PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2001 -3486

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 07 D 307/32
A 61 K 31/00
A 23 L 1/30

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.03.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.03.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/281094**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.02.2002**
(Věstník č. 2/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/FI00/00181**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/59946**

(71) Přihlašovatel:
HORMOS NUTRACEUTICAL OY LTD, Turku, FI;

(72) Původce:
Ahotupa Markku, Turku, FI;
Eckerman Christer, Turku, FI;
Kangas Lauri, Lieto, FI;
Mäkelä Sari, Turku, FI;
Saarinen Niina, Merimasku, FI;
Santti Risto, Naantali, FI;
Wärri Anni, Lieto, FI;

(74) Zástupce:
Kania František Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Hydroxymatairesinol při prevenci rakoviny

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobů prevence rakovin, určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech a/nebo kardiovaskulárních onemocnění u lidí založené na podávání hydroxymatairesinolu přísušné osobě. Řešení se také týká způsobu zvýšení hladiny enterolaktonu nebo jiného metabolitu hydroxymatairesinolu v lidském séru, což je příčinou prevence rakoviny nebo určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech u lidí, založeného na podávání hydroxymatairesinolu příslušné osobě. Dále se řešení týká farmaceutických přípravků, potravinových přísad a potravinových výrobků, obsahujících hydroxymatairesinol.

CZ 2001 - 3486 A3

27.09.01
PV 2001-3486
71814

Hydroxymatairesinol při prevenci rakoviny

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobů prevence rakovin, určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech a/nebo kardiovaskulárních onemocnění u lidí, založené na podávání hydroxymatairesinolu příslušné osobě. Vynález se také týká způsobu zvýšení hladiny enterolaktonu nebo jiného metabolitu hydroxymatairesinolu v lidském séru, což je příčinou prevence rakoviny nebo určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech u lidí, založeného na podávání hydroxymatairesinolu příslušné osobě. Dále se vynález týká farmaceutických přípravků, potravinových přísad a potravinových výrobků obsahujících hydroxymatairesinol.

Dosavadní stav techniky

Formou odkazu jsou zde začleněny publikace a další materiály, které jsou použity k objasnění podkladu vynálezu, zejména k poskytnutí doplňkových detailů týkajících se praxe.

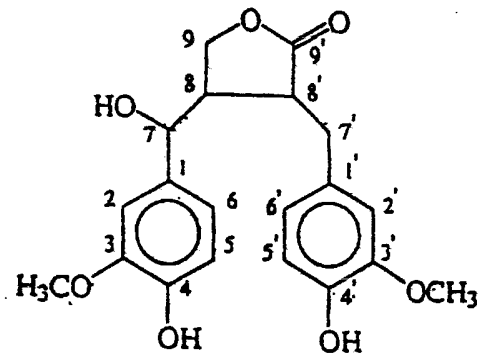
Lignany jsou definovány jako třída fenolických sloučenin s 2,3-dibenzylbutanovým skeletem. Vytváří se sloučením monomerních jednotek zvaných prekurzory, jako je například kyselina skořicová, kávová, ferulová, kumarová a gallitá kyselina (Ayres a Loike, 1990). Lignany jsou široce rozšířeny v rostlinách. Mohou se nalézat v různých částech (kořeny, listy, stonek, semena, plody), ale převážně v malých množstvích. V mnoha zdrojích (semena, plody) se lignany nalézají jako glykosidické konjugáty spojené s vláknitou složkou rostlin. Nejběžnějšími zdroji savčích prekurzorů lignanů v potravě jsou surové obilné výrobky. Nejvyšší koncentrace v jedlých rostlinách byly nalezeny ve lněném semínku, následovaly surové obilné výrobky, zejména žitné. Produkce lignanů u savců z různé rostlinné potravy je uvedena v tabulce 1.

Významná množství lignanů se také nacházejí v jehličnanech. Typ lignanů se v různých druzích liší a množství lignanů je v různých částech stromů různé. Typickými lignany v jádrovém dřevě smrku ztepilého (Picea abies) jsou hydroxymatairesinol (HMR), α-konidendrin, kyselina konidendrinová, matairesinol, isolariciresinol, sekoisolariciresinol, liovil, picearesinol, lariciresinol a pinoresinol (Ekman 1979).

27.09.01

Zdaleka nejčastěji se vyskytující samostatnou složkou lignanů ve smrku je HMR, asi 60 procent celkových ligninů, který se vyskytuje převážně v nekonjugované volné formě. Koncentrace ligninů v silných kořenech je 2 až 3 procenta. Spousta ligninů se vyskytuje v jádrovém dřevě větví (5 až 10 procent) a v ohybech a zejména v sucích, kde může být množství ligninu vyšší než 10 procent (Ekman, 1976 a 1979). Tyto koncentrace jsou asi 100krát vyšší ve srovnání s mletým lněným práškem, který je známý jako materiál bohatý na lignin.

Chemická struktura hydroxymatairesinolu je



Lignan lze izolovat například z vláken tlakového dřeva. Tato vlákna pocházejí z tlakového dřeva stonků a suků (frakce nadměrných štěpků) zhoršujících kvalitu papíru (Ekman, 1976).

Rostlinné lignany jako například matairesinol a sekoisolariciresinol jsou střevní mikroflórou převedeny na odpovídající savčí lignany enterolakton a enterodiol (Axelson a kol., 1982). Ty procházejí enterohepatickou cirkulací a jsou vyloučeny v moči jako glukuronidové konjugáty (Axelson a Setchell, 1981). Experimentálním důkazem chemopreventivních účinků lignanů je podávání vysokotučné stravy s moukou ze lněného semínka bohatou na lignany (5 % nebo 10 %) nebo s lněnými lignany (cekoisolariciresinoldiglykosid, SDG), které zabránilo rozvoji rakoviny prsu u krys indukované antiestrogensenzitivním DBMA (Serraino a Thompson, 1991 a 1992; Thompson a kol., 1996a a 1996b). Došlo k omezení proliferace epiteliálních buněk, jaderných aberací, růstu tumorů a rozvoje nových tumorů. Vysoký příjem lignanů může také chránit před experimentálně vyvolanou rakovinou prostaty a tlustého střeva. Dietní žito (obsahující lignany) zabránilo růstu transplantovaného prostatického adenokarcinomu Dunning R3327 v raném stadiu u krys (Zhang a kol., 1997; Landström a kol., 1998). Procento zvířat se zjevnými nádory, objem nádorů a rychlost růstu byly podstatně nižší. Navíc podávání lněných semínek nebo SDG inhibo-

27.09.01

valo tvorbu chemicky indukovaných aberujících tubulárních žláz v tlustém střevě krys (Serraino a Thompson, 1992; Jenab a Thompson, 1996). Protirakovinový účinek může být tedy způsoben slabými estrogenům / antiestrogenům podobnými vlastnostmi a / nebo jinými mechanismy, které nejsou dobře pochopeny.

Vylučování enterolaktonu močí a jeho koncentrace v séru jsou nízké u žen s rakovinou prsu (Ingram a kol., 1997; Hultén a kol., 1998), což naznačuje, že lignany jsou chemopreventivní. O savčích lignanech (enterolakton a enterodiol) se usuzuje, že modulují s hormony související nádory, jako například rakovinu prsu, díky své strukturní podobnosti s estrogeny. Enterolakton měl slabou estrogenní účinnost v buňkách MCF-7 (Mousavi a Adlercreutz, 1992), ale neměl žádnou estrogenní odezvu u hmotnosti dělohy u myší (Setchell a kol., 1981). Jako známka působení podobného estrogenu zvýšilo krmení krys SDG během březosti a kojení hmotnost dělohy v době odstavení, ale efekt nebyl patrný v pozdějších stadiích. (Tou a kol., 1998). Možné protirakovinné účinky byly také spojovány s jejich antiestrogenními účinky (Waters a Knowler, 1982). Inhibice aromatázy savčím lignanem, enterolaktonem, naznačuje mechanismus, kterým spotřeba na lignany bohaté potravy může přispívat ke snížení na estrogenu závisejících onemocnění, jako je rakovina prsu (Adlercreutz a kol., 1993; Wang a kol., 1994). Potenciální antioxidační aktivita lignanů by mohla také představovat mechanismus spojený s preventivním účinkem lignanů při rozvoji rakoviny. Navíc savčí lignany se ukázaly jako inhibitor přeměny testosteronu na 5-α-dihydrotestosteron (DHT), silný vnitrobuněčný androgen, v koncentracích dosažitelných u lidí (Evans a kol., 1995). Snížení koncentrace DHT by mohlo změnit riziko rakoviny prostaty (PC) a benigní prostatické hyperplazie (BPH).

Je možné, že lignany coby prekurzory enterolaktonu mohou také zmírnit symptomy dolních močových cest (LUTS) a gynekomastii. Na základě výsledků obdržených na zvířecích modelech se domníváme, že estrogeny hrají důležitou roli ve vývoji svalové dysfunkce účastnící se na uretrální dyssynergii, která se projevuje jako dyssynergie krčku močového měchýře nebo pseudodyssynergie vnějšího svěrače (Streng a kol., nepublikovaná pozorování). Tyto neurosvalové změny jsou alespoň částečně vráceny inhibitorem aromatázy (MPV-2213ad), což ukazuje na roli estrogenů. Navíc gynekomastie, která je indukována expozicí estrogenům nebo přítom-

27.09.01

ností zvýšeného poměru estrogenu k androgenům, může být úspěšně léčena inhibitorem aromatázy. Schopnost lignanů inhibovat 5-α-reduktázu a/nebo aromatázu spojená s jejich potencionálními antioxidačními účinky může představovat mechanismy spojené s preventivními účinky ligandů při vývoji hormonálních onemocnění u mužů.

Žádné údaje o možných účincích lignanů na lidi nejsou k dispozici. Současné teorie o účincích lignanů na lidi byly odvozeny ze studií účinků stravy doplněné lněnými produkty (a tedy lignany). Lněná semena ve stravě žen způsobila změny v menstruačním cyklu (Phipps a kol., 1993). Subjekty, ženy s normálním cyklem, vykazovaly delší průměrnou délku luteální fáze a vyšší poměr progesteronu/ 17β-estradiolu v séru během luteální fáze, když jedly 10 g prášku z lněných semínek denně jako přídavek k jejich obvyklé stravě (Phipps a kol., 1993). Žádné významné rozdíly v cyklech testované a kontrolní skupiny nebo v koncentracích estrogenu nebo 17β-estradiolu nebyly zjištěny. Nebyly ani významné rozdíly mezi testovanou a kontrolní skupinou v koncentracích estrogenů v séru u žen v menopauze (Brzezinski a kol. 1997). Přídavek lněných semen zvýšil koncentraci SHBG (protein, který ve velkém množství váže estradiol) v séru. To je typický estrogenní efekt v jaterní tkáni. Zvýšená koncentrace SHGB na druhé straně snižuje biodostupnost endogenních estrogenů. U zdravých mladých mužů neměly krátkodobé (6 týdnů) přídavky lněných semen do stravy (10 g/den ve vdolcích) žádný významný účinek na koncentrace testosteronu v plazmě (Shultz a kol., 1991) indikující nedostatek estrogenicity v mužském organismu. Shrnuto, tyto studie ukazují, že lignany mohou mít slabé hormonální (estrogenní a antiestrogenní) účinky, ale mechanismus jejich účinků nemůže být plně popsán hormonálními efekty.

Na závěr, izolované savčí lignany nebyly dříve k dispozici v dostatečném množství, aby mohly být použity k pokusům na zvířatech nebo při klinických testech, a jediná možnost, jak zvýšit příjem lignanu, byla zvýšit spotřebu na vlákniny bohatých složek potravy, jako jsou lněná semínka. HMR nebo jakýkoli jiný lignan, který je efektivně přeměněn na enterolakton, a může být produkován/izolován ve větších množstvích, bude cenný při rozvoji farmaceutických přípravků a potravinových produktů

27.09.01

jako jsou funkční potraviny pro chemoprevenci rakoviny a dalších hormonálních a kardiovaskulárních onemocnění.

Podstata vynálezu

Z jednoho hlediska se tento vynález týká způsobu prevence rakoviny, určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech a/nebo kardiovaskulárních onemocnění u lidí, a zahrnuje podávání účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru.

Z dalšího hlediska se vynález týká způsobu zvýšení hladiny enterolaktonu nebo jiného metabolitu hydroxymatairesinolu v lidském séru, což je příčinou prevence rakoviny nebo určitých nerakovinných onemocnění závislých na hormonech u lidí, což zahrnuje podávání účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru této osobě.

Ze třetího hlediska se vynález týká farmaceutických přípravků obsahujících účinné množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Ze čtvrtého hlediska se vynález týká produktu, obsahujícího kapalnou nebo pevnou látku obohacenou hydroxymatairesinolem nebo jeho geometrickým izomerem nebo jeho stereoizomerem, pro použití jako přísada do potravinových výrobků.

Z pátého hlediska se vynález týká potravinového výrobku, obsahujícího účinné množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru.

Z ještě jednoho hlediska se vynález týká způsobu zvýšení stability potravinového výrobku obsahujícího přídavek účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru v uvedeném potravinovém výrobku.

27.09.01

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje koncentrační závislost inhibice aromatázy lignany v JEG-3 buňkách.

Obrázek 2 ukazuje proliferaci buněk MCF-7 v přítomnosti a nepřítomnosti HMR.

Obrázek 3 ukazuje děložní hmotnost nedospělých krys krmených HMR nebo inhibitorem aromatázy.

Obrázek 4 ukazuje protinádorové účinky HMR vůči nádoru prsní žlázy indukovanému DMBA u samic krys.

Obrázek 5 ukazuje vylučování enterolaktonu v moči krys krmených různými dávkami HMR.

Příklady provedení vynálezu

Tento vynález se týká použití lignanu, hydroxymatairesinolu (HMR) pro prevenci rakovinných, nerakovinných, na hormonech závislých onemocnění a kardiovaskulárních onemocnění přidáváním uvedeného HMR do potravin nebo jeho použitím jako farmaceutického přípravku. Překvapivě HMR je metabolizován in vivo na enterolakton, o němž se předpokládá, že je alespoň částečně zodpovědný za protinádorové vlastnosti lignanů. Antioxidační aktivita HMR in vitro je silná a tato vlastnost naznačuje, že HMR může také zabránit kardiovaskulárním onemocněním díky ochrannému účinku proti škodlivým volným sloučeninám kyslíku v těle. Vynález se také týká použití HMR jako přísady do potravin ke zvýšení stability potravin (například inhibuje oxidaci lipidů a pigmentů a ztráty vitamínů, což způsobuje ztrátu nutriční hodnoty a vznik nežádoucích pachových látek v potravinách).

Metoda podle tohoto vynálezu je obzvláště účinná v prevenci rakovinných onemocnění jako je rakovina prsu, rakovina prostaty a rakovina tlustého střeva, nerakovinných na hormonech závislých onemocnění jako jsou symptomy dolní části močových cest, uretrální dyssynergie, nestabilita močového měchýře, ucpání výtoku močového měchýře, benigní prostatická hyperplazie a gynekomastie u mužů, a kardiovaskulárních onemocnění způsobených oxidovaným LDL v séru.

27.09.01

Farmaceutický přípravek podle tohoto vynálezu je s výhodou k orálnímu podávání. Potřebné množství aktivní složky (HMR) bude různé podle konkrétních podmínek. Typická dávka se pohybuje od zhruba 10 po zhruba 100 mg na den a dospělou osobu.

Co se týče potravinové přísady podle vynálezu, může být hydroxymatairesinolem obohacena jakákoli jedlá netoxická pevná nebo kapalná látka vhodná ke smíchání s HMR bez ovlivnění vlastností HMR. Hlavní rolí této látky je usnadnit přesné dávkování HMR. Vhodná koncentrace je například od 100 mg do 1 g HMR na 100 g obohacované látky.

Potravinovým produktem podle tohoto vynálezu jsou zejména funkční potraviny, nutriční doplněk, živiny, farmaceutické potravinové přípravky, doplňková výživa, zdravá výživa, potravinové vzorky, nebo jakýkoli potravinový produkt. Vhodná koncentrace HMR v potravinových produktech je například od 1 do 20 mg HMR na 100 g potravinového produktu.

Funkční potraviny podle tohoto vynálezu mohou být například máslo, margarín, sušenky, chléb, sladké pečivo, bonbóny, cukrovinky, jogurt nebo jiný fermentovaný mléčný výrobek, nebo cereálie jako je müsli.

Přídavek hydroxymatairesinolu je účinný zejména pro zvýšení stability potravin ve smyslu inhibice oxidace lipidů, vitamínů a pigmentů, která způsobuje ztrátu nutriční hodnoty a vznik nežádoucích pachových látek v potravinách. Vhodná koncentrace HMR pro tyto účely je například okolo 0,1 %.

Izolace HMR pro použití v tomto vynálezu může být provedena z frakce nadměrných štěpků (zahrnující větve, ohyby a suky) tlakového dřeva a použití HMR je v prevenci onemocnění jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění.

Vlastnosti HMR byly zkoumány sedmi různými zkouškami:

1. Měření antioxidační kapacity in vitro
2. Měření kapacity inhibice aromatázy v buňkách JEG-3
3. Měření estrogenní a antiestrogenní aktivity v kulturách buněk MCF-7

4. Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity biologickou zkouškou růstu dělohy
5. Měření estrogenní a antiestrogenní aktivity u dospělých samců krys
6. Zkoumání protinádorové aktivity na modelu rakoviny prsní žlázy u krys indukované DMBA
7. Analýza metabolitů v moči krys po různých dávkách HMR

Izolace a čištění HMR v množstvích dostatečných pro biologické testy byly dříve nemožné, protože jde o součást lignanů dřeva, které byly poměrně špatně chrakterizovány. Pochopení distribuce HMR v různých částech smrku (Ekman 1976 a 1979) poskytlo příležitost k detailnímu studiu lignanů a zejména HMR.

Mezi dávkami HMR a množstvím enterolaktonu v moči byla nalezena lineární korelace. Enterolakton je dobře známý savčí lignan vytvářený střevními bakteriemi z matairesinolu nebo oxidací enterodiolu (Axelson a Setchell, 1981; Axelson a kol., 1982). V moči bylo nalezeno jen nepatrné množství nemetabolizovaného HMR a dalších metabolitů (enterodiol a 7-hydroxyenterolakton). Jejich množství zůstala nezměněna, i když byla zvyšována denní dávka HMR. Tyto poznatky ukazují, že HMR byl metabolicky přeměněn na enterolakton, a dále že enterolakton vzniklý z HMR demethylačními a dehydroxylačními pochody není přeměňován na enterodiol. Na základě struktury HMR se očekávalo, že 7-hydroxyenterolakton bude hlavním metabolitem HMR, ale nebylo to tak. Během metabolismu dochází k eliminaci této hydroxylové skupiny. Metabolismus HMR se liší od metabolismu SDG. SDG je metabolizován na enterodiol, který je částečně oxidován na enterolakton (Rickard a kol., 1996, Lampe a kol., 1994). HMR tak nabízí výhodu oproti SDG coby přímý prekurzor enterolaktonu.

HMR měl slabý, pokud vůbec nějaký, estrogenní účinek na dělohu krys nebo na samčí organismy. V buňkách MCF-7 ukazoval slabou, ale nijak významnou aktivitu podobnou estrogenní. U HMR nebyla prokázána žádná antiestrogenní aktivita. Proto je tedy překvapivé, že HMR má významnou protinádorovou aktivitu v modelu nádoru indukovaného DMBA u krys, jak ukazuje obrázek 2. Aktivita HMR může být způsobena HMR samotným nebo enterolaktonem. Nicméně u chemopreventivních účinků HMR nebyla nalezena žádná závislost na dávce, když byl HMR podáván ve dvou různých dávkách (3 a 15 mg/kg) krysám po podávání DMBA. Tudíž HMR ne-

27.09.01

musí být převeden na enterolakton, aby měl protinádorový účinek, nebo menší dávky těchto lignanů jsou dostatečné k docílení maximálních chemopreventivních účinků.

HMR je velmi účinný antioxidant, jak ukazují tabulky 2 a 3. Je jeden z nejúčinnějších známých inhibitorů peroxidace lipidů a vynikající inhibitor oxidace LDL. Inhibice oxidace LDL je považována za zvláště důležitou u lidí, protože koncentrace oxidovaného LDL v séru je považována za jeden z nejlepších předpovídatelů kardiovaskulárních onemocnění jako je ateroskleróza. HMR může sloužit jako potravinová přísada ke zvýšení stability potravin (například k inhibici oxidace vitamínů, lipidů a pigmentů, která způsobuje ztrátu nutriční hodnoty a vznik nežádoucích pachových látek v potravinách), protože HMR byl mnohem lepším činidlem odstraňujícím hyperoxidové anionty a peroxylové radikály než dobře známé antioxidanty butylovaný hydroxyanizol (BHA) a butylovaný hydroxytoluen (BHT), které jsou běžně používány pro zvýšení stability potravin.

EXPERIMENTY:

Chemikálie

U různých lignanů byla in vitro testována estrogenicita, antiestrogenicita, schopnost inhibovat aromatizaci a jejich antioxidační vlastnosti. Složky testu byly pořízeny z následujících zdrojů: enterodiol a enterolakton od firmy Plantech, Londýn, Velká Británie, a 7-hydroxyenterolakton obsahující dva 7-OH enantiomery byl velkorysý dar od Dr. Kristiny Wähälä, Ústav aplikované chemie, Helsinská Univerzita, Finsko.

Extrakce HMR ze dřeva

Extrakty HMR byly izolovány z norského smrku (Picea abies), jak uvádí Ekman, 1976 a Ekman, 1979. ve stručnosti, rozemleté jádrové dřevo vysušené za zmrazeného stavu bylo extrahováno Soxhletovou extrakcí hexanem, čímž byly odstraněny nepolární lipofilní sloučeniny. Vzorek dřeva byl pak znovu extrahován v témže přístroji ve směsi aceton/voda (v objemovém poměru 9:1), a tak byly získány surové lignany. Hydroxymatairesinol (HMR) a jeho izomery byly izolovány a chromatograficky přečištěny XAD-pryskyřicí.

27.09.01

Měření antioxidační kapacity in vitro

Antioxidační kapacita lignanů byla odhadována čtyřmi různými metodami: 1) testy inhibice peroxidace lipidů, 2) testy inhibice oxidace nízkohustotních lipoproteinů (LDL), 3) testy pohlcování hyperoxidových aniontů a 4) testy pohlcování peroxylových radikálů.

Inhibice peroxidace lipidů byla vyhodnocena na základě jejich účinnosti inhibovat peroxidaci lipidů vyvolanou terc.-butylhydroperoxidem (t-BuOOH-LP) v mikrosomech jater krys in vitro (Ahotupa a kol. 1997). Test na t-BuOOH-LP byl proveden následovně: 0,8 ml pufru (50 mM uhličitanu sodného, pH = 10,2 , s 0,1mM EDTA) bylo napipetováno do luminometrické kyvety. Bylo přidáno dvacet mikrolitrů zředěných jaterních mikrosomů o konečné koncentraci 1,5 mg proteinů/ml, pak 6 ml luminolu (0,5 mg/ml) a testované chemikálie. Testované sloučeniny byly přidány do inkubačních směsí v malém objemu naředěném ethanolem nebo dimethylsulfoxidem (2 % inkubačního objemu) a účinnost peroxidace lipidů byla porovnána s účinností slepého vzorku (ethanolu nebo dimethylsulfoxidu). Reakce byla iniciována 0,05 ml 0,9mM t-BuOOH při 33 °C. Po dobu zhruba 45 minut byla v minutových intervalech měřena chemiluminiscence a pak byla vypočtena plocha pod křivkou (integrál). Měření chemiluminiscence byla provedena za použití luminometru Bio-Orbit 1251 (Bio-Orbit, Turku, Finsko) připojeného na PC s použitím softwaru určeného pro tyto testy.

Inhibice oxidace LDL byla odhadnuta jak uvádí Ahotupa et al, 1996. Krátce: LDL byl izolován srážením s pufrovaným heparinem. Po resuspengaci ve fosfátovém pufru byl přidán 20 mM $CuCl_2$ a směs byla inkubována 3 hodiny při 37 °C . Poté byly LDL lipidy extrahovány směsí chloroformu a methanolu, vysušeny pod dusíkem, znovu rozpuštěny v cyklohexanu a spektrofotometricky analyzovány při 234 nm. Absorbance je ukazatelem oxidace LDL. Pro zjištění schopnosti různých sloučenin zabránit oxidaci LDL byly tyto sloučeniny přidávány do inkubační směsi před přidáním $CuCl_2$. Možné interference testovaných sloučenin s procesem biotestu byly vyloučeny měřením absorbance při 234 nm před a po inkubační době. Pro ty sloučeniny, které ukazovaly antioxidační účinky při počáteční koncentraci (0,1mM), byly stanoveny hodnoty IC 50 (tj. koncentrace, při kterých testovaná sloučenina inhibuje oxidaci LDL z 50 %).

27.09.01

Metoda pohlcování hyperoxidových aniontů byla založena na hyperoxidových aniontech vyprodukovaných za kontrolovaných podmínek xantin-xantin oxidázovým systémem a na luminometrické detekci generovaných reaktivních částic kyslíku (Ahotupa a kol., 1997). Byla vyhodnocena schopnost testovaných sloučenin snižovat chemiluminiscenci. Byla vypočtena koncentrace IC 50 (koncentrace, která zabránila chmiluminiscenci z 50 %).

Biotest pohlcování peroxylových radikálů byl založen na generaci peroxylových radikálů tepelným rozkladem 2,2´-azo-bis(2-amidinopropanu)HCl a jejich chemiluminiscenční detekci (Ahotupa a kol., 1997). Výsledky byly vypočteny jako stechiometrický faktor, tzn. kolik molů peroxylradikálů může být pohlceno jedním molem testované sloučeniny.

Měření kapacity inhibice aromatázy v buňkách JEG-3

Účinky HMR a strukturně příbuzných lignanů (enterolakton, enterodiol a 7-hydroxyenterolakton) byly zkoumány na tvorbě ^{3}H-17β-estradiolu z ^{3}H-andostendionu v buňkách JEG-3, buněčné linii lidského choriokarcinomu. Choriokarcinomové buňky JEG-3 jsou užitečným aromatázovým modelem umožňujícím zkoumat inhibici aromatázy in vitro (Krekels a kol., 1991). Buňky byly získány z DMEM obsahujícího 10% plodové sérum telete (FCS). Inkubační směs obsahovala 50 µl ^{3}H-androst-4-en-3,17-dionu (0,5 nM), 50 µl neoznačeného androstendionu (0,5 nM), 100 µl testovaných sloučenin (10 mM) a 800 µl buněčné suspenze (1 milion buněk). Po 4hodinové inkubaci byly přidány neoznačené nosiče (androstendion, testosteron, 17β-estradiol a estron). Steroidy byly extrahovány dvakrát 3,0 ml dichlormethanu. Pro separaci a kvantifikaci radioaktivně označeného ^{3}H-17β-estradiolu byla použita HPLC, jak bylo popsáno dříve (Mäkelä a kol., 1995). Kolonový systém se skládal z předkolony následované analytickou kolonou C18 150 x 3,9 mm ID (Technopak 10 C18 HPLC Technology, Wellington House, Cheshire, Velká Británie). Mobilní fáze byla směs acetonitril/voda (35/65) a průtok byl 1,2 ml/min. Pro in-line detekci radioaktivních metabolitů byl eluent z HPLC kolony kontinuálně smíchán s kapalným scintilantem a pak monitorován in-line detektorem radioaktivity.

27.09.01

Měření estrogenní a antiestrogenní aktivity v buněčných kulturách MCF-7

Konzervy kultury buněčné linie MCF-7 (buňky rakoviny prsu u lidí) byly kultivovány na RPMI mediu bez fenolové červeně, obohaceném 5 % FCS, 100 jednotka/ml penicilinu a 100 μg/ml streptomycinu, 10 μg/ml inzulinu, a 1 nM 17β-estradiolu v kultivačních lahvích T-75. Medium bylo vyměňováno za čerstvé třikrát týdně. Konzervy kultury byly sklizeny trypsinizací a suspendovány v 10 ml roztoku EDTA bez fenolové červeni a centrifugovány 5 min při 800 ot./min. Buněčná peleta byla opatrně resuspendována v RPMI mediu obohaceném 5 % FCS s stripovaným dextranovým uhlím (dcFCS) a naočkována na 6 misek s jamkami, 50 000 buněk/3,0 ml media/jamka. Druhý den kultivace bylo medium vyměněno a byly přidány testované sloučeniny. Lignanové sloučeniny byly pro test estrogenicity naředěny ethanolem a přidány k buněčným kulturám o konečné koncentraci 1,0 M. U každého proliferačního testu byl použit 1,0nM roztok 17β-estradiolu v ethanolu jako pozitivní kontrola estrogenní odezvy. Stejná množství ethanolu byla přidána do kontrolních jamek. Pro test antiestrogenicity byly k buněčným kulturám přidány roztoky 17β-estradiolu i lignanu. Buňky byly kultivovány 5 až 7 dní v přítomnosti testovaných sloučenin a medium bylo měněno každý druhý den. Buněčná proliferace byla kvantifikována spočítáním uvolněných jader Coulterovým sčítačem.

Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity uterotropickým testem nedospělých krys

Estrogenicita HMR byla vyhodnocena uterotropickým biotestem u nedospělých krys, který byl realizován jak bylo uvedeno dříve (Jordan a kol., 1977), s výjimkou doby trvání, která byla 7 dní místo 3 dnů uváděných v odkazované studii. Doba trvání byla delší kvůli očekávané slabé estrogenicitě testované sloučeniny. Působení inhibitoru aromatázy (MPV-2213ad) na nedospělé krysy, který zabraňuje biosyntéze estradiolu, bylo použito jako metodologická kontrola pro dělohu, která nebyla stimulována estrogenem.

Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity u dospělých samců krys

Estrogenní (antiandrogenní) resp. antiestrogenní účinky HMR byly zkoumány na nedotčeném resp. hypoandrogenním Noblově kmenu samců krys (stáří 6 až 9 měsíců). Chronický hypoandrogenní stav se strukturními i funkčními změnami na

27.09.01

samčím reprodukčním traktu byl indukován neonatální estrogenizací (diethylstilbestrol, 10,0 μg/kg tělesné váhy v řepkovém oleji s.c. v prvním až pátém postnatálním dni). O těchto změnách se ví, že jsou částečně vratné působením inhibitoru aromatázy při denní dávce MPV-2213ad 10 až 30 mg/kg tělesné váhy (Streng a kol. – nepublikovaná pozorování).

Zvířata byla krmena základní stravou bez obsahu sóji (SDS, Whitham Essex, Anglie) a měla volný přístup k vodě. Dvanáct zvířat z nedotčené a dvanáct z hypoandrogenní skupiny bylo krmeno denní dávkou HMR 50 mg/kg tělesné váhy v řepkovém oleji. Druhých dvanáct zvířat z obou modelových skupin dostávalo řepkový olej jako placebo. Po čtyřech týdnech podávání byla zvířata utracena. Byly zjištěny hmotnosti varlat a přídatných pohlavních žláz (ventrální prostata, semenné váčky a koagulující žláza). Imunotesty byly zjištěny hladiny testosteronu v séru a ve varlatech a luteinizačního hormonu (LH) v hypofýze a séru (Haavisto a kol., 1993).

Zkoumání protinádorové aktivity na modelu rakoviny prsní žlázy u krys indukované DMBA

Protinádorová aktivita HMR u rakoviny prsní žlázy u krys byla studována jak bylo popsáno dříve (Kangas a kol., 1986). 50 dní starým samicím Sprague-Dawleovy krysy bylo podáváno 12,0 mg DMBA (dimethylbenz[a]anthracen). Po přibližně 6 týdnech bylo možno zaznamenat zjevné nádory, a potom byla jednou týdně měřena šířka (w) a délka (l) nádorů, aby mohly být stanoveny objemy nádorů podle vztahu $V = (\pi.w^2.l)/12$. Krysy byly také jednou týdně váženy. Krysy byly rozděleny do tří různých skupin tak, aby celkový počet nádorů na začátku experimentu byl podobný v každé skupině: (1) 8 zvířat – kontrolní skupina, (2) 7 zvířat - 3,0 mg/kg HMR, (3) 7 zvířat - 15,0 mg/kg HMR, z nichž muselo být jedno zvíře utraceno před skončením experimentu.

HMR byl podáván per os (ústy) a podávání začalo 9 týdnů po indukci DMBA, tj. 3 týdny poté, co se objevily nádory, a byl podáván denně po dobu 7,5 týdne. Na konci experimentu byly nádory klasifikovány podle způsobu jejich růstu do skupin: 1. Rostoucí tumory (PD - progresivní onemocnění), 2. Nerostoucí, stabilizované nádory (SD – stabilizované onemocnění, žádné změny objemu tumorů nebo regrese (ústup) menší než 75 %), 3. Regresivní (ustupující) nádory (PR – částečná odpověď, regrese

27.09.01

objemu nádoru větší než 75 %), 4. Zmizelé nádory (CR – úplná odpověď, žádný zjevný nádor).

Analýza metabolitů v moči krys po různých dávkách HMR

Ke zkoumání metabolismu HMR in vivo bylo použito deset samců Sprague-Dawleových krys (stáří 4 měsíce). Během studie byla zvířata chována v párech s 12hodinovým cyklem světlo-tma, měla volný přístup k vodě a základní stravu bez obsahu sóji (SDS, Whitham Essex, Anglie).

Krysám byl podáván HMR rozpuštěný v 10 % ethanolu v PEG, v dávkách 3, 15, 25 a 50 mg/kg tělesné váhy jednou denně po dva dny. Po druhé dávce byl sebrán 24hodinový vzorek moči do metabolických košů ve sběrných nádobách, které obsahovaly 120 µl 0,56 M kyseliny askorbové a 120 µl 0,15 M azidu sodného jako konzervační činidla. Byly zjištěny objemy odstředěné moči a vzorky byly uskladněny při –20 °C. Jako předpříprava bylo do 3,0 ml rozmraženého vzorku přidáno 750 µl 0,2 M acetátového pufru. (pH = 4,0 ± 0,1). Pro extrakci moči byly použity kolony Sep-Pak C18 (100 mg pryskyřice na bázi silikagelu/kolonu). Kolony byly předpřipraveny 3,0 ml H_2O, 3,0 ml methanolu a 3,0 ml acetátového pufru. Poté, co byla moč přefiltrována přes kolonu a vymyta 3,0 ml acetátového pufru, byly eluovány polyfenoly s 3,0 ml methanolu. Eluát byl odpařen do sucha pod dusíkem na vodní lázni při +45 °C a vysušené zbytky byly znovu rozpuštěny ve 3,0 ml 0,2 M acetátového pufru. Bylo přidáno 30 µl směsi enzymů Helix pomatia a roztoky byly inkubovány při 37 °C, aby došlo k hydrolýze glukuronidů i sulfátů. Do hydrolyzovaných vzorků bylo přidáno 300 µl stálého roztoku flavonů (100 µg/ml v ethanolu). Vzorky byly extrahovány na kolonách C-18 a odpařeny do sucha výše uvedeným způsobem, a pak uloženy při –20°C až do analýzy GC-MS.

Odpařené vzorky moči byly rozpuštěny v pyridinu a silylovány přídavkem silylačního činidla BSTFA:TMCS (10:1). Analýza GC-MS silylovaných vzorků byla provedena na přístroji GC-MS HP 6890-5973. Kolona pro plynovou chromatografii byla HP-1 se zesítěným methylpolysiloxanem (15 m x 0,25 mm i.d., tloušťka filmu 0,25 µm). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 1 ml/min. GC pec byla naprogramována od 60 °C do 290 °C, se zahříváním 8 °C /min. GC injektor byl

27.09.01

v režimu split (děličový) se split poměrem 1:15. Teplota injektoru byla 250 °C. Sloučeniny byly identifikovány na základě hmotnostního spektra. Kvantitativní vyhodnocení bylo založeno na nekorigovaných plochách píků cílových sloučenin v porovnání s vnitřním standardem.

VÝSLEDKY

Posouzení antioxidační kapacity in vitro

HMR má silnější peroxidační kapacitu lipidů než jakýkoli jiný lignan nebo flavonoid z našich testů (tabulka 2). HMR byl porovnáván s dobře známým antioxidantem TROLOX, což je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E, a dále s BHA a BHT, a to ve schopnosti inhibovat peroxidaci lipidu, inhibovat oxidaci LDL a pohlcovat hyperoxidové a peroxylové radikály (tabulka 3). HMR byl celkově nejsilnější antioxidant, účinnější než BHA nebo BHT ve všech testech, a silnější než TROLOX ve všech testech kromě testu na inhibici peroxidace lipidů, kde tyto sloučeniny byly téměř stejně účinné.

Kapacita inhibice aromatázy v buňkách JEG-3

Inhibice tvorby ^{3}H-17β-estradiolu z ^{3}H-androstendionu v buňkách JEG-3 byla testována při různých koncentracích HMR. Inhibiční kapacita HMR byla porovnávána s enterolaktonem, 7-hydroxyenterolaktonem a enterodiolem. Enterolakton způsobil na dávce závislou inhibici aromatizace v rozmezí koncentrací od 1,0 do 10,0 μM. Dále se ukázalo, že enterodiol byl neinhibiční, což ukazuje, že laktonový kruh je pro inhibici kritický. 7-hydroxyenterolakton a hydroxymatairesinol nevykazovaly žádný inhibiční účinek (obrázek 1), což ukazuje důležitost počtu a umístění hydroxylových skupin v molekule lignanu pro inhibici aromatázy.

Estogenní a antiestrogenní aktivita v kulturách buněk MCF-7

HMR měl velmi slabou, statisticky nevýznamnou estrogenní nebo antiestrogenní aktivitu při testech proliferace buněk MCF-7, jak ukazuje obrázek 2.

27.09.01

Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity při uterotropickém testu nedospělých krys

Obrázek 3 ilustruje účinky HMR na růst dělohy nedospělých krys. HMR neměl žádný významný estrogenní účinek na přírůstek hmotnosti dělohy nedospělých krys. HMR ani nesnižoval přírustky hmotnosti, což ukazuje na nulový antiestrogenní účinek. Inhibitor aromatázy zabránil růstu hmotnosti dělohy podle očekávání, což ukazuje, že metoda měření inhibitorů aromatázy byla adekvátní.

Hodnocení estrogenní a antiestrogenní aktivity u dospělých samců krys

Po čtyřtýdenním působení HMR nebyly u kontrolních a hypoandrogenních zvířat pozorovány žádné významné změny hmotnosti přídatných pohlavních žláz a varlat (tabulka 4). Nebyly ani významné změny koncentrací testosteronu nebo LH (tabulka 5). Tyto výsledky ukazují, že HMR není v samčím organismu úplný estrogenní antagonista, protože nevykazuje typickou estrogenní aktivitu na ose hypotalamus – hypofýza – gonáda (inhibice LH a sekrece androgenu). HMR není ani antiestrogen, protože nevrací změny indukované neonatální estrogenizací u samců krys.

Zkoumání protinádorové aktivity na modelu rakoviny prsní žlázy indukované DMBA u krys

Počet rostoucích (PD) nádorů versus počet stabilizovaných (SD), regresivních (PR) a zmizelých (CR) nádorů je na obrázku 4. Protinádorový účinek HMR byl shledán statisticky velmi významným. Na tomto modelu nebyla žádná jasná závislost protinádorového účinku na dávce. Antioxidační růst i růst nádoru potlačující vlastnosti HMR mohou tedy souviset s protinádorovou aktivitou in vivo. Mechanismus protinádorové aktivity HMR in vivo je dosud neznámý.

Analýza metabolitů z moči krys po různých dávkách HMR

Obrázek 5 ilustruje, že hlavním vylučovaným metabolitem HMR u krys je enterolakton, který může být onou biologicky aktivní sloučeninou. Je to překvapující, když se vezme v úvahu chemická struktura HMR, protože by se dalo očekávat, že hlavním metabolitem bude hydroxyenterolakton. Přeměna HMR na enterolakton může být katalyzována spíše střevní mikroflórou než játry krys.

27.09.01

ZÁVĚRY

Hydroxymatairesinol (HMR) má na modelu rakoviny prsu indukované DMBA protinádorové účinky buď jako nezměněná sloučenina a/nebo po přeměně na enterolakton. HMR by tedy mohl mít potenciálně prospěšné účinky na lidi ohrožené rozvíjející se rakovinou prsu (BC), prostaty (PC), nebo tlustého střeva nebo benigní prostatickou hyperplazií (BPH). HMR je metabolizován na enterolakton, který inhibuje aromatizaci in vitro. HMR může jako prekurzor inhibitoru aromatázy také zabránit rozvoji symptomů dolních močových cest (LUTS), nestability močového měchýře, ucpání výtoku močového měchýře, uretrální dyssynergie a gynekomastie. HMR má také silnou antioxidační aktivitu a může proto být použit jako přísada do potravin (antioxidant). HMR jako farmaceutický přípravek nebo potravinový doplněk může mít prospěšné kardiovaskulární účinky u lidí. Přidávání HMR do potravin za účelem vytvořit nové funkční jídlo, doplňkovou výživu, zdravou výživu, farmaceutický potravinový přípravek, potravinové vzorky nebo nové jídlo je možné.

Bude oceněno, že metody tohoto vynálezu mají mnoho jiných použití, z nichž jen několik je zde uvedeno. Specialistům v oboru bude zřejmé, že existují další použití a neodchylují se od ducha vynálezu. Popsaná použití jsou tedy ilustrativní a neměla by být chápána jako omezující.

27.09.01

Tabulka 1:

Produkce savčích lignanů z různých rostlinných potravin fermentací *in vitro* pomocí lidské střevní flóry

	µg/100 g
MOUKA ZE LNĚNÉHO SEMÍNKA	68 000
SÓJOVÉ BOBY	170
OBILNÉ OTRUBY:	
PŠENICE	570
OVES	650
CELÉ OBILOVINY:	
ŽITO	160
BRAMBORA	80
MRKEV	350
CIBULE	110

[1]Thompson a kol.: Nutrition and Cancer, 1991, 16:43-52

27.09.01

Tabulka 2:

ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI LIGNANŮ A NĚKTERÝCH PŘÍBUZNÝCH FLAVONOIDŮ *IN VITRO* ZJIŠŤOVANÉ TESTEM INHIBICE PEROXIDACE LIPIDŮ

Sloučenina	Antioxidační kapacita (t-BuOOH-LP) koncentrace IC_{50} (μM)
Flavonoidy	
kaempferol (3,4´,5,7-tetrahydroxyflavon)	0,9
kvercetin (3,3´,4´,5,7-pentahydroxyflavon)	0,4
kaempferid (3,5,7-trihydroxy-4´-methoxyflavon)	0,5
Lignany	
enterolakton 2,3-bis-(3´-hydroxybenzyl)butyrolakton	15,9
enterodiol 2,3-bis-(3´-hydroxybenzyl)-butan-1,4-diol	12,7
hydroxymatairesinol	0,08

27.09.01

Tabulka 3:

POROVNÁNÍ ANTIOXIDAČNÍCH ÚČINKŮ HMR A ZNÁMÝCH ANTIOXIDANTŮ IN VITRO. Jsou uvedeny koncentrace IC 50, kromě testu pohlcování peroxylových radikálů, kde je uveden stechiometrický faktor (tzn. kolik molů peroxylových radikálů může pohltit jeden mol testované sloučeniny).

	HMR[1]	TROLOX[2]	BHA[3]	BHT[4]
Inhibice peroxidace lipidů	0,06 μM	0,02 μM	1,1 μM	15,3 μM
Inhibice oxidace LDL	2,0 μM	2,7 μM	nestanoveno	
Pohlcování hyperoxidových aniontů	5,6 μM	25 μM	15 μM	> 1 mM
Pohlcování peroxylových radikálů	1:4	1:2	nestanoveno	

[1] hydroxymatairesinol

[2] derivát vitamínu E rozpustný ve vodě

[3] butylovaný hydroxyanizol (syntetický antioxidant)

[4] butylovaný hydroxytoluen (syntetický antioxidant)

Metody stanovení byly popsány v textu.

27.09.01

Tabulka 4:

Účinek čtyřtýdenní expozice HMR na relativní hmotnosti reprodukčních orgánů samců krys [1]

	Podáváno	n	Tělesná hmotnost	Varlata	Ventrální prostata	Semenný váček	Koagulační žláza
			g	mg/kg tělesné hmotnosti			
Nedotčená zvířata	Placebo	12	426 ± 28	4362 ± 170	909 ± 146	412 ± 43	223 ± 49
	HMR (50 mg/kg)	12	447 ± 38	4223 ± 304	938 ± 148	419 ± 59	204 ± 48
Hypoandrogenní zvířata	Placebo	12	481 ± 29	3340 ± 509	333 ± 188	249 ± 63	69 ± 49
	HMR (50 mg/kg)	12	455 ± 36	3276 ± 327	378 ± 198	266 ± 49	70 ± 30

[1] Data jsou vyjádřena jako půměr ± směrodatná odchylka (mg/kg tělesné hmotnosti). Relativní hmotnosti po podávání HMR nejsou významně odlišné od hmotností po podávání placeba v obou skupinách.

Tabulka 5:

Účinek čtyřtýdenní expozice HMR na koncentrace testosteronu a LH u samců krys[1]

	Podáváno	n	Testosteron ve varlatech (ng/varle)	Testosteron v séru (ng/ml)	LH v hypofýze (μg/jamku)	LH v séru (ng/ml)
Nedotčená zvířata	Placebo	12	97,6 ± 46,3	2,405 ± 1,122	6,747 ± 2,479	1,804 ± 1,294
	50 mg/kg HMR	12	112,9 ± 58,5	2,770 ± 1,421	6,838 ± 2,061	1,088 ± 0,352
Hypoandrogenní zvířata	Placebo	12	63,5 ± 25,9	1,197 ± 0,663	8,673 ± 2,224	0,712 ± 0,371
	50 mg/kg HMR	12	48,0 ± 15,2	0,939 ± 0,431	7,530 ± 2,286	0,854 ± 0,333

[1] Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Koncentrace hormonů po podávání HMR nejsou významně odlišné od koncentrací po podávání placeba v obou skupinách.

27.09.01

ODKAZY:

Adlercreutz H, Bannwart C, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ Kellis JT, and Vickery LE: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol, 44:147-153,1993.

Ahotupa M, Ruutu M, and Mäntylä E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. Clin Biochem, 29:139-144,1996.

Ahotupa M, Mäntylä E, and Kangas L: Antioxidant properties of the triphenylethylene antiestrogen drug toremifene. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 356: 297-302,1997.

Axelson M and Setchell KDR: The excretion of lignans in rats - evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. FEBS lett,123: 337-342, 1981.

Axelson M, Sjövall J, Gustafsson BE and Setchell KDR: Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. Nature, 298: 659-660,1982.

Ayres D, and Loike, J. Lignans: Chemical, biological and clinical properties. Cambridge university press,1990.

Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, Rösler A, Shmueli A, Tanos V and Schenker JG: Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. Menopause (The Journai of the North American Menopause Society), 4: 89-94,1997.

Ekman R; Analysis of lignans in Norway spruce by combined gas chromatography-mass spectrometry. Holzforschung, 30:79-85,1976.

Ekman R: Distribution of lignans in Norway spruce. Acta Academiae Aboensis, Ser B, 39:1-6,1979.

Evans BA, Griffiths K and Morton MS. Inhibition of 5α-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. J Endocrinol,147: 295-302,1995.

Haavisto A-M, Petterson K, Bergendahl M, Perheentupa A, Roser JF, and Huhtaniemi I A. Supersensitive immunofluorometric assay for rat luteinizing hormone. Endocrinology,132:1687-1691,1993.

Hultén K, Adlercreutz H, Winkvist A, Lenner P, Hallmans G and Ågren Å. Low levels of phyto-estrogens in blood as risk factor for breast cancer. In: COST 916 Workshop `Phyto-oestrogens: exposure, bioavailability, health benefits and safety concerns',1998

Ingram D, Sanders K. Kolybaba M and Lopez D. Case-control stady of phyto-oestrogens and breast cancer. Lancet, Oct 4;350(9083): 990-994,1997.

Jenab M and Thompson LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity. Carcinogenesis, Jun; 17(6):1343-1348, 1996

Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G: A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antiestrogenic activity. J Endocrinol, 75: 305-316,1977.

Kangas L, Nieminen A-L, Blanco G, Grönroos M, Kallio S, Karjalainen A, Perilä M, Södervall M and Toivola R: A new triphenylethylene compound, Fc-1157a II Antitumor effects. Cancer Chemother Pharmacol,17:109-113,1986.

Lampe JW, Martini MC, Kurzer MS, Adlercreutz H and Slavin JL: Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. Am J Clin Nutr, 60:122-8,1994.

Landstrom M, Zhang JX, Hallmans G, Aman P, Bergh A, Damber JE, Mazur W , Wähälä K and Adlercreutz H. Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostateadenocarcinoma in rats. Prostate, Aug 1;

27.09.01

36(3):151-161,1998

Mousavi Y and Adlercreutz H: Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. J Steroid Biochem Mol Biol, 41: 615-619,1992.

Mattinen J, Sjöholm R and Ekman R. NMR-spectroscopic study of hydroxymatairesinol, the major lignan in Norway spruce (Picea abies) heartwood. ACH models in chemistry, I35(4):583-590,1998.

Mäkelä S, Poutanen M, Lehtimäki J, Kostian M-L, Santti R and Vihko R. Estrogen-specific 17β-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C.1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. P.S.E.B.M., 208:51-59, 1995.

Phipps WR, Martini MC, Lampe JW, Slavin JL and Kurzer MS. Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab, 77(5):1215-1219,1993.

Rickard SE, Orcheson LJ, Seidl MM, Luyengi L, Fong HHS and Thompson LU: Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. J Nutr,126: 2012-2019, 1996.

Shultz TD, Bonorden WR and Seaman WR. Effeet of short-time flaxseed consumption on lignan and sex hormone metabolism in men. Nutrition Research, 11:1089-110,1991. .

Serraino M and Thompson LU: The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. Cancer Letters, 60:135-142,1991.

Serraino M and Thompson LU: The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. Nutr Cancer,17:153-159,1992.

Setchell KDR, Borriello SP, Gordon H, Lawson AM, Harkness R and Morgan DML.

Lignan formation in man - microbial involvement and possible roles in relation to cancer. Lancet, 4:4-7,1981

Streng T, Talo A and Santti R. Unpublished observations.

Thompson LU, Robb P, Serraino M and Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. Nutr Cancer,16: 43-52,1991

Thompson LU, Seidl, MM, Rickard SE, Orcheson, LJ, and Fong HHS: A.ntitumorigenic effect of a mammalian litt precursors from flaxseed. Nutr Cancer 26:159-165, 1996a.

Thompson LU, R.ickard SE, Orcheson LJ and Seidl MM: Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. Carcinogenesis, 17:1373-1376,1996b.

Tou JCL, Chen J and Thompson U. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. J Nutr,128:1861-1868,1998.

Wang C, Mäkelä T, Hase T, Adlercreutz H and Kurzer MS: Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human adipocytes. J Steroid Biochem Molec Biol, 50: 205-212,1994.

Waters AP and Knowler JT. Effect of a lignan (HPMF) on RNA synthesis in the rat uterus. J Reprod. Fert, 66:379-381,1982.

Zhang J-X, Hallmans G, Landström M, Bergh A, Damber J-E, Åman P and Adlercreutz H. soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. Cancer Letters,114: 313-314,1997.

27.09.01
PV 2001-3486
71614

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob prevence rakoviny, některých nerakovinných, na hormonech závislých onemocnění a/nebo kardiovaskulárního onemocnění u lidí, zahrnující podávání účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru příslušné osobě.

2. Způsob podle nároku 1, kde rakovinné onemocnění je ze skupiny zahrnující rakovinu prsu, rakovinu prostaty a rakovinu tlustého střeva.

3. Způsob podle nároku 1, kde nerakovinné, na hormonech závislé onemocnění je ze skupiny zahrnující symptomy dolních močových cest, uretrální dyssynergii, nestabilitu močového měchýře, ucpání výtoku močového měchýře, benigní prostatickou hyperplazii a gynekomastii u mužů.

4. Způsob podle nároku 1, kde kardiovaskulární onemocnění je způsobeno oxidovaným LDL v séru.

5. Způsob zvýšení hladiny enterolaktonu nebo jiného metabolitu hydroxymatairesinolu v lidském séru, čímž je způsobena prevence rakovinných nebo některých nerakovinných, na hormonech závislých onemocnění u lidí, zahrnující podávání účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru příslušné osobě.

6. Způsob podle nároku 5, kde rakovinné onemocnění je ze skupiny zahrnující rakovinu prsu, rakovinu prostaty a rakovinu tlustého střeva.

7. Způsob podle nároku 5, kde nerakovinné, na hormonech závislé onemocnění je ze skupiny zahrnující symptomy dolních močových cest, uretrální dyssynergii, benigní prostatickou hyperplazii a gynekomastii u mužů.

8. Farmaceutický přípravek obsahující účinné množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem.

27.09.01

9. Produkt obsahující kapalný nebo pevný materiál obohacený hydroxymatairesinolem nebo jeho geometrickým izomerem nebo jeho stereoizomerem, určený k použití jako přísada do potravinového produktu.

10. Produkt podle nároku 9, kde potravinový produkt je ze skupiny zahrnující funkční potravinu, nutriční doplněk, živiny, farmaceutický potravinový přípravek, doplňkovou výživu, zdravou výživu, potravinový vzorek nebo jakýkoli potravinový produkt.

11. Produkt podle nároku 9, kde potravinový produkt je funkční potravina ve formě másla, margarínu, sušenek, chleba, sladkého pečiva, bonbónů, cukrovinek, jogurtu nebo jiného fermentovaného mléčného výrobku, nebo cereálií jako je müsli.

12. Potravinový produkt obsahující účinné množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru.

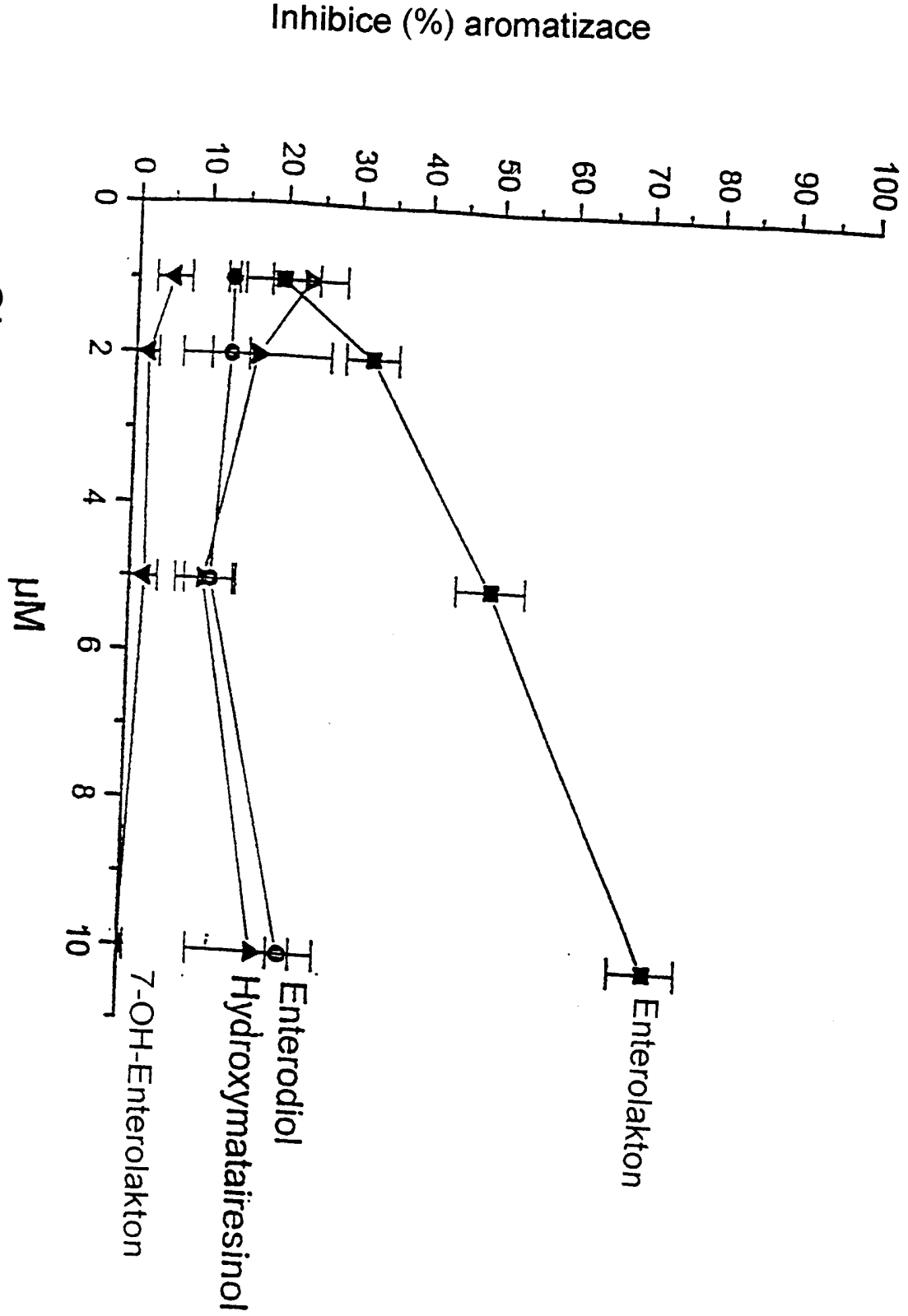
13. Potravinový produkt podle nároku 12, kde potravinový produkt je ze skupiny zahrnující funkční potravinu, nutriční doplněk, živiny, farmaceutický potravinový přípravek, doplňkovou výživu, zdravou výživu, potravinový vzorek nebo jakýkoli potravinový produkt.

14. Potravinový produkt podle nároku 13, kde potravinový produkt je funkční potravina ve formě másla, margarínu, sušenek, chleba, sladkého pečiva, bonbónů, cukrovinek, jogurtu nebo jiného fermentovaného mléčného výrobku, nebo cereálií jako je müsli.

15. Způsob zvýšení stability potravinového produktu zahrnující přidání účinného množství hydroxymatairesinolu nebo jeho geometrického izomeru nebo jeho stereoizomeru do potravinového produktu.

16. Způsob podle nároku 15, kde zvýšení stability potravin zahrnuje inhibici oxidace lipidů, vitamínů a pigmentů, která způsobuje ztrátu nutriční hodnoty a vznik cizích pachových látek v potravinách.

27.09.01
PV 2001-3486
31614



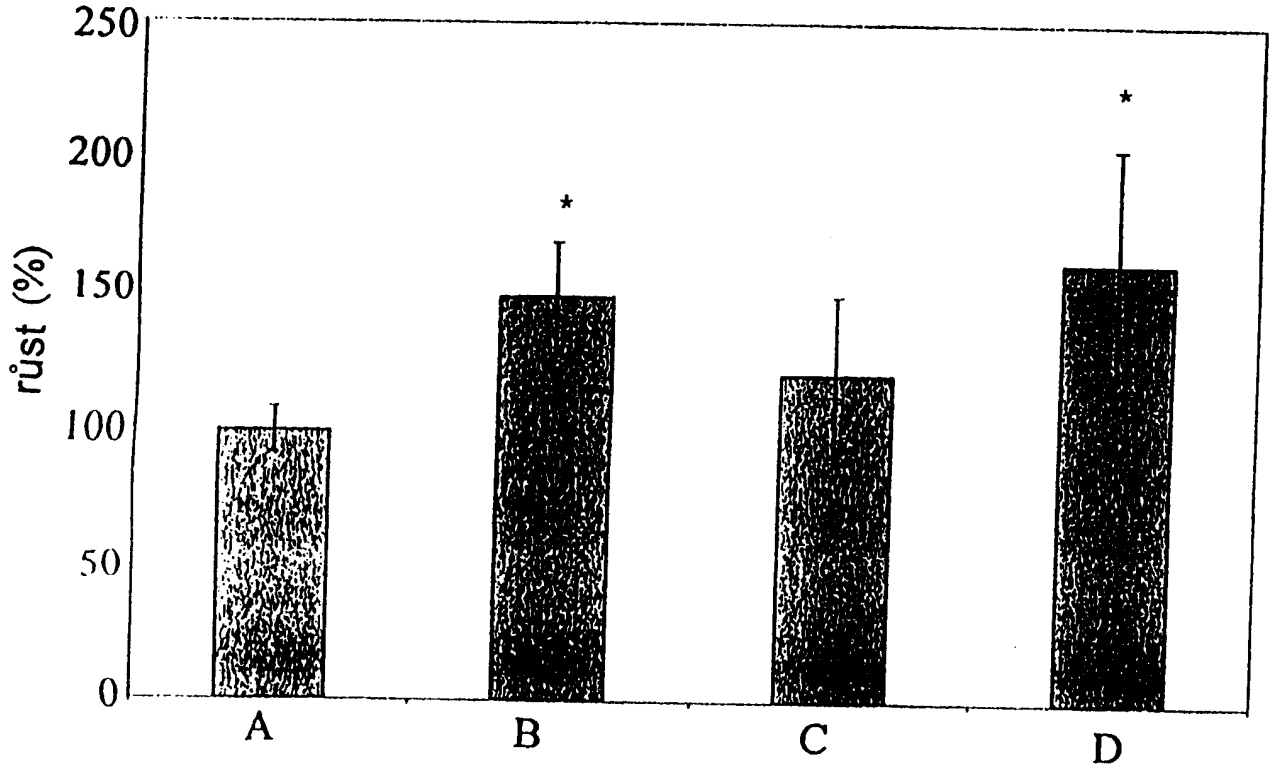
Obr. 1

27.09.01
PV 2001-3488
71814

Estrogenní a antiestrogenní aktivita HMR v buňkách MCF-7. Proliferace buněk kontrolního vzorku je nastavena na 100 %.
Počet experimentů n = 3-4.

*Významně se lišící od kontrolního vzorku

A = kontrolní vzorek
(nosič bez hormonů)
B = nosič + estradiol 10^{-9}M
C = nosič + HMR 10^{-6}M
D = nosič + HMR 10^{-6}M + estradiol 10^{-9}M

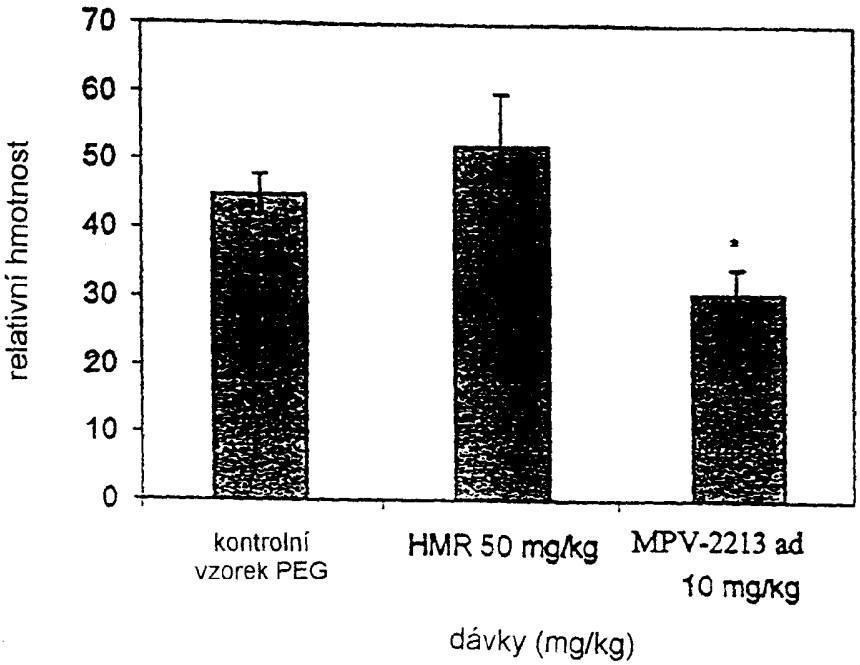


Obr. 2

27.09.01
PV 2001-3488
31614

Relativní hmotnost dělohy (mg/kg tělesné hmotnosti) nedospělých krys ošetřených HMR nebo MPV-2213ad.

*Významně se lišící od kontrolního vzorku

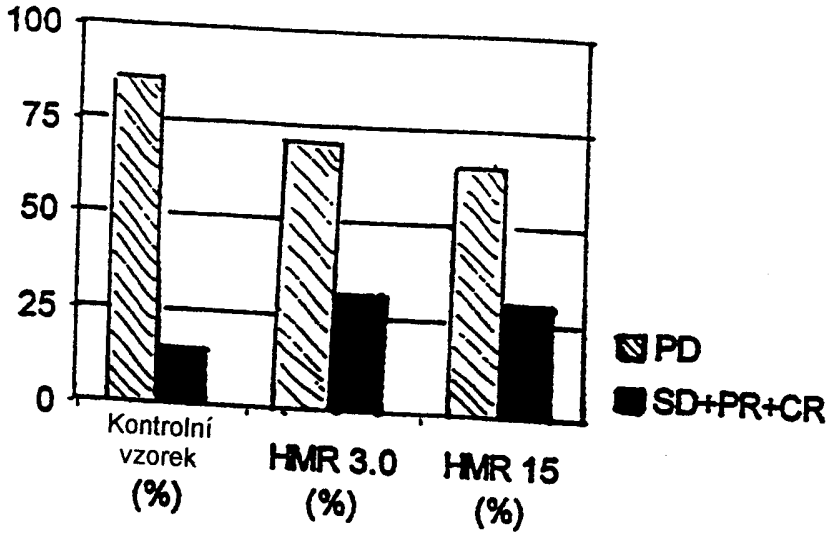


Obr. 3

27.09.01

PV 2001-3486

~~71614~~

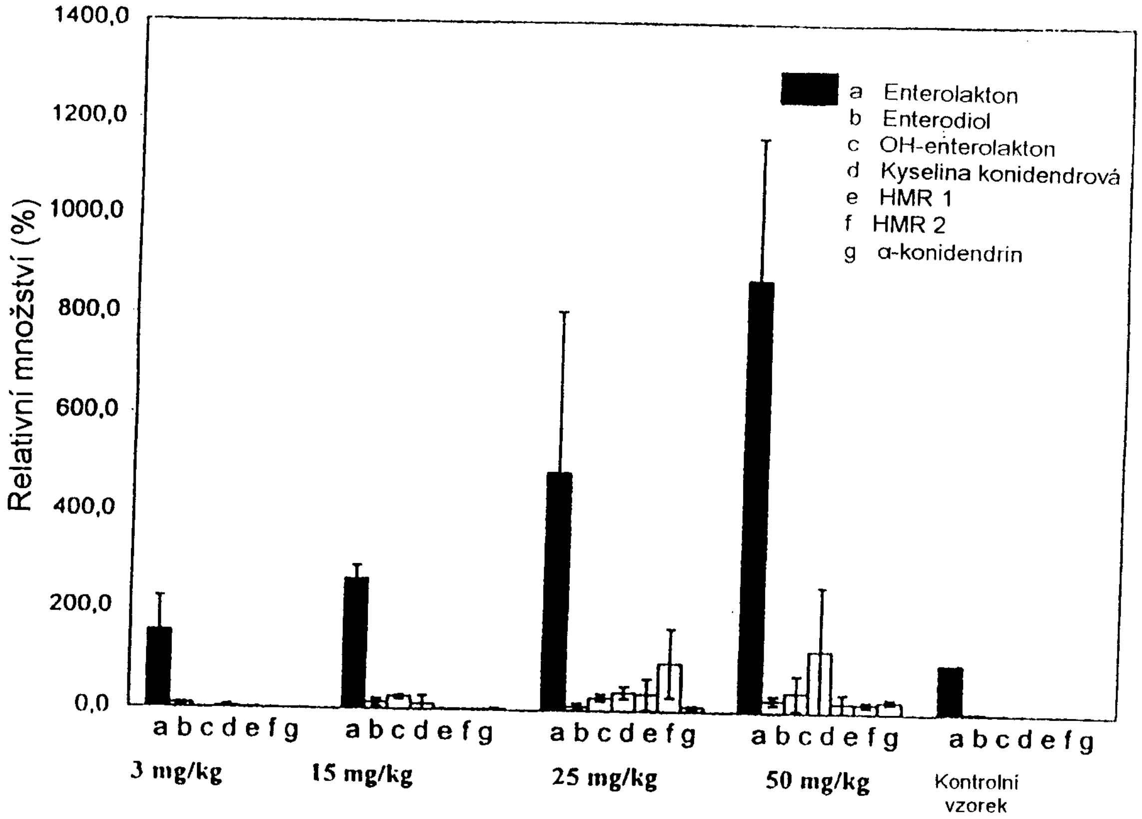


Obr. 4

27.09.01
PV 2001-3486
71614

Lignany z moči po různých dávkách HMR[1]

[1]Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr s vyznačenou úsečkou směrodatné odchylky
Počet zvířat na ošetřenou skupinu n = 2, kromě kontrolního vzorku, kde n = 1.



Obr. 5