

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244268 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441851**

(22) Data zgłoszenia: **2022.07.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.07.10 BUP 28/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.27 WUP 52/2023**

(51) MKP:

A61K 36/74 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, PL
UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ANETA WOJDYŁO, Wrocław, PL
JAKUB FICHNA, Łódź, PL
MACIEJ SAŁAGA, Pabianice, PL
MARCIN TALAR, Łódź, PL
PAULA MOSIŃSKA, Lane Cove North, AU
ALEKSANDRA TARASIUK, Łódź, PL
JULIA KRAJEWSKA, Łódź, PL
ADAM FABISIAK, Konstancin-Jeziorna, PL
AGATA BINIENDA, Brzezinka Nowe, PL
ADRIAN BARTOSZEK, Kalinówka, PL
KATARZYNA DZIEDZICZAK, Zduńska Wola, PL
KAROLINA NIEWINNA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Renata Piekarz, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Zastosowanie ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej

PL 244268 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ekstrakt z kawowej łuski srebrzystej do zastosowania w profilaktyce i leczeniu chorób zapalnych jelit.

Związki bioaktywne, w tym związki polifenolowe charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej, które występują powszechnie w różnych częściach roślin, tj. korzeniach, owocach i warzywach, łodygach, skórkach i innych oraz mogą być otrzymane z niekonwencjonalnego ich źródła pochodzenia tj. roślinnych odpadów przemysłu spożywczego.

Jednym z przykładów dotychczasowego wykorzystania izolowanych związków polifenolowych z wytlóków owocowych jest pozyskiwanie antocyjanów z aronii czarnoowocowej. Również pozyskiwanie kompleksu związków polifenolowych bogatych w kwasy fenolowe z liści karczocha jest powszechnie stosowane celem wykorzystania w produkcji farmakologicznych preparatów roślinnych z zastosowaniem w leczeniu skutków chorób m.in. wywołanych działaniem wolnych rodników.

W ostatnich latach silny nacisk kładziony jest na bezodpadową produkcję w przemyśle spożywczym, stąd istnieje szerokie zainteresowanie nad powtórным wykorzystaniem pozostałości materiału roślinnego w pozyskiwaniu frakcji aktywnych, w tym związków biologicznie czynnych. Stąd też, stosując różne metody ekstrakcji, ukierunkowuje się ją na pozyskanie kompleksu bądź specyficznych, pojedynczych substancji bioaktywnych.

Pozyskanie ekstraktów z odpadowych surowców roślinnych prowadzone jest poprzez ekstrakcję frakcji biologicznie czynnej rozpuszczalnikami organicznymi i oddzielenie ich od substancji balastowych, tj. cukrów, kwasów organicznych, wosków, za pomocą chromatografii kolumnowej, zgodnie ze znanym stanem techniki w tym zakresie. Otrzymany ekstrakt w formie kompleksu związków biologicznie aktywnych stanowi materiał do dalszych działań związanych z rozdziałem, bądź może być stosowany jako kompleks wykorzystując synergistyczne działanie związków bioaktywnych.

Mieszaniny charakteryzujące się synergistycznym działaniem bioaktywnym wykazują aktywność biologiczną o szerokim spektrum swojej działalności i wyróżniają się korzystniejszym efektem aktywności biologicznej w zastosowaniu niż pojedyncze, wyizolowane związki. Tym samym należy zwrócić szczególną uwagę na produkt odpadowy powstający w procesie prażenia ziarna kawy, tj. kawową łuskę srebrzystą, która bogata jest w kompleks kwasów fenolowych, zwłaszcza charakteryzuje się wysoką zawartością pochodnych kwasu chlorogenowego, gdzie związki te stanowią dominującą frakcję w ogólnej puli związków polifenolowych.

W publikacji Rita Głowacka i in.: "Kawowa łuska srebrzysta – nowa, naturalna alternatywa pozyskiwania wybranych związków bioaktywnych", Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych nr 592, 2018, 15–25, DOI 10.22630/ZPPNR.2018.592.2 ujawniono różne metody ekstrakcji związków bioaktywnych z kawowej łuski srebrzystej. Wskazano, że najczęściej wykorzystywana jest ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz tzw. SLE (ang. Solid Liquid Extraction). Rozdrobniony materiał roślinny mieszany jest z ciekłym ekstrahentem, który wnika w głąb rozdrobnionego surowca roślinnego. Powoduje to pęcznienie i uwodnienie suchych części surowca oraz rozpuszczanie i dyfuzję związków bioaktywnych. W technice SLE wykorzystywać można różne rozpuszczalniki organiczne polarne, niepolarne oraz ich wodne mieszaniny. Do ekstrakcji związków polifenolowych najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są wodne roztwory metanolu, etanolu oraz acetonu. Technika SLE odznacza się dość wysoką wydajnością ekstrakcji związków bioaktywnych i jest łatwa do przeprowadzenia. Ujawniono, że spożywanie produktów zawierających kwasy chlorogenowe, a w szczególności żywności bogatej w kwas kawoilochinowy (3-CQA), który jest głównym przedstawicielem kwasów chlorogenowych w łusce srebrzystej, wykazuje wiele pozytywnych efektów na zdrowie człowieka. Związkom tym przypisuje się aktywność hipoglikemiczną, hepatoprotekcyjną, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i antykancerogenną. Wskazano również, że kwas protokatechowy i kwas galusowy, podobnie jak pozostałe związki fenolowe, wykazują liczne pozytywne właściwości, do których zaliczyć można właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwgrzybiczne, antyhepatotoksyczne, przeciwzapalne, cytotoksyczne oraz ochronne dla układu nerwowego. Kwas galusowy charakteryzuje się właściwościami neoplastycznymi, bakteriostatycznymi, przeciwutleniającymi i antykancerogennymi.

W publikacji Amaia Iriondo-DeHond et al.: "Coffee silverskin: A low-cost substrate for bioproduction of high-value health promoting products", Annals of Nutrition & Food Science, 29 Sep, 2017, Volume 1, Issue 1, Article 1005 ujawniono, że ekstrakty pozyskiwane z kawowej łuski srebrzystej mogą być stosowane do wytwarzania żywności funkcjonalnej, kosmetyków o właściwościach przeciwstarzeniowych oraz do zapobiegania i leczenia otyłości, dyslipidemii i cukrzycy.

Problemem technicznym rozwiązywanym przez wynalazek jest opracowanie nowego zastosowania dla ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej oraz zagospodarowanie produktu odpadowego powstającego w procesie prażenia ziarna kawy jakim jest kawowa łuska srebrzysta.

Przedmiotem wynalazku jest ekstrakt z kawowej łuski srebrzystej, zawierający co najmniej 4,5% wag. związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy, do zastosowania w profilaktyce i leczeniu chorób zapalnych jelit.

Korzystnie choroby zapalne jelit obejmują nieswoiste choroby zapalne jelit.

Korzystnie nieswoiste choroby zapalne jelit obejmują chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego.

Korzystnie ekstrakt jest stosowany doustnie dwa razy dziennie w dawce co najmniej 1 mg/kg masy ciała pacjenta.

Korzystnie pacjentami są osoby ze zdiagnozowaną nieswoistą chorobą zapalną jelit lub osoby z historią nieswoistej choroby zapalnej jelit w rodzinie.

Zaletą wynalazku, jest łatwy sposób pozyskiwania kompleksu związków polifenolowych z odpadowego surowca roślinnego o wysokiej wydajności substancji biologicznie czynnej.

Krótki opis figur

Fig. 1 przedstawia wyniki testu NRU dla komórek RAW264.7 – wpływ ekstraktu kawowej łuski srebrzystej w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ na żywotność komórek (% kontroli). Dane na wykresie zostały zaprezentowane jako średnia z czterech powtórzeń $\pm$ SEM.

Fig. 2 przedstawia wyniki testu Griessa dla komórek RAW264.7 – wpływ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu kawowej łuski srebrzystej oraz 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu kawowej łuski srebrzystej na stężenie azotynów. Dane na wykresie zostały zaprezentowane jako średnia z czterech powtórzeń $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ vs. kontrola, \$\$\$ $p < 0,01$ vs. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

Fig. 3 przedstawia ocenę makroskopową jelita grubego – wpływ 4% w/v DSS oraz 4% w/v DSS + kawowa łuska srebrzysta podawana w dawce 1 mg na kg masy ciała 2 razy dziennie. Dane na wykresie zostały zaprezentowane jako średnia $\pm$ SEM. (n w grupie = 6–10) *** $p < 0,001$ vs. kontrola, # $p < 0,05$ vs. DSS.

Fig. 4 przedstawia ocenę stanu zapalnego na podstawie poziomu aktywności mieloperoksydazy – wpływ 4% w/v DSS oraz 4% w/v DSS + kawowa łuska srebrzysta podawana w dawce 1 mg na kg masy ciała 2 razy dziennie. Dane na wykresie zostały zaprezentowane jako średnia $\pm$ SEM. (n w grupie = 6–10).

Wynalazek został dokładniej wyjaśniony na przykładach, które jednak nie ograniczają jego zakresu.

Przykłady wykonania

Przykład 1

Sposób otrzymywania ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej

Kawową łuskę srebrzystą zmielono w młynku laboratoryjnym na proszek o średnicy około 2–4 mm. Uzyskany proszek poddano ekstrakcji gdzie na 100 g kawowej łuski srebrzystej użyto 200 ml 50% roztwór etanolu, po czym całość poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 50 kHz przez 30 minut co 5 minut dodatkowo mieszając, po czym odwirowano (5000x g; Sigma 6K15, Shrewsbury, UK). Ekstrakcję powtórzono 3 krotnie a uzyskany supernatant po połączeniu poddano odparowaniu alkoholu etylowego przy użyciu wyparki obrotowej. Następnie otrzymany ekstrakt poddano frakcjonowaniu na kolumnie stosując wypełnienie żywicą polimerową Amberlite™ XAD-16. W pierwszej kolejności usunięto związki niskocząsteczkowe tj. kwasy organiczne i cukry przemysławiając złożę z zaabsorbowanym ekstraktem wodą po czym właściwy proces elucji prowadzono 80% etanolem. Zebrane frakcje poddano procesowi usunięcia rozpuszczalnika poprzez odparowanie pod wyparką obrotową (Hei-VAP Expert, Heidolph; Schwabach, Niemcy) w 40°C, otrzymując w ten sposób ekstrakt polifenolowy, który finalnie poddano procesowi liofilizacji przez 24 godziny stosując ciśnienie 0,220 mbar (Christ Alpha 2–4, Braun Biotech Int.; Melsungen, Germany).

Analizę ilościową i jakościową uzyskanego ekstraktu przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej wyposażonej w detektor PDA oraz QToF/MS/MS zgodnie z metodą opisaną przez Wojdyło i in. [1]. Rozdziału związków dokonano za pomocą kolumny z wypełnieniem C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm ; Waters Corp.), a uzyskaną zawartość związków polifenolowych wyrażono w mg/g sm w przeliczeniu na związek dominujący w danym preparacie. Stwierdzono, że uzyskany ekstrakt z kawowej łuski

srebrzystej zawiera około 45 mg substancji czynnej w formie związków polifenolowych/g ekstraktu w przeliczeniu na kwas chlorogenowy, gdzie dominującą frakcją związków biologicznie aktywnych są pochodne kwasu chlorogenowego (tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka składu ekstraktu polifenolowego z kawowej łuski srebrzystej

†przypuszczalnie występujący

Rt	MS [M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS [M-H] ⁻ (m/z)	Nazwa związku	Zawartość polifenoli
3.11	353	191/179/173	kwas 3-O-kawoilochinowy	15.44±2.34
3.43	337	191/173/163	kwas 3-O-p-kumaroilochinowy	5.11±0.76
4.08	353	173/179	kwas 4-O-kawoilochinowy	0.45±0.10
4.37	353	191/173	kwas 5-O-kawoilochinowy	11.57±1.23
5.06	367	191/173	kwas 3-O-feruloilochinowy	0.43±0.06
5.45	337	193/173	kwas 5-O-p-kumaroilochinowy	0.47±0.08
5.62	367	191/173	kwas 4-O-feruloilochinowy	2.45±0.78
5.66	367	191/173	kwas 5-O-feruloilochinowy	1.72±0.21
5.73	335	179/161/135	lakton 3-O-kawoilochinowy †	1.21±0.06
6.06	335	179/161/135	lakton 4-O-kawoilochinowy †	0.44±0.22
6.38	515	353	kwas 3,4-O-dikawoilochinowy	2.36±0.15
7.33	367	179	kwas metylo-5-kawoilochinowy †	0.91±0.11
7.45	515	353/179/173	kwas 3,5-O-dikawoilochinowy	0.94±0.05
8.16	515	353/179	kwas 4,5-O-dikawoilochinowy	1.59±0.14
8.73	529	367/335/193/179	kwas 3-O-feruloilo-4-O-kawoilochinowy	0.15±0.02
9.37	529	367/353/335/173	kwas 4-O-kawoilo-5-O-feruloilochinowy	0.11±0.01
9.76	497	335/161	lakton dikawoilochinowy †	0.08±0.01
W sumie (mg/g suchej masy)				45.43

Ocena działania przeciwzapalnego ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej

Ocena działania przeciwzapalnego została przeprowadzona dwuetapowo – w modelu *in vitro* oraz *in vivo*.

In vitro, badanie przeprowadzono przy udziale mysich komórek makrofagowych linii RAW264.7. Komórki zostały poddane stymulacji lipopolisacharydem (LPS), a następnie przy wykorzystaniu testu Griessa oceniono produkcję tlenku azotu (NO). Zbadano wpływ ekstraktu na wytwarzanie NO.

W następnym etapie przeprowadzono badanie *in vivo* w chemicznym modelu zapalenia jelita grubego wykorzystującym dekstranowy siarczan sodu (DSS), którego właściwości prowadzą do uszkodzenia komórek nabłonka jelit. Model został wybrany ze względu na dane literaturowe oraz doświadczenie twórców. Model zapalenia jelita grubego przy użyciu DSS doskonale nadaje się do badań laboratoryjnych odzwierciedlających przebieg nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ) u ludzi, m.in. ze względu na szybkość powstawania stanu zapalnego, prostotę wywołania stanu zapalnego w badanej grupie zwierząt, odtwarzalność i kontrolę przebiegu wywołanej NChZJ u gryzoni.

Wybrano model krótki, 7-dniowy, przypominający ostry stan zapalny. Zwierzęta dostawały roztwór DSS (4% w/v) w wodzie pitnej przez pierwsze 5 dni, a następnie wodę pitną.

Samce myszy domowej (*Mus musculus*) szczepu C57BL/6 w wieku 6–8 tygodni (masa ciała 20–25 g) pozyskano ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Wszystkie procedury w doświadczeniu zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi (34/ŁB96/2018) w dniu 14 maja 2018 roku.

W ostatnim dniu badania została przeprowadzona ocena makroskopowa (uwzględniając masę oraz długość jelita, konsystencję stolca, uszkodzenie nabłonka okrężnicy oraz obecność krwi w kale). Pobrano fragmenty jelita do oceny mikroskopowej (analiza histopatologiczna) oraz oznaczenia aktywności enzymu mieloperoksydazy (MPO).

Szczegółowy opis metod użytych w badaniach:

Ocena makroskopowa wraz z parametrem oceny morfologicznej stolca – „stool score”

Parametry choroby oceniano w dniu 7. po dodaniu DSS do wody pitnej. Po eutanazji cała okrężnica została wyizolowana i zważona, z zawartością kału. Następnie okrężnicę otworzono wzdłuż jej długości i oczyszczono z zawartości kału. Całkowity wynik makroskopowy dla każdego zwierzęcia obliczono na podstawie:

- (i) konsystencji stolca (gdzie 0 oznacza normalne dobrze ukształtowane pel ety kałowe, a 3 oznacza biegunkę),
- (ii) uszkodzenia nabłonka okrężnicy rozpatrywanego jako liczba wrzodów (0–3),
- (iii) wyników długości i masy okrężnicy (wyrażone jako odsetek utraty każdego parametru w stosunku do grupy kontrolnej (0 punktów, utrata masy < 5%; 1 punkt, utrata masy 5–14%; 2 punkty, utrata masy 15–24%; 3 punkty, 25–35% utrata masy/długości i 4 punkty, > 35% utrata masy/długości)).

Całkowity wynik = 0 oznacza brak stanu zapalnego.

Rejestrowano również obecność (wynik = 1) lub brak (wynik = 0) krwi w kale.

Oznaczenie aktywności mieloperoksydazy w tkankach jako markera stanu zapalnego

Aktywność mieloperoksydazy (MPO) została określona ilościowo za pomocą metody opisanej wcześniej przez Sałaga i in. [2], 0,3 cm segmenty okrężnicy zważono i szybko homogenizowano w buforze bromku heksadecylo-trimetyloamoniowego (HTAB) (0,5% HTAB w 50 mM buforze fosforanu potasu, pH 6,0; 50 mg tkanki/mL). Następnie homogenat wirowano przez 15 minut (13 200 g, 4°C) i w kolejnych etapach zastosowano supernatant. Na 96-dołkowej płytce do 7 µL supernatantu dodano 200 µL 50 mM bufora fosforanu potasu (pH 6,0), zawierającego 0,167 mg/mL chlorowodoru O-dianizydyny i 0,05 µL 1% nadtlenku wodoru. Absorbancję mierzono (w trzech powtórzeniach) przy 450 nm (iMARK Microplate Reader, Biorad, Wielka Brytania) w 0 s, 30 s i 60 s od rozpoczęcia reakcji. MPO wyrażono w miligramach na gram mokrej tkanki, 1 jednostka to ilość enzymu zdolna do przekształcenia 1 µmola nadtlenku wodoru w wodę przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Jednostki aktywności MPO na 1 minutę obliczono ze standardowej krzywej przygotowanej przy użyciu oczyszczonego enzymu peroksydazy.

Statystyczna analiza danych w przeprowadzonych badaniach

Dane na wykresach dotyczących przykładów badań przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy średniej. Analiza została przeprowadzona w programie Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) z użyciem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) oraz testu post hoc Newmana-Keulsa. Wartości $p < 0,05$ były uznane za istotne statystycznie.

Przykład 2

Badanie oceniające działanie przeciwzapalne ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej, wykorzystujące mysie komórki makrofagowe linii RAW264.7 stymulowane LPS.

Schemat badania

Komórki linii RAW264.7 hodowano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementowanej 10% surowicą (bovine calf serum), 2 mM alanylo-glutaminą (Ala-Gln), 0,5% roztworem penicyliny/streptomycyny, 1 mM pirogronianem sodu oraz 25 mM buforem HEPES. Komórki hodowano w temperaturze 37°C przy stężeniu 5% CO₂. Pożywkę wymieniano co drugi lub trzeci dzień, a komórki poddawano pasażom po osiągnięciu ok. 80% konfluencji.

Cytotoksyczność ekstraktu została oceniona z pomocą testu Neutral Red Uptake (NRU). Preparat został przebadany w stężeniach 50 µg/ml oraz 100 µg/ml, wybranych na podstawie badań wstępnych.

Oznaczenie jest oparte na barwieniu żywych komórek czerwienią neutralną, co odzwierciedla aktywność lizosomalną komórek. Komórki zostały wysiane na płytkach 96-dołkowych w gęstości 20 000 komórek na dołek. Przez 48 godzin komórki były wystawione na działanie badanego ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej w stężeniach 50 µg/ml oraz 100 µg/ml w objętości 200 µl na dołek. Następnie pożywka została usunięta i dodano 100 µl roztworu czerwieni neutralnej w pożywce hodowlanej o stężeniu 0,05 mg/ml na dołek. Po godzinnej inkubacji komórki zostały jednokrotnie przemyte roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, pH 7,4), a następnie dodano 100 µl rozpuszczalnika na dołek (zawierającego 40% etanolu i 10% kwasu octowego w roztworze wodnym). Płytki wytrząsano przez 10 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikropłytek (iMARK Microplate Reader, Biorad). Cytotoksyczność wyrażono jako procent kontroli negatywnej (zawierającej pożywkę bez badanych preparatów).

Test Griessa został wykorzystany, aby oznaczyć stężenie azotynów w supernatantach z hodowli komórkowej. Komórki zostały wysiane na płytkach 96-dołkowych w gęstości 20 000 komórek na dołek. Przez 24 godziny komórki były hodowane w medium (kontrola), lub wystawione na działanie 0,5 µg/ml LPS samodzielnie lub w połączeniu z badanym ekstraktem z kawowej łuski srebrzystej w stężeniach 50 µg/ml oraz 100 µg/ml w objętości 200 µl na dołek. Następnie medium zostało usunięte i dodano pożywki zawierające badane preparaty, lecz bez dodatku LPS. Po kolejnych 24 godzinach miesza-

równe objętości supernatantów z hodowli oraz wodnego roztworu odczynnika Griessa w stężeniu 40 mg/ml. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w ciemności, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikroplatek (iMARK Microplate Reader, Biorad).

Wyniki

Test NRU został wykorzystany do określenia stężeń w których badany ekstrakt nie zmniejszał żywotności komórek RAW264.7. Ekstrakt stosowany w stężeniach 50 µg/ml oraz 100 µg/ml nie spowodował zmniejszenia żywotności komórek (Fig. 1).

Test Griessa wykazał zmniejszone wydzielanie tlenu azotu przez komórki traktowane badanym ekstraktem, co zaobserwowano przez zmniejszone stężenie azotynów w supernatantach z hodowli komórkowej. Ekstrakt z kawowej łuski srebrzystej w stężeniu 50 µg/ml obniżył stężenie azotynów do $77,00 \pm 6,74\%$, a w stężeniu 100 µg/ml do $54,07 \pm 9,01\%$ ($p < 0,01$, Fig. 2).

Wnioski

Ekstrakt z kawowej łuski srebrzystej wykazuje działanie przeciwzapalne w modelu *in vitro* z wykorzystaniem komórek RAW264.7 stymulowanych LPS.

Przykład 3

Badanie oceniające działanie lecznicze ekstraktu, wykorzystujące mysz ostry chemiczny model zapalenia jelita grubego przypominający obrazem klinicznym aktywną postać choroby wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u ludzi.

Badana populacja

Samce myszy C57BL/6 w wieku 6–8 tygodni (masa ciała 20–25 g).

Na przeprowadzenie badania została wydana zgoda przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi (34/ŁB96/2018 z dn. 14.05.2018 roku).

Schemat badania

Droga podania: doustnie (per os, p.o.), dwa razy dziennie, dawka 1 mg/kg masy ciała.

Podawanie ekstraktu nastąpiło po 3 dniach od rozpoczęcia badania. Podanie ekstraktu odbywało się drogą dożołądkową i było wykonywane za pomocą metalowej sondy dożołądkowej, w objętości całkowitej 100 µL roztworu. Gryzonie były unieruchamiane w pozycji pionowej, przy jednoczesnym ograniczeniu ruchów głowy, poprzez zebranie fałdów skóry na karku. Sonda dożołądkową była powoli wprowadzana do przełyku tak, aby ograniczyć ryzyko jego uszkodzeń i wystąpienia krwawienia. Ekstrakt podawany był stopniowo, aby zapobiec nagłemu wzrostowi ciśnienia w żołądku i przeniesienia treści pokarmowej wzdłuż układu pokarmowego. Całkowity czas unieruchomienia był ograniczony do niezbędnego minimum (<1 minuta). Po podaniu myszy były przenoszone do klatek i obserwowane przez 1–2 minuty w celu potwierdzenia prawidłowości wykonanej procedury. W trakcie podawania nie zaobserwowano silnie wyrażonych odruchów obronnych, nie występowała wokalizacja, myszy nie wydawały „nie-typowych” dźwięków świadczących o dystresie, czyli nie było oznak niewłaściwego traktowania zwierząt. Bezpośrednio po podaniu nie odnotowano żadnego deficytu psychomotorycznego.

W celu ewaluacji potencjalnego działania leczniczego dla metod: ocena makroskopowa jelita grubego wraz ze szczególnym uwzględnieniem morfologii stolca oraz oznaczenia aktywności MPO w tkance, zastosowano parametry określone odpowiednio jako: całościową ocenę makroskopową jelita grubego, w tym parametr „stool score” oraz liczba jednostek MPO w badanej tkance.

Wyniki

U zwierząt z wywołanym stanem zapalnym ocena makroskopowa statystycznie znacząco różniła się od oceny przeprowadzonej u zwierząt kontrolnych ($13,13 \pm 0,42$ versus $0,67 \pm 0,49$, $p < 0,001$). Podanie ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej obniżyło ocenę makroskopową ($11,00 \pm 0,61$, $p < 0,05$) (Fig. 3). Różnica ta była istotna statystycznie.

Poziom aktywności MPO osiągnął wyższą wartość u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym niż u zwierząt kontrolnych ($9,70 \pm 3,54$ vs. $3,65 \pm 1,10$). Podanie ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej obniżyło poziom aktywności MPO ($3,45 \pm 0,61$) (Fig. 4).

Wnioski

Podanie ekstraktu z kawowej łuski srebrzystej złagodziło stan zapalny w mysim modelu zapalenia jelita grubego wywołanego przez DSS.

Pozyskane ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym w produkcji leków i suplementów diety oraz w przemyśle spożywczym w produkcji żywności funkcjonalnej o ukierunkowanych właściwościach prozdrowotnych.

Literatura:

- [1] Wojdyło i in. Comparison of polyphenolic composition, antioxidant activity and PPO activity of some cultivars of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 2762–2772.
- [2] Sałaga i in.: "Novel orally available salvinorin a analog PR-38 protects against experimental colitis and reduces abdominal pain in mice by interaction with opioid and cannabinoid receptors"; *Biochem. Pharmacol.* 92, 618–626 (2014).

Zastrzeżenia patentowe

1. Ekstrakt z kawowej łuski srebrzystej, zawierający co najmniej 4,5% wag. związków polifenylo-
wych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy, do zastosowania w profilaktyce i leczeniu cho-
rób zapalnych jelit.
2. Ekstrakt do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że choroby zapalne jelit obej-
mują nieswoiste choroby zapalne jelit.
3. Ekstrakt do zastosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że nieswoiste choroby zapalne
jelit obejmują chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego.
4. Ekstrakt do zastosowania według jednego z powyższych zastrzeżeń, **znamienny tym**, że jest
stosowany doustnie dwa razy dziennie w dawce co najmniej 1 mg/kg masy ciała pacjenta.
5. Ekstrakt do zastosowania według zastrz. 4, **znamienny tym**, że pacjentami są osoby ze zdia-
gnozowaną nieswoistą chorobą zapalną jelit lub osoby z historią nieswoistej choroby zapalnej
jelit w rodzinie.

Rysunki

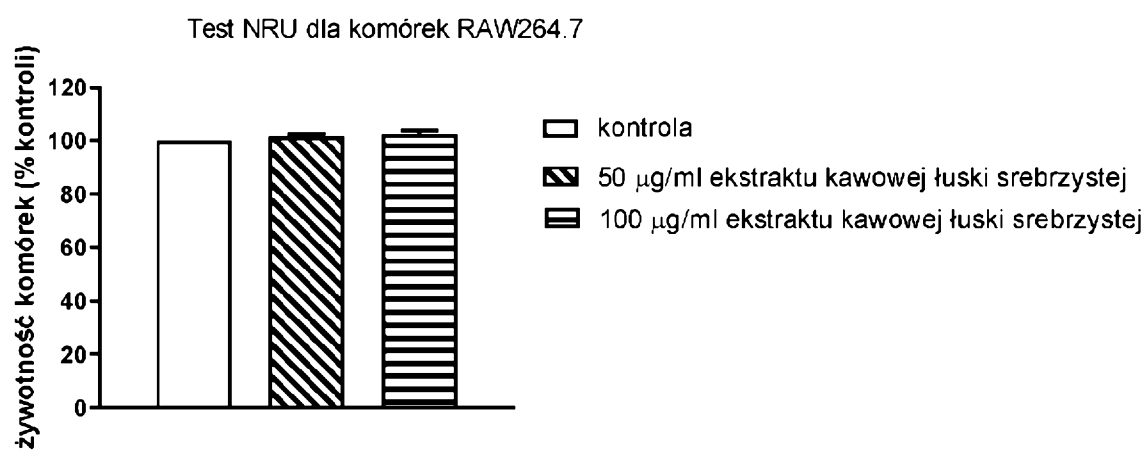


Fig. 1

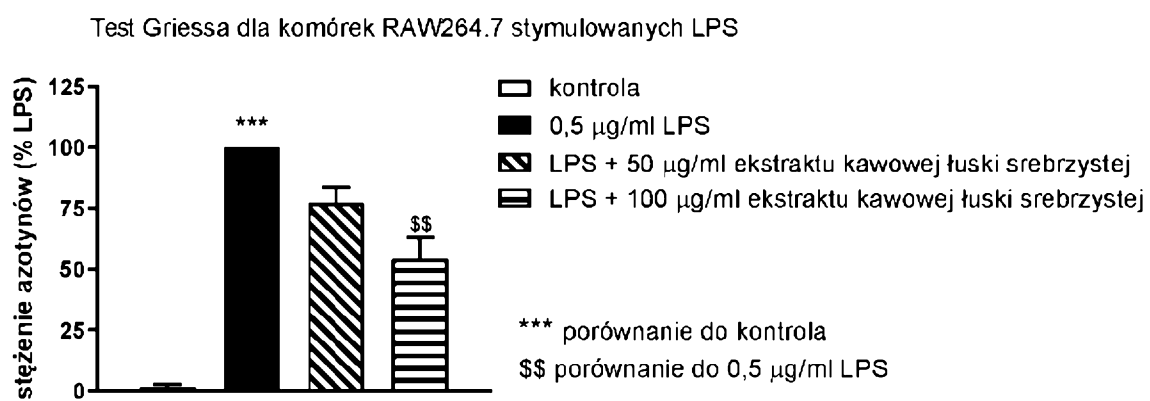


Fig. 2

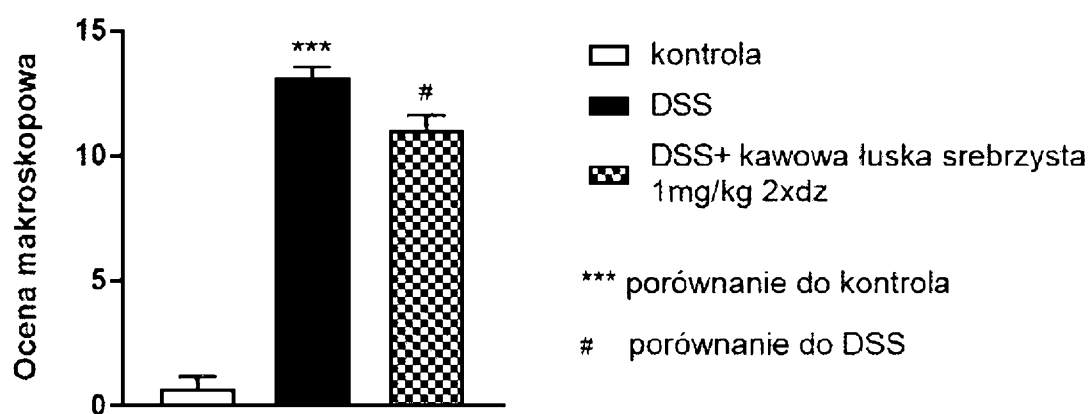


Fig. 3

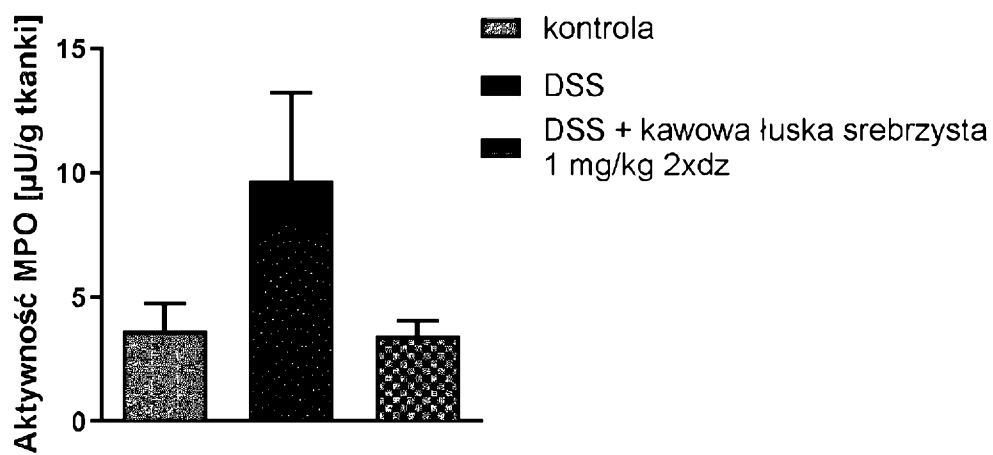


Fig. 4