kolóna 5 μ Phenomex Lichrosphere Silica 100 (250 x 3,2 mm) spojená s ochrannou kolónou Supelco Supelguard LC-Si 5 μ (20 x 4,6 mm), detektory: fotodiódové zoskupenie nastavené na 280 nm, fluorescenčné $\lambda_{ex}=276$ nm a $\lambda_{em}=316$ nm, prietok: 0,5 ml/min, teplota kolóny: 37 °C.

Gradient:	CH ₂ -Cl ₂	(1:1)	Kyselina octová/H ₂ O
Čas (min)			
0	82	14	4
30	67,6	28,4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

Príklad 5: Identifikácia prokyanidínu

Prokyanidíny sa čistili kvapalinovou chromatografiou na kolónach Sephadex LH-20 (28 x 2,5 cm) a potom polopreparatívnu HPLC použitím kolóny 10 μ μ Bundapak C18 (100 x 8 mm) alebo polopreparatívnu HPLC použitím kolóny 5 μ Supercosil LC-Si (250 x 10 mm).

Čiastočne vyčistené izoláty sa analyzovali bombardovaním urýchlenými atómami - hmotnostnou spektrometriou (FAB-MS) na VG ZAB-T MS systéme s vysokým rozlíšením pri použití kvapalinovej sekundárnej iónovej hmotnostnej spektrometrickej (LSIMS) techniky v pozitívnom a negatívnom iónovom modele. Ako zdroj ionizácie sa

použila céziová iónová pištoľ pri 30 kV a "Magická strelová matrica" (1:1 ditiotreitól/ditioerytritól) sa použila ako protónový donor.

Analytické testovanie týchto frakcií pomocou LSIMS odhalilo prítomnosť mnohých flavan-3-olových oligomérov, ktoré sú zhrnuté v tabuľke 3.

T a b u Ľ k a 3

LSIMS (pozitívny ión) údaje získané z frakcií kakaových prokyanidínov

Oligomér	(N+1)**	(M+Na)**	Molekulová hmotnosť
Monoméry (katechíny)	291	313	290
Dimér(y)	577/579	599/601	576/578
Trimér(y)	865/867	887/889	884/866
Tetramér(y)	1 155	1 177	1 154
Pentamér(y)	1 143	1 465	1 442
Hexamér(y)	1 731	1 753	1 730
Heptamér(y)	-	2 041	2 018
Oktamér(y)	-	2 329	2 306
Nonamér(y)	-	2 617	2 594
Dekamér(y)	-	2 905	2 882
Undekamér(y)	-	3 170	
Dodekamér(y)	-	-	3 458

Hlavné hmotnostné fragmentové ióny sa zhodovali s už predtým vypracovanými prácami týkajúcimi sa pozitívnych a negatívnych iónových FAB-MS analýz prokyanidínov (Self R., Eagles J., Galletti G.C., Mueller-Harvey I., Hartley R.D., Lee A.G.H., Magnolato D., Richli U., Gujur R. a Haslam E., Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Polyphenols (Syn Vegetable Tannins), Biomed Environ. Mass Spec. 13, 449-468 (1986) Porter

L.J., Ma Z., Chan B.G., Cocoa Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of Some Minor Metabolites, *Hytochemistry*, 30, 1657-1663 (1991)). Ión, zodpovedajúci m/z 577 $(M+H)^+$ a jeho sodný adukt pri m/z 599 $(M+Na)^+$ predpokladá v izolátoch prítomnosť prokyanidínových dimérov s dvojitou väzbou. Prokyanidínové izoméry B-2, B-5 a C-1 sa predbežne stanovili na základe v zátvorke uvedených prác (Revilla E., Bourzeix M. a Alonso E., Analysis of Catechins and Procianidins in Grape Seeds by HPLC with Photodiode Array Detection, *Chromatographia* 31, 465-468 (1991) Self R., Eagles J., Galletti G.C., Mueller-Harvey I., Hartley R.D., Lee A.G.H., Magnolato D., Richli U., Gujur R. a Haslam E., Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Polyphenols (Syn Vegetable Tannins), *Biomed Environ. Mass Spec.* 13, 449-468 (1986) Porter L.J., Ma Z., Chan B.G., Cocoa Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of Some Minor Metabolites, *Hytochemistry*, 30, 1657-1663 (1991)). Prokyanidíny v čiastočne vyčistených frakciách končiac oktamérom a dekamérom sa overili pomocou FAB - hmotnostnej spektroskopie, okrem toho prítomnosť prokyanidínov, končiac dodekamérom sa zistila takisto normálnou fázovou HPLC analýzou (pozri obr. 2B). Bez toho, aby sme sa chceli viazať na určitú teóriu, je možné predpokladať, že rozpustnosť dodekaméru v rozpúšťadlách použitých pri extrakcii a čistení je trochu obmedzená. Tabuľka 4 uvádza relatívne koncentrácie prokyanidínov nájdených v izolátoch neobsahujúcich xantínové alkaloidy na základe reverznej fázovej HPLC analýzy. Tabuľka 5 uvádza relatívne koncentrácie prokyanidínov určené pomocou normálnej fázovej HPLC analýzy.

T a b u Ľ k a 4

Relatívne koncentrácie prokyanidínov v izolátoch neobsahujúcich xantínové alkaloidy

Zložka	Molekulová hmotnosť	Množstvo (%)
(+)-katechín	290	1,6
(-)-epikatechín	290	38,2
B-2 dimér	578	11,0
B-5 dimér	578	5,3
C-1 trimér	866	9,3
Diméry s dvojitou väzbou	576	3,0
Tetramér(y)	1 154	4,5
Pentamér-oktamér	1 442-2 306	24,5
Neznáme a vyššie oligoméry	-	2,6

T a b u ľ k a 5

Relatívne koncentrácie prokyanidínov vo vodných acetónových výťažkoch

Zložka	Molekulová hmotnosť	Množstvo (%)
(+)-katechín a (-)-epikatechín	290 (rovnaká pre obidva)	41,9
B-2 dimér a B-5 dimér	578	13,9
Triméry	884/866	11,3
Tetraméry	1 154	9,9
Pentaméry	1 442	7,8
Hexaméry	1 730	5,1
Heptaméry	2 018	4,2
Oktaméry	2 306	2,8
Nonaméry	2 594	1,6
Dekaméry	2 882	0,7
Undekaméry	3 170	0,2
Dodekaméry	3 458	< 0,1

Obrázok 3 znázorňuje niekoľko prokyanidínových štruktúr a

obrázky 4A až 4B znázorňujú reprezentatívne HPLC chromatogramy piatich frakcií použitých pri nasledujúcom určovaní protirakovinovej alebo protinádorovej účinnosti. Podmienky pre vysokovýkonnostné kvapalinové chromatografie pre obrázky 4A až 4E boli takéto:

Podmienky HPLC: ternárny HPLC systém Hewlett Packard 1090 vybavený programovateľným fluorescenčným detektorom HP model 1046A. Kolóna: Hewlett Packard 5 μ Hypersil ODS (200 \times 2,1 mm) lineárny gradient 60 % v A pri prietoku 0,3 ml/min. B=0,5 % kyseliny octovej v metáne; A=0,5 % kyseliny octovej v deionizovanej vode. $\lambda_{\text{exc}}=280$ nm; $\lambda_{\text{em}}=316$ nm.

Obrázok 15 D znázorňuje reprezentatívny chromatogram polopreparatívnej vysokovýkonnostnej kvapalinovej chromatografie pre ďalších 12 frakcií, použitých pri zisťovaní protirakovinovej alebo protinádorovej účinnosti (pre HPLC podmienky platia vyššie vymedzené podmienky).

Príklad 6: Protirakovinová, protinádorová alebo protinovotvarová účinnosť kakaových výťažkov (prokyanidínov)

Na testovanie vzoriek z príkladu 5 sa použilo MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid) mikrotitrové doštičkové tetrazoliové cytotoxické zoskupenie pôvodne vyvinuté Mosmannom T., a popísané v "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J. Immunol. Methods, 65, 55 (1983)". Testované vzorky, štandardy (cysplatina chlorambucil) a MTT reagenčné činidlá sa rozpustili v 100 % DMSO (dimetylsulfoxide) pri koncentrácii 10 mg/ml. Zo zásobných roztokov sa pripravilo množstvo nariedených vzoriek. V prípade testovaných vzoriek sa pripravili nariedené vzorky obsahujúce 0,01 až 100 μ g/ml v 0,5 % DMSO.

Všetky ľudské nádorové bunkové línie sa získali z americkej zbierky typových kultúr. Bunky sa nechali rásť vo forme

monovrstiev v alfa-MEM obsahujúcom 10 % plodového bovinného séra 100 jednotiek/ml penicilínu, 10 $\mu\text{g/ml}$ streptomycínu a 240 jednotiek/ml nystatínu. Bunky sa udržiavali v navlhčenej 5 % CO_2 atmosfére pri teplote 37 °C.

Po trypsinizácii sa bunky sčítali a nastavili na koncentráciu 50×10^5 buniek/ml (líšiacich sa v závislosti od príslušnej rakovinovej bunkovej línie). 200 μl bunkovej suspenzie sa umiestilo do jamiek štvorradovej, 96-jamkovej mikrotitračnej platne. Potom, ako sa bunky nechali počas 4 hodín prichytiť, sa vždy do kvadruplexových jamiek pridali 2 μl DMSO obsahujúceho roztoky testovanej vzorky. Začiatočné experimenty, zisťujúce závislosť od dávky, využívajúce množstvo nariadených testovacích vzoriek, sa použili na stanovenie rozmedzia dávok, ktoré majú byť testované. Absorbancie jamiek pri 540 nm sa potom zamerali na BIO RAD MP450 platňovom čítači. Priemerná absorbancia testovanej vzorky získanej spriemernením výsledkov pre štyri vzorky sa porovnávala s kontrolnými výsledkami pre štandardy a výsledky sa vyjadrili ako percento kontrolnej absorbancie \pm štandardná odchýlka. Redukcia MTT na nachový formazánový produkt lineárne koreluje s počtom živých buniek v jamke. Takže meraním absorbancie redukčného produktu je možné získať kvantovanie percent bunkového prežitia v danej dávke testovanej vzorky. Kontrolné jamky obsahujú finálnu koncentráciu 1 % DMSO.

Týmto postupom sa najprv testovali 2 vzorky. Vzorka MM1 predstavovala úplne surový izolát kakaových prokyanidínov a obsahovala nezanedbateľné množstvo kofeínu a teobromínu. Vzorka MM2 reprezentovala kakaový prokyanidínový izolát čiastočne vyčistený gélovou permeačnou chromatografiou. Kofeín a teobromín neboli vo vzorke MM2 prítomné. U obidvoch vzoriek sa pomocou už popísaných procedúr určovala účinnosť proti nasledujúcim rakovinovým bunkovým líniam:

HCT-116 rakovina hrubého čreva

ACHN obličkový adenokarcinóm

SK-5 melanóm

A498 obličkový adenokarcinóm

MCF-7 rakovina prsníka

PC-3 rakovina predstojnice

CAPA-2 rakovina podžalúdkovej žľazy

Pokiaľ ide o MM1, zistilo sa, že jeho účinnosť na vyššie vymenované rakovinové bunkové línie je len malá alebo vôbec žiadna. Pokiaľ ide o MM2, zistila sa určitá účinnosť proti HCT-116, PC-3 a ACHN rakovinovým bunkovým líniám. Avšak ukázalo sa, že ako MM1, tak aj MM2 interferuje s MTT reakčným činidlom, takže prispievajú k zníženiu absorpcie, ktoré by mohlo odrážať zníženie počtu buniek schopných existencie. Táto interferencia takisto prispieva k veľkým stĺpcom chýb, pretože sa zdá, že chemická reakcia, ktorá prebieha v jamkách v obvode plata, prebieha oveľa rýchlejšie. Typický príklad týchto javov je znázornený na obrázku 5. Pri vysokých koncentráciách testovaného materiálu sa dá očakávať, že dôjde k veľkému poklesu prežívajúcich buniek. Avšak mikroskopické pozorovania ukázali, že k cytotoxickým účinkom dochádza aj napriek MTT interferenčným vplyvom. Týmto spôsobom sa získala napr. pre účinnosť MM2 na ACHN bunkovej línii hodnota IC_{50} 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Tieto bežné výsledky si z pohľadu vynálezcu vyžiadali testovacie postupy tak, aby sa vylúčila interferencia s MTT. To sa dosiahlo pomocou nasledujúceho spôsobu. Po inkubovaní platní pri 37 °C v navlhčenej 5 % CO_2 atmosfére, ktoré trvalo 18 hodín, sa médium opatrne odsalo a nahradilo čistým alfa-MEM médiom. Toto médium sa tretí deň realizácie testu z jamiek opäť odsalo a nahradilo 100 μl čerstvo pripraveného McCoyovho média. Do jamiek všetkých plat sa potom pridalo 11 μl 5 mg/ml zásobného roztoku MTT v PBS (fosfátom pufrovaný soľný roztok). Po 4 hodinovej inkubácii v navlhčenej 5 % CO_2 atmosfére pri 37 °C sa do všetkých jamiek platne pridalo 100 μl 0,04N HCl v izopropanole a potom sa zmesi intenzívne miešali s cieľom rozpustenia formazánu produkovaného všetkými životaschopnými bunkami. Navyše bolo rozhodnuté stanoviť špecifické zložky podfrakcií prokyanidínu zodpovedné za tieto účinky.

Separáčne postupy, ktoré už boli popísané pre prípravu

subfrakcií, sa použili pre prípravu vzoriek pre ďalšie testovanie. Pripravilo sa päť frakcií reprezentujúcich oblasti znázorňujúce na obrázku 1 a distribúciu zložky a zložiek znázornenú na obrázku 4A až 4E. Vzorkám sa priradili kódy MM2A až MM2E, ktoré odrážajú ich analytické vlastnosti a označujú neprítomnosť kofeínu a teobromínu.

Pre každú frakciu sa jednotlivo zisťovala účinnosť proti HCT-116, PC-3 a ACHN rakovinovým bunkovým líniam. Výsledky neukázali účinnosť žiadnej zo špecifických frakcií. Tento výsledok je možné považovať za neobvyklý, pretože zložky v "aktívnych" prírodných produkčných izolátoch sa môžu chovať synergicky. V prípade kakaového prokyanidínového izolátu (MM2) izolát obsahoval viac ako 20 detegovateľných zložiek. Predpokladalo sa, že je možné, aby sa účinnosť týkala skôr než jednotlivej zložky alebo zložiek kombinácie zložiek prítomných v rôznych frakciách. Na základe týchto výsledkov sa rozhodlo skombinovať frakcie a testy zamerané na účinnosť proti rovnakým rakovinovým bunkovým líniam sa zopakovali. Niekoľko kombinácií produkovalo cytotoxické účinky proti PC-3 rakovinovým bunkovým líniam, presnejšie pre kombináciu MM2A a MM2E predstavovali IC_{50} hodnoty 40 $\mu\text{g/ml}$ a pre kombinácie MM2C a MM2E sa získala IC_{50} hodnota 20 $\mu\text{g/ml}$. Takisto bola zaznamenaná účinnosť proti HCT-116 a ACHN bunkovým líniam, ale ako v predchádzajúcom prípade, interferencie s MTT indikátorom znemožnili presné pozorovanie. Zhodné experimenty sa opakovane uskutočnili HCT-116 a ACHN bunkových líniam s cieľom zlepšiť výsledné dáta. Avšak tieto výsledky nemali dôkazovú hodnotu vzhľadom na bakteriálnu kontamináciu a vyčerpanie materiálu testovanej vzorky. Obrázky 4A až 6D ukazujú závislosť odpovede od dávky medzi kombináciami kakaových výťažkov a PC-3 rakovinovými bunkami. Avšak z týchto údajov je zrejmé, že kakaové výťažky, predovšetkým kakaové polyfenoly alebo prokyanidíny majú značnú protinádorovú, protirakovinovú alebo protinotovotvarovú účinnosť, predovšetkým pokiaľ ide o ľudské rakovinové bunkové línie PC-3 (predstojnica), HCT-116 (hrubé črevo) a ACHN (obličky). Okrem toho tieto výsledky naznačujú, že za účinnosť proti PC-3 bunkovej línii môžu byť

zodpovedné špecifické prokyanidínové frakcie.

Príklad 7: Protirakovinová, protinádorová alebo protinovotvarová účinnosť kakaových výťažkov (prokyanidínov)

S cieľom potvrdenia vyššie uvedených zistení a s cieľom štúdia ďalších kombinácií frakcií sa uskutočnili ďalšie porovnávacie testy. Všetky pripravené materiály a postupy boli zhodné s vyššie popísanými materiálmi a postupmi, s tou výnimkou, že sa štandardné 4 opakovania testovanej dávky zvýšili na 8 alebo 12 opakovaní testovanej dávky. Pri týchto štúdiách sa posudzovala účinnosť jednotlivých piatich kakaových prokyanidínových frakcií a ich kombinácií proti nasledujúcim rakovinovým bunkovým líniam:

HCT-116 rakovina hrubého čreva

ACHN obličkový adenokarcinóm

SK-5 melanóm

KB Nazofaryngeálna/HeLa

MCF-7 rakovina prsníka

PC-3 rakovina predstojnice

A-459 pľúc

CCRF-CEM T-bunková leukémia.

Jednotlivé testy zisťovali účinnosť rôznych koncentrácií dávok (0,01 až 100 $\mu\text{g/ml}$) frakcií A, B, C, D a E (pozri obr. 4A až 4E a s nimi súvisiaci popis) proti jednotlivým bunkovým líniam. Kombinačné testy zisťovali účinnosť rovnakých dávkových koncentrácií frakcií A+B, A+C, A+D, A+E, B+C, B+D, B+E, C+D, C+E a D+E proti jednotlivým bunkovým líniam. Výsledky týchto testov sú diskutované jednotlivo a potom v celkovom súhrne.

A. PC-3 bunková línia predstojnice

Obrázky 7A až 7H znázorňujúce typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a PC-3 bunkovou líniov. Obr. 7D až 7E ukazujú, že frakcie D a E boli účinné pri hodnote IC_{50} 75 $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty IC_{50} získané z kriviek závislosti

dávka - odpoveď ďalších kombinácií prokyanidínových frakcií sa v prípade, že tieto kombinácie obsahovali frakciu D alebo E, pohybovali v rozmedzí od 60 do 80 $\mu\text{g/ml}$. Jednotlivé IC_{50} hodnoty sú zhrnuté v tabuľke 6.

B. KB nazofaryngeálna/HeLa bunková línia

Obrázky 8A až 8H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a KB nazofaryngeálnou/HeLa bunkovou líniou. Obr. 8D a 8E ukazujú, že frakcie D a E boli účinné pri hodnote IC_{50} 75 $\mu\text{g/ml}$. Obrázky 8f až 8H znázorňujú reprezentatívne výsledky získané zo štúdie kombinácií frakcií. V tomto prípade nemá kombinácia prokyanidínových frakcií A+B žiadny účinok, pričom kombinácie frakcií B+E a D+E boli účinné pri IC_{50} hodnote 60 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} hodnoty získané z kriviek závislosti dávka-odpoveď ďalších kombinácií prokyanidínových frakcií sa v prípade, že tieto kombinácie obsahovali frakciu D alebo E, pohybovali v rozmedzí od 60 do 80 $\mu\text{g/ml}$. Jednotlivé IC_{50} hodnoty sú zhrnuté v tabuľke 6. Tieto výsledky sú v podstate zhodné s výsledkami získanými pri určovaní účinnosti proti PC-3 bunkovej líni.

C. HCT-116 bunková línia hrubého čreva

Obrázky 9A až 9H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a HCT-116 bunkovou líniou hrubého čreva. Obr. 9D a 9E ukazujú, že frakcie D a E boli účinné pri hodnote IC_{50} približne 400 mg/ml . Táto hodnota sa získala extrapoláciou z existujúcej krivky. Je nutné uviesť, že sklon krivky dávka-odpoveď pre frakciu D takisto naznačuje účinnosť. Avšak pre túto frakciu sa hodnota IC_{50} nestanovila, pretože sklon tejto krivky bol príliš plochý na to, aby sa získali vierohodné hodnoty. Obrázky 9F až 9H znázorňujú reprezentatívne výsledky získané zo štúdie kombinácií frakcií. V tomto prípade nevykazuje kombinácia prokyanidínových frakcií B+D podstatnejší účinok, pričom kombinácie frakcií A+E a D+E boli účinné pri IC_{50} hodnote 500 $\mu\text{g/ml}$, resp. 85 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} hodnoty

získané z kriviek závislosti dávka-odpoveď ďalších kombinácií prokyanidínových frakcií v prípade, že tieto kombinácie obsahovali frakciu E, dosahovali približne 250 µg/ml. Extrapolované IC₅₀ hodnoty sú zhrnuté v tabuľke 6.

D. ACHN obličková bunková línia

Obrázky 10A až 10H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a ACHN obličkovou bunkovou líniou. Obr. 10A a 10E ukazujú, že žiadna jednotlivá frakcia nebola proti tejto línii účinná. Obrázky 10F až 10H znázorňujú reprezentatívne výsledky získané zo štúdie kombinácií frakcií V tomto prípade nemá kombinácia prokyanidínových frakcií B+C žiadny účinok, pričom kombinácia frakcií A+E bola účinná pri IC₅₀ hodnote 500 µg/ml, pričom táto hodnota sa zistila extrapoláciou z existujúcej krivky. Krivky závislosti dávka-odpoveď podobné krivke kombinácie C+D boli považované za neúčinné, pretože ich sklon bol príliš plochý. Extrapolované IC₅₀ hodnoty pre ďalšie frakčné kombinácie sú zhrnuté v tabuľke 6.

E. A-459 pľúcna bunková línia

Obrázky 11A až 11H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a A-459 pľúcnou bunkovou líniou. V tomto teste nebol pri použitých dávkach jednotlivých frakcií ani kombinácií frakcií dosiahnutý žiadny účinok. Avšak prokyanidínové frakcie môžu mať v súvislosti s touto bunkovou líniou určitý účinok.

F. SK-5 melanómová bunková línia

Obrázky 12A až 12H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a SK-5 melanómovou bunkovou líniou. V tomto teste nebol pri použitých dávkach jednotlivých frakcií ani kombinácií frakcií dosiahnutý žiadny účinok. Avšak prokyanidínové frakcie môžu mať v súvislosti

s touto bunkovou líniou určitý účinok.

G. MCF-7 prsná bunková línia

Obrázky 13A až 13H znázorňujú typickú závislosť odpovede od dávky medzi kakaovými prokyanidínovými frakciami a MCF-7 prsnou bunkovou líniou. V tomto teste nebol pri použitých dávkach pri použitých dávkach jednotlivých frakcií ani kombinácií frakcií dosiahnutý žiadny účinok. Avšak prokyanidínové frakcie môžu mať v súvislosti s touto bunkovou líniou určitý účinok.

H. CCRF-CEM T-bunková línia leukémie

Pri stanovovaní účinnosti proti CCRF-CEM T-bunkovej línii leukémie sa získali krivky závislosti odpovede od dávky. Avšak mikroskopické súčty počtu buniek v závislosti od času pri rôznych koncentráciách frakcie ukázali, že 500 µg frakcie A, B a D spôsobili 80 % redukciu rastu počas 4-dennej časového zdržania. Reprezentatívna závislosť odpovede od dávky je znázornená na obrázku 14.

I. Zhrnutie

IC₅₀ hodnoty získané v týchto testoch sú súhrnne uvedené v tabuľke 6. Pre všetky bunkové línie s výnimkou CCRF-CEM t-bunkovej línie leukémie. Údaje, týkajúce sa CCRF-CEM t-bunkovej línie leukémie sa z tejto tabuľky zámerne vynechali, pretože pri ich stanovovaní bol použitý iný testovací postup. Všeobecné zhrnutie týchto výsledkov ukazuje, že najviac účinnosti je spojenej s frakciami D a E. Tieto frakcie boli najúčinnnejšie proti bunkovým líniám PC-3 (predstojnica) a KB (nazofaryngeálna/HeLa). Tieto frakcie takisto vykazujú účinnosť proti bunkovým líniám HCT-116 (hrubé črevo) a ACHN (obličky), ale len pri podstatne vyšších dávkach. Proti bunkovým líniám MCF-7 (prsník), SK-5 (melanóm) a A-549 (pľúca) nebola zistená žiadna účinnosť. Avšak prokyanidínové frakcie môžu byť v súvislosti s týmito bunkovými líniami použité. Takisto sa dokázala účinnosť

proti bunkovej línii CCRF-CEM (T-bunková leukémia). Je nutné uviesť, že frakcie D a E sú kompozične najkomplexnejšie, avšak z týchto výsledkov je zrejmé, že kakaové výťažky, predovšetkým kakaové prokyanidíny majú značnú protirakovinovú, protinádorovú alebo protinovo-
tvarovú účinnosť.

T a b u ľ k a 6

IC₅₀ hodnoty pre frakcie kakaových prokyanidínov proti rôznym bunkovým líniam (IC₅₀ hodnoty v µg/ml)

Frakcia	PC-3	KB	HCT-116	ACHN	MCF-7	SK-5	A-549
A							
B							
C							
D	90	80					
E	75	75	400				
A+B							
A+C	125	100					
A+D	75	75					
A+E	80	75	500	500			
B+C							
B+D	75	80					
B+E	60	65	200				
C+D	80	75		1 000			
C+E	80	70	250				
D+E	8	60	85				

Hodnoty vyššie ako 100 µg/ml sa extrapolovali z kriviek závislosti odpovede od dávky.

Príklad 8: Protirakovinová, protinádorová alebo protinovo-
tvarová účinnosť kakaových výťažkov (prokyanidínov)

S cieľom skompletizovania a rozšírenia výsledkov získaných v príkladoch 6 a 7 sa použilo niekoľko ďalších in vitro skúšobných

testovacích postupov.

Metóda A. Test kryštalického fialového zafarbenia

Všetky ľudské nádorové bunkové línie sa získali z americkej zbierky typových kultúr. Bunky sa nechali rásť vo forme monovrstiev v IMEM obsahujúcom 10 % plodového bovinného séra bez antibiotík. Bunky sa udržiavali v navlhčenej 5 % CO₂ atmosfére pri teplote 37 °C.

Po trypsinizácii sa bunky sčítali a nastavili na koncentráciu 1 000 až 2 000 buniek/100 µl. Bunkové bujnenie sa určilo očkovaním buniek (1 000 až 2 000 buniek/jamka) na 96-jamkovú mikrotitračnú platňu. Po pridaní 100 µl buniek sa bunky nechali 24 hodín prichytiť. Na konci tejto 24-hodinovej periódy sa do jamiek pridali rôzne kakaové frakcie v rôznych koncentráciách s cieľom získania závislosti odpovede od dávky. Kakaové frakcie sa rozpustili v médiu pri dvojnásobnej koncentrácii a vždy do troch jamiek sa pridalo 100 µl príslušného roztoku obsahujúceho zhodnú frakciu v zhodnej koncentrácii. Počas nasledujúcich dní sa platne zafarbovali 15 minút 50 µl kryštalickej fialovej (2,5 g kryštalickej fialovej rozpustenej v 152 ml metanolu a 375 ml vody). Zafarbenie sa odstránilo a platňa sa opatrne ponorila do studenej vody z dôvodu odstránenia zafarbenia. Premývanie sa zopakovalo ešte dvakrát a platne sa nechali vyschnúť. Zvyšné zafarbenie sa rozpustilo pridaním 100 µl 0,1M citrátu sodného a 50 % etanolu do každej jamky. Po rozpustení sa počet buniek vypočítal na platňovom čítači ELISA pri 540 nm (referenčný filter pri 410 nm). Výsledky z čítača ELISA sa vyniesli do grafu tak, že na os Y sa vyniesla absorbanca a na os X dni rastu.

Metóda B: Test klonovania mäkkého agaru

Bunky sa klonovali v mäkkom agare pri použití metódy, ktorú popísal Nawata H., Chong M.T., Bronzert D. a Lippman M.E. v článku "Estadiol-Independent Growth of a Subline of MCF-7 Human

Cancer Cells in Culture", J. Biol. Chem., 256:13, 3 895-6 902 (1981). Jednotlivé bunkové suspenzie sa pripravili pridaním rôznych koncentrácií kakaových suspenzií do média obsahujúceho 0,8 % agaru. Suspenzie sa rozdelili rovnako do 35 mm nádobiek potiahnutých médiom obsahujúcim 1,0 % agaru. Po desaťdennej inkubácii sa stanovil na zobrazovacom analytickom systéme Omnicron 3 600 počet kolónií, ktorých priemer bol väčší ako 60 μ m. Výsledky boli vynesené do grafu, pričom na osi Y bol vynesенý počet kolónií a na osi X koncentrácia kakaových frakcií.

Metóda C: XTT mikrokultúrny tetrazoliový test

Na testovanie rôznych kakaových frakcií sa použil XTT testovací postup, ktorý popisuje Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens N.J., Seniff D. a Boyd M.R. v článku "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, Cancer Research", 48, 4 822-4 833 (1988). XTT test s v podstate zhodoval s testom využívajúcim MTT postup (príklad 6), s výnimkou nasledujúcich modifikácií. XTT ((2,3-bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid) sa pripravil v koncentrácii 1 mg/ml média bez séra a predhrial sa na 37 °C. PMS sa pripravilo ako 5 mM PBS. XTT a PMS sa zmiešali dokopy a do každej jamky sa pridalo 10 μ l PMS na ml XTT a 50 μ l PMC-XTT. Po štvorhodinovej inkubácii pri 37 °C sa platne premiešavali 30 minút na mechanickej trepačke a potom sa zmerala absorbanca pri 450 až 600 nm. Výsledky sa vynesli do grafu, pričom absorbanca sa naniesla na os Y a dni rastu alebo koncentrácia na os X.

Výsledky získané použitím metódy A a C sa takisto vynesli do grafu ako % kontrolnej vzorky (na osi Y) v závislosti do dní rastu alebo koncentrácie (os X).

Na porovnanie XTT testovacieho postupu a kryštalickeho fialového postupu, kde sa malo určiť, ktorý test je citlivejší,

sa použila kakaová frakcia D&E (príklad 3B) proti prsnej rakovinovej bunkovej línii MCF-7 p163. Ako ukazuje obrázok 15A, obidva testy vykazujú pri koncentráciách vyšších ako 75 $\mu\text{g/ml}$ rovnaké závislosti odpovede od dávky. Pri koncentráciách nižších ako táto hodnota vykazuje kryštalický fialový test vyššie štandardné odchýlky ako výsledky testu XTT. Avšak pretože je kryštalický fialový test ľahší na použitie, uskutočňovali sa všetky nasledujúce testy, pokiaľ nie je uvedené niečo iné, pomocou tejto metódy. Výsledky kryštalického fialového testu (obr. 15B až 15E) majú demonštrovať účinky surového polyfenolového výťažku (príklad 2) na prsnú rakovinovú bunkovú líniiu MDA MB231, PC-3 rakovinovú bunkovú líniiu predstojnice, MCF-7 p163 prsnú rakovinovú bunkovú líniiu a cervikálnu rakovinovú bunkovú líniiu Hela. Vo všetkých prípadoch dávka 250 $\mu\text{g/ml}$ úplne inhibovala všetok rakovinový bunkový rast počas 5 až 7 dní. Zdalo sa, že Hela bunková línii je na výťažok citlivejšie, pretože bunkový rast už inhibovala dávka 100 $\mu\text{g/ml}$. Kakaové frakcie z príkladu 3B sa testovali proti Hela bunkovej línii a proti ďalšej SKBR-3 prsnej rakovinovej bunkovej línii. Tieto výsledky (obr. 15F a 15G) ukazujú, že frakcia D&E má najvyššiu účinnosť. Ako ukazuje obrázok 15H a 15I, hodnoty IC_{50} pre frakciu D a A dosahovali pre obidve rakovinové bunkové línii približne 40 $\mu\text{g/ml}$.

Kakaová frakcia D&E sa takisto testovala použitím testu klonovania v mäkkom agare, ktorý určil schopnosť testovanej zlúčeniny alebo zlúčenín inhibovať ukotvený nezávislý rast. Ako ukazuje obrázok 15J, koncentrácia 100 $\mu\text{g/ml}$ tejto frakcie úplne inhibuje tvorbu kolónie buniek Hela.

Proti línii Hela cell sa takisto testovali surové polyfenolové výťažky získané z ôsmich rôznych kakaových genotypov reprezentujúcich tri záhradnícke odrody kakaa. Ako ukazuje obrázok 15K, všetky rôzne varianty kakaa vykazovali podobnou odpoveďou účinnosť v závislosti od dávky. UIT-1 variant vykazoval najväčšiu účinnosť proti línii buniek Hela. Tieto výsledky ukazujú, že všetky kakaové genotypy zahrnujú polyfenolové

reakciu, ktorá vykazuje účinnosť aspoň proti jednej línii ľudskej rakovinovej bunky, ktorá je nezávislé od geografického pôvodu, poľnohospodárskej odrody genotypu.

Ďalšie série testov sa uskutočnili na surových polyfenolových extraktoch pripravených z jednej tony tradičných brazílskych kakaových bôbov, päť dní fermentovaných a potom 4 dni sušených na slnku. Výsledky na obrázku 15L ukazujú, že extrakty v týchto skoro spracovaných štádiách nevykazujú žiadne účinky, čo svedčí o malej zmene v zložení polyfenolov. Avšak je známe, že (Lehrian, D.W., Patterson G.R., In *Biotechnology*; Reed G., ed.; Verlag Chemie: Weinheim, 1983, zväz. 5, kap. 12.) polyfenoloxidáza (PPO) oxiduje počas fermentácie polyfenolmi. S cieľom zistenia vplyvov, ktoré by mohli mať vplyv na účinnosť enzymaticky zoxidovaných polyfenolov, sa uskutočnili ďalšie testy. Surová PPO sa pripravila extrahovaním jemne namletých, nefermentovaných, vymrazených, odtučnených brazílskych kakaových bôbov s acetónom v pomere 1 mg prášku na 10 ml acetónu. Získaná suspenzia sa odstreďovala pri 3 000 ot/min. počas 15 minút. To sa opakovalo trikrát, pričom sa každý raz odstránil supernatant a štvrtá extrakcia sa preliala cez Buchnerov filtračný lievnik. Získaný acetónový prášok sa nechal vysušiť vzduchom a potom sa podrobil testu popísanému McLordom J.D. a Kilarom A., v článku "Control of Enzymatic Browning in Processed Mushrooms (*Agaricus Bisporus*)" *J. Food Sci.*, 48:1 479 (1983). Do roztoku surových polyfenolov (100 mg/ml Citráto-fosfátového pufru, 0,02M, pH 5,5) 100 mg acetónového prášku (4 000 μ /mg proteínu) sa pridalo a nechalo 30 minút miešať prúdom vzduchu prebublávajúcim cez suspenziu. Vzorka sa odstreďovala pri 5 000 xg 15 minút a supernatant extrahoval 3x 20 ml etylacetátu. Etylacetátové výťažky sa zlúčili, vysušili destiláciou pri čiastočnom vákuu a po pridaní 5 ml vody sa lyofilizovali. Pripravený materiál sa testoval proti bunkám HeLa a závislosť odpovede od dávky sa porovnala s tou istou závislosťou surových polyfenolových výťažkov, ktoré neboli enzymaticky ošetrované. Výsledky (obr. 15M) ukazujú značný posun na krivke odpoveď-dávka pre enzymaticky zoxidovaný výťažok, čo ukazuje, že zoxidované produkty sú

účinnějšími inhibítormi než ich prirodzené formy.

Príklad 9: Antioxidačná účinnosť kakaových výťažkov obsahujúcich prokyanidíny

Literatúra uvádza vzťah medzi spotrebou prirodzene sa vyskytujúcich antioxidantov (vitamínov C, E a B-karoténu) a nižším výskytom chorôb zahrnujúcich rakovinu (Designing Foods, Manipulating Foods to Promote Health, Inform, 4:4, 344-369 (1993)). Všeobecne sa uvažuje, že tieto antioxidanty ovplyvňujú určité oxidačné a voľnoradikálové procesy, vrátane niektorých typov nádorového pôsobenia. Okrem toho, niektoré rastlinné polyfenolové zlúčeniny, ktoré sú známe ako antikarcinogénne, takisto vykazujú silné antioxidačné účinky (Ho a kol., 1992, Huang a kol. 1992).

S cieľom stanovenia, či kakaové výťažky obsahujúce prokyanidíny vykazujú antioxidačné vlastnosti, sa použila štandardná Rancimatová metóda. Postupy popísané v príkladoch 1, 2 a 3 sa použili na prípravu kakaových výťažkov, ktoré boli ďalej spracúvané tak, že poskytli dve frakcie gélovej permeačnej chromatografie. Tieto dve frakcie sú aktuálne skombinované frakcie A až C a D a E (pozri obr. 1), ktorých antioxidačné vlastnosti sa porovnávali s antioxidačnými vlastnosťami syntetických antioxidantov BHA a BHT.

Z nepražených arašídových orechov sa vylisoval po odstránení šupiek arašídový olej. Každá testovaná zlúčenina sa naočkovalo do oleja v dvoch koncentráciách, tj. približne 100 ppm a 20 ppm, pričom aktuálne koncentrácie sú uvedené v tabuľke 7. Do každej vzorky sa pridalo 50 µl metanolom solubilizovaného antioxidantu s cieľom pomôcť dispergácii uvedeného antioxidantu. Kontrolná vzorka sa pripravila z 50 µl metanolu neobsahujúceho antioxidant.

Pre každú vzorku sa testovala použitím Rancimatového stabilizačného testu oxidačná stabilita pri 100 °C a 20 cm³/min vzduchu. Testovacie parametre sa zvolili tak, aby zodpovedali

parametrom použitým pri Metóde aktívneho kyslíka (ADM) alebo Swiflovmu testu stability (Van Oosten C.W., Poot C. a Hensen A.C., The Precision of the Swift Stability Test, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 83:4, 133-135 (1981)).

Typická Rancimátová stopa je znázornená na obrázku 16. Výsledky testov je uvedené v tabuľke 8 ako hodiny potrebné na to, aby bola dosiahnutá peroxidová úroveň 100 meq.

T a b u ľ k a 7

Koncentrácia antioxidantov

Vzorka	Koncentrácia 1	Koncentrácia 2
	ppm	
Butyrovany hydroxytoluén (BHT)	24	120
Butyrovany hydroxyanizol (BHA)	24	120
Surová etylacetátová frakcia kakaa	22	110
Frakcia A-C	20	100
Frakcia D-E	20	100

T a b u ľ k a 8

Oxidačná stabilita oleja z podzemnice olejnej s rôznymi antioxidantmi

Vzorka	20 ppm	100 ppm
	Priemer	
Kontrolná	1,5U ± 0,7	
Butyrovany hydroxytoluén (BHT)	16,5 ± 2,1	12,5 ± 2,1
Butyrovany hydroxyanizol (BHA)	13,5 ± 2,1	14,0 ± 1,4
Surová kakaová frakcia	18,0 ± 0,0	19,0 ± 1,4
Frakcia A-C	16,0 ± 6,4	17,5 ± 0,0
Frakcia D-E	14,0 ± 1,4	12,5 ± 0,7

Tieto výsledky demonštrujú zvýšenú oxidačnú stabilitu arašídového oleja so všetkými testovanými aditívami. K najvyššiemu zvýšeniu oxidačnej stability došlo u vzorky naočkovanej surovým etylovým výťažkom kakaa. Tieto výsledky demonštrujú, že kakaové výťažky obsahujúce prokyanidíny majú antioxidačný potenciál rovný zhodným množstvám syntetického BHA a BHT alebo vyšší. V súlade s vynálezom je možné kakaové výťažky použiť namiesto BHA a BHT, napríklad ako antioxidant a/alebo potravinárske aditívum. A v tomto ohľade je nutné uviesť, že vynález je z jedlého zdroja. Na základe týchto výsledkov môže odborník v danom obore takisto ľahko určiť vhodné množstvo extraktov pre takéto aplikácie, napr. množstvo pridávané do potravín bez zbytočných experimentov.

Príklad 10: Štúdia inhibície Topoizomerázy II

DNA topoizomerázy I a II sú enzýmy, ktoré katalyzujú štiepenie a opakované spájanie DNA reťazcov a tým kontrolujú topologické stavy DNA (Wang J.C., DNA Topoisomerases, Ann. Rev. Biochem., 54, 665-697 (1985)).

Okrem štúdie intracelulárnej funkcie topoizomerázy bolo jedným z najpodstatnejších nálezov označenie topoizomerázy II za primárny bunkový cieľ pre mnohé klinicky dôležité protinádorové zlúčeniny (Yamashita Y., Kawada S.Z. a Nakano H., Induction of Mammalian Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Monintercalative Flavanoids, Genostein and Orbol., Biochem Pharm., 39:4, 737-744 (1990)) zahrnujúcich vnútorne katalytické činidlá (m-AMSA, Adriamycín a ellipiticín), rovnako ako aj vnútorne nekatalytické epipodofyllotoxíny. Niekoľko línií ukazuje, že spoločnou vlastnosťou niektorých protinádorových liečiv je stabilizácia komplexu DNA-topoizomerázy II ("čistiaceho komplexu"), ktorý o vystavení denaturujúcim činidlám vedie k indukovaniu DNA štiepenia (Muller M.T., Helal K., Soisson S a Spitzer, J.R., A Rapid and Quantitative Microtiter Assa for Eukaryotic Topoisomerase II, Nuc. Acid. Res., 17:9 499 (1989)). Zistilo sa, že tvorba čistiaceho komplexu spočíva v tom, že

protinádorové liečivá produkujú objemné DNA aduktov, vedie k zahubeniu buniek.

V súlade s týmto príťažlivým modelom sa použil nový špecifický induktor čistiaceho komplexu DNA-topoizomerázy II ako protinádorové, protirakovinové a protinovotvarové činidlo. Pri pokusoch identifikovať aktivity cytotoxickéj zlúčeniny, ktorých cieľom je DNA, sa testovali zvýšené cytotoxické účinky kakaových prokyanidov proti niekoľkým bunkovým líniam citlivým na poškodenie DNA a uskutočnil sa enzymatický test pri použití ľudskej topoizomerázy II získanej z lymfómu.

A. Dekantácia kinetoplastickej DNA topoizomerázou

Inhibícia topoizomerázovej II dekantácie kinetoplastovej DNA *in vitro* sa určila podľa Mullera M.T., Helala K., Soissona S a Spitzera, J.R., A Rapid and Quantitative Microtiter Assa for Eukaryotic Topoisomerase II, *Nuc. Acid. Res.*, 17:9 499 (1989)) nasledujúcim spôsobom. Z ľudskeho lymfómu sa modifikáciou metód Millera K.G., Lia L.F a Englunga P.A., Homogenous Type II DNA Topoisomerase from Hela Cell Nuclei, *J. Biol. Chem.*, 256:9 334 (1981) a Danksa M.K., Schmidta C.A., Cirtaina M.C., Sutlea D.P. a Becka W.T., Altered Catalytic Activity of and DNA Cleavage by DNA Topoisomerase II from Human Leukemic Cells Selected for Resistance to VM-26, *Biochem.*, 27:8 861 (1988) pripravili jadrové extrakty majúce topoizomerázovú I účinnosť. Jedna jednotka čisteného enzýmu bola dostatočná pre dekantáciu 0,25 µg kinetoplastovej DNA počas 30 minút pri 34 °C. Kinetoplastová DNA sa získala z trypanozómu *Crithidia fasciculata*. Každá reakcia sa uskutočňovala v 0,5 ml mikrocentrifugovej skúmavke obsahujúcej 19,5 µl H₂O, 2,5 µl desaťnásobku pufru (jeden násobok pufru obsahuje 50 mM tris-HCl, pH 8,0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 0,5 mM ditiotreitolu a 30 µg BSA/ml), 1 µl kinetoplastovej DNA (0,2 µg) a 1 µl DMSO - s obsahom rôznych koncentrácií kakaových prokyanidínových frakcií. Táto kombinácia sa dokonale premiešala a udržiavala v ľade. Jedna jednotka topoizomerázy sa pridala bezprostredne pred inkubáciou do vodného kúpeľa s

teplotou 34 °C, kde sa nechala 30 minút.

Po inkubácii sa dekatenačný test zastavil pridaním 5 µl koncového pufru (5% sarkozyly, 0,0025% brómfenolovej modrej, 25% glycerolu) a vzorka sa umiestila na ľad. DNA sa podrobila na 1% agarózovom géle elektroforéze v TAE pufri obsahujúcom etidiumbromid (0,5 µg/ml). Osvetlenie UV pri 310 nm vlnovej dĺžke umožnilo vizualizáciu DNA. Gély sa vyfotografovali použitím fotoaparátu Polaroid Land.

Obr. 17 ukazuje výsledky týchto experimentov. Úplne katenovaná kinetoplastická DNA nemigrovala do 1% agarózového gélu. Dekantácia kinetoplastovej DNA topoizomerázou II generuje pásy monomérskej DNA (monomérsny kruh, formy I a II), ktoré migrujú do gélu. Inhibícia enzýmu pridaním kakaových prokyanidínov sa prejavuje na postupnom vymiznutí monomérsnych pásov, ako vzrastajúca koncentrácia. Z týchto výsledkov vyplýva, že prokyanidínové frakcie A, B, D a E inhibujú topoizomerázu II pri koncentráciách pohybujúcich sa v rozmedzí od 0,5 do 5,0 µg/ml. Tieto inhibičné koncentrácie boli veľmi podobné koncentráciám získaným pre mitoxantron a m-AMSA [4'-(9-akridinyl-amino)metánsulfón-m-anizidid].

B. Bunkové línie citlivé na liečivo

Zisťovala sa cytotoxicita kakaových bôbov proti niekoľkým bunkovým líniám DNA citlivých na poškodenie. Jednou z týchto bunkových línií bol mutant opravujúci rozštiepenie dvojitého reťazca xrs-6 DNA vyvinutý P. Jegoom P.A., Caldecottom K., Pidsleyom S. a Banskom G.R., v článku "Sensitivity of Chinese Hamster Ovary Mutants Defective in DNA Double Strand Break Repair to Topoisomerase II Inhibitors", *Cancer Res.*, 49:7 057 (1989) (Kemp L.M., Sedwick S.G. a Jeggo P.A., X-ray Sensitive Mutants of Chinese Hamster Ovary Cells Defective in Double Strand Break Rejoining, *Mutant. Res.*, 132:189 (1984)). DNA opravná deficiencia xrs-6 bunkovej línie udeľuje zlúčeninám, ktoré produkujú štiepenie DNA dvojitého reťazca, napríklad bleomycínu, a

zlúčeninám, ktoré inhibujú topoizomerázu a môžu tak vyvolávať štiepenie dvojitého reťazca nepriamo, citlivosť predovšetkým voči röntgenovému žiareniu (Warters R.L., Lyons B.W., Li T.M. a Chen D.J., Topoisomerase II Activity a DNA Double-Strand Break Repair Deficient Chinese Hamster Ovary Cell Line, Mutant. Res., 254:167 (1991)). Cytotoxicita proti deficientnej línii sa porovnávala s cytotoxicitou proti COH línii schopnej opraviť DNA, BR1. Zvýšená cytotoxicita proti pre opravu deficientnej (xrs-6) línii sa interpretovala ako evidencia vzniku štiepenia DNA štiepiteľného dvojitého reťazca.

Na opravu DNA kompetentnej CHO línie BR1 bola vyvinutá Barrowsom, L.R., Borchersom, A.H. a Paixtonom, M.B., Transfectant CHO Cella Expressing O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase Display Increased Resistance to DNA Damage Other than O⁶-guanine Alkylation, Carcinogenesis, 8:1 853 (1987), ktorá exprimuje O⁶-alkylguanín-DNA-alkyltransferázu, okrem normálnych DNA opravujúcich enzýmov. Obidve tieto línie sa nechali rásť ako monovrstvy v alfa-MM obsahujúcom sérum a antibiotiká, ako popisuje príklad 6. Bunky boli udržiavané v navlhčenej 5% CO₂ atmosfére pri 37 °C. Pred ošetrením kakaovými prokyanidmi sa bunky rastúce ako monovrstvy spojili použitím trypsínového ošetrenia. Testy sa uskutočňovali použitím MTT testovacieho postupu popísaného v príklade 6.

Výsledky (obr. 18) nenaznačujú žiadne zvýšenie cytotoxicity proti xrs-6 bunkám, čo ponúka možnosť, že kakaové prokyanidy pre inhibíciu topoizomerázy II využili iný spôsob než štiepenie štiepiteľného dvojitého reťazca. To znamená, že kakaové prokyanidy vzájomne vnútorne reagovali s topoizomerázou II pred tým, ako reagoval s DNA za vzniku nerozštiepiteľného komplexu.

Zlúčeniny tvoriace nerozštiepiteľný komplex sú relatívne novým objavom. Členovia antracyklínov, podofylinných alkaloidov, antracendiónov, akridínov ellipticínov sú využívaní pre klinické protinádorové, protirakovinové alebo antineoplastické aplikácie a produkujú štiepiteľné komplexy (Liu L.F., DNA Topoisomerase

Poisons as Antitumor Drugs, *Ann. Rev. Biochem.*, 58? 351-375 (1989)). Nedávno bolo identifikovaných niekoľko inhibítorov topoizomerázy II, ktoré, ako sa zdá, neprodukujú štiepateľné komplexy. Tieto inhibítory zahŕňujú amonafid (Hsiang I.H., Jiang J.B. a Liu L.F., *Topoisomerase II Mediated DNA Cleavage by Amonaside and Its Structural Analogs*, *Mol. Pharmacol.*, 36, 371-376 (1989)), *distamycin* (Fesen M. a Pommier Y., *Mammalian topoisomerase II Activity is Modulated by the DNA Minor Groove Binder - Distamycin in Simian Virus 40 DNA*, *J. Biol. Chem.*, 264:11 354-11 359 (1989)), flavanoidy (Yamashita Y., Kawada S.Z. a Nakano H., *Induction of Mammalian Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Monintercalative Flavanoids, Genostein and Orbol.*, *Biochem Pharm.*, 39:4, 737-744 (1990)), saintopin (Yamashita Y., Kawada S.Z., Fujii N. a Nakano H., *Induction of Mammalian DNA Topoisomerase I and II Mediated DNA Cleavage by Saintopin, a New Antitumor Agent from Fungus*, *Biochem.*, 30, 5 838-5 845 (1991)), membraanon (Drake F.H., Hofmann G.A., Mong S.M., Bartus J.O., Hertzberg R.P., Johnson R.K., Matten M.R. a Mirabelli C.K., *In vitro and Intercellular Inhibition of topoisomerase II by the Antitumor Agent Membrane Cancer Research*, 49, 2 578-2 583 (1989)), terpenoidy (Kawada S.Z., Yamashita Y., Fujii N. a Nakano H., *Induction of Head Stable Topoisomerase II-DNA Cleavable Complex by Nonintercalative Terpenoids, Terpetecin and Clerocidin*, *Cancer Research*, 51, 2 922-2 929 (1991)), antrapyrazoly (Fry D.W., Boritzki T.J., Besserer J.A. a Jackson R.C., *In vitro Strand Scission and Inhibition of Nucleic Acid Synthesis on L1210 Leukemia Cells by a New Class of DNA Complexes, the Anthra [1,9-CD]Pyrazol-6(2H)-ones (Anthrapyrazoles)*, *Biochem., Pharmacol.*, 34, 3 499-3 508 (1985)), dioxopiperazíny (Tanabe K., Ikegami Y., Ishida R. a Andoh T., *Inhibition of Topoisomerase II by Antitumor Agents bis (2,6-dioxopiperazine) Derivates*, *Cancer Research*, 51, 4 903-4 908 (1991)) a námorný akridín-dekricín (Burres N.S., Sazesh J., Gumawardana G.P. a Clement J.J., *Antitumor Activity and Nucleic Binding Properties of Dercitin, a New Acridine Alkaloid Isolated form a Marine *Dercitus* Species Sponke*, *Cancer Research*, 49, 5 267-5 274 (1989)).

Pretože kakaové prokyanidíny inaktivujú pred vznikom štiepateľných komplexov topoizomerázy II, majú buď samotné, alebo v kombinácii s ďalšími známymi a mechanisticky definovanými inhibítormi topoizomerázy II určitú chemoterapeutickú hodnotu. Okrem toho sa takisto zdá, že kakaové prokyanidy sú novou triedou inhibítorov topoizomerázy II (Kashiwada Y., Nonaka G.I., Nishioka I., Lee K.J.H., Bori I., Fukushima Y., Bastow K.F a Lee K.H., Tannin as Potent Inhibitors of DNA Topoisomerase II in vitro, J. Pharm. Sci., 82:5, 487-492 (1993)) a mohli by byť teda menej toxické voči bunkám, než ďalšie známe inhibítory, čím by sa zvyšovala ich použiteľnosť pri chemoterapii.

Parenterálne línie MCF-7 p168 Bunkovej línie MCF-7 (ADR) ľudskej prsnej rakoviny, ktorá exprimuje glykoproteín (gp 170) viazaný na membránu, ktorý vykazuje rezistenciu voči viacerým liečivám (Leonessa F., Jacobson M., Boile L., Lippman J., McGarvey M. a Clarke R., Effect of Tamoxifen on the Multidrug-Resistant Phenotype in Human Breast Cancer Cells: Isobolograms, Drug Accumulation, and M170,000 Glycoprotein (gp 170) Binding Studies, Cancer Research, 54, 441-447 (1994)) sa použili na testovanie účinkov kakaovej frakcie D&E. Ako ukazuje obrázok 19, parenterálna línia bola inhibovaná pri zvyšujúcich sa dávkových koncentráciách frakcie D&E, zatiaľ čo Adriamycínová (ADR) rezistentná línia bola pri vyšších dávkach menej účinná. Tieto výsledky ukazujú, že kakaová frakcia D&E má vplyv na bunkové línie odolné voči väčšiemu počtu liečiv.

Príklad 11: Syntéza prokyanidínov

Syntéza sa uskutočňovala postupom, ktorý vyvinul Delcour J.A., Ferreira D. a Rouks D.G. a je popísaný v "Synthesis of Condensed Tannins, Part 9, The Condensation Sequence of Leucocyanidin with (+)-Catechin and with the resultant Procyanidins", J. Chem. Soc. Perkin Trans. I., 1 711-1 717 (1983) a ktorý sa uskutočňoval bez ďalších modifikácií. Okrem kondenzovania (+)-katechínu s dihydrokvercetínom pri redukujúcich

podmienkach, sa takisto použil (-)-epikatechín s cieľom reflektovať vyššie koncentrácie (-)-epikatechínu než ako sú prirodzene obsiahnuté v nefermentovaných kakaových bôboch. Tieto produkty syntézy sa izolovali, čistili, analyzovali a identifikovali postupmi popísanými v príkladoch 3, 4 a 5. Týmto spôsobom sa pripravili biflavanoidy, triflavanoidy a tetraflavanoidy a tie sa použili ako štandardy spôsobom popísaným vyššie v súvislosti s kakaovými výťažkami.

Príklad 12: Test normálnych fázových polopreparatívnych frakcií

Vzhľadom na to, že sú polyfenolové výťažky kompozičnými komplexmi, je nevyhnutné určiť, ktoré zložky boli pri čistení, testoch dávka-odpoveď a obsiahlej štruktúrnej identifikácii aktívne proti líniam rakovinových buniek. Na separovanie kakaových prokyanidínov s bázou s oligomérou veľkosťou sa použila polopreparatívna HPLC separácia (príklad 3B) s normálnymi fázami. Okrem pôvodného výťažku sa pripravilo 12 frakcií (obr. 2B a 150) a tie sa testovali v dávkach 100 $\mu\text{l/ml}$ a 25 $\mu\text{l/ml}$ proti Hela bunkovej línii s cieľom určiť, ktorý oligomér vykazuje najvyššiu aktivitu. Ako ukazuje obr. 20, frakcie 4 až 11 (pentamér až dodekamér) vykazujú IC_{50} hodnoty približne 25 $\mu\text{l/ml}$. Tieto výsledky ukazujú, že tieto špecifické oligoméry majú najvyššiu účinnosť proti Hela bunkám. Okrem toho, normálna fázová HPLC analýza kakaovej frakcie D&E ukázala, že táto frakcia je obohatená uvedenými špecifickými oligomérmi.

Z predchádzajúceho je zrejmé, že tento kakaový výťažok a kakaové polyfenoly, rovnako ako spôsob ich výroby a sada podľa vynálezu, sú využiteľné. V tomto ohľade je potrebné uviesť, že vynález pochádza z jedlého zdroja a účinnosť in vitro môže demonštrovať aspoň dajakú účinnosť in vivo, predovšetkým ak sa zoberú do úvahy vyššie diskutované dávky.

Okrem toho, vyššie uvedený popis ukazuje, že kakaový výťažok a kakaové polyfenoly, rovnako ako aj ich kompozície, spôsob ich

výroby a sada podľa vynálezu, majú antioxidačnú účinnosť zhodnú s účinnosťou BHT a BHA a rovnako tak aj oxidačnú stabilitu. Takže vynález je možné takisto použiť namiesto BHT alebo BHA v známych aplikáciách BHA resp. BHT, ako antioxidant, napríklad antioxidačné potravinové aditívum. Vynález je možné takisto použiť namiesto inhibítorov topoizomerázy pri v súčasnosti známych aplikáciách. V súlade s tým vynález ponúka mnohé kompozície a spôsoby, napríklad antioxidačné alebo konzervačné kompozície, kompozície inhibujúce topoizomerázu, spôsoby konzervácie potravín alebo ľubovoľných požadovaných výrobkov, napríklad pred oxidáciou a spôsoby inhibovania topoizomerázy, ktoré zahŕňujú buď výťažok kakaa a/alebo kakaový polyfenol alebo polyfenoly, alebo ktoré zahŕňujú uvedenie potravín, výrobkov alebo topoizomerázy do kontaktu s príslušnou kompozíciou alebo s kakaovým výťažkom a/alebo kakaovým polyfenolom alebo polyfenolmi.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstate čistý kakaový výťažok alebo syntetický polyfenol alebo polyfenoly, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje oligoméry 3 až 12 polyfenolu alebo polyfenolov.

2. V podstate čistý kakaový výťažok podľa nároku 1, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že je vyrobený spôsobom zahrnujúcim:

redukované kakaových bôbov na prášok,
odtučnenie prášku a
extrahovanie a čistenie kakaového polyfenolu alebo polyfenolov z prášku.

3. V podstate čistý kakaový výťažok podľa nároku 2, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že spôsob redukovania kakaových bôbov na prášok zahrnuje:

vymrazovanie bôbov a dužiny,
zbavenie vymrazenej hmoty dužiny,
zbavenie vymrazených kakaových bôbov šupky a
namletie šupiek zbavených bôbov.

4. V podstate čistý kakaový výťažok podľa niektorého z nárokov 2 alebo 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že spôsob výroby ďalej zahrnuje čistenie výťažku gélovou permeačnou chromatografiou a/alebo preparatívnu vysokovýkonnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

5. V podstate čistý kakaový výťažok podľa nároku 1, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že v podstate obsahuje oligoméry 5 až 12 polyfenolu alebo polyfenolov.

6. Antioxidačná kompozícia, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje v podstate čistý kakaový výťažok alebo

syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly podľa nároku 5 a vhodný nosič.

7. Antioxidačná kompozícia podľa nároku 6, v y z n a č u - j ú c a s a t ý m, že obsahuje kakaové prokyanidíny vyrobené spôsobom zahrnujúcim:

redukované kakaových bôbov na prášok,
odtučnenie prášku a
extrahovanie a čistenie kakaového polyfenolu alebo polyfenolov z prášku.

8. Antioxidačná kompozícia podľa nároku 7, v y z n a č u - j ú c a s a t ý m, že spôsob redukovania kakaových bôbov na prášok zahrnuje:

vymrazovanie bôbov a dužiny,
zbavenie vymrazenej hmoty dužiny,
zbavenie vymrazených kakaových bôbov šupky a
namletie šupiek zbavených bôbov.

9. Antioxidačná kompozícia podľa nároku 7 alebo 8, v y z - n a č u j ú c a s a t ý m, že spôsob výroby ďalej zahrnuje čistenie výťažku gélovou permeačnou chromatografiou a/alebo preparatívnu vysokovýkonnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

10. Sada na ošetrovanie pacienta, v prípade potreby ošetrovanie antineoplastickým činidlom, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že v podstate obsahuje čistý kakaový výťažok alebo syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly podľa nároku 5 a vhodný nosič.

11. Sada podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje inštrukcie na zmiešavanie jednotlivých zložiek alebo informácie týkajúce sa spôsobu podania pacientovi.

12. Lyofilizovaná antineoplastická kompozícia, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje v podstate čistý kakaový

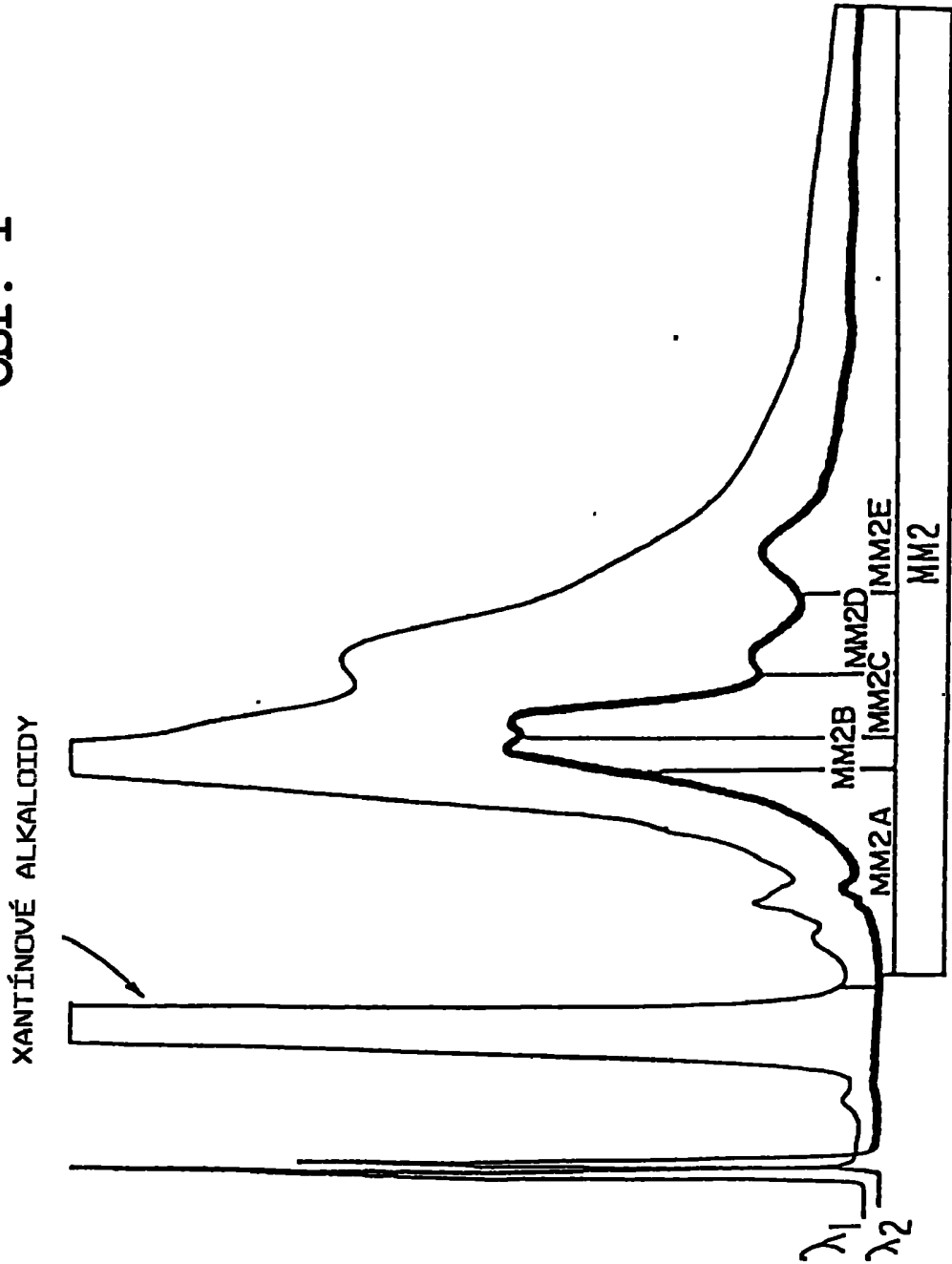
výťažok alebo syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly podľa nároku 5 a vhodný nosič.

13. Antioxidačná alebo konzervačná kompozícia, v y z n a -
č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje v podstate čistý kakaový
výťažok alebo syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly podľa
nároku 1.

14. Kompozícia inhibujúca topoizomerázu, v y z n a č u j ú -
c a s a t ý m, že obsahuje v podstate čistý kakaový výťažok
alebo syntetický kakaový polyfenol alebo polyfenoly podľa nároku
1.

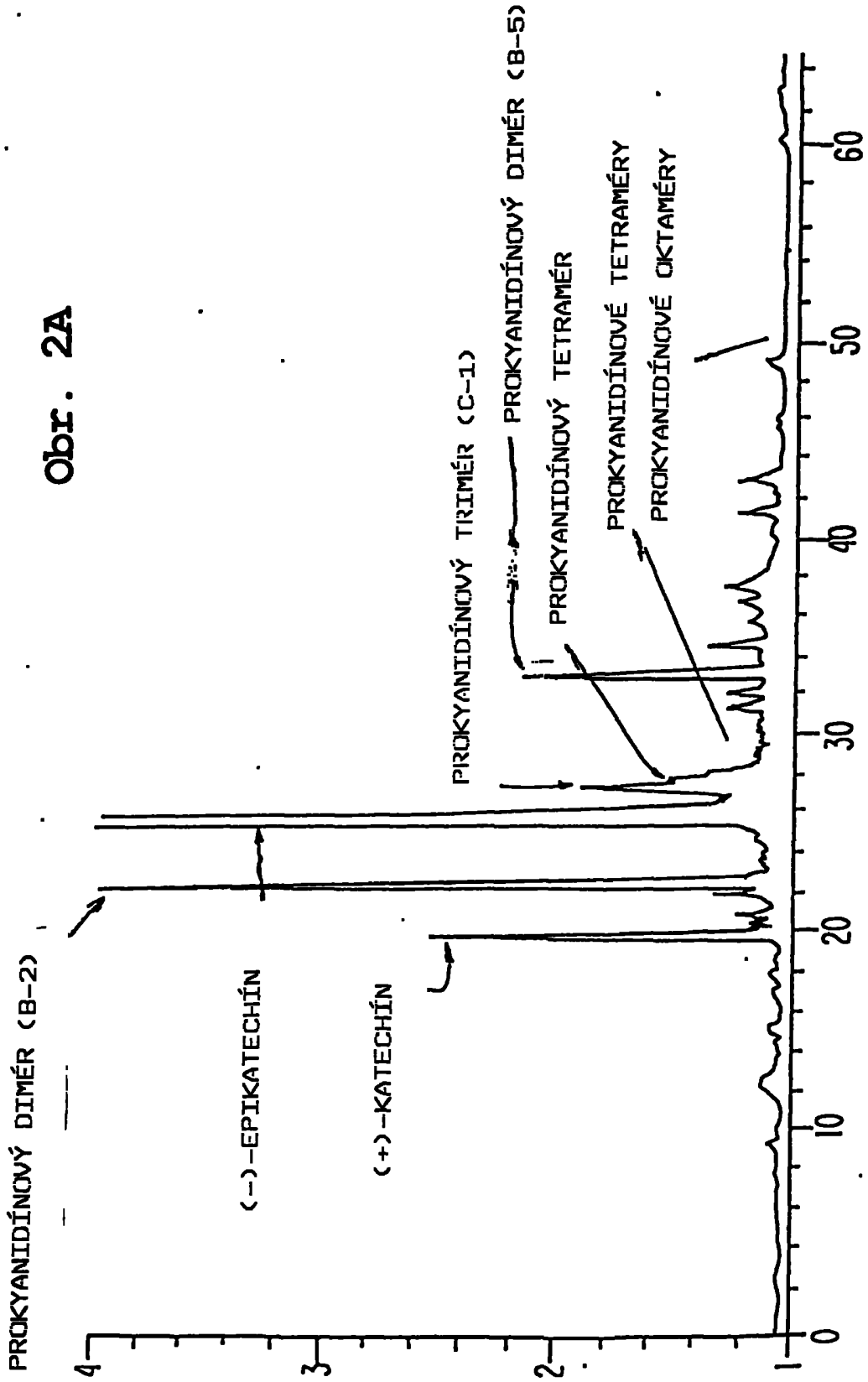
1/91

Obr. 1



2/91

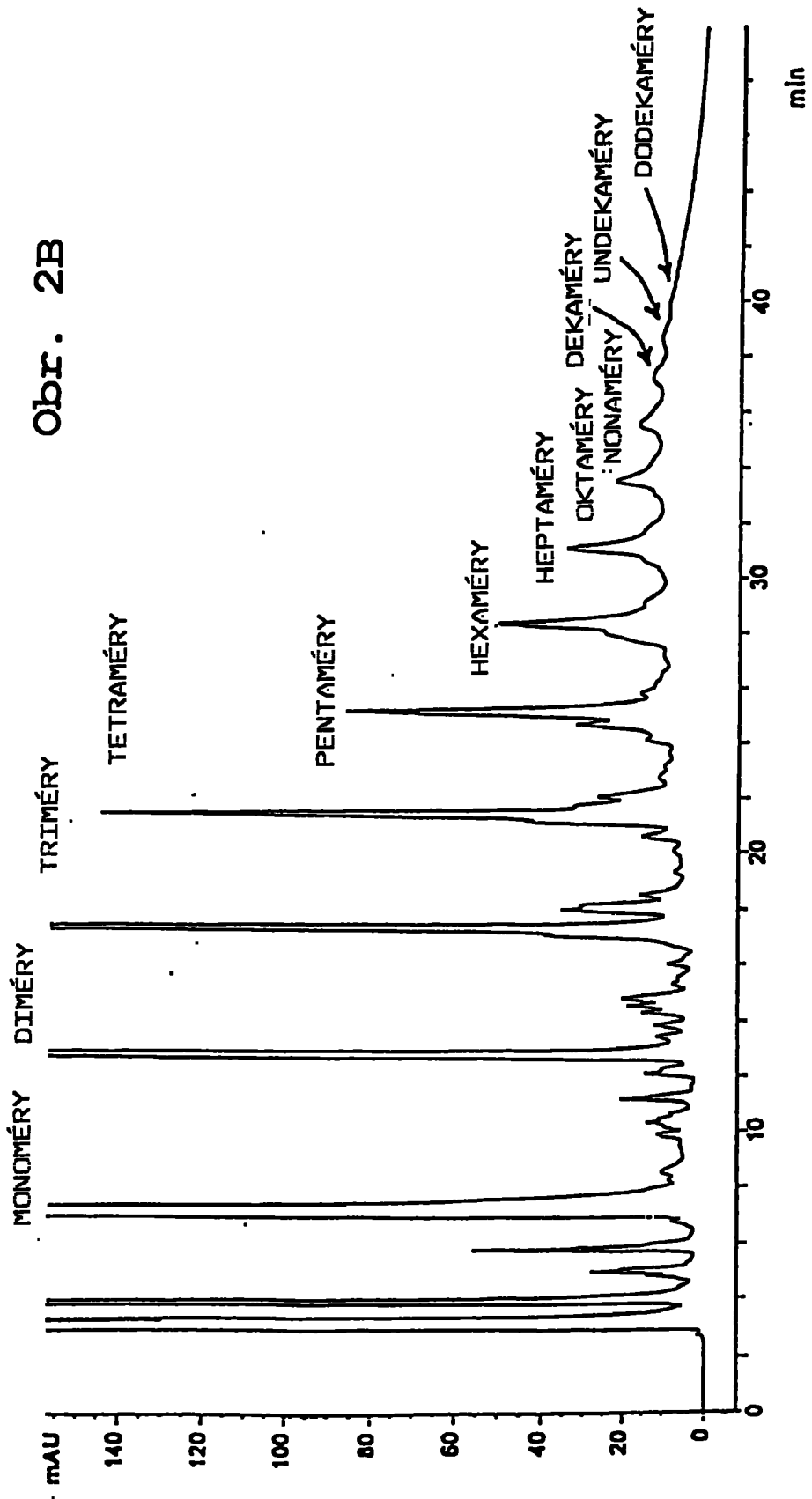
Obr. 2A



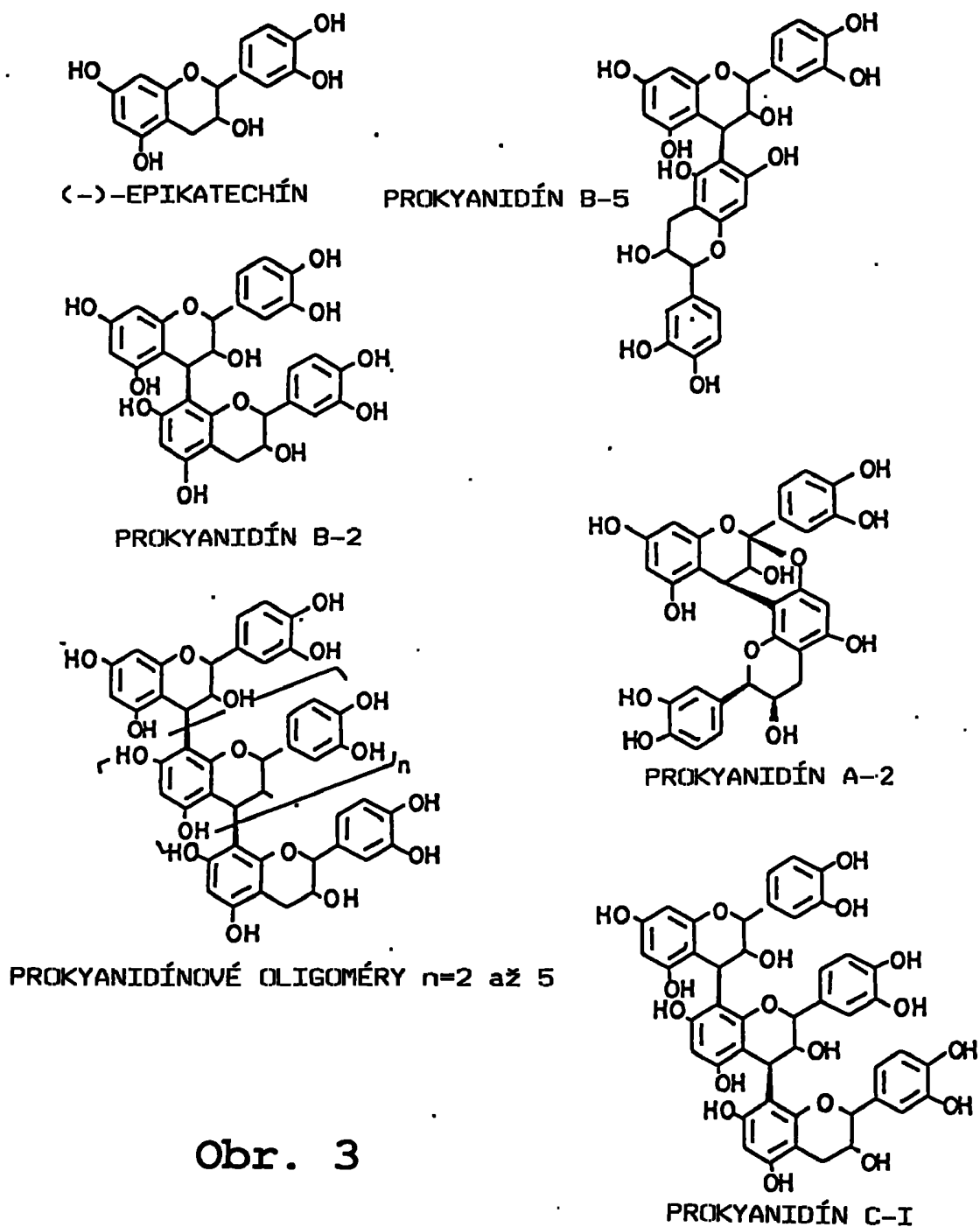
3/91

DADI A, Sig = 280, 4 Ref = 580, 40 of 4078/009-0401.D

Obi. 2B



4/91

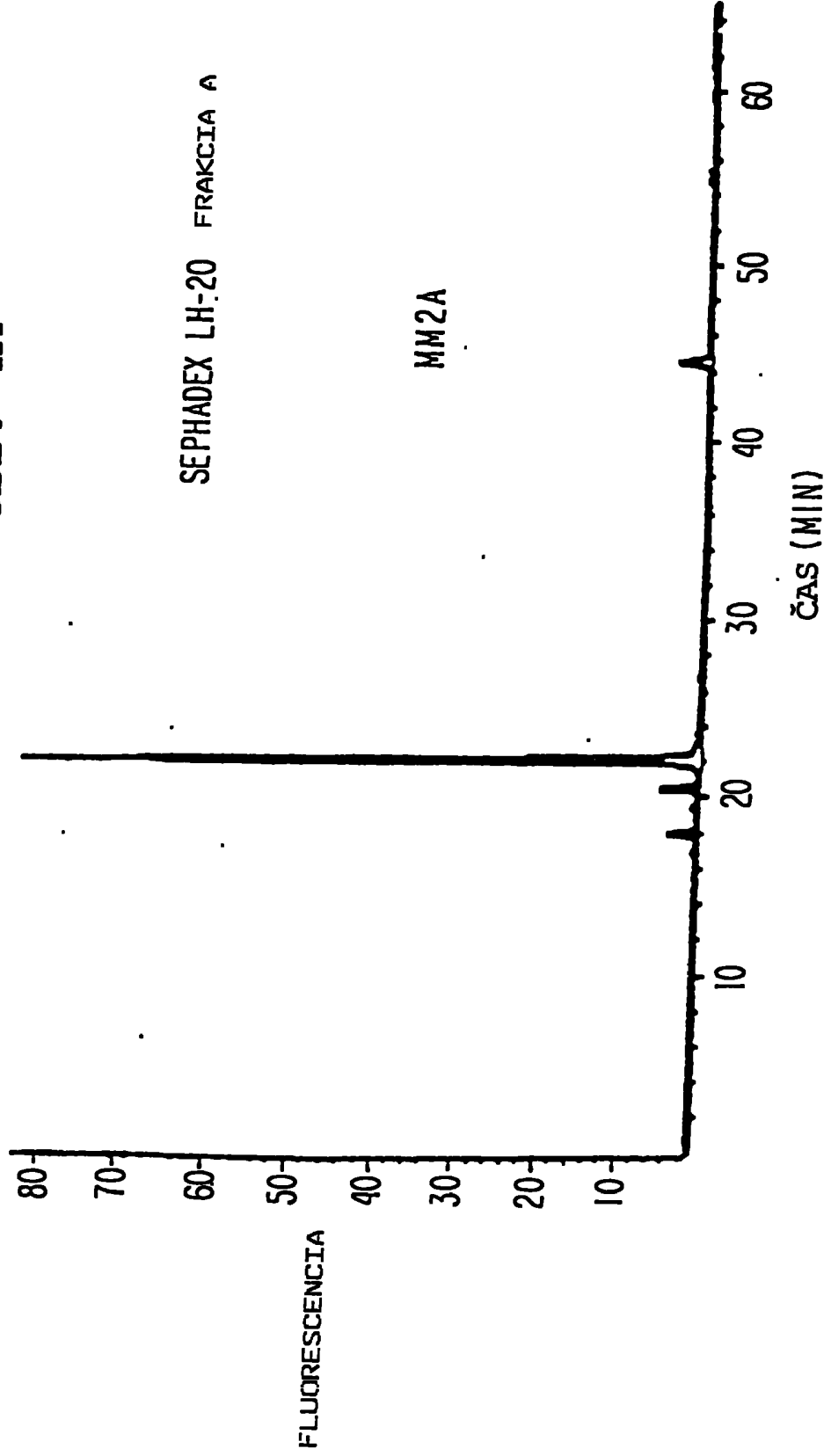


5/91

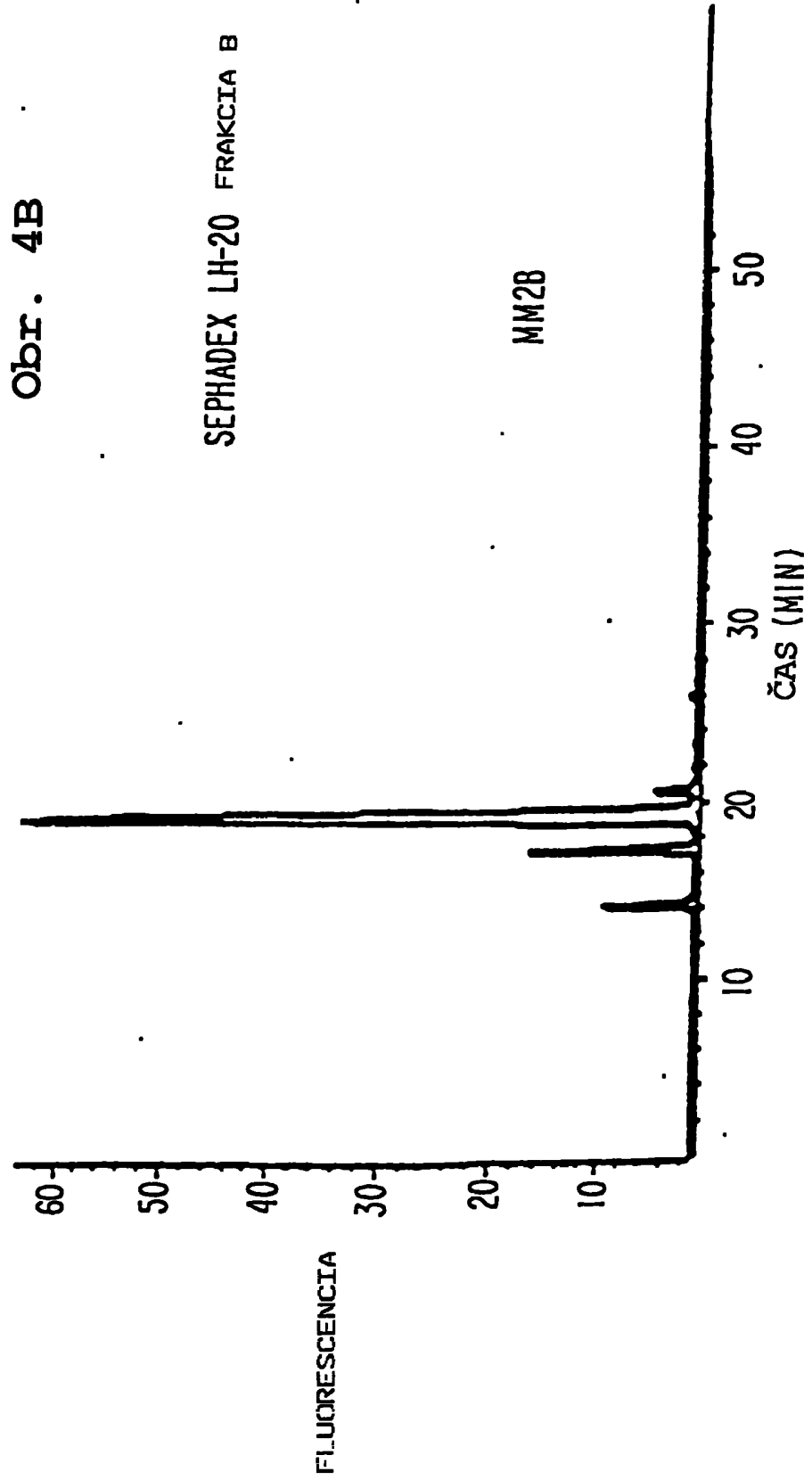
Obř. 4A

SEPHADEX LH-20 FRAKCIA A

MM2A



6/91

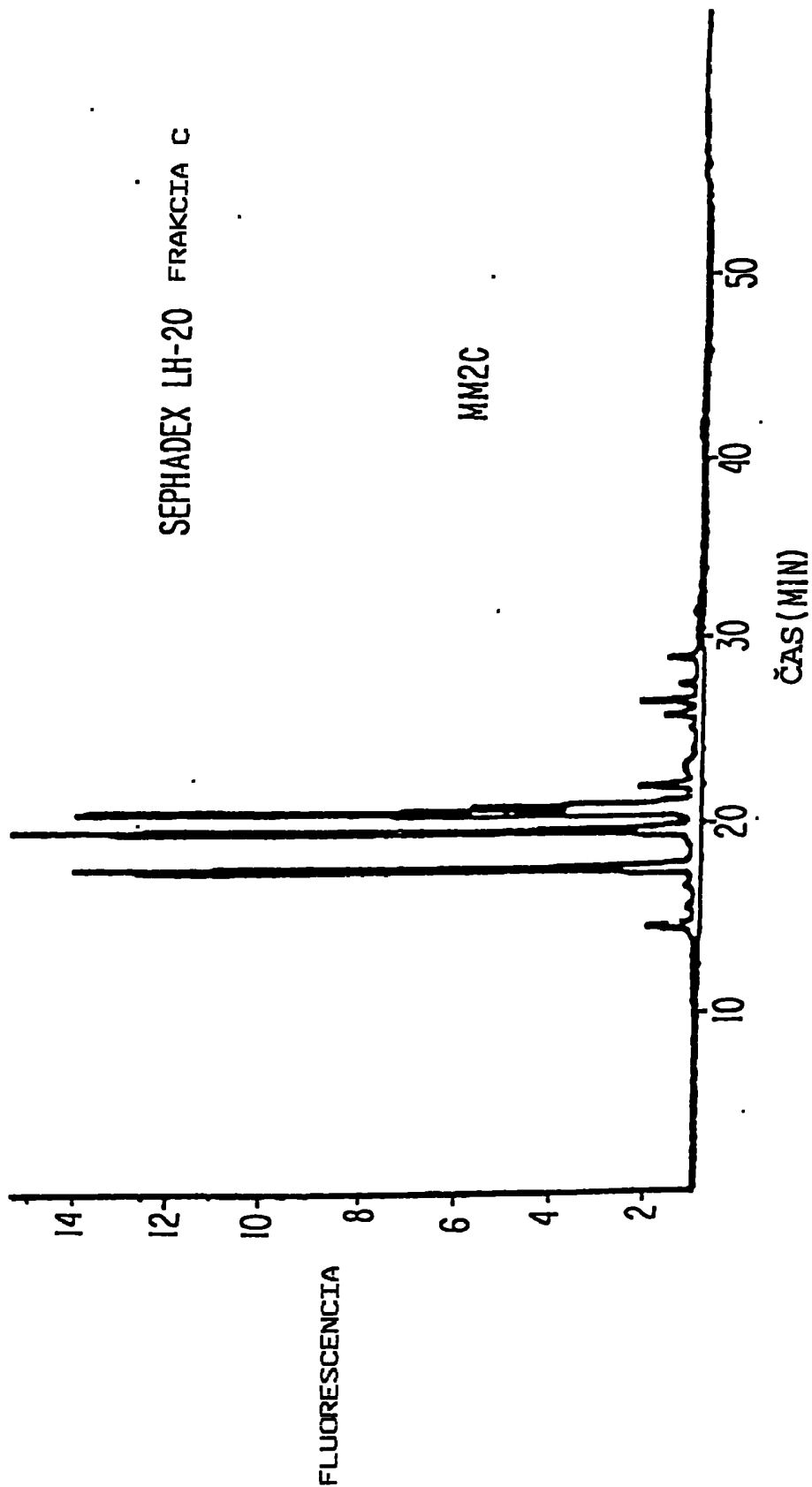


7/91

Obr. 4C

SEPHADEX LH-20 FRAKCIA C

MM2C

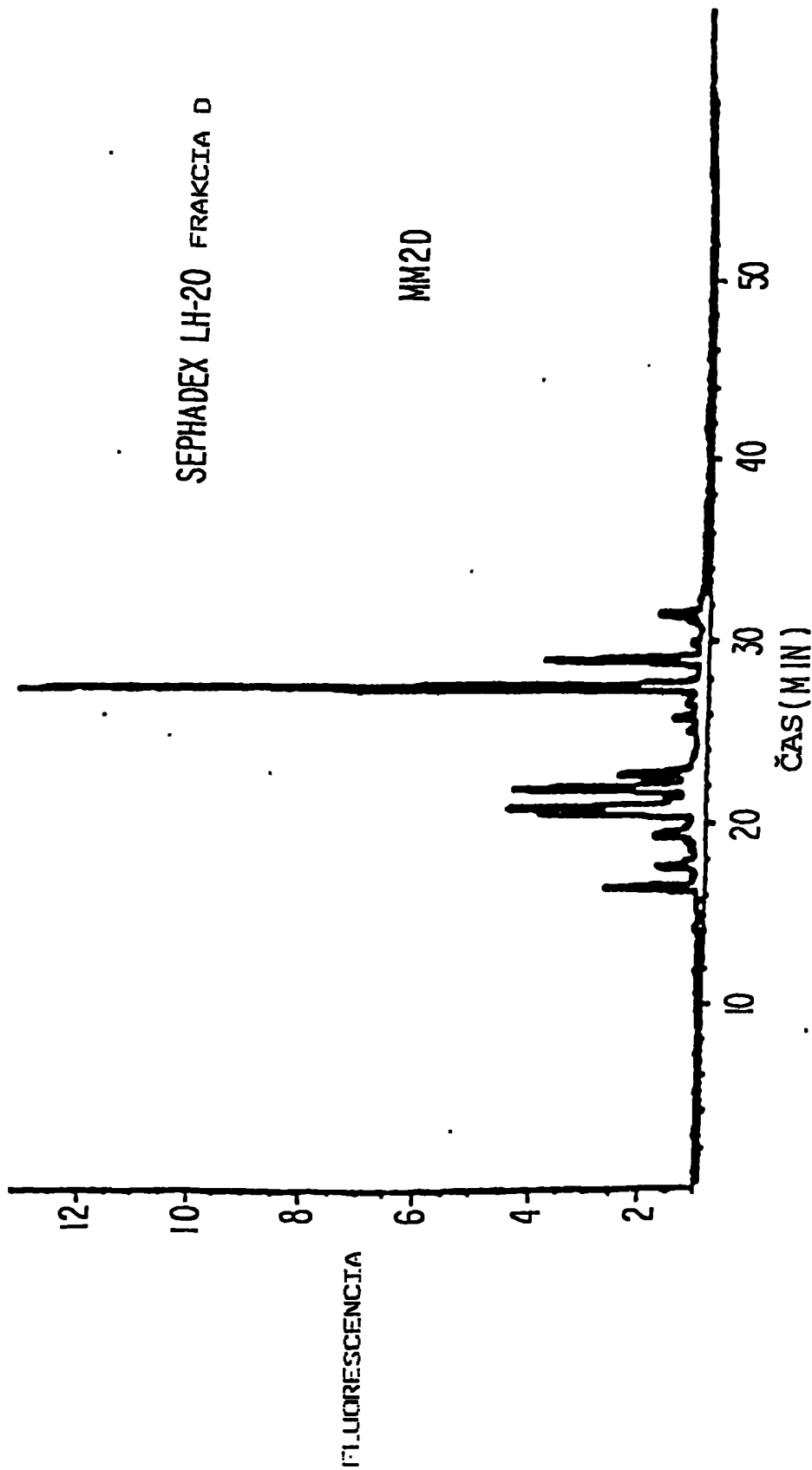


8/91

Obr. 4D

SEPHADEX LH-20 FRAKCIA D

MM20

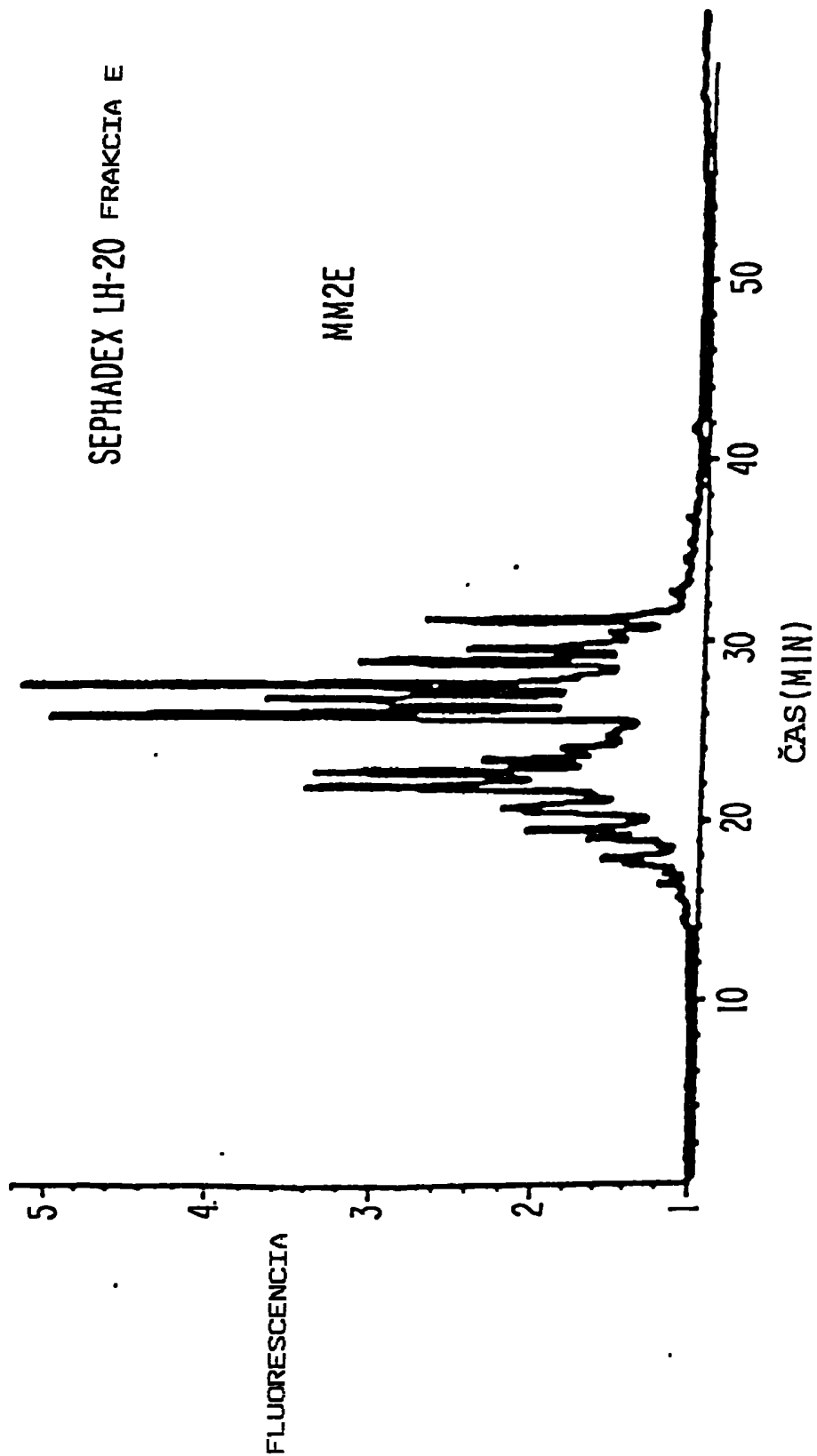


9/91

Obr. 4E

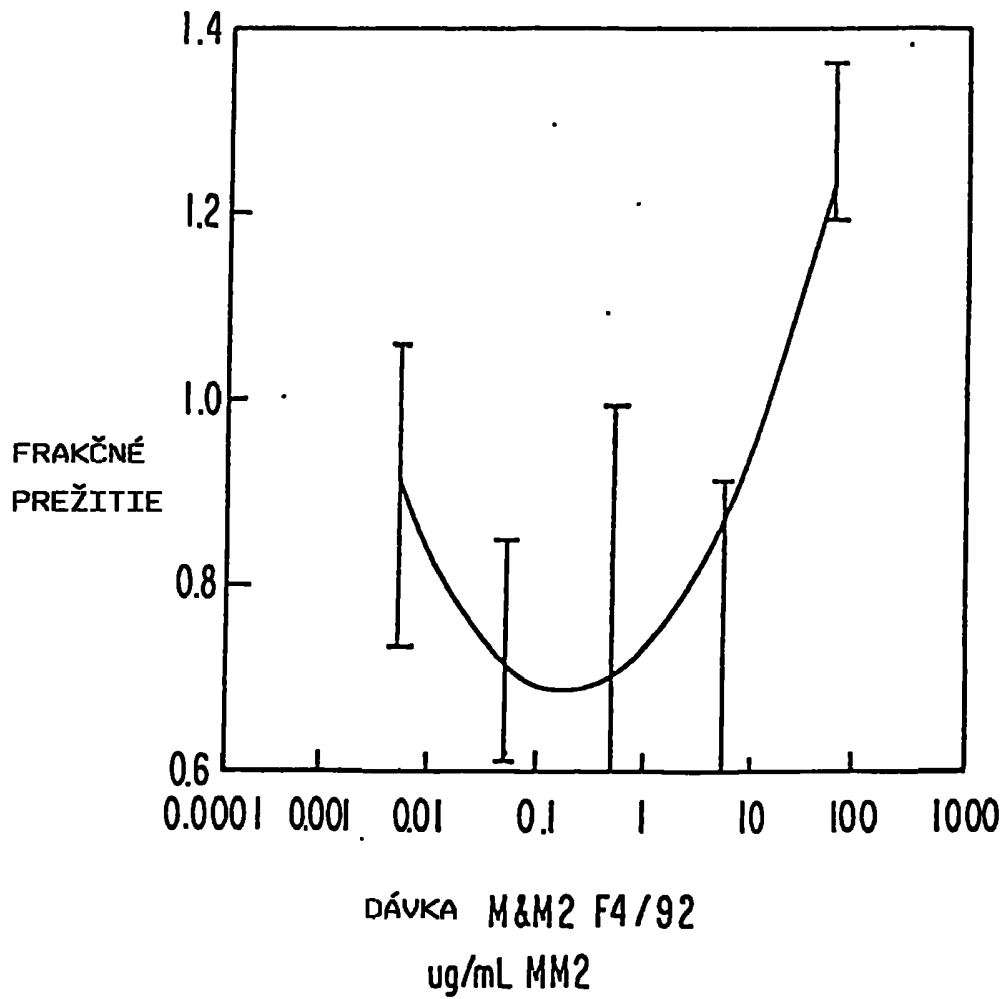
SEPHADEX LH-20 FRAKCIA E

MM2E

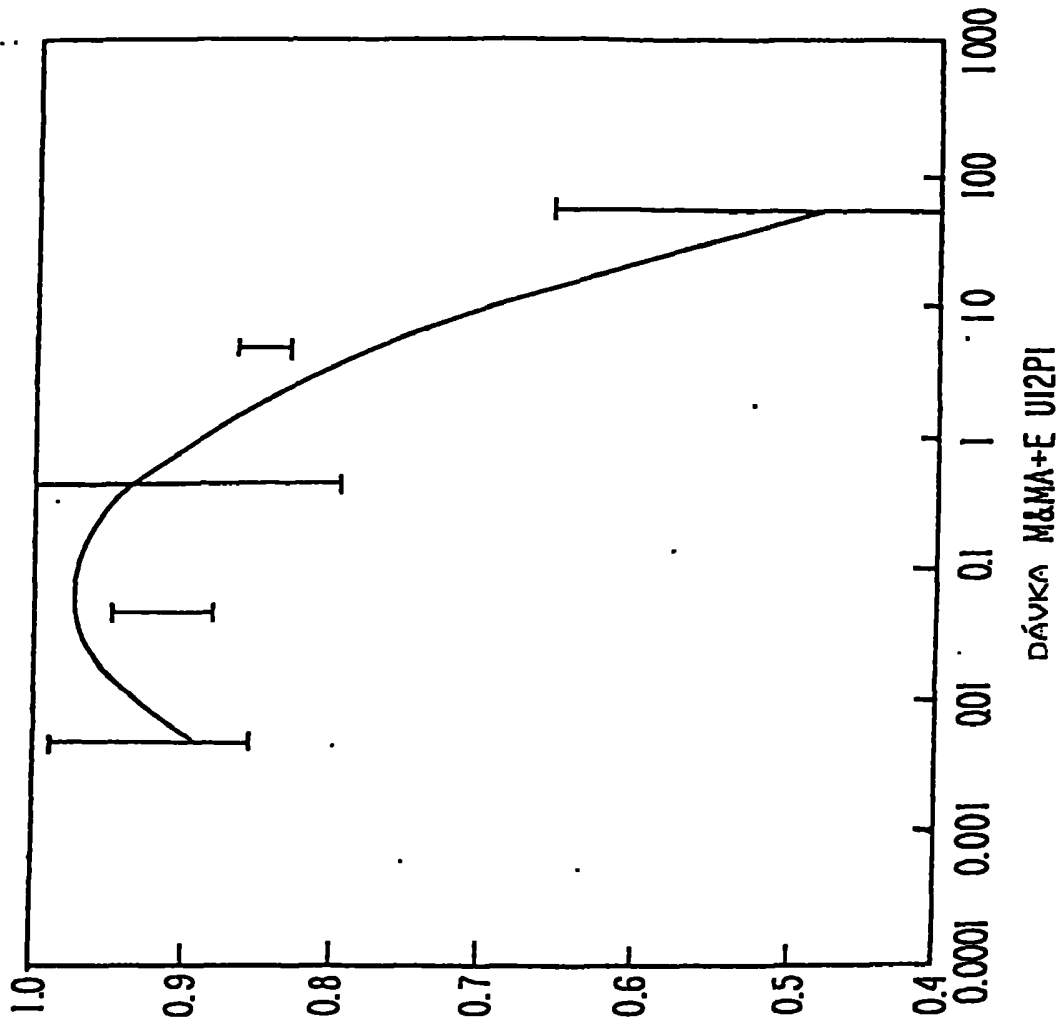


10/91

Obr. 5



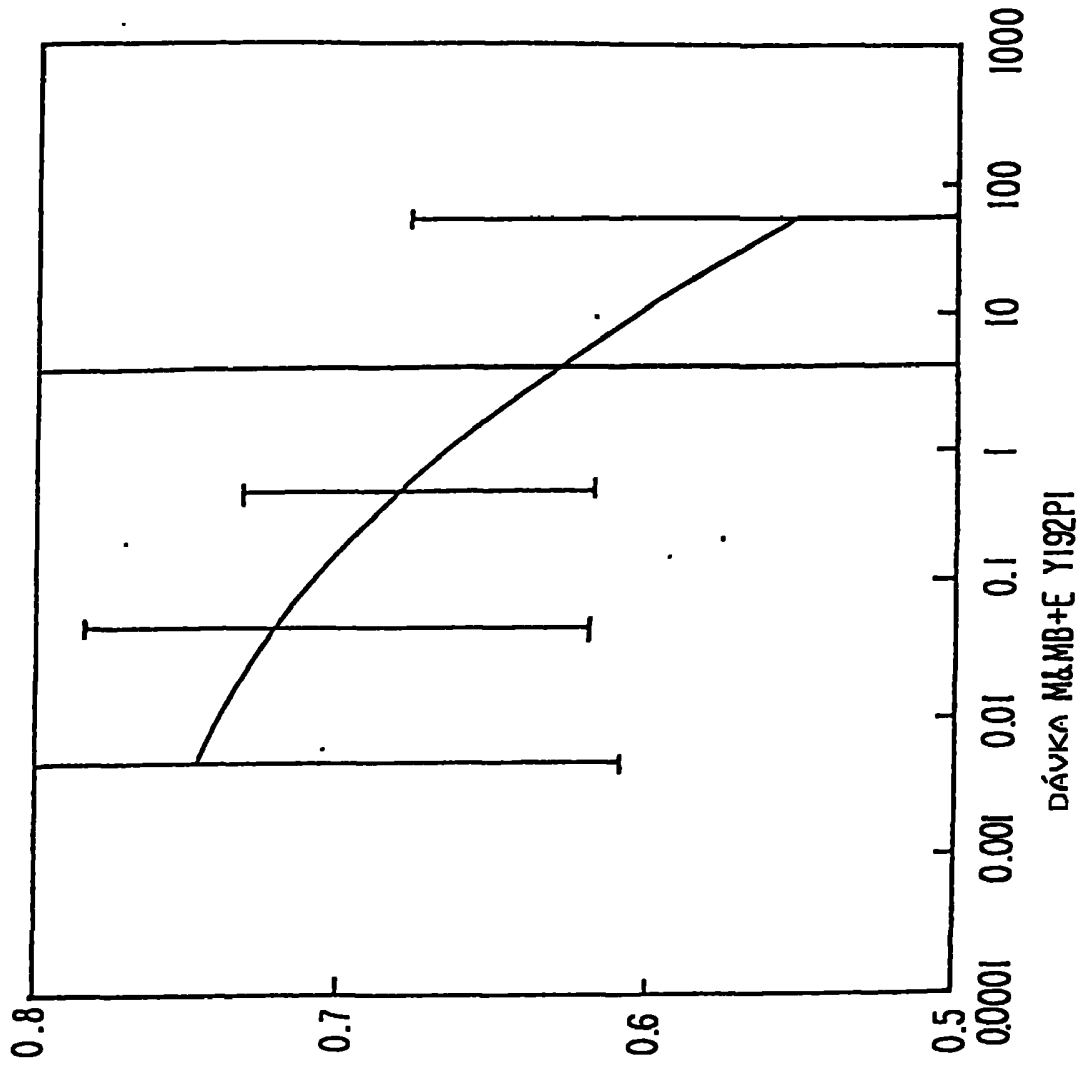
11/91



Obr. 6A

FRAKČNÉ PREŽITIE

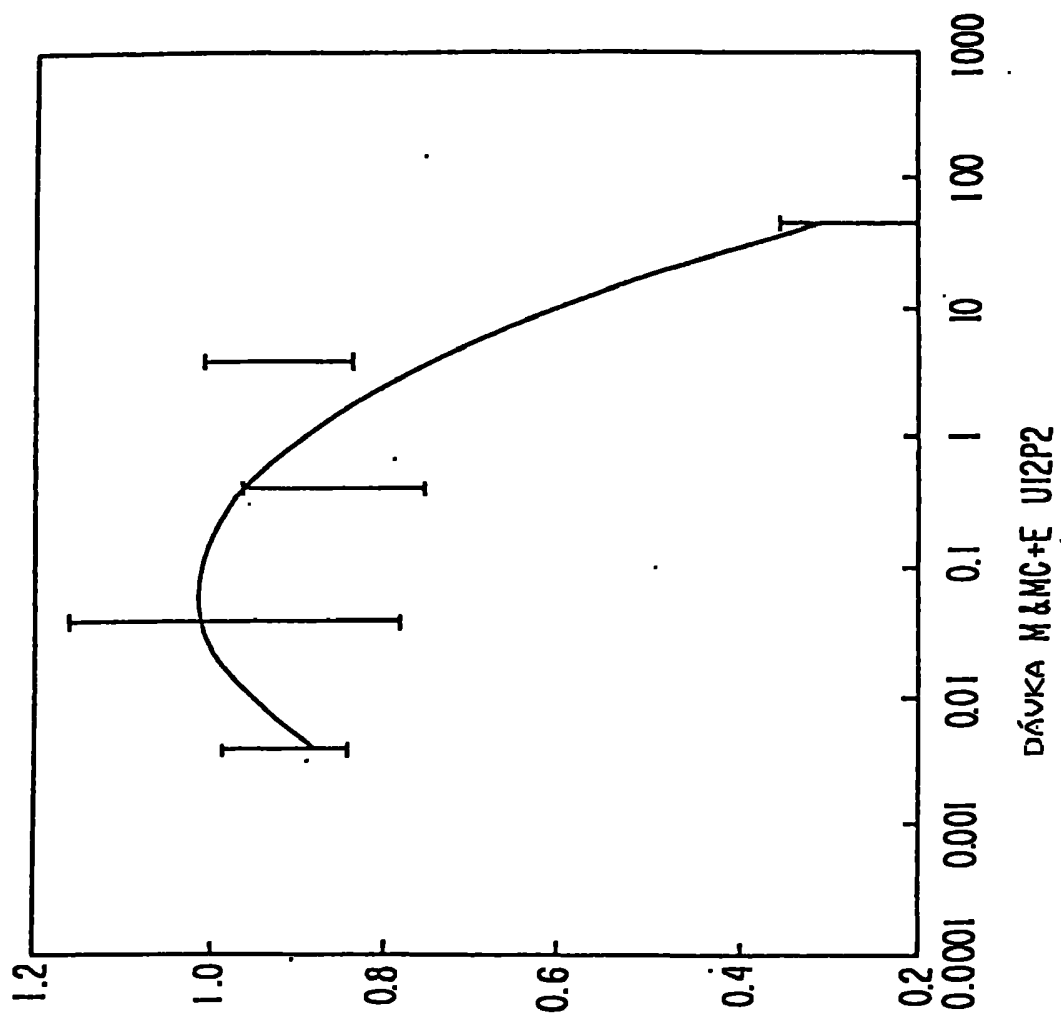
12/91



Obr. 6B

FRAKČNÉ PREŽITIE

13/91

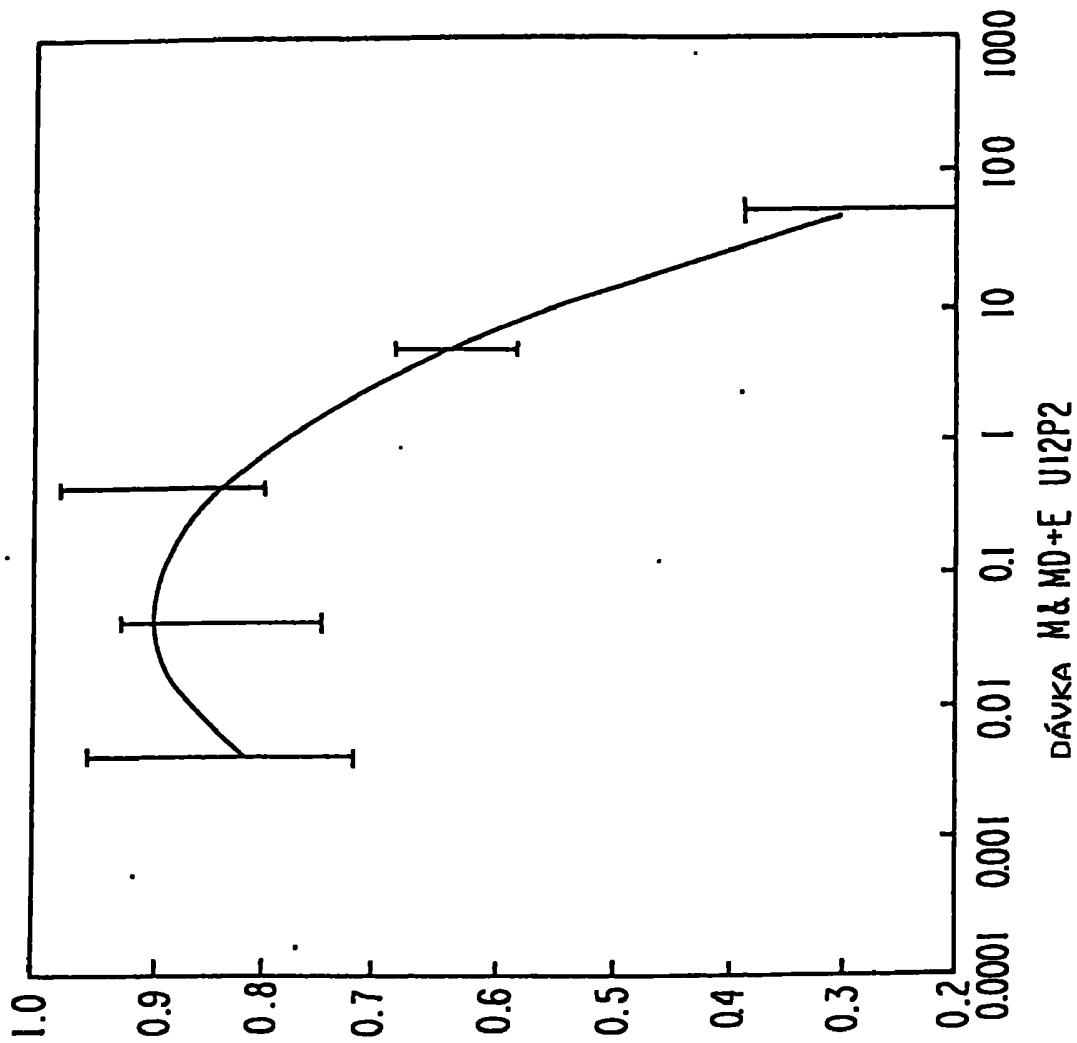


Obr. 6C

FRAKČNÉ PREŽITIE

DÁVKA M&MC+E UI2P2

14/91

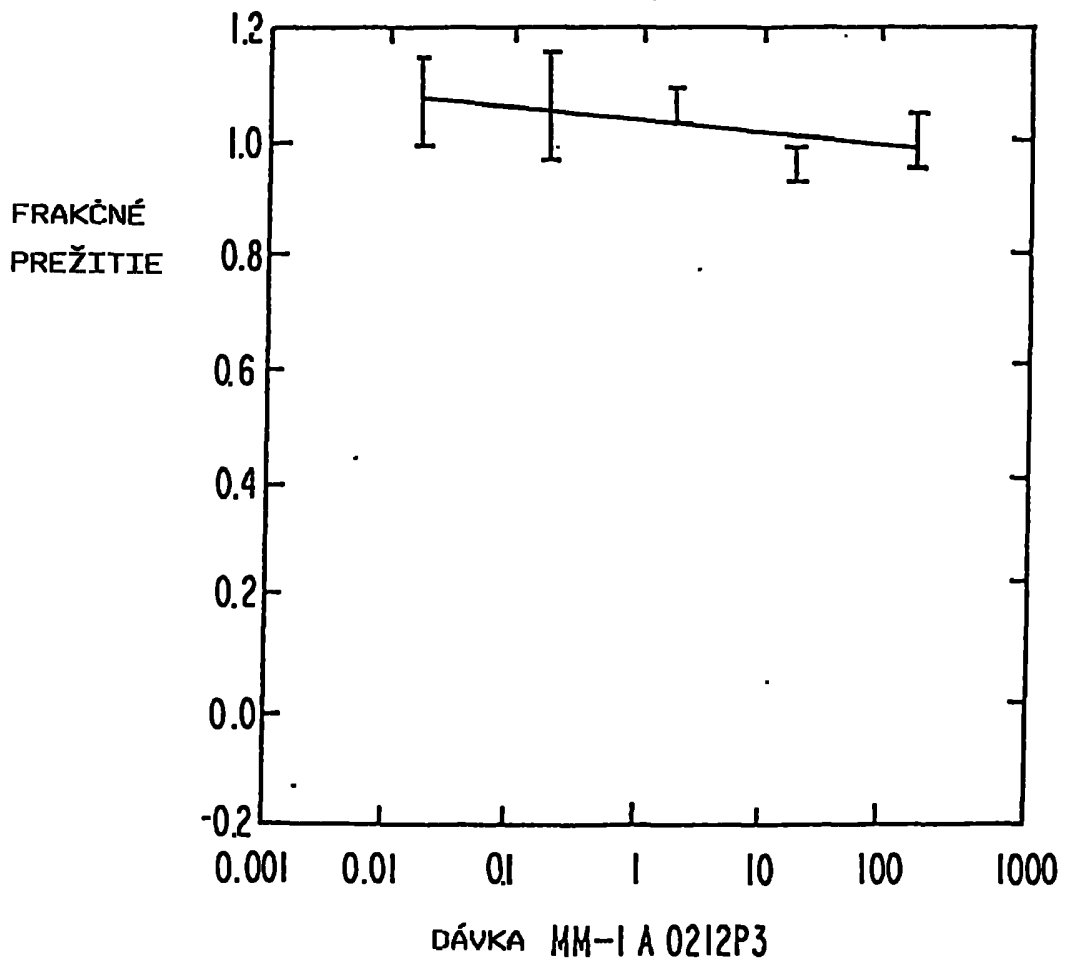


Obr. 6D

FRAKČNÉ
PREŽITIE

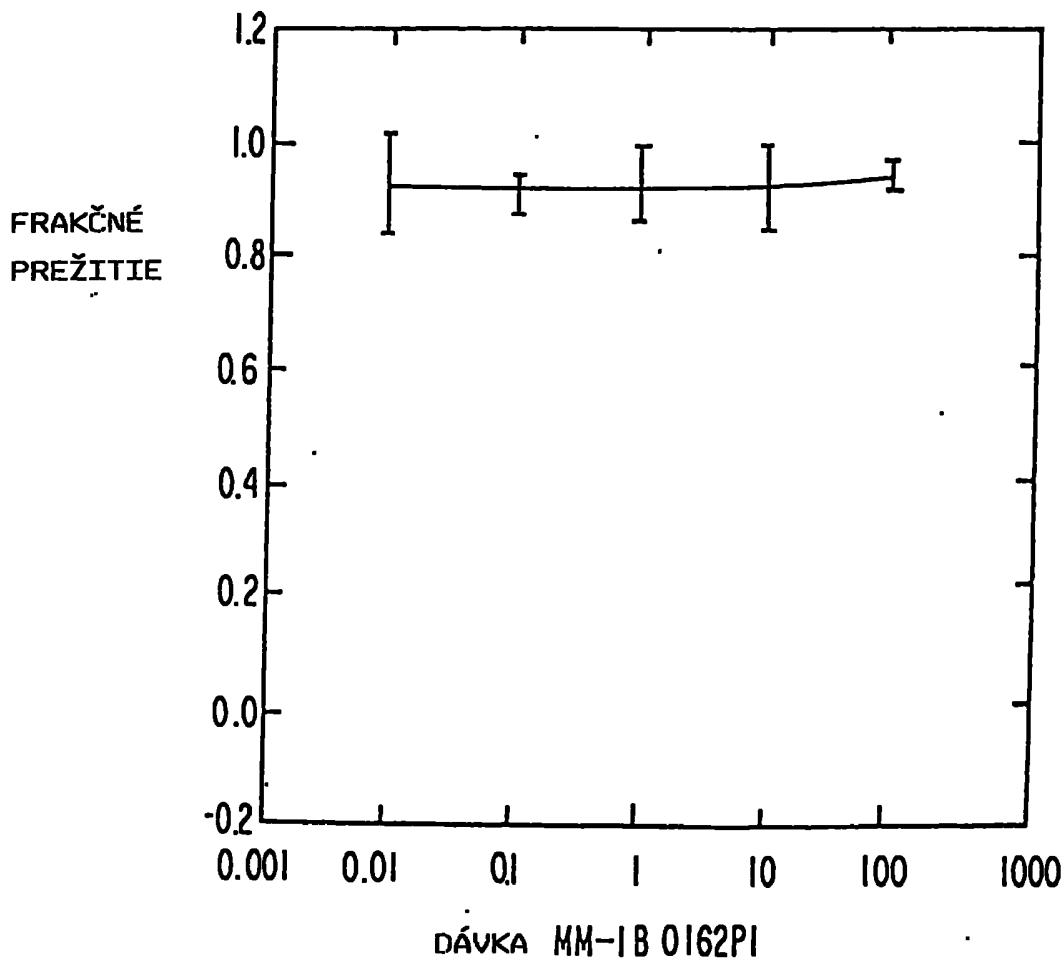
15/91

Obr. 7A



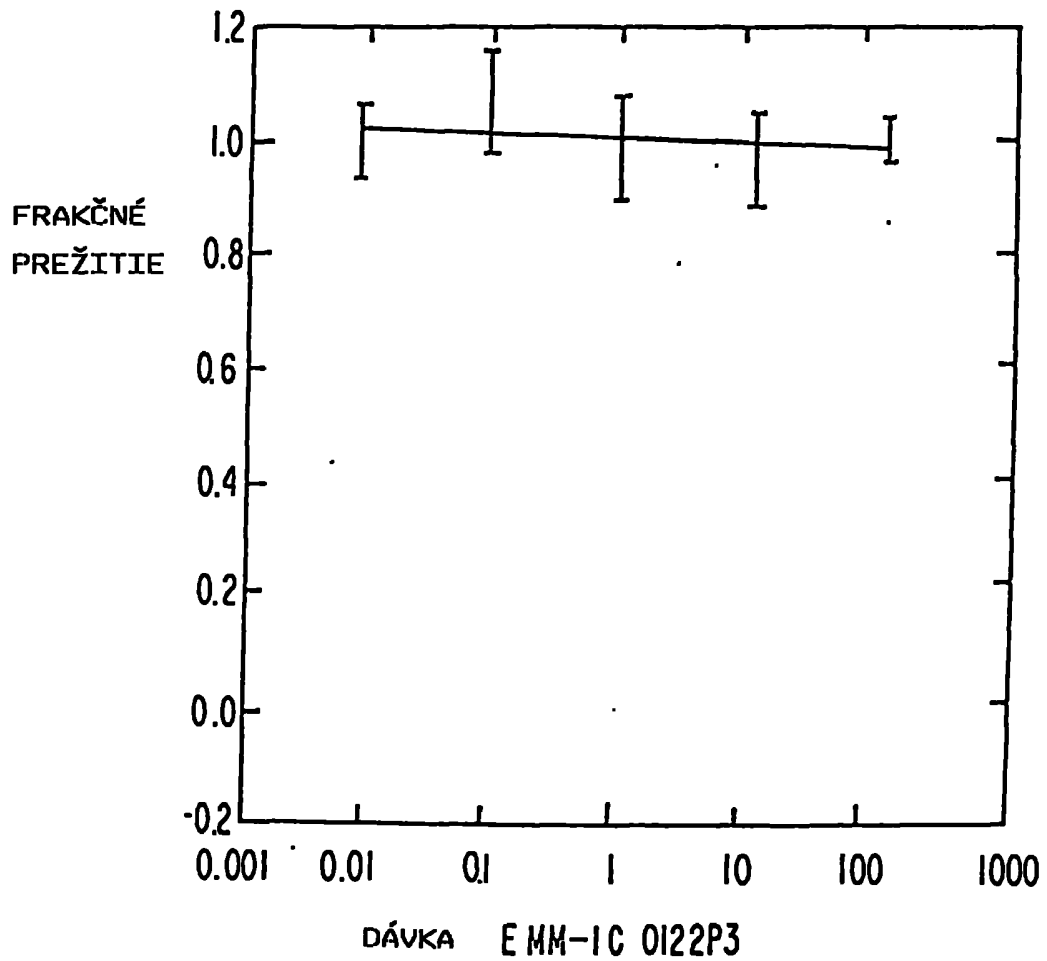
16/91

Obr. 7B



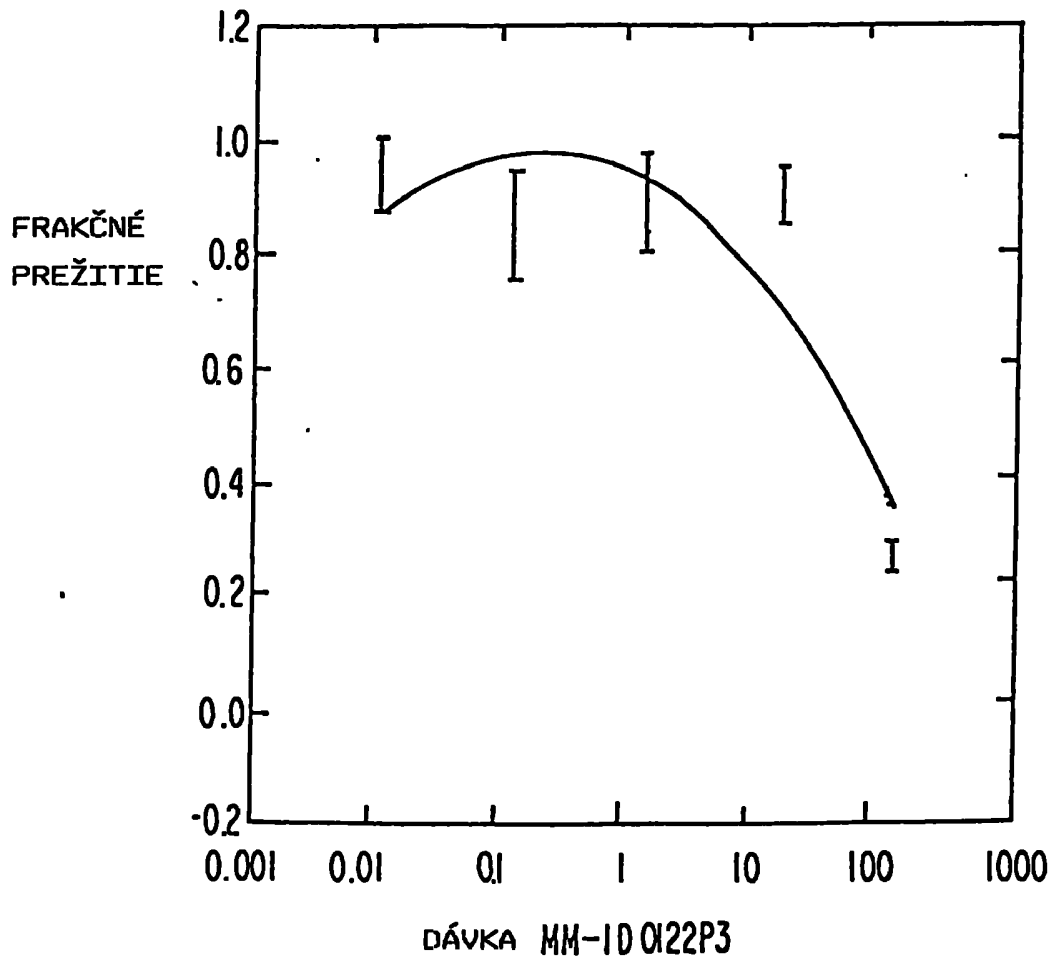
17/91

Obr. 7C



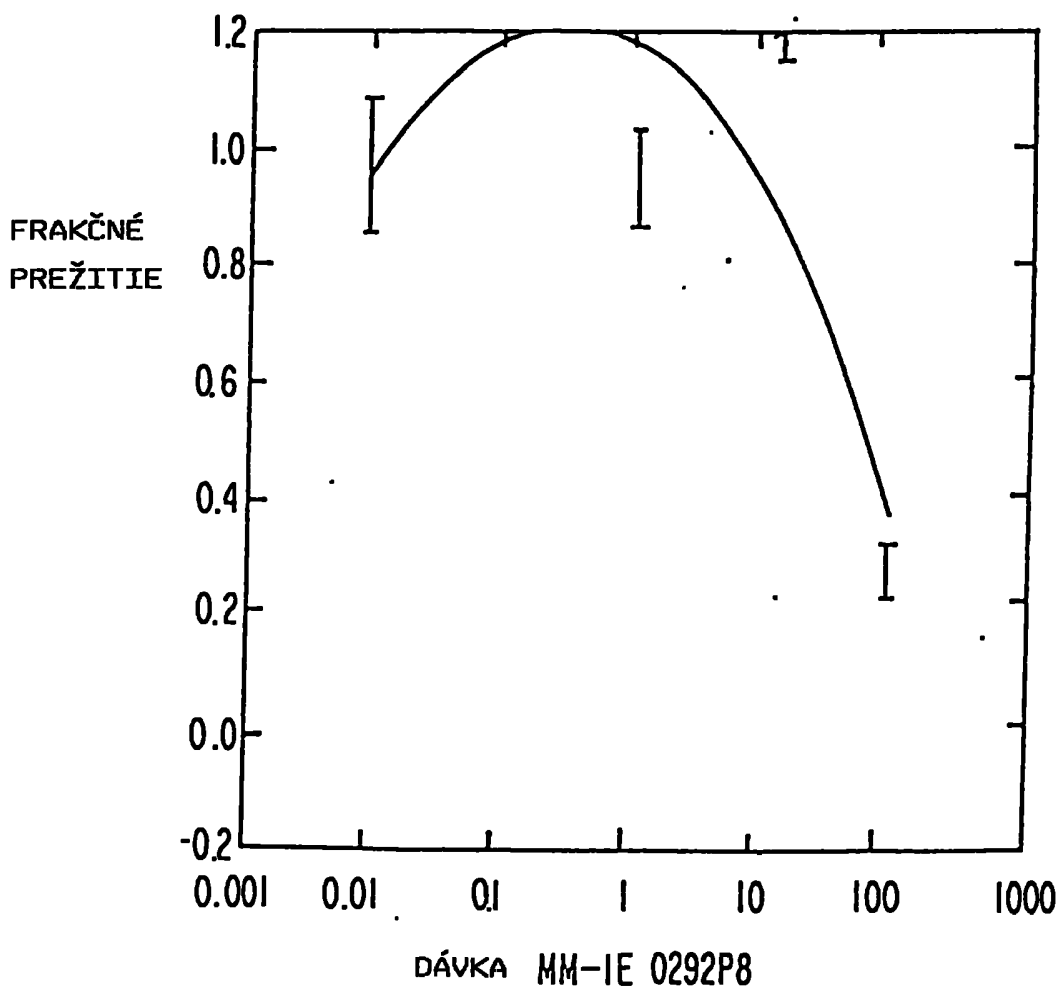
18/91

Obr. 7D.



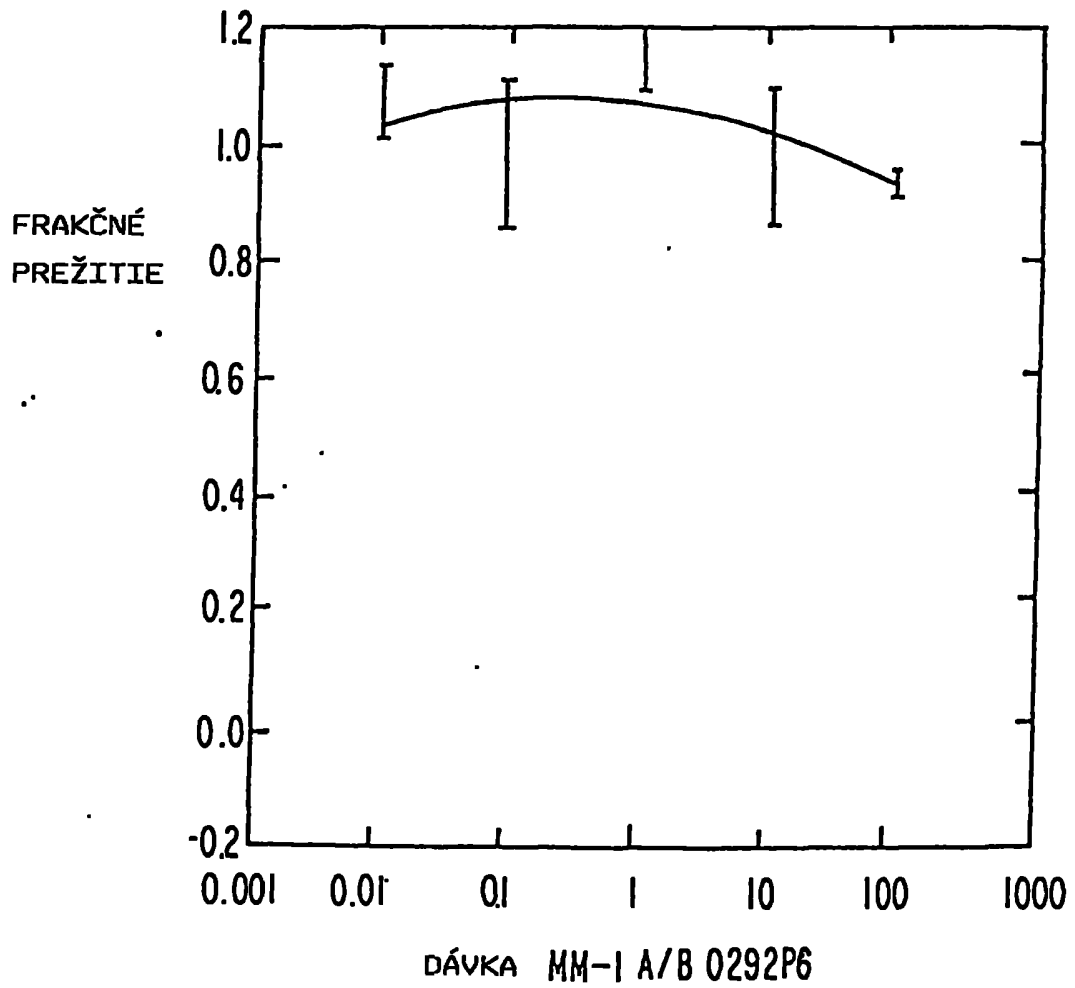
19/91

Obr. 7E



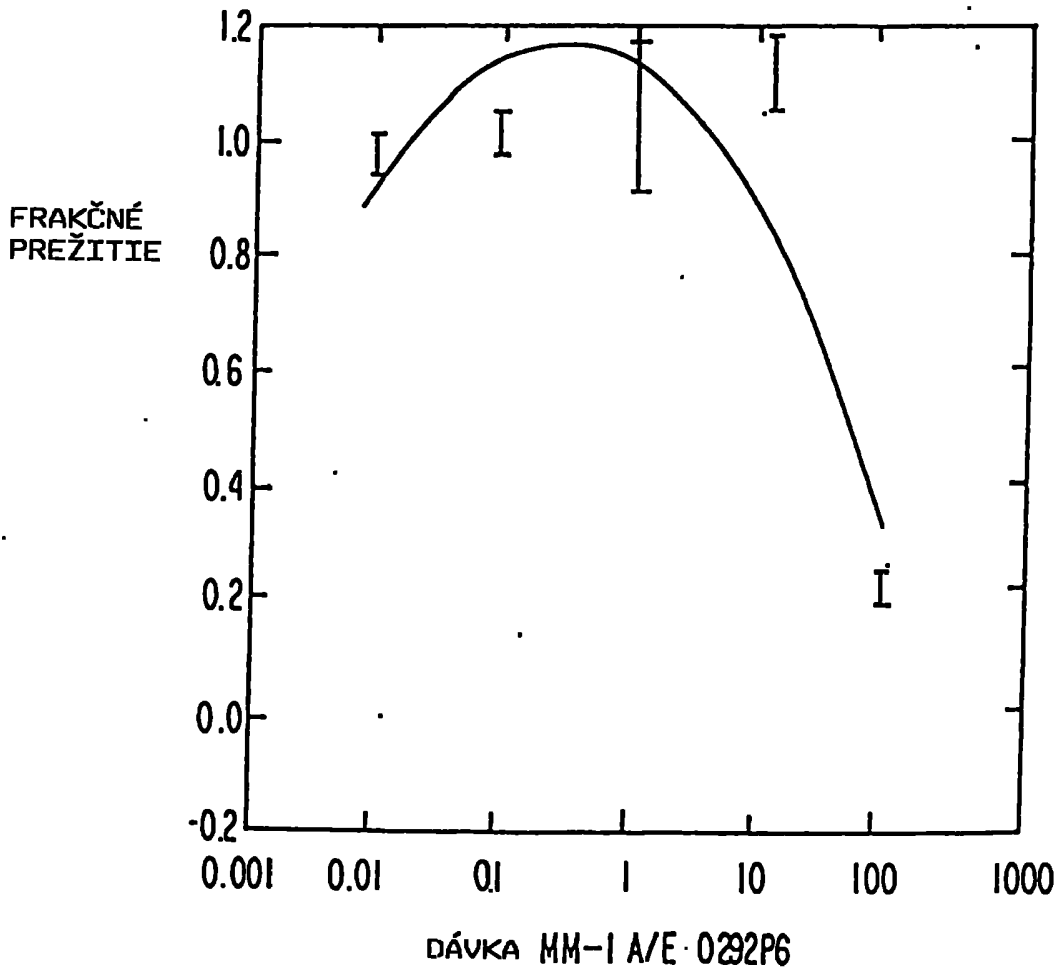
20/91

Obr. 7F



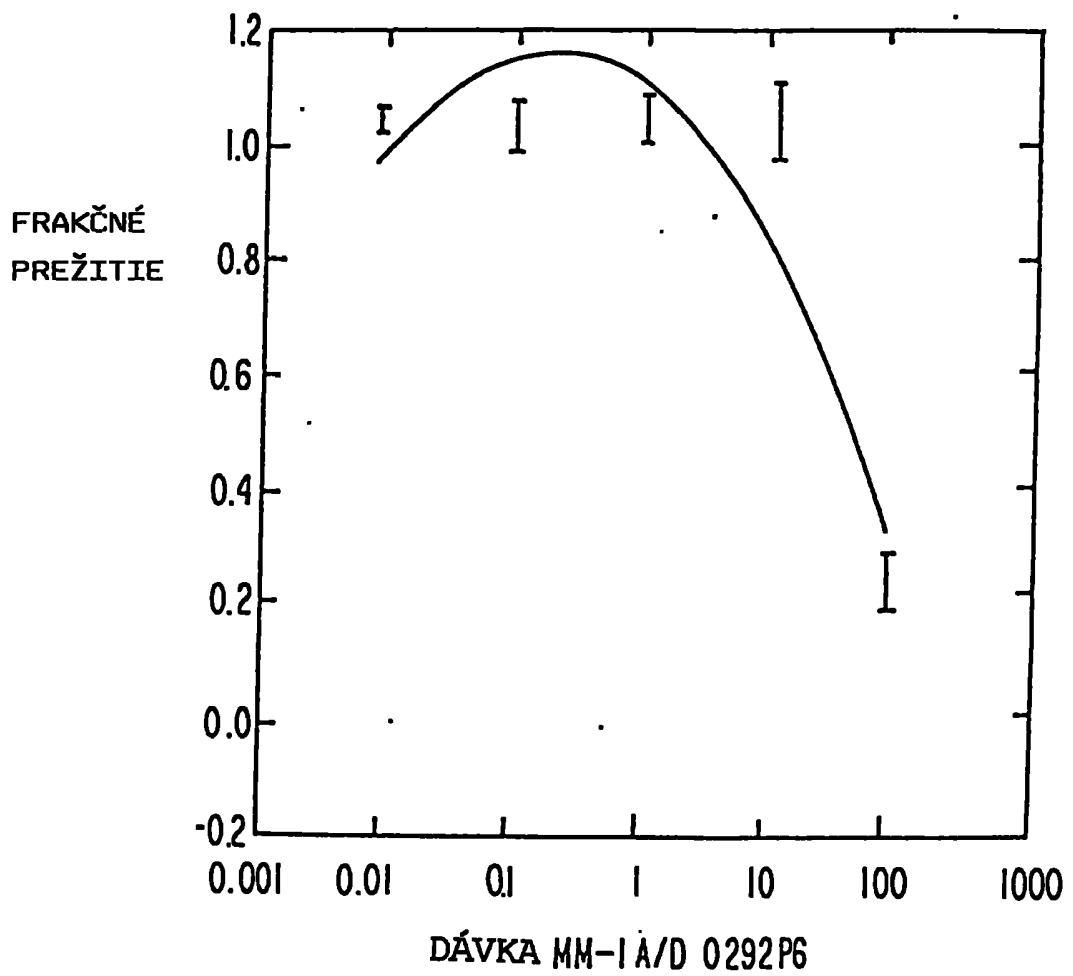
21/91

Obr. 7G



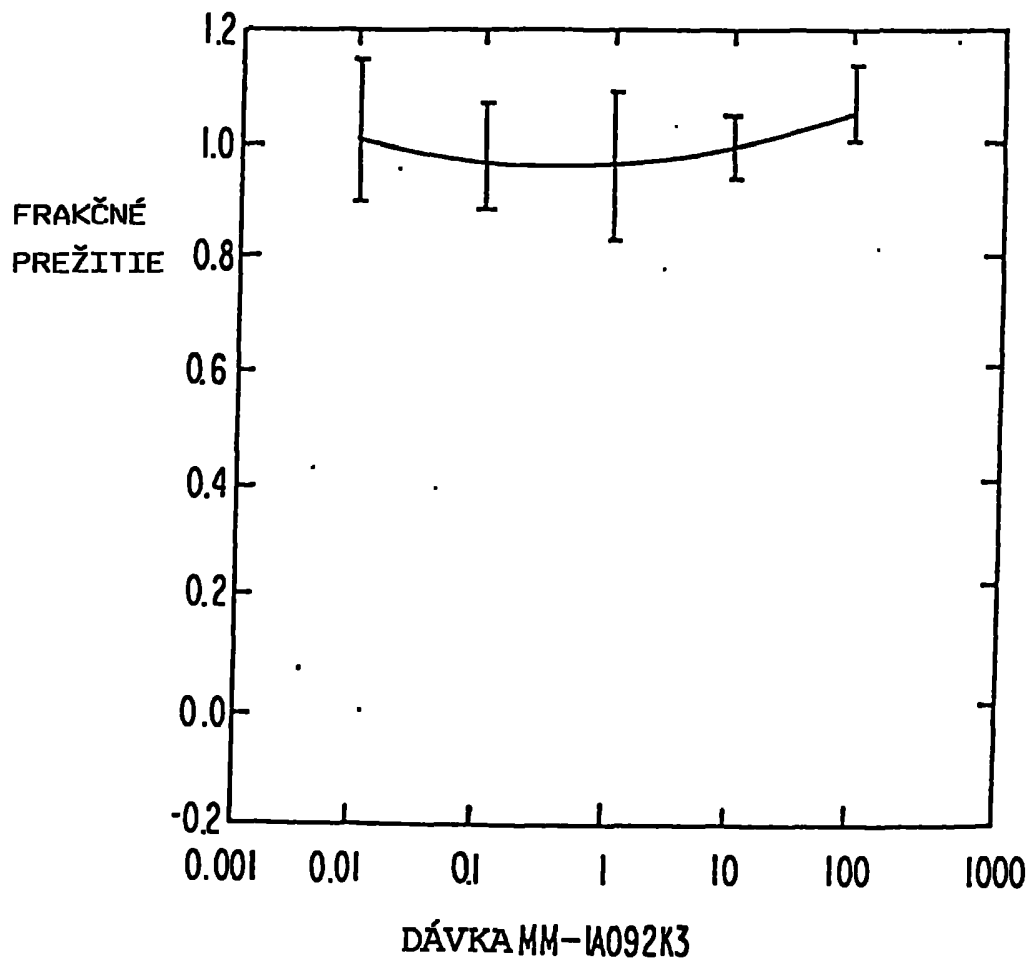
22/91

Obr. 7H



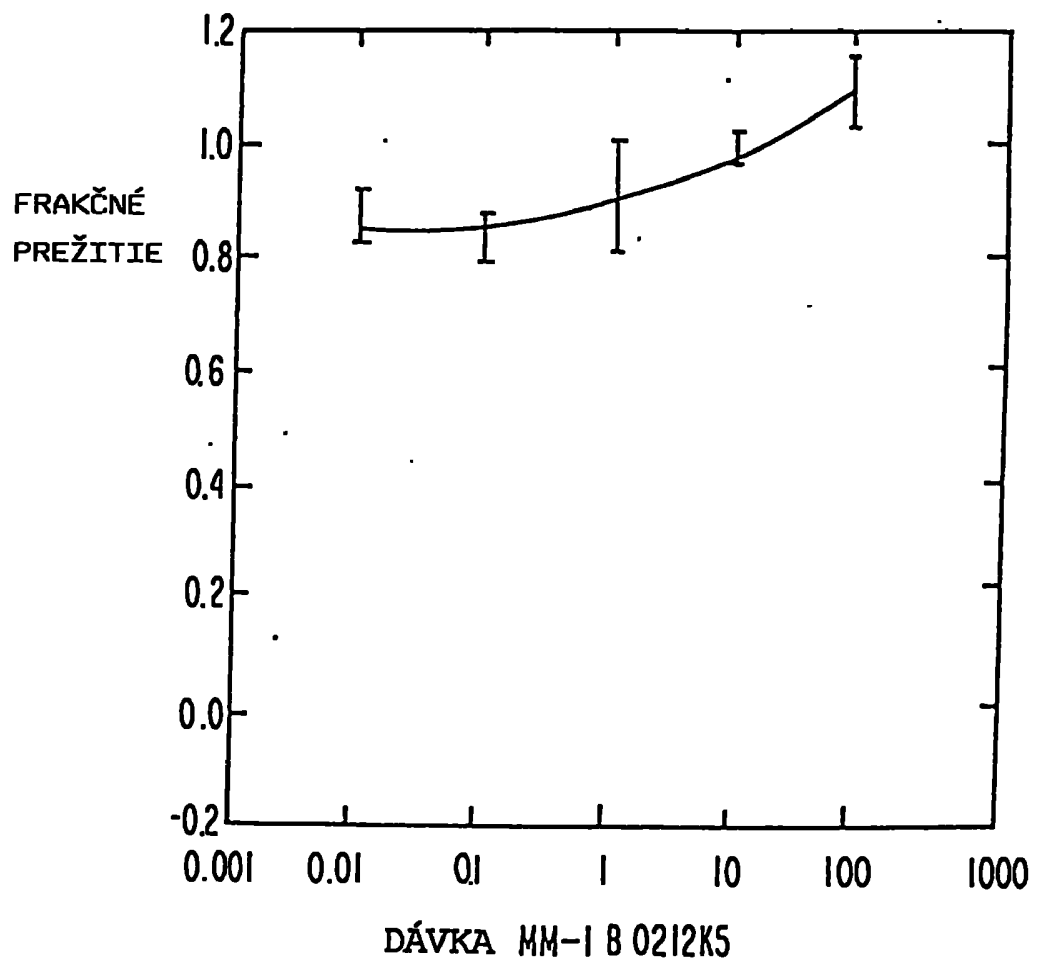
23/91

Obr. 8A



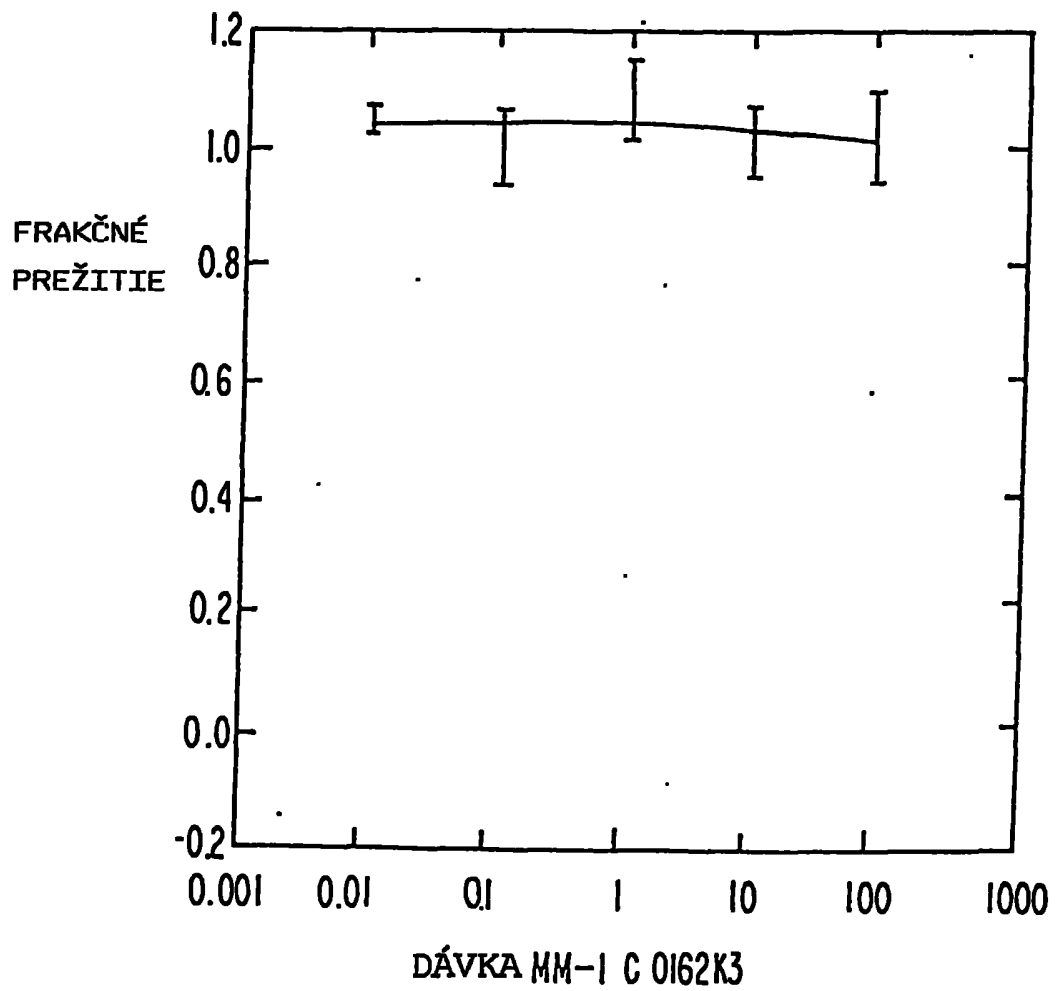
24/91

Obr. 8B



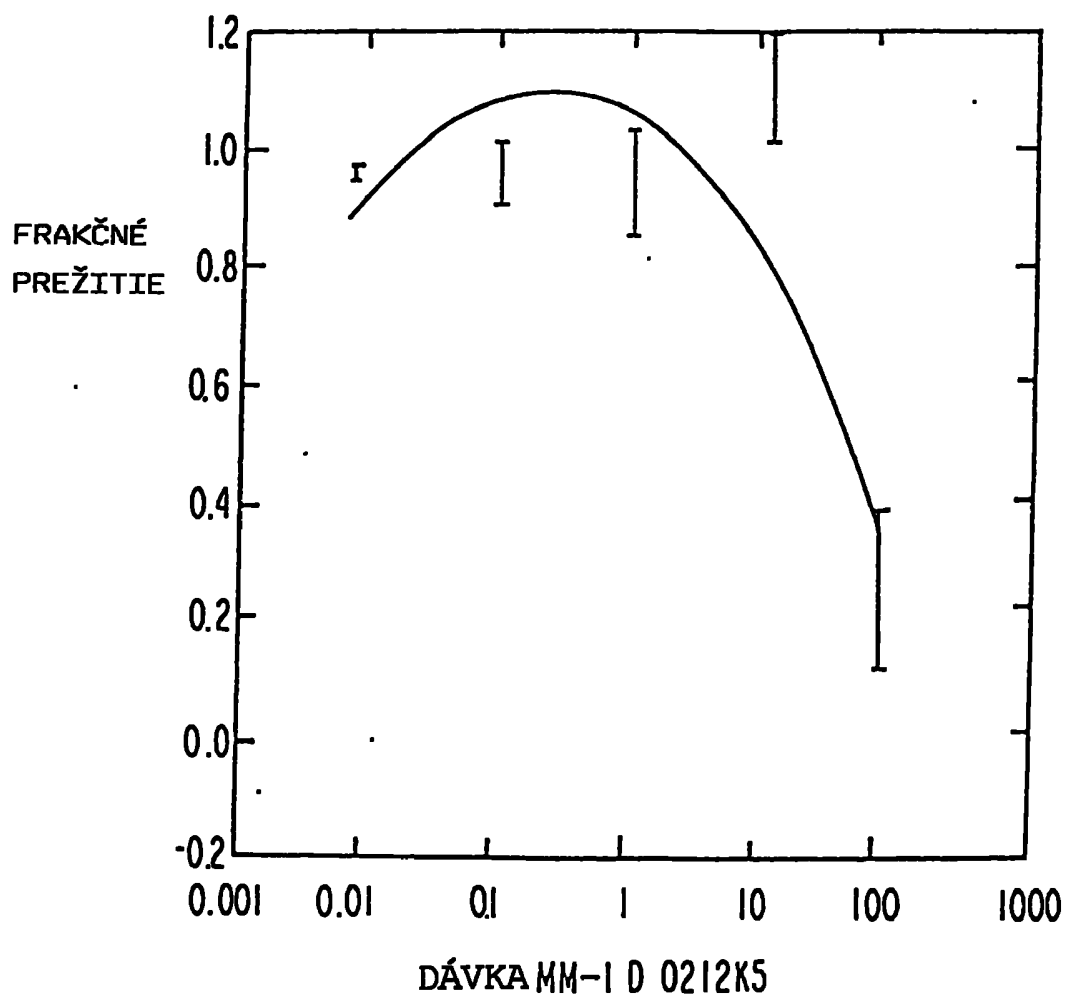
25/91

Obr. 8C



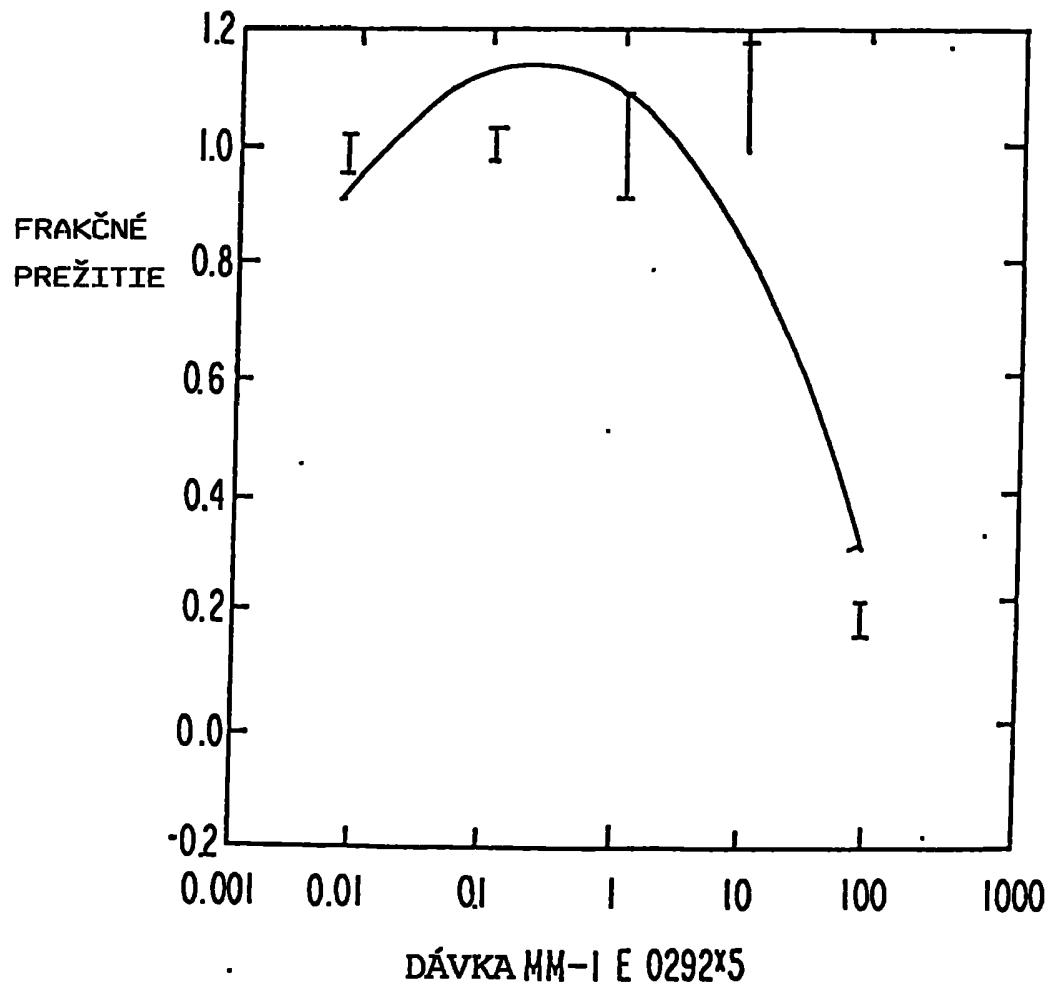
26/91

Obr. 8D



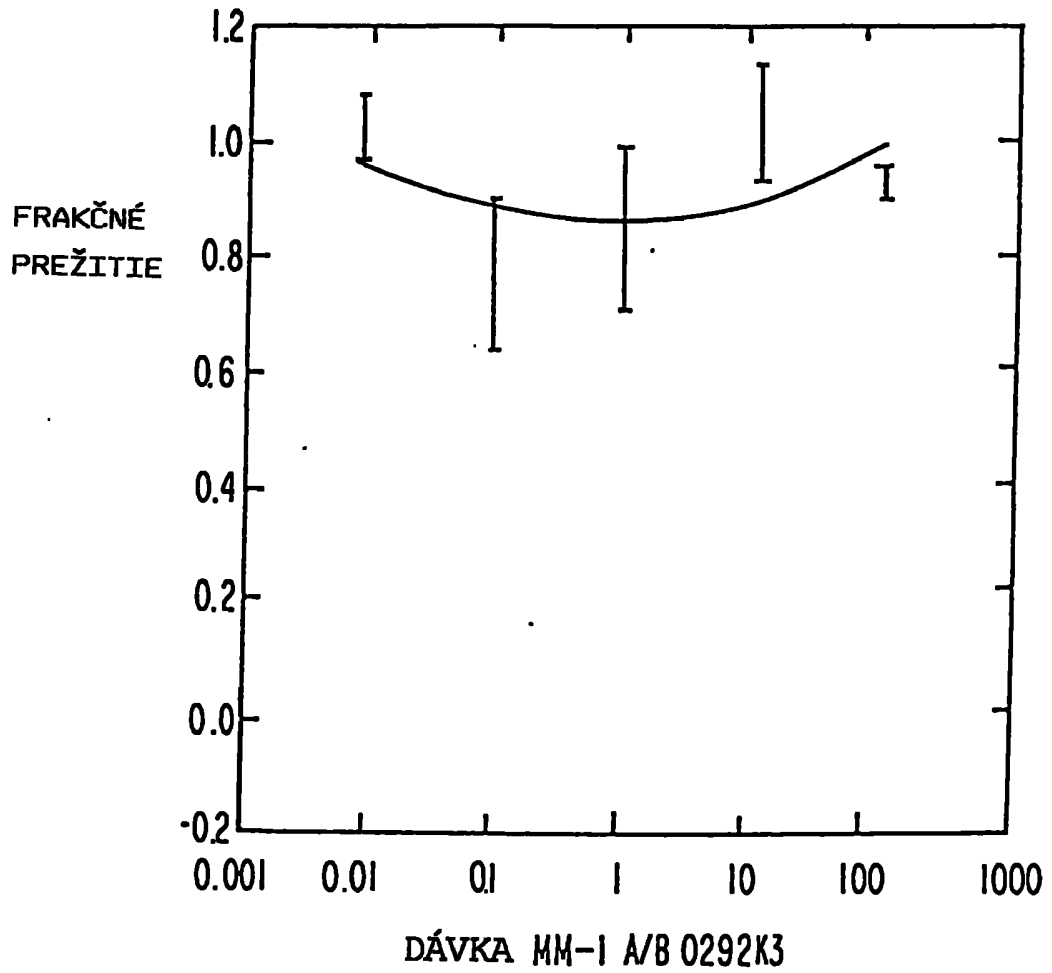
27/91

Obr. 8E



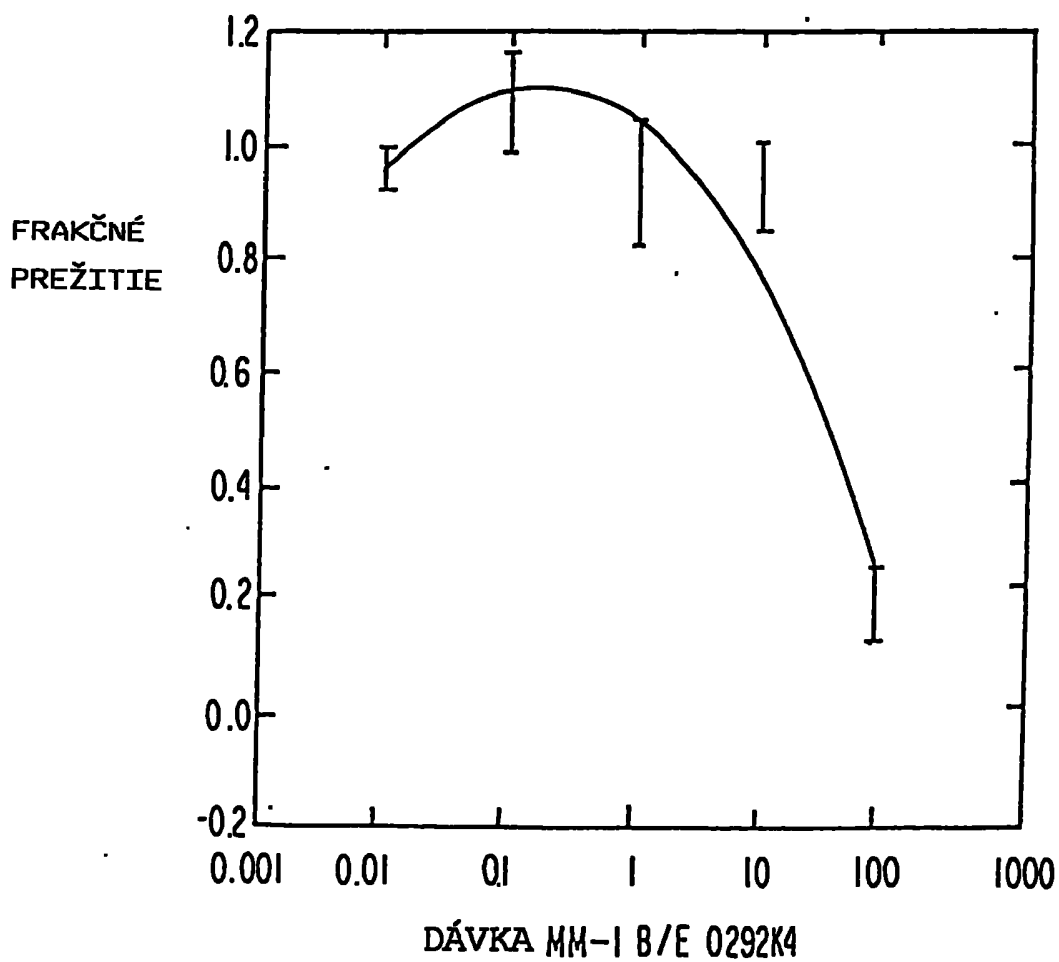
28/91

Obr. 8F



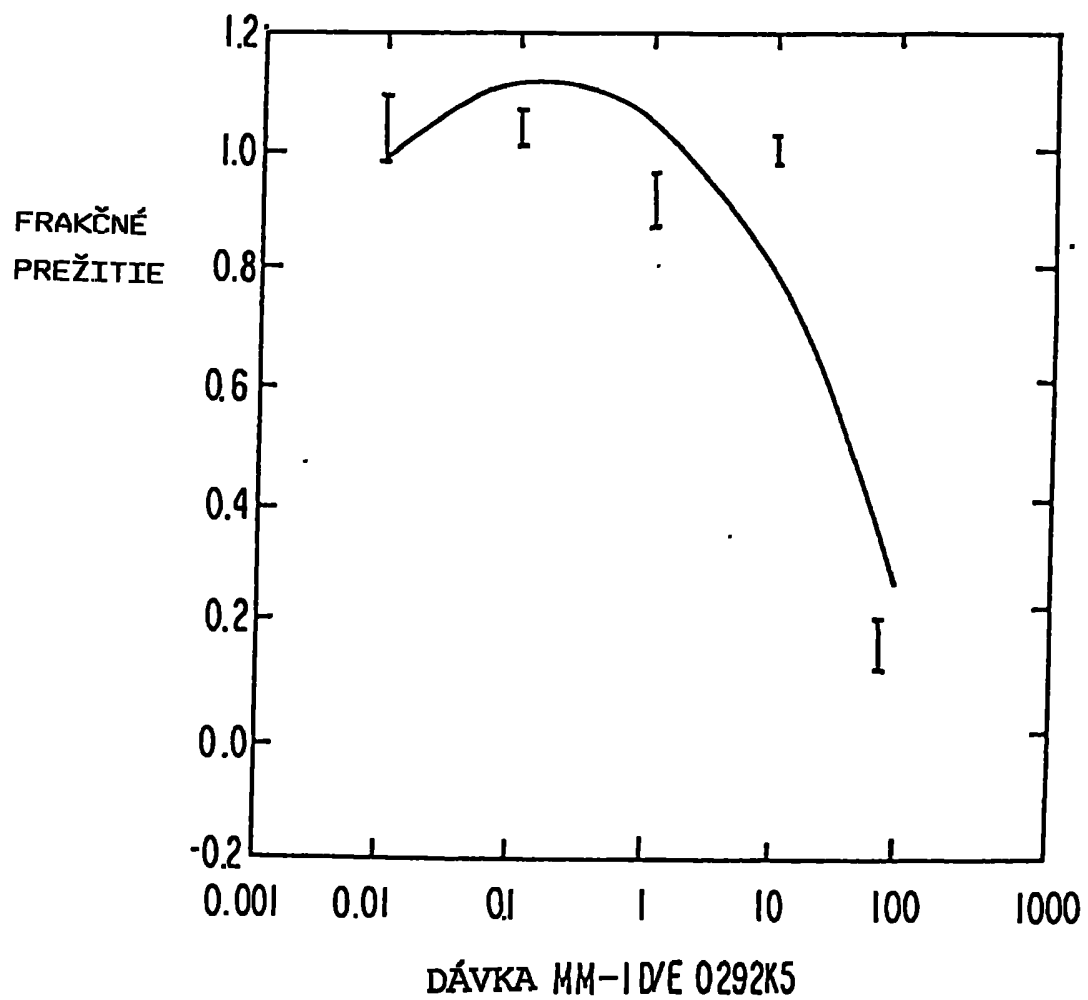
29/91

Obr. 8G



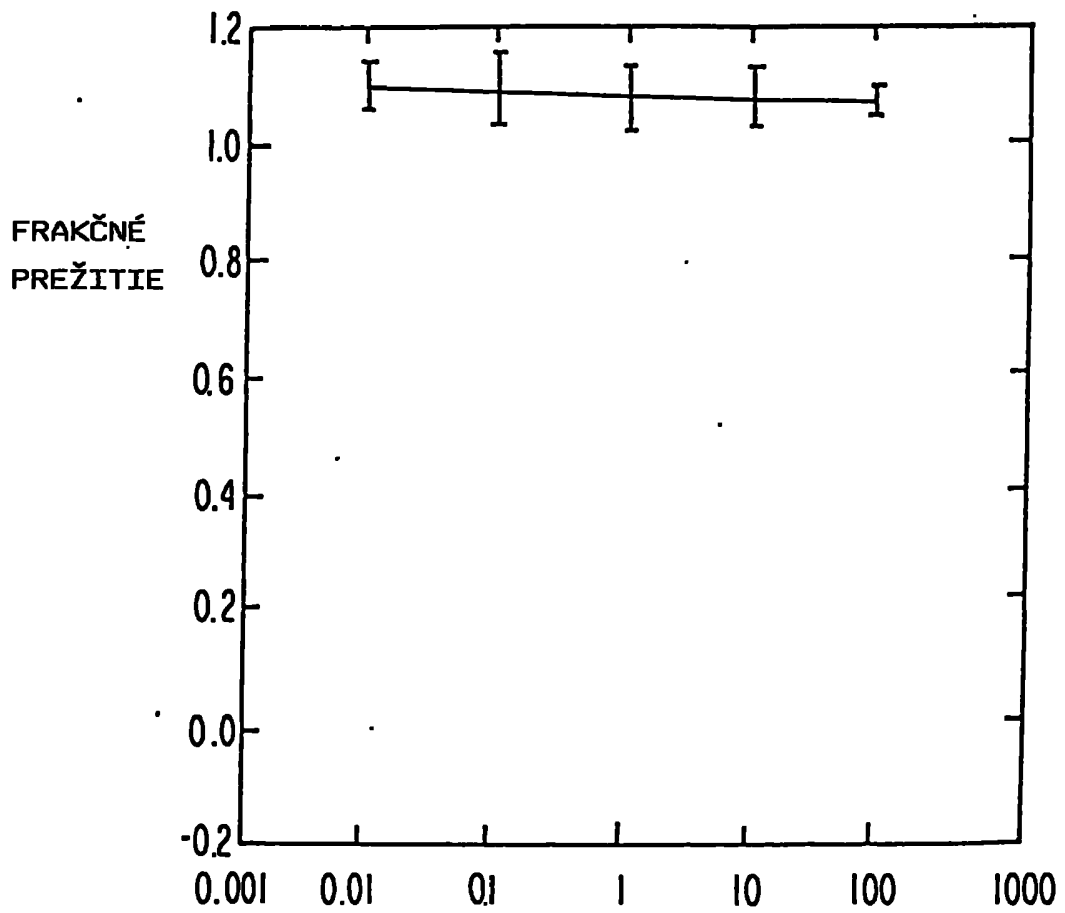
30/91

Obr. 8H



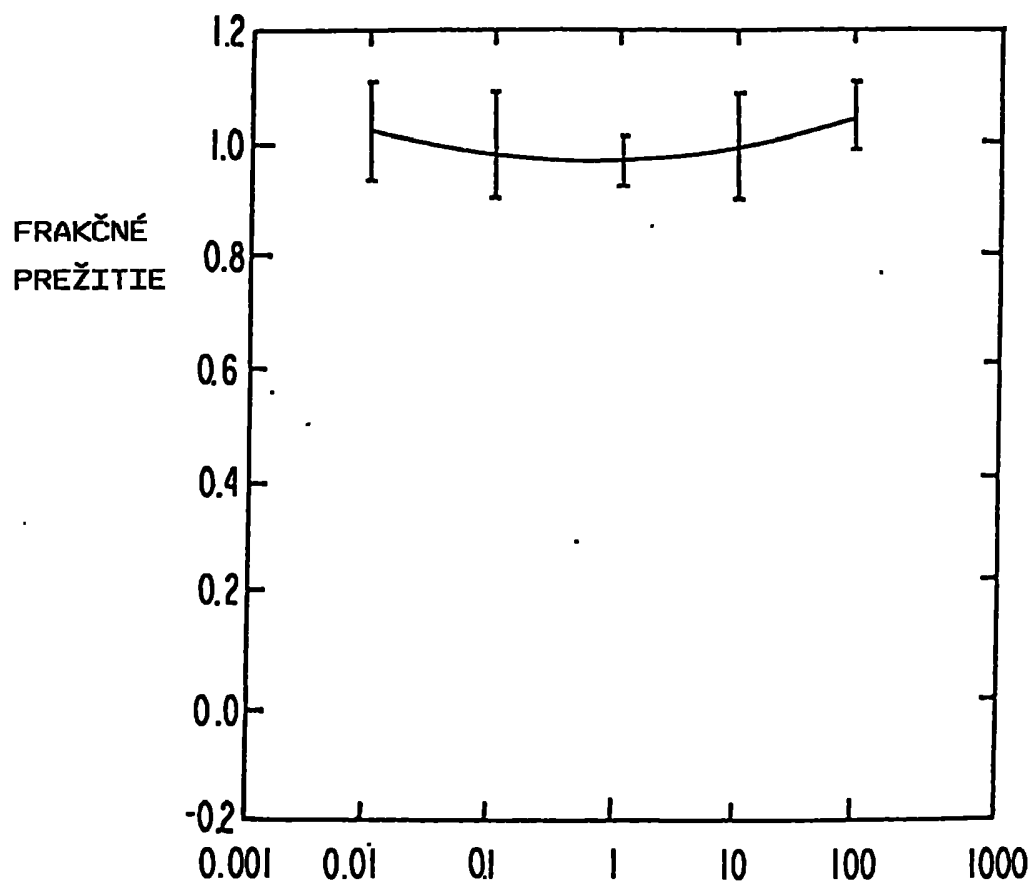
31/91

Obr. 9A



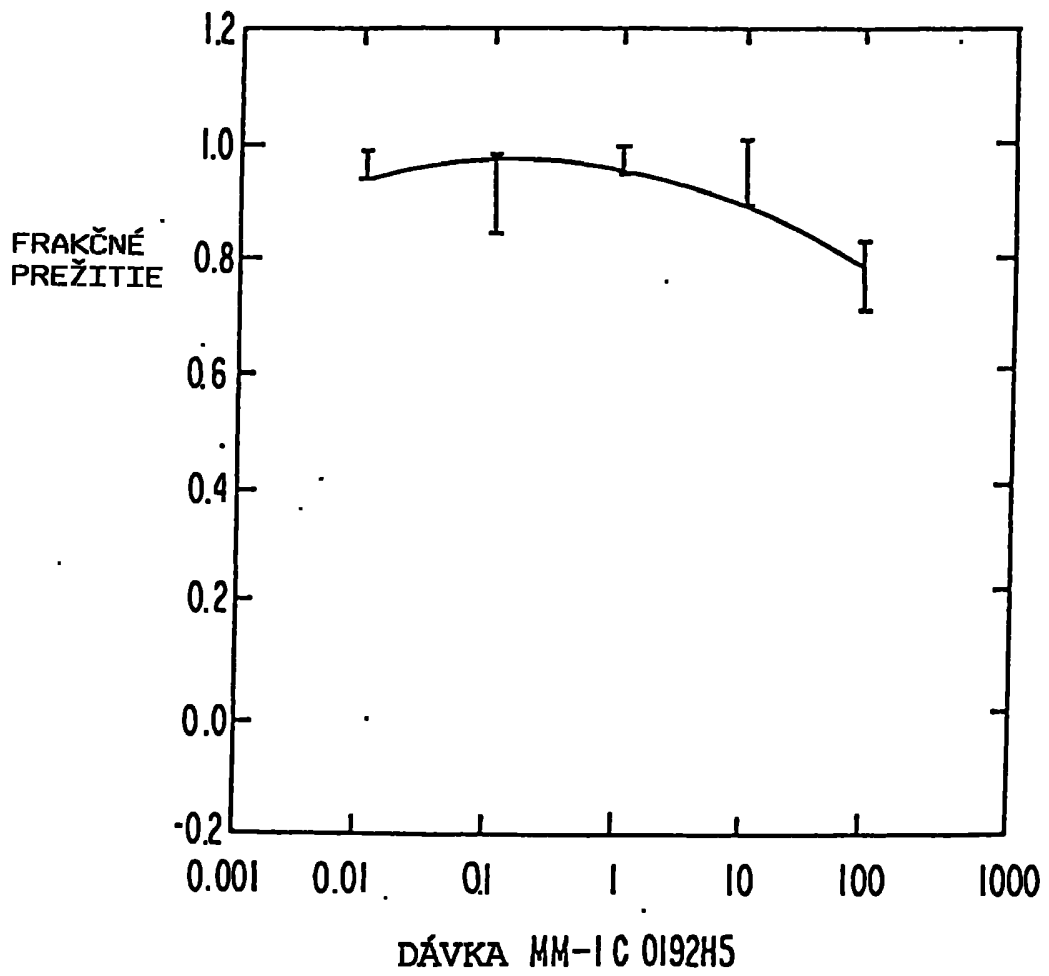
32/91

Obr. 9B



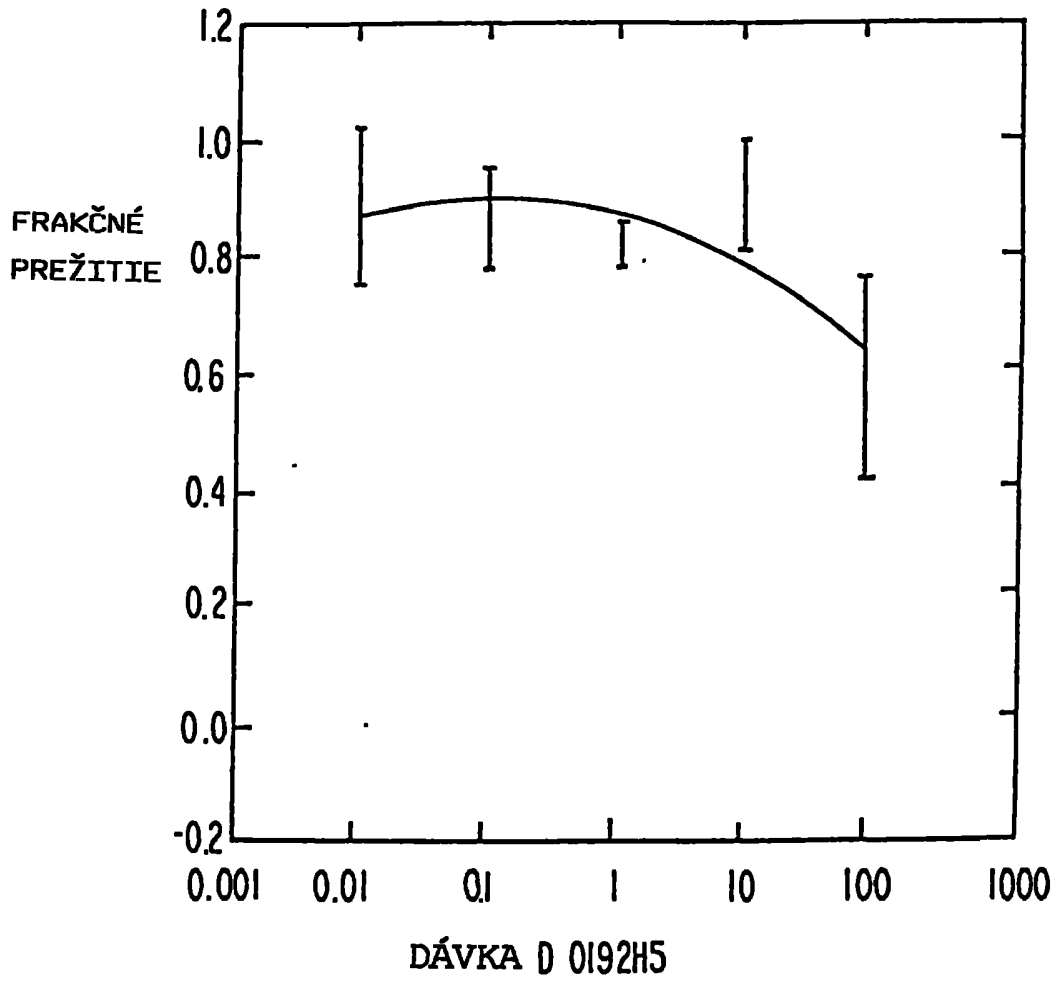
33/91

Obr. 9C



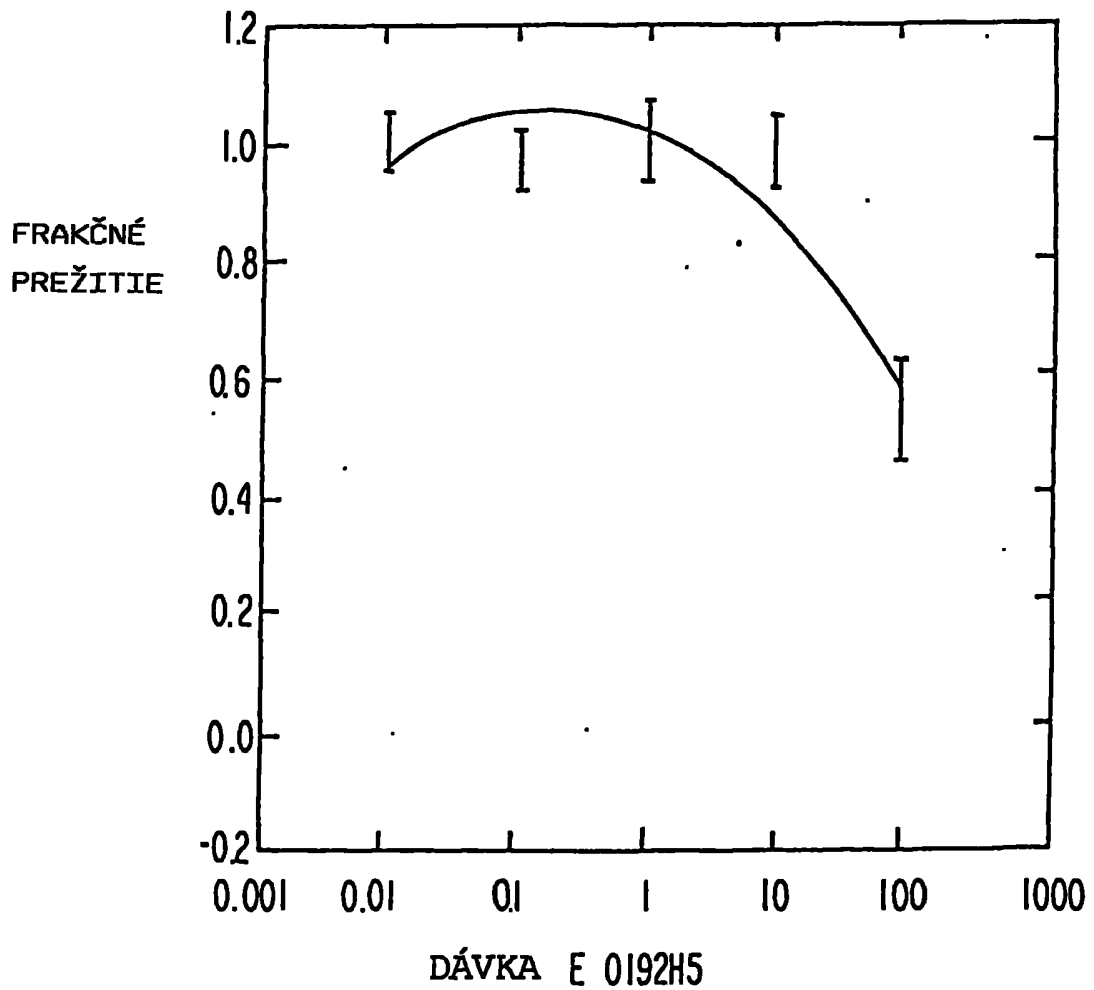
34/91

Obr. 9D



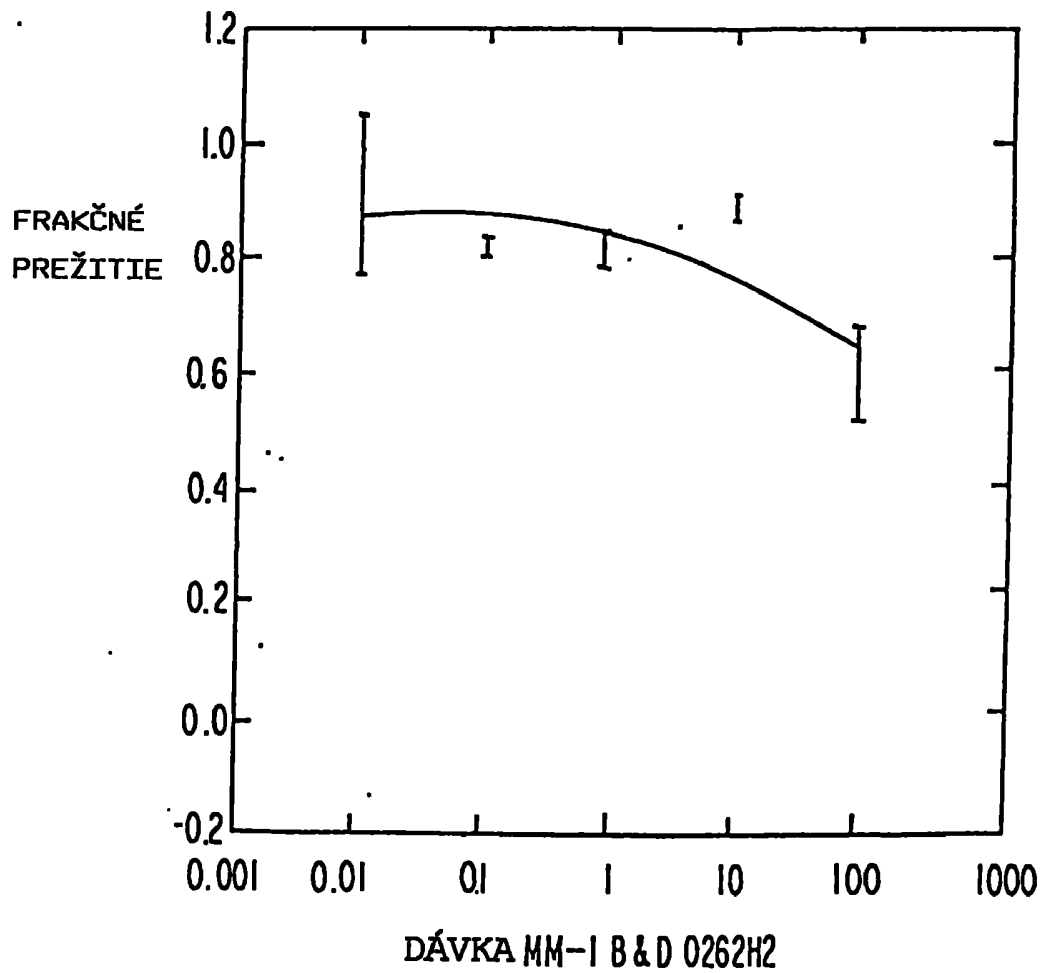
35/91

Obr. 9E



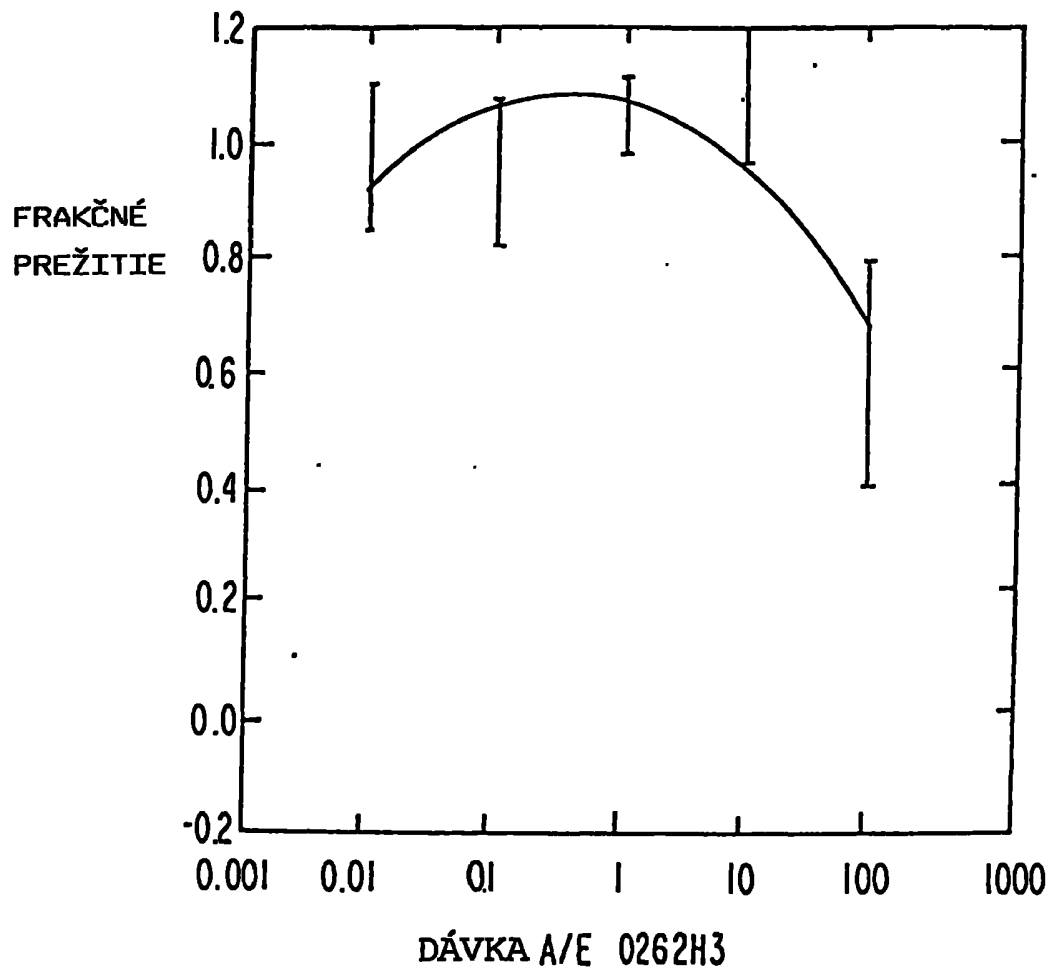
36/91

Obr. 9F



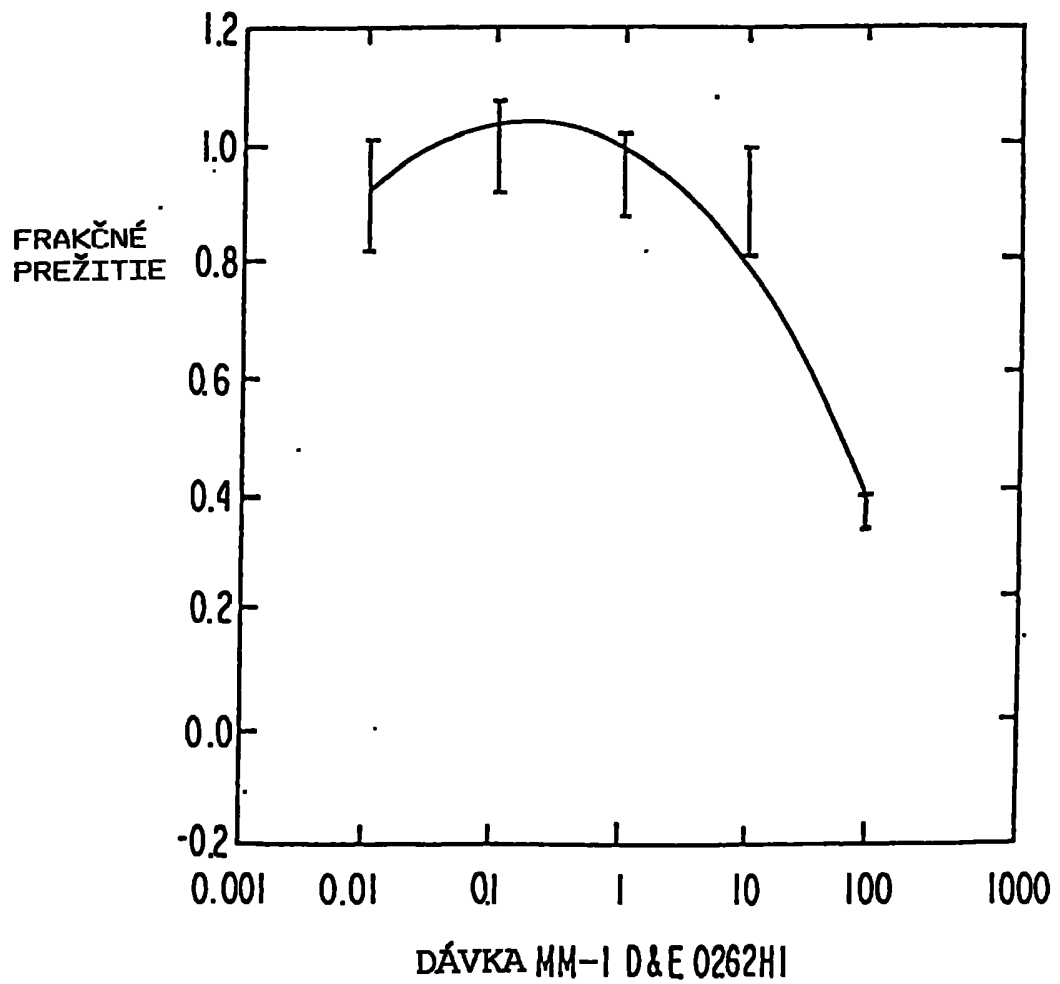
37/91

Obr. 9G



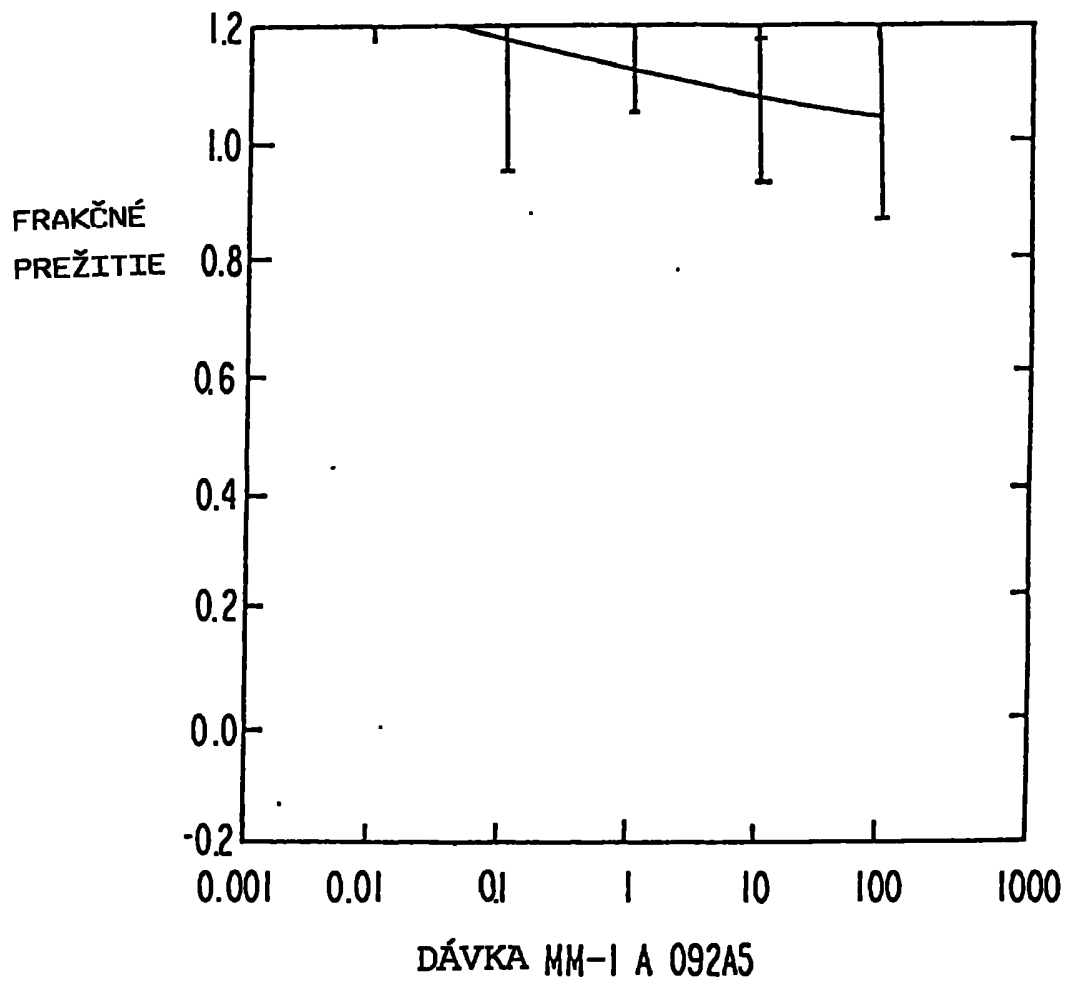
38/91

Obr. 9H



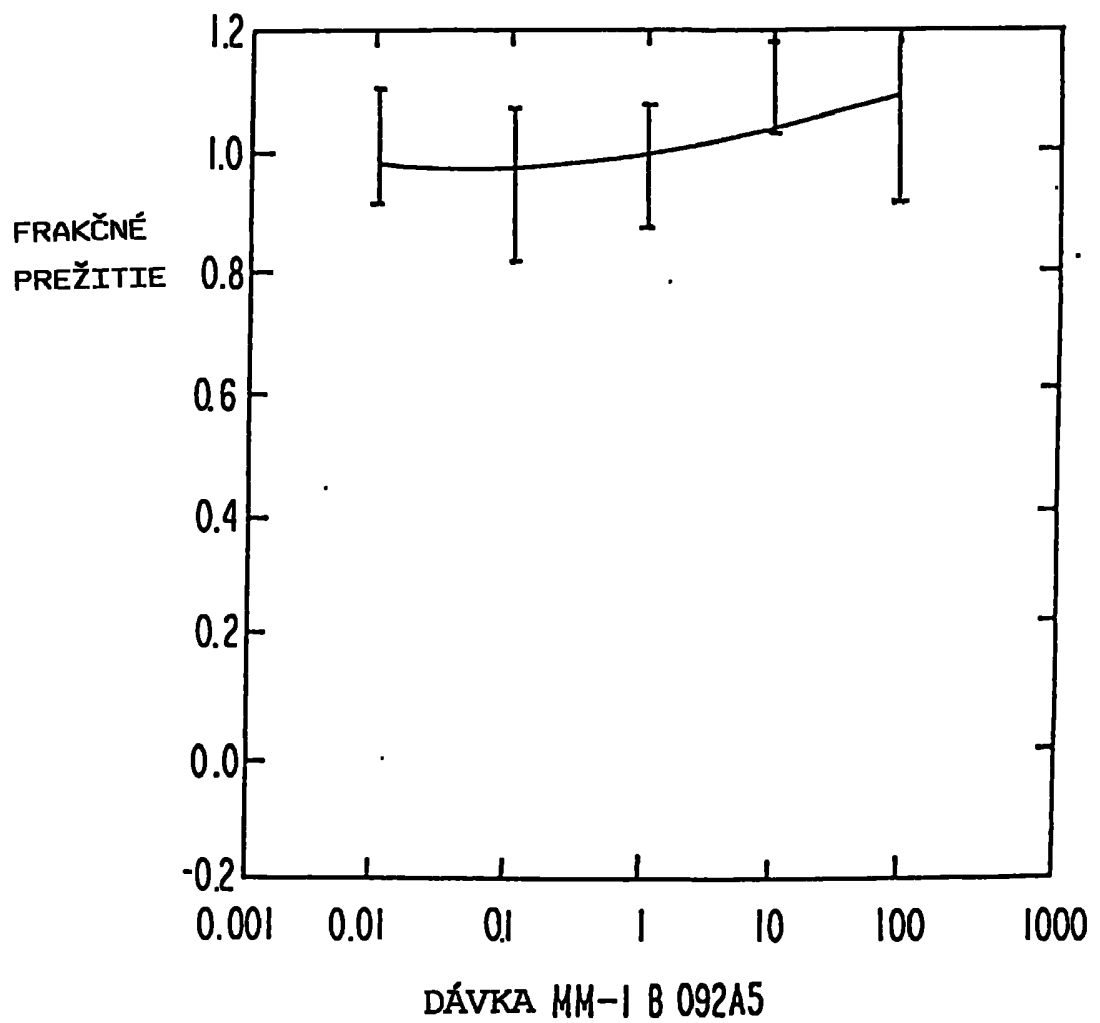
39/91

Obr. 10A



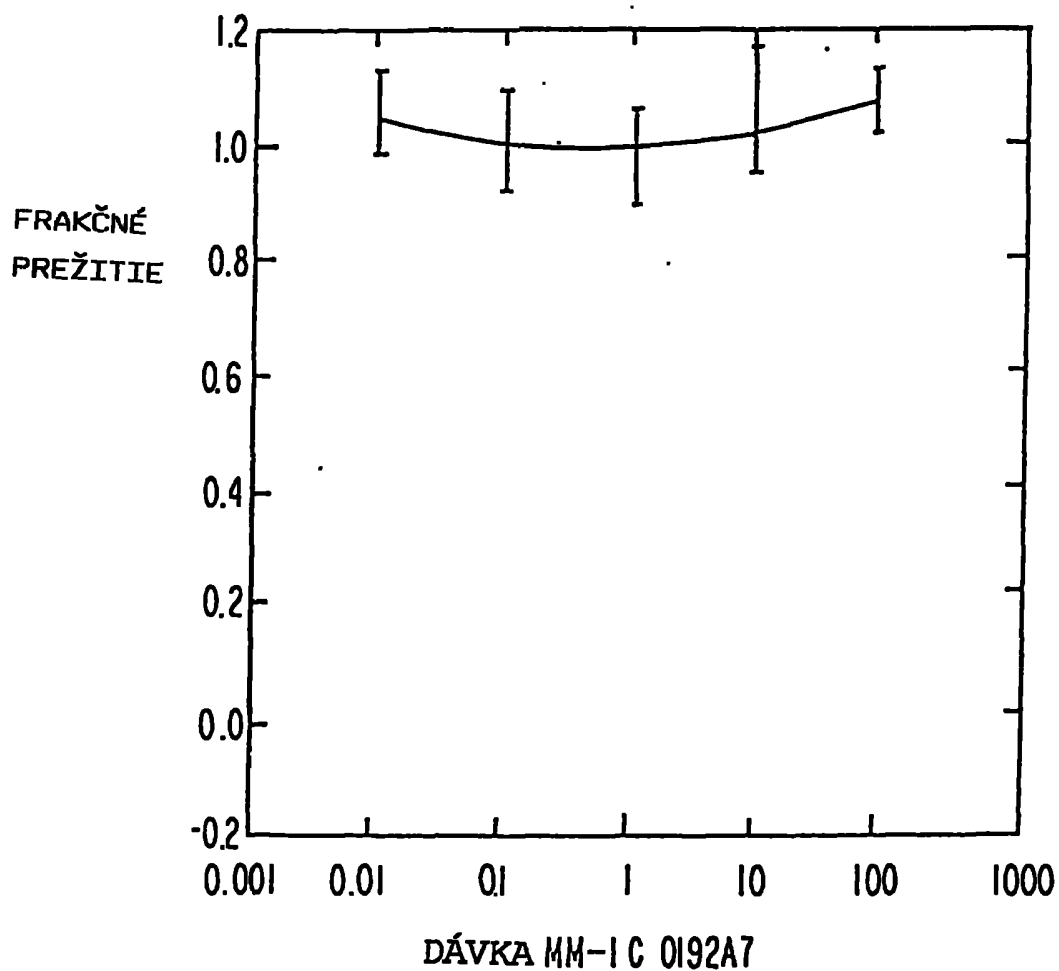
40/91

Obr. 10B



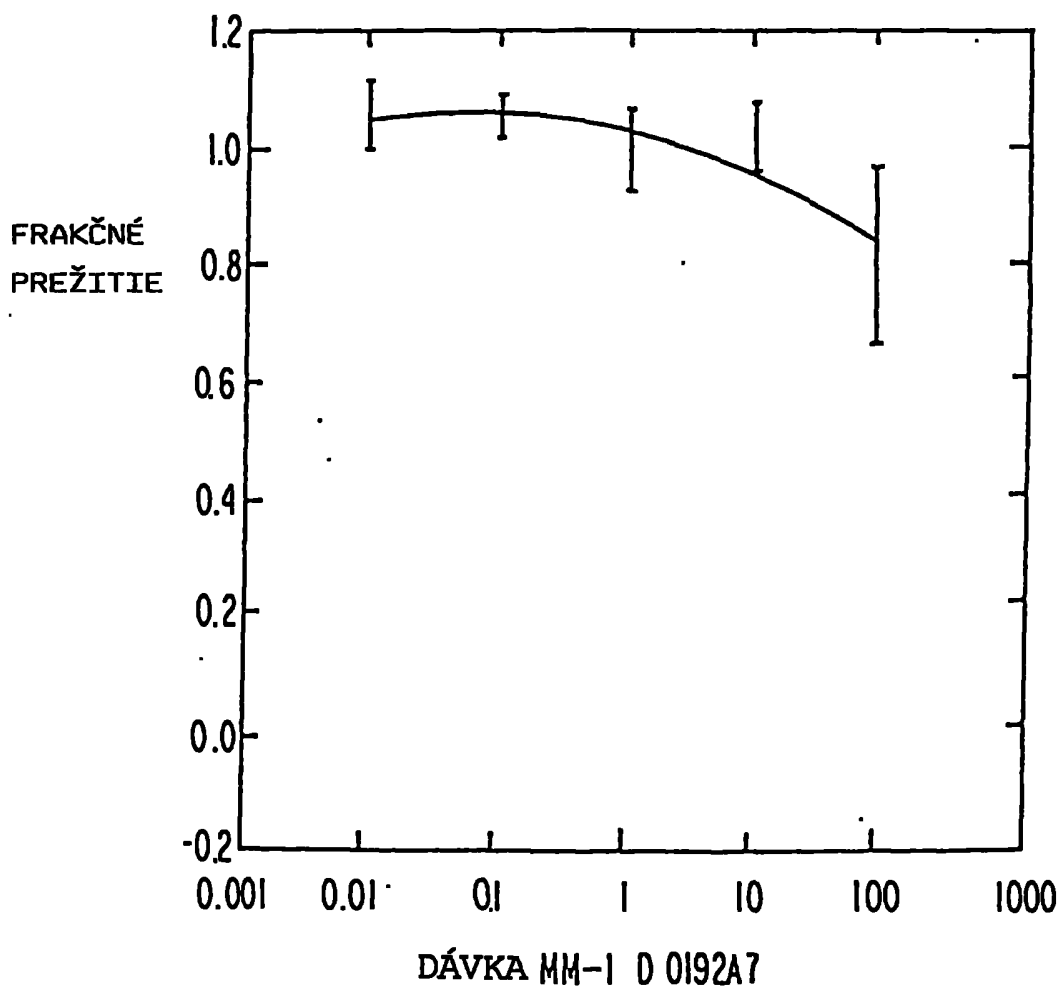
41/91

Obr. 10C



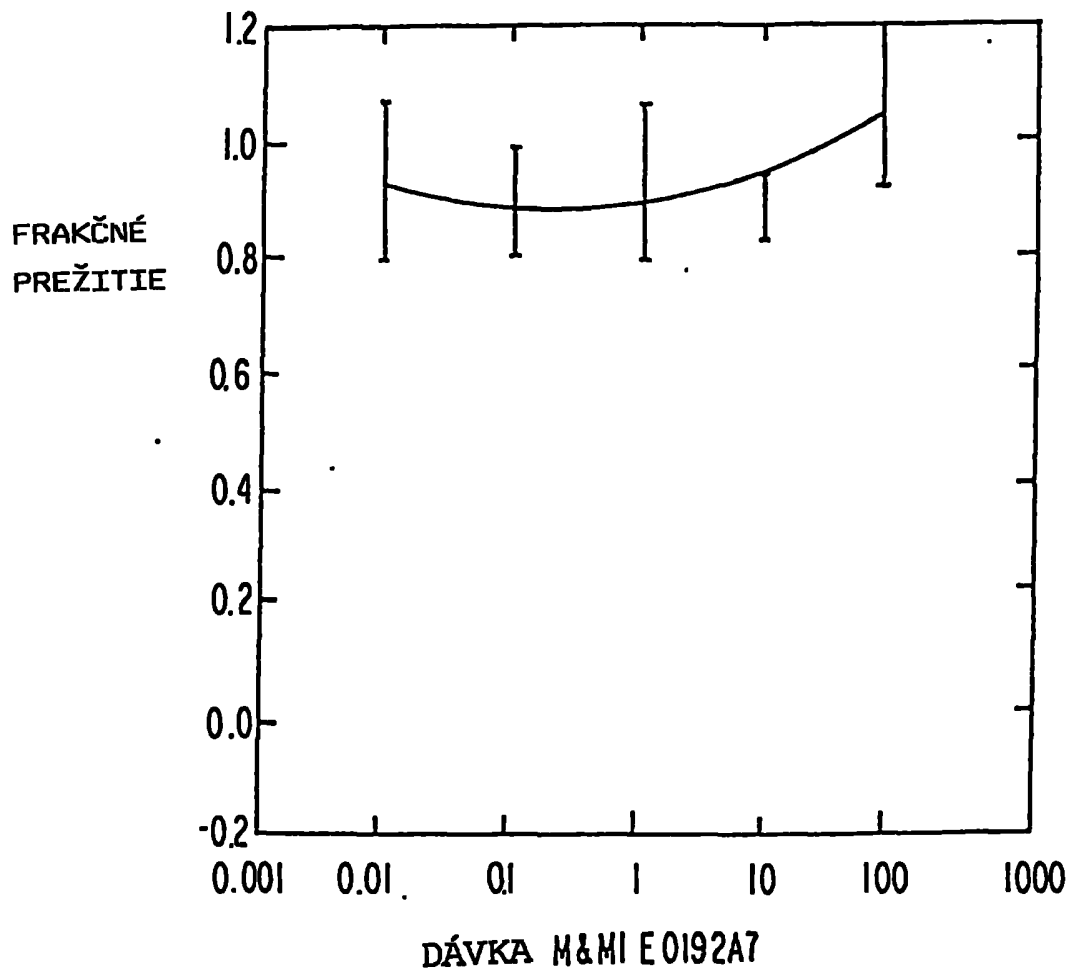
42/91

Obr. 10D



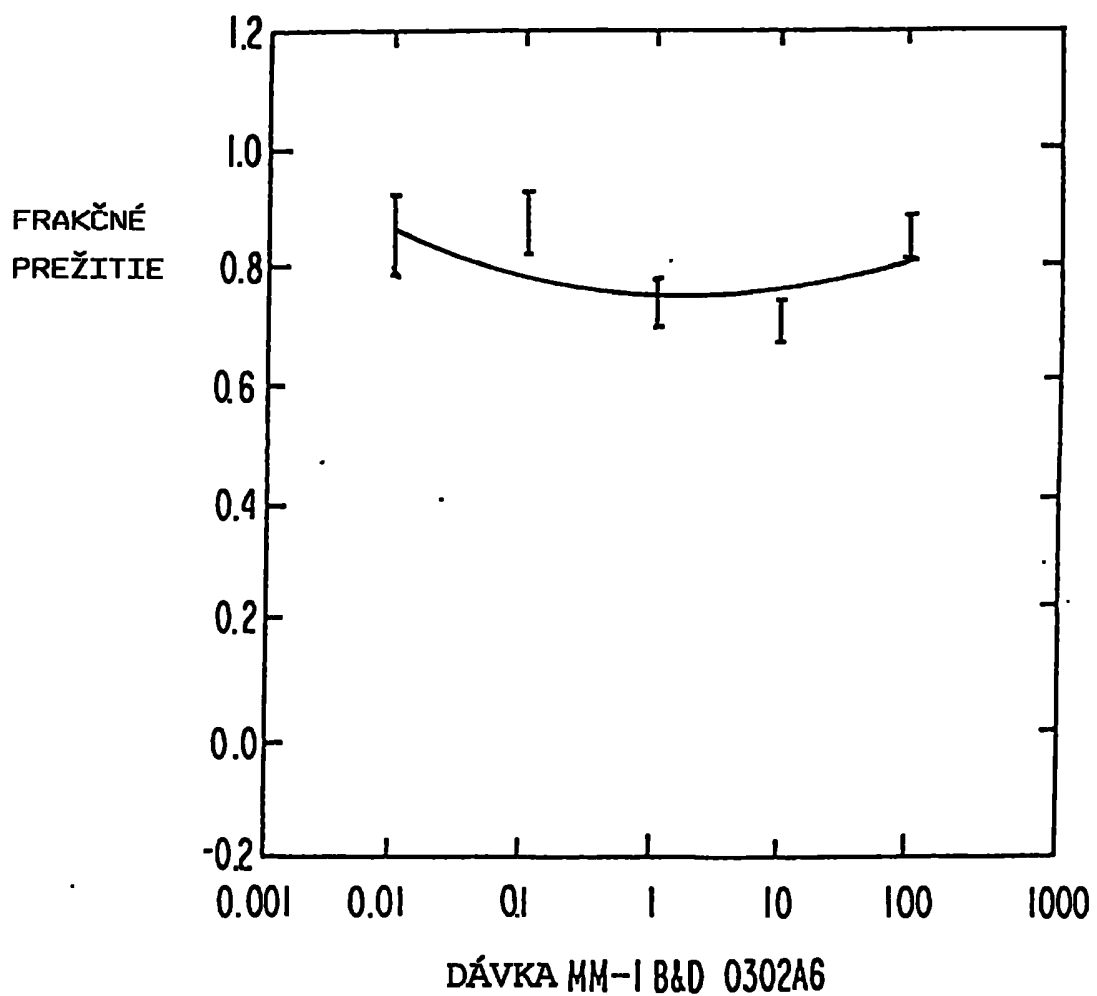
43/91

Obr. 10E



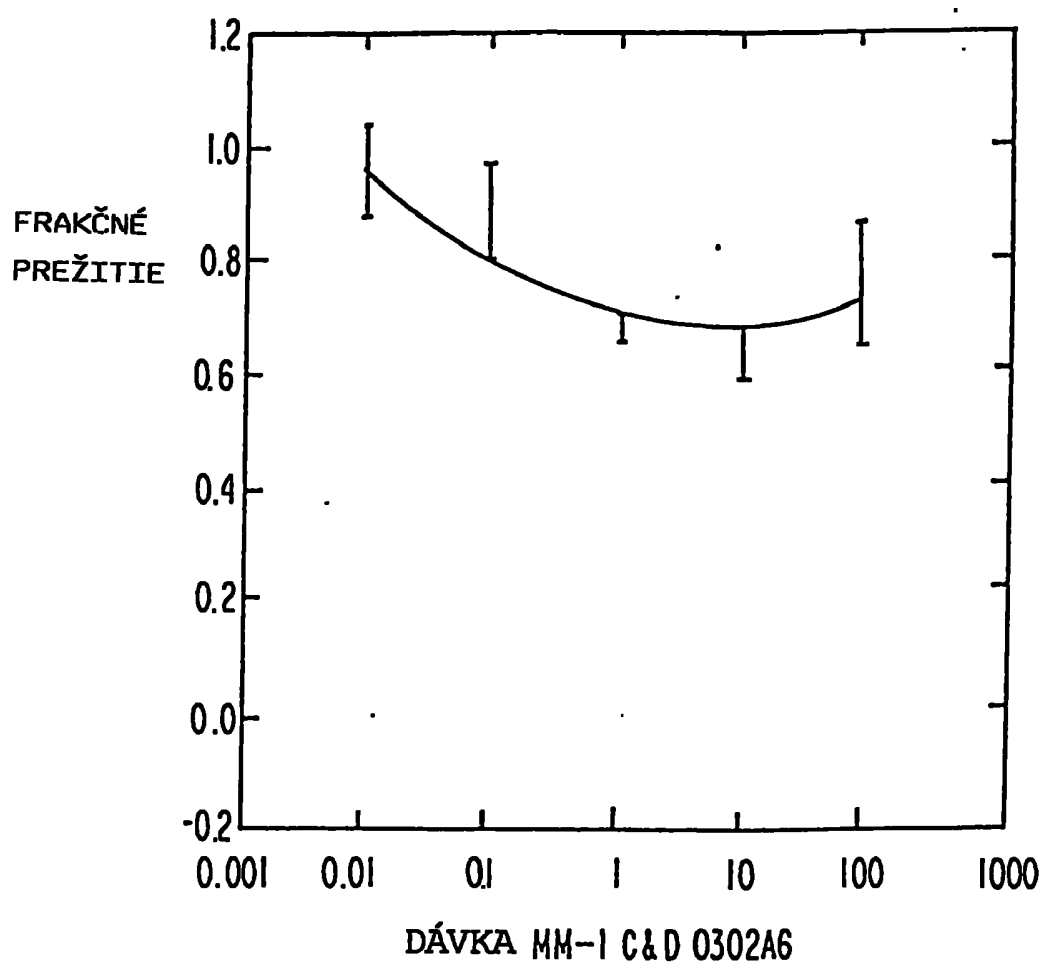
44/91

Obr. 10F



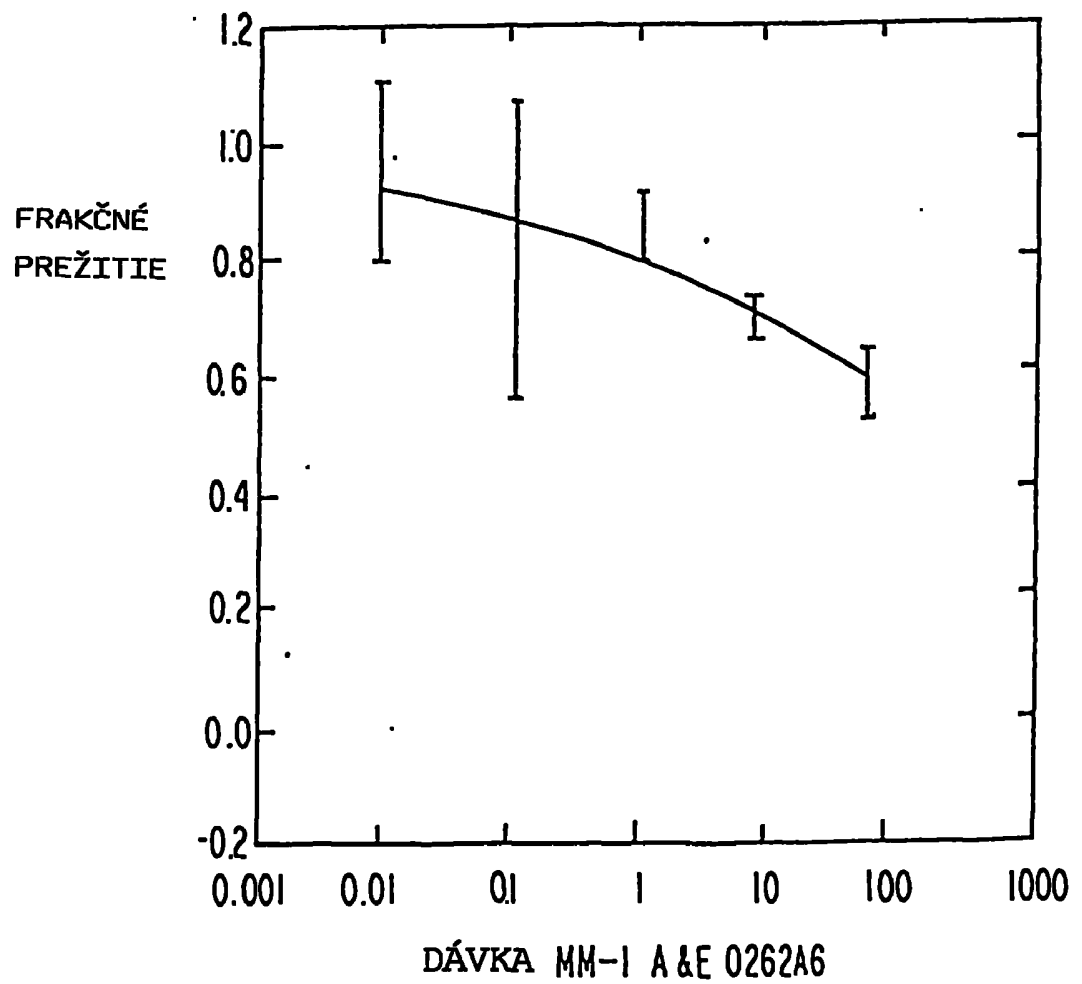
45/91

Obr. 10G



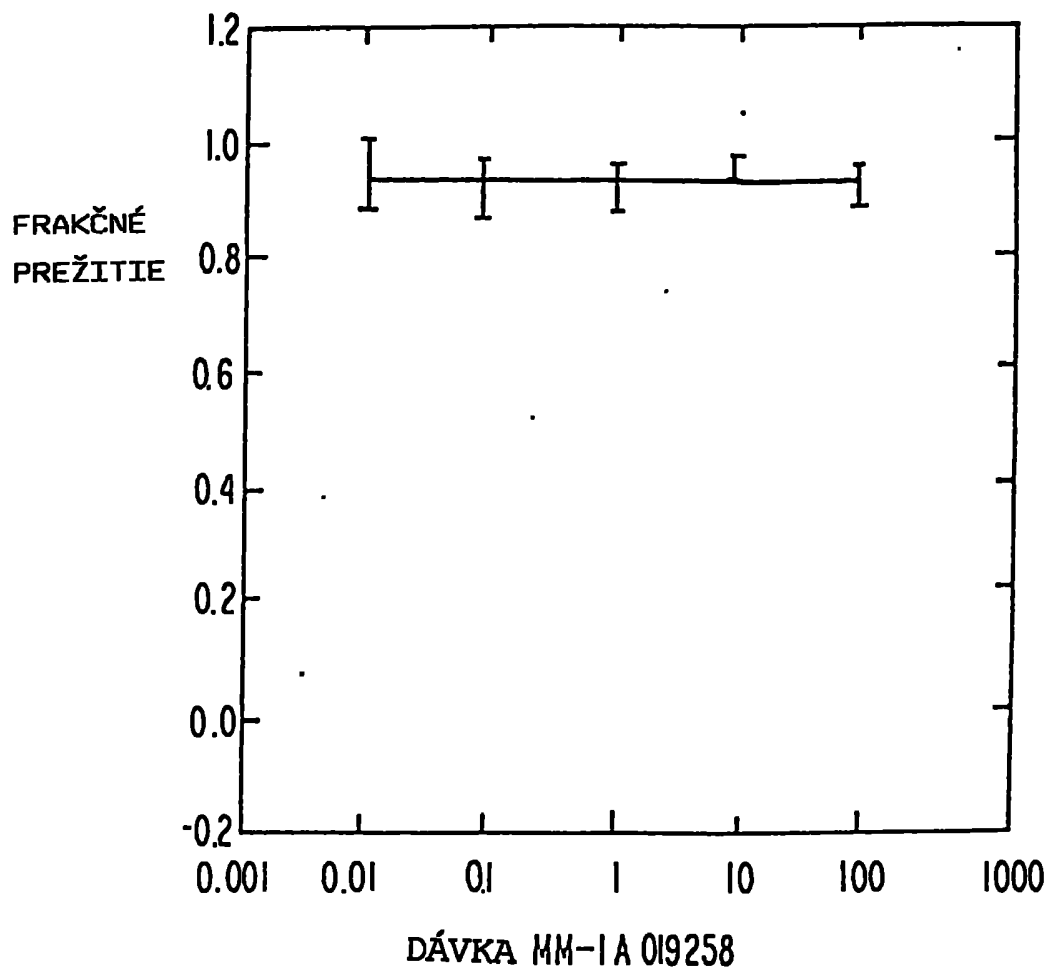
46/91

Obr. 10H



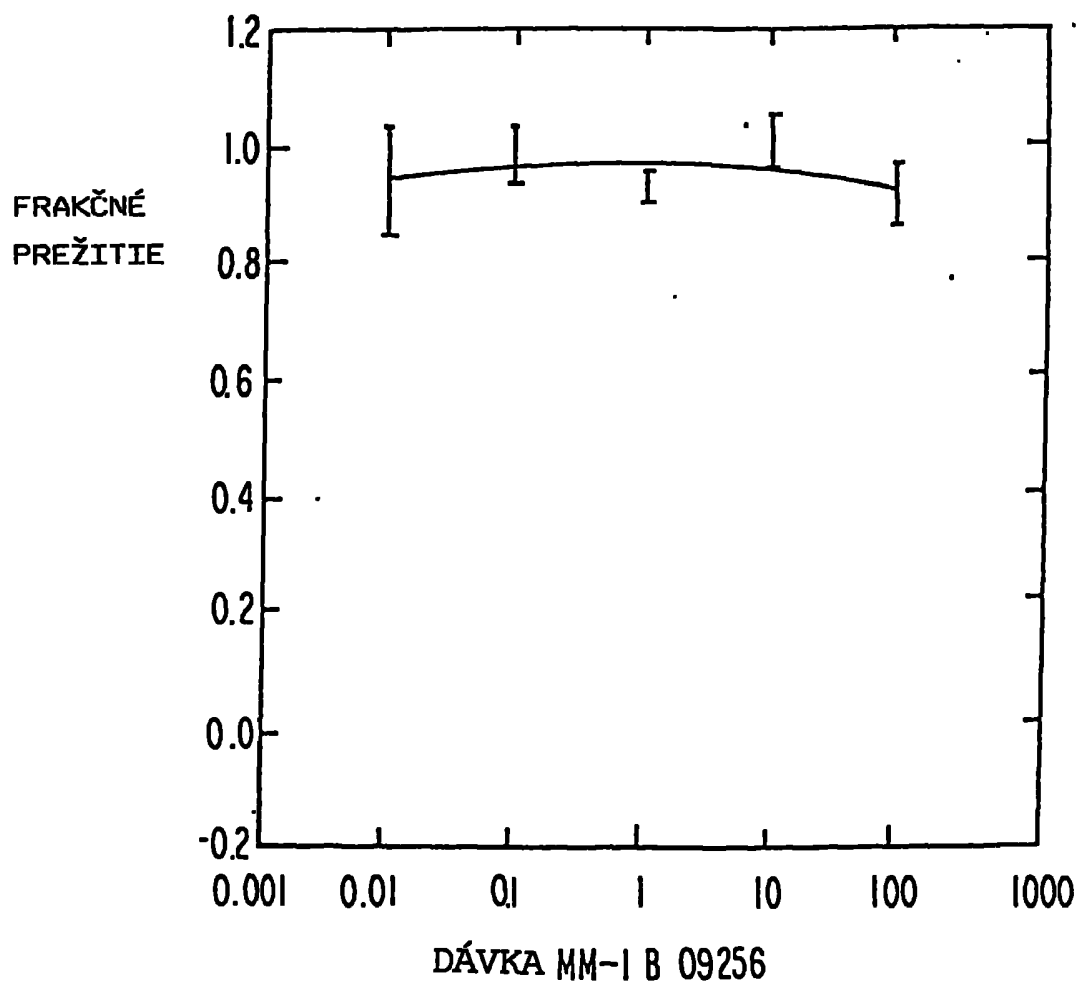
47/91

Obr. 11A



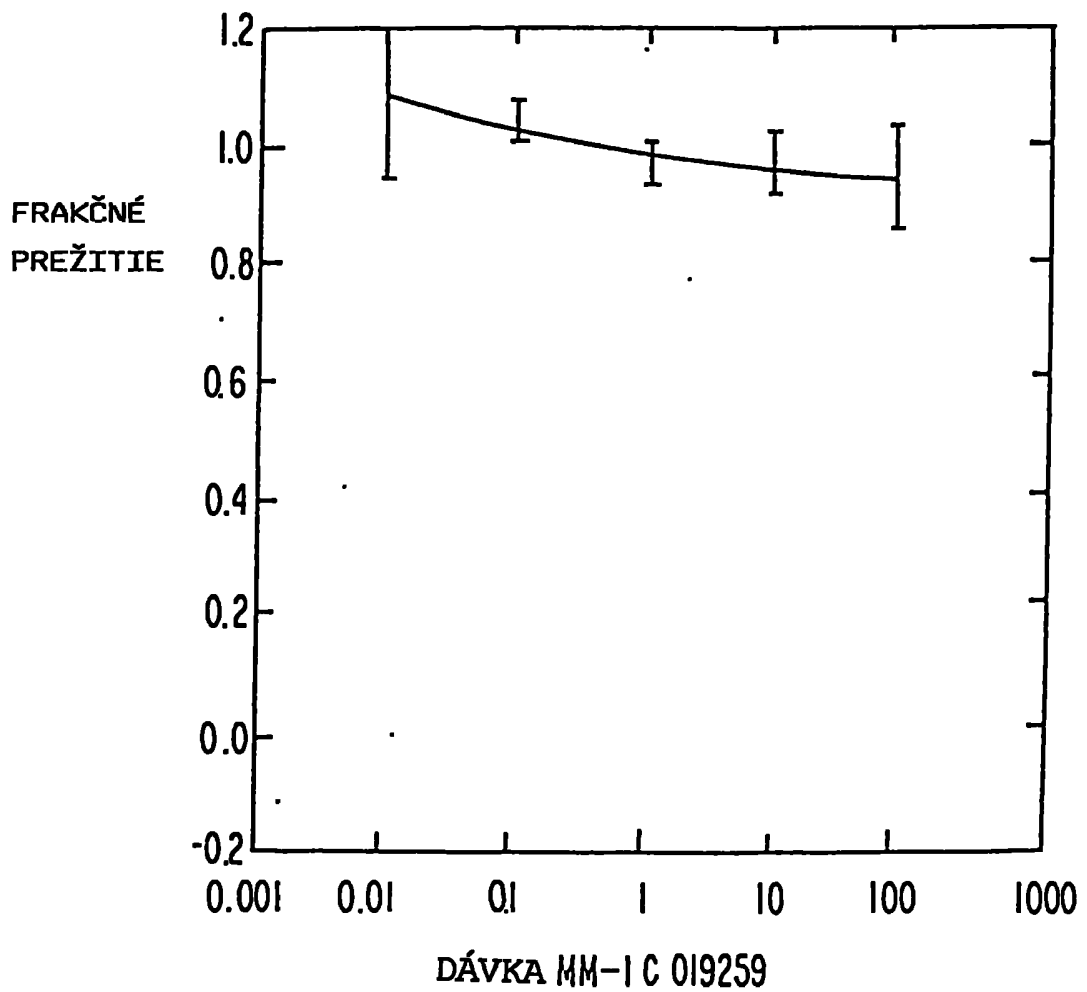
48/91

Obr. 11B



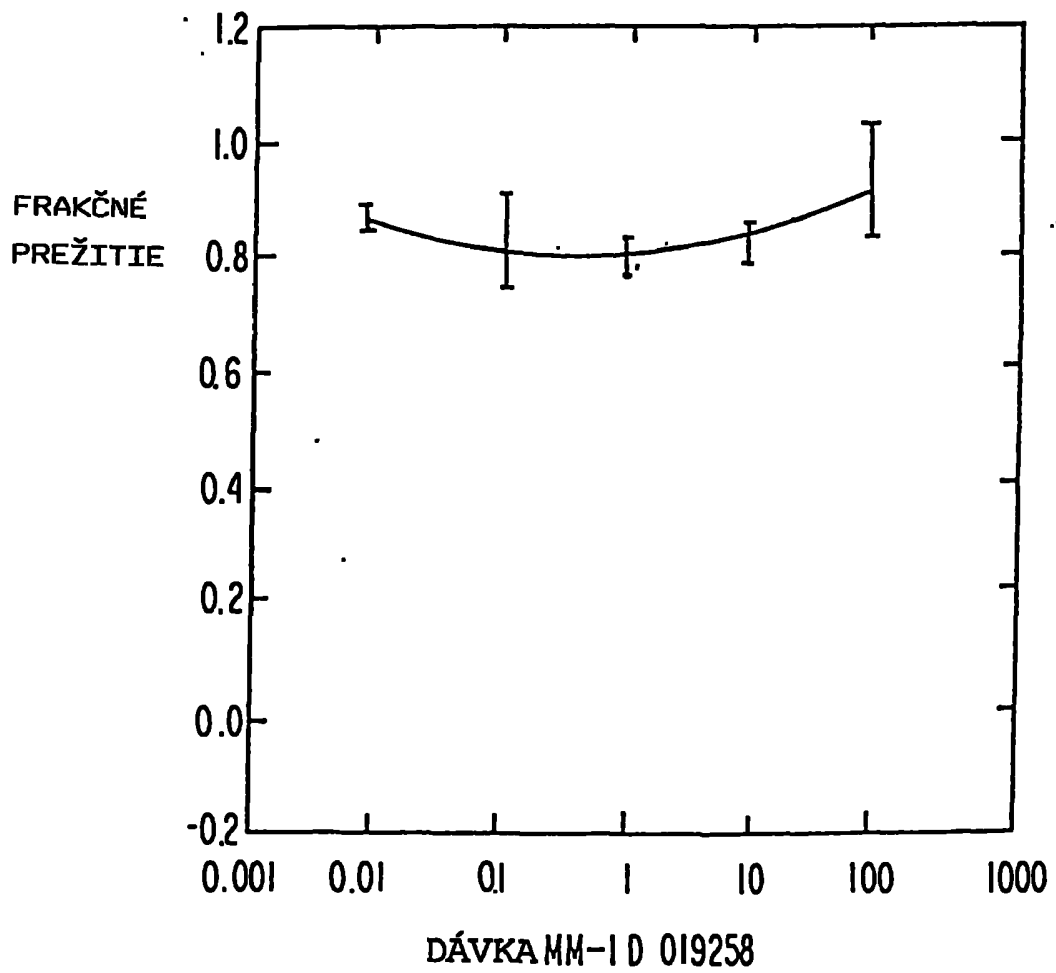
49/91

Obr. 11C



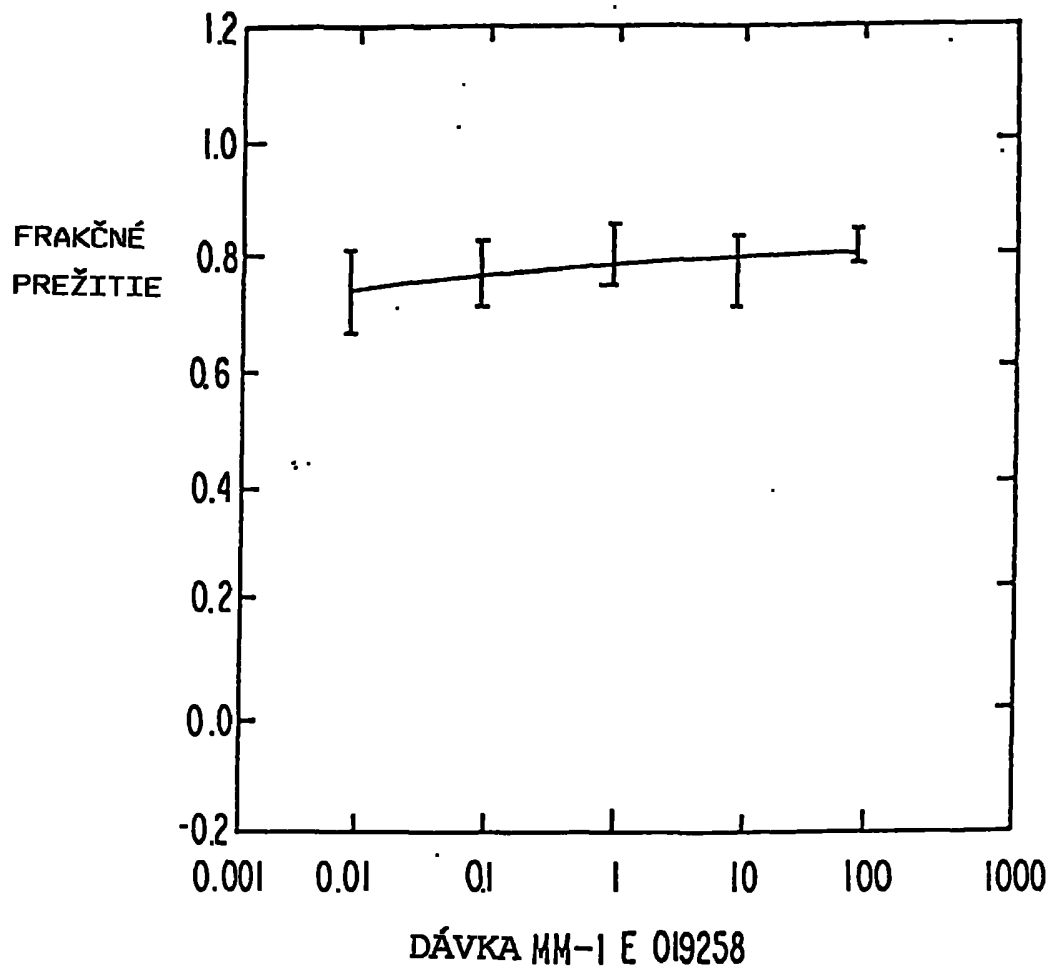
50/91

Obr. 11D



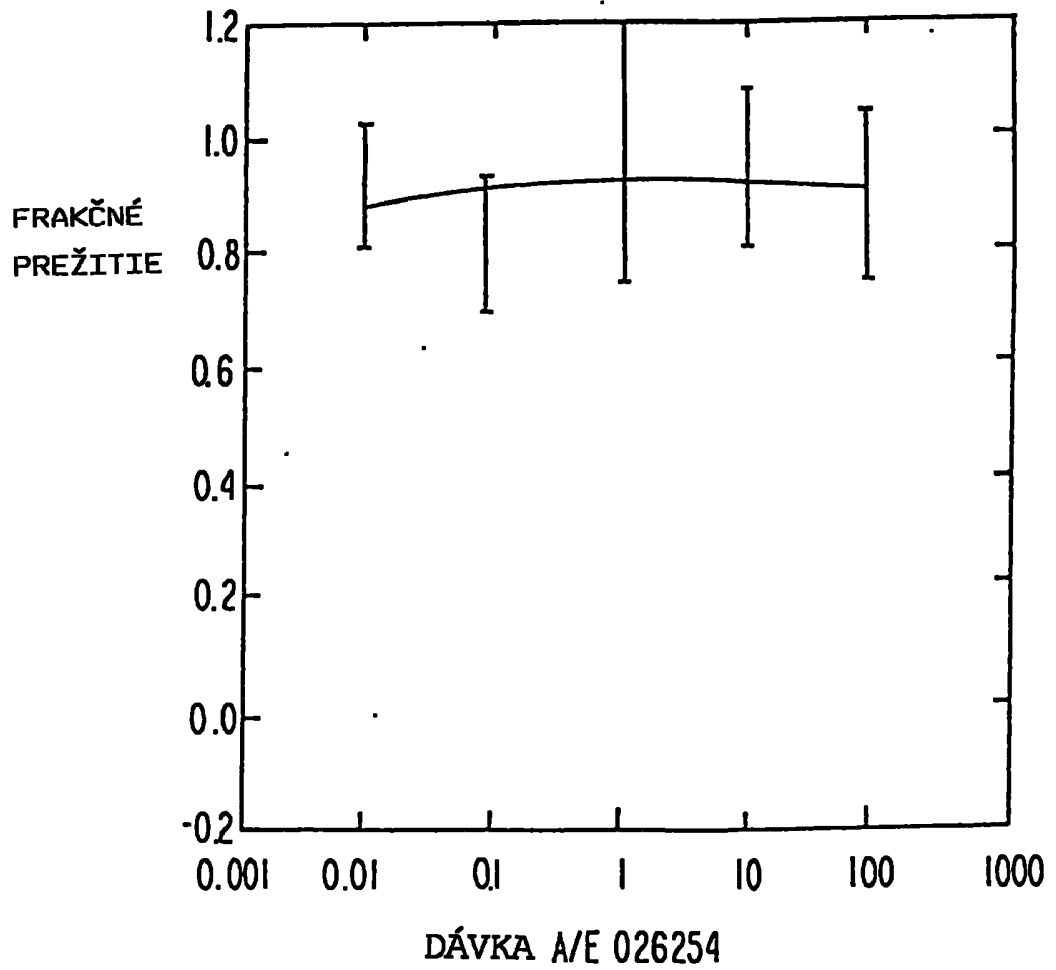
51/91

Obr. 11E



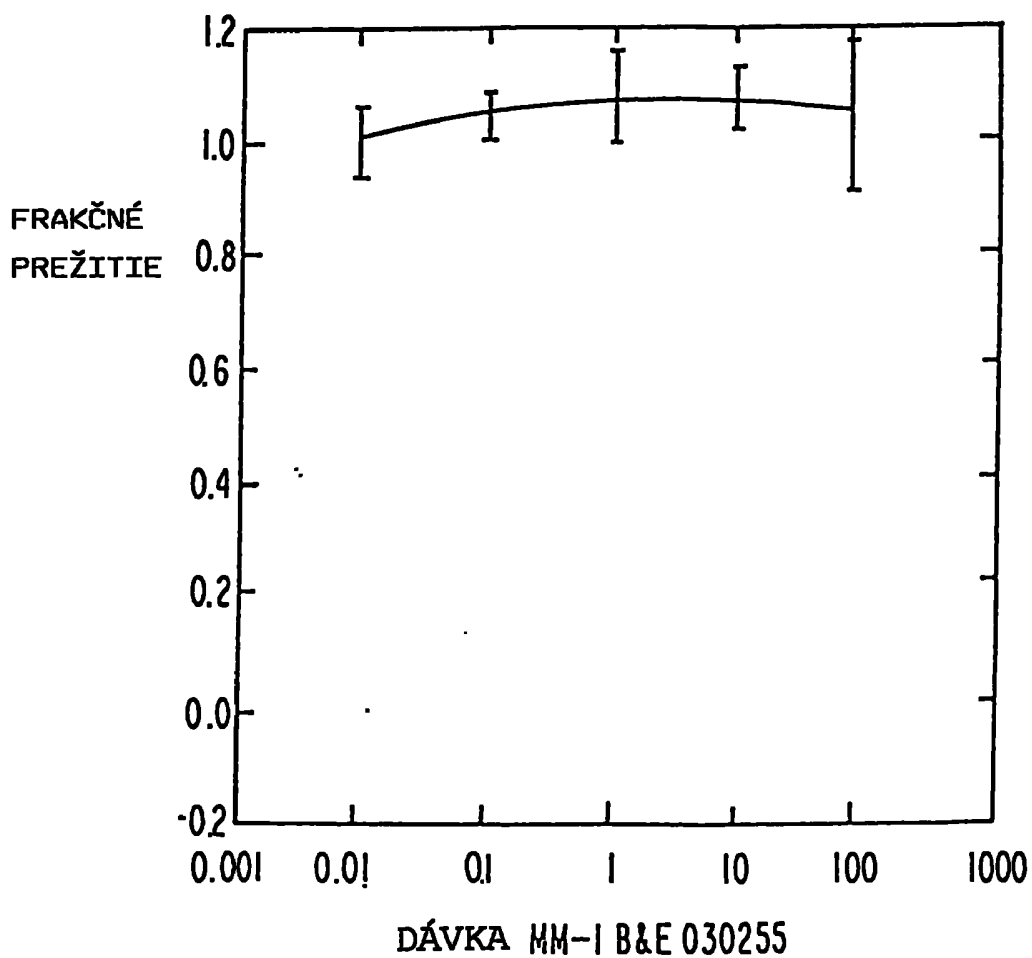
52/91

Obr. 11F



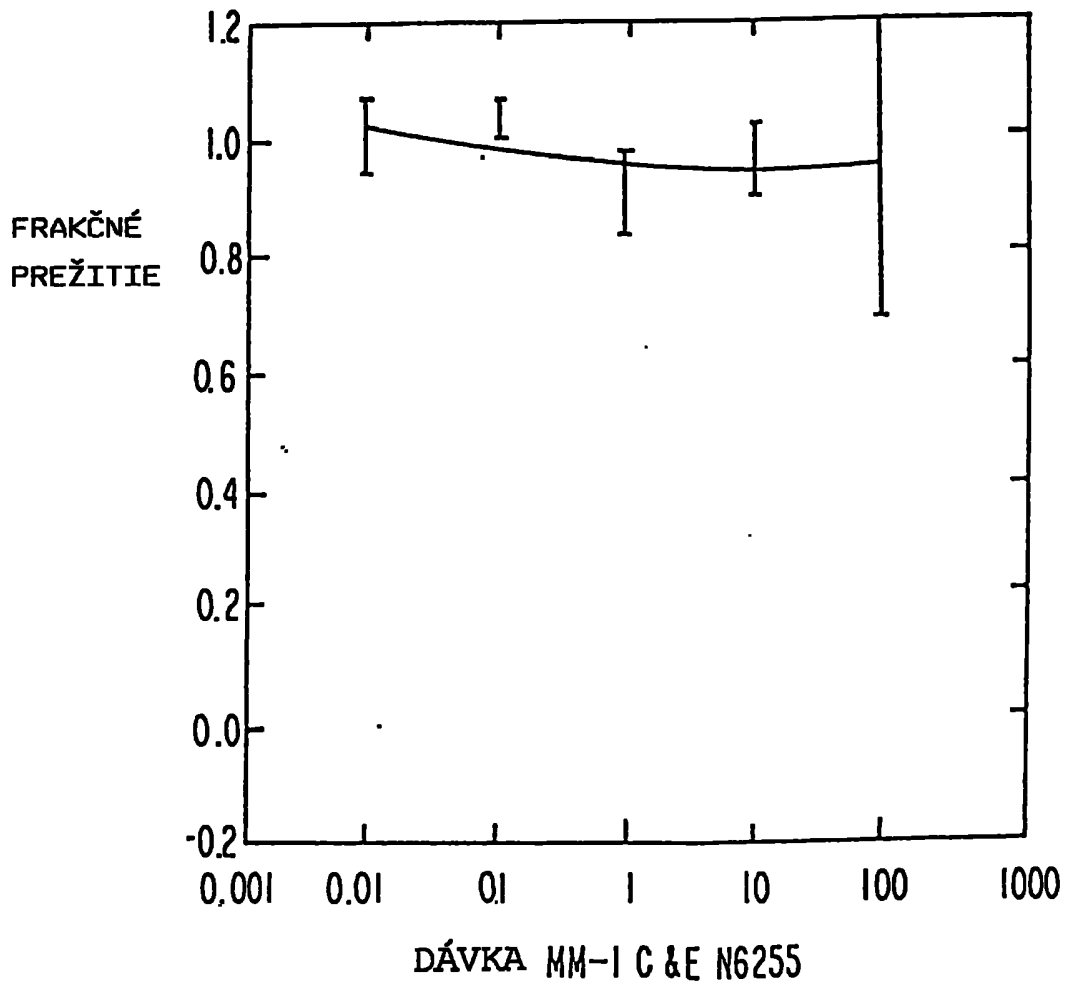
53/91

Obr. 11G



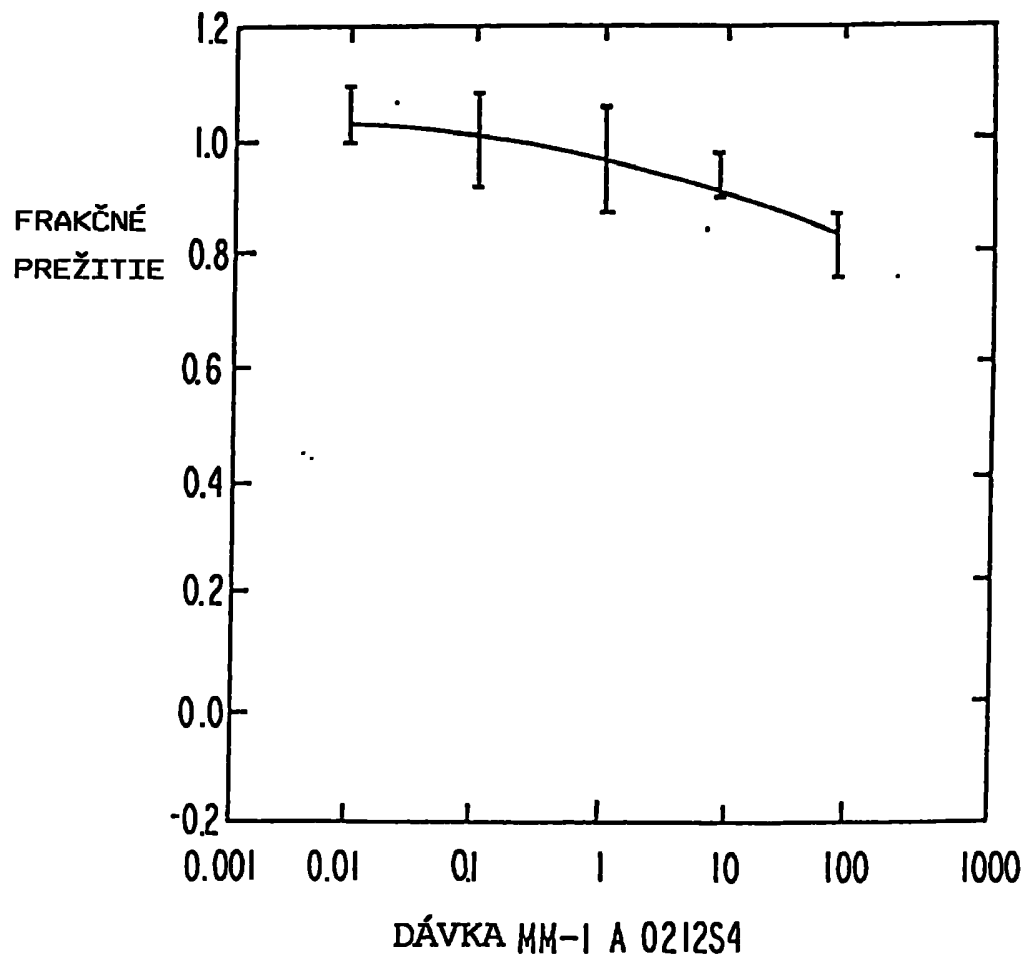
54/91

Obr. 11H



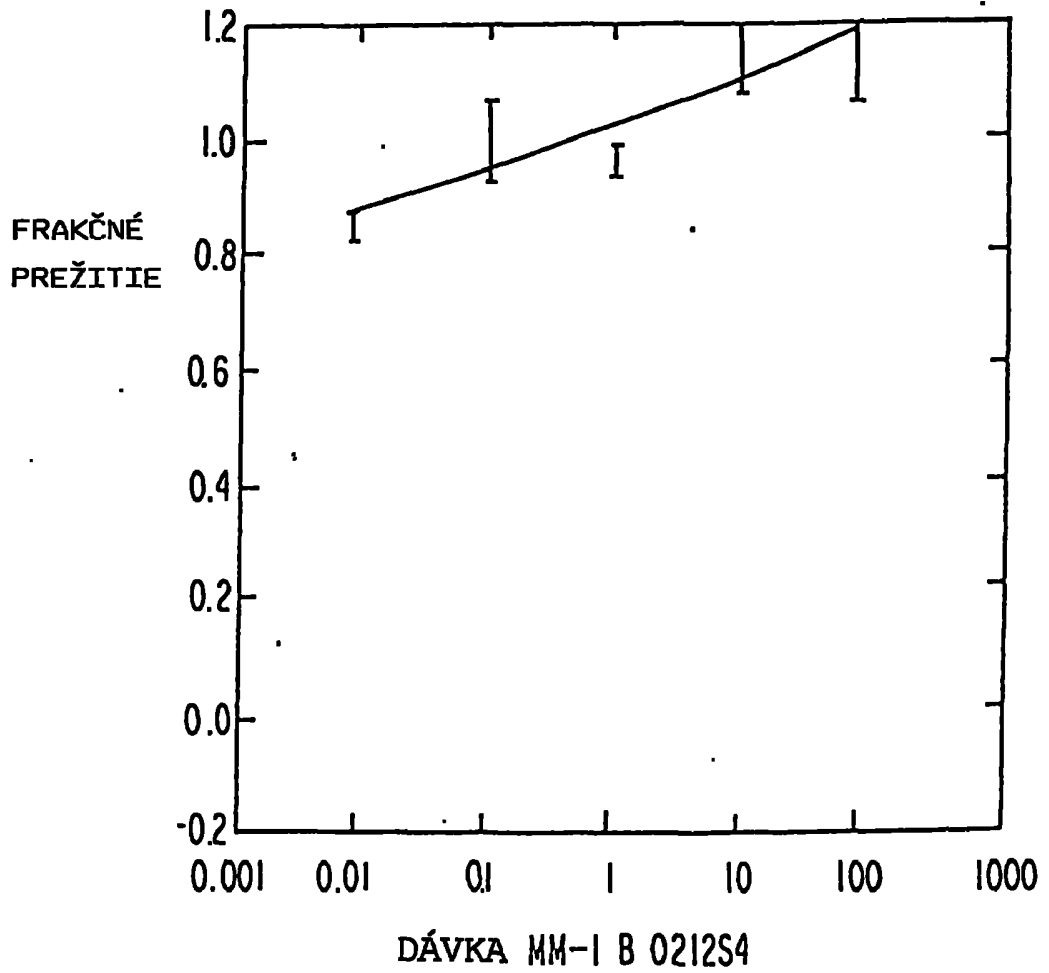
55/91

Obr. 12A



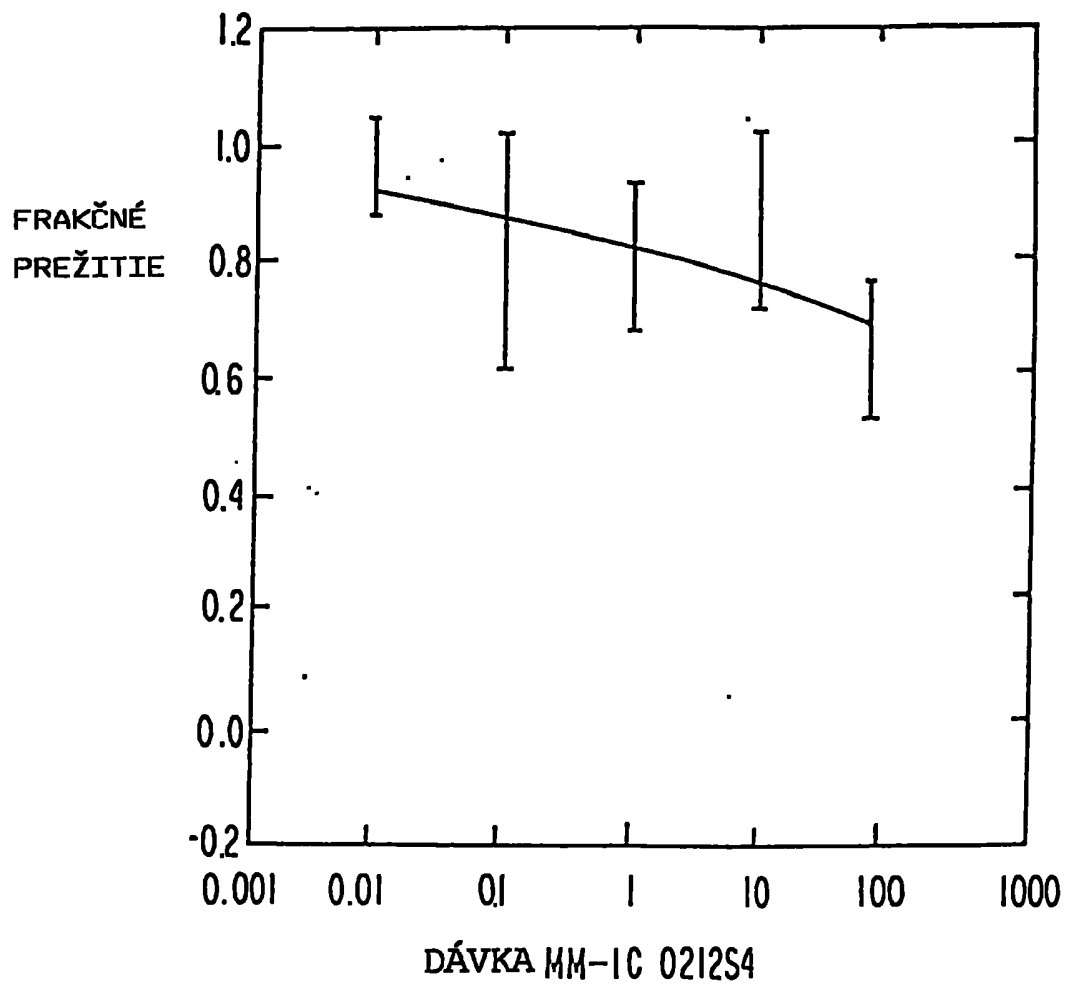
56/91

Obr. 12B



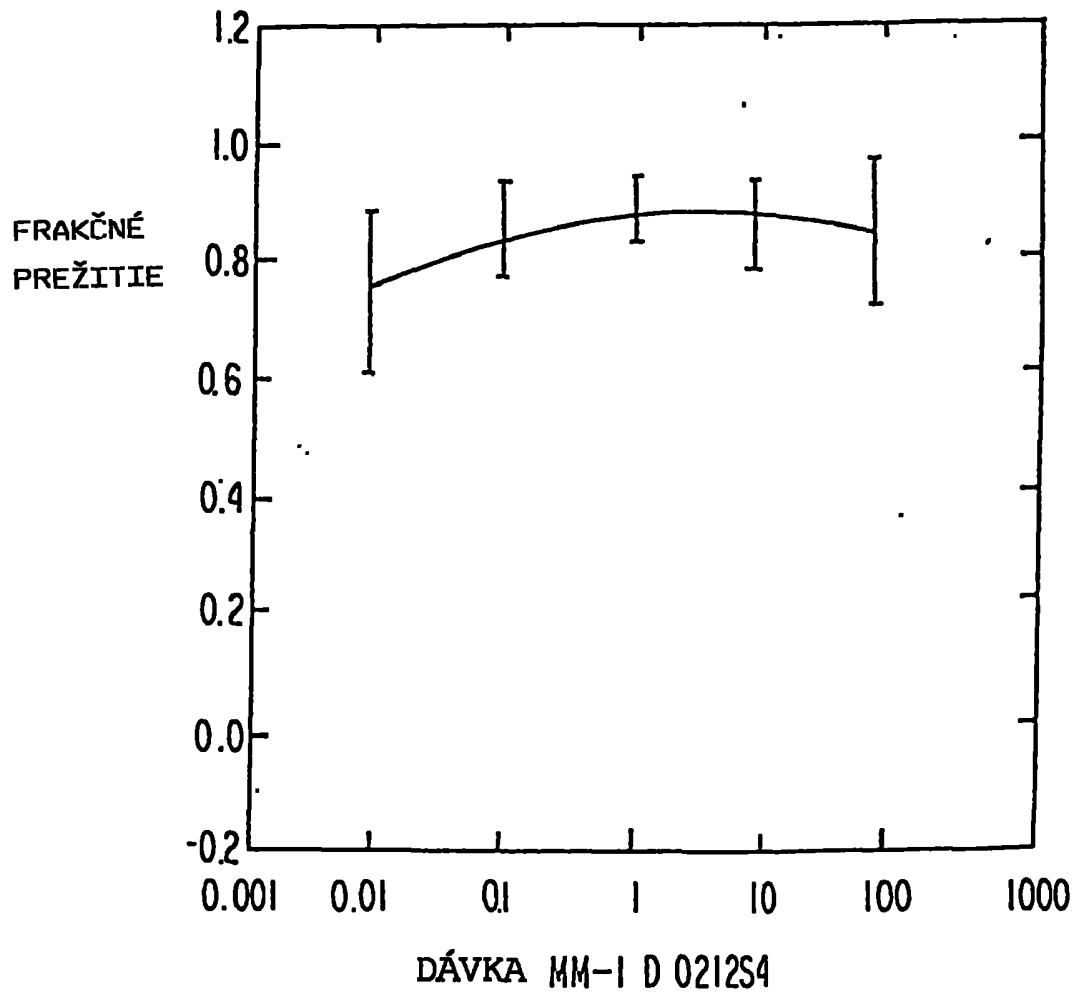
57/91

Obr. 12C



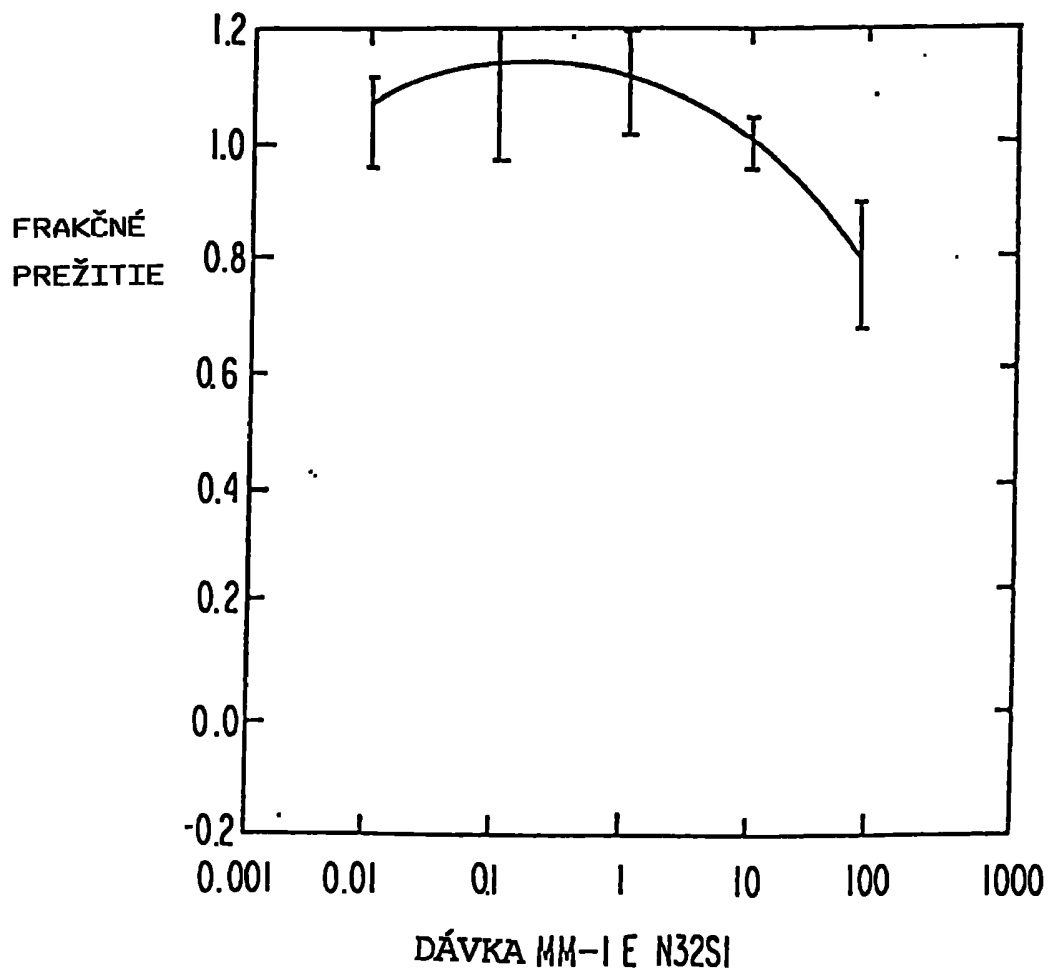
58/91

Obr. 12D



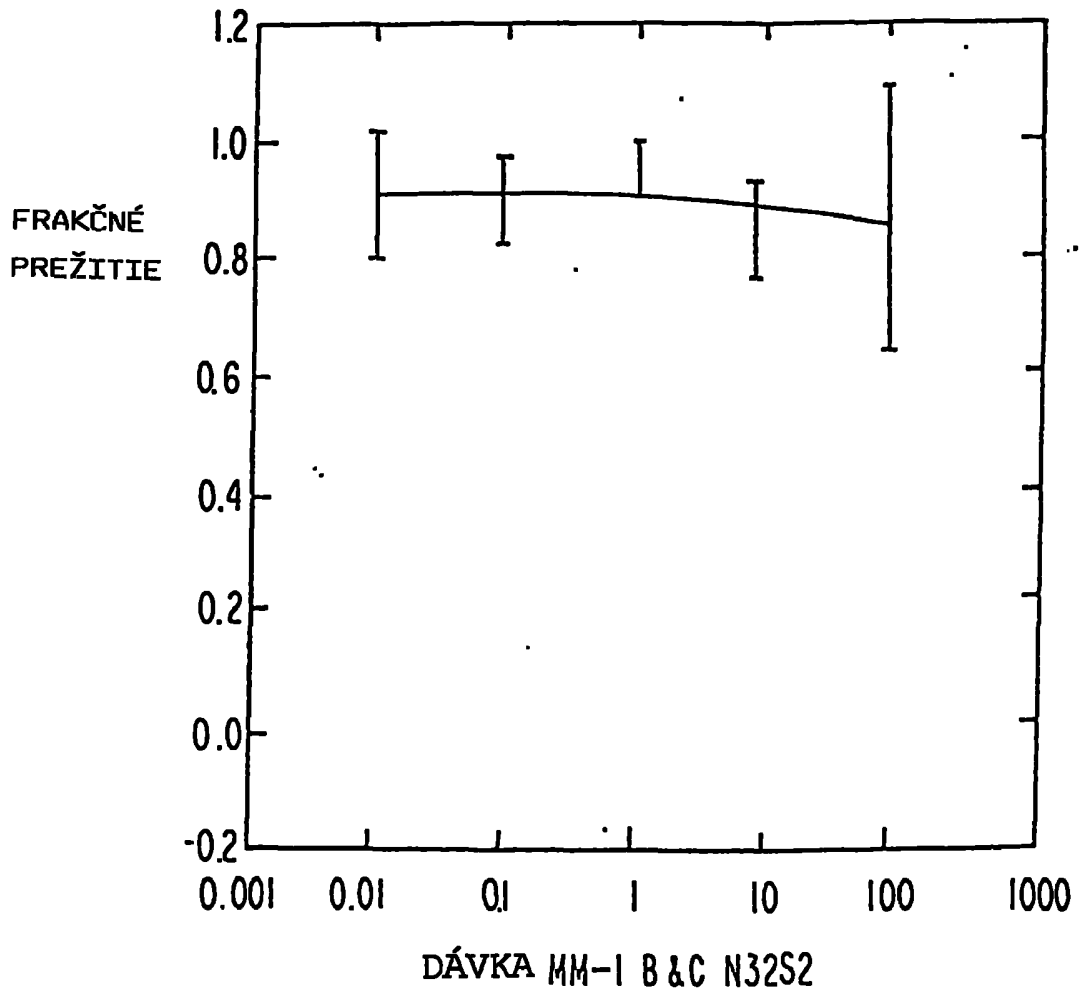
59/91

Obr. 12E



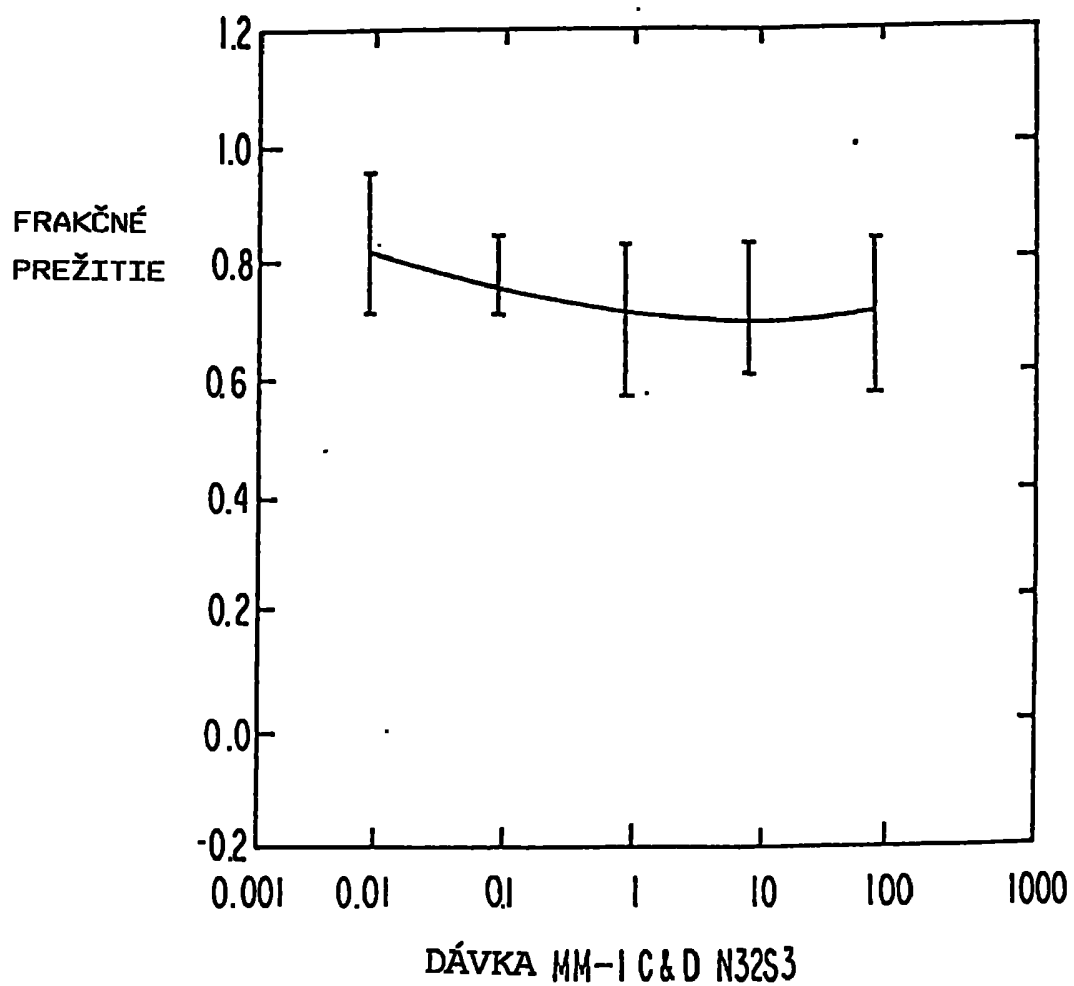
60/91

Obr. 12F



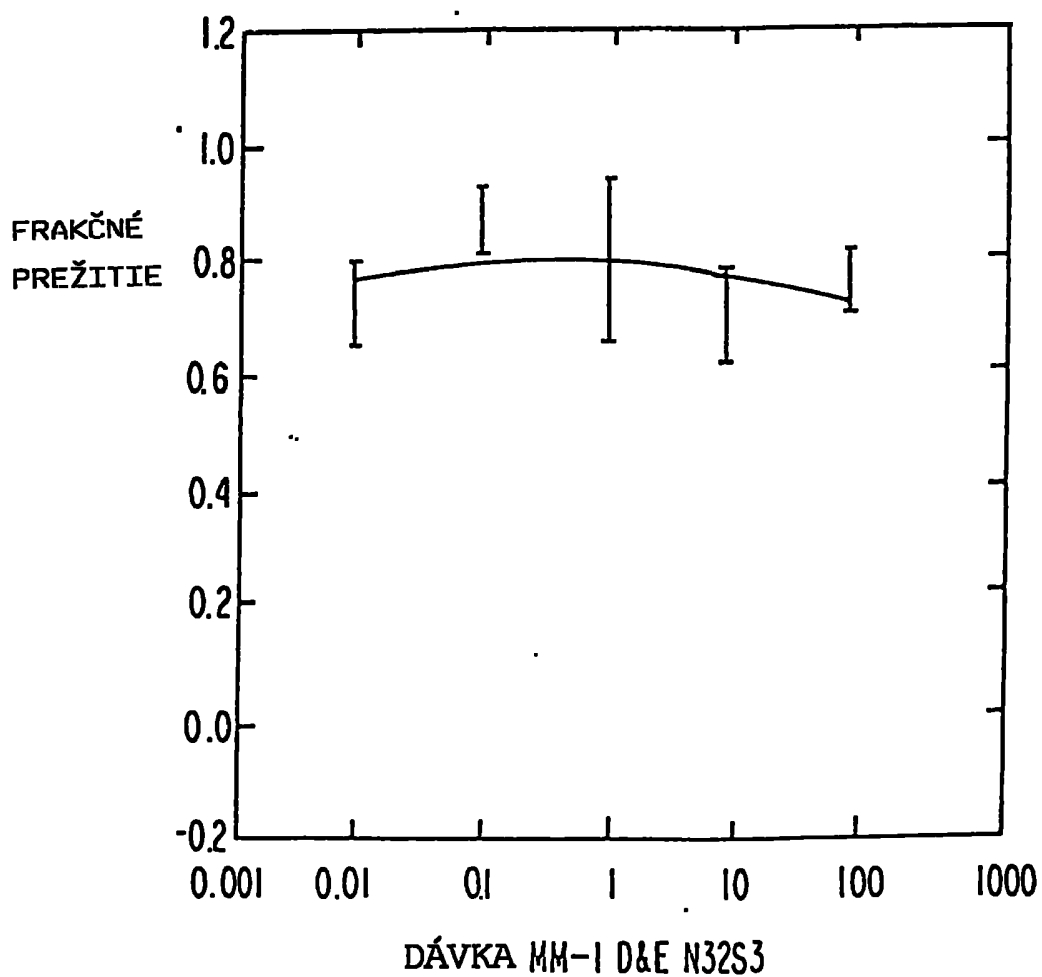
61/91

Obr. 12G



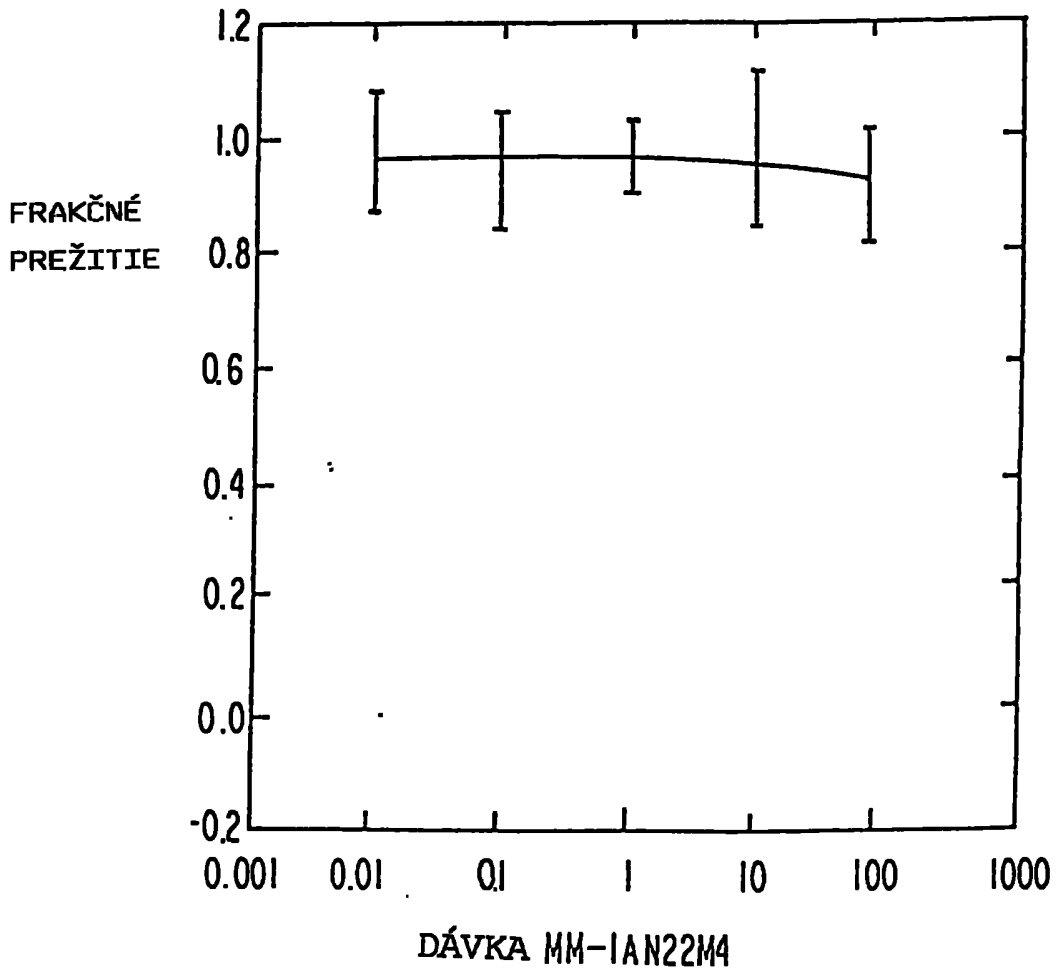
62/91

Obr. 12H



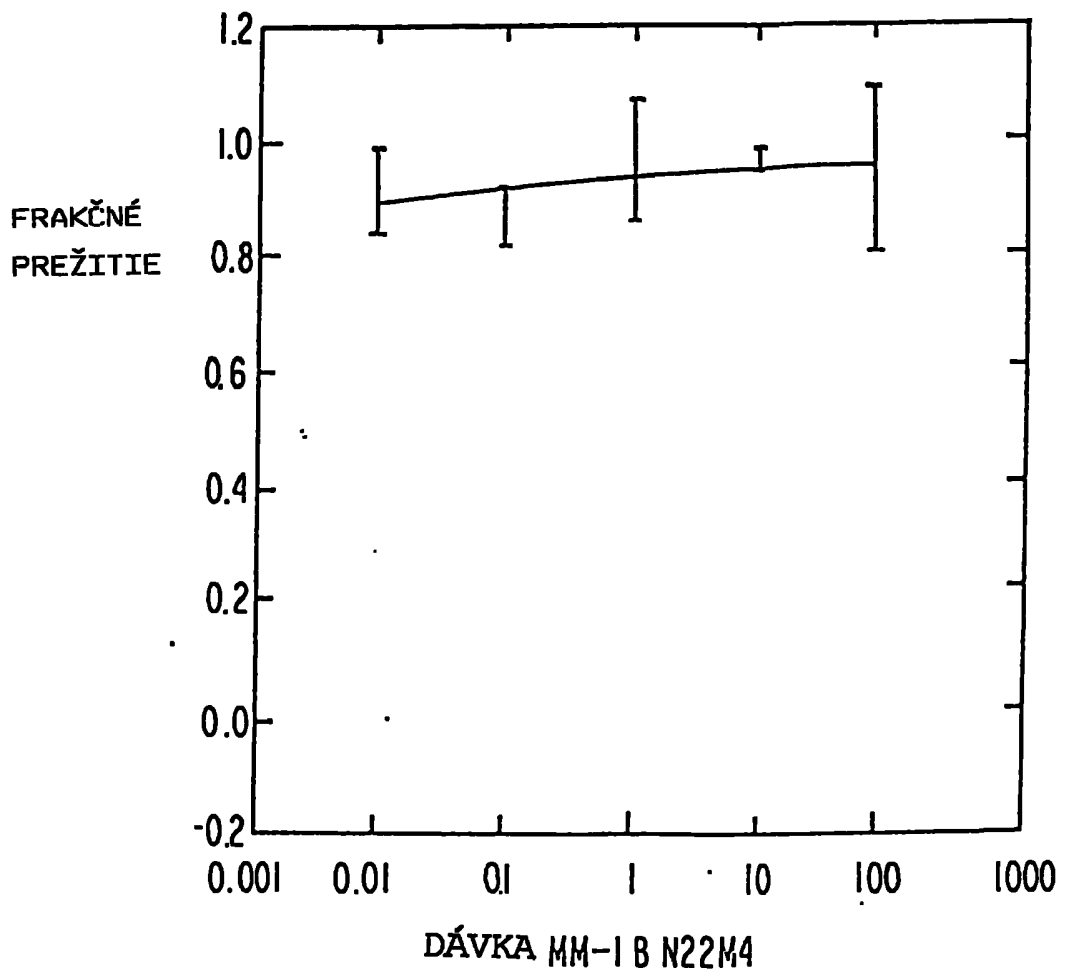
63/91

Obr. 13A



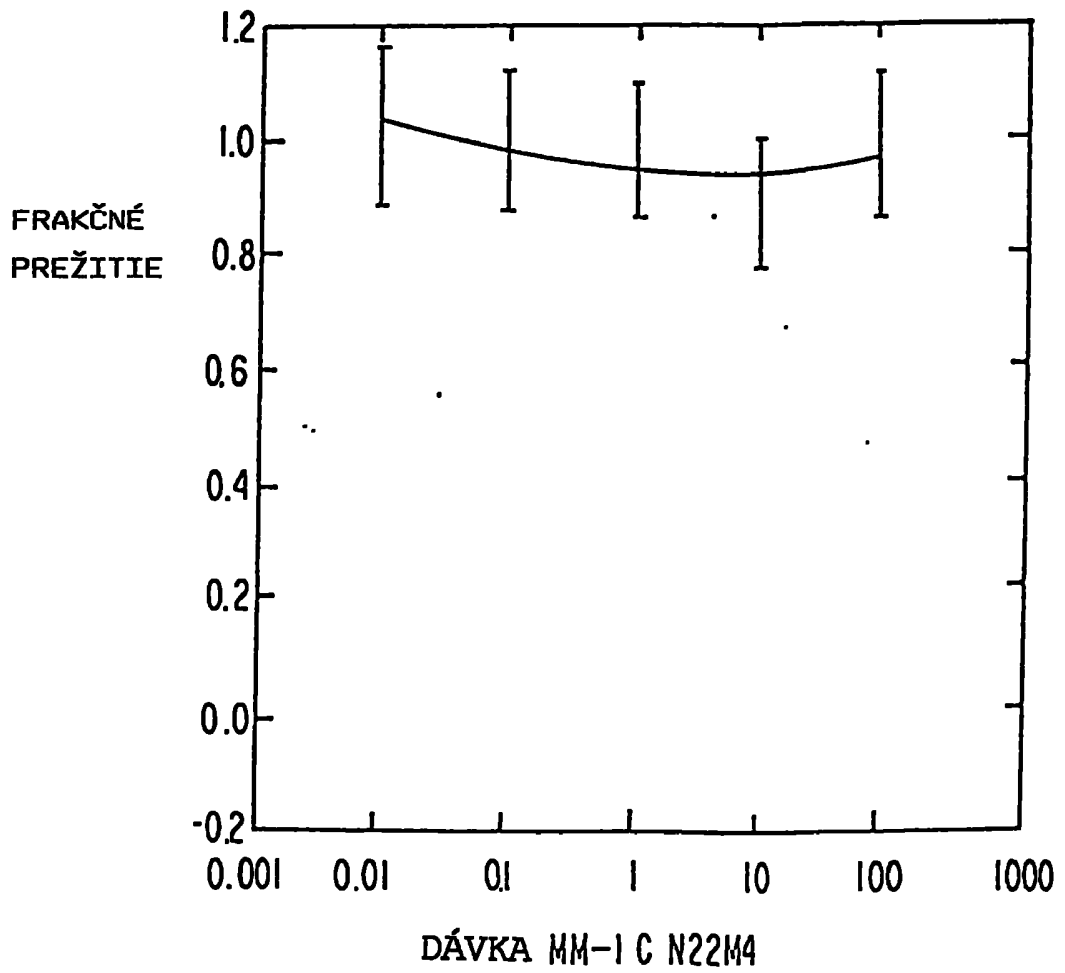
64/91

Obr. 13B



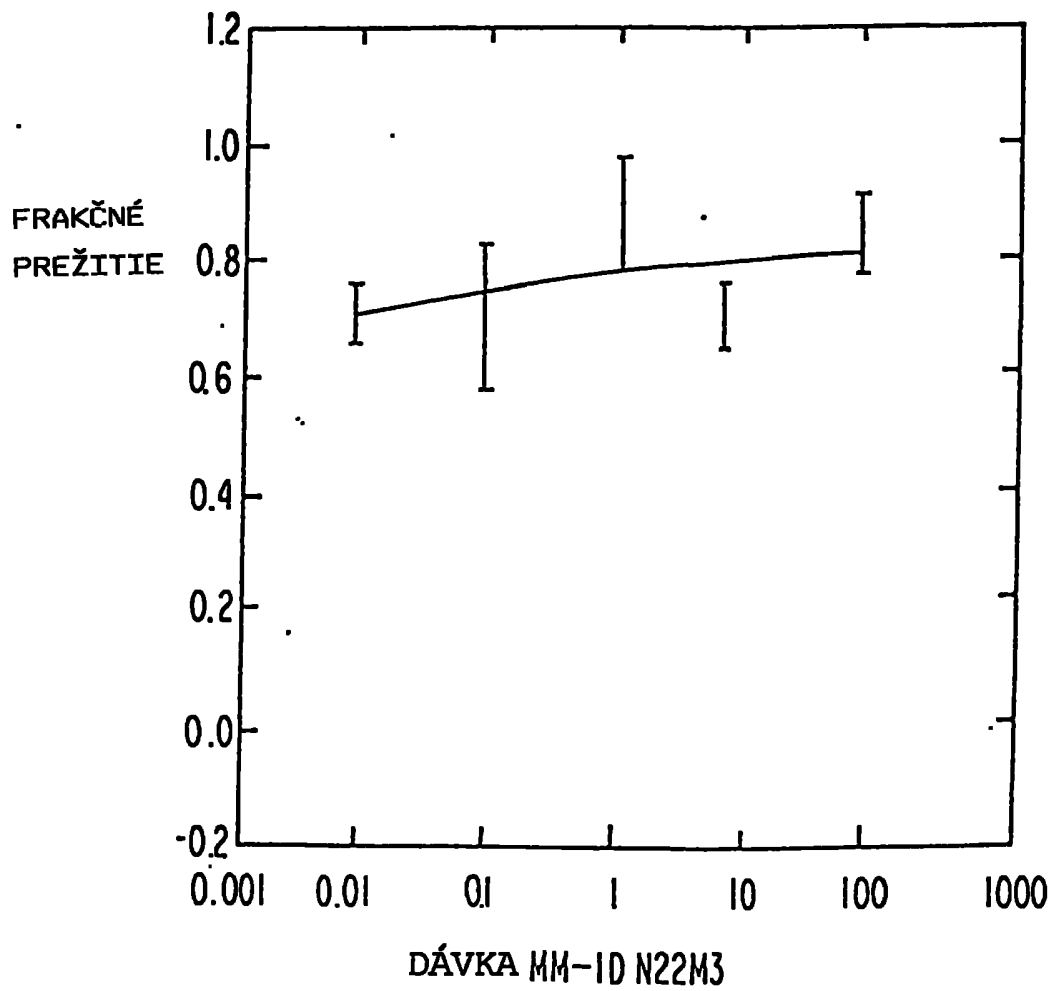
65/91

Obr. 13C



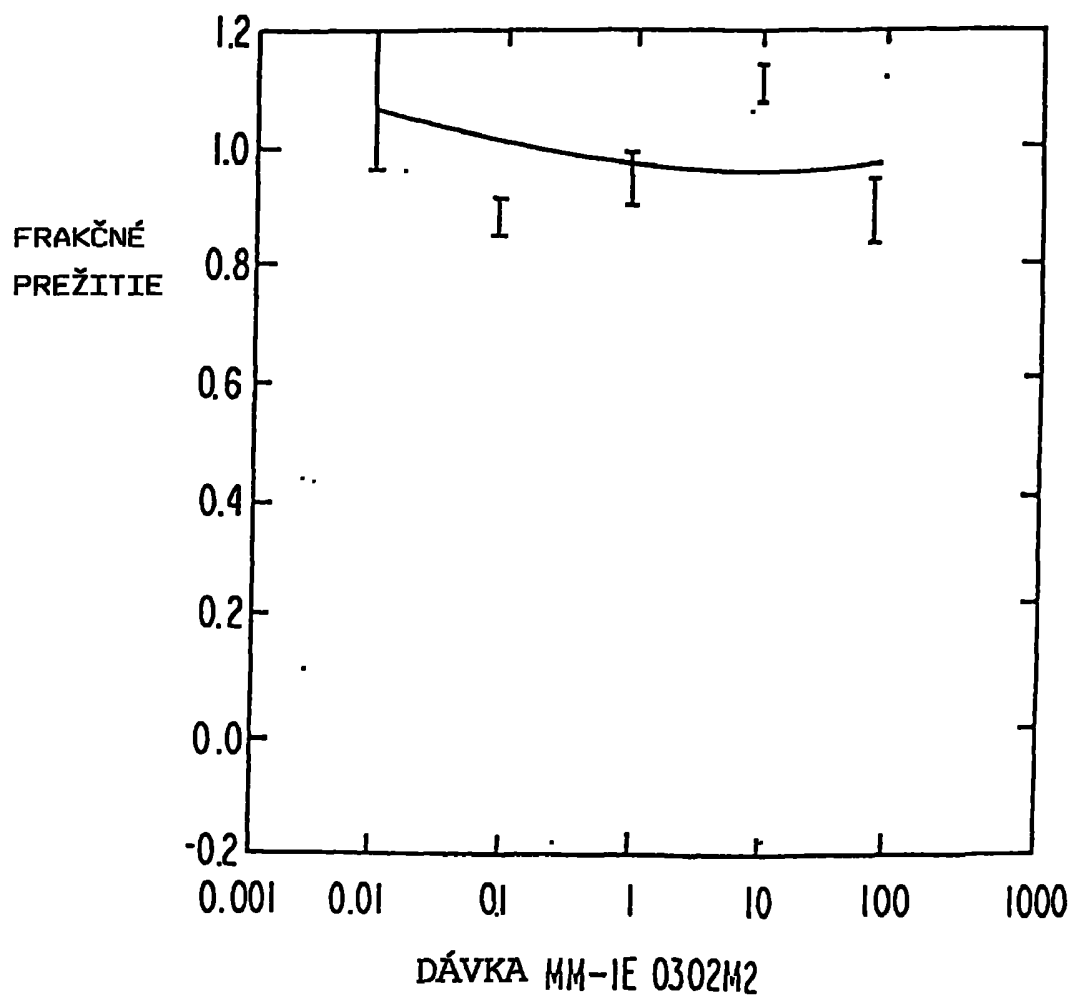
66/91

Obr. 13D



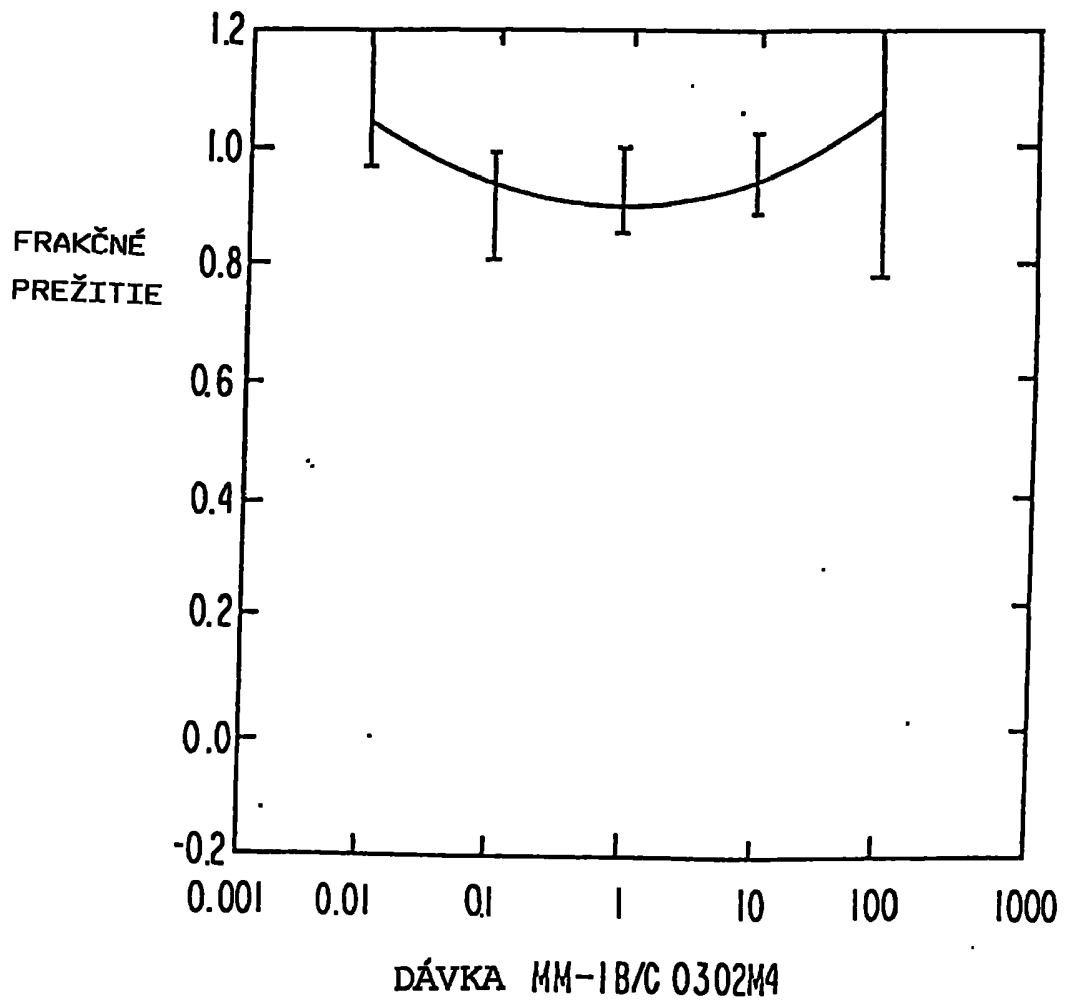
67/91

Obr. 13E



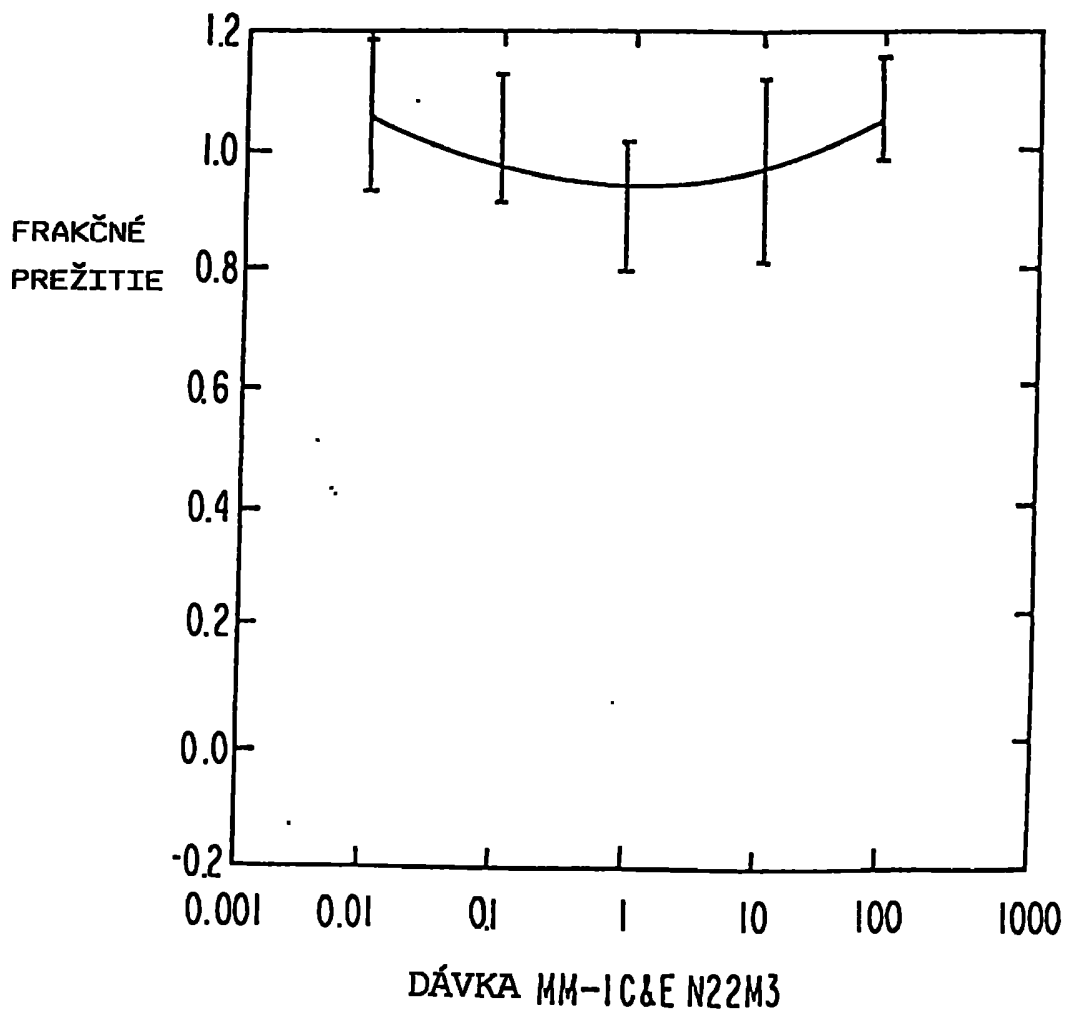
68/91

Obr. 13F



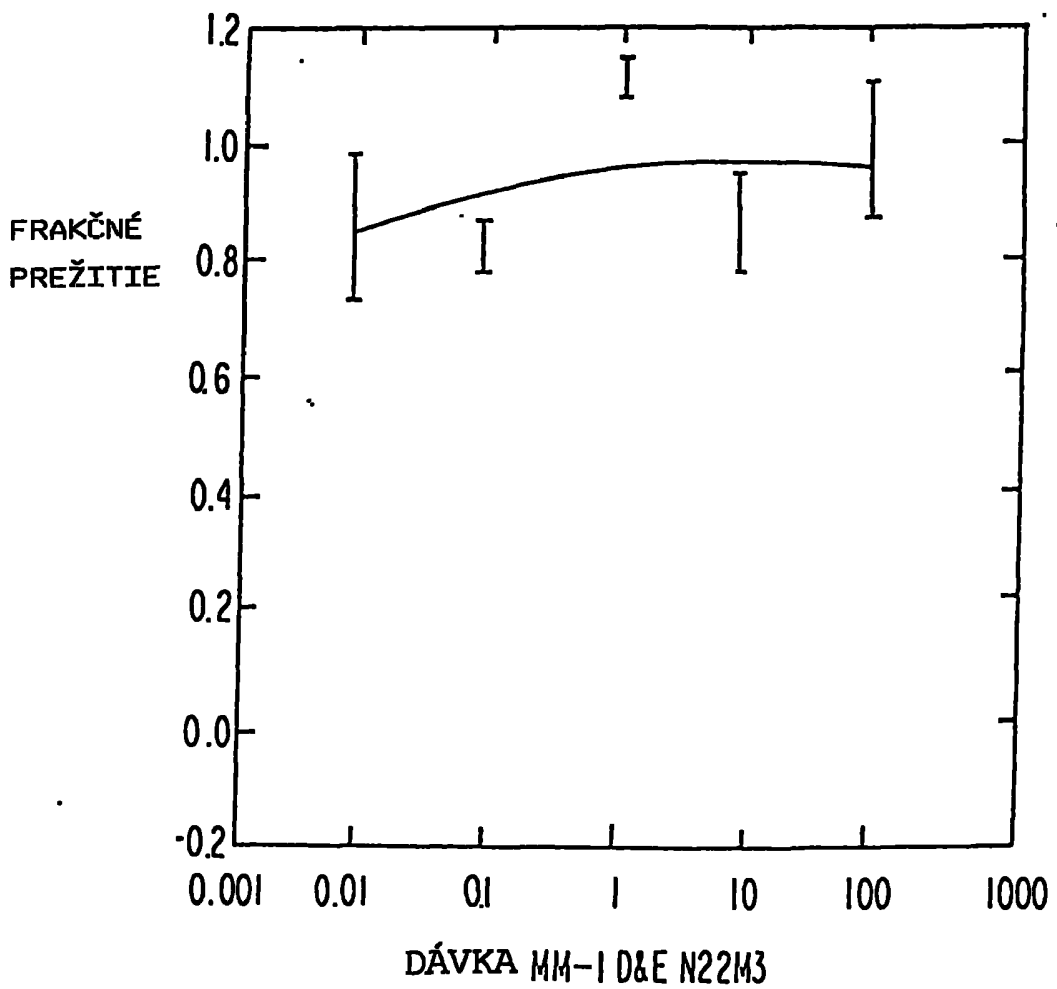
69/91

Obr. 13G



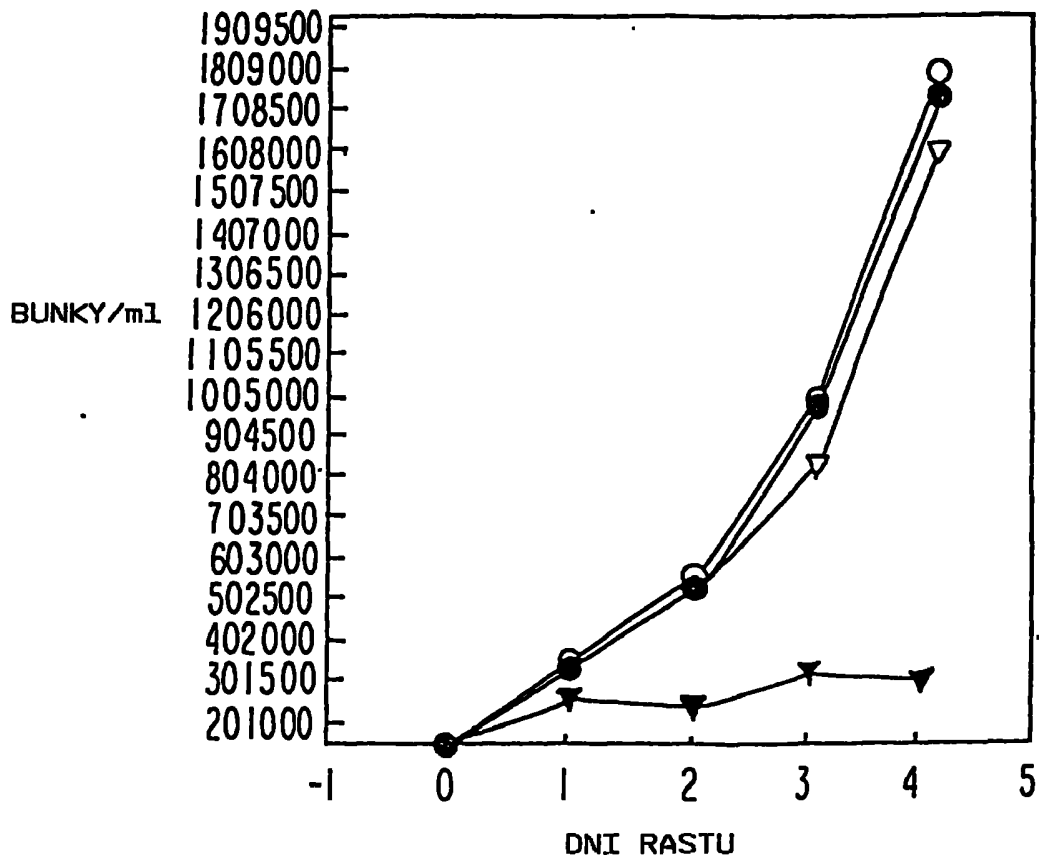
70/91

Obr. 13H



71/91

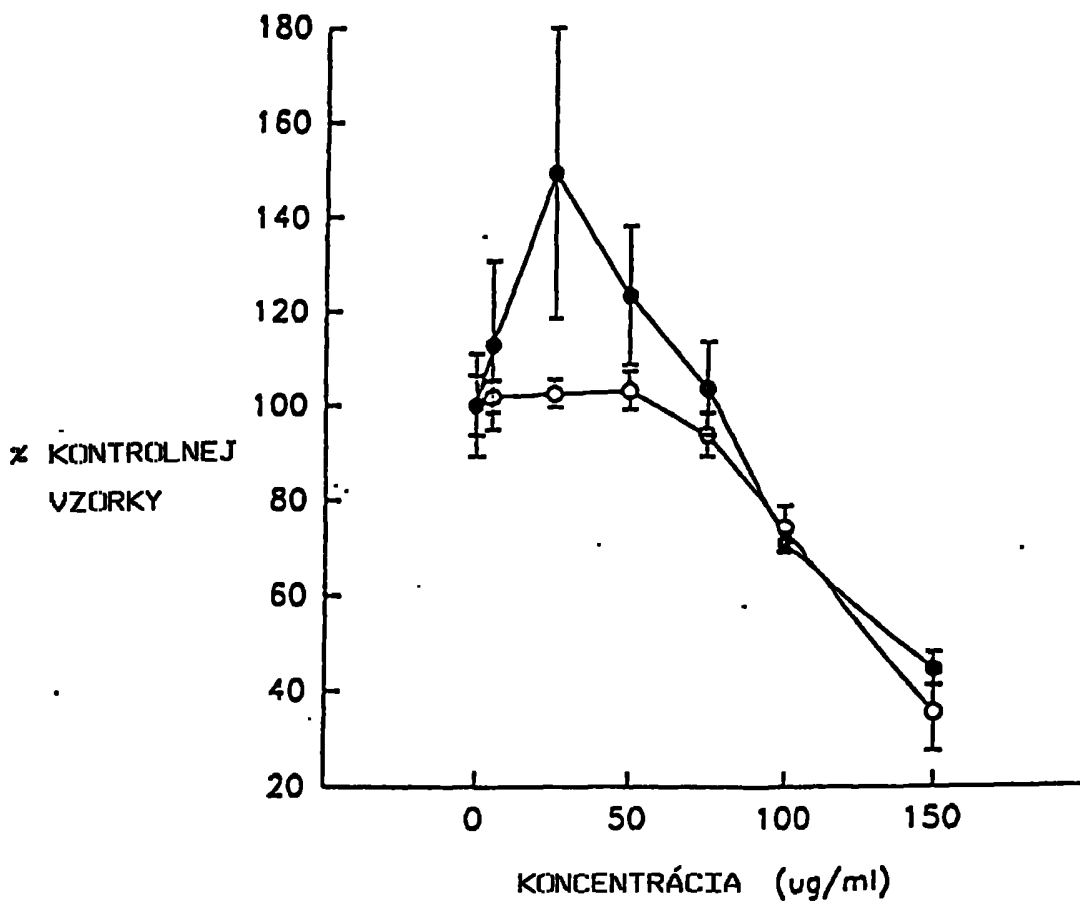
Obr. 14



- KONTROLNÁ
- 125 µg FRAKCIA D
- ▽ 250 µg FRAKCIA D
- ▼ 500 µg FRAKCIA D

72/91

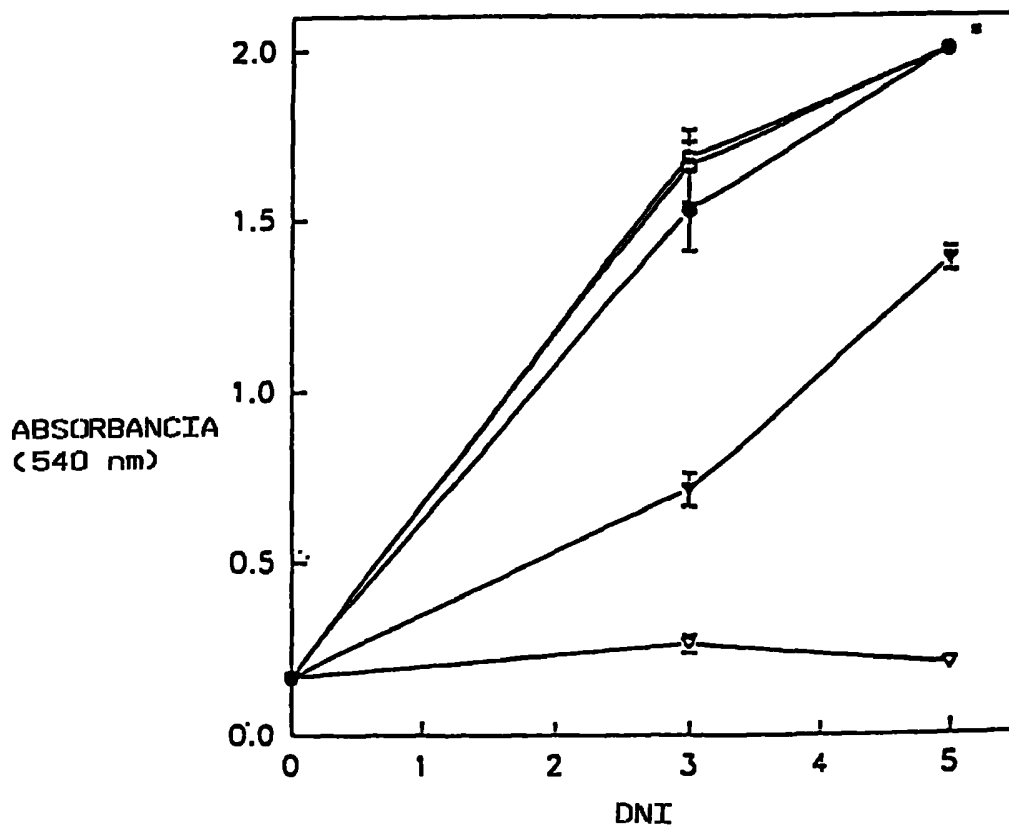
Obr. 15A



- ZAFARBENIE
- KRYŠTALICKÉ FIALOVÉ ZAFARBENIE

73/91

Obr. 15B



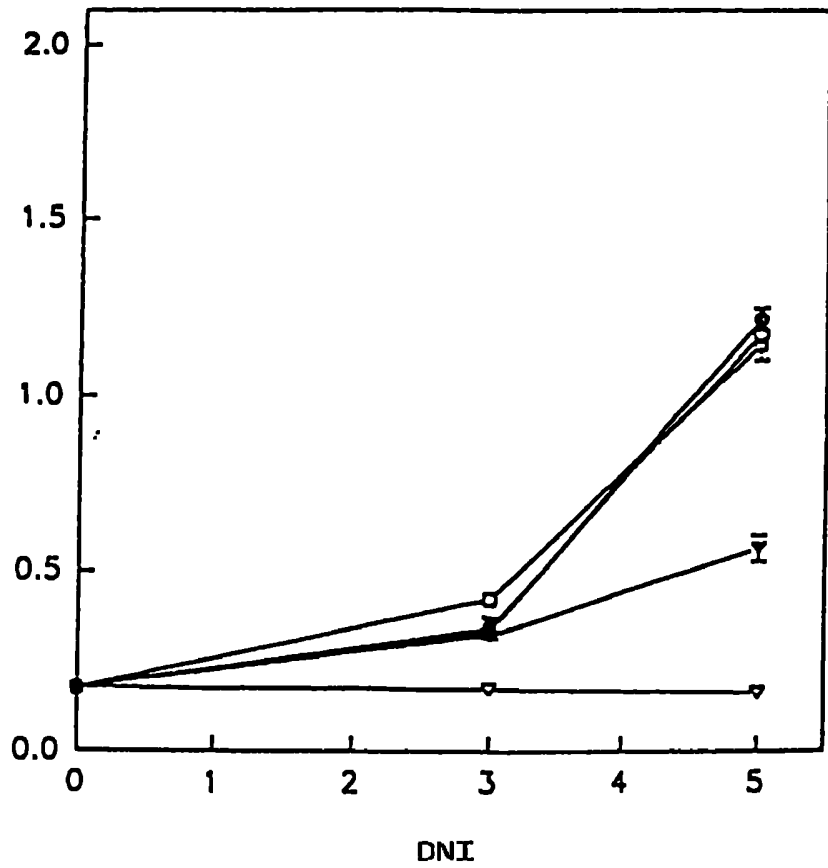
○ KONTROLNÁ
● VEHIKULUM
▽ 250 ug/ml
▼ 100 ug/ml
□ 10 ug/ml

** POZNÁMKA: ABSORBANCIA 2.0 PREDSTAVUJE MAXIMÁLNU ABSORBANCIU PLATOVÉHO ČÍTAČA A NIE POČET BUNIEK

74/91

Obr. 15C

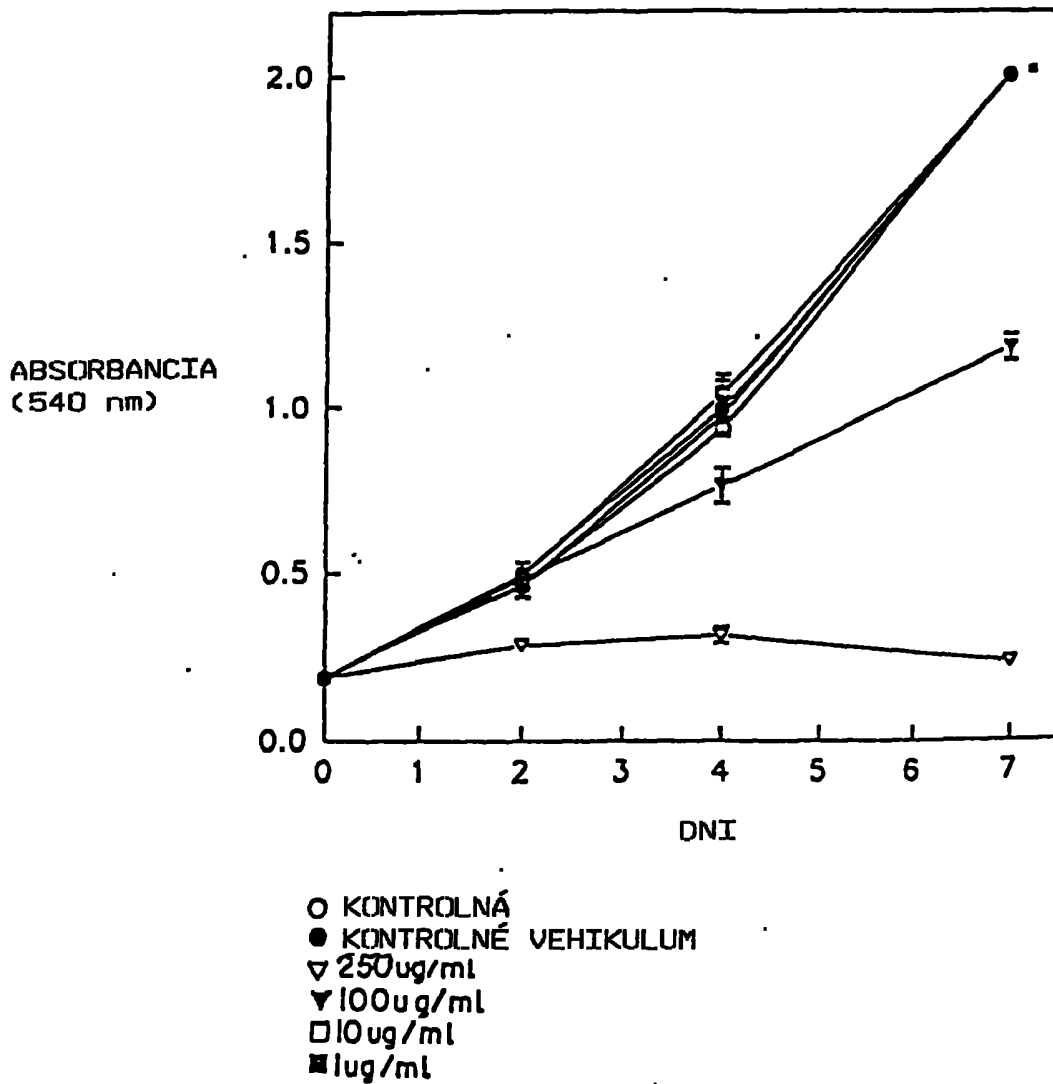
ABSORBANCIA
(540 nm)



- KONTROLNÁ
- VEHIKULUM
- ▽ 250ug/ml
- ▼ 100 ug/ml
- 10ug/ml

75/91

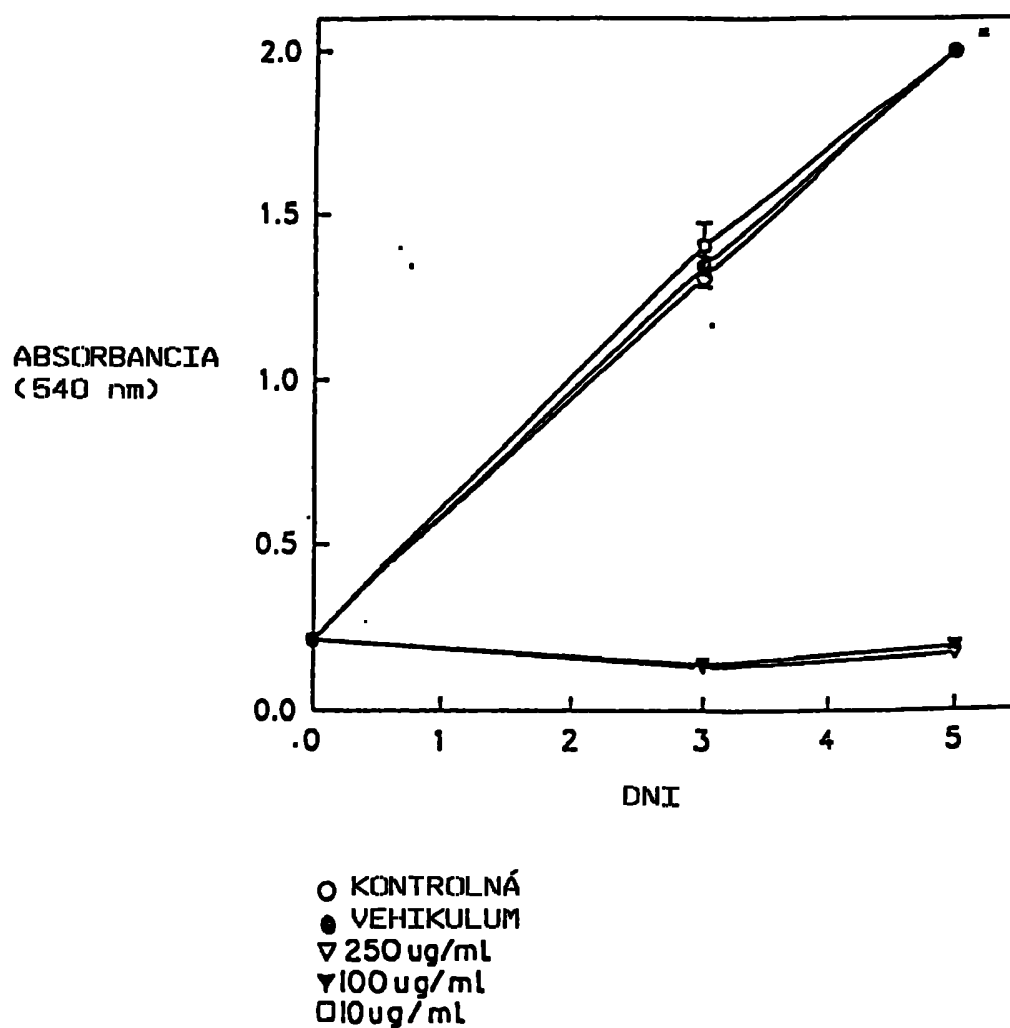
Obr. 15D



* POZNÁMKA: ABSORBANCIA 2,0 PREDSTAVUJE MAXIMÁLNU ABSORBANCIU PLATOVÉHO ČÍTAČA A NIE POČET BUNIEK

76/91

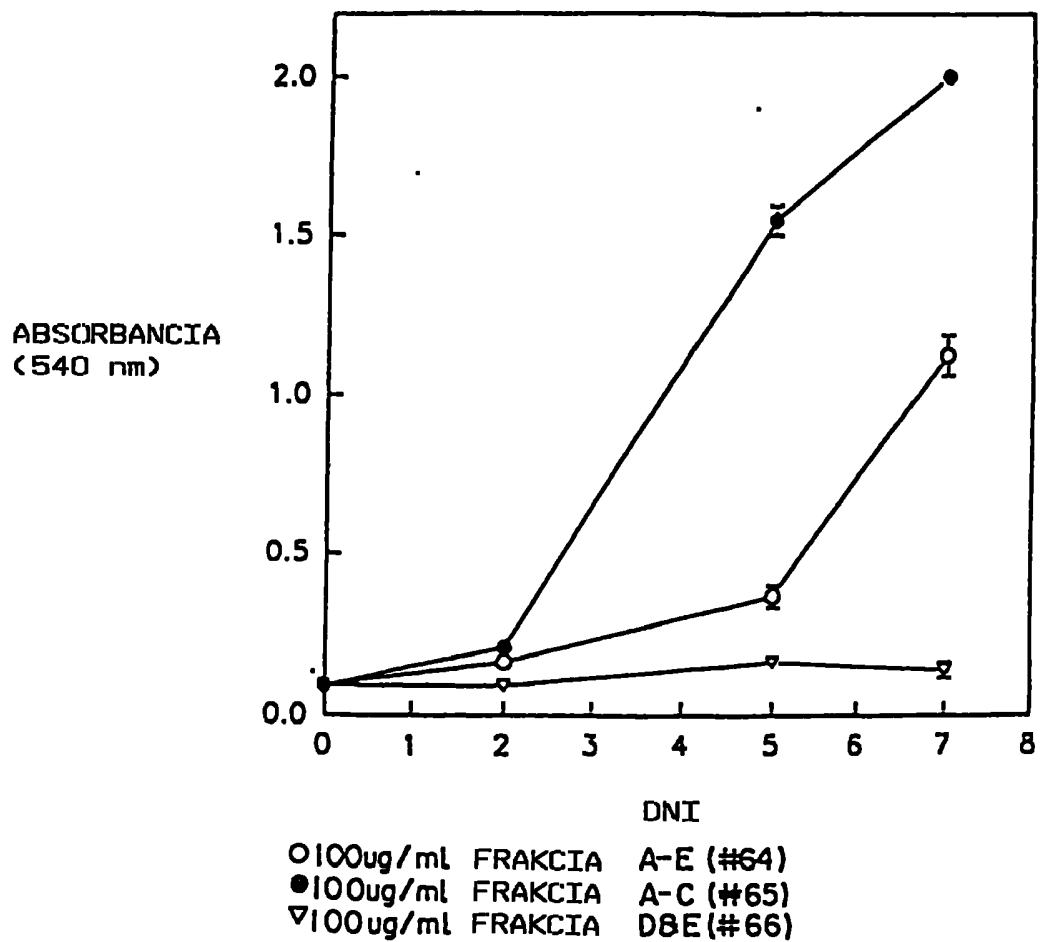
Obr. 15E



** POZNÁMKA: ABSORBANCIA 2.0 PREDSTAVUJE MAXIMÁLNU ABSORBANCIU PLATOVÉHO ČÍTAČA A NIE POČET BUNIEK

77/91

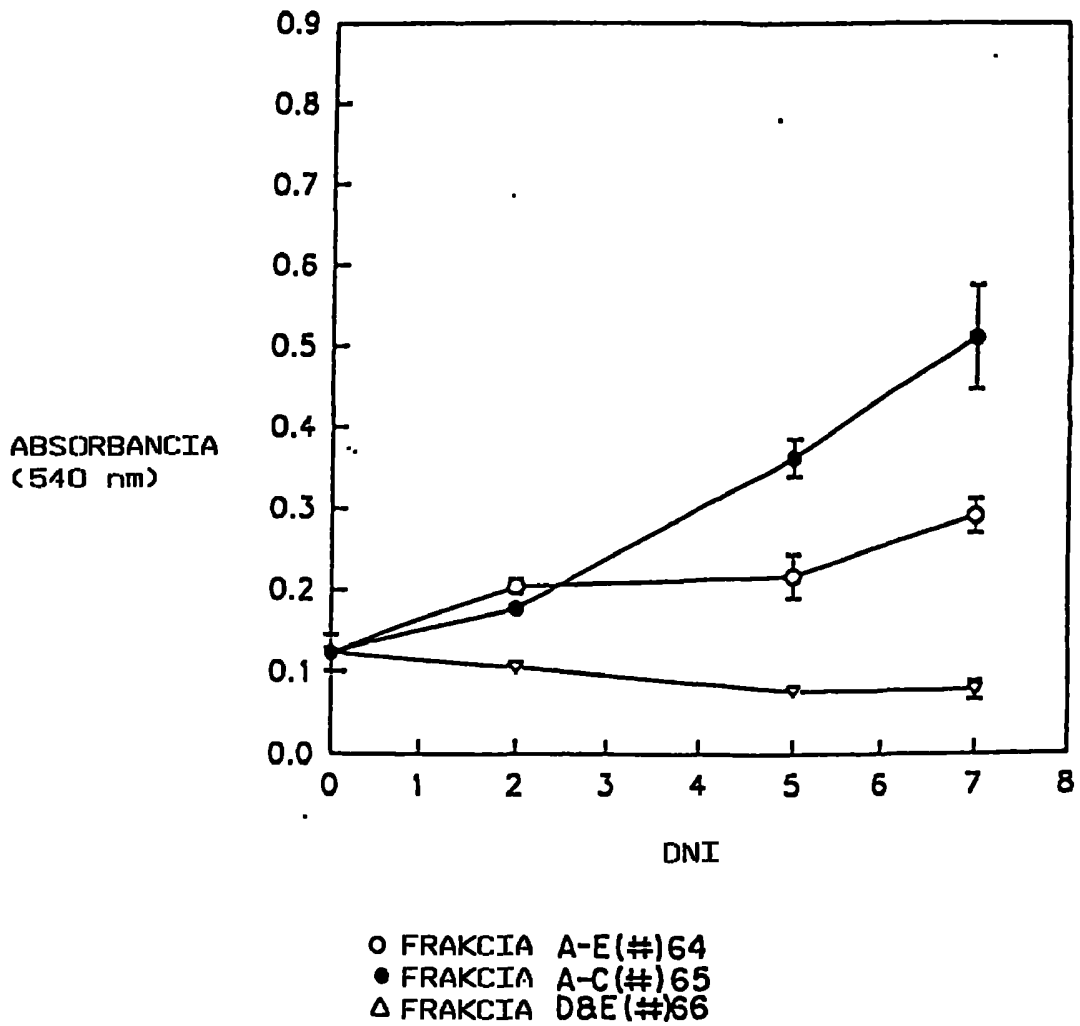
Obr. 15F



* POZNÁMKA: ABSORBANCIA 2,0 PREDSTAVUJE MAXIMÁLNU ABSORBANCIU PLATOVÉHO ČÍTAČA A NIE POČET BUNIEK

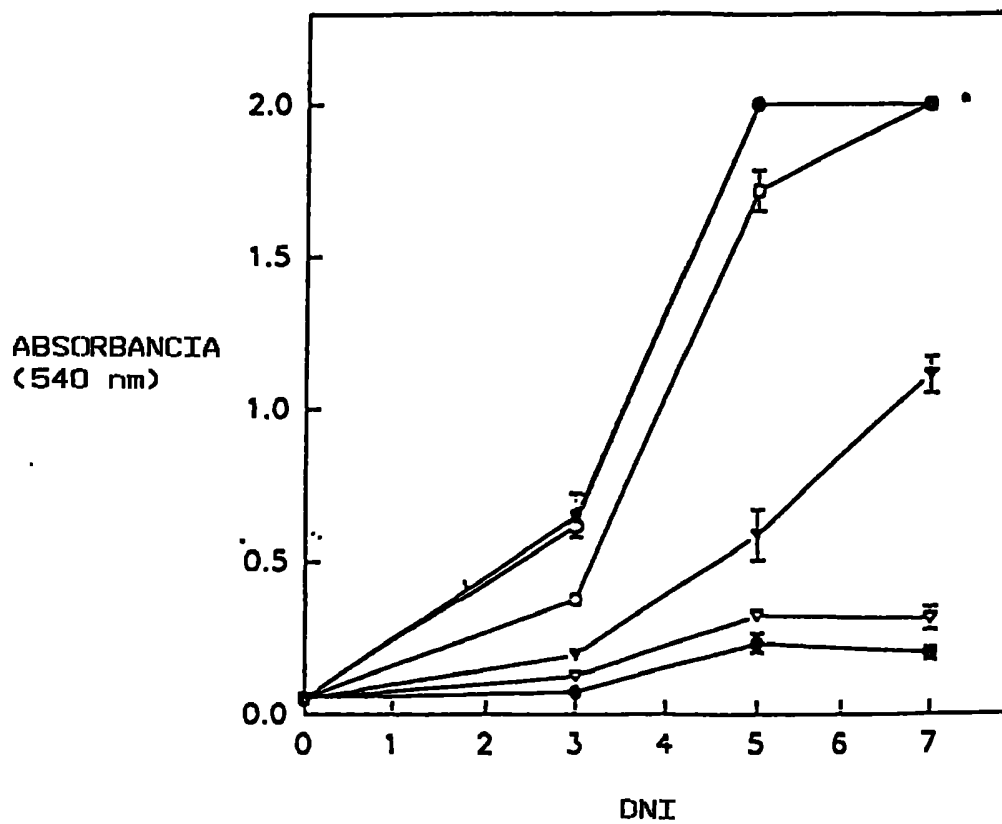
78/91

Obr. 15G



79/91

Obr. 15H

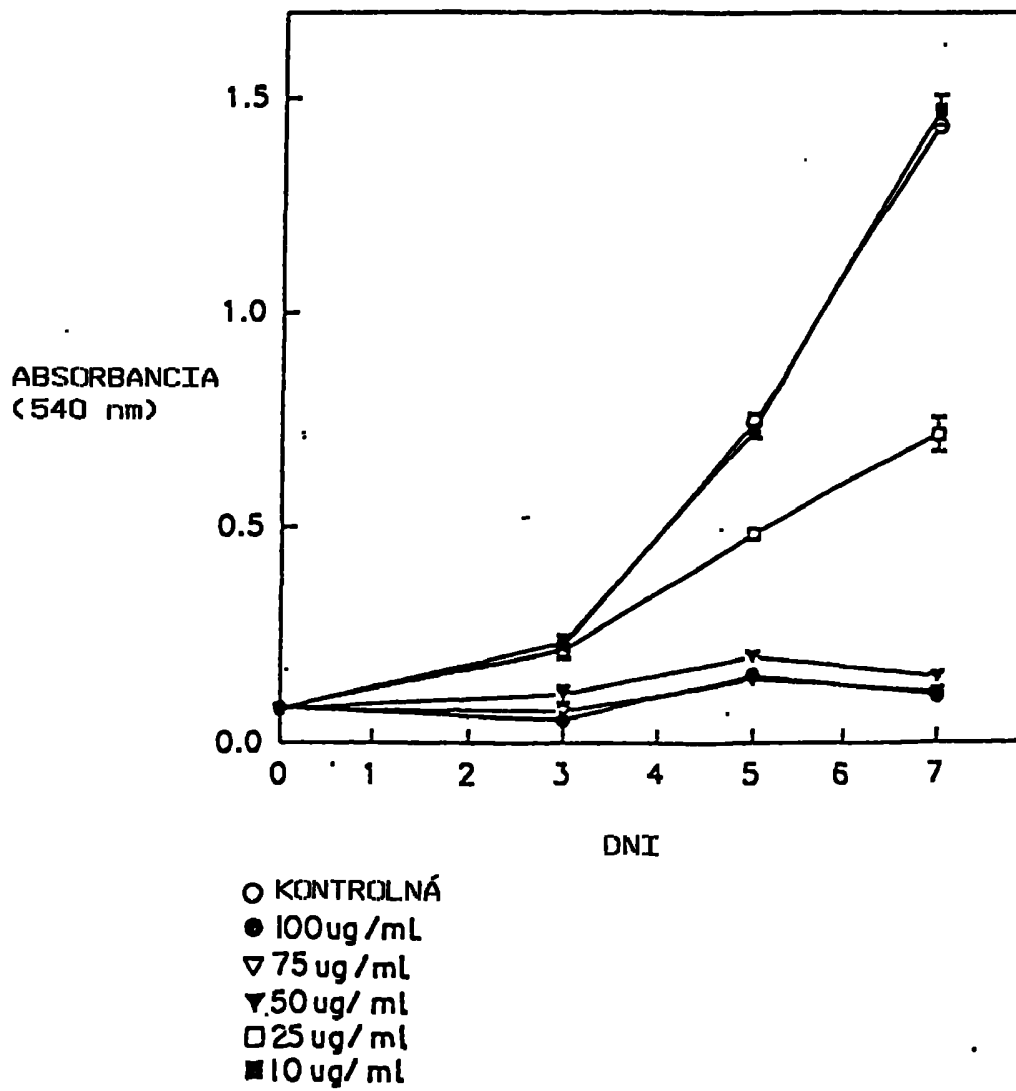


○ KONTROLNÁ
 ● 100 ug/ml
 ▽ 75 ug/ml
 ▼ 50 ug/ml
 □ 25 ug/ml
 ■ 10 ug/ml

** POZNÁMKA: ABSORBANCIA 2,0 PREDSTAVUJE MAXIMÁLNU ABSORBANCIU PLATOVÉHO ČÍTAČA A NIE POČET BUNIEK

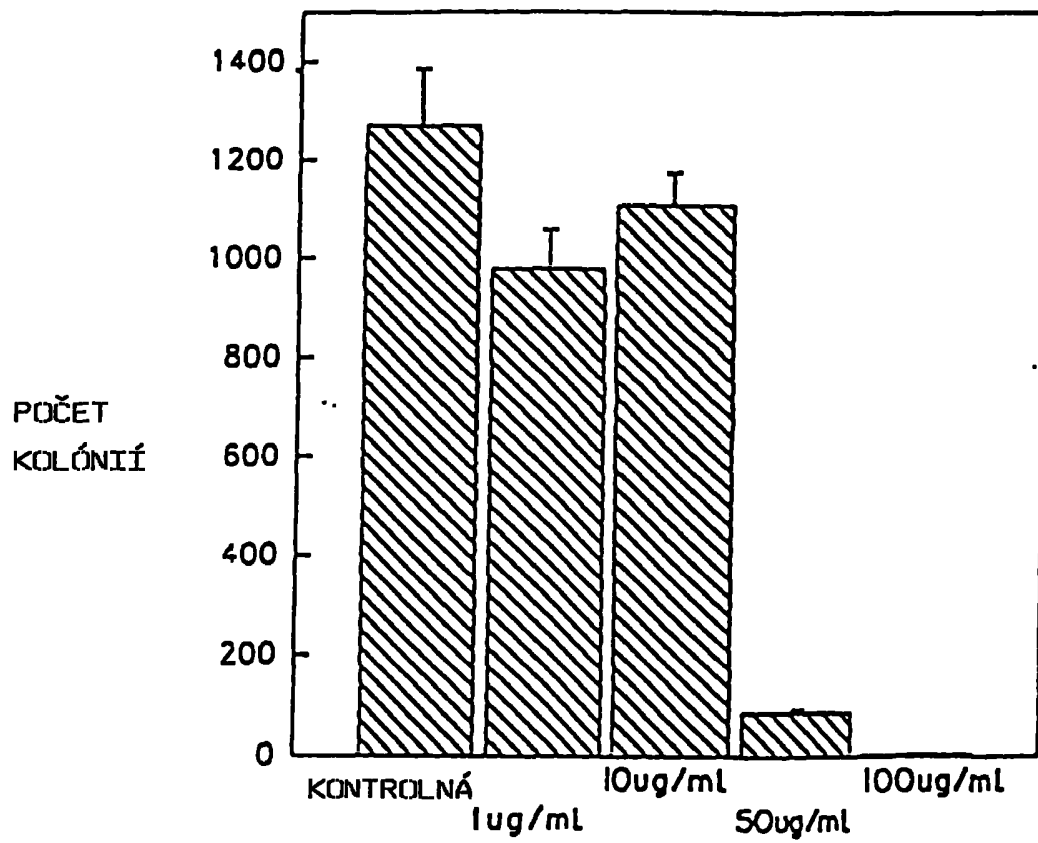
80/91

Obr. 15I

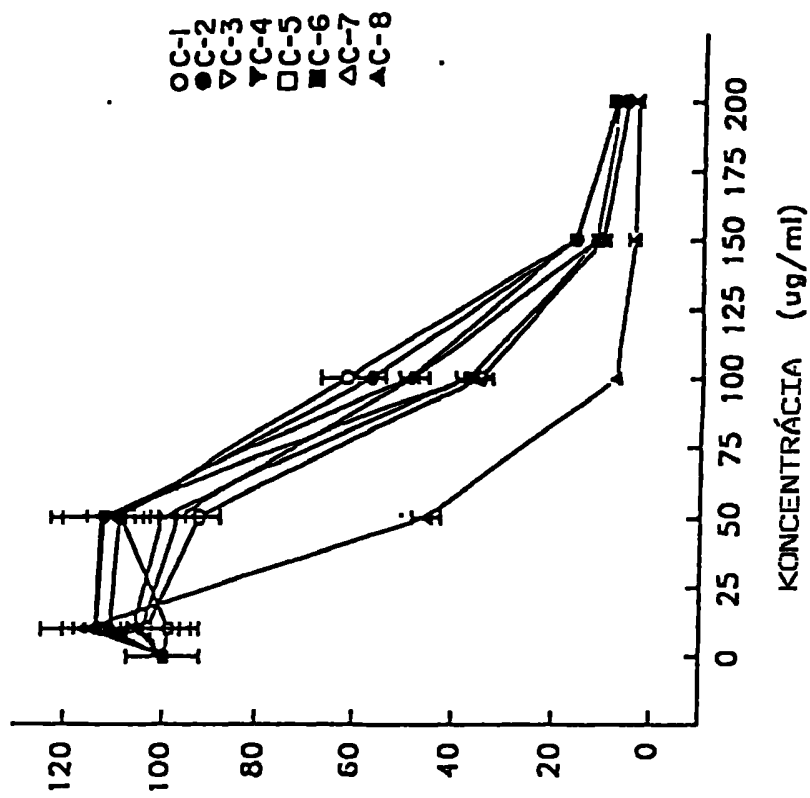


81/91

Obr. 15J



82/91



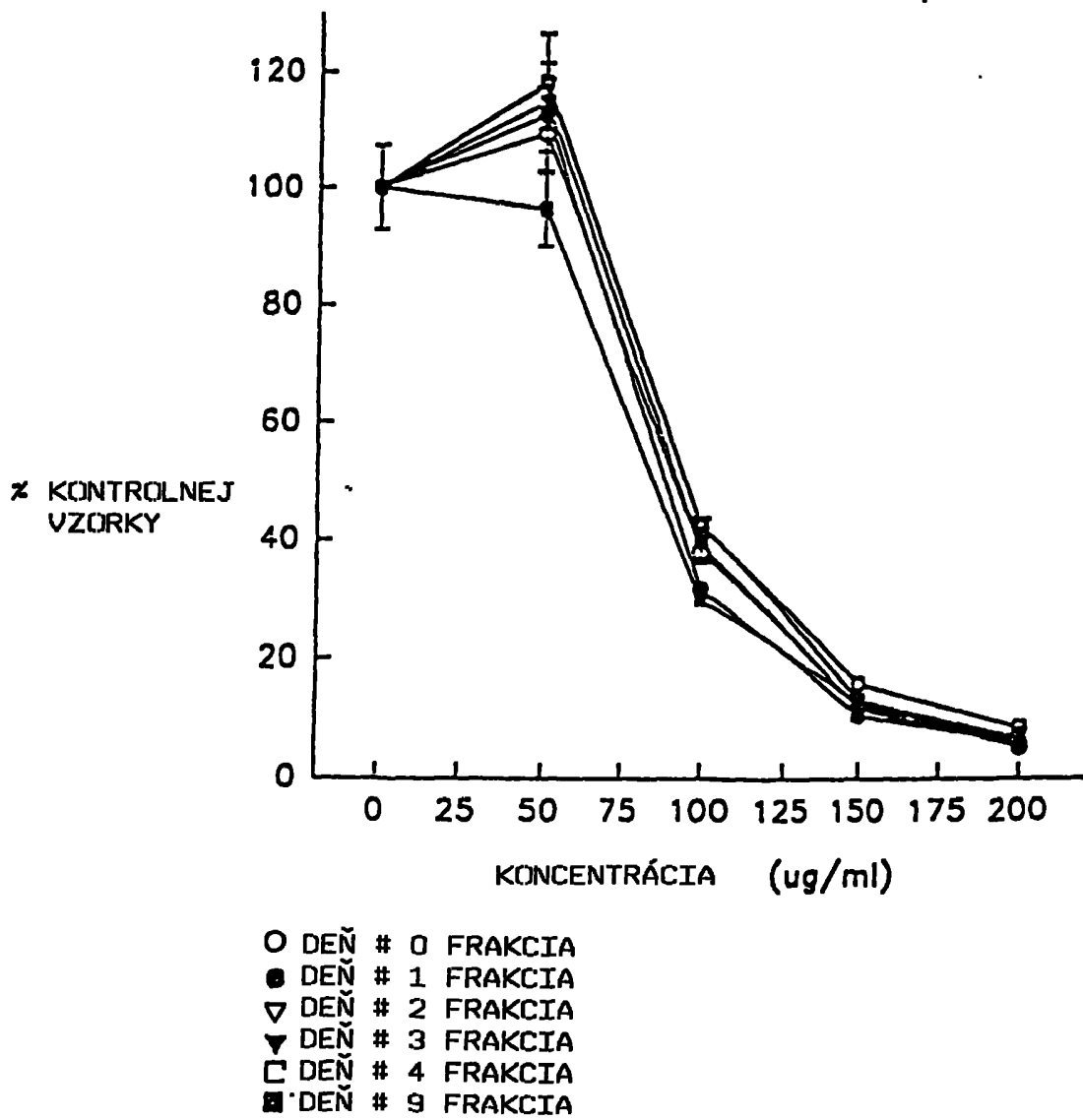
Obr. 15K

% KONTROLNEJ
VZORKY

# GENOTYP	POĽNOHOSPODÁRSKA ODRODA	POPIS
C-1 UF-12	CRIOILLO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z UF-21 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-2 NA-33	FORASTERO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z NA-33 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-3 EEG-48	FORASTERO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z EEG-48 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-4 NEZNÁMY	FORASTERO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z NEZNÁMEHO GENOTYPU (ZÁPADNÁ AFRIKA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-5 UF-613	TRINITARIO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z UF-613 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-6 ICS-100	TRINITARIO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z ICS-100 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-7 ICS-139	TRINITARIO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z ICS-139 (BRAZÍLIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)
C-UIT-1	TRINITARIO	SUROVÉ VÝŤAŽKY Z UIT-1 (MALAJZIA) KAKAOVÉ POLYFENOLY (DEKOFEINOVANÉ/DETEOBROMINOVANÉ)

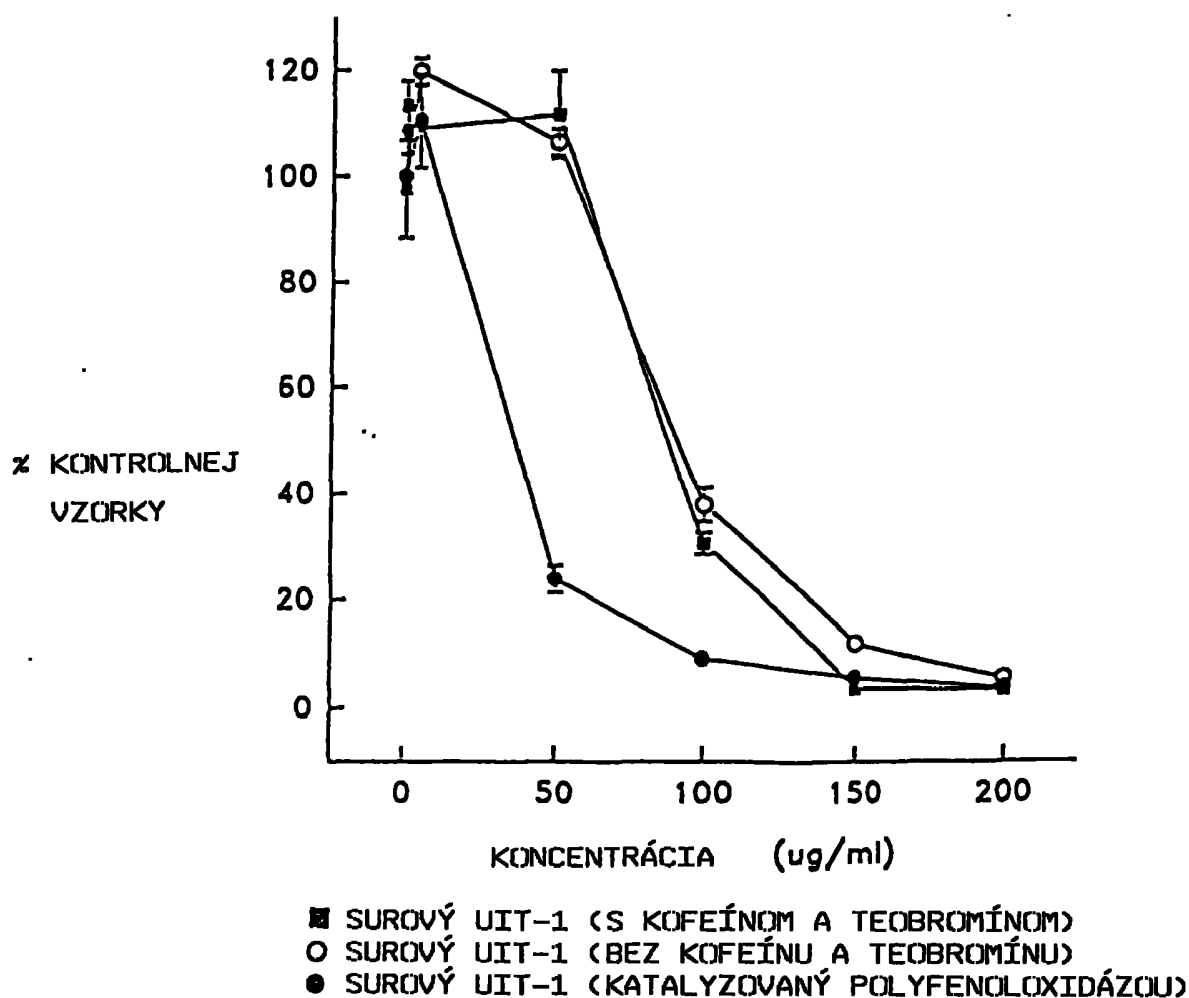
83/91

Obr. 15L



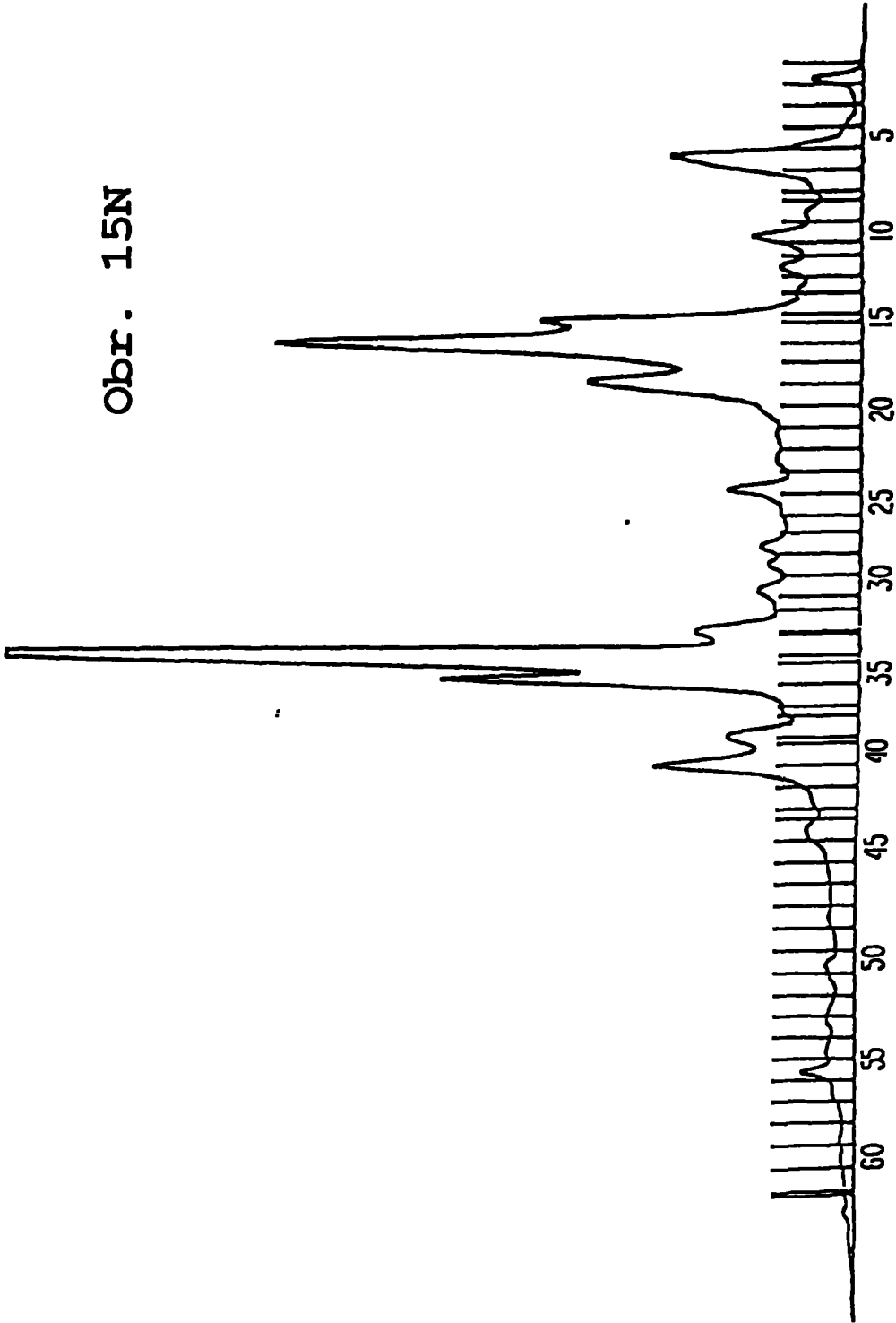
84/91

Obr. 15M



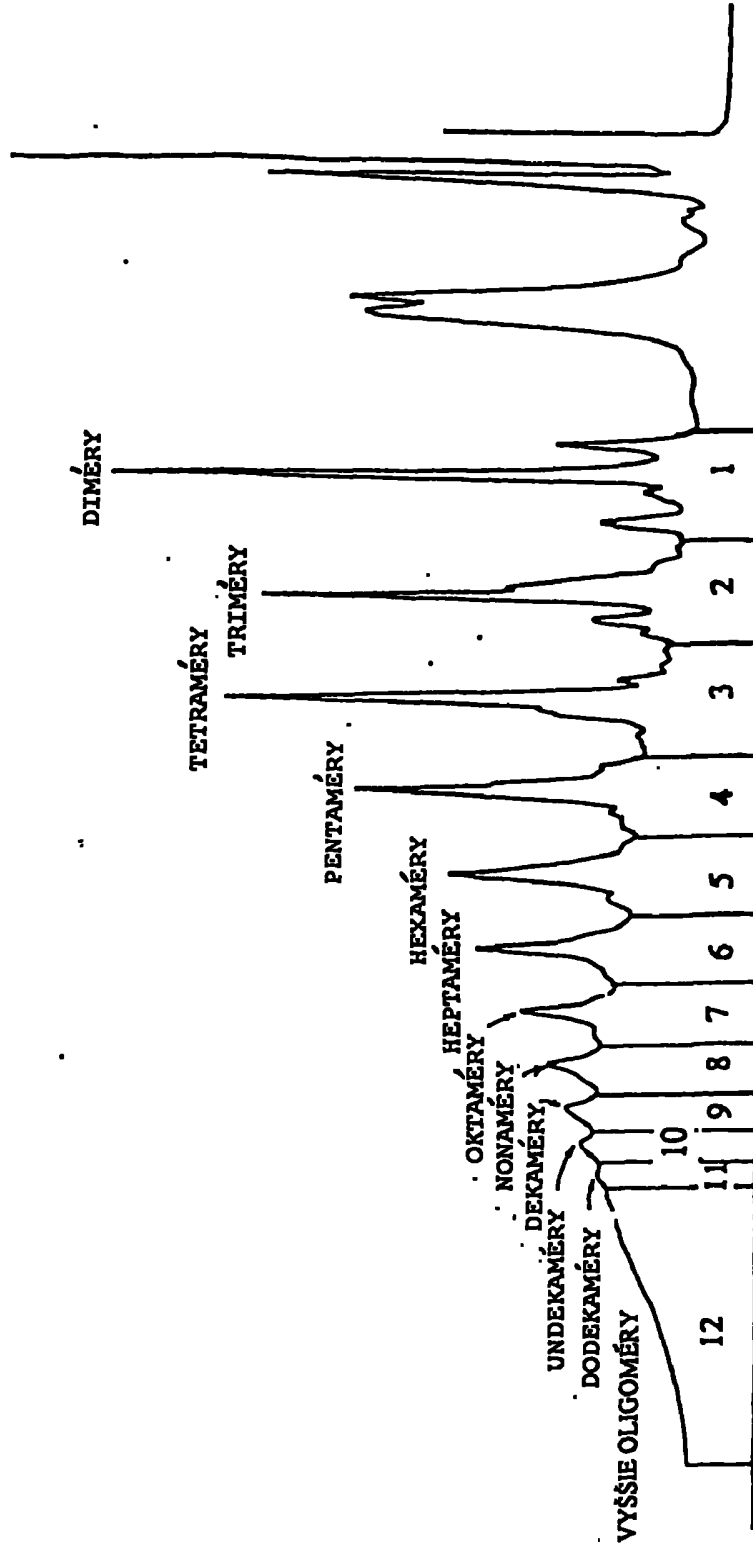
85/91

Obr. 15N



86/91

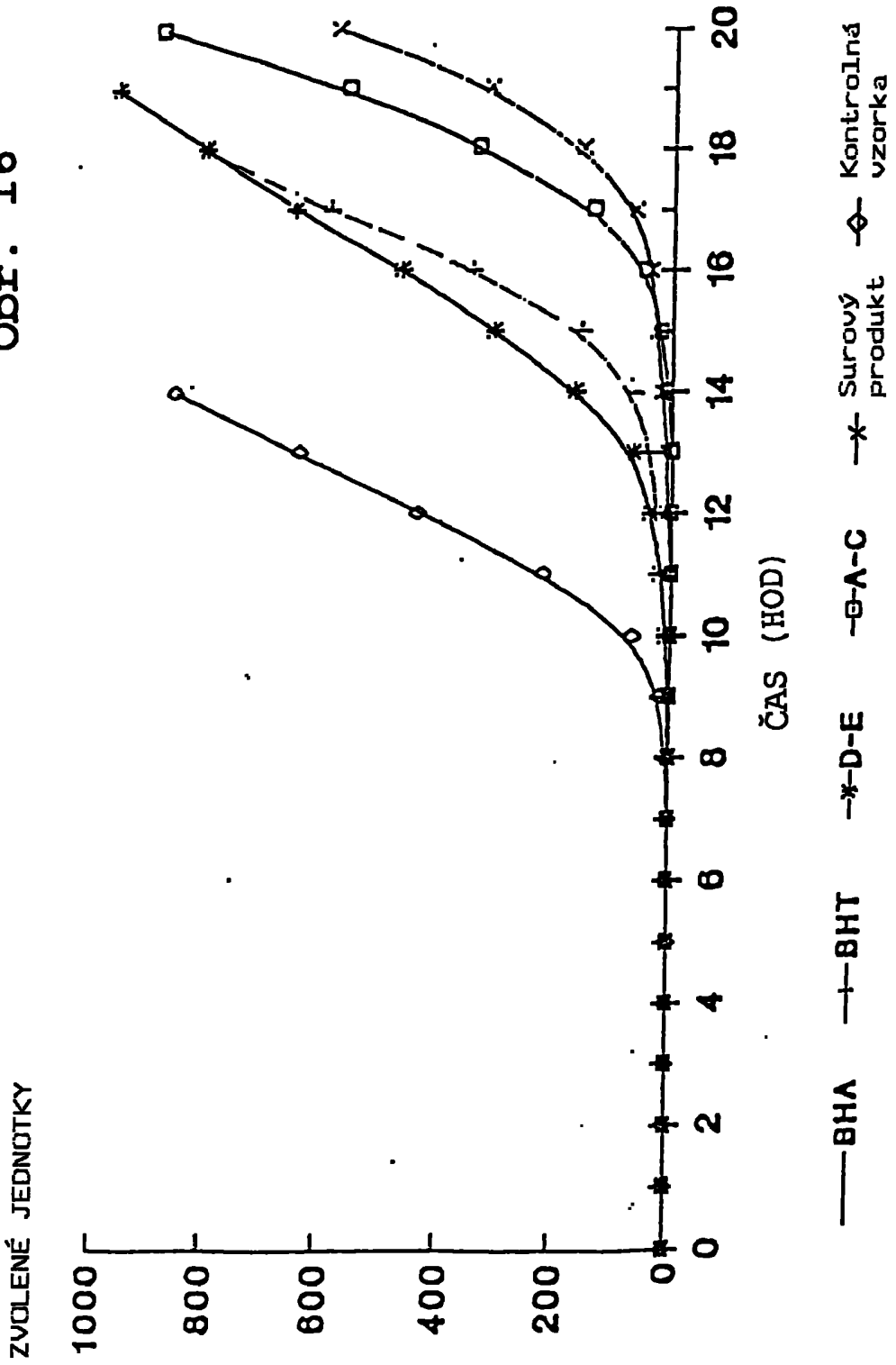
Obr. 150



ČÍSLO FRAKCIE

87/91

Obř. 16



FRAKCIA A FRAKCIA B FRAKCIA D FRAKCIA E FRAKCIA D FRAKCIA E FRAKCIA D FRAKCIA E FRAKCIA E **Obf. 17**

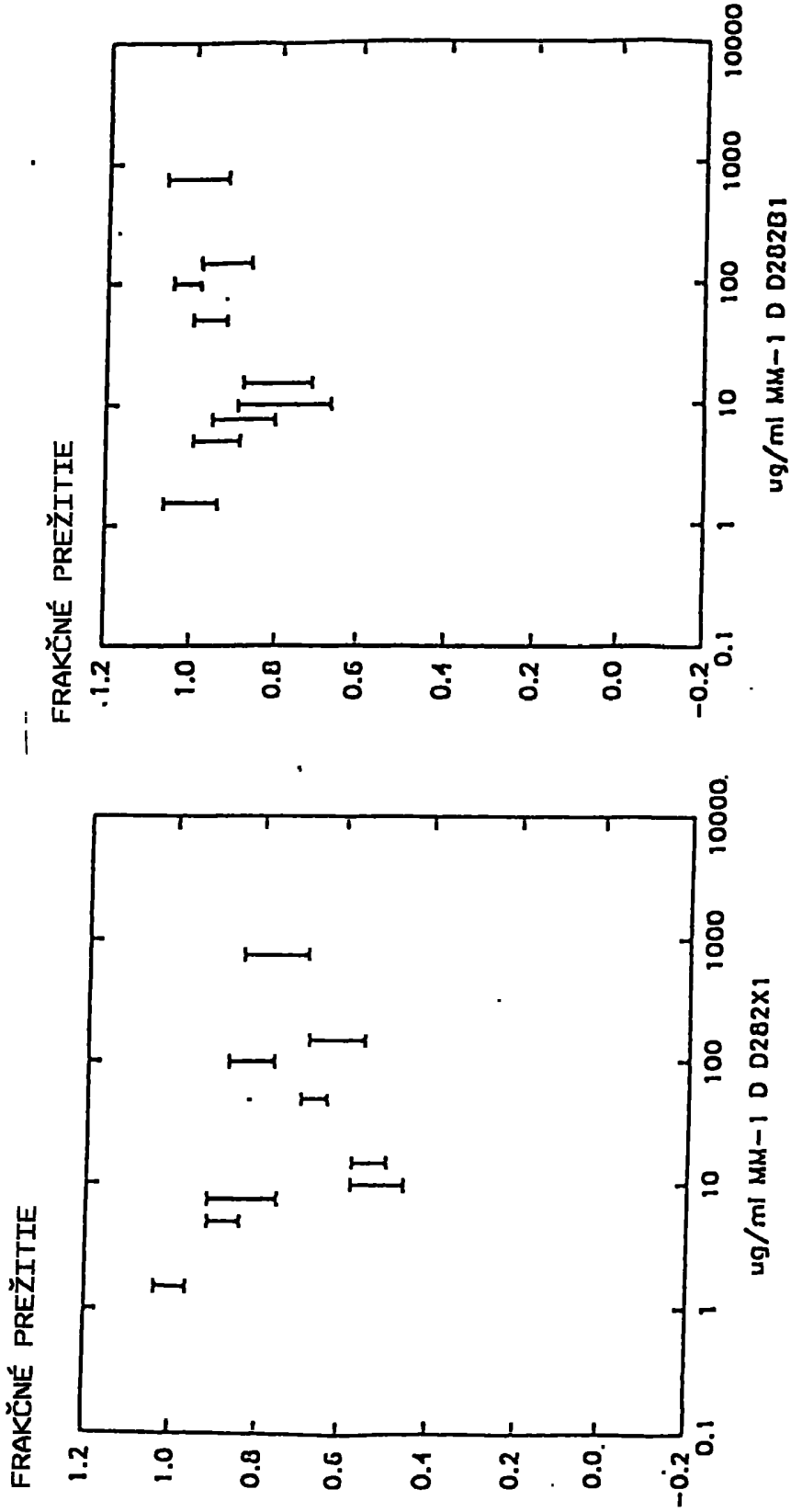
M C 0.5 5.0 0.5 5.0 0.05 0.5 0.05 0.5 5.0 0.05 0.5 5.0 0.05 0.5 5.0 0.05 0.5 5.0 ug/mL C



PRIECHODY 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Priechod 1 obsahuje 0,5 µg značkovacích (Nš) kinetoplastových DNA cyklov s monomérou dĺžkou; priechody 2 a 20 obsahujú kinetoplastickú DNA, ktorá bola inkubovaná topoizomérázou II v prítomnosti 4 % DMSO, ale v neprítomnosti prokyanidínov. (Kontrolná -C); priechody 3 a 4 obsahujú kinetoplastickú DNA, ktorá sa inkubovala topoizomérázou II v prítomnosti 0,5 a 5,0 µg/ml kakaovej prokyanidínovej frakcie A; priechody 5 a 6 obsahujú kinetoplastovú DNA, ktorá sa inkubovala topoizomérázou II v prítomnosti 0,5 a 5,0 µg/ml kakaovej prokyanidínovej frakcie B; priechody 7, 8, 9, 13, 14 a 15 sú replikami kinetoplastovej DNA, ktorá sa inkubovala topoizomérázou II v prítomnosti 0,05, 0,5 a 5,0 µg/ml kakaovej prokyanidínovej frakcie D; priechody 10, 11, 12, 16, 17 a 18 sú replikami kinetoplastovej DNA, ktorá sa inkubovala topoizomérázou II v prítomnosti 0,05, 0,5 a 5,0 µg/ml kakaovej prokyanidínovej frakcie E; priechod 19 je replikou kinetoplastovej DNA, ktorá sa inkubovala topoizomérázou II v prítomnosti 5,0 µg/ml kakaovej prokyanidínovej frakcie E;

89/91

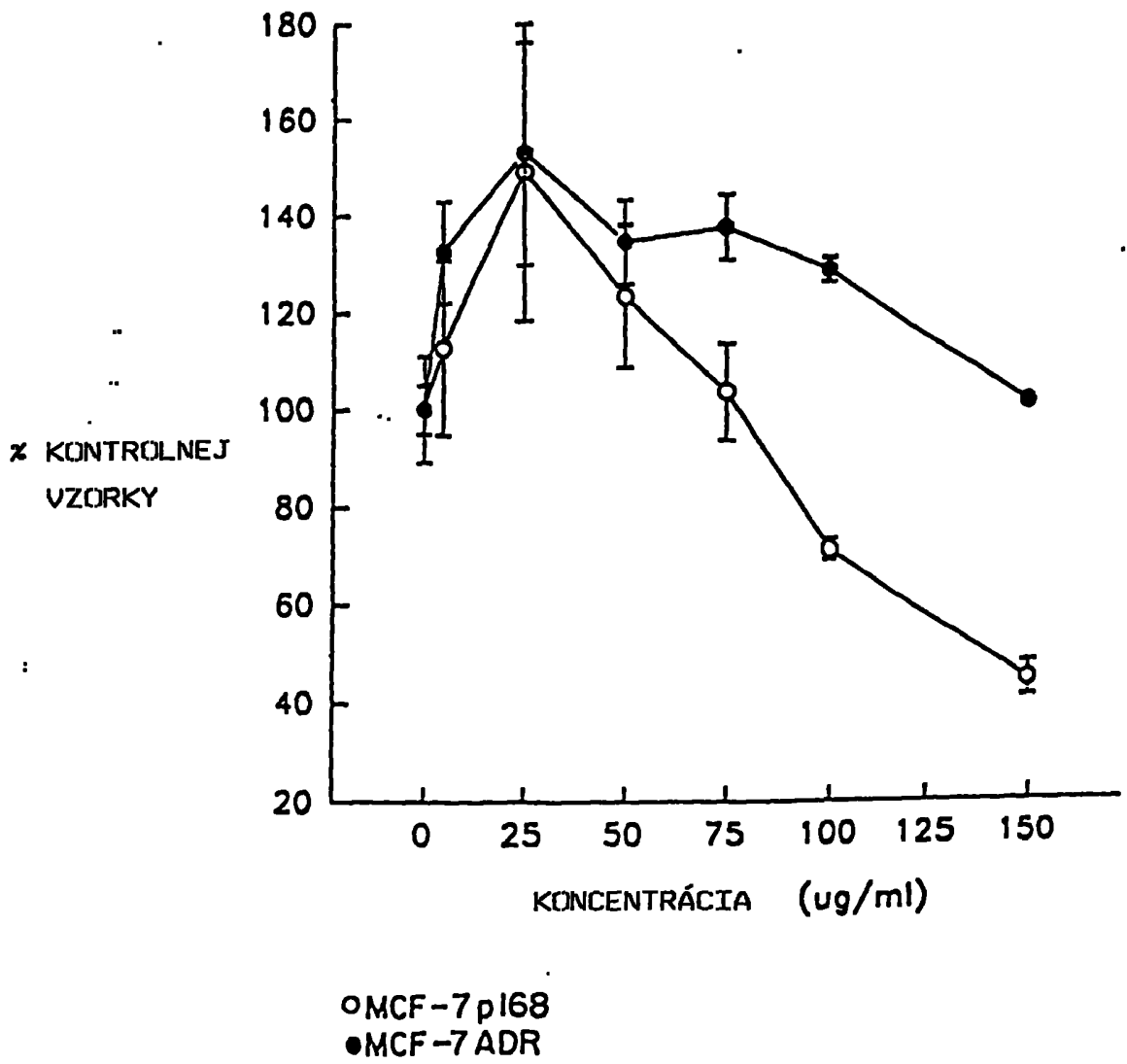


Obr. 18A

Obr. 18B

90/91

Obr. 19



91/91

Obr. 20

