

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) **BG**

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) **65380 B1**
(51) Int.Cl.

A 61 K 31/341 (2006.01)
A 23 L 1/30 (2006.01)
A 23 L 3/00 (2006.01)
A 61 K 31/365 (2006.01)
A 61 P 1/00 (2006.01)
A 61 P 5/00 (2006.01)
A 61 P 13/02 (2006.01)
A 61 P 13/08 (2006.01)
A 61 P 13/10 (2006.01)
A 61 P 15/00 (2006.01)
A 61 P 25/00 (2006.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)
A 61 P 39/06 (2006.01)
C 07 D 307/33 (2006.01)

- (21) Заявителски № 105856
(22) Заявено на 30.08.2001
(24) Начало на действие
на патента от: 09.03.2000

Приоритетни данни

(31) 09/281,094 (32) 30.03.1999 (33) US

- (41) Публикувана заявка в
бюлетин № 4 на 30.04.2002
(45) Отпечатано на 30.05.2008
(46) Публикувано в бюлетин № 5
на 30.05.2008
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от заяв. №

(73) Патентоприитежател(и):
HORMOS MEDICAL LTD., FI-20520
TURKU, ITAEINEN PITKAEKATU 4B (FI)

(72) Изобретател(и):
Markku Ahotupa
Christer Eckerman
FIN-20540 Turku
Lauri Kangas
FIN-21420 Lieto
Sari Maekelae
FIN-20740 Turku
Niina Saarinen
FIN-21160 Merimasku
Risto Santti
FIN-21100 Naantali
Anni Waerri
FIN-21420 Lieto (FI)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/FI2000/000181, 09.03.2000

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO2000/059946, 12.10.2000

(54) ИЗПОЛЗВАНЕ НА ХИДРОКСИМАТЕРЕЗИНОЛ ЗА ПРОФИЛАКТИКА НА РАК

BG 65380 B1

(57) Изобретението се отнася до използване в хуманната медицина на хидроксиматерезинол за предотвратяване появата на ракови заболявания, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания. В резултат се повишава нивото на ентеролактон или на друг метаболит на хидроксиматерезинола в серума на човек, като по този начин се предотвратяват ракови заболявания, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания при хората, основаващи се на прилагане на хидроксиматерезинол. Изобретението се отнася също до фармацевтични препарати, хранителни добавки и хранителни продукти, съдържащи хидроксиматерезинол.

19 претенции, 5 фигури

(54) ИЗПОЛЗВАНЕ НА ХИДРОКСИМАТЕРЕЗИНОЛ ЗА ПРОФИЛАКТИКА НА РАК

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до използване на хидроксиматерезинол за профилактика на ракови заболявания, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания при хората. В резултат на това използване се постига повишаване нивото на ентеролактон или на друг метаболит на хидроксиматерезинола в серума на човек, като по този начин се причинява предпазване от ракови заболявания, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания при хората, основаващи се на прилагане на хидроксиматерезинол върху посочените хора. Настоящото изобретение се отнася, освен това, до фармацевтични препарати, хранителни добавки и хранителни продукти, съдържащи хидроксиматерезинол.

Предшестващо състояние на техниката

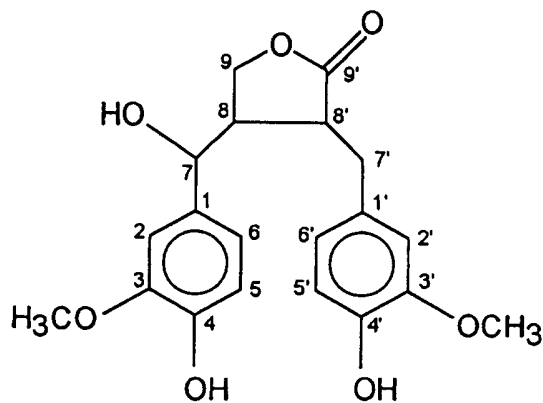
Публикациите и другите материали, използвани в настоящото изобретение, осветляват предшестващото състояние на техниката, и по-специално, се използва случая да се предоставят допълнителни детайли по отношение на практиката, и са включени като литература.

Лигнаните са дефинирани като клас фенолни съединения, притежаващи 2,3-дибензилбутанов скелет. Те се образуват чрез съединяване на мономерните единици, наречени предшественици, като канелена киселина, кофеинова, ферулова, кумарова и галиева киселини (Ayres and Loike, 1990). Лигнаните са широко разпространени сред растенията. Те могат да бъдат намерени в различни части (корени, листа, стебло, семена, плодове), но предимно в малки количества. При много източници (семена, плодове), лигнаните се откриват като гликозидни конюгати, асоциирани с влакнестата съставка на растенията. Най-широко разпространените хранителни източници на предшественици на лигнани в бозайниците са нерафинираните продукти от семена. Най-високата концентрация в ядливите растения, която е била открита е при лененото семе, следвано от нерафинирани

продукти от семена, по-специално ръж. Продукцията на лигнани за бозайници от различни растителни храни са посочени в таблица 1.

Значителни количества лигнани се откриват, също така, в иглолистните дървета. Видът на лигнаните се различава при различните видове и количествата лигнани варира в различните части на дърветата. Типичните лигнани в дървесинната сърцевина на смърч (*Picea abies*) са хидроксиматерезинол (HMR), алфа-конидендрин, конидендринова киселина, матерезинол, изоларицирезинол, секоизоларицирезинол, лиовил, пицеарезинол, ларицирезинол и пинорезинол (Eckman 1979). Най-изобилстващата единична съставка на лигнаните при смърч е HMR, приблизително 60 % от всичките лигнани, който се среща предимно в неспрегната свободна форма. Концентрацията на лигнани в дебели корени е 2-3 %. Изобилие на лигнани се среща в сърцевината на клоните (5-10 %) и извивките и по-специално във възлите (чепове), където количеството лигнани може да надвишава 10 % (Eckman, 1976 и 1979). Тези концентрации са стократни, в сравнение с прах на смляно ленено семе, продукт известен като богат на лигнани.

Химичната структура на хидроксиматерезинола е



Лигнани могат да се изолират, например, от влакнини на пресована дървесина. Тези влакнини произхождат от пресована дървесина на стебла и възли (фракция от едри стърготини) влошаващи качеството на хартията (Eckman 1976).

Растителните лигнани, като матерезинол и секоизоларицирезинол се конвертират от микрофлората на червата в лигнани на бозайници, ентеролактон и етеродиол, съответно (Axelson

et al., 1982). Те претърпяват ентерохепатична циркулация и се отделят в урината като глюкуронови конюгати (Axelson and Setchell, 1981). Като експериментално доказателство за хемопревантивното действие на лигнаните, добавянето на храна, богата на мазнини с богато на лигнани брашно от семена на ленено семе (5% или 10%) или лигнани от ленено семе (секоизоларицирезинол-дигликозид, SDG) предпазва от развитието на чувствителен на антиестроген DMBA-индуциран рак на гърдата при плъх (Sarraino and Thompson 1991 и 1992; Thompson et al., 1996a and 1996b). Те намаляват пролиферацията на епителни клетки, ядрените аберации, растеж на тумори и развитието на нови тумори. Приемът на голямо количество лигнани може да предпазва, също така, и от експериментален рак на простатата и на дебелото черво. Използваната за храна ръж (съдържащ лигнани) предотвратява ранните етапи на растеж на трансплантирани Dunning R3327 простатични аденокарценоми при плъхове (Zhang et al., 1997; Landstrom et al., 1998). Процентът на животни, носещи палпиращи (напипващи) се тумори, обемът на тумора, и скоростта на нарастване са значително по-ниски. Допълнително добавяне на ленено семе или SDG инхибира образуването на аберантни крипти в дебелото черво на плъх (Sarraino and Thompson 1992; Jenab and Thompson 1996). Следователно, противотуморното действие може да се дължи на слаби естроген-антиестроген свойства и/или други механизми, които не са добре изяснени.

Изхвърлянето чрез урината и концентрациите в серума на ентеролактона са ниски при жена, диагностицирана с рак на гърдата (Ingram et al., 1997; Hulten et al., 1998), което подсказва, че лигнаните са хемопревантивни средства. Лигнаните на бозайниците (ентеролактон и ентеродиол) се предлагат хипотетично като модулатори на видовете рак, свързани с хормоните, като рака на гърдата, поради тяхната структурна подобност с естрогените. Ентеролактонът има слабо естрогенно действие в MCF-7 клетки (Mousavi and Adlercreutz 1992), но не притежава естрогенен отговор при обременяване на матка на мишка (Setchell et al., 1981). Като признак за естрогенподобна активност, храненето с SDG по време на бременност и кърмене на плъхове увеличава обременяването на матката при отбиване, но ефектът не е очевиден на по-къс-

ните етапи (Tou et al., 1998). Възможни противотуморни ефекти се свързват, също така, с техните антиестрогенни действия (Waters and Knowler, 1982). Инхибирането на ароматазата от животински лигнан, ентеролактон, би подсказало механизъм, чрез който консумирането на растителна храна, богата на лигнани, трябва да допринесе за намаляването на зависимите от естрогена заболявания, като рак на гърдата (Adlercreutz et al., 1993; Wang et al., 1994). Потенциалната антиоксидантна активност на лигнаните би могла да представлява също така, механизъм, асоцииран с предпазното действие на лигнаните при развитието на ракови заболявания. Освен това, лигнаните на бозайниците са показали, че инхибират преобразуването на тестостерона в 5 α -дихидротестостерон (DHT), силният вътреклетъчен андроген, при концентрации, които могат да бъдат постигнати при хората (Evans et al., 1995). Намаляването на концентрацията на DHT би модифицирало риска от рак на простатата (PC) и доброкачествена простатична хиперплазия (свърххрастване на тъканта) (BPH).

Възможно е лигнаните, като предшественик на ентеролактон, да облекчават симптомите на долния уринарен тракт (LUTS) и гинекомастия (развитие на гърди при мъже). На основата на резултатите, получени в животински модел, се предполага, че естрогените играят основна роля в развитието на мускулната дисфункция, включена към маточната диссинергия, разглеждана като диссинергия на шийката на пикочния мехур или псевдодиссинергия на сфинктера (Streng et al., непубликувани наблюдения). Такива невромускулни промени са обратими, поне частично, от инхибитор на ароматазата (MVP-22113ad), което показва ролята на естрогените. Освен това, гинекомастия, индуцирана от излагане на действието на естрогени или в присъствие на повишено отношение на естрогени към андрогени. Гинекомастията може да се третира успешно с инхибитор на ароматазата. Способността на лигнаните да инхибират 5 α -редуктазата и/или ароматазата, комбинирана с тяхното силно антиоксидантно действие, може да представлява механизми, асоциирани с предпазно действие на лигнаните при развитието на свързани с хормоните заболявания в организма на мъжа.

Не са известни данни за възможното дейс-

твие на лигнаните при хора. Настоящата теория за действието на лигнаните при хора произлиза от изследвания върху ефекта от храните с добавки на продукти от ленено семе (и съответно лигнани). Лененото семе при диети за жени причинява промяна в менструалния цикъл (Philipps et al., 1993). Субектите, всички жени с нормален цикъл, показват по-дълга, със средна дължина, лутеинизираща фаза и по-високо отношение на прогестерон/17бета-естрадиол в серума по време на лутеинизиращата фаза, когато са приели 10 g прах от ленено семе на ден, в добавка към техния нормален хранителен режим (Philipps et al., 1993). Не се откриват значителни разлики между групите с ленено семе и контролните цикли или концентрациите на естрон или на 17бета-естрадиол. Няма значителни разлики, също така, между ленено семе и контролните групи по отношение на концентрациите на серумните естрогени при жени след менопауза (Brzezinski et al., 1997). Добавянето на ленено семе увеличава концентрацията на SHBG (протеин, който свързва естрадиола при висок капацитет) в серума. Това е характерен ефект на естрогена в тъканта на черния дроб. Увеличената концентрация на SHBG, от друга страна, намалява биодостъпността на ендогенните естрогени. При здрави млади жени, краткотрайният (6 седмици) хранителен режим с добавка на ленено семе (10 g/d в кифла) няма значителен ефект върху концентрацията на тестостерон в плазмата (Shultz et al., 1991), което показва липса на естрогенност в организма на мъжа. Всички тези изследвания показват, че лигнаните могат да имат слаб хормонален ефект (естрогенен и антиестрогенен), но механизмът на тяхното действие не може напълно да бъде описан с хормонално действие.

В заключение, изолирани лигнани за зайници не са били по-рано на разположение в достатъчни количества, за да могат да се използват при животни или за клинични изпитания и единствената възможност да се увеличи приема на лигнани е била да се консумира растителна храна, богата на влакнини, като ленено семе. HMR или който и да е друг лигнан, който ефикасно се конвертира в ентеролактон и може да се продуцира/изолира в големи количества, би бил високо оценен при развитието на фармацевтични препарати и хранителни продукти, като функционални храни за хемопредпазване от рак и други

свързани с хормоните болести и сърдечносъдови заболявания.

Кратко описание на изобретението

Съгласно един аспект, настоящото изобретение се отнася до използване за профилактика на рак, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания при хората, включващ прилагане на посочения човек на ефективно количество хидроксиматерезинол или на негов геометричен изомер или стереоизомер.

Съгласно един друг аспект, настоящото изобретение се отнася до използване за увеличаване нивото на ентеролактон или на друг метаболит на хидроксиматерезинола в серума на човек, като по този начин причинява предпазване от рак, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания при човека, включващ прилагане върху посочения човек на ефективно количество хидроксиматерезинол или на негов геометричен изомер или стереоизомер.

Съгласно един трети аспект, настоящото изобретение се отнася до фармацевтичен състав, включващ ефективно количество хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер в комбинация с фармацевтично приемлив носител.

Съгласно един четвърти аспект, настоящото изобретение се отнася до продукт, съдържащ течен или твърд материал, обогатен с хидроксиматерезинол или с негов геометричен или стереоизомер, за използване като добавка към хранителни продукти.

Съгласно един пети аспект, настоящото изобретение се отнася до хранителен продукт, съдържащ ефективно количество хидроксиматерезинол или на негов геометричен изомер или стереоизомер.

Съгласно един друг аспект, настоящото изобретение се отнася до метод за увеличаване стабилността на хранителен продукт, включващ добавянето към посочения хранителен продукт на ефективно количество хидроксиматерезинол или на негов геометричен изомер или стереоизомер.

Описание на приложените фигури

Фигура 1 представлява свързаното с кон-

центрацията инхибиране на ароматазата от лигнани в JEG-3 клетки;

фигура 2 - пролиферацията на MCF-7 клетки в присъствие и отсъствие на HMR;

фигура 3 - мокро тегло на матка на незрели плъхове с HMR или с инхибитор на ароматаза;

фигура 4 - антитуморната активност на HMR срещу индуцирани от DMBA тумори на млечната жлеза при женски плъхове;

фигура 5 - екскрецията на ентеролактон в урината на плъхове, третирани с различни дози HMR.

Техническа същност на изобретението

Изобретението се отнася до използването на лигнан, хидроксиматерезинол (HMR), за профилактика на рак, неракови заболявания, зависими от хормоните заболявания и/или сърдечносъдови заболявания чрез прибавяне на посочения HMR в храната или чрез използването му във фармацевтични състави. Учудващо, HMR се метаболизира *in vivo* до ентеролактон, за който се приема, че обяснява поне частично антитуморните свойства на лигнаните. Антиоксидативното действие на HMR *in vitro* е силно и това свойство показва, че HMR също може да предпазва от сърдечносъдови заболявания благодарение на предпазното действие срещу вредните свободни видове кислород в тялото. Изобретението се отнася също така до използването на HMR като хранителна добавка за повишаване стабилността на храната (т.е. инхибиране оксидирането на липидите и на пигментите и загубите на витамини, което причинява загуба на хранителна стойност и развитие на лош вкус на храната).

Предлаганото изобретение е изключително ефективно за предпазване от рак, като рак на гърдата, на простатата и на дебелото черво, неракови заболявания, зависими от хормоните болести, като симптоми на долния уринарен тракт, диссинергизъм на матката, нестабилност на пикочния мехур, запушване на изхода на пикочния мехур, доброкачествена хиперплазия на простатата, и гинекомастия при мъже, и сърдечносъдови заболявания, получени в резултат на оксидирането на LDL в серума.

Фармацевтичният състав, съгласно изобретението, е за предпочитане орална форма.

Необходимото количество от активното съединение (HMR) варира от специфичните условия, от които трябва да се предпазва. Характерната доза варира между приблизително 10 до приблизително 100 mg на ден за възрастен човек.

При хранителната добавка от изобретението, продуктът, който трябва да се обогатява с хидроксиматерезинол може да е който и да е ядивен, нетоксичен твърд или течен продукт, подходящ да се смесва с HMR без да се засягат свойствата на HMR. Ролята на продукта е преди всичко да направи по-лесно точното дозиране на HMR. Подходяща концентрация е например 100 mg до 1 g HMR на 100 g обогатен продукт.

Хранителният продукт, съгласно изобретението, е по-специално функционална храна, хранителна добавка, хранителен продукт, фармацевтична храна, нутрацевтична, здравословна храна, храна с определена цел, и който и да е хранителен продукт. Подходяща концентрация на HMR в хранителния продукт е, например, 1 до 20 mg HMR на 100 g хранителен продукт.

Функционалната храна, съгласно настоящото изобретение, може да е например под формата на масло, маргарин, бисквити, хляб, торти, сладкиши, бонбони, кисело мляко или друг продукт от ферментирало мляко, или зърнен продукт, като мюсли.

Добавянето на хидроксиматерезинол е изключително полезно за повишаване стабилността на храната, в смисъл за инхибиране оксидирането на липиди, витамини и пигменти, което причинява загуба на хранителната стойност и развитието на лош вкус на храната. Подходяща концентрация на HMR за тази цел е, например, приблизително 0,1%.

Изолирането на HMR за целите на настоящото изобретение може да се проведе от фракция от големи стърготини (съдържаща клони, извивки и възли) от пресовано дърво и използването на HMR за предотвратяването на болести, като рак и сърдечносъдови заболявания.

Свойствата на HMR са изследвани чрез седем различни изследвания:

1. Измерване на антиоксидантната способност *in vitro*

2. Измерване на способността за инхибиране на ароматаза в JEG-3 клетки

3. Измерване на естрогеновата и антиестрогеновата активност в MCF-7 клетъчна култура

4. Оценяване на естрогеновата и антиестрогеновата активност чрез биоизследване на маточния растеж

5. Измерване на естрогеновата и антиестрогеновата активност във възрастни мъжки плъхове

6. Изследване на антитуморната активност в модел на рак на гърдата, индуциран от DMBA в плъхове

7. Анализ на метаболитите от урината на плъх след прилагане на различни дози HMR.

Изолирането и пречистването на HMR в достатъчно количество за биологични тестове бе невъзможно по-рано, тъй като той е съставка на дървесните лигнани, които бяха слабо охарактеризирани. Разбирането за разпределението на HMR в различни части на смърч (Elman 1976 and 1979) даде възможността да се изучат с подробности лигнаните и по-специално HMR.

Между дозите на HMR и количествата ентеролактон в урината бе открита линейна зависимост. Ентеролактонът е добре известен лигнан при бозайниците, образуван чрез чревни бактерии от матерезинол или чрез оксидиране на ентеродиол (Axelson and Setchell 1981; Axelson et al., 198). В урината се откриват само минимални количества неметаболизиран HMR и други метаболити (ентеродиол и 7-хидроксиентеродиол). Техните количества остават непроменени когато се увеличава дневната доза на HMR. Тези открития подсказват, че HMR се метаболизира до ентеролактон, а след това ентеролактонът, произлязъл от HMR чрез етапи на деметилиране и дехидроксилиране не се превръща в ентеродиол. На базата на структурата на HMR се очаква 7-хидроксиентеролактонът да е основния метаболит на HMR, но това не се случва. Тази хидроксилна група се елиминира по време на метаболизма. Метаболизмът на HMR се различава от този на SDG. SDG се метаболизира до ентеродиол, който частично се оксидира до ентеролактон (Rickard et al., 1996; Lampe et al, 1994). HMR предоставя, следователно, едно предимство пред SDG като директен предшественик на ентеролактона.

HMR притежава слабо, ако въобще съществува, естрогенно действие върху матка на плъх или мъжки организъм. Проявява слабо, но незначимо естрогенподобно действие в MCF-7 клетки. Не се демонстрира антиестрогенна активност за

HMR. Следователно е учудващо, че притежава силно антитуморно действие в туморен модел, индуциран от DMBA при плъхове, както е показано на фигура 2. Активността на HMR може да се дължи на самия HMR или на ентеролактона. Въпреки това, не се наблюдава зависимост от дозата при хемопредпазното действие на HMR, когато се прилага в две различни дози (3 и 15 mg/kg) плъхове след третиране с DMBA. Следователно HMR се нуждае да бъде превърнат в ентеролактон, за да има антитуморно действие или по-ниски дози от тези лигнани са достатъчни да осъществят максимален хемопредпазен ефект.

HMR е много ефективен антиоксидант, както е показано в таблици 2 и 3. Той представлява един от най-силните известни инхибитори на липидното пероксидиране и е отличен инхибитор на LDL оксидирането. Инхибирането на LDL оксидирането се разглежда като притежаващо важно значение при хората, тъй като концентрацията на LDL в серума се счита като един от най-добрите предсказател на сърдечносъдовите заболявания, като атеросклерозата. HMR може да послужи като хранителна добавка, за да се повиши стабилността на храната (т.е., инхибиране оксидирането на липиди, витамини и пигменти, което причинява загуба на хранителна стойност и развитие на лош вкус в храната), тъй като HMR е много по-добро средство за прочистване от супероксидния анион и от пероксидни радикали, отколкото добре известните антиоксиданти бутилиран хидроксианизол (BHA) и бутилиран хидрокситолуен (BHT), които обикновено се използват за повишаване стабилността на хранителните продукти.

Примери за изпълнение на изобретението

Химикали

Различни лигнани се тестват *in vitro* за тяхната естрогенна, антиестрогенна способност да инхибират ароматизирането (обработване с ароматаза) и за техните антиоксидантни свойства. Тестовите съединения се доставят от следните източници: ентеродиол и ентеролактон от Plantech, London UK, а 7-хидроксиентеролактонът, съдържащ две 7-ОН енантиомера е великодушен подарък от Dr. Kristina Wahala, Department of Applied Chemistry, University of Helsinki, Finland.

Екстрахиране на HMR от дърво (дървесина)

Екстрактите на HMR се изолират от Норвежки смърч (*Picea abies*), както е описано от Ekman, 1976 and Ekman 1979. Накратко, лиофилизираната смляна сърцевина на дървото се екстрахира по Soxhlet с хексан, за отстраняване на неполярното липофилно екстрахируемо вещество. Дървесинната проба се екстрахира отново в същото устройство с ацетон/вода (9:1 об/об) за получаване на сурови лигнани. Хидроксиматерезинол (HMR) и неговият изомер се изолират и отново се подлагат на хроматографиране с XAD-смола за последващо пречистване.

Измерване на антиоксидазната активност *in vitro*

Антиоксидазната способност на лигнаните се определя чрез четири различни метода: 1) инхибиране на липидното пероксидиране, 2) инхибиране оксидирането на липиди с ниска плътност (LDL), 3) пречистване от супероксидния анион и 4) изследвания за пречистване от пероксилния радикал.

Инхибирането на липидното пероксидиране се определя на основата на тяхната способност да инхибират терт-бутилхидропероксид-индуцирано липидно пероксидиране (t-BuOOH-LP) в микrozоми на черен дроб на плъх (Ahotupa et al., 1997). Тестът за t-BuOOH-LP се провежда както следва: Буферът (50 mM натриев карбонат, pH 10,2, с 0,1 mM EDTA) се отпипетирва в обем от 0,8 ml в луминометрична кювета. Прибавят се 20 μ mol от разредени чернодробни микrozоми, крайна концентрация от 0,5 mg/ml, и тестови химикали. Тестовите съединения се прибавят към инкубационните смеси в малко количество, разредени в етанол или диметилсулфоксид (2% от инкубационния обем), и липидният пероксидазен потенциал се сравнява с този на носителя (етанол или диметилсулфоксид). Реакцията се иницира с 0,05 ml 0,9 mM t-BuOOH-LP при 33°C. Измерва се хемилуминесценцията за приблизително 45 min на цикли от 1 min, и се пресмятат полетата под кривата (интеграл). Измерванията на хемилуминесценцията се провеждат при използване на Bio-Oebit 1251 Luminometer (Bio-Orbit, Turku, Finland), свързан към персонален компютър, при използване на софтуер специално за изследванията.

Инхибирането на оксидирането на LDL се

оценява, както е описано от Ahotupa et al., 1996. Накратко: LDL се изолира чрез утаяване с буфериран хепарин. След повторното суспендиране във фосфатен буфер, 20 mM CuCl_2 се прибавят и сместа се инкубира 3 h при + 37°C. След това, LDL липиди се екстрахират с хлороформ-метанол, изсушават се под азот, отново се разтварят в циклохексан и се анализират спектрофотометрично при 234 nm. Интензитетът на абсорбцията е показателен за LDL оксидирането. За тестване способността на различните съединения да предпазват от LDL оксидиране, съединенията се добавят към инкубационната смес преди добавянето на CuCl_2 . Възможността тестовите съединения да пречат на процедурата за анализ се изключва чрез измерването на абсорбцията при 234 nm преди и след инкубационния период. За тези съединения, които показват антиокислителни възможности при изходната концентрация (0,1 mM), се определят IC-50 стойности (т.е., концентрации, при които тестовото съединение инхибира LDL оксидирането с 50%).

Методът на пречистване от супероксидния анион се основава на супероксидния анион, продуциран при контролирани условия чрез ксантин-ксантиноксидазна система и откриване (установяване) на генерираните реактивни видове кислород чрез луцинометър (Ahotupa et al., 1997). Определя се способността на тестваните съединения да намаляват хемилуминесценцията. Изчислява се IC-50 концентрацията (концентрация, която предпазва хемилуминесценцията с 50%).

Изследването за пречистване от пероксилния радикал се основава на генерирането на пероксидни радикали чрез термично разграждане на 2,2'-азобис(2-амидинопропан)HCl и тяхното откриване чрез хемилуминесценция (Ahotupa et al., 1997). Резултатите се изчисляват като стехиометричен фактор, т.е., колко мола пероксилни радикали могат да се свържат и да се изнесат от системата от 1 mol на тестовото съединение.

Измерване на ароматаза-инхибиращия капацитет на JEG-3 клетки

Действието на HMR и структурно свързаните лигнани (ентеролактон, ентеродиол и 7-хидроксиентеролактон) се изучават посредством образуването на ^3H -17бета-естрадиол от ^3H -андостендион в JEG-3 клетки, човешка хориокар-

циномна клетъчна линия. JEG-3 хориокарциномните клетки са полезен ароматазен модел, позволяващ изучаването инхибирането на ароматазата *in vitro* (Krekels et al., 1991). Клетките се поддържат в DMEM, съдържаща 10% зародишен телешки серум (FCS). Инкубационната смес съдържа 50 μ mol небелязан андростендион (0,5 nM, 100 μ mol тестови съединения (10 mM) и 800 μ mol клетъчна суспензия (1 милион клетки). След 4-часово инкубиране се прибавят небелязани носители (андростендион, тестостерон, 17бета-естрадиол и естрон). Стероидите се екстрахират двукратно с 3,0 ml дихлорметан. Използва се BETX за разделянето и количественото определяне на изотопно белязания ^3H -17бета-естрадиол, както е описано по-горе (Makela et al., 1995). Колонната система се състои от кизелгур-колона, следвана от C18 150 x 3,9 mm ID аналитична колона (Technopal 10 C18 HPLC Technology; Wellington House, Cheshire, UK). Подвижната фаза е ацетонитрил/вода (35/65) и скоростта на потока е 1,2 ml/min. За *in-line* откриване на радиоактивните метаболити, елюентът на BETX колоната се смесва продължително със сцинтилационна течност, след което се онаглеждава с *in-line* радиоактивен детектор.

Сток-култури на MCF-7 клетъчна линия (клетки от рак на гърдата на човек) се култивират в RPMI среда, без фенол-ред, с добавка на 5% FCS, 100 U/ml пеницилин и 100 μ g/ml стрептомицин, 10 μ g/ml инсулин и 1 nM 17бета-естрадиол в колби с T-75 култура. Средата се заменя със свежа среда три пъти на седмица. Сток-културите се събират чрез трипсинизиране и се суспендират в 10 ml versene разтвор без фенол ред и се центрофугират 5 min на 800 об/мин. Гъстата клетъчна утайка внимателно се суспендира отново в RPMI среда, с добавка на 5% декстран, пречистен с активен въглен PCS (dcFCS) и се посяват върху 6-ямкови блюда 50 000 клетки/3,0 ml среда/ямка. На втория ден от култивирането средата се сменя и се прибавят тестови съединения. За тестване на естрогенността на лигнановите съединения те се разреждат в етанол и се прибавят към клетъчните култури при крайна концентрация от 1,0 M. При всеки пролиферативен опит се използва 1,0 nM разтвор на 17бета-естрадиол в етанол като положителна контрола за естрогеновия отговор. Равни количества етанол се добавят към контролните ямки. За

тестване на антиестрогенността, към клетъчните култури се прибавят и двете, разтвори на 17бета-естрадиол и на лигнан. Клетките се култивират за 5 до 7 дни в присъствието на тестови съединения, а средата се подменя на всеки два дни. Клетъчната пролиферация се изразява количествено чрез преброяване на освободените ядра с Coulter брояч.

Определяне на естрогенната и антиестрогенната активност при утеротропен тест в незрял плъх

Естрогенността на HMR се определя чрез утеротропно изследване в незрели плъхове, което се провежда както е описано по-рано (Jordan et al., 1977), с изключение на времето на третиране, което е 7 дни, вместо 3 дни, както при изследванията от литературната отпратка. Времето на третиране е по-дълго поради очакваната слаба естрогенност на тестовото съединение. Третирането на незрели плъхове с ароматазен инхибитор (MPV-221ad), който предотвратява биосинтеза на естрадиол се използва като методологичен контрол за матка, неподложена на стимулиране с естроген.

Определяне на естрогенната и антиестрогенната активност във възрастен мъжки плъх

Естрогенните (антиандрогенните) и антиестрогенните ефекти на HMR се изучават в интактни и хипоандрогенни Noble щам мъжки плъхове (на възраст 6-9 месеца), съответно. Хроничният хипоандрогенен стадий с двете - структурни и функционални промени в мъжката репродуктивна система се индуцират чрез неонатално естрогениране диетилстилбестрол, 10,0 μ g/ml телесно тегло в рапичово олио подкожно на 1-5 дни след раждането). За тези промени е известно, че са частично обратими от третиране с ароматазния инхибитор, състоящо се от дневна доза MPV-2213ad 10-30 mg/kg телесно тегло (Streng et al., непубликувани наблюдения).

Животните се хранят с базовата диета без соя (SDS, Whitham, Essex, England) и имат свободен достъп до вода. Дванадесет от интактните, както и от хипоандрогенните животни, се хранят с дневни дози HMR 50 mg/kg телесно тегло с рапичово олио. Други дванадесет животни от двата животински модела се хранят единствено с рапичово олио като плацебо лечение. След четириседмично лечение животните се убиват.

Измерва се теглото на тестисите и на вторичните полови жлези (коремна простата, семенни везикули и коагулиращата жлеза). Чрез имуноизследване (Haavisto et al., 1993) се измерва нивото на серумния и тестисния тестостерон и хипофизния и серумния лутеинизиращ хормон (LH).

Изследвания на антитуморната активност в модел на рак на гърдата, индуциран от DMBA в плъх

Антитуморната активност на HMR при рак на гърдата при плъхове се изучава както е описано по-рано (Kangas et al., 1986). На 50-дневен женски плъх Sprague-Dawley се прилага 12,0 mg DMBA (диметилбенз[а]антрацен) чрез хранене. След приблизително шест седмици могат да се установят палпабилни тумори, като ширината (w) и дължината (l) на туморите се измерва веднъж седмично за да се определи обема на тумора съгласно формулата $V = (\pi w^2 l) / 12$. Плъховете също се теглят веднъж седмично. Плъховете се разпределят на три отделни групи, така че общият брой тумори в началото на експеримента е еднакъв във всяка група: (1) контролна група от 8 животни, (2) HMR 3,0 mg/kg 7 животни, и (3) HMR 15,0 mg/kg 7 животни, като едно животно трябва да бъде убито преди края на експеримента.

HMR се прилага перорално, като се започва 9 седмици след индуцирането с DMBA, т.е., 3 седмици след появата на палпабилни тумори, и се прилага дневно в продължение на 7,5 седмици. На края на експеримента туморите се класифицират в групи, съгласно техния модел на растеж: 1. растящи тумори (PD = прогресивно заболяване); 2. нерастящи тумори, стабилизирани тумори (SD = стабилизирано заболяване, без промяна в обема на тумора или регресия от по-малко от 75%); 3. регресирани тумори (RT = частичен отговор, регресия на туморния обем от над 75%); 4. изчезнали тумори (CR = пълен отговор, липса на палпабилни тумори).

Анализ на метаболити от урина на плъхове, получаващи различни дози HMR

Десет Sprague-Dawley мъжки плъха (на възраст 4 месеца) се използват за изучаване на метаболизма на HMR in vivo. Животните се затварят по двойки с 12-часов цикъл на светлина:тъмнина и имат свободен достъп до вода и базова диета без соя (SDS, Whitham, Essex, England) по време на изследването на метаболизма.

Плъховете се хранят с HMR, разтворен в 10% етанол в PEG на дози от 3, 15, 25 и 50 mg/kg телесно тегло веднъж на ден в продължение на два дни. След второто хранене се събира 24-часовата урина в метаболитни клетки в съдове за събиране, съдържащи 120 microl 0,56 M аскорбинова киселина и 120 microl 0,15 M Na-азид като консервант. Измерва се обема на центрофугираните урини и се съхраняват при -20°C. За предварителното третиране се добавят 750 microl 0,2 M ацетатен буфер (pH 4,0 ± 0,1) към 3,0 ml затоплена урина аликвотни части. За екстрахирането на урината се използват Sep-Pak C18 колони (100 mg смола на основата на силициев диоксид/колони). Колоните предварително се уравновесяват с 3,0 ml H₂O, 3,0 ml метанол и 3,0 ml ацетатен буфер. След филтруването на урината през колоната и промиването с 3,0 ml ацетатен буфер се елюират полифенолите с 3,0 ml метанол. Елюатът се изпарява под азот до сухо при +45°C водна баня и изсушените остатъци отново се разтварят в 3,0 ml 0,2 M ацетатен буфер. Прибавят се 30 microl Helix джибров ензимна смес и разтворите се инкубират при +37°C за хидролизиране на глюкуронидите, както и на сулфатите. 300 microl флавонов стоков разтвор (100 microg/ml в EtOH) се прибавят в хидролизираните проби. Пробите се екстрахират в C-18 колона и се изпаряват до сухо, както е описано по-горе, и се съхраняват при -20°C до анализирането с GC-MS.

Изпарените проби урина се разтварят в пиридин и се силилират чрез добавяне на BSTFA:TMCS (10:1) силилиращ реактив. GC-MS анализите на силилираните проби се провеждат с HP 6890-5973 GC-MS устройство. GC колоната е HP-1 напречно омрежена метил полисилоксанова колона (15 m x 0,25 mm, т.е. 0,25 microm дебелина на филма). Използва се хелий като газ носител при поток от 1 ml/min. GC-термостат се програмира температурно от 60 до 290°C, при скорост на загряване 8°C/min. GC-инжекторът се нагласява на разделителен режим, при съотношение на разделяне 1:15. Температурата на инжектора е 250°C. Идентифицирането на съединенията се провежда на основата на маспектрите. Количествените изчисления са на основата на площта на некоригираните пикове на съставките обекти, имащи отношение към вътрешния стандарт.

Резултати

Установяване на антиоксидантната активност *in vitro*

HMR притежава по-силен пероксидиращ капацитет, отколкото който и да е друг лигнан или флавоноид в тестовите (таблица 2). HMR се сравнява с добре известния антиоксидант TROLOX, който е производно на водоразтворим витамин E, и BHA и BHT за способността им да инхибират пероксидирането на липиди, инхибирането на LDL оксидирането, и пречистването от супероксидните и пероксидните радикали (таблица 3). Като цяло, HMR представлява най-силния антиоксидант, по-ефективен от BHA или BHT във всичките изследвания, и по-силен от TROLOX във всички изследвания, с изключение на изследването за инхибиране на липидното пероксидиране, където съединенията са посочени като еднакво активни.

Капацитет на инхибиране на ароматаза при JEG-3 клетки

Инхибирането на ³H-17бета-естрадиол образуване от ³H-андростендион в JEG-3 клетки се тества при различни концентрации на HMR. Инхибиращият капацитет на HMR се сравнява с ентеролактон, 7-хидроксиентеролактон и ентеродиол. Ентеролактонът причинява зависимо от дозата инхибиране на ароматизирането при концентрация в границите от 1,0 до 10,0 μM . Вижда се също така, че ентеродиолът е неинхибиторен, което показва, че лактоновият пръстен е критичен за инхибирането. 7-хидроксиентеролактонът и хидроксиматерезинолът нямат инхибиторно действие (фигура 1), което показва важността на броя и разположението на хидроксилните групи в молекулата на лигнана за инхибирането на ароматазата.

Естрогенна и антиестрогенна активност на MCF-7 клетъчна култура

HMR има много слаба, статистично незначима естрогенна или антиестрогенна активност при изследването за MCF-7 клетъчна пролиферация, както е показано на фигура 2.

Оценяване на естрогенната и антиестрогенната активност при утеротропен тест в незрял плъх

Фигура 3 показва ефектите на HMR върху растежа на матката на незрели плъхове. HMR няма значим естрогенен ефект върху теглото на матката на незрели плъхове. HMR също така не намалява натрупването на тегло, което показва, че

няма антиестрогенен ефект. Инхибиторът на ароматаза предпазва от нарастването на теглото на матката, както се очаква, което показва, че методът на измерване на инхибиторите на ароматаза е адекватен.

Определяне на естрогенната и антиестрогенната активност при възрастен мъжки плъх

След 4-седмично третиране с HMR не се наблюдават значителни промени в теглото на вторичните полови жлези и тестисите при контролните и хипоандрогенните животни (таблица 4). Няма значителни промени в концентрацията на тестостерон или LH, също на (таблица 5.) Тези резултати показват, че HMR не е пълен агонист на естрогена в мъжкия организъм, защото не проявява типичната естрогенна активност върху хипоталамус - хипофиза - гонада (неидентифицирана полово жлеза) - оста (инхибиране секрецията на LH и на андроген). HMR също не е антиестроген, защото не обръща промените, индуцирани чрез неонатално естрогениране в мъжки плъх.

Изследване на антитуморната активност при индуциран от DMBA модел на рак на гърдата в плъх

Броят на растящите тумори (PD) към броя на стабилните (SD) тумори, регресиращи (PR) тумори и изчезнали (CR) тумори е представено на фигура 4. За антитуморния ефект на HMR се открива, че е статистично много значим. При този модел няма ясна зависимост на антитуморното действие от дозата. И двете свойства на HMR, на антиоксидант и на регресия на туморите, може следователно да се свържат с *in vivo* антитуморната активност. Механизмът на антитуморна активност на HMR *in vivo* е все още неизвестен.

Анализ на метаболити от урина на плъх след различни дози HMR

Фигура 5 илюстрира, че главният екскретиран метаболит на HMR е ентеролактон, който може да е биологично активно съединение. Това е учудващо, като се вземе предвид химичната структура на HMR, тъй като човек би очаквал хидроксиентеролактона да е главния метаболит. Метаболизмът на HMR в ентеролактон може да се катализира по-скоро чрез бактериалната чревна флора, отколкото от черния дроб на плъха.

Заклучения

Хидроксиматерезинолът (HMR) притежа-

ва антитуморна активност както като непроменено съединение, така и след превръщане в ентеролактон в модел на рак на гърдата, индуциран от DMBA. Следователно HMR притежава потенциал да причинява ползотворен ефект при хора, които рискуват да развият рак на гърдата (BC), рак на простатата (PC), на дебелото черво или доброкачествена хиперплазия на простатата (BHP). HMR се метаболизира до ентеролактон, който инхибира ароматизирането *in vitro*. Като предшественик на инхибитора на ароматазата HMR може също така да предотврати развитието на симптоми на долния уринарен тракт (LUTS), нестабилност на пикочния мехур, запущване на изхода на пикочния мехур, уретрална диссинергия, и гинекомастия. HMR притежава, също така, силно антиоксидативно действие и следователно може да се използва като хранителна добавка (антиоксидант). HMR,

като фармацевтичен продукт или диетична добавка може да притежава благотворно действие върху сърдечносъдовата система при човека. Добавянето на HMR към храната, за да се постигне съвсем нова функционална храна, нутрацевтична, здравословна храна, храна с определена цел или нова храна е достижимо.

5 Трябва да се вземе предвид, че методите от настоящото изобретение могат да се включат
10 под формата на най-разнообразни варианти за изпълнение на изобретението, само една малка част от които е включена в настоящото. За специалистите в областта става ясно, че съществуват и други варианти за изпълнение на изобретението без да се отдалечават от замисъла на изобретението. Следователно описаните варианти за изпълнение на изобретението са илюстративни и не трябва да се разглеждат като ограничаващи.

Таблица 1

Получаване на лигнани за бозайници от различни растителни храни чрез *in vitro* ферментация с човешка фекална флора

µg / 100 g

Ленено семе, брашно	68 000
Соеви зърна	170
Зърнени трици:	
Пшеница	570
Овес	650
Пълни зърна :	
ръж	160
Картоф	80
Морков	350
Лук	110

¹Thompson et al., Nutrition and Cancer 16:43-52, 1991

Таблица 2

Антиоксидантни свойства на лигнаните и на някои свързани флавоноиди *in vitro* чрез теста за инхибиране на липидното пероксидиране

Съединение	Антиоксидативен капацитет (t-BuOOH-LP) IC ₅₀ (μM)
Флавоноиди	
Кемпферол (3,4',5,7-тетрахидрокси- флавон)	0,9
Кврцитин (3,3',4',5,7-пентахидрокси- флавон)	0,4
Кемпферид (3, 5,7-трихидрокси-4'-метокси- флавон)	0,5
Лигнани	
Ентеролактон 2,3-bis-(3'-хидроксибензил)- бутиролактон	15,9
Ентеродиол 2,3-bis-(3'-хидроксибензил)-1,4- диол	12,7
хидроксиматерезинол	0,08

Таблица 3

Сравнение на антиоксидативното действие на HMR и на известни антиоксиданти *in vitro*

Представени са IC-50 концентрации, с изключение на изследването за пречистване от пероксидовия радикал, където стехиометричният фактор, т.е., колко мола пероксидов радикал може да се свържат от един мол на тестваното съединение.

	HMR ¹	TROLOX ²	BHA ³	BHT ⁴
Инхибиране на липидното пероксидиране	0,06 µM	0,02 µM	1,1 µM	15,3 µM
Инхибиране на LDL оксидиране	2,0 µM	2,7 µM	неопределен	
Пречистване от супероксидния анион	5,6 µM	25 µM	15 µM	>1 mM
Пречистване от пероксидовия радикал	1:4	1:2	неопределен	

¹хидроксиматерезинол

²водоразтворимо производно на витамин Е

³бутилиран хидроксианизол (синтетичен антиоксидант)

⁴бутилиран хидрокситолуол (синтетичен антиоксидант)

Методите за определяне са предоставени в текста на описанието.

Таблица 4

Действие на HMR при четириседмично излагане върху мъжките репродуктивни органи по отношение на теглото¹

	Третиран е	n	Телесно тегло	тестис	Коремна простата	Семенна везикула	коагулираща жлеза
			g	mg/kg телесно тегло			
Интактни животни	Плацебо	12	426 ± 28	4362 ± 170	909 ± 146	412 ± 43	223 ± 49
	HMR 50 mg/kg	12	448 ± 38	4223 ± 304	938 ± 148	419 ± 59	204 ± 48
Хипоандр огенни животни	Плацебо	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

¹Данните са изразени като средна + SD стойност (mg/kg телесно тегло). Относителните тегла след третиране с HMR са с незначителни различия от плацебо в другата група.

Таблица 5

Действие на HMR при четириседмично излагане върху тестостерон при мъжки плъхове и концентрация на LH¹

	Третиран е	n	Тестисен тестостерон (ng/тестис)	Серумен тестостерон (ng/ml)	Хипофизен LH (µg/pit)	Серумен LH (ng/ml)
Интактни животни	Плацебо	12	97,6 ± 46,3	2,405 ± 1,122	6,747 ± 2,479	1,804 ± 1,294
	HMR 50 mg/kg	12	112,9 ± 58,5	2,770 ± 1,421	6,838 ± 2,061	1,088 ± 0,352
Хипоандр огенни животни	Плацебо	12	63,5 ± 25,9	1,197 ± 0,663	8,673 ± 2,224	0,712 ± 0,371
	HMR 50 mg/kg	12	48,0 ± 15,2	0,939 ± 0,431	7,530 ± 2,286	0,854 ± 0,333

¹Данните са изразени като средна + SD стойност (mg/kg телесно тегло). Относителните тегла след третиране с HMR са с незначителни различия от плацебо в другата група.

Патентни претенции

1. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер за използване за профилактика на раково заболяване, нераково заболяване, хормонално зависимо заболяване и/или сърдечносъдово заболяване при човек.

2. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер съгласно претенция 1 за използване за профилактика на рак при човека, при което споменатото раково заболяване е избрано от групата, състояща се от рак на гърдата, рак на простатата и рак на дебелото черво.

3. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер съгласно претенция 1 за използване за профилактика на нераково, хормонално зависимо заболяване при човек, при което споменатото нераково, хормонално зависимо заболяване е избрано от групата, състояща се от симптоми на долния уринарен тракт, уретрална диссинергия, слабост на пикочния мехур, запушване на отвора на пикочния мехур, доброкачествена хиперплазия на простатата и гинекомастия при мъжа.

4. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер съгласно претенция 1 за използване за предпазване от сърдечносъдово заболяване при човек, при което споменатото сърдечносъдово заболяване е в резултат на оксидиран LDL в серума.

5. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер за използване в метод за повишаване нивото на ентеролактон или на друг метаболит на хидроксиматерезинол в серума на човек, като по този начин се постига предпазване от раково заболяване или някое нераково заболяване, хормонално зависимо заболяване при човек, включващ прилагане към споменатия човек на ефективно количество хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер.

6. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер за използване в метод съгласно претенция 5, при което споменатото раково заболяване е избрано от групата, състояща се от рак на гърдата, рак на простатата и рак на дебелото черво.

7. Хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер за използване в метод съг-

ласно претенция 5, при което споменатото нераково, хормонално зависимо заболяване е избрано от групата, състояща се от симптоми на долния уринарен тракт, уретрална диссинергия, доброкачествена хиперплазия на простатата и гинекомастия при мъжа.

8. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество от хидроксиматерезинол или от негов геометричен изомер или стереоизомер в комбинация с фармацевтично приемлив носител.

9. Добавка към хранителен продукт, характеризираща се с това, че споменатата добавка включва хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер, обогатен в ядлив нетоксичен твърд или течен материал, при което споменатата добавка съдържа 100 mg до 1 g хидроксиматерезинол на 100 g от споменатия обогатен материал.

10. Хранителна добавка съгласно претенция 9, характеризираща се с това, че споменатият хранителен продукт е избран от групата, състояща се от функционална храна, хранителна добавка, хранително вещество, фармацевтична храна, нутрацевтик, здравословна храна, храна с определена цел или който и да е хранителен продукт.

11. Хранителна добавка съгласно претенция 9, характеризираща се с това, че споменатият хранителен продукт е функционална храна под формата на масло, маргарин, бисквити, хляб, кекс, бонбони, сладкиши, кисело мляко или друг ферментирал млечен продукт, или зърнени храни като мюсли.

12. Хранителен продукт, характеризиращ се с това, че съдържа ефективно количество от хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер.

13. Хранителен продукт съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че споменатият хранителен продукт е избран от групата, състояща се от функционална храна, хранителна добавка, хранително вещество, фармацевтична храна, нутрацевтик, здравословна храна, храна с определена цел или който и да е хранителен продукт.

14. Хранителен продукт съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че споменатият хранителен продукт е функционална храна под формата на масло, маргарин, бисквити, хляб,

кекс, бонбони, сладкиши, кисело мляко или друг ферментирал млечен продукт, или зърнени храни като мюсли.

15. Метод за повишаване стабилността на хранителен продукт, характеризиращ се с това, че включва добавяне към споменатия хранителен продукт на ефективно количество от хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер.

16. Метод съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че повишаването на стабилността на храната включва инхибиране оксидирането на липиди, витамини и пигменти, което причинява загуба на хранителна стойност и развитие на лош вкус в храната.

17. Използване на хидроксиматерезинол или негов геометричен изомер или стереоизомер, обогатен в твърд или течен материал, като добавка към хранителен продукт.

18. Използване съгласно претенция 17, при което споменатият хранителен продукт е избран от групата, състояща се от функционална храна, хранителна добавка, хранително вещество, фармацевтична храна, нутрацевтик, здравословна храна, храна с определена цел или който и да е хранителен продукт.

19. Използване съгласно претенция 17, при което споменатият хранителен продукт е функционална храна под формата на масло, маргарин, бисквити, хляб, кекс, бонбони, сладкиши, кисело мляко или друг ферментирал млечен продукт, или зърнени храни като мюсли.

Приложение: 5 фигури

Литература

Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela 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 Mantyla E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem*, 29:139-144, 1996.

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

1997.

Axelsson 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.

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

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

Brezinski A, Adlercreutz H, R. Rosier A, Shmueli A, Tanos V and Schenker JG: Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause (The Journal 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, Ser B*, 39:1-6, 1979.

Evans BA, Griffiths K and Morton MS. Inhibition of 5 α -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.

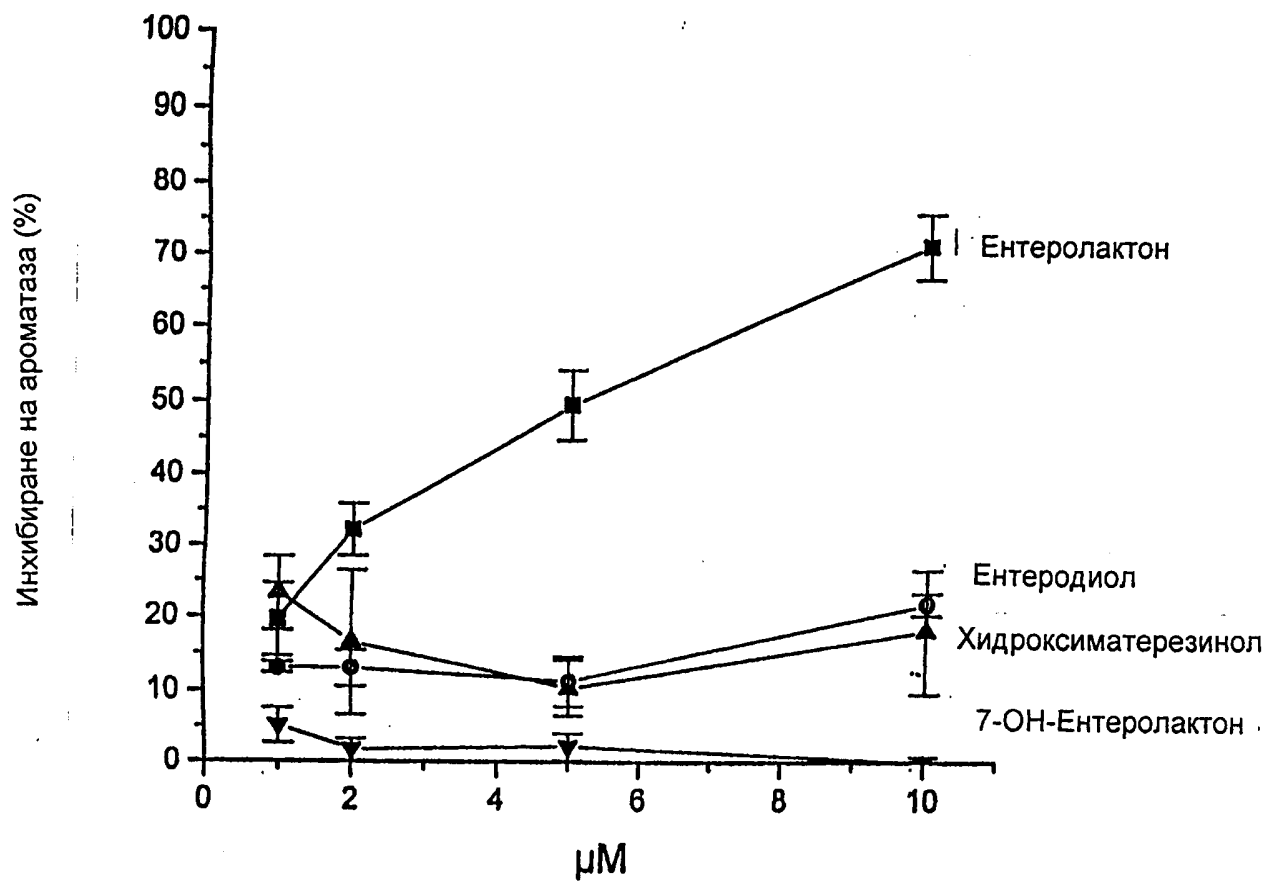
Hulten K, Adlercreutz H, Winkvist A, Lenner P, Hallmans G and Agren A. Low levels of phytoestrogens in blood as risk factor for breast cancer. In: COST 916 Workshop 'Phyto-oestrogens: exposure, bioavailability, health benefits and safety concerns', 1998.

Ingram D, Sanders K, Kolybaba M and Lopez D. Case-control study 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, Gronroos M, Kallio S, Karjalainen A, Perila M, Sodervall 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, Wahala K and Adlercreutz H. Inhibitory effects of soy and rye diet on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *Prostate*, Aug 1; 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, Sjoholm R and Ekman R. NMR-spectroscopic study of hydroxymatairesinol, the major lignan in Norway spruce (*Picea abies*) heartwood. *ACH models in chemistry*. 135(4) : 583-590, 1998.
- Makela S, Poutanen M, Lehtimäki J, Kostian M-L, Santti R and Vihko R. Estrogen-specific 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.G. 1.1.1.62). as 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):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 Effect 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 cancer 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: Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursors from flaxseed. *Nutr Cancer*, 26: 159-165, 1996a.
- Thompson LU, Rickard 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, Makela 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 on lignan (HPMF) on RNA synthesis in rat uterus. *J Reprod. Fert*, 66:379-381, 1982.
- Zhang J-X, Hallmans G, Landstrom M, Bergh A, Damber J-E, Aman P and Adlercreutz H. soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. *Cancer Letters*, 114: 313-314, 1997.



Фигура 1

Естрогенна и антиестрогенна активност на HMR в MCF-7 клетки.
Клетъчнаа пролиферация на контролата се довежда до 100%.

Брой експерименти, $n = 3 - 4$.

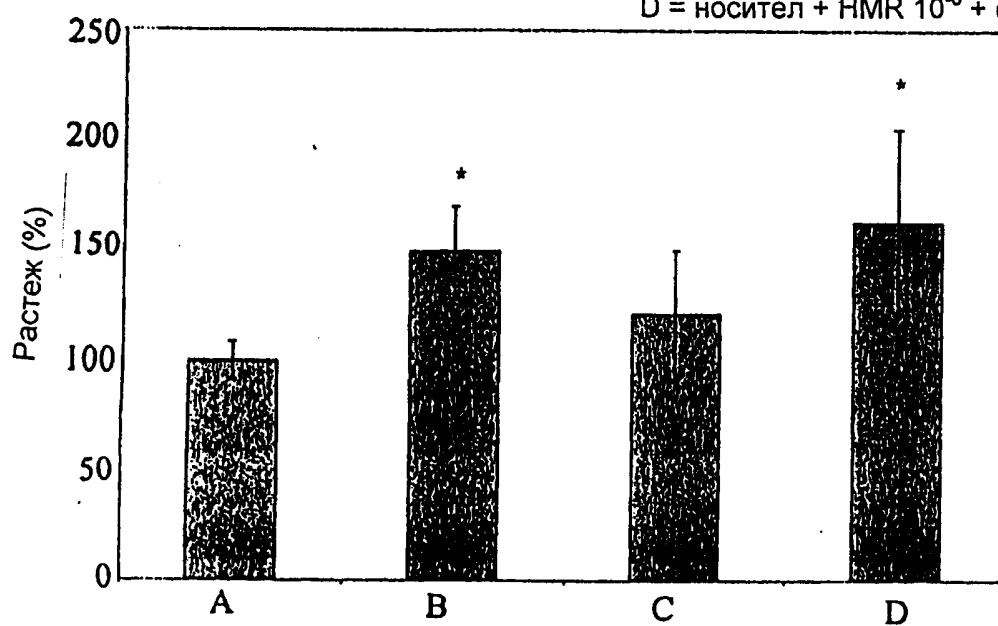
* значително различен от контролата

A = контрола (носител без хормони)

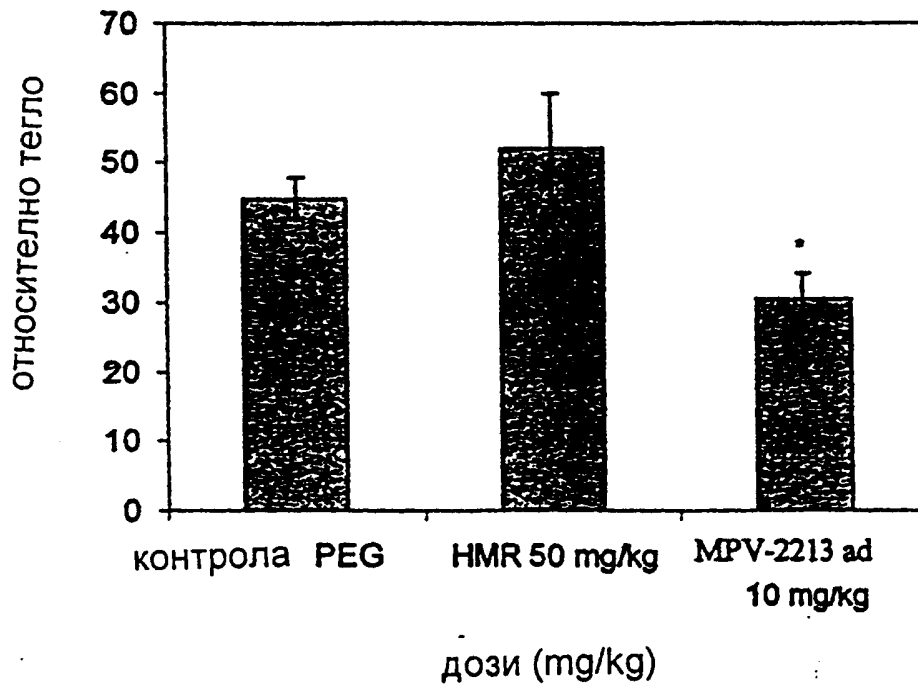
B = носител + естрадиол 10^{-9} M

C = носител + HMR 10^{-6} M

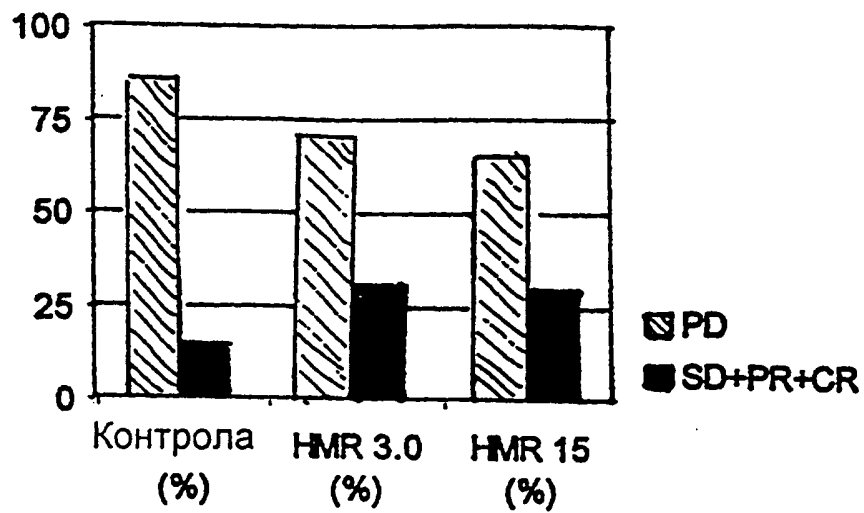
D = носител + HMR 10^{-6} + естрадиол 10^{-9} M



Фигура 2



Фигура 3



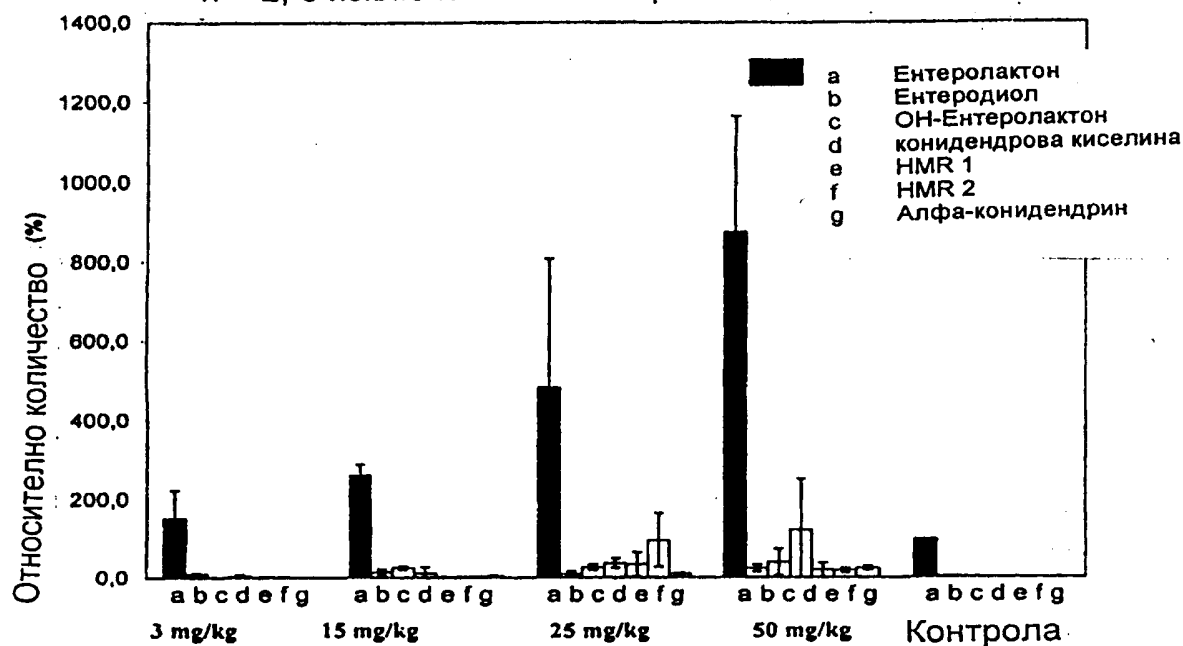
Фигура 4

Лигнани в урината след различни дози HMR¹

Стойностите са изразени като средна стойност с SD стълбче.

Брой животни за група третирани животни.

n = 2, с изключение на контролата, n = 1.



Фигура 5

Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: К. Аничина

Редактор: Е. Синкова

Пор. № 65027

Тираж: 40 СР