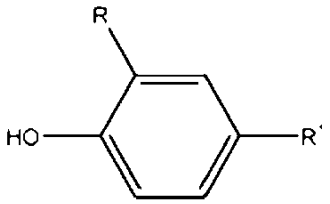
ÖZET

KAS HASARINA YÖNELİK ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KULLANIMI

Mevcut buluş, kas sağlığını sürdürmek veya geri kazanmak üzere formüle (1) göre bir bileşik içeren bir bileşimin kullanımını açıklar: formül (1) burada: R, H, OH veya CH_3O olabilir; R^1, H, $(CH_2)_n,OR^2$ olabilir burada: n, 1, 2 veya 3'tür, R^2, H, $COCH_3$ veya formüldür (2), burada m, R ve R^1'in aynı anda H olmaması koşulu ile 1, 2 veya 3'tür. Buluş ilaveten kas sağlığını sürdürmek veya geri kazanmak, bu şekilde örneğin egzersizden kaynaklı kas hasarını önlemek ve/veya tedavi etmek üzere bir bileşime yönelik imalatta formüle (1) göre bir bileşiğin kullanımı ile ilgilidir. Daha spesifik olarak, bu tür bileşim gıda, içecekler, takviyeler ve yem içerir.

İSTEMLER

1. Bileşim olup, formülün (1) yenebilen bileşiğini içerir



(1)

burada:

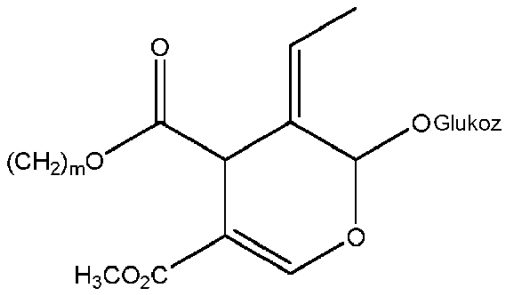
R ve R^1'in aynı anda H olmaması koşulu ile

R, H, OH veya CH_3O olabilir;

R^1, H, $(CH_2)_nOR^2$ olabilir

burada: n, 1, 2 veya 3'tür

R^2, H, $COCH_3$ veya aşağıdakidir



burada m, 1, 2 veya 3'tür;

bileşimin bir çiğneme sakızı olmaması ve bileşimin salidrozid içermemesi koşulu ile; egzersizden kaynaklı kas hasarının tedavisinde kullanıma yöneliktir; özelliği formülün (1) bileşiğinin hidroksitirosol veya bunun asetatı olması ile karakterize edilmesidir.

2. İstem 1'e göre bileşim olup, özelliği bunun ayrıca C vitamini içermesi ile karakterize edilmesidir.

3. İstem 1 veya 2'ye göre bileşim olup, özelliği bileşimin atletler tarafından alıma yönelik bir spor besinsel ürünü olması ile karakterize edilmesidir.

4. İstem 3'e göre bileşim olup, özelliği spor besinsel ürününün, bir diyet takviyesi, spor içeceği veya spor gıdası olması ile karakterize edilmesidir.

5. Önceki istemler 1-4'ten herhangi birine göre bileşim olup, özelliği formülün (1) bileşiminin, porsiyon başına 1 mg ile 3 g arasında, tercih edildiği üzere 10 mg ila 1 g olan bir miktarda mevcut olması ile karakterize edilmesidir.

TARİFNAME
KAS HASARINA YÖNELİK ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KULLANIMI

Buluşun sahası

Mevcut buluş kas sağlığını sürdürmek veya geri kazanmak üzere antioksidan bileşiklerin kullanımı ile ilgilidir. Bu bileşikler kas sağlığını sürdürmek veya geri kazanmak üzere bir bileşime yönelik imalatta kullanılabilir, bu şekilde egzersizden kaynaklı kas hasarı önlenir ve/veya tedavi edilir. Daha spesifik olarak, bu tür bileşim gıda, içecekler, takviyeler ve yem içerir.

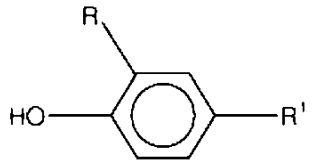
Atletler düzenli olarak yoğun ve/veya uzatılmış kas egzersizleri yapar. Çalışmalar, yorucu egzersiz sırasında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun doku antioksidan savunma sistemini yoran bir düzeye yükseldiğini önerir. Sonuç, dokulara, örneğin doku kasına hasara yol açabilen oksidatif strestir. Genel olarak iyi bir kas koşulu, performanslarına, özellikle iskelet kaslarına yönelik zorunlu öneme sahiptir. Egzersiz dolayısıyla, örneğin yorgunluk, düşük dayanıklılık, işlev kaybına yol açarak kas sağlığını bozar. Antioksidan takviyelerin kullanımı, bu tür hasarları önlemek üzere sunulmuştur (Dietary anti-oxidants and exercise, Journal of Sports Sciences, 2004, 22, 81-94, Powers et al.).

US-B1-6 399 116 kas yorgunluğunu tedavi etmeye yönelik ilave antioksidan (C vitamini) ile salidrozid ve tirosol içeren bileşimleri (içecek, gıda veya besinsel takviye) açıklar. SU 1 787 420, kan:beyin bariyerini geçebilen ve beyin dokusunu oksidatif fenomenlere, özellikle nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyabilen oleropin ve hidroksitirosol içeren besinsel takviyeleri açıklar. Bununla birlikte tüm antioksidanlar kas hasarını iyileştirmeye yönelik uygun değildir. Çalışmalar bazı antioksidanların zorlukla herhangi bir etki verdiğini göstermiştir. Bu durum birkaç nedeni olabilir. İlk olarak, antioksidanların biyoyararlanımı düşük olabilir. Antioksidanların bağırsaklar tarafından alımı akabinde nispeten düşüktür, yüksek bir antioksidan miktarının etkili hale dönüşmesine yönelik ihtiyaç ile sonuçlanır. İkinci olarak, tüm antioksidanlar kas hücrelerinin membranını geçemez. İlaveten, bazı antioksidanlar kullanım üzerine tüketilir, aynı zamanda bir etkiyi görmek üzere nispeten yüksek bir antioksidan alım miktarını gerektirir. Bu durum, sadece bir sağlık perspektifinden (vücutta birçok metabolit) değil ancak aynı zamanda maliyet perspektifinden istenmez.

Bazı antioksidanlar, bir sözde antioksidan ağında rejenere edildiği, örneğin E vitamininin C vitamini tarafından rejenerasyonu bilinir. E vitamini ile ilgili in vivo çalışmalar, antioksidan markörler üzerinde herhangi bir önemli etki göstermemiştir.

Buluşun amacı, iyi bir biyoyararlanıma sahip antioksidan ağında yer alabilen, kas iyileşmesine yönelik uygun bir bileşenin sağlanmasıdır.

Buluş istemler ile açıklanır. Şaşırtıcı şekilde, formüle (1) göre yenilebilen bir bileşiğin, egzersizden kaynaklı kas hasarına yönelik tedavide kullanılabildiği bulunmuştur.



(1)

burada:

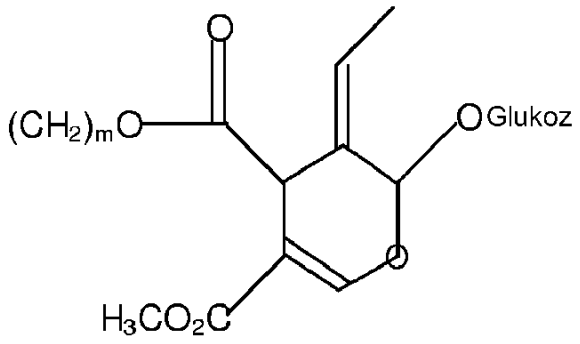
R ve R1'in aynı anda H olmaması koşulu ile

R, H, OH veya CH_3O olabilir;

R^1, H veya $(CH_2)_nOR^2$ olabilir

burada: n 1, 2 veya 3'tür

R^2, H, $COCH_3$ veya aşağıdakidir



burada m, 1, 2 veya 3'tür.

Formüle (1) göre uygun bileşiklerin örnekleri, hidroksitirosol ve bunun asetatı, oleropin, tirosol ve bunun asetatı, homovanilik alkol ve/veya katekoldür. Ayrıca bu bileşiklerin karışımları kullanılabilir.

Bu bileşiğin C vitamininin kullanımı ile rejenere edilebildiği şaşırtıcı bir şekilde bulunmuştur. Bu, formüle (1) göre bileşiği, oksidatif stresten kaynaklı kas hasarını önlemek veya tedavi etmek üzere bir bileşime yönelik imalatta kullanıma uygun hale getirir.

Tercih edildiği üzere, R, OH'dir. Daha tercihen en az hidroksitirosol veya bunun asetatı bileşim içinde kullanılır. Hidroksitirosol, amfifil olmasına yönelik ilave avantaja sahiptir. Bu, aköz ve yağ bileşimleri içinde, örneğin intraselüler ve ekstraselüler sıvılar ve membranlar içinde çözünebilir.

Formüle (1) göre bileşik, egzersizden kaynaklı kas hasarını tedavi etmeye veya önlemeye yönelik bir bileşimin imalatına yönelik kullanılabilir. Bu bileşim salidrozid içermez.

Buluşun bir diğer açısı, buluşa göre kullanımdır, burada kas iyileşmesine yönelik uygun bileşen, insan tüketimine yönelik uygun bir besinsel ürün içinde kullanılır. Herhangi bir besinsel ürün, örneğin gıda, içecek veya diyet takviyesi uygun olabilir. Besinsel ürün, bir çiğneme sakızı değildir.

Tercih edildiği üzere, formüle (1) göre antioksidan bileşik atletler tarafından alıma yönelik spor besinsel ürünlerde mevcuttur. Atletlerin, genel popülasyona yönelik tavsiye edilen diyet talimatlarının ötesinde özel gıdalar ve gıda içerik maddelerinden faydalanabileceği bilinir. 'Spor besinsel ürünler' terimi burada, özellikle atletlere yönelik adapte edilen herhangi bir gıda veya içeceği belirtmek üzere kullanılır.

Buluşun amacına yönelik uygun spor besin maddesinin birçok türü, örneğin spesifik diyet takviyeleri, spor içecekleri veya spor gıdaları bulunur.

Spor içecekleri hipotonik, hipertonik veya izotonik olabilir. Spor içecekleri likit formda, konsantreler olarak veya toz olarak (bir likit, örneğin su içinde çözülmek üzere) mevcut olabilir. Spor gıdası bar, tablet veya jel formunda olabilir. Diyet takviyesi, bir hap veya bir kapsül formunda olabilir.

Besin ayrıca alışılagelmiş katkı maddeleri, örneğin tatlandırıcılar, lezzetlendiriciler, şeker, yağ, emülgatörler, koruyucu maddeler içerebilir. Besin maddesi aynı zamanda,

WO02/45524'te açıklandığı üzere (hidrolizlenmiş) proteinler gibi diğer aktif bileşenleri içerebilir. Aynı zamanda diğer antioksidanlar besin maddesi içinde, örneğin flavonoidler, karotenoidler, ubikinonlar, rutin, lipoik asit, katalaz, glutatyon (GSH) ve örneğin C ve E gibi vitaminler veya bunların öncüllerinde mevcut olabilir. Formüle (1) göre bir bileşik ve C vitamini veya bunun öncüllerinin kombinasyonu, bir sinerjik etki göstermiştir. Tercih edildiği üzere, hidroksitirosol veya bunun asetatı, C vitamini ile kombine edilir. Formüle (1) göre bir bileşik ve C vitamini içeren bir bileşim, yenidir ve buluşun bir diğer açısıdır.

Formüle (1) göre bileşiğin, etkili bir miktarda mevcut olması gerekir. Genel olarak bileşiğin, bir etki oluşturmak üzere porsiyon başına 1 mg ile 3 gram, tercih edildiği üzere porsiyon başına 10mg ila 1 gram arası gereklidir. Bu durum, ağırlık, yaş, diyet alışkanlıkları ve egzersiz yoğunluğu gibi birçok faktöre dayanır. Bir antioksidanın etkisi, belirli markörler vasıtasıyla ölçülebilir. Kas egzersizinde, lipit oksidasyonu ve protein oksidasyonu meydana gelir. Lipit oksidasyonuna yönelik ölçülecek uygun markörler, örneğin malondialdehit (MDA) ve izoprotanlardır. Protein oksidasyonu miktarına yönelik uygun bir markör örneğin protein karbonillerdir.

Formüle (1) göre bileşiği içeren besin maddesi, egzersizden önce, bu sırada veya bundan sonra yenebilir. Bu durumda, bu, egzersizden önce kullanılır, tercih edildiği üzere bu, yaklaşık bir saat önce yenir. Bu durumda, bu, egzersizden sonra kullanılır, tercih edildiği üzere bu, bundan sonra bir saat içinde, daha tercihen egzersizden hemen sonra yenir.

İnsanların tüketimine yönelik uygun besinsel ürünlere ilave olarak, aynı zamanda evcil hayvan gıdaları dahil olmak üzere hayvanlara yönelik yemlerde formüle (1) göre bileşiğin kullanılması mümkündür. Bu akabinde, kas kuvvetlerine yönelik kullanılan hayvanlara, örneğin (yarış) atlarına veya köpeklerine (diğer bir deyişle yarış köpekleri veya kızak köpekleri) yönelik özellikle uygundur.

Buluş buradan sonra aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örnekler ile açıklanır.

Örnekler

Örnek 1: Organ banyosu deneyleri

Erkek Lewis sıçanları (12 ila 14 haftalık arasındaki) kullanılmıştır. Dekapitasyondan sonra, diyafram hızlı şekilde eksize edilmiştir ve küçük şeritler (yaklaşık 2 mm en ve 1 cm uzunlukta) kesilmiştir ve akabinde pH 7.4 olmak üzere bir %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile gaz ile doldurulmuş Krebs tamponu içeren termostat ile ayarlanmış organ banyoları içine monte edilmiştir. Her bir diyafram şeridi, dikey olarak bir izometrik transdüsere bağlanmıştır. Krebs tamponu bileşimi bu (mM) olmuştur: NaCl (117.5), KCl (5.6), $MgSO_4$ (1.18), $CaCl_2$ (2.5), $NaHPO_4$ (1.28), $NaHCO_3$ (25) ve glukoz (5.5). Deney sırasında, tampon her 15 dakika değiştirilmiştir. Saha stimülasyonu, platin elektrotlar ile her bir kasın tüm uzunluğu boyunca oluşturulmuştur.

Deneyin başında, şeritler sıcaklığa bağımlı bozulmayı minimuma indirmek üzere oda sıcaklığında 45 dakika boyunca yıkanmıştır. Bundan sonra, su banyosu 37°C'de (deneylerin başlamasından 15 dakika önce) açılmıştır. Her bir şerit ilk olarak, kasılma kontraksiyonları (1 Hz) kullanılarak bunun optimal uzunluğuna (Lo) ayarlanmıştır. Darbe süresi daima 10 ms'dir.

İlk olarak Pt (1 Hz'lik bir stimülasyonda kasılma gerilimi) ve Po (250 ms süre, 100 Hz'lik bir stimülasyonda maksimum spesifik gerilim) belirlenmiştir. Bundan sonra, diyafram kas şeritlerinin artan stimulus frekanslarına tepkisi, 250 ms katarında uygulanan 10, 20, 33, 50 ve 100 Hz darbelerin uygulanması ile Lo'da değerlendirilmiştir. 2 dakikalık bir iyileştirme periyodu kontraksiyonlar arasında kullanılmıştır. Kuvvet-frekans protokolünün bitiminde, bir yorulma protokolü uygulanmıştır. Şeritler 5 Hz'de 6 dakika boyunca stimüle edilmiştir.

Bu stimülasyon protokolünden sonra, hidroksitirosol (HT) veya kontrol (araç, etanol) 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Akabinde, hidrojen peroksit (H_2O_2) veya kontrol (MilliQ) 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bundan sonra, bunlar yeniden belirlenmiştir: Pt, Po, kuvvet-frekans ve yorulma.

Hidroksitirosol, Cayman Chemical, Ann Arbor, ABD tarafından satın alınmıştır. Hidrojen peroksit Sigma, St. Louis, ABD tarafından elde edilmiştir. Diğer tüm kimyasal maddeler, analitik derece saflığa sahiptir.

Şekil 1, kas kuvveti üzerinde H_2O_2 etkisini gösterir. H_2O_2 doz bağımlı şekilde, kontrol ile kıyasla tüm uygulanan stimülasyon frekansında kuvveti düşürür. Veri, en azından çift kopya ölçümlere dayanarak ortalama olarak ifade edilir.

Şekil 2, HT'nin H_2O_2 aracılı kas hasarına karşı koruyucu etkisini gösterir. HT, H_2O_2 aracılı kas hasarına tüm stimülasyon frekanslarında (10, 20, 33, 50 ve 100 Hz) karşı korur. H_2O_2 inkübasyon olmaksızın 300 µM HT kas fonksiyonunu dahi korur. Veri, en azından çift kopya ölçümlere dayanarak ortalama olarak ifade edilir.

Şekil 3, HT'nin H_2O_2 aracılı kas hasarına karşı koruyucu etkisini gösterir. HT doz bağımlı şekilde H_2O_2 ile indüke edilen kuvvette düşüşe karşı korur. Stimülasyon frekansı 50 Hz ve H_2O_2 konsantrasyonu 1 mM'dir. Veri, en azından 2 çift kopya ölçümlere dayanarak ortalama olarak ifade edilir.

<u>Örnek 2: Süpürme deneyleri ve lipoik asit ile kıyaslama.</u>

Materyaller

Hidroksitirosol, Cayman Chemical, Ann Arbor, ABD tarafından elde edilmiştir. Tirosol ve KO_2 Fluka, Buchs, İsviçre tarafından satın alınmıştır. Homovanilik alkol, 2-metoksifenol, fenol ve dihidrorhodamin-123 (DHR-123) Sigma, St. Louis, ABD tarafından elde edilmiştir. Katekol, Janssen Chimica, Geel, Belçika tarafından elde edilmiştir. Lipoik asit, Asta Medicac AG, Frankfurt, Almanya tarafından satın alınmıştır. Nitrojen monoksit, AGA, Hamburg, Almanya tarafından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasal maddeler, analitik derece saflığa sahiptir.

ONOOH süpürme

Bileşiklerin ONOOH indüklü DHR-123 oksidasyonuna karşı koruma, Kooy et al (Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med, 16;149-56) tarafından açıklandığı üzere ölçülmüştür. Kısaca, 5 µM DHR-123 ve bir süpürücünün çeşitli konsantrasyonları 37°C'de 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) içinde inkübe edilmiştir. Akabinde, ONOOH hızlı vortekslenirken tüp içine 10 µl'lik bir alikot pipetleme yoluyla eklenmiştir, 0.7 µM'lik bir nihai konsantrasyona ulaşılmıştır. Floresans ölçümleri sırasıyla 500 ve 536 nm dalga boylarının eksitasyonu ve yayılması

ile gerçekleştirilmiştir. Etkiler, DHR-123 (IC50) oksidasyonunun %50 inhibisyonunu veren süpürücünün konsantrasyonu olarak ifade edilir.

O_2•-süpürme

O_2•-, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) içinde ksantin (150 µM) ve ksantin oksidaz (XO) (5.5 mU/ml) reaksiyonu yoluyla oluşturulmuştur. O_2•- radikalleri nitro mavi tetrazolyum (NBT, 50 µM) yoluyla saptanmıştır. NBT, O_2•- yoluyla bunun formazanına azalmaya uğrar. Bu azalmanın oranı 2 dakika boyunca 560 nm'de spektrofotometrik olarak görüntülenmiştir. Bir süpürücünün çeşitli konsantrasyonları eklenmiştir ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon, XO'nun eklenmesi ile başlatılmıştır. O_2•- süpürme potansiyeli, NBT (IC50) azaltımında %50'lik bir düşüş veren süpürücü konsantrasyonu olarak ifade edilir. Süpürücünün XO aktivitesi üzerine olası bir inhibitör etkisine yönelik ayarlamak üzere süpürücünün en yüksek konsantrasyonu 37°C'de inkübe edilmiştir ve akabinde ürat oluşumu oranı 2 dakika boyunca 293 nm'de ölçülmüştür.

Süpürme testlerinin sonuçları aşağıdaki tablo 1'de gösterilir.

Tablo 1. Test edilen bileşiklerin ONOO- ve O_2•- süpürme aktiviteleri. IC50 değerleri ± SEM (µM cinsinden), n=3 gösterilir.

Test edilen bileşik	$ONOO^-$	$O_2^{\bullet-}$
Hidroksitirosol	3.6 ± 0.2	2.3 ± 0.3
Oleropin	2.3 ± 0.5	6.0 ± 0.5
Tirosol	99 ± 16	>200
Homovanilik alkol	6,6 ± 0,2	>200
Lipoik asit (karşılaştırmalı örnek)	>200	>100

Örnek 3: Askorbat ile hidroksitirosol (HT) rejenerasyonu

HT oksidasyonu (Cayman Chemical, Ann Arbor, ABD) 37°C'de, pH 7.4 olmak üzere 50 µM HT ve 5 U/ml tirosinaz (Sigma, St. Louis, ABD) içeren 145 mM olan bir fosfat tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Tirosinaz ve HT inkübasyonu, bir kuinon (HTQ)

oluşumuna yol açar. Reaksiyonlar spektrofotometrik olarak ve yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) yoluyla görüntülenmiştir. Spektrumlar 240 nm/dakikalık bir tarama hızında kaydedilmiştir. İnkübasyon karışımlarının HPLC analizi, bir Supelcosil LC318 kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon dakika başına 1 ml olan bir akış hızı ile %0.1 (v/v) trifloroasetik asit ve %5 (v/v) asetonitril içeren distile su ile ayrıştırılmıştır. 280 nm'de diyot dizilim deteksiyonu (DAD) kullanılmıştır. Askorbatın HTQ ile reakte etmeye yönelik kabiliyeti aşağıdaki gibi belirlenmiştir. İlk olarak, HTQ iki buçuk dakika boyunca oluşturulmuştur. Akabinde, 150 µM askorbat (Sigma, St. Louis, ABD) HTQ'ya eklenmiştir ve karışım üçüncü dakikada el ile HPLC'ye hemen enjekte edilmiştir.

Şekil 4, sadece HT'nin (kontrol) HPLC ölçümünün sonuçlarını gösterir.

Şekil 5, tirokinazın HT'ye eklenmesinin etkisini gösterir, bu şekilde bunun kionunun oluşumu (kontrol) gösterilir.

Şekil 6, askorbatın bir HT ve tirokinaz karışımına eklenmesinin etkisini gösterir. Bu, HT'nin yeniden oluşturulduğunu ve hiçbir HTQ'nun üç dakikadan sonra daha fazla mevcut olmadığını gösterir. HT'nin askorbat ile rejenerasyonu meydana gelmiştir (örnek).

Örnek 4: Hidroksitirosol içeren kurabiye tarifi.

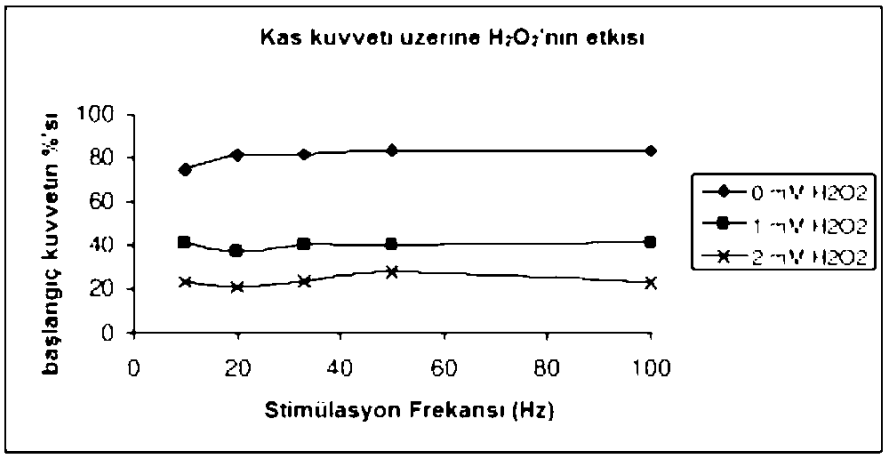
Aktif içerik maddeleri: 10-50 mg hidroksitirosol/porsiyon başına (tipik olarak 30g)

İçerik maddesi	(g)
Buğday unu	41.0
Şeker	20.5
Yağ/Tereyağı	20.5
Tam yumurta (likit)	18.0
Limon Aroması	gerektiği kadar
Pişirme ajanı	gerektiği kadar

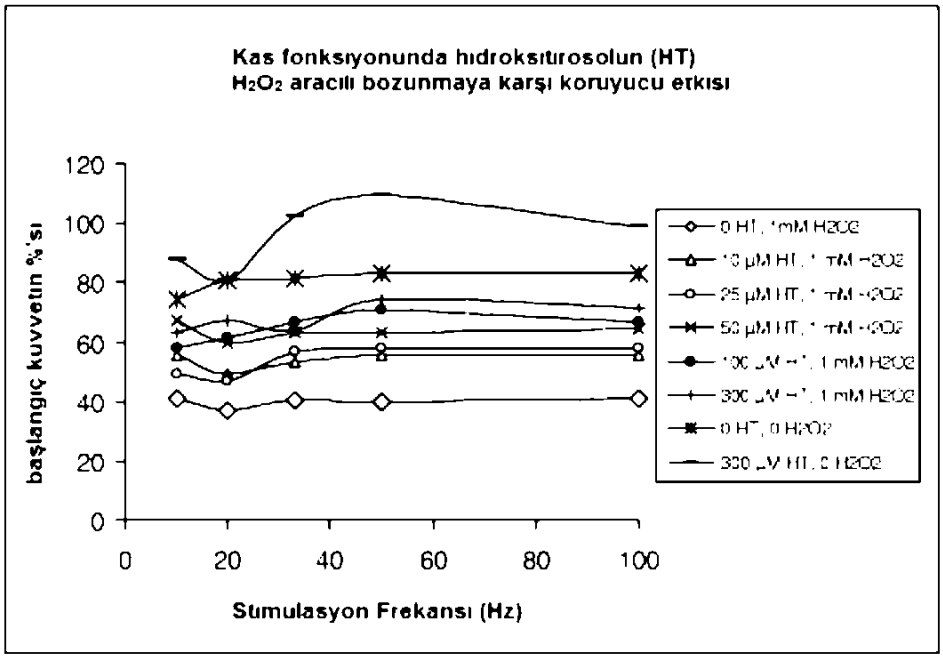
Tüm içerik maddeleri, bir tatlı gevrek hamur işi oluşturmak üzere karıştırılarak yavaş bir biçimde eklenir. Daha sonra, hamur işinin yaklaşık olarak 5 mm bir kalınlığa yassılaştırılmasının öncesinde, hamur işi en az 2 saat boyunca soğuk tutulur (4°C).

Parçalar kesip çıkarılır ve pişirme öncesinde yüzey üzerine yumurta sarısı ile fırçalanır. Pişirme, 180 °C'de bir fan fırını içinde 15 dakika boyunca meydana gelebilir.

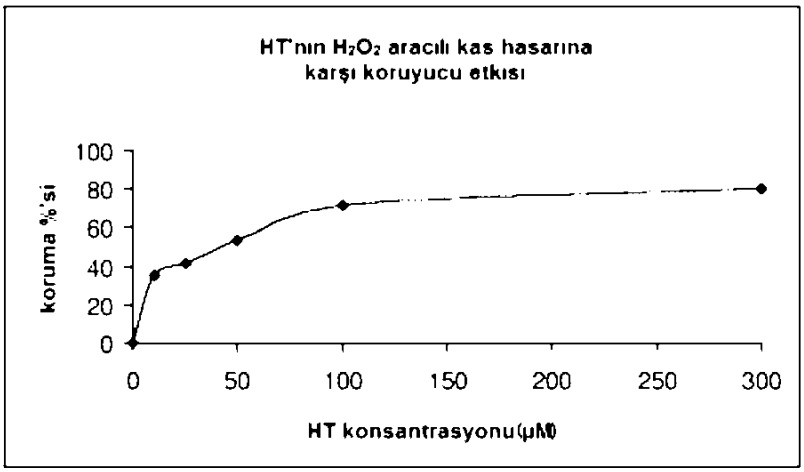
5



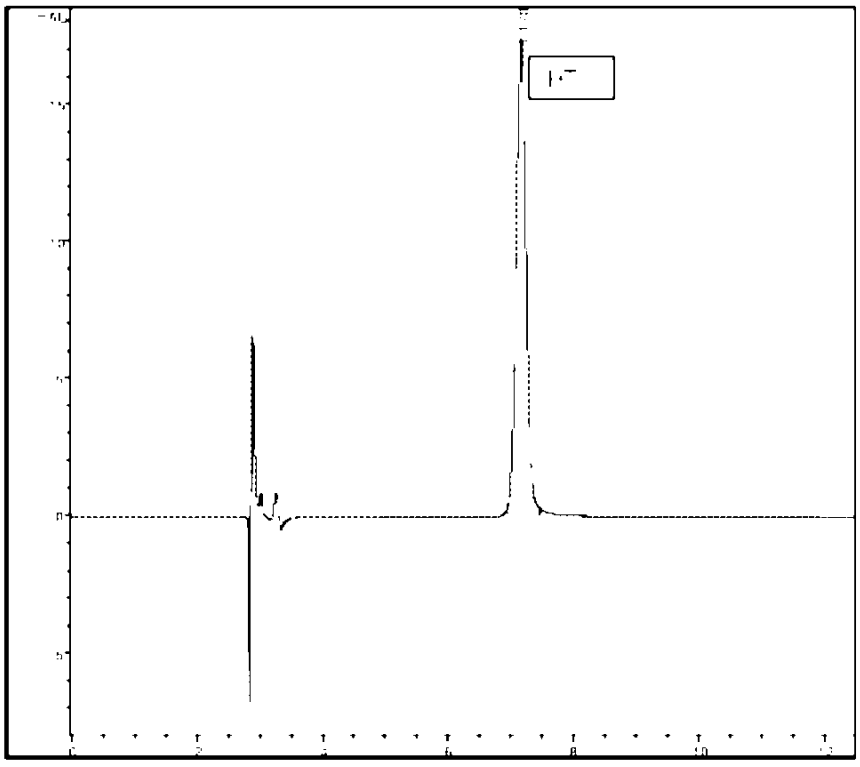
Şekil 1. H_2O_2'nin kas kuvveti üzerine etkisi



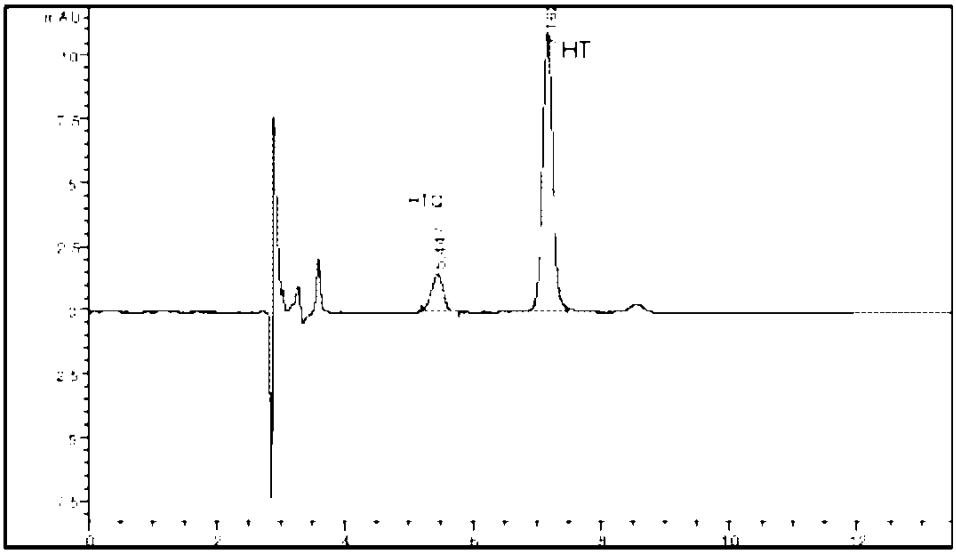
Şekil 2. HT'nin H_2O_2 aracılı kas hasarına karşı koruyucu etkisi



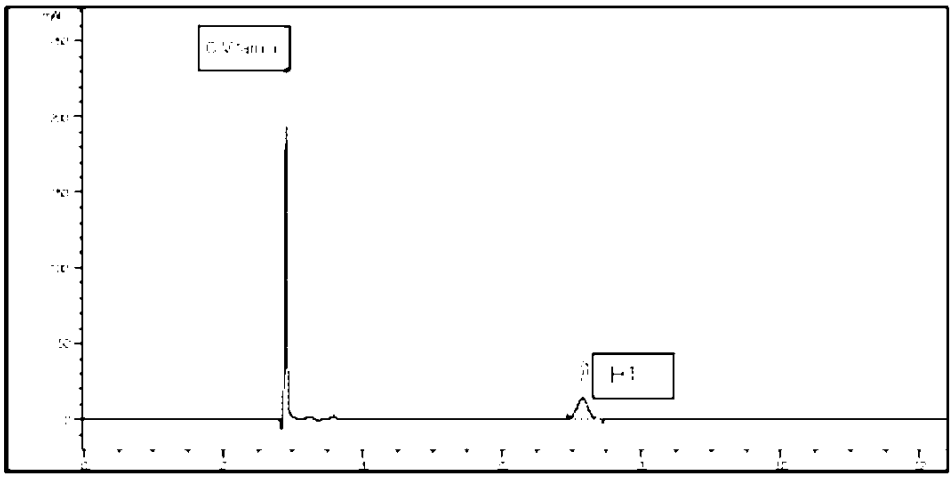
Şekil 3 HT'nın H_2O_2 aracılı kas hasarına karşı koruyucu etkisi



Şekil 4 Hidroksitirosolun (HT) HPLC grafiği



Şekil 5. Buna tirokinaz ve oluşturu an hidroksitiroso kuinonun (HTQ) ek endığı hidroksitiroso ün (HT) HPLC grafiği



Şekil 6. Bir HT, tirokinaz ve askorbat (C Vitamini) karış m nın HPLC grafiği