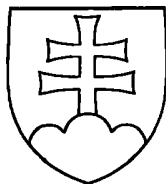


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 19.09.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9619700.9, 9711171.0,
9711172.8, 9711173.6
(32) Dátum priority: 20.09.96, 31.05.97,
31.05.97, 31.05.97
(33) Krajina priority: GB,GB,GB,GB
(40) Dátum zverejnenia: 06.08.99
(86) Číslo PCT: PCT/GB97/02537, 19.09.97

(21) Číslo dokumentu:

355-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.6 :

**A 23L 1/30,
A 23L 1/302,
A 61K 35/78**

(71) Prihlasovateľ: THE HOWARD FOUNDATION, Great Shelford, Cambridgeshire, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Howard Alan Norman, Great Shelford, Cambridgeshire, GB;
Nigdikar Shailja Vijay, Newmarket, Suffolk, GB;
Rajput-Williams Jayshri, Huntingdon, Cambridgeshire, GB;
Williams Norman Ross, Huntingdon, Cambridgeshire, GB;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Suchá zmes s obsahom flavonolov, nápoj s jej obsahom a jej použitie

(57) Anotácia:
Suchá zmes získavaná z rastlín, obsahujúca flavonoly, vhodná na konzumáciu ľuďmi, ktorá obsahuje najmenej 25 % hmotnostných polyfenolov, a jej použitie na inhibíciu oxidácie plazmových LDL a/alebo stimulovanie tvorby TGF- β , a/alebo inhibíciu agregácie krvných doštičiek, a/alebo stimulovanie fibrinolýzy, nápoj s obsahom tejto zmesi a jej použitie.

Suchá zmes s obsahom flavonolov, nápoj s jej obsahom a jej použitie

Oblasť techniky

Vynález sa týka, *inter alia*, určitých zmesí, ich použitia a potravinových doplnkov a nápojov určených na spotrebu ľuďmi, ktoré obsahujú tieto zmesi.

Doterajší stav techniky

Vysoká spotreba vína vo Francúzsku sa považuje za dôležitý faktor stravy, spôsobujúci nízky výskyt úmrtnosti na koronárne srdcové choroby (CHD) a predpokladá sa, že aspoň čiastočne je to možné vysvetlenie javu známeho ako "Francúzsky paradox" (Renaud & De Lorgeril 1992), Francúzsko je výnimka v porovnaní s väčšinou iných krajín pretože CHD úmrtnosť je nízka, bez ohľadu na vysoký príjem nasýtených tukov.

Existuje rozsiahla literatúra o údajných priaznivých účinkoch červeného vína vo vzťahu k prevencii koronárnych srdcových chorôb (CHD). Epidemiologické údaje potvrdzujú, že ochrana poskytovaná vínom je vyššia ako ochrana inými alkoholickými nápojmi, ako je napríklad pivo a destiláty, čo naznačuje, že k tomuto efektu prispievajú iné faktory než obsah alkoholu vo víne (St Leger a spol., 1979; Renaud & De Lorgeril 1992). Vo výhliadkovej štúdii v Kodani, Dánsko sa vyhodnotili rôzne parametre (vrátane príjmu alkoholu, zvyku fajčiť a indexu telesnej hmotnosti) u 13285 ľudí dosahujúcich 12 rokov prežitia. Zistilo sa, že nízky až mierny príjem vína (ale nie piva alebo destilátov) bol spojený s nižšou úmrtnosťou na kardiovaskulárne a cerebrovaskulárne choroby a iné takéto príčiny (Gronbaek a spol., 1995). Tieto výsledky potvrdili výsledky skôr uvedené v USA (Klatsky & Armstrong, 1993).

Pribúdajú dôkazy, že reťazová reakcia voľných radikálov peroxidácie tukov, zahrnujúca oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) hrá významnú prispievajúcu úlohu vo vývoji aterosklerózy a CHD (Steinberg, 1993).

Frankel a spol.. (Lancet 1993 341, 454 až 457) preskúšal schopnosť

zriedeného dealkoholizovaného červeného vína inhibovať oxidáciu ľudských LDL *in vitro* a zistilo sa, že víno je veľmi aktívne ako antioxidant. Autori predpokladajú, že bežná konzumácia červeného vína môže "znižovať" oxidáciu lipoproteínov a znižuje trombotický fenomén". Avšak autori priznali, že "potrebujeme poznať viac o farmakokinetike vínných flavonoidov a absorpcii a metabolizme vínných fenolov, ak máme zhodnotiť ďalšiu potenciálnu úlohu antioxidantných látok v červenom víne pri znižovaní CHD".

Flavonoidy patria ku skupine látok nazývaných polyfenoly (PP), takto nazývané pretože obsahujú dve alebo viac fenolových skupín. Polyfenoly sa vyskytujú hojne v červenom víne a pozostávajú z veľkého počtu rôznych chemických látok s rôznymi molekulovými hmotnosťami. Hlavné polyfenolové zložky hrozna a vína a ich koncentrácie sú opísané Shahidi & Nazck (1995) v "Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications" (Technomic Publishing Co., Lancaster Pa, USA) str.136 až 146. Medzi polyfenolmi sú nasledujúce triedy: flavonoidy (pojem často používaný na označenie polyfenolov všeobecne, ale bežnejšie v Európe len na označenie flavónov), flavanoly, proantokyanidíny (tiež nazývané prokyanidoly, prokyaníny, prokyanidíny a taníny) a antokyaníny.

Flavóny sú látky so základnou štruktúrou uvedenou na Obrázku 2, v ktorom sú dva benzénové kruhy (A a B) spojené s heterocyklickým šesť-členným kruhom C, ktorý obsahuje karbonylovú skupinu. Kruh B môže byť pripojený v polohe 2 (ako je na ilustrácii), čím sa poskytne flavón alebo v polohe 3, čím sa poskytne izoflavón. Hydroxylácia sa môže vyskytovať v polohách 3, 5, 7 a 3', 4', 5', čím sa poskytnú látky nazývané flavonoly. Typické príklady flavonolov sú: kvercetín (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 3', 4'), kampferol (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 4'), a myricetín (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 3', 4', 5'). Môžu prirodzene sa vyskytovať ako aglykón alebo ako O-glykozidy (napríklad D-glukóza, galaktóza, arabinóza, ramnóza atď.). Zistili sa tiež iné formy substitúcie ako napríklad metylácia, sulfonácia a malonylácia.

Flavanoly majú základnú štruktúru uvedenú na Obrázku 3. Dva najbežnejšie flavanoly sú katechín (hydroxylové skupiny v polohách 5, 7, 3', 4') a jeho stereoizomér epi-katechín. Hydroxylové skupiny môžu byť esterifikované

kyselinou galovou (uvedená na Obrázku 4). Proanto-kyanidíny sú polyméry katechínu a/alebo epikatechínu a môžu obsahovať až do 8 jednotiek alebo viac.

Antokyaníny sú farebné látky so základnou štruktúrou uvedenou na Obrázku 5. Niekedy sú nazývané antokyanidíny. Typické príklady sú: kyanidín (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 3', 4'), delphinidín (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 3', 4', 5') a pelargonidín (hydroxylovaný v polohách 3, 5, 7, 3'). Hydroxylové skupiny sú obvykle glykozylované a/alebo metoxylované (napríklad malvidín v polohe 3', 5').

Do všeobecného pojmu „polyfenoly“ sú zahrnuté kyseliny dihydroxy- alebo tri-hydroxy-benzoové a fytoalexíny, ktorých typickým príkladom je resveratrol (uvedený na Obrázku 6).

Najpoužívanejšou metódou na určenie oxidácie LDL je použitie prechodného kovu medi (konkrétne iónov Cu^{2+}) ako katalyzátora na umožnenie oxidácie endogénnych lipidových hydroperoxidov. Antioxidanty prítomné v LDL, zvlášť alfa-tokoferol, odďaľujú oxidačný proces a spôsobujú takzvanú fázu oneskorenia. Proces sa môže ľahko sledovať v UV spektrofotometri pretože oxidačná reakcia produkuje konjugované diény, ktoré sa môžu kontinuálne monitorovať pri 234 nm (Esterbauer a spol., 1989). Na ochranu LDL pred oxidáciou počas uskladnenia sa pridáva EDTA, aby sa komplexovala meď a iné stopové prvky. Tento prebytok EDTA interferuje s meďou katalyzovanou oxidáciou. EDTA sa môže odstrániť pomocou dialýzy LDL prípravkov pred prídavkom iónov medi alebo sa môže pridať prebytok iónov medi na kompenzovanie viazaných s EDTA.

Výsledky *in vitro* experimentov trochu podobné na výsledky opísané Frankelom a spol., (Lancet 1993, citované vyššie) boli tiež publikované Frankelom a spol., v 1995 (J. Agricult. and Food Chemistry 43, 890 až 894). Autori tejto publikácie venovali pozornosť obtiažnosti interpretovať *in vitro* údaje. Teda, „Hoci fenolické látky majú podobné chemické vlastnosti, ich redukčná kapacita nie je veľmi presným prediktorom ich antioxidantnej aktivity. V LDL oxidačnej skúške a iných testoch antioxidantnej aktivity je systém typicky heterogénny a fyzikálne vlastnosti, ako napríklad lipofilita, rozpustnosť a rozdeľovanie medzi vodnú a lipidovú fázu LDL, sa môžu stať významnými pre určenie antioxidantnej aktivity“.

Odborník v tejto oblasti určite uzná, že extrapolácia od *in vitro* zistení po *in vivo* situácie je často nenáležitá. Odkazujeme čitateľa ako príklad na publikáciu McLoone a spol., (1995 Proc. Nutr. Soc. 54, Abstrakt 168A), ktorá ukazuje, že hoci látka luteín má schopnosť inhibovať oxidáciu LDL *in vitro*, doplnenie stravy ľudských dobrovoľníkov s luteínom počas 2 týždňov (ktoré poskytlo 6-násobný vzrast hladín luteínu v plazme) nemalo účinok na oxidáciu LDL.

Na výskum možných priaznivých účinkov červeného vína na zdravie sa majú konať niektoré *in vivo* skúšky. Fuhrman a spol., (1995 Am. J. Clin. Nutr. 61, 549 - 554) zistil, že "Niektoré fenolové látky, ktoré sa vyskytujú v červenom víne, ale nie v bielom víne, sú absorbované, viazané na plazmové LDL, a môžu zodpovedať za antioxidantné vlastnosti červeného vína" a poskytol vo svojich slovách prvú demonštráciu „že konzumácia červeného vína inhibuje sklon LDL podliehať peroxidácii lipidov", a že to môže prispieť k spomaleniu aterosklerózy. Avšak, štúdia Sharpe a spol., výsledky ktorej boli publikované (Q. J. Med. 1995 88, 101 až 108) takmer súčasne so štúdiou Fuhrman a spol., zistila, že ani konzumácia červeného vína ani bieleho vína nemala účinok "na celkový cholesterol, triglyceridy, HDL alebo miery antioxidantného charakteru, vrátane citlivosti LDL k oxidácii".

De Rijke a spol., tiež skúmali tento materiál a viedli randomizované dvojito-slepé skúšky. Uviedli svoje zistenia v 1996 (Am. J. Clin. Nutr. 63, 329 až 334) a zistili, že "Výsledky tohto štúdia neukazujú priaznivý účinok konzumácie červeného vína na oxidáciu LDL".

Teda sumárne, existujú viaceré odkazy, že zriedené červené víno môže inhibovať oxidáciu LDL pri *in vitro* skúškach, ale že tieto zistenia nemôžu nevyhnutne byť prenesené na *in vivo* situáciu. Ďalej, *in vivo* údaje týkajúce sa inhibovania oxidácie LDL pomocou konzumácie červeného vína sú prinajlepšom konfliktné a nie je jasný dôkaz potvrdzujúci, že konzumácia červeného vína má účinok na oxidáciu LDL.

Teraz sú verejne dostupné početné zmesi, ktoré sa pripravujú z vína alebo hroznových vedľajších produktov a ktoré môžu obsahovať polyfenoly (aj keď u niektorých zmesí pri dosť nízkych hladinách). Medzi nimi sú kapsuly Francúzsky Paradox (dostupné od Arkofarma). Kapsuly Francúzsky Paradox sa vyrábajú

pomocou prípravy extraktu z matolín (odpad hroznových šupiek zostávajúci po fermentácii vína). Väčšina z polyfenolov prítomných v hroznových šupkách je rozpustná v alkohole a teda majú sklon extrahovať sa do fermentujúceho sa vína. Teda, kapsuly Francúzsky Paradox majú v skutočnosti dosť nízky obsah polyfenolov. (Iné verejne dostupné zmesi zahŕňujú prášok, obsahujúci antokyaníny (získateľné od Sefcal) vyrobený z extraktu hroznových šupiek, a ktorý sa používa ako potravinárske farbivo, a zmes, obsahujúcu proantokyanidín („Endotelon“) pripravenú z hroznových semien.)

Aj keď kapsuly Francúzsky Paradox obsahujú významné množstvá polyfenolov, nie je jasné, že by orálna konzumácia takýchto syntetických polyfenolových zmesí vykazovala rovnaký terapeutický účinok údajne spojený s konzumáciou červeného vína. Napríklad, ako je vysvetlené Goldbergom (1995 Clin. Chem. 41, 14 až 16), obsah alkoholu vo víne udržiava polyfenoly v roztoku vo víne a v ľudskom čreve, takže môžu byť dostupné na absorpciu. Syntetický bezalkoholový polyfenolový prášok môže byť úplne neúčinný, pretože polyfenoly sú nedostatočne rozpustné v čreve (v neprítomnosti alkoholu) na to, aby boli absorbované. Okrem toho, absorpcia do krvného obehu možno nie je dostatočná na to, aby vykazovala anti-oxidačný účinok na LDL - môže sa požadovať tesné spojenie polyfenolov s LDL frakciou.

Zistilo sa, že mnohé choroby sú spôsobené alebo vyvolané mechanizmom oxidácie voľných radikálov; napríklad rakovina, šedý zákal, cukrovka atď. Antioxidačné živiny, ako napríklad vitamín E, vitamín C a iné, sa považujú za prevenciu oxidácie voľných radikálov v mnohých orgánoch a tkanivách. Teda absorpcia polyfenolov, ktoré sú účinné antioxidanty, sú spôsobilé pôsobiť na choroby spojené s voľnými radikálmi/oxidáciou všeobecne, a použitie polyfenolov môže byť oveľa širšie ako liečenie alebo prevencia koronárnych srdcových chorôb.

Napriek tomu, CHD sú jednou z hlavných príčin úmrtnosti a chorobnosti v západnom svete, a preto majú zvláštny význam. Patogenéza chorôb pozostáva v podstate z dvojstupňového procesu, ktorý zahŕňa najprv vývoj aterosklerotických povlakov a potom tvorbu trombu (zrazenina) na povlaku (proces nazývaný trombóza), ktorý môže spôsobiť arteriálnu oklúziu, ktorej dôsledkom môže byť

infarkt myokardu (MI) a náhla smrť. Iné choroby, ktoré sú spôsobené trombózou sú mŕtvica a trombóza žíl. Počiatočným štádiom pri tvorbe trombu je agregácia krvných doštičiek, ktoré potom uvoľňujú koagulačné faktory do krvi, čím spôsobujú produkciu fibrínových zrazenín. Keď sa tvoria krvné zrazeniny, môžu byť odstraňované pomocou procesu známeho ako fibrinolýza, ktorá je v podstate rozpúšťaním zrazenín a degradácia fibrínu na degradačné produkty. Teda existujú najmenej dva procesy, pomocou ktorých sa dá predchádzať trombóze: inhibícia agregácie krvných doštičiek, alebo zvýšenie fibrinolýzy.

Abnormálne bujnenie buniek hladkého svalstva ciev (VSMC) môže prispievať k tvorbe obštruktívnych lézií pri koronárnych srdcových chorobách, ateroskleróze, restenóze, mŕtvici a neoplazmách hladkého svalstva čriev, maternice, myóme maternice alebo fibróme.

Mnoho rokov je známe, že TGF- β je jedným z najsilnejších inhibítorov rastu buniek (Massagué, 1990), a viacerí autori zistili, že TGF- β inhibuje VSMC proliferáciu (Assolian, 1986; Bjorkerud, 1991; Owens, 1988; Kirschenlohr, 1993). Ľudské VSMC produkujú TGF- β v latentnej, inaktívnej forme, ktorá sa aktivuje proteolyticky pomocou sérového proteínu plazmínu, ktorý sa získava z plazminogénu pomocou skupiny plazminogénových aktivátorov (PAs), ako napríklad tkanivový plazminogénový aktivátor (tPA) (Lyons, 1990). Vzrast celkového plazmového TGF- β sa považuje za účinný faktor na inhibovanie rastu VSMC, pretože sa latentná forma konvertuje na aktívnu formu pomocou plazmínu.

Viacerí autori vyvinuli metódy na určenie plazmovej hladiny TGF- β a na hľadanie farmaceutických látok, ktoré môžu stimulovať tvorbu TGF- β aj v latentnej aj v aktívnej forme. V US 5,545,569 (Grainger a spol.) je opísaná metóda na určenie *in vitro* účinnosti látok, ktoré zvyšujú plazmové hladiny TGF- β a stimulujú jeho tvorbu, použitím techník opísaných v uvedenom dokumente. W094/26303 (Grainger a spol.) opisuje metódu udržiavania alebo vzrastu priemeru ciev chorých alebo poranených ciev cicavcov pomocou podávania účinného množstva TGF- β aktivátora alebo tvorbou stimulátora. Látka Tamoxifen (trans-2-[4-(difenyli-1-butanyli)fenoxi]-dimetyl-etylamin) je nárokovaná ako účinná látka, pretože stimuluje

tvorbu TGF- β , a zvyšuje pomer aktívneho ku latentnému TGF- β . Ďalšia látka vykazujúca túto aktivitu je aspirín (Grainger, a spol., 1995), ktorý zvyšuje aj celkový aj aktívny sérový TGF- β u normálnych ľudí, ale len celkový TGF- β u pacientov s koronárnou srdcovou chorobou.

Vzrast agregácie krvných doštičiek bol tiež významne spojený s rozšírením (Elwood a spol., 1991) a dopadom (Thaulou a spol., 1991) CHD. Agregácia krvných doštičiek sa pohodlne študuje použitím agregometra krvných doštičiek, v ktorom sa z krvi čerstvo získaná suspenzia krvných doštičiek umiestni do kontaktu s agonistickou látkou, ktorá spôsobí agregáciu. Môžu sa použiť mnohé agonistické látky, ale najtypickejšími sú kyselina arachidonová, ADP, kolagén a trombín. Z merania maxima agregácie (%) je možné študovať účinky inhibítorov agregácie krvných doštičiek, ktoré sa môžu podávať subjektu orálne alebo pomocou injekcie. Jednou z najúčinnějších látok na prevenciu agregácie krvných doštičiek je aspirín, ktorý inhibuje aktivitu cyklo-oxygenázy a tvorbu tromboxánu, faktora nutného pri tvorbe trombu (Moncada & Vane, 1979). Aspirín tiež bráni CHD, mŕtvici a náhlejši smrti (Hennekens a spol., 1988).

Fibrinolytický systém tvorí kaskádu extra-celulárnych proteolytických reakcií pevne regulovaných pomocou aktivátorov a inhibítorov. Enzymový plazminogénový aktivátor tkanivový-typ (tPA) konvertuje plazminogén na plazmín, ktorý zas rozpúšťa fibrínové zrazeniny. t-PA je glykoproteín syntetizovaný v endotelových bunkách, ktorý sa adsorbuje na fibrín, aby sa tak aktivoval. Inhibítor plazminogénového aktivátora (PAI)-1, je inhibítorom serínproteázy a pôsobí ako špecifický inhibítor t-PA. PAI-1 sa vyskytuje v troch formách: aktívny, latentný a ako inaktívny komplex. Syntetizuje sa v endotelových bunkách, pečeni a krvných doštičkách.

V krvnom obehú je väčšina tPA (95%) komplexovaná s PAI-1. Veľmi málo z tPA a PAI-1 je vo voľnej (aktívnej) forme. Znížená fibrinolytická aktivita sa považuje za zodpovednú za zvýšenie hladiny PAI-1 alebo aktivity, ktorá spôsobuje zníženie aktivácie plazminogénu na plazmín pomocou tPA. To je dôležité pre posúdenie spojenia medzi zníženou fibrinolytickou aktivitou a rizikom CHD (Mehta a spol.,

1987) a MI. Zmenšená fibrinolýza, hlavne na zvýšenie plazmového PAI-1, je bežným zistením pri trombotickej chorobe. V Northwick Park Heart Study, prieskumnej epidemiologickej štúdii mužov v strednom veku (40 až 54 pri vstupe), Meade a spol., (1987) uviedli, že znížená fibrinolytická aktivita je hlavným nezávislým rizikovým faktorom pre budúcu CHD. Prierezové štúdie pacientov s angínou pectoris alebo s predchádzajúcim infarktom myokardu konzistentne ukázali zníženú fibrinolytickú aktivitu u pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou (Hamsten a spol., 1985 a 1986; Johnson 1984; Paramo a spol., 1985; Aznar a spol., 1986; Francis 1988; a Olofson a spol., 1989). U MI pacientov sa PAI-1 koncentrácie ukázali vyššie v porovnaní s kontrolnými osobami (Hamsten a spol., 1987).

Spôsob zníženia agregácie krvných doštičiek a/alebo zvýšenia fibrinolýzy by sa mohol vzhľadom na úlohu pri agregácii krvných doštičiek a fibrinolýze v tvorbe trombu použiť ako metóda liečenia trombotickej choroby všeobecne a CHD zvlášť.

Podstata vynálezu

V prvom uskutočnení vynález poskytuje z pestovaných rastlín získavanú suchú zmes, obsahujúcu flavonol vhodnú pre konzumáciu ľuďmi, kde najmenej 25 % hmotnostných získavaného materiálu z rastlín v zmesi predstavuje polyfenoly.

Ako vysvetlenie, z pestovaných rastlín získavané zmesi môžu obsahovať extrakty rastlín alebo ich častí (ako napríklad hľuzy, plody), ktoré sa nejakým spôsobom môžu spracovať (napríklad pomocou fermentácie). Teda z pestovaných rastlín získavané zmesi zahŕňujú vodné alebo organické rozpúšťadlové extrakty rastlín alebo ich častí, ovocných štiav a fermentovaných kvapalín (napríklad vína) vyrábaných z rastlín alebo ovocnej šťavy, alebo zmesí získaných z niektorých z predchádzajúcich materiálov. Rastlinný materiál sa typicky spracuje (fyzikálne a/alebo chemicky) počas výroby zmesi na extrakt polyfenolov z rastlín a tak sa zvýši a obohatí polyfenolový obsah v zmesi.

Výhodne zmes môže byť taká, že získavaný materiál z rastlín predstavuje najmenej 35 % hmotnostných polyfenolov alebo viac, výhodne najmenej 45 %

hmotnostných polyfenolov.

Zmes môže obsahovať úplne alebo podstatne z rastlín získavaný materiál, z ktorého sa získa flavonolový obsah zmesi. Alternatívne zmes môže obsahovať iný materiál, ako napríklad príchute, vehikulá, nosiče a podobne konvenčne používaný pri príprave zmesí na konzumáciu ľuďmi.

Pojem "z pestovaných rastlín získavaný materiál" v zmesi zodpovedá tomu podielu zmesi, ktorý pochádza z rovnakého zdroja, ako flavonolový obsah zmesi. Zmes môže tiež obsahovať iné zložky (napríklad škrob alebo príchute) získané z rastlín, ale tieto nie sú považované za "z pestovaných rastlín získavaný materiál", ak nie sú získané z rovnakého zdroja ako flavonolový obsah zmesi.

Výhodne je zmes taká, že flavonolový obsah je najmenej 0,5 % hmotnostného, výhodne najmenej 1 % hmotnostné a výhodnejšie najmenej 2 % hmotnostné celkového získavaného polyfenolového obsahu zmesi z rastlín.

Je tiež výhodné, ak flavonolový obsah zmesi ako celok je najmenej 0,01 % hmotnostného, výhodnejšie najmenej 0,1 % hmotnostného a najvýhodnejšie najmenej 1 % hmotnostné.

V druhom aspekte vynález poskytuje z rastlín získavanú suchú zmes obsahujúcu flavonol, ktorá obsahuje najmenej 0,01 % hmotnostného flavonolu, výhodnejšie najmenej 0,1 % hmotnostného, a najvýhodnejšie najmenej 1 % hmotnostné.

Zmesi definované vyššie sú typicky pri atmosférickom tlaku (101 kPa (760 mm Hg)) v teplotnom rozsahu 10 až 20 °C tuhé. Zmes môže byť časticová (napríklad prášková alebo granulovaná), alebo môže byť formovaná do kapsúl, tabliet a podobne.

Prekvapivo sa zistilo, že zmesi podľa tohto vynálezu sú účinné po orálnej konzumácii ľudskými subjektami, na inhibovanie oxidácie plazmových LDL, podľa meraní pomocou mnohých kritérií. Teda orálna konzumácia zmesi je účinná na vzrast fázy oneskorenia pri oxidácii izolovaných plazmových LDL podľa určenia pomocou metódy Esterbauera a spol., (1989 Free Radic. Res. Commun. 6, 67 až 75). Stručne, pri tejto metóde sa LDL izolované z pacientovej plazmy pomocou ultracentrifúgy dialyzujú na odstránenie EDTA, a k LDL (prítomným s koncentráciou

50 mg/l) sa pridajú ióny medi (5 $\mu\text{mol/l}$). Obvyklá doba oneskorenia pred tvorbou diénu je asi 50 až 60 minút. Podávanie zmesi podľa tohto vynálezu subjektu by malo poskytnúť predĺženie doby oneskorenia výhodne najmenej 2 minúty (alebo asi 4 % alebo viac). Najvýhodnejšie je v rozsahu 5 až 25 minút (alebo asi 10 až 50 %). Okrem toho je zmes účinná (po orálnej konzumácii) na zníženie množstva lipidových peroxidov v plazme ľudských subjektov (podľa vyhodnotenia pomocou metódy Gorog a spol., 1994, a ako je opísané nižšie).

Zmesi vhodne obsahujú polyfenoly (vrátane flavonolov) získané z hrozna (celého hrozna alebo jeho častí, ako napríklad zo šupiek alebo šťavy), vína (zvlášť červeného vína, ktoré obsahuje oveľa vyššie koncentrácie polyfenolov ako sú v bielom víne), alebo vedľajšie produkty a/alebo odpadové produkty procesu výroby vína, ako napríklad výlisky (t.j. zvyšok z rozdrveného hrozna po extrakcii šťavy) alebo matolina (odpadové tuhé látky zostávajúce po počiatkovej fermentácii). Avšak polyfenoly, ako napríklad flavonoly, sú prítomné v širokom rozsahu prírodne sa vyskytujúcich materiálov, z ktorých mnohé obsahujú vyšší flavonolový obsah ako červeného vína, a tak by mohli predstavovať vhodnejšie zdroje flavonolov. Príklady takýchto materiálov zahŕňujú: ovocie vo všeobecnosti, ako napríklad jablká (napríklad var. "Gravensteiner"), zvlášť jablkové šupky; hrušky (napríklad var. "Williams Christs"); paprika (napríklad var. "Yolo wonder"); červené ríbezle; čierne ríbezle (zvlášť výhodné pre relatívne veľa flavonolov); citróny; čerešne; brusnice; egreše; rajčiny; olivy; a zelenina všeobecne, vrátane: reďkoviek (napríklad var. "Saxa treib"); kalerábu (napríklad "Primavera"); chrenu; zemiakov; cibule; a špargle.

V konkrétnom uskutočnení sa zmes získa z červeného vína a obsahuje reprezentatívny profil v podstate všetkých polyfenolových látok prítomných vo víne (typicky, hoci nie nevyhnutne, prítomné v zmesi v podstate v relatívnych množstvách predstavujúcich množstvá vo víne, z ktorého sa zmes získava). Takáto zmes môže označená ako "celkový polyfenolový súbor".

Polyfenoly sa môžu pohodlne získať z červeného vína alebo iných polyfenoly obsahujúcich kvapalín pomocou absorpcie na živicu v chromatografickej kolóne, s elúciou polyfenolmi obohatenej frakcie z kolóny (typicky po kroku premytia) použitím ako eluenta 40 až 50 % etanolu, alebo iného vhodného

organického rozpúšťadla (ako napríklad metanol, acetón, etylacetát, dichlórmetán a chloroform - ktoré môže byť v vodnom roztoku). Organické rozpúšťadlo je výhodne relatívne prchavé (t.j. má teplotu varu medzi 30 a 85 °C pri tlaku 101 kPa (760 mm Hg)) a tak sa ľahko odstráni, čím zanechá v podstate suchú (t.j. menej ako 10 % hmotnostných H₂O) tuhú zmes obsahujúcu polyfenoly. Takáto metóda sa môže úspešne používať na získanie súboru celkových polyfenolov z červeného vína.

Alternatívne sa polyfenoly môžu získať z červeného vína alebo inej polyfenoly obsahujúcej kvapaliny pomocou rozpúšťadlovej extrakcie použitím vhodného organického rozpúšťadla nemiešateľného s vínom alebo danou inou kvapalinou. Alternatívne sa polyfenoly môžu získať z polyfenoly obsahujúcich tuhých látok pomocou rozpúšťadlovej extrakcie (typicky extrakcia s organickým rozpúšťadlom, ako napríklad etanolom alebo etylacetátom), tuhé látky sa môžu potom separovať od rozpúšťadla pomocou filtrácie alebo centrifugácie. Rozpúšťadlo sa môže potom odpariť, čím zanechá v podstate suchú tuhú zmes obsahujúcu polyfenoly.

Vo výhodných uskutočneniach, predstavuje zmes potravinový doplnok. To môže byť látka určená na prídanie ako prídavná zložka počas výroby potraviny, alebo sa môže samostatná látka konzumovať jedincom (napríklad ako tableta alebo kapsula) v podstate izolovaná (t.j. nezmiešaná) od iných potravinových zložiek pred konzumáciou (hoci sa samozrejme tableta alebo kapsula môže zobrať s potravou). Vynález teda zahŕňa v svojom rozsahu produkt, zvlášť potravinu, obsahujúcu zmes podľa tohto vynálezu. Alternatívne zmes môže predstavovať tuhú látku, z ktorej sa vyrobí nápoj zmiešaním s fyziologicky prijateľným zriedovadlom (ako napríklad mliekom, vodou alebo inou vodnou kvapalinou).

Dávka zmesi podávaná subjektu je závislá na stupni aktivity materiálu, ale bude medzi 10 mg a 10 g za deň. Pre celkový polyfenolový súbor získaný z červeného vína je výhodná dávka 0,1 až 4,0 g/deň, a výhodnejšie 1 až 2 g/deň, ekvivalentná 0,5 až 1 litru červeného vína na deň. Výhodná dávka flavonolu bude v rozsahu 0,1 až 1000 mg za deň, výhodne v rozsahu 0,5 až 500 mg za deň, výhodnejšie v rozsahu 1 až 250 mg za deň.

Odborník v tejto oblasti bude schopný urobiť prípravok polyfenolov

získaných z vína, hrozna alebo vedľajších produktov vína a ďalej ho frakcionovať, čím sa získajú zmesi s koncentrovanejšou aktivitou. To by sa mohlo urobiť pomocou kolónovej chromatografie, rozpúšťadlovej extrakcie, pomocou molekulových sít so semi-permeabilnými membránami, alebo inými metódami konvenčne používanými v potravinárskom priemysle. Výhodou je, že hmotnosť aktívnej látky je menšia a priaznivo sa zmení farba a chuť doplnku.

Zmesi podľa tohto vynálezu sa môžu pripraviť použitím aktívnych polyfenolových činidiel v zhode s konvenčnou praxou potravinových doplnkov alebo farmaceutickou praxou. Zried'ovadlá, vehikulá alebo nosiče atď., ktoré sa môžu používať sú dobre známe v oblasti prípravy potravín a forma zvolená pre každý konkrétny režim bude závisieť na danom kontexte a voľbe toho, kto zmes pripravuje. Všeobecne dávka bude závisieť od koncentrácie polyfenolov v zmesi a na identite danej polyfenolovej látky.

Naviac zmesi môžu obsahovať akýkoľvek počet ďalších zložiek, ako napríklad zložky typicky používané v potravinárskom priemysle a/alebo vo farmaceutickom priemysle. Takéto zložky môžu zahŕňať živiny (zvlášť stopové prvky a vitamíny), antioxidanty, terapeutické látky (zvlášť tie čo majú terapeutický účinok vo vzťahu k prevencii a/alebo liečeniu CHD, konkrétne, aspirín), príchute a sladidlá (zvlášť umelé sladidlá, ako napríklad aspartám atď.).

Príklady uvedené vyššie zahŕňujú nasledujúce látky: karotenoidy, ako napríklad luteín, lycopén, alebo α - a/alebo β -karotén; potravinové antioxidanty alebo anti-zápalové činidlá, ako napríklad vitamín A, vitamín C, vitamín E (α -tokoferol a iné aktívne tokoferoly), kyselina listová, selén, meď, zinok, mangán, ubichinón (koenzým Q10), kyselina salicylová, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová.

Antioxidanty, ako napríklad karotenoidy a vitamín B, sa čiastočne rozkladajú v gastrointestinálnom trakte oxidáciou. Včlenením týchto látok do zmesi podľa tohto vynálezu sa predpokladá, že sa tento proces inhibuje a absorbuje sa viac antioxidantov. Použitie zmesi obsahujúcej α -tokoferol a/alebo aspirín je zvlášť výhodné, pretože sa predpokladá, že takáto zmes poskytuje synergický účinok v

prítomnosti polyfenolov.

Typicky vhodné denné dávky týchto dodatočných zložiek zmesi (a ktoré môžu preto byť zahrnuté v zmesi, takže normálna konzumácia zmesi poskytne príslušnú dávku) sú nasledujúce:

Luteín	2 až 50 mg, napríklad vhodne 7,5 mg
Beta karotén	2 až 20 mg, napríklad vhodne 5 mg
Vitamin A	400 až 600 RE, napríklad vhodne 500 RE
Vitamin C	75 až 250 mg, napríklad vhodne 100 mg
Kyselina listová	0,1 až 1,0 mg, napríklad vhodne 0,2 mg
Selén	80 až 120 mg, napríklad vhodne 90 mg
Meď	2 až 4 mg, napríklad vhodne 3 mg
Zinok	10 až 20 mg, napríklad vhodne 15 mg
Koenzým Q10	10 až 200 mg, napríklad vhodne 30 mg
Aspirín	10 až 150 mg, napríklad vhodne 150 mg

Teda v jednom uskutočnení má zmes formu kapsúl, každá kapsula obsahuje 500 mg polyfenolovej zmesi, s navrhovaným príjmom jednu až štyri kapsuly za deň. Ďalšou prezentáciou je nealkoholický nápoj, ktorý poskytuje účinnú dávku polyfenolov po rozpustení vo vode (obyčajnej alebo prevzdušnenej) ochutenej a osladenej kvôli chuti, alebo zriedené v ovocnej šťave napríklad v hroznovej, v jablkovej alebo v pomarančovej atď.

Pretože môže byť z mnohých dôvodov (napríklad sociálnych, religióznych a ekonomických) výhodné poskytovanie bezalkoholových nápojov obsahujúcich zmes podľa tohto vynálezu, takéto nápoje sa môžu fortifikovať s alkoholom (napríklad s vodkou, ginom, whisky), čím sa poskytne požadovaná hladina 5 až 15 % hmotnostných alkoholu, v závislosti na chuti konzumenta.

Ďalšími prezentáciami sú potravinové zložky v mliečnych produktoch, ako napríklad mlieko a jogurty, zavareniny a diétne produkty určené ako doplnky jedla alebo náhradky. Vyššie uvedené Príklady sú len ilustratívne a nie sú zamýšľané na obmedzenie akýmkoľvek spôsobom.

V treťom aspekte vynález teda poskytuje spôsob inhibovania oxidácie

plazmových LDL u ľudských subjektov; metódu zahrnujúcu prípravu zmesi podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu; a podávanie tejto zmesi subjektu.

Zistilo sa, že orálna konzumácia zmesi podľa tohto vynálezu nie len inhibuje oxidáciu plazmových LDL, táto zmes bude mať tiež účinok stimulovania tvorby transformačného rastového faktora (TGF)-3 *in vivo*. Okrem toho sa zistilo, že orálna konzumácia zmesi podľa tohto vynálezu bude inhibovať agregáciu krvných doštičiek a/alebo stimulovať fibrinolýzu, a tým znižovať sklon k trombóze jedinca, čo je podporou v prevencii a/alebo liečení trombotickej choroby, ako napríklad CHD, mŕtviaci. Konkrétne sa zistilo, že konzumácia zmesi zvyšuje hladiny tPA aktivity v plazme (podľa vhodného merania pomocou skúšok, ako napríklad „Chromolize“ test [dostupný od Biopool, Sweden] opísaný nižšie), účinkom ktorej sa má zvýšiť čistá rýchlosť fibrinolýzy u tohto subjektu.

Podľa štvrtého aspektu vynález poskytuje metódu stimulovania TGF- β tvorby u ľudských subjektov; táto metóda zahrnuje prípravu zmesi podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu; a podávanie tejto zmesi subjektu.

V piatom aspekte vynález poskytuje metódu inhibovania agregácie krvných doštičiek a/alebo stimulovania fibrinolýzy u ľudských subjektov, táto metóda zahrnuje prípravu zmesi podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu; a podávanie tejto zmesi subjektu.

V šiestom aspekte vynález poskytuje na použitie zmes, podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu definovaných vyššie, na výrobu lieku na orálnu konzumáciu ľudským subjektom na inhibovanie oxidácie plazmových LDL u tohto subjektu.

V siedmom aspekte vynález poskytuje na použitie zmes, podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu definovaných vyššie, na výrobu lieku na orálnu konzumáciu ľudským subjektom na stimulovanie tvorby TGF- β u tohto subjektu.

V ôsmom aspekte vynález poskytuje na použitie zmes, podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu definovaných vyššie, na výrobu lieku na orálnu konzumáciu ľudským subjektom na inhibovanie agregácie krvných doštičiek a/alebo stimulovanie fibrinolýzy u tohto subjektu (zvlášť v zrašťom hladiny tPA aktivity v

plazme ľudského subjektu).

Zmes podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu bude typicky poskytovať všetky z vyššie zmienených vlastností zmesiam konzumovaným subjektom. Vynález preto tiež poskytuje spôsob výroby lieku na orálnu konzumáciu ľudským subjektom na účel uskutočnenia u subjektu jedného alebo viacerých nasledujúcich efektov: inhibovanie oxidácie plazmových LDL; inhibovanie agregácie krvných doštičiek; stimuláciu fibrinolýzy; a stimuláciu tvorby TGF- β ; tento spôsob obsahuje prípravu zmesi podľa prvého alebo druhého aspektu vynálezu; ak je to potrebné, zmiešanie zmesi s fyziologicky prijateľným vehikulom alebo nosičom; a prípravu jednotkových dávok zmesi. Vhodné spôsoby výroby liekov sú dobre známe odborníkom v zodpovedajúcej oblasti.

Lieky, ktoré majú tento účinok, môžu mať formu potravinových doplnkov alebo zložiek, ako je vysvetlené vyššie, a mali by byť užitočné v prevencii alebo liečení koronárnych srdcových chorôb. Vhodné dávky liekov, ako je vysvetlené skôr, budú závisieť od koncentrácie a identity polyfenolov v zmesi a od vážnosti chorobného stavu u subjektu, ktorý sa má liečiť. Avšak ako všeobecný návod by výhodne dávka mala byť dostatočná na to, aby poskytla rovnaké množstvo polyfenolov pri konzumácii, ako množstvo poskytnuté konzumáciou najmenej jedného pohára vína za deň (približný ekvivalent k 0,25 g celkového polyfenolového súboru z červeného vína), ale výhodnejšie asi 0,5 až 1,0 l červeného vína za deň (t.j. asi 1,0 až 2,0 g celkových vínových polyfenolov).

Vynález je ďalej opísaný pomocou ilustratívneho príkladu a odkazmi na sprevádzajúce nákresy.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje graf oxidácie LDL oproti času (minúty). Obrázok 2 je schematická reprezentácia jadra štruktúry flavónov. Obrázok 3 je schematická reprezentácia jadra štruktúry flavonolov. Obrázok 4 je schematická reprezentácia štruktúry kyseliny galovej. Obrázok 5 je schematická reprezentácia jadra štruktúry antokyanínov a Obrázok 6 je schematická reprezentácia štruktúry resveratrol.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava polyfenolového prášku z červeného vína

Asi 2000 l červeného vína (Francúzske 1993 Cabernet Sauvignon) sa prefiltrovalo na odstránenie sedimentu a destilovalo sa za vákua pri tlaku 30 kPa (300 milibarov) pri 75 až 80 °C počas 1 minúty, potom sa ochladilo a skoncentrovalo za vákua pri 55 °C a potom sa rýchlo ochladilo na 25 °C pomocou chladničky. Skoncentrované víno sa prepustilo cez kolónu priemeru 55 cm a približne 2 m vysokú, ktorá obsahuje 65 l živice Diaion HP-20. Kolóna sa premyla s 250 l destilovanej vody a polyfenoly sa eluovali s asi 250 l roztoku 50 % hmotnostných etanolu, počas doby asi 150 minút. Na konci tejto doby bol eluát bez polyfenolov, podľa určenia pomocou metódy Folin-Ciocalteu. Eluát sa potom skoncentroval na 35 % suchý materiál za vákuovej destilácie a sušenia rozprašovaním pod dusíkovou atmosférou, čím sa vyrobilo okolo 2 kg prášku s obsahom vlhkosti od 3 do 4 % hmotnostné.

Polyfenolový prášok je výbornou potravinovou zložkou, ktorá má tmavo červenú farbu, po rozpustení vo vode alebo vodnom roztoku alkoholu, je dostatočne chutná, a dáva "pikantnosť" na jazyk podobnú na chuť červeného vína. Odporúčaná denná dávka je 1 až 2 g/deň.

Typická zmes polyfenolového prášku je porovnaná nižšie s polyfenolovým obsahom červeného vína. V porovnaní s červeným vínom polyfenolový prášok obsahuje proporcionálne viac proantokyanínov než iné polyfenoly, ale v podstate zachováva relatívny obsah rôznych polyfenolov.

Zloženie červeného vína a polyfenolového prášku

	Červené víno kyselina galová ekviv. mg/l		červené víno polyfenolový prášok mg/l	
	%		%	
Kyselina hydroxyškoricová	165	15	18	3
Katechíny	200	17	38	6
Flavonoly	20	2	14	
Antokyaníny	200	17	70	2
Proantokyaníny	550	49	480	77
Celkom	1135		620	

Príklad 2

Uskutočnili sa štúdie pomocou dobrovoľníkov použitím vínových polyfenolov, aby sa určila antioxidačná aktivita červeného a bieleho vína a polyfenolových prípravkov na zdravých dobrovoľníkov.

Subjekty a metódy:

26 zdravých mužov, vo veku 35 až 65 rokov, ktorí boli nefajčiari, konzumujúci štandardnú UK stravu, sa zúčastnilo na súkromnej a dôvernej štúdiu. Dva týždne pred štúdiu dobrovoľníci prerušili konzumáciu vína. Všetci dobrovoľníci boli požiadaní dodržiavať ich obvyklú stravu a štýl života počas štúdie. Dobrovoľníci boli rozdelení do dvoch skupín, ktoré konzumovali nasledujúce vínové alebo čajové produkty s jedlom počas dvoch týždňov v množstvách uvedených v Tabuľke 1. Červeným vínom bolo víno Cabernet Sauvignon (1993) a biele víno bolo z oblasti Narbonne, Francúzsko. Víno poskytované počas štúdie bolo jediné víno povolené

počas doby experimentu. Okrem toho rovnakým subjektom bol podávaný polyfenolový prášok pripravený z rovnakej dávky červeného vína používanej v tejto štúdií. Prášok bol uložený pri -20 °C (PP1) a čerstvo pripravená vzorka z júna 1996 (PP2). Štúdia sa zahájila na začiatok septembra 1995 a trvala asi jeden rok.

Skupina	Testovaná látka
1)	červené víno Cabernet Sauvignon (375 ml), obsahujúce 1,8 g/l polyfenolov
2)	biele víno Vin ordinaire (375 ml), obsahujúce 0,2 g/l polyfenolov
3)	polyfenolový prášok červeného vína (pripravený z rovnakého vína ako sa podávalo skupine 1), 1 g v dvoch želatínových kapsulách
4)	biele víno obsahujúce v roztoku 1 g polyfenolov červeného vína (pozri nižšie)
5)	vodka a limonáda (10 % objemových alkoholu), 400 ml za deň
6)	50 mg/deň antokyanínov, ako extrakt hroznových šupiek (Seftal, St. Julien de Peyrolas, Francúzsko) podávaný ako nápoj
7)	matoliny z červeného vína (Francúzsky Paradox™ , Arkofarma, Nice, Francúzsko) podávané ako kapsuly (3 za deň), každá kapsula obsahujúca 250 mg matolín
8)	proantokyanidíny hroznových semien, ako kapsuly Endotelon™, (Sanofi-Winthrop, Francúzsko) (3 za deň), každá kapsula obsahujúca 150 mg proantokyanidínu
9)	extrakt zeleného čaju (Polyphenon™, Mitsui Norm, Fujieda Japonsko), 3 kapsuly za deň, každá kapsula obsahujúca 100 mg čajových katechínov: 1,6 % hmotnostného galokatechínu, 19,3 % hmotnostného epigalokatechínu, 6,4 % hmotnostného epikatechínov, 59,1 % hmotnostného epigalokatechín-galát a 13,7 % hmotnostného epikatechín-galát

Vzorky krvi sa odoberali do K₃, EDTA (1 mmol/l) 12 hodín po večernom jedle, pred a na konci obdobia konzumácie produktu vína. Vzorky sa centrifugovali pri 2000x g počas 15 minút pri 4 °C, čím sa získala plazma. LDL sa separovali pomocou ultracentrifugácie s gradientom hustoty použitím Beckman stolného modelu Optima TLX s TLA 100,4 rotorom (Beckman, Palo Alto, CA), nasledujúcim postupom: do plazmy sa pridal bromid sodný do hustoty 1,3 g/ml a navrstvila sa pod roztokom s hustotou 1,006 g/ml. Odstredovanie sa robilo pri 100000 ot./min. počas 20 minút pri 4 °C. Oranžový/žltý LDL pás sa odobral a centrifugoval sa s roztokmi hustoty 1,154 a 1,063 g/ml počas 30 minút pri 100000 ot./min. a 4 °C.

Viditeľná LDL vrstva sa odobrala a dialyzovala sa s 10 mmol/l fosfátom pufrovanou soľankou s 2 μmol/l EDTA počas jednej hodiny použitím dialýznej kazety (Pierce Slide-A-Lyzer, Perstorp Biotec Company, USA) pri 4 °C počas jednej hodiny, potom s 10 mmol/l fosfátom pufrovanej soľanky počas noci.

Celkové polyfenoly boli určené v plazme a v LDL frakcii pomocou metódy Singletona a Rossiho (1965). V stručnosti, celkové polyfenoly v plazme a LDL boli merané pomocou odobratia 125 μl plazmy alebo 400 μl LDL a doplnením do 500 μl s vodou. Táto zmes sa pridala k 2,5 ml Folinovho činidla (zriedené 1:10) a 2,0 ml uhličitanu sodného (75 g/l). Po intenzívnom premiešaní bol roztok inkubovaný pri laboratórnej teplote počas 2,5 hodiny a potom sa centrifugoval pri 2500 ot./min. počas 8 minút. Optická hustota supernatantu sa merala pri 765 nm. Pre porovnanie sa ako štandard použila kyselina galová.

Proteíny sa stanovili pomocou metódy Bradforda (Bradford, 1976) použitím kitu obsahujúceho činidlo Bioquant (Merck, Darmstadt, Nemecko).

Na určenie antioxidačnej aktivity sa použili dve nezávislé metódy.

1) Oxidácia LDL meďou

Lipoproteín (50 mg LDL proteínu/l) bol inkubovaný v prítomnosti síranu meďnatého (5 mmol/l) pri 37 °C počas 5 hodín. Tvorba konjugovaných diénov bola kontinuálne monitorovaná meraním vzrastu absorbancie pri 234 nm a doby oneskorenia pred tvorbou diénu určenou podľa metódy Esterbauera a spol.,

(1989). Obrázok 1 ukazuje graf tvorby konjugovaného diénu (podľa merania pomocou absorbančie pri 234 nm) oproti času (v minútach). Typické krivky sú ilustrované pre vzorky odobraté pri začiatku skúšky (0) a po 2 týždňoch. Fáza oneskorenia sa merala pomocou extrapolácie lineárnej časti krivky smerom k osi x (ako je ukázané pomocou prerušovaných čiar). Výhodne konzumácia zmesí podľa tohto vynálezu spôsobí zvýšenie času fázy oneskorenia 2 minúty alebo viac.

2) Peroxidy plazmových lipidov

Všetky plazmové lipidy a lipoproteíny boli selektívne odobraté použitím PHM-L-liposorb (Calbiochem-Novabiochem UK). Suchý PHM-L-liposorb (20 mg) sa suspendoval v 0,25 ml 150 mmol/l chloridom sodným obsahujúcim 10 mmol/l citranu sodného v 2 ml hnedej mikrocentrifugačnej skúmavke, obsah sa premiešal a nechal sa dosiahnuť rovnováhu počas 5 minút. Potom sa plazma (0,5 ml) alebo soľanka (blank) pridala do suspenzie liposorbu, premiešavala sa a skúmavky sa umiestnili do rotačného mixéra na 15 minút. Po centrifugácii (12000x g počas 1 minúty) sa supernatant vyhodil a liposorbový gél sa premyl dva krát s 1,5 ml soľanky, po čom nasledovalo premiešavanie a centrifugácia. Premytý liposorbový gél sa suspendoval v 1,5 ml činidla jodid-cholesterol-oxidáza (BDH-Merck) a umiestnil sa do rotačného mixéra a premiešaval sa počas 60 minút. Po centrifugácii (12000x g počas 3 minút) pri laboratórnej teplote sa merala optická hustota číreho supernatantu v spektrofotometri pri 405 nm oproti blanku s soľankou, (Gorog a spol., 1994).

Výhodne konzumácia zmesí podľa tohto vynálezu spôsobí pokles v koncentrácii plazmových lipidových peroxidov najmenej 0,1 $\mu\text{mol/g}$ proteínu.

Výsledky

Získané hodnoty boli porovnávané pred a po liečení. Tabuľka 1 sumarizuje výsledky, ktoré sú dané podrobne v Tabuľkách 2 až 6. Ako je uvedené v Tabuľke 1, tie produkty čo obsahujú nadbytok polyfenolov vína (červené víno, PP1, PP2, biele víno + PP1) vykazujú vzrast polyfenolov v plazme a LDL a antioxidačnú aktivitu v LDL, podľa merania pomocou testov 1 a 2 vyššie.

Dva polyfenolové prášky (PP1, PP2) poskytli výsledky rovnakého rozsahu ako ekvivalentné množstvo červeného vína.

Nepozoroval sa účinok s bielym vínom, antokyanínovým práškom (Sefcal™, extrakt zo šupiek hrozna používaný ako potravinárske farbivo) výliskov červeného vína, kapsulami Francúzsky Paradox™ (Arkofarma) alebo Endotelon™ (Sanofi-Winthrop, proantokyanidín pripravený z hroznových semien), ani s extraktom zeleného čaju (Polyfenon™) obsahujúcim katechíny a ich estery.

Aktívny polyfenolový prípravok obsahoval súbor všetkých polyfenolov červeného vína a bol pozorne spracovaný tak, aby sa zabránilo ich oxidácii. Naviac sa ukázalo, že polyfenolový obsah plazmy a izolovaných LDL sa zvýšil u tých subjektov, čo prijímali červené víno alebo polyfenolový prášok získaný z červeného vína alebo šupiek hrozna.

Na potvrdenie antioxidačnej aktivity prípravku sa použila druhá skúška, pri ktorej sa plazma opracovala s absorbčnou živicom, ktorá odstránila lipidy a lipoproteíny a určil sa obsah lipidových peroxidov v živici. Obsah lipidových peroxidov sa zvýšil u subjektov, ktorým sa podávalo červené víno alebo polyfenolový prípravok. Znova veľkosť účinku polyfenolového prášku bola ekvivalentná k množstvu červeného vína, z ktorého bol získaný.

Tieto experimenty ukazujú presvedčivo, že polyfenoly sú absorbované po prijatí červeného vína a objavia sa v plazme a LDL, a že polyfenoly izolované z vína môžu mať podobný účinok. Naviac absorbované polyfenoly majú silnú antioxidačnú aktivitu. Spôsoby pôsobenia polyfenolov môžu byť viaceré. Primárne môžu sekvestrovať kovové ióny, ako napríklad medi a železa, ktoré umožňujú tvorbu lipidových peroxidov *in vivo*. Tieto chelatované ióny sú pri podpore oxidácie inaktívne. Polyfenoly, pre vysoký obsah hydroxylových skupín, obsahujú chemické štruktúry, o ktorých je známe, že chelatujú ióny kovov, a teda rozkladajú ich katalytické vlastnosti.

Ďalšie pôsobenie môže byť také, že pôsobia ako konkurenčná látka, ktorá sa oxiduje pred LDL, ako je prípad alfa-tokoferolu. Avšak vynález nie je obmedzený na akýkoľvek konkrétny spôsob pôsobenia.

Na preskúmanie významu odstránenia EDTA z prípravku pred katalytickou

oxidáciou meďou sa urobilo porovnanie použitím dialýzy s EDTA a bez EDTA, a metóda s vymieňačovou kolónou. Keď sa k dialyzátu pridá EDTA predĺženie doby oneskorenia spôsobené polyfenolovým práškom z červeného vína sa nezjavuje alebo sa významne znižuje. Dialýza bez EDTA a kolónová metóda poskytli podobné výsledky. Neschopnosť predchádzajúcich autorov (de Rijke a spol., 1996) získať účinok červeného vína u dobrovoľníkov môže byť vysvetlený pomocou prítomnosti EDTA v ich prípravkoch používaných pri oxidácii katalyzovanej meďou.

Tabuľka 1

Prehľad výsledkov štúdií polyfenolov vína na dobrovoľníkoch

Produkt	Poč.	Polyfenoly		Antioxidácia	Aktivita
		plazma	LDL	LDL metóda medi	plazmy lipidové peroxidy
Červené víno	9	+	+	+	+
Biele víno	9	-	-	-	-
PP1 prášok	9	+	+	+	+
PP2 prášok	6	+	+	+	+
Biele víno + PP1	6	+	+	+	+
Alkoholický nápoj	6	-	-	-	-
Antokyaníny	5	-	-	-	-
Matoliny červeného vína	6	-	-	-	ND
Proantokyanidíny hroznových semien	6	-	-	-	-
Extrakt zeleného čaju	7	-	-	-	ND

+ = pozitívny účinok

- = bez účinku

ND = bez údajov

Tabuľka 2

Účinok vína a produktov z vína na plazmové polyfenoly (mg/g proteínu \pm S.D.)

Produkt	Poč.	O	2wk	P hodnota párového t-testu
Červené víno	9	16,2 \pm 5,6	22,6 \pm 2,7	0,008
Biele víno	9	18,9 \pm 5,0	20,3 \pm 1,4	0,450
PP1 prášok	9	21,0 \pm 2,9	26,9 \pm 5,3	0,009
PP2 prášok	6	24,5 \pm 1,4	26,0 \pm 1,8	0,070
Biele víno + PP1	6	17,6 \pm 4,0	22,6 \pm 1,7	0,020
Alkoholický nápoj	6	23,9 \pm 1,0	24,0 \pm 1,2	0,860
Antokyaníny	5	19,2 \pm 6,4	21,4 \pm 3,1	0,580
Matoliny červeného vína	6	22,6 \pm 0,7	23,4 \pm 1,2	0,158
Proantokyanidíny hroznových semien	6	20,4 \pm 6,7	21,3 \pm 7	0,380
Extrakt zeleného čaju	7	21,3 \pm 1,2	22,1 \pm 1,6	0,295

Tabuľka 3

Účinok vína a produktov z vína na LDL polyfenoly (mg/g proteínu \pm S.D.)

Produkt	Poč.	O	2wk	P hodnota párového t-testu
Červené víno	9	34,0 \pm 6,2	42,3 \pm 8,1	0,001
Biele víno	9	39,3 \pm 6,1	38,5 \pm 10,0	0,820
PP1 prášok	9	37,0 \pm 4,6	47,6 \pm 6,2	0,002
PP2 prášok	6	35,5 \pm 5,1	46,0 \pm 10,0	0,006
Biele víno + PP1	6	33,5 \pm 6,3	54,2 \pm 21,0	0,040
Alkoholický nápoj	6	39,4 \pm 4,5	43,7 \pm 1,6	0,084
Antokyaníny	5	40,0 \pm 5,6	36,2 \pm 6,0	0,520
Matoliny červeného vína	6	41,7 \pm 3,6	38,4 \pm 3,4	0,063
Proantokyanidíny hroznových semien	6	38,2 \pm 4,8	40,2 \pm 3,7	0,240
Extrakt zeleného čaju	7	36,9 \pm 6,2	37,3 \pm 5,3	0,840

Tabuľka 4

Účinok vína a produktov z vína na peroxidy plazmových lipidov ($\mu\text{mol/g}$ proteínu $\pm\text{S.D.}$)

Produkt	Poč.	O	2wk	P hodnota párového t-testu
Červené víno	9	2,13 \pm 0,70	1,54 \pm 0,48	0,056
Biele víno	9	1,73 \pm 0,55	2,15 \pm 0,66	0,158
PP1 prášok	9	1,90 \pm 0,52	1,37 \pm 0,38	0,051
PP2 prášok	6	1,88 \pm 0,24	1,51 \pm 0,21	0,018
Biele víno + PP1	6	1,70 \pm 0,51	1,19 \pm 0,19	0,040
Alkoholický nápoj	6	1,60 \pm 0,25	1,50 \pm 0,40	0,460
Antokyaníny	5	3,04 \pm 0,73	2,93 \pm 0,56	0,260
Matoliny červeného vína	6		bez údajov	
Proantokyanidíny hroznových semien	6	1,69 \pm 0,13	1,47 \pm 0,46	0,289
Extrakt zeleného čaju	7		bez údajov	

Tabuľka 5

Účinok vína a produktov z vína na LDL oxidáciu meďou: stredná doba oneskorenia v minútach ($\pm\text{S.D.}$)

Produkt	Poč.	O	2wk	P hodnota párového t-testu
Červené víno	9	51,6 \pm 7,6	69,3 \pm 18,3	0,008
Biele víno	9	63,8 \pm 18,5	63,6 \pm 9,9	0,950
PP1 prášok	9	51,7 \pm 5,6	65,9 \pm 12,8	0,006
PP2 prášok	6	60,0 \pm 9,2	73,7 \pm 11,0	0,001
Biele víno + PP1	6	54,8 \pm 2,6	66,5 \pm 5,2	0,007
Alkoholický nápoj	6	54,0 \pm 4,6	56,6 \pm 4,2	0,140
Antokyaníny	5	53,0 \pm 4,4	51,5 \pm 3,11	0,650
Matoliny červeného vína	6	62,0 \pm 2,7	60,3 \pm 5,2	0,500
Proantokyanidíny hroznových semien	6	69,5 \pm 24,0	62,8 \pm 5,4	0,499
Extrakt zeleného čaju	7	66,2 \pm 4,4	59,3 \pm 5,4	0,629

Závery

Antioxidačná aktivita 1 gramu prášku polyfenolov z vína je ekvivalentná polovici fľaše červeného vína. Denná dávka 1 až 2 g polyfenolového prášku by mala mať silnú profylaktickú aktivitu proti koronárnej srdcovej chorobe. Iné produkty, ako napríklad extrakt hroznových šupiek používaný v potravinárskom priemysle ako farbivo, proantokyanidínový prípravok, kapsuly Francúzsky Paradox a extrakt zeleného čaju obsahujúce katechíny a ich estery boli inaktívne.

Príklad 3

Z nasledujúcich zložiek boli pripravené kapsuly pomocou jednoduchého zmiešania a bežného zapúzdrenia.

	mg
prášok polyfenolov vína	500
kyselina stearová	25
stearát horečnatý	50
mikrokryštalická celulóza	25
	600 mg

Dve až štyri kapsuly sa berú denne s jedlom alebo po jedle.

Príklad 4

Z nasledujúcich zložiek boli pripravené kapsuly pomocou jednoduchého zmiešania a bežného zapúzdrenia.

	mg
prášok polyfenolov vína	400
α -tokoferol	150
kyselina listová 0,2 mg (1:50 v zriedčovadle)	10
lecitín	20
včelí vosk	20
	600 mg

Najmenej tri kapsuly za deň by sa mali brať s jedlom.

Príklad 5

Jeden gram prášku polyfenolov vína sa pridal do suchej práškovej potravinovej zmesi poskytujúcej 405 kcal za deň (42 g proteínu, 43 g cukrov a 8 g tuku, RDA vitamínov a minerálov) rozširovanej pod obchodným menom Cambridge Diet (Cambridge Health Plan Ltd, Norwich, UK). Jednodňová dávka (3 jedlá/deň) poskytuje príjem polyfenolov ekvivalentný 0,5 l červeného vína/deň.

Príklad 6

0,5 g súboru celkových polyfenolov získaných z červeného vína sa pridal do 250 ml jednoduchého jogurtu obsahujúceho jahodovú príchuť a sladidlo. Na červeno zafarbený polyfenolový materiál zlepšuje vzhľad jogurtu a poskytuje vysoko chutnú potravinu s priaznivým účinkom na zdravie.

Príklad 7

Nasledujúci prípravok je ne-alkoholický nápoj poskytovaný ako prášok na zmiešanie s vodou.

Monohydrát dextrózy	300 g
kyselina citrónová	32 g
citran sodný	5 g
príchut' hrozna	6 g
príchut' citrónu	1,4 g
príchut' pomaranča	1,4 g
aspartám	1 g
celkový súbor polyfenolov vína (ako Príklad 1)	21 g

53 g prášku sa rozpustilo v 1 litri vody. Použitie 250 ml poskytuje 0,75 g aktívnych polyfenolov.

Príklad 8

Nasledujúci prípravok je alkoholický nápoj poskytovaný ako fľaškový hotový nápoj.

Odvzdušnená toniková voda	450 ml
Vodka	50 ml
Celkový súbor polyfenolov vína (ako Príklad 1)	1 g

Polyfenol sa rozpustil v zvetranej tonikovej zmesi (odvzdušnenej) a potom sa nasýtila s oxidom uhličitým pod tlakom, čím sa poskytol sýtený nápoj. Alikvóty 450 ml sa dávkovali do fliaš, pridala sa vodka a fľaša sa uzavrela so závitovým uzáverom.

Príklad 9

Asi 2000 kg výliskov získaných z bieleho hrozna sa intenzívne premiešavalo v komerčnom mixéri s 2500 l destilovanej vody pri 30 °C počas

štyroch hodín. Zmes sa potom odobrala z mixéra a umiestnila sa v tanku a nechala sa usadiť počas dvoch hodín, supernatant sa potom odobral a prefiltroval, čím poskytol čiru kvapalinu. Potom sa použil rovnaký postup ako v Príklade 1 na absorpciu polyfenolov na živicu použitím podobných množstiev živice Diaion HP-20 a elučného rozpúšťadla.

Po skoncentrovaní vodného etanolového roztoku na 35 % suchej hmoty červeno zafarbeného tuhého vzhladu s hmotnosťou približne 600 g. Táto hmota sa rozpustila v 10 % hmotnostných vodnom alkohole a potom sa sušil rozprašovaním, čím poskytol tuhú látku nerozpustnú vo vode ale rozpustnú vo vodnom alkohole. Zostávajúci roztok sa potom sušil rozprašovaním pod dusíkom, čím poskytol 1,4 kg červeno zafarbeného materiálu obsahujúceho asi 50 % hmotnostných polyfenolov. Táto zmes bola podobná ako zmes získaná v Príklade 1.

Táto metóda má nevýhodu v tom, že postup získania extraktu pred absorpciou na živicu je ťažší a časovo náročný. Hoci je výtazok menší, dostupnosť lacných hroznových šupiek má komerčné výhody.

Práškový nápoj sa rekonštituoval a podával 5 dobrovoľníkom počas dvoch týždňov podľa protokolu opísaného v Príklade 2. Výsledky pri meďou katalyzovanej LDL oxidačnej skúške boli nasledujúce:

Pred	78,8 ± 7,2 min
Po 2 týždňoch	93,0 ± 9,4 mm
Zmena (p hodnota 0,003)	14,2 ± 4,8 mm

Možno uzavrieť, že extrakt z hroznových šupiek (v tomto prípade z bieleho hrozna), t.j. výlisky, boli účinným antioxidantom, keď sa brali orálne počas 2 týždňov.

Príklad 10

Plazmové LDL (od skupiny dobrovoľníkov opísaného v Príklade 2) sa separovali pomocou ultracentrifugácie a dialyzovali sa s fosfátovým pufrom ako je opísané v Príklade 2. Polyfenoly obsahujúce látky sa analyzovali na ich polyfenolový obsah pomocou metódy Singleton & Rossi (1965). Plazmový LDL (0,05 µg LDL v 1,0 ml) bol inkubovaný so 100 µl roztoku síranu meďnatého (konečná koncentrácia 5 µmol/l) pri 37 °C a doba oneskorenia určená pomocou meďou katalyzovanej diénovej skúšky, ako je opísané v Príklade 2. Schopnosť polyfenoly obsahujúcich látok predĺžiť dobu oneskorenia *in vitro* bola určená pomocou prídania 4 µg polyfenolovej látky do 1 ml LDL pred prídanim síranu meďnatého. Testovali sa nasledujúce látky:

- 1) Červené víno Cabernet Sauvignon
- 2) Biele víno Vin ordinaire
- 3) Polyfenoly červeného vína, pripravené ako je opísané v Príklade 1
- 4) Seftal™ antokyanín, ako je opísané v Príklade 2
- 5) Endotelon™, proantokyanín, ako je opísané v Príklade 2
- 6) Kapsuly Francúzsky Paradox (matoliny červeného vína), ako je opísané v Príklade 2
- 7) Polyphenon™ (katechíny zeleného čaju), ako je opísané v Príklade 2

Výsledky získané *in vivo* orálnou konzumáciou testovanej látky počas 2 týždňov sú porovnávané s *in vitro* výsledkami v Tabuľke 7 nižšie. *In vitro* výsledky sú priemer zo štyroch stanovení. Doba oneskorenia vzrástla so všetkými látkami pridanými s hladinou 4 µg/ml. Pozorovalo sa poradie veľkosti účinku: polyfenolový prášok = antokyaníny > katechíny zeleného čaju > proantokyanidíny hroznových semien > červené víno > biele víno > matoliny červeného vína.

Keď sa látky brali orálne a LDL sa oddelili a testovali, ako je opísané v Príklade 2, len červené víno a polyfenoly červeného vína poskytli predĺženie doby

oneskorenia, všetky iné polyfenoly obsahujúce látky boli inaktívne. To jasne ukazuje, že je nemožné predpovedať *in vivo* účinok látky z *in vitro* výsledkov. Neprítomnosť aktivity väčšiny z látok *in vivo* by mohla dôsledkom ich nedostatočnej absorpcie z čreva, alebo neschopnosti byť včlenené do LDL.

Tabuľka 6

Porovnanie polyfenoly obsahujúcich látok *in vitro* a *in vivo*, pri skúške med'-dién.

	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
Látka	Vzrast doby oneskorenia				Vzrast doby oneskorenia			
	obsah polyfenolov	min	%	účinok**	prijem polyfenolo v/deň	min	%	účinok
červené víno	1,8 g/l	26	100	++	675	17,8	100	++
biele víno	0,2 g/l	22	85	+	75	-0,22	-1	-
polyfenolový prášok*	450 mg/g	65	230	+++	450	14,2	80	++
antokyaníny červeného vína	500 mg/g	66	255	+++	500	-1,5	-8	-
proantokyaníny hroznových semien	425 mg/g	50	190	+++	750	-6,7	-38	-
matoliny červeného vína	210 mg/g	18	70	+	156	-1,7	-10	-
katechíny zeleného čaju	960 mg/g	75	290	+++	300	4,8	-38	-

* v kapsule

** pozorované účinky: + malé, ++ mierne, +++ silné, - žiadne.

Príklad 11

Dvadsať z vyššie zmienených dobrovoľníkov z Príkladu 2 bolo rozdelených do skupín (A a B) po 6 až 9 subjektov a podávali sa im počas dvoch týždňov:

A) čiernymi ríbezľami ochutený nápoj (330ml) obsahujúci 1 g celkových polyfenolov červeného vína a zmiešaný s komerčne dostupným práškom (cukor, kyselina citrónová, aspartám citranu sodného, syntetická príchuť; Cambridge Manufacturing Co Ltd, Corby, UK), do ktorej sa pridala voda tesne pred konzumáciou; alebo

B) Kapsuly, obsahujúce prášok polyfenolov červeného vína pripravený tak, ako je uvedené vyššie, v dávke 2 g polyfenolov červeného vína /deň.

Produkty boli rozdelené rovnomerne a brali sa po obede a večeri.

Získali sa vzorky plazmy a centrifugovali sa v ultracentrifúge, čím sa získali LDL, ako je opísané v Príklade 2.

Použili sa tri metódy opracovania LDL pred oxidáciou, ako je uvedené nižšie.

a) Konečná dialýza bez EDTA.

LDL boli dialyzované s 10 mmol/l fosfátom pufrovanou soľankou obsahujúcou 2 μ mol/l EDTA počas jednej hodiny použitím dialýznej kazety (Pierce Slide-A-Lyzer Perstorp Biotec Company, USA) pri 4 °C počas jednej hodiny a potom s 10 mmol/l fosfátom pufrovanej soľanky počas noci.

b) Kontinuálna dialýza s EDTA

Odobrali sa LDL a dialyzovali sa pri 4 °C ako je uvedené vyššie s výnimkou, že dialýza sa robila s 10 μ mol/l EDTA v 10 mmol/l fosfátom pufrovanej soľanky.

c) Opracovanie na kolóne

LDL sa prepustili cez EcNo-pac 10DG odsoľovacia kolónu (Bio-Rad Labs, UK). Kolóna sa premyla dva krát s opracovaným 10 mmol/l PBS [živica chelex-100 (Bio-Rad, UK), 5 g/l PBS premiešané a dekantované]. 600 μ l LDL sa potom dávkovalo na kolónu a eluovalo s 3 ml PBS pufrom pri prietoku 0,6 ml/minútu použitím čerpadla Ismatec IPC Peristaltic pump (Ismatec, Weston Super Mare, UK).

Potom sa uskutočnila meďou katalyzovaná peroxidácia a merala sa doba oneskorenia ako v Príklade 2. Výsledky sú uvedené v Tabuľke 7.

Konzumácia polyfenolov červeného vína, buď ako nápoj (1 g/deň) alebo ako kapsuly (2 g/deň), spôsobuje zvýšenie doby oneskorenia (keď sa EDTA vynechá z konečného dialyzátu) o 30 % resp. 21% a tiež pomocou kolónovej metódy 12 % resp. 22 %. Prídavok EDTA k dialyzátu odstraňuje účinok 1 g polyfenolov červeného vína na deň a poskytol len malý vzrast doby oneskorenia o 7 % pri 2 g/deň.

Tabuľka 7

Doba oneskorenia (minúty) pri meďou katalyzovanej peroxidácii použitím rôznych metód odsolenia LDL

Dodatok	Počet	Dialýza bez EDTA	Dialýza s EDTA	bez dialýzy kolóna
Vínne polyfenoly Nápoj (1 g/deň)	6			
Základná línia		60,0 ± 5,3	64,3 ± 3,8	54,2 ± 4,6
Po 2 týždňoch		77,7 ± 8,4	64,5 ± 3,9	60,6 ± 4,7
Rozdiel priemerov		17,7 ± 3,1	0,3 ± 0,1	6,4 ± 0,1
P-hodnota		0,02	0,9	0,005
Kapsuly (2 g/deň)	6			
Základná línia		62,7 ± 2,5	67,7 ± 3,6	54,0 ± 2,2
Po 2 týždňoch		75,8 ± 2,8	72,2 ± 3,1	65,8 ± 2,2
Rozdiel priemerov		13,2 ± 0,3	4,5 ± 0,5	11,8 ± 0,1
P-hodnota		0,004	0,02	0,003

Ďalším objektom vynálezu je poskytnúť aktívny polyfenolový prípravok (vhodne získaný z hrozna, vína alebo vedľajších produktov vína) na liečenie

koronárnych srdcových chorôb a iných chorôb spojených s bujnením buniek hladkého svalstva, ako napríklad ateroskleróze, restenóze, mŕtvici a neoplazmách čriev a maternice, myóme maternice alebo fibrómu.

Autori vynálezu prekvapivo zistili, že je možné pripraviť polyfenolové zmesi (napríklad z červeného vína), ktoré pri orálnom podávaní ľudským subjektom, budú stimulovať tvorbu celkového a aktívneho TGF- β -1.

Bolo ukázané, že keď sa červené víno alebo prípravok polyfenolov získaný z červeného vína poskytovaný ako prášok alebo nápoj, podávali orálne človeku, pozoruje sa vzrast celkového a aktívneho TGF- β -1. Biele víno, ktoré obsahuje málo polyfenolov je inaktívne.

Dávka polyfenolového prípravku je závislá od stupňa aktivity materiálu, ale bude medzi 10 mg až 10 g za deň. Dávka celkového súboru polyfenolov získaných z vína je výhodne 0,1 až 4 g/deň a výhodnejšie 1 až 2 g/deň ekvivalentná 0,5 až 1 litru červeného vína za deň.

Príklad 12

Červené víno, biele víno a prípravok polyfenolov získaných z červeného vína (ako je opísané skôr v Príklade 1) vo forme prášku alebo nápoja dané orálnym podávaním ľudským subjektom, sa študovali z hľadiska ich účinku na plazmový TGF- β .

Zdraví dobrovoľníci (30 mužov vo veku 35 až 65 rokov) boli požiadaní o prerušenie konzumácie vína počas dvoch týždňov. Podávalo sa im buď 375 ml červeného vína alebo bieleho vína alebo 1 g celkového súboru polyfenolov červeného vína (pripravený z rovnakého vína Cabernet Sauvignon ako je uvedené vyššie) buď ako kapsuly alebo ako ochutený nápoj v 330 ml vody. Každý doplnok bol konzumovaný dva krát denne po jedle počas doby dvoch týždňov.

Odobrali sa vzorky krvi do K₃ EDTA (1 mmol/l) po opracovaní a centrifugácii sa získala plazma, ktorá bol uložená pri -70 °C pred analýzou. Celkové plazmové polyfenoly boli merané pomocou metódy Singletona a Rossiho (1965). Celkový

TGF- β -1 bol určený pomocou imuno-skúšky použitím dvoch rôznych polyklonálnych protilátok (metódy 1 & 2, opísané nižšie):

Metóda 1

Celkový (latentný + aktívny) TGF- β bol meraný pomocou Quantikine[®] kitu na imuno-skúšku ľudského TGF- β , dodávaný od R&D systémov (Abingdon, Oxford, UK). Táto skúška používa kvantitatívnu sendvičovú techniku imuno-skúšky. TGF- β rozpustný receptorový typ II viaže TGF- β -1, ktorý bol vopred nanesený na mikrotitračnú platňu. Štandardy a vzorky sa pipetovali do kalíškov a prítomný TGF- β -1 sa viazal imobilizovaným receptorom. Po odmytí neviazanej látky sa pridal enzým viazaný polyklonálnou protilátkou špecifickou pre TGF- β -1 do kalíškov k sendviču TGF- β -1 imobilizovaného počas prvej inkubácie. Po premytí na odstránenie nenaviazaného protilátkového enzýmového činidla sa pridal substrátový roztok do kalíškov, ktoré tvoria s enzýmom farbu. Intenzita vyvinutej farby je proporcionálna prítomnému TGF- β -1.

Pred vykonaním skúšky sa latentný TGF- β konvertoval na aktívnu formu pridaním kyseliny octovej a močoviny, inkubovaním počas 10 minút a potom neutralizovaním s roztokom hydroxid sodný/HEPES. Metóda odhaduje (latentný + aktívny) TGF- β -1. Aktivácia latentného TGF- β bol uskutočnená takto: k 0,1 ml plazmy sa pridalo 0,1 ml roztoku 2,5 mol/l kyseliny octovej/10 mol/l močoviny, dobre sa premiešali a inkubovali počas 10 minút pri laboratórnej teplote. K tomuto roztoku sa pridalo 0,1 ml zmesi 2,7 mol/l NaOH/1 mol/l HEPES na neutralizovanie vzorky, a dobre sa premiešali. Pred skúškou sa vzorka aktivovanej plazmy zriedila 10-krát s kalibrovacím zriedovacím sérom RD6M dodávaným výrobcom kitu.

Postup skúšky bol nasledujúci: 200 μ l vzorky alebo štandardu sa pridalo do každého kalíška mikrotitračnej platne. Platňa sa potom prikryla s adhezívnym pásom plastického materiálu a inkubovala sa počas 3 hodín pri laboratórnej teplote. Kalíšky sa potom odsali a premyli tri krát so 400 μ l premývacieho pufru. Potom sa do kalíškov pridalo 200 μ l TGF- β -1 konjugátu a platňa sa znova pokryla s čerstvým

adhezívnym pruhom a inkubovala sa pri laboratórnej teplote počas 110 minút. Kalíšky sa potom odsali a premyli sa tri krát s 400 μ l premývacieho pufru. Do kalíškov sa pridalo 200 μ l substrátového roztoku a platňa sa inkubovala počas 20 minút pri laboratórnej teplote. Do kalíškov sa pridalo 50 μ l 2 mol/l H_2SO_4 roztoku a merala sa optická hustota pri 450 nm.

Metóda 2

Použila sa v podstate rovnaká metóda, ako je uvedené vyššie s výnimkou, že TGF- β nebol aktivovaný pred hodnotením a namiesto poly-klonálnej protilátky pre TGF- β -1 sa použila BDA-19 protilátka (R&D systems, Abingdon, Oxford, UK). Táto metóda odhaduje aktívnu formu TGF- β -1.

Výhodne konzumácia zmesi podľa tohto vynálezu spôsobuje vzrast TGF- β -1 hladín u subjektu najmenej 1,5 ng/ml podľa posúdenia pomocou Metódy 1, alebo najmenej 0,5 ng/ml, podľa posúdenia pomocou Metódy 2.

Výsledky

Ako je uvedené v Tabuľke 8, plazmové polyfenoly vzrástli pre červené víno, ale nie s bielym vínom, a s polyfenolovými kapsulami a nápojom. Vzrast TGF- β -1 bol pozorovaný oboma metódami pri červenom víne a s polyfenolovými kapsulami a nápojom, ale nie pri bielom víne. To naznačuje, že polyfenoly červeného vína zvyšujú aj celkové množstvo (latentný + aktívny) TGF- β -1 aj aktívnu formu TGF- β -1. Záverom je, že vínne polyfenoly zvyšujú celkový TGF- β -1 a majú schopnosť inhibovať VSMC bujnenie.

Tabuľka 8

Účinok vína a polyfenolov červeného vína na plazmové polyfenoly a celkový TGF- β podľa dvoch rôznych metód skúšania

Doplnok	Počet	Polyfenoly mg/g proteínu	Celkový TGF- β	
			Metóda 1	Metóda 2
			ng/ml	
Červené víno	8			
Základná línia		16,2 \pm 1,87	6,6 \pm 1,3	5,0 \pm 0,4
Po 2 týždňoch		22,6 \pm 0,91	15,5 \pm 3,1	6,5 \pm 0,5
Rozdiel priemerov		6,33 \pm 0,96	8,9 \pm 1,8	1,5 \pm 0,1
P-hodnota		0,002	0,01	0,01
Biele víno	8			
Základná línia		18,9 \pm 1,67	9,7 \pm 2,5	5,6 \pm 0,6
Po 2 týždňoch		20,2 \pm 0,91	11,9 \pm 3,4	5,3 \pm 0,6
Rozdiel priemerov		1,33 \pm 0,76	2,2 \pm 0,9	0,3 \pm 0,1
P-hodnota		0,5	0,5	0,8
Polyfenolové kapsuly	8			
Základná línia		21,0 \pm 0,96	9,0 \pm 2,3	6,0 \pm 0,7
Po 2 týždňoch		26,9 \pm 1,76	19,8 \pm 3,9	8,5 \pm 0,9
Rozdiel priemerov		5,86 \pm 0,80	10,8 \pm 1,6	2,5 \pm 0,2
P-hodnota		0,02	0,01	0,01
Polyfenolový nápoj	6			
Základná línia		21,6 \pm 0,35	9,2 \pm 1,1	5,0 \pm 1,5
Po 2 týždňoch		23,6 \pm 0,40	15,6 \pm 2,4	9,9 \pm 1,1
Rozdiel priemerov		2,05 \pm 0,05	6,4 \pm 1,3	4,9 \pm 0,4
P-hodnota		0,03	0,03	0,03

Priemer \pm SEM

Autori vynálezu okrem toho prekvapivo zistili, je možné pripraviť polyfenolovú zmes (napríklad z červeného vína), ktorá pri orálnom podaní ľudskému subjektu bude inhibovať agregáciu krvných doštičiek a stimulovať fibrinolýzu.

Konkrétne to bolo demonštrované tak, že vtedy keď sa pripravok polyfenolov získaných z červeného vína podával orálne človeku, existoval pokles agregácie krvných doštičiek, keď sa ako agonistické látky použili kyselina arachidonová, ADP, kolagén alebo trombín. Navyše konzumácia polyfenolového prípravku zvyšuje tPA aktivitu v plazme tohto subjektu.

Dávka polyfenolového prípravku je závislá od stupňa aktivity materiálu, ale bude medzi 10 mg až 10 g za deň. Ak zmes predstavuje celkový fenolický súbor získaný z červeného vína, výhodné je dávkovať 0,1 až 4,0 g za deň a výhodnejšie 1 až 2 g, ktorá je ekvivalentná 0,5 až 1,0 litru červeného vína za deň.

Príklad 13

Zmes polyfenolov červeného vína bola pripravená tak, ako je opísané skôr (Príklad 1 uvedený vyššie).

Strava dvanástich zdravých mužov vo veku 35 až 65 rokov bola doplnená s 2 g polyfenolov červeného vína (ako je opísané v Príklade 2) alebo aspirínom (75 mg) denne počas dvoch týždňov. Na lačno sa odobrala citrátovaná krv ako základná línia a po štyroch hodinách a dvoch týždňoch po začatí skúšky, nasledujúcim postupom: krv bola získaná z predlakt'ovej cievy, so subjektom v ležiacej polohe, použitím minimálnej stázy, do striekačky obsahujúcej 0,11 mol/l citranu (1:9 objemovo ku krvi). Plazma bohatá na krvné doštičky (PRP) bola pripravená pomocou centrifugácie krvi pri 250x g počas 10 minút. Väčšina PRP bola odobratá a plazma chudobná na krvné doštičky (PPP) sa potom pripravila pomocou centrifugovania zvyšnej krvi pri 2500x g počas 15 minút. Koncentrácia krvných doštičiek v PRP bola určená v počítači buniek (Minos STX, ABX Ltd, Montpellier, Francúzsko). Vzorky s počtom krvných doštičiek mimo rozsahu 150000 až 350000 na μl boli vylúčené. RPR sa nechala v pokoji počas najmenej 30 minút

pred začatím štúdia agregácie. Čas medzi odberom krvi a agregáciou krvných doštičiek nebol nikdy viac ako tri hodiny.

Agregácia krvných doštičiek bola určená na čerstvo pripravených krvných doštičkách použitím PAP-4C agregometra (BioData, Alfa Laboratories, Southampton, UK). 200 μ l vzorka PRP sa pridala do silikónovanej kyvety a inkubovala sa pri 37 °C počas 3 minút. Agregácia sa vyvolala prídavkom 20 μ l agonistickej látky (jedna z nasledujúcich: kyselina arachidonová pri 455 μ g/ml; 1,8 μ mol/l ADP; kolagén pri 43 μ g/ml získaných z BioData; trombín pri 0,11 U/ml, získaných od Sigma, Poole, Dorset, UK; všetko sú to konečné koncentrácie v agregáčnej zmesi). Suspenzia krvných doštičiek sa premiešavala sa pri 1000 ot./min. pri 37 °C počas 5 minúty. Maximum agregácie (percento zo základnej línie) bolo určené v tomto čase. Hodnota bola mierou agregáčného potenciálu doštičiek, pokles indikoval anti-agregačnú odozvu, pri porovnaní so vzorkou odobratou pred a po konzumácii testovaného materiálu. Štatistická významnosť sa hodnotila pomocou párového t-testu.

Prášok polyfenolov červeného vína inhiboval agregáciu krvných doštičiek buď akútne alebo chronicky, ako je uvedené v Tabuľke 9. Tieto účinky sú podobné ale menšie ako účinky pozorované s aspirínom (75 mg za deň), s výnimkou pre trombín. Konkrétne účinok polyfenolov na arachidonátom-indukovanú agregáciu potvrdzuje inhibíciu cyklo-oxygenázovej aktivity krvných doštičiek. Tieto výsledky potvrdili, že polyfenoly červeného vína majú účinky podobné aspirínu, hoci existuje dodatočný inhibičný účinok na trombínom indukovanú agregáciu.

Tabuľka 9

Maximum agregácie krvných doštičiek dobrovoľníkov po podávaní polyfenolov červeného vína alebo aspirínu (%). Priemer (SEM)

Agonistická látka	Maximum agregácie krvných doštičiek (%)					
	polyfenoly červeného vína ^a (12)+			Aspirín ^b (7) +		
	Základná línia	4 hodiny	2 týždne	Základná línia	4 hodiny	2 týždne
Kyselina arachidonová (455 µg/ml)	82,3(1,1)	78,7(0,8)*	79,0(0,8)**	69,2(10,1)	8,6(11,2)	12,6(1,9)**
ADP (1.8 µmol/l)	42,4(3,4)	37,6(3,3)	38,7(2,9)	39,2(4,2)	31,5(3,7)	31,3(2,6)*
Kolagén (43 µg/ml)	54,2(8,8)	59,2(8,0)	47,3(9,2)**	67,5(5,1)	24,6(5,0)** *	21,8(4,7)** *
Trombín (0,11 U/ml)	22,0(1,7)	17,4(1,8)**	16,2(2,2)*	15,5(2,8)	13,9(4,5)	12,2(2,0)

*P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001 (rozdiel od základnej línie)

+ subjekty ^a2 g/deň ^b75 mg/deň

Rovnaká skúška bola používaná na výskum hladín PAI-1 a tPA aktivity u týchto subjektov. Krv bola získaná z predlakt'ovej cievy, so subjektom v ležiacej polohe, použitím minimálnej stázy, do striekačky obsahujúcej 0,5 mol/l citranu, pH 4,3 (Stabilyte™ 1:9 objemovo ku krvi). Plazma bola pripravená pomocou centrifugácie krvi pri 2500x g počas 15 minút pri 4 °C, a ihneď sa zmrazila pri -70 °C.

Všetky tri vzorky (základná línia, 4 hodiny a 2 týždne) od subjektu sa rýchlo roztopili pri 37 °C v deň skúšky. tPA aktivity sa určili použitím komerčne dostupného kitu (Chromolize™, od Biopool, Umea, Švédsko), ktorým je bio-funkčná imuno-

sorbentová skúška. Vzorka alebo štandard (100 µl) sa pridali do kalíškov. Mikro-titračná platňa sa inkubovala v trepačke platní počas 20 minút, po tomto čase sa obsahy kalíškov vyhodili a kalíšky sa 4 krát premyli. Potom sa do kalíškov pridalo 50 µl substrátového roztoku, po čom nasledovalo 50 µl plazminogénového činidla a platňa sa inkubovala počas ďalších 90 minút. Nakoniec sa do každého kalíšku pridalo, 50 µl 1,7 mol/l roztoku ľadovej kyseliny octovej a premiešali sa počas 15 sekúnd. Absorbancie sa merali pri 405 nm, a aktivity tPA vo vzorke sa odčítali z lineárnej kalibračnej čiary. Významnosť rozdielu medzi základnou líniou, hodnotami 4 hodiny a 2 týždne pre všetky opracovania sa hodnotila pomocou dvojstranového párového t-testu. Výsledky sú uvedené v Tabuľke 10,

Enzým tPA tvorí dôležitý proteín vo fibrinolytickom mechanizme a predpokladá sa, že jeho aktivita hrá hlavnú úlohu vo fibrinolytickom systéme. Fyziologická úloha tPA je aktivovať plazminogén na plazmín, ktorý degraduje fibrín na rozpustné fibrinodegradačné produkty. V skúške tPA je obvykle špecifický inhibítor PAI-1 prítomný vo veľkom prebytku a musí byť chránený pred zastavením tPA aktivity. To sa dosahuje použitím skúmaviek na odber krvi Stabilyte™, ktoré poskytujú mierne okyslenie vzorky.

Pretože PAI-1 hodnoty sú známe ako závislé od dennej variácie, uskutočnila sa ďalšia skúška, v ktorej sa študovali rovnaké subjekty použitím vody ako placebo, namiesto polyfenolov červeného vína. Výsledky sú uvedené v Tabuľke 11.

Tabuľka 10

PAI-1 a tPA po podávaní polyfenolov červeného vína (2 g/deň). Priemer ± SEM

	N	Základná línia	4 hodiny	2 týždne
PAI-1 antigén (ng/ml)	6	18,8 ± 3,6	8,6 ± 1,0*	17,0 ± 3,4
tPA aktivita (IU/ml)	10	0,62 ± 0,16	1,61 ± 0,30**	0,71 ± 0,20

* P<0,05 **P<0,01 (rozdiel od základnej línie)

Tabuľka 11

Porovnanie 2 g polyfenolov červeného vína s vodou po 4 hodinách.

PAI-1 Antigén (ng/ml) (n = 11)

Dávka	Voda		polyfenoly červeného vína (2 g)	
	0 hodín	4 hodiny	0 hodín	4 hodiny
Priemer	21,9	10,6	20,3	9,5
SD	12,7	4,2	9,0	3,1
SEM	3,8	1,3	2,7	0,9
P-hodnota		0,0061		0,0007

tPA aktivita (IU/ml) (n = 9)

Voda			polyfenoly červeného vína (2 g)	
	0 hodín	4 hodiny	0 hodín	4 hodiny
Priemer	0,821	1,221	0,566	1,511
SD	0,693	0,605	0,492	0,934
SEM	0,231	0,202	0,164	0,311
P-hodnota		0,1968		0,0136

Polyfenoly červeného vína (2 g/deň) spôsobili významný pokles PAI-1 po 4 hodinách, ktorý bol spojený s významným zvýšením tPA aktivity (Tabuľka 10). Nevidno žiadne zmeny po nočnom pôste po 2 týždňovom liečení. Avšak, ako je uvedené v Tabuľke 11, po 4 hodinách je po podávaní vody koncentrácia PAI-1 antigénu znížená, čo indikuje, že účinky na koncentráciu PAI-1 antigénu pozorované po konzumácii polyfenolového prášku boli jednoducho spôsobené dennou variáciou. Podávanie vody nespôsobilo významné zvýšenie tPA aktivity,

avšak, prášok polyfenolov červeného vína poskytol 2,7 násobné zvýšenie tPA aktivity. Možno uzavrieť, že polyfenoly červeného vína spôsobujú priaznivý účinok na stimulovanie fibrinolýzy pomocou zvýšenia tPA aktivity, ale nemajú žiaden účinok na koncentráciu PAI-1 antigénu. tPA podporuje tvorbu plazmínu z plazminogénu a plazmín konvertuje latentnú formu TGF- β na jeho aktívnu formu, ktorá potom inhibuje rast cievnych buniek hladkého svalstva (VSMC), ktorý prispieva k rastu aterosklerotických povlakov.

Výhodne konzumácia zmesi podľa tohto vynálezu bude spôsobovať najmenej 2 % zníženie maxima agregácie krvných doštičiek (podľa určenia pomocou metód opísaných vyššie) a/alebo zvyšuje tPA aktivitu najmenej 0,75 IU/ml (podľa určenia pomocou metód opísaných vyššie).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Suchá zmes s obsahom flavonolov, získavaná z rastlín, vhodná na konzumáciu ľuďmi, ktorá je získaná z hrozna, vína alebo vedľajších produktov, obsahujúcich flavonoly alebo odpadových produktov procesu výroby vína, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje najmenej 25 % hmotnostných polyfenolov a najmenej 0,01 % hmotnostných flavonolu, a ktorá pri konzumácii ľudským subjektom spôsobuje inhibíciu oxidácie plazmových LDL a/alebo stimulovanie tvorby TGF- β a/alebo inhibíciu agregácie krvných doštičiek a/alebo stimulovanie fibrinolýzy.

2. Suchá zmes podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že flavonolový obsah je najmenej 0,1% hmotnostného.

3. Suchá zmes podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že flavonolový obsah je najmenej 1% hmotnostné.

4. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1, 2 alebo 3, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že flavonolový obsah zahrnuje najmenej 0,5 % hmotnostných z celkového obsahu polyfenolov získaných z rastlín v zmesi.

5. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že flavonolový obsah zahrnuje najmenej 1,0 % hmotnostné z celkového obsahu polyfenolov získaných z rastlín v zmesi.

6. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že flavonolový obsah zahrnuje najmenej 2,0 % hmotnostné z celkového obsahu polyfenolov získaných z rastlín v zmesi.

7. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a -

č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje celkový súbor polyfenolov červeného vína.

8. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a -
č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje vehikulum, zriedčovač alebo nosič.

9. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a -
č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje jednu alebo viaceré látky vybrané zo skupiny
pozostávajúcej zo živín, antioxidantov, terapeutických zložiek (zvlášť tie, ktoré majú
terapeutický účinok vo vzťahu k prevencii a/alebo liečeniu CHD), ochucovadiel a
sladidiel.

10. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov,
v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje jednu alebo viaceré látky vybrané zo
skupiny pozostávajúcej z luteínu, lycopénu, alebo α - a/alebo β -karoténu, vitamínu
A, vitamínu C, vitamínu E (α -tokoferol a iné aktívne tokoferoly), kyseliny listovej,
selénu, mede zinku, mangánu, ubichinónu (koenzým Q10), kyseliny salicylovej,
kyseliny 2,3-dihydroxybenzoovej a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej a aspirínu.

11. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov,
v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je balená v jednotkovej dávkovej forme.

12. Suchá zmes podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov,
v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je vo forme tabliet, kapsúl alebo piluliek.

13. Nápoj, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zmes podľa
ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov a fyziologicky prijateľnú kvapalinu.

14. Spôsob výroby nápoja, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje
zmiešanie zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12 s fyziologicky prijateľnou
kvapalinou.

15. Nápoj podľa nároku 13, alebo spôsob podľa nároku 14, v y z n a -
č u j ú c i s a t ý m, že fyziologicky prijateľnú kvapalinu predstavuje voda, vodný
roztok, alkoholický roztok, ovocná šťava, mlieko alebo jogurt.

16. Spôsob inhibície oxidácie plazmových LDL u ľudského subjektu,
v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa prípravu suchej zmesi podľa
ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12, alebo nápoja podľa nároku 13 a podávanie zmesi
alebo nápoja danému subjektu.

17. Spôsob stimulácie tvorby TGF- β u ľudského subjektu, v y z n a -
č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa prípravu zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až
12, alebo nápoja podľa nároku 13 a podávanie zmesi alebo nápoja danému
subjektu.

18. Spôsob inhibovania agregácie krvných doštičiek a/alebo stimulovania
fibrinolýzy u ľudského subjektu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa prípravu
zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12, alebo nápoja podľa nároku 13 a
podávanie zmesi alebo nápoja danému subjektu.

19. Použitie zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12 na výrobu liečiva
na konzumáciu ľudským subjektom na inhibovanie oxidácie plazmových LDL u
daného subjektu.

20. Použitie zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12 na výrobu liečiva
na konzumáciu ľudským subjektom na stimulovanie tvorby TGF- β u daného
subjektu.

21. Použitie zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12 na výrobu liečiva
na konzumáciu ľudským subjektom na inhibovanie agregácie krvných doštičiek
a/alebo stimulovania fibrinolýzy u daného subjektu.

22. Spôsob výroby liečiva na orálnu konzumáciu ľudským subjektom na účely vyvolania jedného alebo viacerých z nasledujúcich efektov: inhibícia oxidácie plazmových LDL; inhibícia agregácie krvných doštičiek; stimulovanie fibrinolýzy; a stimulovanie tvorby TGF- β , v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa prípravu zmesi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12 a prípravu jednotkových dávok zmesi.

23. Výrobok, najmä potravina, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zmes podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12.

Literatúra

- Assojan & Sporn (1986) *J. Cell Biol.* 102, 1712 - 1733
- Aznar a spol., *Brit. Heart J.* (1986) 59, 535 - 541
- Bjorkerud (1991) *Arteriosclerosis Thromb.* 11 892 - 902
- Bradford (1976) *Anal Biochem* 72, 248 - 54
- de Rijke a spol., (1996) *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 329 - 34
- Elwood a spol., (1991) *Circulation* 83, 38 - 44
- Esterbauer a spol., (1989) *Free Radic. Res. Commun.* 6, 67 - 75
- Francis, *Am. Heart J.* (1988) 115, 776 - 780
- Frankel a spol., (1993) *Lancet* 341, 454 - 457
- Frankel a spol., (1995) *J. Agriculture and Food Chem.* 43, 890 - 894
- Fuhrman a spol., (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 549 - 554
- Goldberg (1995) *Clin. Chem.* 41, 14 - 16
- Gorog a spol., (1994) *Atherosclerosis* 111, 47 - 53
- Grainger a spol., (1995) *Nature Medicine* 1, 74 - 79
- Gronbaek a spol., (1995) *Brit. Med J.* 310, 1165 - 1169
- Hamsten a spol., *New Eng. J. Med.* (1985) 313, 1557 - 1563
- Hainsten a spol., *Brit. Heart J.* (1986) 55, 58 - 66
- Hamsten a spol., *Lancet*, (1987) II, 3 - 9
- Johnson, *Int. J. Cardiol.*, (1984) 6, 380 - 382
- Kirschenlohr a spol., (1993) *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol. 34), C571 - C576
- Klarsky & Armstrong (1993) *Amer. J. Cardiol.* 71, 467 - 469
- Lyons a spol. (1990) *J. Cell Biol.* 110, 1361 - 7
- Massagué, (1990) *Annual Rev. Cell. Biol.* 6, 597 - 641
- MoLoone a spol., (1995) *Proc. Nutr. Soc.* 54, Abstract 168A
- Meade, (1987) v *Thrombosis a Haemostasis*, Verstraete a spol., (Eds.) *Int. Soc. on Thrombosis a Haemostasis Univ. Press Leuven*, 37 - 60
- Mehta a spol., *J. Am. Coll. Cardiol.*, (1987) 9, 26
- Moncada & Vane *New Eng. J. Med.* (1979) 300, 1142 - 47
- Olofsson a spol., *Eur. Heart J.* (1989) 10, 77 - 82

Owens a spol., (1988) J. Cell Biol. 107, 771 - 780

Paramo a spol., Brit. Med. J. (1985) 291, 575 - 576

Renaud & De Lorgeril (1992) Lancet 339, 1523 - 1526

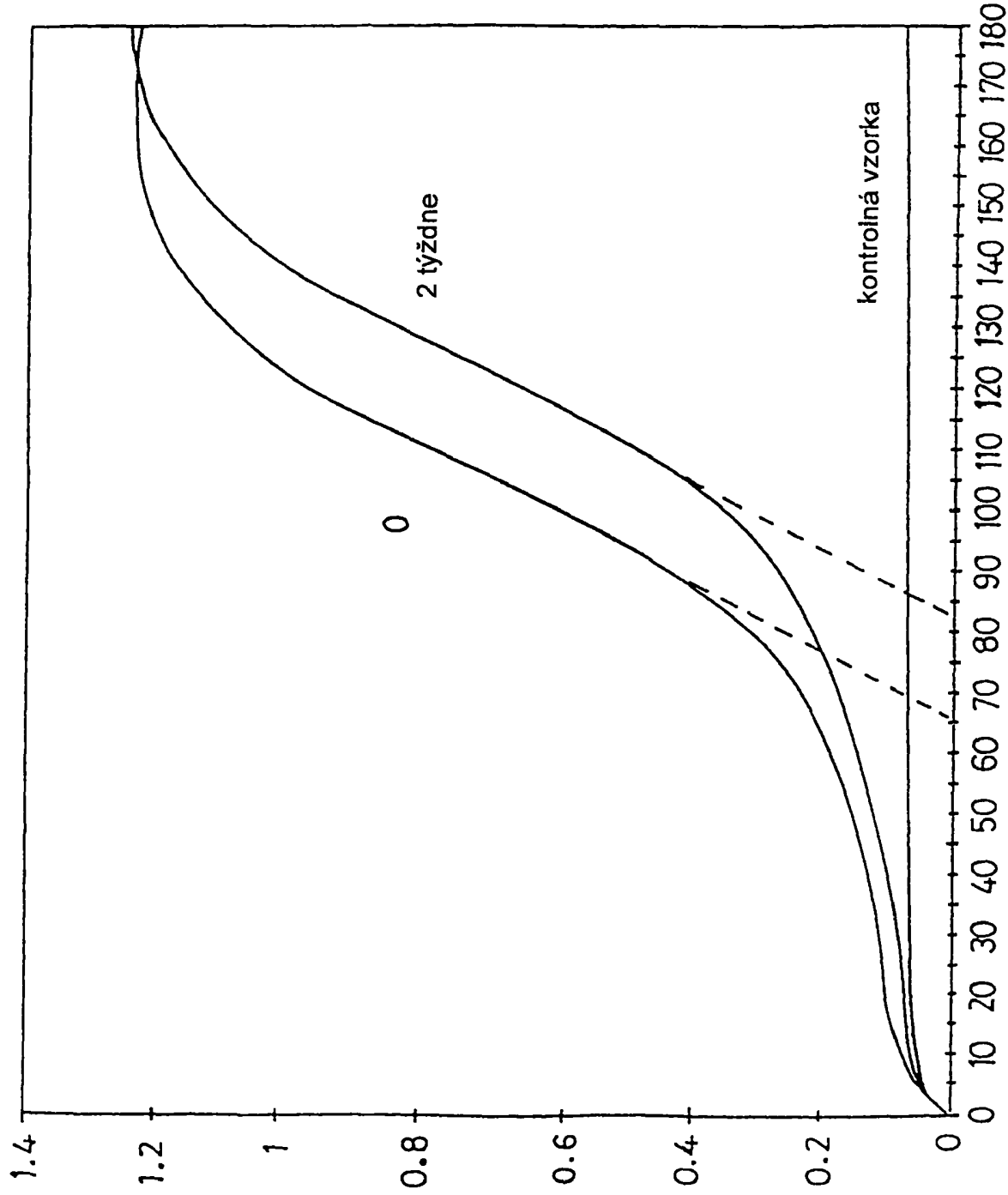
Shahidi & Nazck (1995) v Food phenolics, sources chemistry effects and applications Technomic Publishing Co. Lancaster, USA str. 136 - 146

Singleton & Rossi (1965) Amer. J. Enology a Viticulture 16, 144 - 158

• Steinberg, (1993) J. Intern. Med. 233, 227 - 232

• St Leger a spol., (1979) Lancet 1, 1017 - 1020

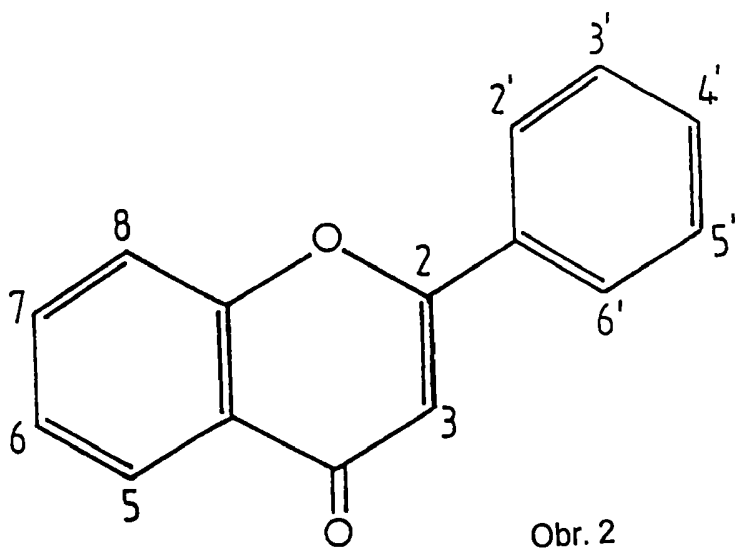
• Thaulou a spol., (1991) Circulation 84, 613 - 17



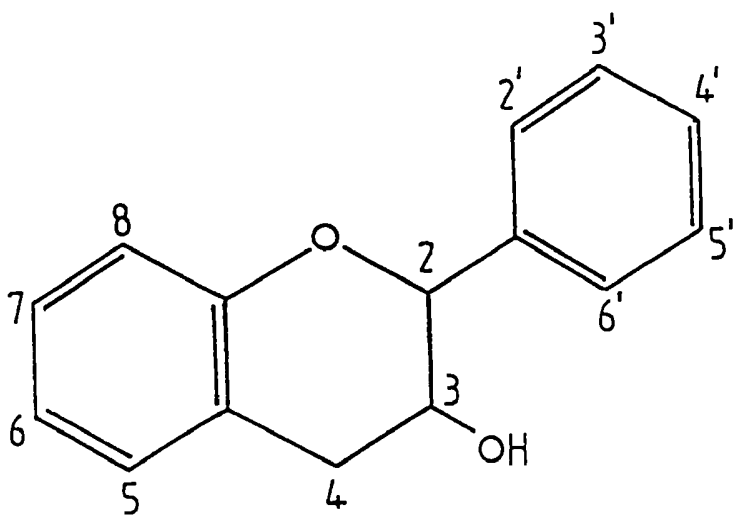
Obr. 1

213

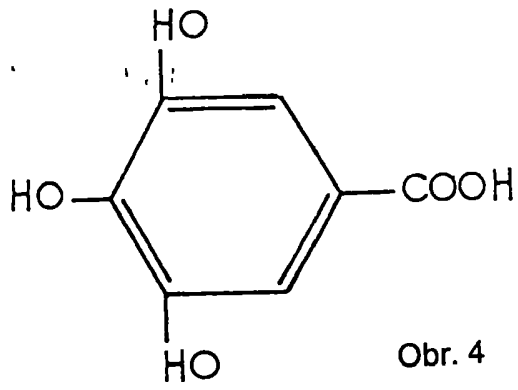
21 01 0 000 0000



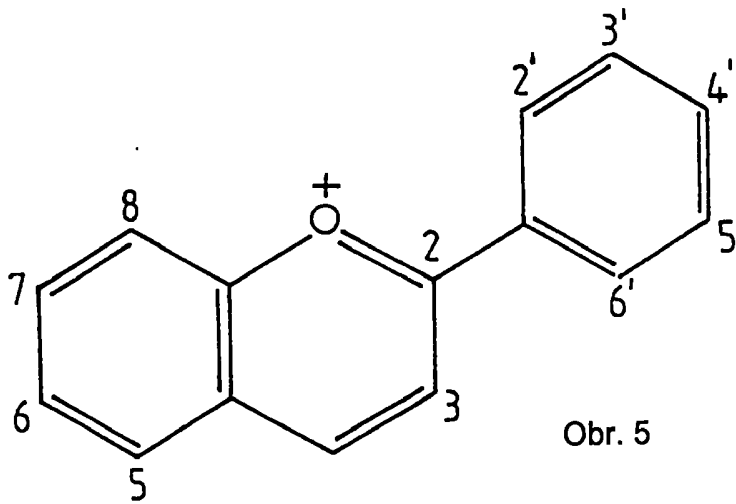
Obr. 2



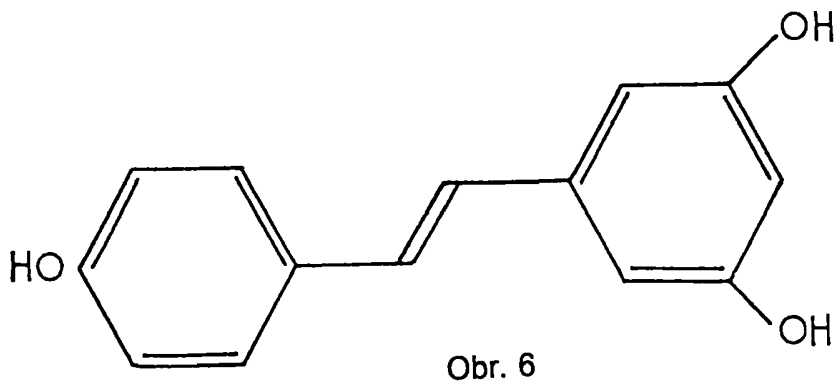
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6