



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
15.06.2010 10728592.6

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
**17.04.2013 Europejski Biuletyn Patentowy 2013/16
EP 2442667 B1**

(13) **T3**
(51) Int.Cl.
A23F 5/00 (2006.01)
A23F 5/04 (2006.01)
A23F 5/16 (2006.01)
A23F 5/24 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/4425 (2006.01)

(54) Tytuł wynalazku:
Ekstrakt wzbogacony w NMP

(30) Pierwszeństwo:
15.06.2009 EP 09007839

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
25.04.2012 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2012/17

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:
30.09.2013 Wiadomości Urzędu Patentowego 2013/09

(73) Uprawniony z patentu:
Tchibo GmbH, Hamburg, DE
Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, DE
Technische Universität München, Freising, DE

(72) Twórca(y) wynalazku:
VERONIKA SOMOZA, Garching, DE
THOMAS HOFMANN, Freising, DE
INGO LANTZ, Hamburg, DE
HERBERT STIEBITZ, Hamburg, DE
GERHARD BYTOF, Hamburg, DE
ROMAN LANG, Freising, DE
MALTE RUBACH, München, DE

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Jolanta Mitura
PATPOL
KANCELARIA PATENTOWA SP. Z O.O.
ul. Nowoursynowska 162 J
02-776 Warszawa

PL/EP 2442667 T3

Uwaga:

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

Opis

[0001] Wynalazek niniejszy dotyczy sposobu wytwarzania ekstraktu wzbogaconego w N-metylopirydinium (NCMP) z materiału organicznego zawierającego trygonelinę.

[0002] Ekstrakty z materiału organicznego zawierającego trygonelinę, jak na przykład napoje kawowe, są złożonymi roztworami zawierającymi aktywne biologicznie związki, które reagują z mikrośrodowiskiem w żołądku człowieka. Uważa się, że z powodu tej interakcji dochodzi do nasilenia wydzielania kwasu żołądkowego. Dlatego wielokrotnie opisano podrażnienie żołądka po spożyciu kawy. W złożonym procesie wydzielania kwasu w żołądku, główną rolę odgrywa. Dzięki aktywacji komórek okładzinowych przez hormony i transmiery, wodór jest transportowany do światła żołądka z wymianą na potas i żołądek jest zakwaszany. Równolegle, do światła żołądka jest wydzielany chlorek. Cały proces jest regulowany dzięki receptorom powierzchniowym komórek. W stymulacji wydzielania kwasu żołądkowego pośredniczy receptor histaminy H₂, receptor acetylocholino M₃ i receptor cholecystokininy beta. Reakcja wyrównawcza zachodzi dzięki aktywacji receptora somatostatyny. Z tego powodu, hormony, takie jak histamina, gastryna i somatostatyna, jak też acetylocholina odgrywają istotną rolę w regulacji wydzielania kwasu. Aktywacja receptorów powierzchniowych komórki jest bezpośrednio związana z wewnątrzkomórkowym przekazywaniem sygnału. Wykazano, że kinazy MAPK i receptorowe kinazy tyrozynowe są zaangażowane w regulację wydzielania kwasu żołądkowego. Jak dotąd, aktywacja receptora dla nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFr) wiąże się ze stanem nasilonego wydzielania komórek okładzinowych. Następnie, szlak sygnalizacyjny aktywuje kinazy Akt1 i ERK1/2 MAPK. Sygnał Akt1 aktywuje transkrypcję H⁺,K⁺-ATPazy i również nasila aktywność wydzielniczą komórek okładzinowych. ERK1/2 wykazuje ostry efekt hamujący aktywność wydzielniczą, ale uważa się, że jej przewlekłe pobudzenie sprzyja wydzielaniu. Jednak uważa się również, że ERK1/2 aktywuje ekspresję genu H⁺,K⁺-ATPazy. Niezależnie od tych szlaków przekąźnikowych tworzy się cykliczny AMP po aktywacji białka GS, związanej z aktywacją receptora histaminowego H₂. Cykliczny AMP może aktywować kinazę białkową A, która z kolei aktywuje czynnik transkrypcji w jądrze. Czynnik transkrypcji ATF-2 może być zaangażowany w ekspresję H⁺,K⁺-ATPazy i receptora somatostatyny 2, ponieważ obydwa geny mają element odpowiedzi na cykliczny AMP.

[0003] Przed paleniem, nietraktowane ziarna kawy zawierają około 1000 do 1400 µg/g N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidu (C5HT), palone ziarna kawy zawierają około 500 do 800 µg/g C5HT. Ponadto, palone ziarna kawy, które odkofeinowano, zawierają około 50 µg/l C5HT. Dodatkowo, kawa z kofeiną zawiera około 200 do 500 µg/l C5HT, podczas gdy kawa odkofeinowana zawiera około 50 µg/l C5HT.

[0004] W związku z tym donoszono, że konsumpcja kawy wiąże się z paleniem za mostkiem lub podrażnieniem żołądka, które mogą być wywołane zwiększonym wydzielaniem kwasu żołądkowego. Wpływ napojów kawowych na podrażnienie żołądka i śródżołądkowe pH u ludzi było po raz pierwszy badane przez Ehrlich i in. (Ehrlich A, Basse H, Henkel-Ernst J, Hey B, Menthe J, i Lücker PW. Effect of differently processed coffee on the gastric activity difference and intragastric pH in healthy volunteers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20: 155-161, 2006.). Po doustnym podaniu 150 ml napoju kawowego przygotowanego ze zwykłej lub traktowanej parą kawy, ten drugi powodował istotnie mniejsze podrażnienie śluzówki u zdrowych ochotników niż zwykły napój kawowy. Opierając się na tych wynikach przyjęto hipotezę, że obróbka parowa kawy istotnie zmniejsza ilość związków drażniących śluzówkę w palonych ziarnach kawy, a producenci kawy zaczęli oznaczać kawę po obróbce parowej jako „przyjazną dla żołądka”. Technologię tę opracowano po-

czątkowo do usuwania kofeiny i kwasów chlorogenowych, jako głównych związków obniżających walory smakowe napojów kawowych.

[0005] Zatem, problemem technicznym leżącym u podstaw niniejszego wynalazku jest dostarczenie produktu lub innych środków do zapobiegania lub zmniejszenia problemów żołądkowych spowodowanych wydzielaniem kwasu w żołądku, które nadawałyby się do zastosowania, na przykład, jako suplementy diety.

[0006] Rozwiązanie powyższego problemu technicznego osiągnięto w wykonaniach scharakteryzowanych w zastrzeżeniach.

[0007] W szczególności, wynalazek niniejszy dotyczy sposobu wytwarzania ekstraktu wzbogaconego w N-metylopirydinium (NMP) z materiału organicznego zawierającego trygonelinę, sposobu obejmującego następujące etapy:

- (a) odwoskowanie materiału organicznego zawierającego trygonelinę;
- (b) palenie materiału organicznego zawierającego trygonelinę;
- (c) traktowanie palonego materiału organicznego zawierającego trygonelinę gorącą wodą do uzyskania wodnego ekstraktu; i
- (d) dodawanie NMP do wodnego ekstraktu.

[0008] Odwoskowanie materiału organicznego zawierającego trygonelinę, palenie materiału organicznego zawierającego trygonelinę jak również ekstrakcję gorącą wodą można przeprowadzić metodami dobrze znanymi w tej dziedzinie.

[0009] Na przykład, odwoskowanie w etapie (a) można przeprowadzić sposobami opisanymi przez van der Stegen. 1979 (van der Stegen, The effect of dewaxing of green coffee on the coffee brew, Fd. Chem (4) 23-29, 1979).

[0010] Gdy materiał organiczny zawierający trygonelinę zawiera kofeinę, sposób według niniejszego wynalazku może ewentualnie obejmować dodatkowy etap odkofeinowania materiału organicznego zawierającego trygonelinę przed i/lub po etapie (a), na przykład przez traktowanie organicznego materiału zawierającego trygonelinę octanem etylu. Etap ten można przeprowadzić sposobami dobrze znanymi w tej dziedzinie.

[0011] W korzystnym wykonaniu, stopień palenia materiału organicznego zawierającego trygonelinę po etapie palenia (b) wynosi co najmniej 50, korzystniej co najmniej 80, jeszcze korzystniej co najmniej 100 stopni skali. W innym korzystnym wykonaniu, stopień palenia materiału organicznego zawierającego trygonelinę po paleniu w etapie (b) wynosi od 40 do 110 stopni skali, korzystniej od 60 do 90 stopni skali i nawet korzystniej od 70 do 90 stopni skali i najkorzystniej 70 do 80 stopni skali. Co do koloru, stopień palenia mniejszy niż 50 stopni skali uważany jest za ciemny, stopień palenia około 75 stopni skali uważany jest za średni, a stopień palenia wynoszący co najmniej 90 stopni skali uważany jest za jasny. Stopień palenia może być łatwo określony przez specjalistę, na przykład z zastosowaniem detektora koloru Dr. Lange – LFM 1, detektora koloru Dr. Lange – LK100 lub detektora koloru RSM-2 wytwarzanego przez Schaltex GmbH, według odpowiednich protokołów dostarczanych przez producenta wymienionych urządzeń.

[0012] Po paleniu w etapie (b) powyższego sposobu, materiał organiczny zawierający trygonelinę ma korzystnie zawartość C5HT mniejszą niż 50 µg/g C5HT, korzystniej mniej niż 40 µg/g C5HT, jeszcze korzystniej mniej niż 30 µg/g C5HT, nawet bardziej korzystnie 20 µg/g C5HT a najkorzystniej mniej niż 10 µg/g C5HT.

[0013] Sposób według niniejszego wynalazku ewentualnie obejmuje dalej etap mielenia upalonego materiału organicznego zawierającego trygonelinę po etapie (b). W korzystnym wykonaniu niniejszego wynalazku, materiałem organicznym zawierającym trygonelinę jest kawa, którą mieli się do stopnia wybranego z grupy obejmującej drobny, średni i gruby.

[0014] Traktowanie gorącą wodą w etapie (c) nie jest poddane żadnym ograniczeniom. Na przykład, traktowanie gorącą wodą w etapie (c) można prowadzić przez co najmniej 30 sekund i/lub woda może mieć temperaturę co najmniej 80°C.

[0015] Sposób według niniejszego wynalazku obejmuje ewentualnie jeszcze etapy filtrowania wodnego ekstraktu przed i/lub po etapie (d). Korzystnie, filtrowanie przeprowadza się w temperaturze pokojowej z zastosowaniem dostępnych komercyjnie filtrów do kawy, z pomocą siły grawitacji.

[0016] W kolejnym korzystnym wykonaniu, w etapie (d) do wodnego ekstraktu dodaje się co najmniej 2,95 mg/100ml NMP, korzystnie co najmniej 5 mg/100ml NMP, bardziej korzystnie co najmniej 8 mg/100ml NMP.

[0017] Korzystnie, ekstrakt wzbogacony w NMP uzyskany sposobem według niniejszego wynalazku zawiera co najmniej 23 mg/l NMP, korzystnie co najmniej 36 mg/l NMP, bardziej korzystnie co najmniej 48 mg/l NMP.

[0018] Korzystnie, ekstrakt wzbogacony w NMP uzyskany sposobem według niniejszego wynalazku jest pozbawiony C5HT. W szczególności, ekstrakt wzbogacony w NMP uzyskany sposobem według niniejszego wynalazku jest korzystnie pozbawiony CSHT w stosunku do materiału organicznego zawierającego trygonelinę, zastosowanego jako materiał wyjściowy w sposobie według niniejszego wynalazku.

[0019] W korzystnym wykonaniu, ekstrakt wzbogacony w NMP uzyskany sposobem według niniejszego wynalazku zawiera mniej niż 50 µg/l C5HT, korzystnie mniej niż 40 µg/l C5HT, bardziej korzystnie mniej niż 30 µg/l C5HT, bardziej korzystnie mniej niż 20 µg/l C5HT i najkorzystnie mniej niż 10 µg/l C5HT.

[0020] W innym korzystnym wykonaniu, stosunek NMP/C5HT x 100 w ekstrakcie wzbogaconym w NMP, uzyskanym sposobem według niniejszego wynalazku, wynosi co najmniej 100, korzystnie co najmniej 120, bardziej korzystnie co najmniej 140 i najkorzystnie co najmniej 180.

[0021] Termin „N-metylopirydynium” w stosowanym tu znaczeniu odnosi się do N-metylopirydynium w postaci jonowej, jak również w postaci soli, na przykład jodku (NMP⁺I⁻), chlorku, wodorotlenku lub siarczanu. Skrót N-MP i NMP stosuje się tu zamiennie dla N-metylopirydynium.

[0022] Termin „materiał organiczny zawierający trygonelinę” w stosowanym tu znaczeniu odnosi się do dowolnego, naturalnie występującego materiału, który zawiera alkaloid trygonelinę.

[0023] Ogólnie, materiał organiczny zawierający trygonelinę jest wybrany z grupy obejmującej kawę, w szczególności *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea spp.*, i *Psilanthus spp.*, członków bobowatych (*Fabaceae*), w szczególności *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum*, i *Trigonella foenum-graecum*, członków kosmowatych (*Chenopodiaceae*), w szczególności *Chenopodium quinoa* i członków wiechlinowatych (*Poaceae*), w szczególności *Avena sativa*.

[0024] W korzystnym wykonaniu, materiałem organicznym zawierającym trygonelinę jest *Coffea spp.* W bardziej korzystnym wykonaniu, materiałem organicznym zawierającym trygonelinę jest *Coffea arabica*, korzystnie *Coffea arabica*, pochodząca z Kolumbii lub *Coffea arabica*, pochodząca z Brazylii. W kolejnym korzystnym wykonaniu, materiałem organicznym zawierającym trygonelinę jest *Coffea canephora*, znana również jako „kawa robusta”, korzystnie *Coffea canephora*, pochodząca z Wietnamu.

[0025] Wymieniony ekstrakt wzbogacony w N-metylopirydynium (NMP) można stosować jako suplement diety.

[0026] W przebiegu niniejszego wynalazku opracowano środek spożywczy, wzbogacony w N- metylopirydynium (NMP) przez dodanie wymienionego ekstraktu wzbogaconego w NMP, uzyskanego w niniejszym wynalazku.

[0027] Termin „środek spożywczy” w stosowanym tu znaczeniu odnosi się do dowolnej substancji, która może być skonsumowana lub wypita przez zwierzę lub człowieka, na przykład celem odżywienia i/lub dla przyjemności. W szczególnie korzystnym wykonaniu, środkiem spożywczym jest kawa.

[0028] Korzystnie, ekstrakt z materiału zawierającego trygonelinę wzbogacony w NMP, uzyskany sposobem według niniejszego wynalazku, łączy wysoką zawartość NMP z niską zawartością C5HT. Przez odwośkowanie materiału organicznego zawierającego trygonelinę, zachowana jest zawartość NMP i obniżona zawartość C5HT. A zatem, ekstrakt wzbogacony w NMP ma bardzo korzystny stosunek NMP/C5HT. W konsekwencji, działanie NMP hamujące wydzielanie kwasu żołądkowego jest wydłużone poza czas konsumpcji ekstraktu wzbogaconego w NMP, uzyskanego w niniejszym wynalazku, przez minimalizację zawartości C5HT.

[0029] Figury przedstawiają:

Figura 1: Indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX) komórek HGT-1 traktowanych przez 10 min histaminą (HIS, 1 mmol/l) lub jedną z frakcji w rozpuszczalniku przygotowanych z napojów kawowych w stężeniach odpowiadających ich wydajności ilościowej: woda (H₂O: 2,14 mg/ml), octan etylu (EtAc: 0,16 mg/ml), dichlorometan (CH₂Cl₂: 0,18 mg/ml) i pentan: 0,005 mg/ml). Rozkład ilościowy związków we frakcji w rozpuszczalniku przedstawiano w tabeli poniżej (statystyka: dwustronny test t vs komórki kontrolne, ***=p.0,001, n=9).

Figura 2: Indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX) komórek HGT-1 traktowanych przez 10 min różnymi stężeniami N-metylopirydynium, jako pojedynczego związku (N-MP) lub w kombinacji z liofilizatem przygotowanym ze zwykłej kawy (Kawa + N-MP), przy uzyskaniu takiego samego stężenia N-metylopirydynium w układzie, jak stosowane dla pojedynczego związku (statystyka: jednoznaczniowa ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidaka, *=p.0,05, n=9).

Figura 3: Indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX, czas ekspozycji: 10 min, A) i zawartość cyklicznego AMP (cAMP, czas ekspozycji: 0,5 min, B) komórek HGT-1 traktowanych histaminą (HIS: 1 mmol/l) lub liofilizatami (2,5 mg/ml) przygotowanymi zarówno z C. Arabica Brazil (Kawa A), C. Arabica Brazil traktowanej parą (Kawa AT), C. Robusta Vietnam (kawa R) lub C. Robusta Vietnam traktowanej parą (kawa RT), odpowiednio mających wysokie (kawa A, AT), średnie (kawa R) i niskie (kawa RT) stężenia N-metylopirydynium (statystyka: dwustronny test t vs komórki kontrolne, **=p.0,01, ***=p.0,001, n=9; lub vs kawa RT ##=p.0,01, ###=p.0,001).

Figura 4: Indeksy aktywacji szlaku EGFr, ERK1/2, Akt1 i ATF-2 w komórkach HGT-1 traktowanych przez 10 min histaminą (HIS: 1 mmol/l) lub liofilizatami (2,5 mg/ml) przygotowanymi z C. Arabica Brazil (Kawa A), C. Arabica Brazil traktowanej parą (Kawa AT), C. Robusta Vietnam (kawa R) lub C. Robusta Vietnam traktowanej parą (kawa RT), odpowiednio mającymi wysokie (kawa A, AT), średnie

(kawa R) i niskie (kawa RT) stężenia N-metylopirydinium (statystyka: dwustronny test t vs komórki kontrolne, **= $p.0,01$, ***= $p.0,001$, $n=9$ lub vs kawa RT ##= $p.0,01$, ###= $p.0,001$).

Figura 5: Zależne od czasu indeksy ekspresji genów dla H^+,K^+ -ATPazy (ATP4A), receptora histaminy H_2 (HRH2), receptora acetylocholiny M_3 (CHRM3) i receptora somatostatyny (SSTR2) w komórkach HGT-1 po ekspozycji na liofilizaty (2,5 mg/l) przygotowane z C. Robusta Vietnam (kawa R) lub C Robusta Vietnam traktowanej parą (kawa RT), mające odpowiednio średnie (kawa R) i niskie (kawa RT) stężenia N-metylopirydinium. (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidaka, *= $p.0,05$, **= $p.0,01$, $n=6$; wartość p dla jednoczynnikowej ANOVA podano na wykresie, tabele poniżej wskazują istotne zmiany w przebiegu czasowym w porównaniu do najbardziej wyraźnej zmiany ekspresji wykrytej w analizie post-hoc).

Figura 6: Zależne od czasu indeksy ekspresji genów dla H^+,K^+ -ATPazy, (ATP4A), receptora histaminy H_2 (HRH2), receptora acetylocholiny M_3 (CHRM3) i receptora somatostatyny (SSTR2) w komórkach HGT-1 po ekspozycji na liofilizaty (2,5 mg/l) przygotowane z C. Arabica Brazil (kawa A) lub C. Arabica Brazil traktowanej parą (kawa AT), o wysokich stężeniach N-metylopirydinium (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidak, *= $p.0,05$, **= $p.0,01$, $n=6$; wartość p dla jednoczynnikowej ANOVA podano na wykresie, tabele poniżej wskazują istotne zmiany w przebiegu czasowym w porównaniu do najbardziej wyraźnej zmiany ekspresji wykrytej w analizie post-hoc).

Figura 7: Wpływ pojedynczych związków i kombinacji związków na ekspresję genów H^+,K^+ -ATPazy (ATP4A) i receptora histaminy H_2 (HRH2). A: Zbadano, że ekspresja ATP4A jest regulowana w górę przez kwas chlorogenowy (CA) i kofeinę (CAFF) po 20 minutach. W przeciwieństwie do tego, pirogalol (PYR) i N-metylopirydinium (N-MP) regulowały w dół ekspresję po 20 minutach. (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc). B: Kombinacja CA, CAFF lub obydwu z N-NMP spowodowała istotną kompensację regulacji w górę przez CAFF lub CA (statystyka: test t - CS lub CF vs kombinacja z N-MP lub PYR). C: N-alkanoilo-hydroksytryptamidy (C5HT) znacznie regulowały w dół HRH2 po pięciu minutach. Katechol również powodował regulację w dół. CA regulował w górę HRH2 po 20 minutach. (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc). D: Kombinacja CA z C5HT skutkowała znacznym zwiększeniem ekspresji HRH2 ($p.0,001$) w porównaniu do komórek kontrolnych. CA w kombinacji z CAT nie zmieniał ekspresji HRH2 w porównaniu do samego CAT (statystyka: test t - komórki traktowane vs komórki kontrolne) (*= $p.0,05$, **= $p.0,01$, ***= $p.0,001$, $n=5-9$).

Figura 8: Wpływ pojedynczych związków lub kombinacji związków na ekspresję genów receptora acetylocholiny M_3 (CHRM3) i receptora somatostatyny 2 (SSTR2). A: Ekspresja CHRM3 była istotnie zwiększona przez pirogalol (PYR) i w mniejszym stopniu przez kofeinę (CAFF) i N-metylopirydinium (N-MP). N-MP powodowało następczą regulację w dół po 20 min, a PYR po 15 min. (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc). B: N-alkanoilo-hydroksytryptamid (C5HT) znacznie i katechol (CAT) łagodnie regulowały w dół receptor somatostatyny 2. N-MP regulowało w górę ten receptor przeciwwydzielniczy więcej niż dwukrotnie z następczą regulacją w dół (statystyka:

jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc). C: Łączny wpływ N-MP i C5HT po 5 min skutkował pełną kompensacją wpływu każdego pojedynczego związku (statystyka: test t -MP/C5HT vs. N-MP lub C5HT) (*=p.0.05, **=p.0.01, ***=p.0.001, n=5-9;).

Figura 9: Wpływ pełnej kombinacji (dalej „rekombinacja”) wszystkich związków na ekspresję genów receptora histaminy H2 (HRH2), receptora acetylocholino M3 (CHRM3), receptora somatostatyny 2 (SSTR2) i H⁺,K⁺-ATPazy (ATP4A). Przedstawiono również aktywację transdukcji sygnału dla kinaz i czynnika transkrypcyjnego ATF-2, jak również stężenia cyklicznego AMP. A: HRH2 był silnie regulowany w górę przez mieszaninę wszystkich związków po 10 min. CHRM3 i SSTR2 były regulowane w dół w ciągu minimum 20 min. ATP4A był regulowany w mniejszym stopniu niż receptory, ale ciągle istotnie, w piątej i 10 minucie (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc). B: EGFr był istotnie aktywowany przez mieszaninę wszystkich związków, jak również Akt1 i czynnik transkrypcyjny ATF-2. W przeciwieństwie do tego, wykazano, że poziom fosforylacji ERK1/2 był poniżej poziomów kontrolnych (test t -komórki traktowane vs komórki nietraktowane (CTR)). (*=p.0,05, **=p.0,01, ***=p.0,001, n=3-9;).

Figura 10: Wpływ pojedynczych związków na stężenia cyklicznego AMP, aktywację kinaz i czynnika transkrypcyjnego ATF-2. A: Histamina (HIS), kofeina (CAFF), katechol (CAT), pirogalol (PYR), N-alkanoilo-hydroksytryptamid (C5HT) i N-metylopirydinium (N-MP) zwiększały istotnie stężenia cyklicznego AMP w porównaniu do komórek kontrolnych (CTR). Kwas chlorogenowy (CA) powodował znaczące obniżenie stężeń cyklicznego AMP. B: Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFr) był znacznie aktywowany przez HIS, CA, CAFF i C5HT, ale nie przez PYR, CAT i N-MP. Kinaza Akt1 była istotnie aktywowana tylko przez traktowanie CAFF, PYR, CAT, C5HT i N-MP. Sygnałowanie ERK1/2 było wyłącznie zwiększone dzięki traktowaniu N-MP. C: Białko wiążące element odpowiedzi na cykliczny AMP, znane jako czynnik transkrypcyjny ATF-2, ulegało znaczącej aktywacji przez HIS, CAT i N-MP. CAFF powodowało aktywację poniżej poziomów kontrolnych (statystyka: test t - komórki traktowane vs komórki nietraktowane (CTR), *=p.0,05, **=p.0,01, ***=p.0,001, n=3-7).

Figura 11: Pomiar aktywności wydzielniczej przez indeksy protonów wewnątrzkomórkowych (IPX). A: Traktowanie komórek HGT-1 histaminą (HIS), kofeiną (CAFF), pirogalolem (PYR), katecholem (CAT) lub C5HT skutkowało zwiększonym wydzielaniem wskazywanym przez ujemny IPX. W przeciwieństwie do tego, kwas chlorogenowy (CA) N-metylopirydinium (N-MP) i trygonelina (TRI) powodowały zmniejszone wydzielanie protonów wskazywane przez dodatni IPX (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA, p=0,01.0,001; n=10-12). B: Traktowanie komórek HGT-1 kwasem chlorogenowym (CA) zwiększało prąd, podczas gdy rekombinacja wszystkich związków (Mix) powodowała obniżony IPX (statystyka: test t - komórki traktowane vs komórki nietraktowane, **=p=0.05, ***=p=0.001, n=3-7).

Figura 12: Pomiar aktywności wydzielniczej w komórce Ussinga. A: Traktowanie histaminą (HIS)

zwiększało prąd po podaniu wierzchołkowym. Nasilony prąd był następnie ograniczany podaniem wierzchołkowym omeprazolu (OMP), swoistego inhibitora H^+,K^+-ATP azy. B: Wierzchołkowe podanie kwasu chlorogenowego (CA) spowodowało zmniejszenie prądu, wskazujące na zmniejszoną aktywność wydzielniczą jak w (A). C: Wierzchołkowe podanie kofeiny (CAFF) zwiększało prąd. Po podaniu podstawnym N-metylopirydynium (N-MP) prąd zmniejszał się ponownie wskazując na hamujące działanie N-MP. D: Podstawne podanie samego N-MP powodowało jedynie nieznaczny spadek prądu. E: Wierzchołkowe podanie katecholu (CAT) zwiększało prąd, ale maksymalnej wartości nie osiągnęto w momencie podania, co wskazuje na powolną odpowiedź komórek okładzinowych na CAT. F: Wierzchołkowe podanie C5HT silnie zwiększało prąd w momencie podania, jednakże IPX nie zmieniał się w sposób istotny. ($p=0,07$, patrz A). G: Pirogalol (PYR) powodował spadek prądu po podaniu wierzchołkowym wskazując na obniżone wydzielanie. H: Podanie podstawne trygoneliny (TRI) powodowało silne obniżenie prądu, wskazujące na potencjał przeciwydzielniczy.

Figura 13. Działania testowanych związków w rekombinacjach. N-metylopirydynium (N-MP), kwas chlorogenowy (CA), kofeina (CAFF), katechol (CAT), C5HT lub pirogalol (PYR) pominięto w pełnej rekombinacji badanych związków (Mix), aby wyjaśnić działania synergistyczne każdego związku (statystyka: jedno lub dwustronny test t - mieszanina bez związku vs mieszanina, $**=p=0,001$, $n=9$).

Figura 14. Analiza HPLC-MS/MS (ESI*) filtrowanych napojów z kawy palonej. Oprócz C5HT, określono N-metylopirydynium w tym samym napoju, stosując analizę rozcieńczeń stabilnego izotopu, stosowaną już z sukcesem w poprzednich badaniach. Dane podsumowano na Fig. 15.

Figura 15: Podsumowanie danych dotyczących N-alkonoilo-5-hydroksytryptamidów (panel dolny, $\mu g/l$, suma pochodnych) i N-metylopirydynium (panel górny, mg/l) 50, 80, 110 oznacza stopień upalenia w stopniach skali. 1) „nietraktowana Col 5”, 2) „nietraktowana Col 2”, 3) „odkofeinowana 2+2”, 4) „odwoskowana Col 5”, „odwoskowana Col 2**”

Figura 16. Porównanie badanych kaw na podstawie stosunku NMP/C5HT (czynnik = $NMP/C5HT \times 100$). 50, 80, 110 oznaczają stopień wypalenia w stopniach skali. Kawy z poprzednich badań przedstawiono w celach porównawczych. 1) „nietraktowana Col 5”, 2) „nietraktowana Col 2”, 3) „odkofeinowana 2+2”, 4) „odwoskowana Col 5”, 5) „odwoskowana Col 2**”

Figura 17. Porównanie potencjału wydzielniczego kaw wzbogaconych w N-MP. Przedstawiono indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX). Najskuteczniejsze stężenia N-metylopirydynium (w zawieszonym ponownie liofilizacie) pokazano w górze figury (statystyka: dwustronny test t, $***=p<0,001$, $\$ = p<0,05$, $\$\$ = p<0,01$; $\$ \$ \$ = p<0,001$).

Figura 18: Wpływ trygoneliny na aktywność wydzielniczą (statystyka: dwustronny test t, $***p\leq 0,001$).

Figura 19: Zależność: dawka – efekt dla trygoneliny (statystyka: jednoczynnikowa ANOVA, $*p\leq 0,05$, $\$ = p<0,05$, $\$\$ = p<0,01$, $\$ \$ \$ = p<0,001$, $n=4$)

Figura 20: Wpływ trygoneliny i N-metylopirydynium na prąd zwarcia.

[0030] Wynalazek niniejszy zostanie teraz zilustrowany w następujących przykładach, bez ograniczania go do nich.

Przykłady

Przykład 1: Kierowane aktywnością frakcjonowanie do charakteryzowania napojów kawowych, które skutecznie obniżają aktywność wydzielania kwasu żołądkowego w porównaniu do zwykłych kaw

[0031] U niektórych osobników, konsumpcja kawy często wiąże się z objawami podrażnienia żołądka. Uważa się, że traktowanie surowych ziaren kawy gorącą parą wodną zasadniczo zmniejsza zawartość związków drażniących żołądek i wytworzone tą technologią produkty wprowadzono jako „kawy przyjazne dla żołądka”. Jednakże, dane dotyczące wpływu kawy traktowanej parą na wydzielanie kwasu żołądkowego są sprzeczne i dotychczas nie wykazano, które składniki kawy działają jako pro-, a które jako antystymulatory wydzielania. Przedstawiony tu przykład ma na celu scharakteryzowanie napoju kawowego, który skutecznie obniża aktywność wydzielania protonów przez ludzkie komórki żołądka (HGT-1).

[0032] Najpierw, zwykły napój kawowy frakcjonowano, stosując rozpuszczalniki o różnej polarności: wodę, octan etylu, dichlorometan i pentan. Badania funkcjonalne aktywności wydzielniczej protonu (PSA) tych frakcji w rozpuszczalnikach wykazały najmniej wyraźny wpływ dla frakcji wodnej, dla której analizy ilościowe wykazały największą dystrybucję kwasu chlorogenowego (95%), β N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidu (55%) i N-metylopirydynium (N-MP, >99%) spośród wszystkich frakcji. Wykonane następnie eksperymenty pokazały, że komórki HGT-1 traktowane zwykłą kawą wzbogaconą w N-MP, w stężeniu około 20 mg/ml N-MP, znacząco obniżyły PSA w porównaniu do komórek poddanych działaniu liofilizatów napojów kawowych zawierających wyższe (32-34 mg/l) lub niższe (5 mg/l) stężenia N-MP. Wyniki te potwierdzono stosując analizę szlaku transkrypcji (ATF-1, Akt1) i czynników sygnałowania (cAMP, EGFR), kinaz (ERK1/2) i eksperymenty nad ekspresją genów dla pro- (receptor histaminy HRH2, acetylocholinoi CHRM3) i anty- (receptor somatostatyny SSTR1) wydzielniczych receptorów oraz H⁺,K⁺-ATPazy.

[0033] Przygotowanie próbki

Dla frakcjonowania rozpuszczalnikiem stosowano proszek zmielonej kawy palonej (normalna, dostępna w handlu, mieszanka kaw ani nie traktowana parą ani nie odkofeinowana); 54 g homogennego materiału odważono na filtrze papierowym, powszechnie stosowanym do domowego przygotowania napojów kawowych (Melitta Gold, Nr 4, Aldi, Niemcy). Porcje świeżo zagotowanej wody z kranu (T=90-95°C, około 100 ml każda) wylewano na proszek i gorący filtrat zbierano do 1000 ml kolby miarowej. Dokładnie 500 ml roztworu kawy przenoszono do naczyń krystalizacyjnych, natychmiast zamrażano (-20°C) i ostatecznie suszono przez liofilizację (48 h, 0,77 mbar, 25°C). Drugą część napoju kawowego (500 ml) przenoszono do rozdzielacza i fazę wodną ekstrahowano kolejno pentanem (4 x 500 ml), dichlorometanem (4 x 500 ml) i octanem etylu (4x 500 ml) z fazą wodną jako pozostałością. Wszystkie uzyskane frakcje poddawano działaniu próżni, rozpuszczano w wodzie, mrożono (-20°C) i liofilizowano (48 h, 0,77 mbar, 25°C). Wydajność określano grawimetrycznie.

rycznie. Rozpuszczone frakcje stosowano następnie do testów funkcjonalnych na aktywność wydzielniczą ludzkich komórek okładzinowych żołądka, w stężeniach odpowiadających ich wydajności.

[0034] Badania nad komórkowymi mechanizmami regulacji wydzielania kwasu żołądkowego przeprowadzono z dwoma próbkami *C. Arabica* Brazil (kawa A) i dwoma *C. Robusta* Vietnam (kawa R). Jedna z odmian każdej kawy, była zwykłą kawą, ani nie traktowaną parą ani nie odkofeinowaną, druga odpowiednia próbka była poddawana traktowaniu parą (kawa AT, kawa RT), zgodnie z praktyką wytwórcy, by usunąć domniemane podrażnienie żołądka. Wszystkie próbki kawy były reprezentatywne dla kaw dostępnych w handlu i były dostarczone przez lokalnych wytwórców kawy. Pokrótce, surowe ziarna kawy poddawano ekstrakcji gorącą parą wodną przy ciśnieniu 19 do 22 psi przez 10 – 30 minut. Następnie, pozostałą wilgoć odparowano ogrzewając ziarna do 130 -150°C. Ostatecznie, uwolniono odparowaną parę wodną z aparatu, podczas gdy oryginalną zawartość wody w surowych ziarnach kawy odzyskano w atmosferze próżni. Napoje z każdej z czterech kaw (A, AT, R i RT) przygotowano zgodnie ze standardową recepturą, którą typowo stosuje się do przygotowania napojów w domu.

[0035] Hodowla komórek

Komórki ludzkiego raka komórek okładzinowych (HGT-1) uzyskano od Dr C. Loboisse (Laboratory of Pathological Anatomy, Nantes, Francja) i hodowano w 37°C i 5% CO₂. Jako podłoże hodowli stosowano podłoże Eagle w modyfikacji Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, PAA, Coelbe, Niemcy) z glukozą (4%, PAA, Coelbe, Niemcy) i dodatkiem 20% surowicy płodowej cielęcej (PAA, Coelbe, Niemcy), 2% L-glutaminy (PAA, Coelbe, Niemcy), 2% penicyliny streptomycyny (PAA, Coelbe, Niemcy) i 2% buforu - kwasu 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetano-sulfonowego (HEPES)(PAA, Coelbe, Niemcy). Przed każdym eksperymentem komórki hodowano przez 5 dni i synchronizowano DMEM (bez dodatku surowicy płodowej cielęcej).

[0036] Izolacja RNA i synteza cDNA

100000 komórek wysiano na 6-studzienkowe płytki. Po traktowaniu próbki, komórki zbierano do analizy całkowitego RNA, który izolowano z zastosowaniem zestawu RNeasy Midi (Qiagen, Hilden, Niemcy). Trawienie DNazą I przeprowadzono w kolumnie z zestawem DNazy wolnej od RNazy (Qiagen, Hilden, Niemcy). Przed qPCR, całkowitą zawartość RNA mierzono fotometrycznie, przy 260 nm. cDNA syntetyzowano stosując zestaw cDNA High Capacity Synthesis Kit (Applied Biosystems, Monachium, Niemcy), zgodnie z instrukcją producenta.

[0037] Badanie ekspresji genów

Analizy ekspresji genów przeprowadzono po traktowaniu próbki komórek przez 5, 10, 15 lub 20 min. Startery dla podjednostki alfa H⁺,K⁺-ATPazy (ATP4A), receptora histaminy H₂ (HRH2), receptora somatostatyny (SSTR2) i receptora acetylocholino (CHRM3) zaprojektowano za pomocą Beacon Designers 7.0 (Premier-Biosoft, Palo Alto, CA) i potwierdzono analizami krzywej standardowej i topnienia, zgodnie z powszechnie stosowanymi sposobami. Prawidłową sekwencję produktów PCR weryfikowano przez sekwencjonowanie (Medigenomics, Martinsried, Niemcy, dane nie przedstawione). Test PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono na cyklerze Mx3000p (Stratagene, Amsterdam, Holandia) z zastosowaniem zestawu Brilliant SYBR Green Kit (Stratagene, Amsterdam, Holandia). Warunki cykli były następujące: 10:00 min/95°C (aktywacja). 00:30 s/95°C (denaturacja), 00:30 s/60°C (aniling z pomiarem fluorescencji), 00:30 s/72°C (elongacja).

[0038] Ilościowe oznaczenie cyklicznego AMP

50000 komórek wysiano na 24-studzienkowe płytki i traktowano odpowiednimi próbkami przez 0,5 minuty. Dla określenia cyklicznego AMP w supernatantach komórek, stosowaliśmy kompetycyjny zestaw parametryczny ELISA do cyklicznego AMP (R&D Systems, Minneapolis, MN) w sposób opisany w protokole wytwórcy. Supernatanty oddzielano po 1 minucie inkubacji.

[0039] Badanie transdukcji sygnału

Detekcję stanu fosforylacji receptorowych kinaz tyrozynowych i kinaz MAPK wykrywano testami immunoenzymatycznymi. Białko całkowite izolowano z komórek HGT-1 po inkubacji z testowanymi kawami przez 10 min, jak zaleca protokół wytwórcy. Ilość białka całkowitego obliczano fotometrycznie, stosując odczynnik Bradforda (Bio-Rad, Monachium). Następnie zastosowano ELISA do określenia stanu fosforylacji: zestaw EGR-ELISA, zestaw EKR1/2 ELISA (obydwa z Calbiochem/Merck, Nottingham, UK), ELISA PathScan dla Akt 1 i ELISA PathScan dla ATF-2 (obydwa z Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt nad Menem, Niemcy). Absorbencję odczytywano przy 450 nm na czytniku płytek MRX (Dynex, Berlin, Niemcy) lub czytniku płytek Varioscan Flash (Thermo Electron Cooperation, Waltham, MI) z dodatkowym odczytem przy referencyjnej długości fali 620 nm, jeśli tak nakazywał protokół wytwórcy.

[0040] Aktywność wydzielnicza

W każdym niezależnym eksperymencie biologicznym stosowano zawiesinę komórek o objętości 2 ml, odpowiadającą 2000000 komórek, i traktowano przez 10 minut 2,5 mg liofilizatu napoju kawowego (54 g / 1,1 l gorącej wody) na ml PBS, histaminą (1 mmol w PBS) lub różnymi frakcjami rozpuszczalnymi w 37°C. Aktywność wydzielniczą mierzono określając indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX). Do pomiaru wewnątrzkomórkowego pH stosowano barwnik fluorescencyjny Carboxy-SNARF-AM (Invitrogen, Karlsruhe, Niemcy). Sposób potwierdzono powszechnie znanymi metodami i stosowano histaminę (1 mmol/l) jako dobrze znany związek referencyjny, który stymuluje wytwarzanie kwasu w żołądku. Pokróćce, komórki HGT-1 barwiono 3 µM barwnikiem przez 30 minut w lodzie. Wewnątrzkomórkowe pH obliczono w odniesieniu do krzywej kalibracyjnej z komórkami HGT-1 traktowanymi 2 µM nigerycyny (PAA, Coelbe, Niemcy) w buforze blokującym K⁺, składającym się z 20 mM NaCl, 110 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 18 mM D-glukozy i 20 mM HEPES, który był ustawiony na różne punkty kalibracyjne pH (6,8 -8,2), przez miareczkowanie NaOH. Następnie, obliczano indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX) jako logarytm log₂ ze stosunku stężenia wewnątrzkomórkowego wodoru w komórkach traktowanych i kontrolnych. Im wyższy IPX, tym więcej protonów pozostaje w komórce, wskazując na niższą aktywność wydzielniczą, natomiast niskie wartości IPX wskazują na większe wydzielanie protonów.

[0041] Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzano za pomocą Excel 2003 lub SigmaStat (Systat Software GmbH, Erkrath, Niemcy). Zestawy danych wytworzone przez qPCR i ELISA przekształcano przez konwersję logarytmiczną, aby otrzymać rozkład normalny i przedstawiano jako zindeksowany log₂ stosunku na figurach. Pojedyncze porównania pomiędzy traktowanymi a kontrolnymi komórkami były wykonywane za pomocą dwustronnego testu t-Studenta dla równych wariancji. Dla analiz przebiegów czasowych ekspresji genów, wykonywaliśmy jednoczynnikową ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidak dla danych parametrycznych i testem Kruskal-Wallisa z testem post-hoc Dunna dla nieparametrycznych zestawów danych. W części wyników zaznaczono liczbę powtórzeń każdego eksperymentu, ale wynosiła ona co najmniej n=3. Na każdym wykresie słupki błędów przedstawiają błąd standardowy (SE).

[0042] Aktywność wydzielnicza frakcji rozpuszczalnych przygotowanych ze zwykłych kaw

Zastosowano następujące podejście do oceny aktywności wydzielniczej kwasu żołądkowego napojów kawowych w komórkach ludzkiego raka żołądka (HGT-1). Komórki traktowano liofilizowanymi napojami kawowymi przygotowanymi z odkofeinowanej i/lub traktowanej parą kawy, wykazującej zmniejszoną aktywność wydzielniczą w porównaniu do komórek traktowanych liofilizatami przygotowanymi ze zwykłej kawy. W tym modelu, jako wskaźnik wydzielania protonów analizowano wewnątrzkomórkowe pH za pomocą cytometrii przepływowej, stosując barwnik wrażliwy na pH SNARF-AM. Dane obliczono jako indeks wewnątrzkomórkowego pH (IPX), opierając się na hipotezie, że wewnątrzkomórkowe stężenie H^+ zmniejsza się dzięki wydzielaniu protonów. Im wyższy IPX, tym więcej protonów pozostaje w komórce, wskazując niższą aktywność wydzielniczą, natomiast niskie wartości IPX wskazują na wyższe wydzielanie protonów. Wartości IPX ostatecznie przekształcano do postaci $\log_2$ dla stabilizacji wariancji. W pracy tu przedstawionej traktowanie komórek HGT-1 fizjologicznym stymulantem, histaminą, prowadziło do stymulacji aktywności wydzielniczej, jak pokazano przez istotne zmniejszenie IPX ($-0,41 \pm 0,04$; $p.0,001$) w porównaniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (Fig. 1). Komórki traktowane tymi frakcjami ekstrahowanymi z komercyjnych, zwykłych mieszanek kawowych, octanem etylu, dichlorometanem i pentanem, reagowały w podobny sposób z wartościami IPX $-0,43 \pm 0,6$, $-0,20 \pm 0,03$ i $-0,34 \pm 0,04$, odpowiednio (dwustronny test t, $p.0,001$ vs nietraktowane komórki kontrolne dla każdej frakcji, Fig. 1). W przeciwieństwie do tego, komórki ekspozycje na ekstrakt wodny wykazywały istotnie zmniejszoną aktywność wydzielniczą w porównaniu do komórek kontrolnych, jak wykazano przez dodatnie wartości IPX $+0,07 \pm 0,03$ (dwustronny test t, $p.0,05$; Fig. 1). Biorąc pod uwagę rozkład ilościowy związków między frakcjami w rozpuszczalniku, frakcja pentanowa zawierała tylko jeden z nich: kofeinę, w ilości około 1% całkowitej ilości zawartej we wszystkich frakcjach.

[0043] Nieoczekiwanie, większość oznaczonych ilościowo związków było rozproszonych we frakcji wodnej, w octanie etylu i dichlorometanie, z katecholem i pirogalolem wyekstrahowanymi w przeważającej ilości octanem etylu i kofeiną, głównie w ekstrakcie dichlorometanowym. Jednakże, ekstrakt wodny, który wykazywał w teście funkcjonalnym aktywność przeciwwydzielniczą, zawierał większość kwasu chlorogenowego i β N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidu i był jedynym ekstraktem zawierającym więcej niż 99% całkowitej, wyliczonej ilości N-metylopirydynium (Fig. 1).

[0044] Aktywność wydzielnicza liofilizatów zwykłych kaw po dodaniu N-metylopirydynium

Ponieważ wyniki z eksperymentów z rozpuszczalnymi frakcjami izolowanymi z handlowych, zwykłych mieszanek kaw sugerowały przeciwwydzielnicze działanie kawy bogatej w związki rozpuszczalne w wodzie, a w szczególności, N-metylopirydynium, które zostało oznaczone ilościowo wyłącznie w ekstrakcie wodnym, zbadano N-metylopirydynium jako pojedynczy związek oraz liofilizaty przygotowane ze zwykłej kawy z dodatkiem N-metylopirydynium pod kątem ich wpływu na aktywność wydzielniczą komórek HGT-1. Oznaczenie ilościowe N-metylopirydynium w kawie A wykazało stężenie 6,32 mg/l (Fig. 2). Wzbogacenie liofilizatu napoju przeprowadzono przez dodanie różnych ilości do uzyskania 2-krotnego (12,64 mg/l), 3-krotnego (18,96 mg/l), 5-krotnego (31,60 mg/l) i 10-krotnego (63,20 mg/l) wzrostu w porównaniu do niewzbogaconego liofilizatu. Jak pokazano na Fig. 2, traktowanie komórek HGT-1 niewzbogaconym liofilizatem kawy miało działanie stymulujące aktywność wydzielniczą, z IPX $-0,17 \pm 0,03$ (dwustronny test t, $p.0,001$ vs nietraktowane komórki kontrolne), natomiast w komórkach traktowanych liofilizatami zawierającymi dwu- i trzykrotność N-metylopirydynium, stwierdzono mniejszą aktywność wydzielniczą (odpowiednio $-0,10 \pm 0,04$ i $-3,46-17 \pm 0,01$, dwustronny test t, $p.0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolne, w obu próbkach). Liofilizat zawierający 3-krot-

nie większe stężenia N-metylopirydynium w porównaniu do niewzbogaconego liofilizatu faktycznie wydawał się nie mieć żadnego wpływu, ponieważ komórki traktowane tymi próbkami wykazywały IPX taki, jak nietraktowane komórki kontrolne. Jednakże, wraz ze wzrostem ilości N-metylopirydynium aż 10-krotnie (63,2mg/l) aktywność wydzielnicza kawy A jest prawie taka sama jak zbadana dla niewzbogaconego liofilizatu (jednoczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; Fig. 2).

[0045] Gdy komórki HGT-1 traktowano N-metylopirydynium jako jednym związkiem, nie zaobserwowano żadnego efektu zależnego od dawki (Fig. 2). Wyniki te jasno pokazują, że N-metylopirydynium działa jako związek przeciwwydzielniczy w napoju kawowym, ale nie jako pojedyncza substancja.

[0046] Aktywność wydzielnicza liofilizatów przygotowanych ze standaryzowanych napojów kawowych z różną zawartością N-metylopirydynium i ich wpływ na tworzenie cyklicznego AMP

Ponieważ eksperymenty z liofilizatami wzbogaconymi w N-metylopirydynium, przygotowanymi z kawy A sugerowały działanie przeciwwydzielnicze napojów kawowych mających 3-krotnie większe stężenie N-metylopirydynium w porównaniu do niewzbogaconych liofilizatów, wytworzono trzy dodatkowe próbki kawy z określoną zawartością N-metylopirydynium. Po pierwsze, dobrana próbka odpowiadająca kawie A składała się z tej samej kawy, ale była łagodnie traktowana parą (kawa AT), w taki sposób, że nie wpływało to na zawartość N-metylopirydynium (Tabela 1). Dla drugiego zestawu próbek wytworzono *C. robusta* Vietnam (kawę R) i *C. robusta* Vietnam – traktowaną parą (kawę RT). Obliczenie zawartości N-metylopirydynium w tych dwóch próbkach wykazało stężenia „średnio wysokie” i „niskie”, odpowiednio 22,4 mg/l i 5,41 mg/l, (Tabela 1). Zatem, stężenia N-metylopirydynium w kawie R były porównywalne do stężeń w kawie A wzbogaconej do 18,96 mg/l.

[0047] Indeksy protonów wewnątrzkomórkowych IPX analizowane w komórkach HGT-1 po traktowaniu liofilizatami przygotowanymi z kawy A ($-0,043 \pm 0,05$), AT ($-0,49 \pm 0,02$) i R ($-0,35 \pm 0,07$) wykazywały istotnie mniejszą aktywność wydzielniczą w porównaniu do kawy RT ($-0,06 \pm 0,02$) (Fig. 3A). Zatem, „wysokie” i „średnio wysokie” stężenia N-metylopirydynium stwierdzone odpowiednio w kawie A / AT i R, wydają się być związane z niższą zdolnością do pobudzania wydzielania w porównaniu do kawy RT o najniższym stężeniu N-metylopirydynium oznaczonym w tych próbkach.

[0048] Stymulacja wydzielania kwasu żołądkowego jest związana z podwyższonymi poziomami cyklicznego AMP w komórkach okładzinowych, ponieważ pobudzenie receptora gastryny i histaminy zwiększa syntezę cyklicznego AMP przez cyklazę adenylnową dzięki aktywacji białka G. W tym badaniu, komórki HGT-1 traktowane histaminą znacznie pobudzały aktywność wydzielniczą do IPX $-0,97 \pm 0,02$ w porównaniu do nietraktowanych komórek kontrolnych. Zgodnie z tymi wynikami, zwiększało się również stężenie cyklicznego AMP z poziomu podstawowego $6,02 \pm 0,36$ pmo/ml do $7,76 \pm$ pmo/ml w nietraktowanych komórkach kontrolnych (dwustronny test t, $p \leq 0,05$; Fig. 3A i B). Zgodnie z wynikami z testów aktywności wydzielniczej, stężenie cyklicznego AMP po traktowaniu komórek HGT-1 kawą RT ($19,69 \pm 0,41$ pmo/l) było znacząco wyższe (dwustronny test t, $p \leq 0,05$) w porównaniu do komórek kontrolnych i stężenia cyklicznego AMP po traktowaniu kawą A ($8,83 \pm 0,69$ pmo/l), kawą AT ($10,76 \pm 0,38$ pmo/ml) lub kawą R ($14,98 \pm 0,89$ pmo/ml) (Fig. 3B). Ogólnie, kawa RT stymulowała wydzielanie protonów w porównaniu do komórek kontrolnych bardziej niż jakiegokolwiek inny, spośród testowanych, liofilizat kawy, podczas gdy uzyskano najwyższe poziomy wewnątrzkomórkowego cyklicznego AMP. Kawa R, przeciwnie, wykazywała najslabsze działanie stymulujące czynność wydzielniczą protonów, ale powodowała drugie co do wielkości poziomy cyklicznego AMP w komór-

kach HGT-1. Wyniki te sugerują, że testowane liofilizaty kawy aktywują wydzielanie żołądkowe dodatkowymi drogami oprócz sygnału cyklicznego AMP.

[0049] Wpływ liofilizatów kawy na szlaki transdukcji sygnału i na ekspresję genów

Transdukcja sygnału łączy aktywację receptora i regulację transkrypcji genu białek czynnościowych np. H⁺,K⁺-ATPazy. Jak do tej pory, wykazano, że sygnały EGR α , ERK1/2 i Akt1 są zaangażowane w wydzielanie kwasu żołądkowego. Regulacja transkrypcji genów zależy od czynników transkrypcji. Ponieważ H⁺,K⁺-ATPaza i receptor somatostatyny zawierają motywy wiążące dla czynników transkrypcji zależnych od cyklicznego AMP, badaliśmy również rolę ATF-2 w procesie regulacji genów i aktywności wydzielniczej. W rezultacie, ekspozycja komórek HGT-1 na histaminę skutkowałą aktywacją ATF-2 (indeks aktywacji szlaku $1,17 \pm 0,25$ vs 0 dla nietraktowanych komórek kontrolnych; $p \leq 0,001$, Fig. 4). Dla wszystkich testowanych liofilizatów kawy wykazano działanie indukujące aktywność ATF-2, które było najniższe dla kawy R (kawa R: $0,33 \pm 0,14$; kawa RT: $0,84 \pm 0,39$; kawa A: $0,97 \pm 0,15$; kawa AT: $0,85 \pm 0,20$; wszystkie $p < 0,05$ vs nietraktowane komórki kontrolne; Fig. 4). Jednakże, kawa RT nie wpływała na ekspresję związanego ze szlakiem genu podjednostki alfa H⁺,K⁺-ATPazy (ATP4A); podczas gdy komórki traktowane kawą R wykazały zwiększoną ekspresję genu przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny ($0,74 \pm 0,19$; jednoczynnikowa ANOVA $p \leq 0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolne (=0), Fig 5A i B). Podczas badań nad kawą R traktowaną parą (kawa RT), nie wykazano żadnego wpływu na receptor somatostatyny, ale wykazano również wzrost ekspresji genu dla ATP4A ($0,55 \pm 0,04$, jednoczynnikowa ANOVA $p \leq 0,05$ vs nietraktowane komórki kontrolne (=0), Fig. 5A i B). Komórki HGT-1 traktowane kawą A wykazały wzrost ekspresji genu ATP4A ($0,47 \pm 0,09$; $p \leq 0,05$ vs nietraktowane komórki kontrolne (=0)), podczas gdy ekspresja genu dla przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny zmniejszyła się ($-0,59 \pm 0,17$, jednoczynnikowa ANOVA $p \leq 0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolne (=0), Fig. 6A i B).

[0050] Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, który, jak donoszono, zwiększa wydzielanie kwasu żołądkowego i ekspresję genu dla H⁺,K⁺-ATPazy, jest Akt1. W tym badaniu, sygnał Akt1 był znacząco aktywowany w komórkach HGT-1 eksponowanych na kawę AT, R lub RT z maksymalnym indeksem aktywacji szlaku, odpowiednio $1,75 \pm 0,35$, $0,60 \pm 0,22$ i $0,75 \pm 0,30$ (dwustronny test t, $p \leq 0,05$ - $0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolnych; Fig. 4). Jednakże, ani kawa AT ani kawa R nie wpływały na ekspresję genu ATP4. W przeciwieństwie do tego, traktowanie komórek HGT-1 kawą A, powodowało mały, ale istotny spadek aktywacji Akt1 w porównaniu do nietraktowanych komórek kontrolnych ($-0,22 \pm 0,05$, dwustronny test t $p \leq 0,05$, Fig. 6). Ponieważ kawa A zwiększała ekspresję ATP4A, sygnał Akt1 wydawał się nie być czynnikiem wyzwalającym ekspresję ATP4A po ekspozycji na kawę. Niemniej jednak, gdy komórki HGT-1 eksponowano na kawę A, aktywowany był ERK1/2 ($1,30 \pm 0,58$, dwustronny test t vs nietraktowane komórki kontrolne $p \leq 0,05$, Fig 4). W przeciwieństwie do tego, po traktowaniu kawą RT sygnał ERK1/2 był zmniejszony ($-0,57 \pm 0,49$, dwustronny test t, Fig. 4).

[0051] Aktywacja receptora EGFr była znacząca wyłącznie po ekspozycji komórek HGT-1 na histaminę ($1,32 \pm 0,42$) i kawę RT ($0,58 \pm 0,23$), (dwustronny test t, $p \leq 0,05$ - $0,001$, Fig. 4). Wykazano tu ponownie wyższą aktywność wydzielniczą kawy RT. Rozpatrując ekspresję receptorów prowydzielniczych, inkubacja komórek HGT-1 z kawą A lub kawą AT nie wpływała niekorzystnie na receptor H2. W przeciwieństwie do tego, kawa RT znacząco zwiększała jego ekspresję ($0,41 \pm 0,10$, jednoczynnikowa ANOVA $p \leq 0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolne, Fig. 5C). Ekspresja prowydzielniczego receptora acetylocholin M3 ulegała zmniejszeniu po traktowaniu komórek HGT-1 kawą A ($-0,56 \pm 0,09$, jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,001$, Fig. 6B). W

przeciwieństwie do tego, kawy R i RT, wykazywały działanie zwiększające ekspresję genu receptora acetylocholiny M3 (odpowiednio $0,43 \pm 0,12$ i $0,71 \pm 0,23$, jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,01$ vs nietraktowane komórki kontrolne, Fig. 6B). Podsumowując, traktowanie komórek okładzinowych kawą RT powodowało wyższą aktywność wydzielniczą, najogólniej regulację w górę prowydzielniczych genów i aktywację szlaków powiązanych z wydzielaniem kwasu żołądkowego. Komórki HGT-1 ekspozycje na kawę AT nie wykazywały żadnego wzrostu ekspresji genów prowydzielniczych ani nie zaobserwowano zmniejszenia ekspresji genów przeciwwydzielniczych. W konsekwencji, aktywność wydzielnicza komórek okładzinowych po ekspozycji na kawę AT była niższa niż po ekspozycji na kawę RT (Fig. 3).

[0052] Najmniej wyraźny wpływ na aktywność wydzielniczą wykazano dla kawy R (Fig. 3), która wykazywała narastający wpływ na ekspresję genu dla prowydzielniczego receptora acetylocholiny M3, ale wykazywała również najsilniejszy spośród testowanych kaw, wpływ stymulujący na ekspresję genu przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny (Fig. 5B).

Tabela 1

Stężenia głównych domniemanych związków bioaktywnych w napojach kawowych (mg/l) i liofilizatach (mg/l) przygotowanych z c. Arabica Brazil (Kawa A), traktowanej parą c. Arabica Brazil (Kawa AT), c. Robusta Vietnam (kawa R) lub traktowanej parą c. Robusta Vietnam (kawa RT). Ponadto, podano stosunki pojedynczych związków pomiędzy liofilizatami kawy, gdzie kawa z najniższym stężeniem danego związku była przyjmowana za 100%.

Napoje kawowe [mg/l]	Kawa A	Kawa AT	Kawa R	Kawa RT
Wydajność ekstrakcji ^a	12740	12580	15800	16750
Kwas chlorogenowy ^b	1038	1083	975	1464
Kofeina ^b	618	594	1389	1326
N-metylopirydinium ^b	32,21	34,70	22,40	5,41
Pirogalol ^b	4,05	3,99	5,63	4,79
Katechol ^b	5,73	5,29	9,26	4,43
C5HT ^b	0,21	0,21	0,12	0,08
Skuteczna dawka w liofilizacie [mg/l]				
Kwas chlorogenowy ^c	203,66	215,22	154,27	218,51
Kofeina ^c	121,27	118,04	219,78	197,91
N-metylopirydinium ^c	6,32	6,90	3,54	0,81
Pirogalol ^c	0,79	0,79	0,89	0,71
Katechol ^c	1,12	1,05	1,47	0,66
C5HT ^c	0,04	0,04	0,02	0,01

(kontynuacja)

Stosunki

Kwas chlorogenowy	132%	140%	100%	142%
Kofeina	103%	100%	186%	167%
N-metylopirydinium	780%	851%	437%	100%
Pirogalol	111%	111%	125%	100%
Katechol	170%	159%	221%	100%
C5HT	400%	400%	200%	100%

^a wydajność ekstrakcji określona jako masa po liofilizacji ^b stężenie określone technikami HPLC-DAD/HPLC-MS/MS w świeżo sporządzonych napojach ^c stężenia wyliczone ze stężeń w napojach i wydajności ekstrakcji

Kawa A: nietraktowana Arabica Brazil; **Kawa AT:** traktowana parą Arabica Brazil; **Kawa R:** nietraktowana Vietnam Robusta; **Kawa RT:** traktowana parą Vietnam Robusta.

[0053] Powyższy przykład miał na celu scharakteryzowanie składu napoju kawowego, który skutecznie reguluje w dół wybrane mechanizmy wydzielania żołądkowego. Po pierwsze, zwykły napój kawowy, ani nie traktowany parą ani nie odkofeinowany, poddawano frakcjonowaniu rozpuszczalnikami w celu identyfikacji polarności związków, które wpływają na aktywność wydzielania protonów w komórkach HGT-1. Ponadto, każdą z tych rozpuszczalnych frakcji uzyskaną z ekstrakcji napoju kawowego wodą, octanem etylu, dichlorometanem lub pentanem analizowano na zawartość w nich domniemanych związków drażniących żołądek, mianowicie kofeiny, kwasu chlorogenowego, β N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów, pirogalolu, katecholu jak też N-metylopirydinium jako kolejnego, ostatnio zidentyfikowanego aktywnego biologicznie związku w napojach kawowych. Testy funkcjonalne wykazały wpływ pobudzający na aktywność wydzielania protonów dla ekstraktu w octanie etylu, dichlorometanie i pentanie, natomiast nie wykazano żadnego wpływu na wydzielanie protonów dla ekstraktu wodnego. Wynik ten był w pewnym stopniu nieoczekiwany, ponieważ ekstrakt wodny zawierał większość kwasu chlorogenowego (95%) i β N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów (55%) obecnych w całym napoju kawowym. Istnieje hipoteza, że oba związki wzmagają wydzielanie kwasu żołądkowego. Jednakże, brak działania stymulującego wydzielanie protonów w komórkach HGT-1 przypisaliśmy zawartości N-metylopirydinium we frakcji wodnej, która jako jedyna zawierała ten związek. Chociaż nie byliśmy w stanie potwierdzić tego wpływu w doświadczeniach, w których komórki HGT-1 były traktowane N-metylopirydinium, jako jedynym związkiem, dodatek N-metylopirydinium do liofilizatu przygotowanego ze zwykłego napoju kawowego (nietraktowanego parą i nieodkofeinowanego) jasno pokazał przeciwwydzielnicze działanie tego związku w stężeniu około 18 mg/l napoju. Te różnice pomiędzy pojedynczym związkiem a złożonym napojem wydają się uzasadnione, ponieważ napój kawowy zawiera wiele różnych składników, które mogą działać jak konkurencyjne do wiązania z receptorem, jako inhibitory lub wzmacniacze białek funkcjonalnych, jak też jako regulatory genów i ostatecznie mogą wykazywać działanie synergistyczne lub anty-synergistyczne.

[0054] W celu dalszej oceny wpływu napojów o różnych stężeniach N-metylopirydynium na komórkowe mechanizmy wydzielania kwasu żołądkowego, od lokalnych wytwórców kawy uzyskano liofilizaty przygotowane z napojów kawowych o wysokich (*C. Arabica* 32 mg/l i średnio traktowana parą *C. Arabica Brazil* 34 mg/l), średnich (*C. Robusta Vietnam* 22 mg/l) i niskich (traktowana parą *C. Robusta Vietnam* 5 mg/l) stężeniach. Traktowanie parą zastosowano zgodnie z procedurą stosowaną do produkcji dostępnych w handlu kaw, oznaczonych jako „przyjazne dla żołądka”. Wyniki z doświadczeń funkcjonalnych, badających wpływ liofilizowanego napoju kawowego na aktywność wydzielania protonów, wykazały istotnie niższą aktywność wydzielniczą tych napojów kawowych o średnim i wysokim stężeniu N-metylopirydynium w porównaniu do napoju o najniższym stężeniu. Jednakże, najniższą aktywność wydzielniczą wykazano dla *C. Robusta Vietnam*, o stężeniu N-metylopirydynium 22 mg/l napoju. Wynik ten jest zgodny z rezultatami uzyskanymi w doświadczeniach, w których liofilizaty przygotowywano z handlowej zwykłej kawy, wzbogaconej w N-metylopirydynium do końcowego stężenia 18 mg/l napoju. Również, wyniki badania molekularnych mechanizmów wydzielania kwasu żołądkowego, takich jak regulacja genów, szlaki transdukcji sygnału i odpowiadające im czynniki transkrypcyjne wykazały najniższą aktywność prowydzielniczą wśród badanych napojów kawowych dla *C. Robusta Vietnam*. W szczególności, wpływ indukujący wykazano dla ekspresji genu przeciwwydzielniczego receptora dla somatostatyny (SSTR2), natomiast nie zaobserwowano wpływu na ekspresję genów dla H⁺,K⁺-ATPazy.

[0055] Nieoczekiwanie, najniższa aktywność wydzielnicza wśród testowanych próbek kawy korelowała ze zwiększoną ekspresją genów dla receptora acetylocholino (CHRM3). Wynik ten wskazuje, że szlaki regulujące wydzielanie kwasu żołądkowego różnią się skutecznością. Regulacja w górę prowydzielniczych genów lub białkowych czynników transkrypcyjnych niekoniecznie powoduje zwiększone wydzielanie protonów i *vice versa*. Zostało to pokazane również dla innych napojów kawowych przebadanych w tej pracy. Na przykład, traktowana parą *C. Robusta Vietnam*, wykazała najsilniejszy wpływ stymulujący na aktywność wydzielania protonów, regulację w górę ekspresji genów dla H⁺,K⁺-ATPazy, głównego aktywatora wydzielania kwasu żołądkowego, jak również na ekspresję genów dla prowydzielniczego receptora histaminy (HRH2) i receptora acetylocholino (CHRM3). Przeciwnie do tych prowydzielniczych działań, komórki HGT-1 traktowane *C. Robusta Vietnam* wykazywały również obniżone stężenia cyklicznego AMP i zmniejszoną aktywację ERK1/2, obydwu zaangażowanych w szlaki prowydzielnicze.

[0056] Konkludując, pokazaliśmy po raz pierwszy, że regulacja i czynność wydzielania protonów przez komórki ludzkiego żołądka, indukowana przez napoje kawowe, zależy od zawartości w nich N-metylopirydynium. Wpływ innych składników, takich jak kofeina, kwas chlorogenowy lub βN-alkanoilo-5-hydroksytryptamidy zbadano w następujących wieloparametrowych badaniach.

Przykład 2: Wieloparametrowe podejście w celu identyfikacji składników kawy, które regulują mechanizmy wydzielania kwasu żołądkowego

[0057] W tym badaniu, ocenionych było sześć różnych związków, kwas chlorogenowy (CA), kofeina (CAFF), pirogalol (PYR), katechol (CAT), N-alkanoilo-hydroksytryptamidy (C5HT) i N-metylopirydynium pod kątem ich wpływu na aktywność wydzielniczą, transdukcję sygnału i ekspresję genów związanych z wydzielaniem kwasu żołądkowego, jak również na aktywację czynnika transkrypcyjnego ATF-2, jak też stężenie cyklicznego AMP. Wyjaśniliśmy, które związki w napojach kawowych mogą działać jako związek ochronny dla żołąd-

ka. Ponadto, opracowaliśmy model statystyczny do przewidywania działania synergistycznego i anty-synergistycznego roztworów wielu związków na wydzielanie kwasu żołądkowego.

[0058] N-MP, CAFF, CAT, C5HT, PYR i CA stosowano w stężeniach odpowiadających tym w zwykłych napojach kawowych. Do badań *in vitro* stosowano linię komórkową ludzkiego raka żołądka HGT-1. Aktywność wydzielniczą mierzono za pomocą komory Ussinga i analizy FACS. Dla wykrycia aktywacji EGFr, Akt1, ERK1/2, ATF-1 i poziomów cAMP przeprowadzaliśmy testy ELISA, podczas gdy zmiany w zależności od czasu ekspresji genów związanych z wydzielaniem kwasu żołądkowego, jak dla receptorów histaminy, acetylocholi-ny i somatostatyny, jak też H⁺,K⁺-ATPazy, określone były za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Dane doświadczalne były następnie stosowane częściowo do modelowania statystycznego, z zastosowaniem programu „sieci neuronowe”.

[0059] N-MP nasilało ekspresję przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny o 114%, natomiast C5HT zmniejszały jego ekspresję o 48%. Ponadto, N-MP regulowało w dół prowydzielniczy receptor acetylocholi-ny M3 (-36%) i H⁺,K⁺-ATPazę o 27%. ATPaza była regulowana w górę 2-krotnie przez CA i CAFF. CAFF naj-silniej stymulowała aktywność wydzielniczą w testach czynnościowych. N-MP działało jak inhibitor aktywnoś-ci wydzielniczej indukowanej przez CAFF. Nieoczekiwanie, CA nie zwiększał wydzielania, prowadząc raczej do zmniejszenia wydzielania. Analiza szlaków umożliwiła rozróżnienie pomiędzy CAFF, CA, CAT, C5HT, PYR i histaminą, aktywującymi sygnał EGFr i N-MP aktywującym sygnał Akt1 i ERK1/2. Podsumowując, wyniki te sugerują potencjał ochronny dla żołądka pirogalolu i N-metylopirydynium *in vitro*.

[0060] Hodowla komórkowa

Komórki HGT-1 (Dr. C. Labois, Nantes, Francja) hodowano w 37°C i 5% CO₂ na podłożu Eagle w modyfi-kacji Dulbecco z dodatkiem 20% surowicy płodowej cielęcej, 5% glutaminy i 5% penicyliny/streptomycyny. Komórki synchronizowano przez 24 godziny przed doświadczeniami podłożem Eagle w modyfikacji Dulbec-co w sposób opisany powyżej, ale bez dodatku surowicy płodowej cielęcej.

[0061] Doświadczenia z pojedynczym związkiem. Komórki ekspozowano na kofeinę (3 mM), kwas chlorogenowy (3 mM), katechol (52 µM), pirogalol (32 µM) (wszystkie z Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy) βN-alkanoilo-5-hydroksytryptamidy (1 µM) i N-metylopirydynium (0,34 µM), w stężeniach odpowiadających ich zawartości w zwykłych napojach kawowych. W innych stężeniach były omeprazol (1 mM), somatostatyna (0,5 mM), histamina (1 mM), acetylocholina (1 mM) (wszystkie z Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy). Wszystkie związki albo rozpuszczano bezpośrednio w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) albo w roztworze Ringera, z wyjątkiem N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów, które rozpuszczano w tetrahydrofura-nie (1 mg/ml THF) i dodawano w objętości 2 µl do 10 ml buforu w celu uzyskania końcowego stężenia.

[0062] Testy ekspresji

Po 5, 10, 15 i 20 min ekspozycji, komórki zbierano do badań nad ekspresją genów. Startery dla ATP4A, HRH2, SSTR2 i CHRM3 zaprojektowano za pomocą Beacon Designer 7.0 (PremierBiosoft, Palo Alto, CA) i walidowano za pomocą analizy krzywej standardowej i topnienia. Prawidłową sekwencję produktów PCR weryfikowano przez sekwencjonowanie (Medigenomics, Martinsried, Niemcy). PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano z zastosowaniem zestawu Brilliant SYBR Green Kit (Stratagene, Amsterdam, Holandia) w cyklerze Mx3000p (Stratagene, Amsterdam, Holandia). Warunki cykli były następujące: 10:00 min/95°C (aktywacja), 00:30 s/95°C (denaturacja), 00:30 s/60°C (aniling z pomiarem fluorescencji), 00:30 s/72°C (elongacja).

[0063] Ilościowe określenie cyklicznego AMP (cAMP)

W celu określenia cAMP w supernatantach komórek stosowaliśmy zestaw parametrów ELISA kompetycyjnych dla cAMP (R&D Systems, Minneapolis, MN) w sposób opisany w protokole wytwórcy. Supernatanty izolowano po jednej minucie inkubacji.

[0064] Izolacja RNA i synteza cDNA

100000 komórek wysiewano na sześciostudzienkowe płytki i hodowano do stadium zlewności. Całkowity RNA izolowano stosując zestaw Rneasy Midi (Qiagen, Hilden, Niemcy). Trawienie DNazą I przeprowadzano za pomocą zestawu RNase free DNase (Qiagen, Hilden, Niemcy) w kolumnie. Przed qPCR, całą zawartość RNA określano fotometrycznie przy 260 nm. cDNA syntetyzowano stosując zestaw do syntezy cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Monachium, Niemcy), jak opisano w instrukcji wytwórcy.

[0065] Aktywność wydzielnicza

W każdym niezależnym doświadczeniu biologicznym stosowano objętość dwóch ml zawiesiny komórek, odpowiadającą 2000000 komórek, i inkubowano przez 10 minut w 37°C z 2,5 mg liofilizatu kawy na ml PBS, histaminy, pojedynczego związku lub różnych kombinacji wszystkich związków. Aktywność wydzielniczą mierzono określając indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX). Do pomiaru wewnątrzkomórkowego pH stosowano barwnik fluorescencyjny Carboxy-SNARF-AM (Invitrogen, Karlsruhe, Niemcy). Metodę walidowano. Komórki HGT-1 wybarwiono przy użyciu 3 µM barwnika przez 30 min w lodzie. Wewnątrzkomórkowe pH obliczono odnosząc się do krzywej kalibracyjnej dla komórek HGT-1 traktowanych 2 µM nigerycyny (PAA, Coelbe, Niemcy) w buforze blokującym K⁺, składającym się z 20 mM NaCl, 110 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 18 mM D-glukozy i 20 mM HEPES, ustawionym na różne punkty kalibracyjne pH (6,8-8,2) przez miareczkowanie NaOH. Następnie obliczono indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX) jako logarytm log₂ ze stosunku stężenia wewnątrzkomórkowego protonów w komórkach traktowanych i kontrolnych. Wyższy IPX - więcej protonów pozostaje w komórce, wskazując na niższą aktywność wydzielniczą, natomiast niskie wartości IPX wskazują na większe wydzielanie protonów. Bardziej ujemny IPX odpowiada odpowiednio większej aktywności wydzielniczej.

[0066] Eksperymenty z komorami Ussinga

W celu zbadania, jak pojedyncze substancje wpływają na transport jonów z okolicy podstawnej do wierzchołkowej monowarstwy HGT-1, przeprowadziliśmy doświadczenia z komorą Ussinga. W tym celu, komórki HGT-1 hodowano na podłożu z poliestrowej błony przepuszczalnej SNAP-well, z porami 0,4 µm (Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy). Powierzchnia hodowli wynosiła około 1,13 cm². Komórki hodowano do stadium zlewności, potwierdzonego badaniem mikroskopowym i pomiarami oporności w komorze Endohma (WPI, Berlin, Niemcy). Wkładki z SNAP-well montowano w komorze Ussinga (Easy Mount Chambers, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Niemcy) i zanurzano w roztworze Ringera (Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy) w 37°C i delikatnie napowietrzano, z kontrolą pH. Wszystkie testowane substancje również były rozpuszczone w roztworze Ringera. Transepitelialną różnicę potencjałów mierzono, stosując dwie pary elektrod Ag/AgCl, podłączonych do miernika napięcia (KMSci, Aachen, Niemcy). Prąd i elektrody napięciowe były przyłożone do każdego miejsca monowarstwy. Elektrody wkładano do końcówek dla elektrod i podłączano do roztworu Ringera za pomocą wypełnionego 3 M KCl mostka agarowego. Wydzielanie mierzono jako prąd w obwodzie zwarcia i wyświetlano jako µA/cm² (czas trwania impulsu, 0,2 s; częstotliwość impulsu,

1 Hz; amplituda impulsu 25 ms). Związki podawano do przestrzeni szczytowej odpowiadającej światłu żołądka.

[0067] *Badania transdukcji*

Stan fosforylacji receptorowych kinaz tyrozynowych i kinaz MAPK wykrywano testami immunoenzymatycznymi (ELISA). Białko całkowite izolowano z komórek HGT-1 po inkubacji z testowanymi substancjami przez 10 minut zgodnie z protokołem wytwórcy i dodawano bufor do lizy. Całkowitą zawartość białka mierzono fotometrycznie przy 595 nm, stosując odczynnik Bradforda (Bio-Rad, Monachium). Do określenia stanu fosforylacji stosowano następujące zestawy ELISA: zestaw EGR-ELISA, zestaw EKK1/2 ELISA (obydwa z Calbiochem/Merck, Nottingham, UK), Akt1 pathscan ELISA i ATF-2 pathscan ELISA (obydwa z Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt nad Menem, Niemcy). Absorbencję odczytywano na czytniku płytek MRX (Dynex, Berlin, Niemcy) przy 450 nm.

[0068] *Analizy danych na sieci neuronowej*

Sieci neuronowe dla trzech receptorów HRH2, CHRM3 i SSTR2, trenowano indywidualnie na zestawach danych z rekombinacji kawy. Stosowano oprogramowanie sieci neuronowych, NeuralWorks Predict (NeuralWare, Pittsburg, PA) z ustawieniami domyślnymi, z wyjątkiem zastosowania kaskadowego wyboru zmienionych, i obowiązującego traktowania danych wejściowych jako zmiennych danych liczbowych, ciągłych. Związek pojedynczego składnika kawy z ekspresją genów w sieciach neuronowych charakteryzuje się częstotliwością, z jaką ten konkretny składnik pojawia się w ostatecznej populacji algorytmu genetycznego, który wybiera zmienne sieci. Maksymalna częstotliwość 1,00 dla zmiennej wejściowej (składnik kawy) wskazuje, że jest ona bardzo ważna dla sieci neuronowej i jest zawsze wybierana.

[0069] *Analiza statystyczna*

Analizę statystyczną przeprowadzano za pomocą Excel 2003 lub SigmaStat (Systat Software GmbH, Erkrath, Niemcy). Zestawy danych wytworzone przez qPCR i ELISA przekształcano przez konwersję logarymiczną, aby otrzymać rozkład normalny i przedstawiono je na figurach jako log₂ współczynnika. Pojedyncze porównania pomiędzy traktowanymi i kontrolnymi komórkami były wykonywane za pomocą dwustronnego testu t-Studenta dla równych wariancji, o ile nie wskazano inaczej. Dla analiz przebiegu czasowego ekspresji genów, wykonywaliśmy jednoczynnikową ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidak dla zestawu danych parametrycznych i testem Kuskal-Wallisa z testem post-hoc Dunna dla zestawu danych nieparametrycznych. W części wyników i na figurach zaznaczono ilość powtórzeń każdego eksperymentu. Na każdym wykresie pokazano średnią z niezależnych eksperymentów ± błąd standardowy (SE). Doświadczenia z komorą Ussinga przeprowadzano jako pojedyncze eksperymenty i oryginalnie zarejestrowane wartości przedstawione są na odpowiadających im wykresach.

[0070] *Regulacja genów związanych w wydzielaniem kwasu żołądkowego*

Regulacja genów związanych z wydzielaniem kwasu żołądkowego jest ważnym środkiem określania podatności komórek okładzinowych na wydzielanie hormonów parakrynnych i endokrynnych. Ponadto, indukowana synteza białek czynnościowych może osłabiać aktywność wydzielniczą komórek okładzinowych. W tym badaniu określaliśmy zależny od czasu wpływ sześciu różnych związków pochodzących z napojów kawowych na ekspresję H⁺,K⁺-ATPazy (ATP4A), receptora histaminy H₂ (HRH2), receptora acetylocholiny M₃ (CHRM3) i receptora somatostatyny 2 (SSTR2). Zależną od czasu ekspresję mierzono dopóki nie powróciła ona do wartości kontrolnych. Jedna kontrregulacja po uprzedniej regulacji w dół lub w górę była rozpatrywana jako regulacja fizjologiczna.

[0071] *H⁺,K⁺-ATPaza*

Ekspresja *H⁺,K⁺-ATPazy* była głównie i istotnie osłabiona przez kwas chlorogenowy, kofeinę, pirogalol i N-metylopirydynium (jednoczynnikowa ANOVA, $p < 0,01-0,001$; $n=5-6$, Fig. 7A), podczas gdy katechol i C5HT nie zmieniały znacząco ekspresji przez cały czas testu (wykres nie pokazany). Kwas chlorogenowy i kofeina po 20 minutach zwiększały ekspresję *H⁺,K⁺-ATPazy* prawie dwukrotnie (CA: $0,91 \pm 0,17$, CAFF: $0,94 \pm 0,24$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 7A). W całym przebiegu 30 minut zmiana ekspresji była ciągle znacząca. W przeciwieństwie do tego, N-metylopirydynium i pirogalol prowadziły do istotnego zmniejszenia ekspresji po 20 minutach (N-MP: $-0,64 \pm 0,11$, PYR: $-0,46 \pm 0,07$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 7A). w celu wykazania synergistycznego lub anty-synergistycznego działania tych związków przy piku ekspresji maksimum/minimum, przetestowano różne ich kombinacje po kątem wpływu na ekspresję genów. Zarówno pirogalol jak i N-metylopirydynium były zdolne do istotnego skompensowania wpływu regulacji w górę po kwasie chlorogenowym i kofeinie (dwustronny test t, $p \leq 0,01-0,001$, $n=4-6$, Fig. 7B) do N-MP/CA: $-0,76 \pm 0,24$, N-MP/CAFF: $-0,46 \pm 0,05$, N-MP/CA/CAFF: $-0,21 \pm 0,22$ i PYR/CA: $-0,36 \pm 0,19$, PYR/CAFF: $-0,10 \pm 0,13$, PYR/CA/CAFF: $-0,27 \pm 0,15$. Wykazano tu, że N-metylopirydynium i pirogalol dominują nad działaniem kwasu chlorogenowego i kofeiny w bardziej złożonych roztworach. Traktowanie komórek HGT-1 fizjologicznymi aktywatorami wydzielania kwasu żołądkowego, takimi jak histamina ($0,74 \pm 0,16$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, wykres nie przedstawiony) i acetylocholina ($0,62 \pm 0,19$; test post-hoc, $n=6$, $p \leq 0,05$, wykres nie przedstawiony), powodowało istotny wzrost ekspresji odpowiednio po 20 i 15 minutach. Interesujące jest, że traktowanie somatostatyną również istotnie regulowało w górę *H⁺,K⁺-ATPazę* po 20 minutach, $0,83 \pm 0,20$ (test post-hoc, $n=6$, $p \leq 0,05$, wykres nie przedstawiony). Rozpatrując te wzorce regulacji, spowodowane fizjologicznymi związkami, wydaje się prawdopodobne, że regulacja w górę *H⁺,K⁺-ATPazy* pojawia się jako pierwsza odpowiedź na traktowanie komórek HGT-1. Zatem, następcza kontrregulacja, jak pokazano dla pirogalolu i N-metylopirydynium, jest prawdopodobnie bardziej istotna dla regulacji wydzielania kwasu żołądkowego.

[0072] *Receptory histaminy H2*

Prowydzielnicze receptory są zaangażowane w aktywację komórek okładzinowych dzięki wiązaniu hormonów i transmiterów. Zbadano prowydzielniczy receptor histaminy H2 i receptor acetylocholino M3 w kierunku ich zależności od czasu ekspresji w komórkach HGT-1. Receptor H2 był znacząco regulowany przez cały czas eksperymentu przez kwas chlorogenowy, katechol i C5HT (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,01-0,05$, $n=5-6$, Fig. 7C), natomiast kofeina i N-metylopirydynium nie osłabiały ekspresji tego receptora. Katechol ($-0,54 \pm 0,24$, test post-hoc; $p \leq 0,05$) i C5HT ($-1,35 \pm 0,21$, test post-hoc, $p \leq 0,05$ znacząco regulowały w dół ekspresję. Kwas chlorogenowy znacząco regulował w górę ekspresję receptora H2 ($0,55 \pm 0,21$, test post-hoc, $p \leq 0,05$) po 20 minutach. Kombinacja kwasu chlorogenowego i C5HT powodowała znaczącą regulację w górę receptora H2 po pięciu minutach ($0,46 \pm 0,04$, dwustronny test t, $p \leq 0,001$, $n=4-6$, Fig. 7D) w porównaniu do komórek kontrolnych i samego C5HT. Ponieważ regulacja w dół receptora H2 nie zwiększałaby wrażliwości komórek okładzinowych na histaminę, kwas C5HT mógłby wspierać ten efekt w złożonym roztworze. Jednakże, w kombinacji z kwasem chlorogenowym mogłoby to być zniesione. Kombinacja katecholu i kwasu chlorogenowego nie zmieniała poziomu ekspresji w sposób znaczący w porównaniu do samego katecholu (Fig. 7D). Histamina jako ligand fizjologiczny nie regulowała w sposób istotny receptora H2 (dane nie przedstawione).

[0073] Receptor acetylocholiny M3

Wykazano jedynie zwiększoną regulację receptora cholinergicznego M3 przez kofeinę, pirogalol i N-metylopirydinium (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,01-0,001$, $n=4-9$, Fig. 8A). Kwas chlorogenowy, C5HT i katechol nie wpływały istotnie na ekspresję receptora M3 (wykres nieprzedstawiony). Kofeina, pirogalol i N-metylopirydinium najpierw prowadziły do regulacji w górę receptora M3 po 5 minutach, CAFF: $0,55 \pm 0,08$, N-MP: $0,53 \pm 0,25$, PYR: $1,14 \pm 0,14$ (test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8A), podczas gdy pirogalol wykazywał najwyraźniejszą regulację w górę tego receptora. Jednakże, następcza kontrregulacja była znacząca dla N-metylopirydinium ($-0,76 \pm 0,26$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8B) po 20 minutach i dla pirogalolu ($-0,70 \pm 0,21$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8B) po 15 minutach. Ponieważ nie zmierzaliśmy żadnej przeciwnej regulacji w górę lub w dół przez niektóre związki, nie badaliśmy dalej wpływu związków w kombinacjach na ten receptor. Ekspresja receptora M3 nie podlegała istotnej regulacji przez traktowanie acetylocholimą (danie nieprzedstawione).

[0074] Receptor somatostatyny 2

Przeciwwydzielniczy receptor somatostatyny 2 był znacząco regulowany przez N-metylopirydinium, C5HT i katechol (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,01-0,001$, $n=4-9$, Fig. 8B). Katechol zmniejszał ekspresję receptora somatostatyny do $-0,56 \pm 0,28$ po 15 minutach (test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8B). Ponadto, C5HT powodował ogromny spadek ekspresji receptora do $-2,12 \pm 0,25$ po pięciu minutach (test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8B). W przeciwieństwie do tego, N-metylopirydinium nasilało ekspresję przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny więcej niż dwukrotnie do $1,14 \pm 0,15$ po pięciu minutach (test post-hoc, $p \leq 0,05$, Fig. 8B). Traktowanie somatostatyną regulowało ten receptor w takim samym zakresie jak N-metylopirydinium, ale z maksimum występującym po 20 minutach ($1,14 \pm 0,31$, test post-hoc, $p \leq 0,05$, wykres nieprzedstawiony). Zatem, połączyliśmy C5HT i N-metylopirydinium, co spowodowało ekspresję receptora somatostatyny na poziomie kontrolnym ($1,14 \pm 0,31$, Fig. 8D). Poziom ekspresji w porównaniu do traktowania samymi N-metylopirydinium lub C5HT, uległ zatem znacznej zmianie (dwustronny test t, $p \leq 0,05-0,001$, $n=4-6$, Fig. 8D).

[0075] Pełna rekombinacja związków

Po scharakteryzowaniu działania każdego pojedynczego związku i ich kombinacji dla najbardziej widocznych punktów czasowych, przetestowaliśmy pełną rekombinację wszystkich sześciu związków razem. Nasze stwierdzenia dla H⁺,K⁺-ATPazy zostały potwierdzone faktem, że ekspresja pompy protonowej nie była ani zwiększona ani zmniejszona po 20 minutach. Cały przebieg w czasie był nadal istotny dla regulacji (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,05$, $n=5-6$, Fig. 9A), ale potwierdzony został kompensacyjny wpływ N-metylopirydinium i pirogalolu po 20 min. Wykazano regulację w dół prowydzielniczego receptora M3 po 20 min przez N-metylopirydinium. Rekombinacja wszystkich sześciu związków również istotnie regulowała w dół ekspresję tego receptora po 20 min do $-1,43 \pm 0,31$ (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,001$, $n=6$, Fig. 9A; test post-hoc, $p \leq 0,05$), która była znacznie silniejsza niż działanie samego N-metylopirydinium. Zatem, sugeruje się skojarzone działanie N-metylopirydinium i pirogalolu. Ponadto, przy traktowaniu pełną rekombinacją, nie wykazano regulacji w górę receptora M3 po pięciu minutach, sugerując hamujące, antysynergistyczne działanie wszystkich związków łącznie. Wykazano regulację w górę przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny przez N-metylopirydinium i że jego przeciwstawną regulację przez C5HT. Pełna rekombinacja potwierdziła nasze stwierdzenia co do przeciwstawnego wobec siebie działania C5HT/N-metylopirydinium, po 5 minutach. Poziom ekspresji był nieco, ale nieznaczaco, podniesiony ponad poziomy kontrolny. W przeciwieństwie do tego, po 20 min ciągle miała miejsce następcza regulacja w dół receptora somatostatyny,

jak wykazano również dla samego N-metylopirydynium (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,001$, $n=6$, Fig. 9A; test post-hoc, $p \leq 0,05$).

[0076] Receptor histaminy H2 kreśli zupełnie odmienny obraz, niż ten pokazany dla pojedynczych związków. Silne działanie regulujące w dół przez C5HT było prawdopodobnie skompensowane przez kwas chlorogenowy, jak pokazano uprzednio (Fig. 7C i D). Jednakże, po 10 minutach ekspresja receptora H2 była ogromnie zwiększona do $1,36 \pm 0,37$ (jednoczynnikowa ANOVA, $p \leq 0,001$, $n=6$, Fig 9A; test post-hoc, $p \leq 0,05$). Ponieważ nasze eksperymenty z pojedynczymi związkami nie tłumaczyły tego efektu, opracowaliśmy do znalezienia zależności pomiędzy pojedynczymi związkami lub ich kombinacjami i ekspresją receptora H2, jak też transdukcją sygnału i aspektami czynnościowymi, za pomocą modelowania statystycznego, które zostanie wprowadzone w następnym akapicie.

[0077] Identyfikacja działań skojarzonych na ekspresję genu receptora za pomocą analizy obliczeniowej

Zastosowano różne kombinacje badanych związków do oceny działań kombinacji pojedynczych związków za pomocą obliczeń sieci neuronowej (Tabela 2). Jako najbardziej dominujące w roztworze wielu związków zidentyfikowano N-metylopirydynium, kofeinę i kwas chlorogenowy. N-metylopirydynium było rozważane jako najistotniejszy czynnik w 94% wszystkich wyliczonych scenariuszy dla ekspresji receptora histaminy H2. Najwyższą relewancję 100% wykazano dla kofeiny; pirogalol i kwas chlorogenowy wykazywały relewancję 71% i 79%, podczas gdy N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidy i katechol miały najniższą relewancję 50% i 29%. Ogólnie, wyliczone scenariusze korelowały z wynikami doświadczeń dla ekspresji receptora H2 z $R=94\%$. Wyniki eksperymentalne dla ekspresji receptora acetylocholin M3 wykazywały również 94% korelację z wyliczonym modelem. Kwas chlorogenowy wykazywał tu najwyższą relewancję wynoszącą 100%. N-metylopirydynium było stosowane w 91% wszystkich wyliczonych scenariuszy, jako ważny czynnik w kombinacji z innymi składnikami, kofeina wykazywała relewancję 82%. Katechol (59%), N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidy (68%) i pirogalol (23%) miały mniejsze znaczenie. Obliczenia sieci neuronowej, dla przeciwwydzielniczego receptora dla somatostatyny, ciągle korelowały z wynikami eksperymentu, przy dopuszczalnej wartości R wynoszącej 80%. Z wyjątkiem N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów (25%), wszystkie związki wykazywały relewancję powyżej 83% (pirogalol). Największą wagę wyliczono dla kwasu chlorogenowego i kofeiny 100%. N-metylopirydynium wykazało relewancję 96%, taką samą jak katechol.

[0078] Stężenie cyklicznego AMP w lizatach komórek

Sygnał receptora histaminy H2 jest silnie związany z podwyższonymi poziomami cAMP z powodu aktywacji cyklazy adenylanowej. Traktowanie histaminą znacząco zwiększało stężenie cAMP w komórkach HGT-1 do 71 ± 17 fmol/l (dwustronny test t , $p \leq 0,05$; $n=4$, Fig. 10A). Podobnie do histaminy, również kofeina (56 ± 15 fmol/ml), pirogalol (56 ± 23 fmol/ml), katechol (74 ± 27 fmol/l), C5HT ($40 \pm 1,0$ fmol/ml) i N-metylopirydynium zwiększały znacząco stężenia cyklicznego AMP w komórkach HGT-1 (dwustronny test t ; $p \leq 0,05-0,01$; $n=4$; Fig 10 A). W przeciwieństwie do tego, kwas chlorogenowy ($12 \pm 1,9$ fmol/ml) prowadził do istotnego zmniejszenia stężeń cyklicznego AMP w porównaniu do komórek kontrolnych (dwustronny test t , $p \leq 0,05$; $n=4$, Fig. 10A). Pełna rekombinacja wszystkich pojedynczych związków również znacząco zwiększała stężenia cyklicznego AMP do $46 \pm 7,1$ fmol/ml w porównaniu do kontroli ($23 \pm 3,4$ fmol/ml) (dwustronny test t , $p \leq 0,05$; $n=7$, Fig. 9, C).

[0079] Transdukcja sygnału

Wzbudzenie wydzielania kwasu żołądkowego jest wieloparametrowe. Zmiany na poziomie regulacji i czynności zachodzą za pośrednictwem sygnałów wewnątrzkomórkowych kinaz. Z tego powodu, badaliśmy czy trzy różne kinazy są aktywowane przez fosforylację, po traktowaniu składnikami palonej kawy lub histaminą. Po pierwsze, fosforylacja receptorowej kinazy tyrozynowej EGFR była istotnie zwiększona po dodaniu histaminy ($1,32 \pm 0,42$), kwasu chlorogenowego ($2,22 \pm 0,3$), kofeiny ($1,78 \pm 0,64$) lub C5HT ($1,19 \pm 0,21$) ($p \leq 0.001-0.05$; $n=3-7$; Fig. 10, B), podczas gdy N-metylopirydynium nie zmieniało aktywacji w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponieważ sygnał EGFR i białko G w konsekwencji może aktywować kinazę Akt1, ten szlak również testowano pod kątem stanu jego fosforylacji. Nieoczekiwanie, Akt1 była tylko łagodnie aktywowana przez kofeinę ($0,48 \pm 0,30$), pirogalol ($0,66 \pm 0,38$), katechol ($0,66 \pm 0,13$) i C5HT ($0,53 \pm 0,32$) (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=7$; Fig. 10, B), ale bardziej przez N-metylopirydynium ($1,39 \pm 0,25$) (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=7$; Fig. 10, B). Wydzielanie żołądkowe wywołane histaminą zachodzi głównie przez sygnał cyklicznego AMP. Jednak, kwas chlorogenowy ani nie zwiększa poziomów cyklicznego AMP, ani nie aktywuje Akt1, sugerując niski potencjał wydzielniczy. Zachodząca w tym samym czasie aktywacja Akt1 przez N-metylopirydynium musi być spowodowana przez indukcję innego receptora niż EGFR. Ponadto zbadaliśmy, czy regulowane pozakomórkowo kinazy 1/2 (ERK1/2) wykazują inne poziomy fosforylacji po traktowaniu histaminą lub składnikami palonej kawy. Samo N-metylopirydynium ($0,52 \pm 0,14$) prowadziło do znaczącej aktywacji ERK1/2 (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=3$; Fig. 10, B). W przeciwieństwie do tego, traktowanie histaminą ($-0,37 \pm 0,09$), kwasem chlorogenowym ($-1,09 \pm 0,38$), C5HT ($-0,81 \pm 0,22$) i kofeiną ($-0,30 \pm 0,13$) skutkowało nawet istotnym zmniejszeniem aktywacji ERK1/2 w porównaniu do komórek kontrolnych (dwustronny test t, $p \leq 0,01-0,05$; $n=7$; Fig. 10 B). Jednakże, pełna rekombinacja wszystkich związków aktywowała EGFR ($2,19 \pm 0,59$) i Akt1 ($0,88 \pm 0,28$), ale nie ERK1/2 ($-0,33 \pm 0,14$). Wynik ten wskazuje przeważający wpływ innych związków niż N-metylopirydynium w sygnale ERK1/2, który, jak poprzednio stwierdzono, odgrywa rolę w ostrym hamowaniu wydzielania kwasu żołądkowego.

[0080] Aktywacja czynników transkrypcyjnych

Czynniki transkrypcyjne odgrywają kluczową rolę w transkrypcji genów. Ponieważ geny dla podjednostki alfa H^+, K^+ -ATPazy (ATP4A) i dla receptora somatostatyny (SSTR2) wykazują elementy odpowiedzi na cAMP, badaliśmy rolę czynnika transkrypcyjnego ATF-2 w stymulacji wydzielania kwasu żołądkowego dzięki histaminie, pojedynczym związkom i pełnej ich rekombinacji. Jedynie histamina ($1,17 \pm 0,25$), katechol ($1,22 \pm 0,08$) i N-metylopirydynium ($0,84 \pm 0,23$) istotnie aktywowały ATF-2. Sama kofeina powodowała defosforylację, która była znacząco poniżej komórek kontrolnych ($0,64 \pm 0,06$) (dwustronny test t, $p \leq 0,05-0,001$; $n=7$; Fig. 10, C). Pełna rekombinacja wszystkich związków prowadziła do znacząco zwiększonej aktywacji ATF-2, w porównaniu do kontroli (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=4$; Fig. 9, B). W odniesieniu do pomiarów stężeń cyklicznego AMP w komórkach HGT-1, aktywacja histaminą komórek okładzinowych wykazywała silny związek z aktywacją ATF-2, podobnie jak aktywacja katecholem i N-metylopirydynium. Ponadto, defosforylacja ATF-2 przez kwas chlorogenowy jest zgodna ze spadkiem poziomów cyklicznego AMP w komórkach HGT-1. Jest prawdopodobne, że transkrypcja genów związanych z wydzielaniem kwasu żołądkowego jest aktywowana również szlakami i czynnikami transkrypcji innymi niż sygnał cyklicznego AMP, ponieważ kofeina i kwas chlorogenowy powodują silny wzrost ekspresji H^+, K^+ -ATPazy. Jednakże, indukowana N-metylopirydynium ekspresja receptora somatostatyny może być wspierana zarówno przez cykliczny AMP jak i aktywację ATF-2.

[0081] Potencjał wydzielniczy

Najpierw zmierzono indeks protonów wewnątrzkomórkowych (IPX), aby ocenić potencjał stymulacyjny pojedynczych związków, pełnej rekombinacji i różnych rekombinacji, w których brakowało jednego z sześciu związków. IPX dostarcza informacji o wewnątrzkomórkowym stężeniu protonów w porównaniu do nietraktowanych komórek. Im bardziej ujemny IPX, tym bardziej komórki kontrolne wykazują wyższą aktywność wydzielniczą, zakładając, że wewnątrzkomórkowe pH wzrasta chwilowo wskutek wydzielania protonów. Jednakże, pH zmienia się w zakresie fizjologicznym, ale mierzalnym. Histamina powoduje silną stymulację wydzielania, odpowiadającą IPX $-1,15 \pm 0,04$ (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=4$; Fig. 11 A). Ta obserwacja jest poparta pomiarami w komorze Ussinga, gdzie histamina nasilała wydzielanie do $39 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Fig. 11 B), hamowane później przez omeprazol, swoisty inhibitor H^+ , K^+ -ATPazy, które następnie wracało do wartości kontrolnych ($77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Fig. 11 B). Działanie kwasu chlorogenowego było silnie przeciwwydzielnicze. Obydwa pomiary, silnie dodatni IPX ($0,17 \pm 0,02$; dwustronny test t, $p \leq 0,001$; $n=7$; Fig. 11 A) oraz spadek prądu w komorze Ussinga ($-76 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Fig. 11 C) sugerują działanie hamujące kwasu chlorogenowego na poziomie czynnościowym *in vitro*. Rekombinacja wszystkich związków, bez kwasu chlorogenowego, również wskazywała na anty-synergistyczne działanie kwasu chlorogenowego w pełnej rekombinacji, ponieważ IPX ($0,02 \pm 0,01$) był istotnie obniżony (dwustronny test t, $p \leq 0,001$; $n=7$; Fig. 11, A). W przeciwieństwie do tego, kofeina stymulowała wydzielanie z IPX $-0,09 \pm 0,04$ (dwustronny test t, $p \leq 0,01$; $n=7$; Fig. 11, A). Aktywność wydzielnicza była potwierdzona przez wzrost prądu do $16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Fig. 11 C). Samo N-metylopirydinium w ogóle nie wpływało na IPX (Fig. 11 A) ani na prąd (wykres nieprzedstawiony). Zatem, jeśli dodawano je do komory Ussinga do przedziału podstawnego po podaniu kofeiny do przedziału wierzchołkowego, prowadziło do obniżenia prądu z $16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ do $-5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Fig. 11 C). Kombinacja kofeiny i N-metylopirydinium powodowała obniżenie IPX do $0,03 \pm 0,06$, które nie było już istotne w odniesieniu do kontroli, ale również nie było w odniesieniu do działania samej kofeiny (wyniki nieprzedstawione). Najsilniejszy efekt rekombinacji wykazano dla katecholu. IPX dla samego katecholu wskazywał na działanie stymulujące komórki HGT-1 ($-0,04 \pm 0,02$; dwustronny test t, $p \leq 0,05$; $n=7$; Fig. 11, A). Rekombinacja wszystkich związków niezawierająca katecholu, okazała się być silną zmianą dodatnią IPX do $0,12 \pm 0,02$ (dwustronny test t, $p \leq 0,001$; $n=7$; Fig. 11, A). Jak wykazano przez IPX dla katecholu, ciągle istotnego, ale nie tak silnego jak dla histaminy czy kofeiny, prąd wywołany szczytowym traktowaniem komórek HGT-1 katecholem był stosunkowo łagodny w porównaniu do stymulacji kofeiną lub histaminą (Fig. 11 A, C, D). Zatem, wpływ katecholu wydaje się bardziej synergistyczny niż wpływ pojedynczego związku. Nie badano, czy 5HT zmieniał IPX istotnie w porównaniu do komórek kontrolnych, jednakże, sam 5HT wykazywał tendencje do istotności z wartością $p \leq 0,07$. Zostało to poparte pomiarami prądu po wierzchołkowym podaniu 5HT komórkom HGT-1, co powodowało wzrost prądu po podaniu do $70 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Fig. 11E). W końcu zbadano, czy pirogalol wykazuje zdolność przeciwwydzielniczą, uzyskując istotnie dodatni IPX $0,05 \pm 0,02$ w porównaniu do komórek kontrolnych (dwustronny test t, $p \leq 0,05$; $n=7$; Fig. 11, A). Pomiar prądu wykazywał spadek do $-24 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ po traktowaniu szczytowym komórek HGT-1. Jednakże, pełna rekombinacja nie wykazywała istotnej zmiany IPX w porównaniu do komórek kontrolnych, wspierając hipotezę o synergistycznym i anty-synergistycznym działaniu wieloskładnikowych roztworów.

Tabela 2

Zmienne wejściowe i wyjściowe dla obliczeń sieci neuronowej dla ekspresji receptorów

	POJEDYNCZY ZWIĄZEK						RECEPTORY			
	N-MP	CA	CAFF	CAT	C5HT	PYR	HRH2	CHRM3	SSTR2	
kontrola	0	0	0	0	0	0	100%	100%	100%	ZMIENNE WEJŚCIOWE
N-MP	100	0	0	0	0	0	137%	138%	129%	
CA	0	100	0	0	0	0	103%	156%	96%	
CAFF	0	0	100	0	0	0	138%	190%	103%	
CAT	0	0	0	100	0	0	118%	139%	120%	
C5HT	0	0	0	0	100	0	117%	119%	98%	
PYR	0	0	0	0	0	100	107%	151%	90%	
All	100	100	100	100	100	100	263%	99%	111%	
N-MP/CA	100	100	0	0	0	0	107%	129%	113%	ZMIENNE WYJŚCIOWE
N-MP/CAFF	100	0	100	0	0	0	186%	223%	134%	
N-MP/CAT	100	0	0	100	0	0	181%	235%	134%	
N-MP/C5HT	100	0	0	0	100	0	135%	142%	93%	
N-MP/PYR	100	0	0	0	0	100	165%	155%	80%	
N-MP/CA/CAFF	100	100	100	0	0	0	107%	148%	115%	
N-MP/CAT/CA	100	100	0	100	0	0	147%	241%	164%	
N-MP/C5HT/CA	100	100	0	0	100	0	154%	175%	97%	
N-MP/PYR/CA	100	100	0	0	0	100	157%	148%	92%	
N-MP/CA/CAFF/CAT	100	100	100	100	0	0	101%	156%	125%	
N-MP/C5HT/CA/CAFF	100	100	100	0	100	0	137%	166%	84%	
N-MP/PYR/CA/CAFF	100	100	100	0	0	100	142%	149%	105%	
N-MP/CA/CAFF/CAT/C5HT	100	100	100	100	100	0	90%	133%	121%	
N-MP/PYR/CA/CAFF/CAT	100	100	100	100	0	100	179%	162%	89%	
CA/CAFF	0	100	100	0	0	0	62%	69%	36%	
CA/CAT	0	100	0	100	0	0	72%	79%	35%	
CA/C5HT	0	100	0	0	100	0	54%	59%	29%	
CA/PYR	0	100	0	0	0	100	66%	78%	31%	
CA/CAFF/CAT	0	100	100	100	0	0	74%	90%	59%	
CA/CAFF/C5HT	0	100	100	0	100	0	91%	90%	51%	
CA/CAFF/PYR	0	100	100	0	0	100	57%	73%	111%	
CA/CAFF/CAT/C5HT	0	100	100	100	100	0	79%	84%	223%	
CA/CAFF/CAT/PYR	0	100	100	100	0	0	89%	106%	266%	
CA/CAFF/CAT/PYR/C5HT	0	100	100	100	100	0	86%	101%	193%	

[0082] Analiza sieci neuronowych ekspresji genów dla receptorów HRH2, CHRM3 i SSTR2 wykazała, że związkami o najniższej swoistości receptorowej były odpowiednio, katechol, pirogalol i C5HT (Tabela 3). Jednakże, dane wskazują na zależną od specyficznego związku regulację poszczególnych receptorów, ponieważ dla ekspresji genu dla HRH2 najbardziej znacząca była kofeina, podczas gdy ekspresja genu dla CHRM3 zależała najbardziej od kwasu chlorogenowego. Dla receptora SSTR2, kwas chlorogenowy i kofeina były tak samo istotne i osiągały również najwyższą częstotliwość.

Tabela 3

Relewancja poszczególnych składników kawy w sieci neuronowej dla ekspresji genów receptorów HRH2, CHRM3 i SST2. R oznacza korelację liniową pomiędzy wartościami zmierzonymi a przewidywaniami sieci neuronowej

	HRH2	CHRM3	SSTR2
NMP	0,94	0,91	0,96
CS	0,79	1,00	1,00
COFF	1,00	0,82	1,00
CAT	0,29	0,59	0,96
5HT	0,50	0,68	0,25
PYR	0,71	0,23	0,83
	R = 0,94	R = 0,94	R = 0,80

[0083] Wszystkie związki stosowano w stężeniach, w jakich zwykle występują w zwykłych napojach kawowych. W naszym podejściu wieloparametrycznym badaliśmy wpływ tych związków na znane do tej pory geny, przekaźniki sygnału i aspekty funkcjonalne wydzielania kwasu żołądkowego. Dodatkowo, zastosowaliśmy model sieci neuronalnej do identyfikacji związków o największym znaczeniu dla ekspresji genów receptorów pro- i przeciwwydzielniczych. Jednakże, nasze stwierdzenia dla pojedynczych związków na poziomie regulacji genów były zgodne z oczekiwaniami, z jednym wyjątkiem, wyników pomiarów dla pełnej rekombinacji. Wykazano po raz pierwszy, że N-metylopirydynium i pirogalol regulują w dół H⁺,K⁺-ATPazę, odgrywając główną rolę w wydzielaniu kwasu żołądkowego, i konkurują z kofeiną oraz kwasem chlorogenowym, które regulują prawie dwukrotnie w górę ten gen. W eksperymentach z rekombinacją, zarówno N-metylopirydynium jak i pirogalol kompensowały wpływ regulacji w górę przez kofeinę i kwas chlorogenowy, co powodowała również pełna rekombinacja wszystkich związków. Prowydzielniczy receptor acetylocholiny M3 był regulowany w górę przez pirogalol, kwas chlorogenowy i N-metylopirydynium. Później, po 20 minutach, N-metylopirydynium regulowało w dół ten receptor, w taki sam sposób, jak pełna rekombinacja wszystkich związków wpływała na ekspresję tego receptora. Dodatkowo, pirogalol także regulował w dół ten receptor po 15 minutach, po silnej jego regulacji w górę w piątej minucie. Dlatego prawdopodobne jest łączne działanie po 20 minutach. Dodatkowo, przeciwwydzielniczy receptor somatostatyny 2 był silnie regulowany w dół przez 5HT, co może skutkować zmniejszoną podatnością komórek okładzinowych na sygnał przeciwwydzielniczy *in vivo*. W przeciwieństwie do tego, N-metylopirydynium zwiększało ekspresję tego receptora więcej niż dwukrotnie. Kombinacja tych dwóch związków skutkowała poziomami ekspresji nieistotnymi wobec kontroli. W taki sam sposób, pełna rekombinacja wszystkich związków regulowała przeciwwydzielniczy receptor somatostatyny.

[0084] Podsumowując te wyniki, wydaje się, że N-metylopirydynium wpływa na wszystkie ważne geny, z wyjątkiem receptora histaminy, w sposób przeciwwydzielniczy. Pirogalol ma takie samo działanie na H⁺-K⁺-ATPazę i prawdopodobne występuje współdziałanie z N-metylopirydynium na receptor acetylocholiny M-3.

Ponieważ C5HT silnie reguluje w dół przeciwwydzielniczy receptor somatostatyny i kompensuje działanie metylopirydinium regulujące w górę N-, C5HT może wspierać nasilone wydzielanie kwasu żołądkowego po konsumpcji kofeiny *in vivo*. W przeciwieństwie do tego, C5HT znacznie reguluje w dół ekspresję receptora histaminy H₂ po pięciu minutach, podczas gdy kwas chlorogenowy prowadzi do jego regulacji w górę po 15 minutach. Jednakże, pełna rekombinacja wszystkich związków prowadzi do normalnych poziomów ekspresji po pięciu minutach, ale zwiększa ekspresję więcej niż dwukrotnie po 10 minutach. Pozostaje niejasnym, dlaczego łączne działanie powoduje regulację w górę ekspresji receptora histaminy H₂. Sieć neuronowa przewidziała największą relewancję ekspresji receptora histaminy H₂ dla kofeiny, kwasu chlorogenowego i N-metylopirydinium. Inne kombinacje pojedynczych związków wykazały, że rosnąca złożoność roztworów prowadzi do różnych wartości relewancji niż mogłyby wskazywać to pojedyncze związki. Ponieważ wpływ C5HT obniżający ekspresję receptora acetylocholino M₃ był nawet zwiększony przez ko-inkubację z kwasem chlorogenowym. Pojedyncze działanie kwasu chlorogenowego nie było wystarczająco silne, by wskazać wpływ dominujący nad C5HT. Niemniej jednak, sieć neuronowa zidentyfikowała kwas chlorogenowy, jako mający najwyższą relewancję 100% dla zmiany w ekspresji receptora acetylocholino M₃ spowodowanej roztworami wielozwiązkowymi. Jako związek z drugą najwyższą relewancją 91%, zidentyfikowano N-metylopirydinium. Jednakże, N-metylopirydinium, jako pojedynczy związek, wykazało działanie regulujące w dół ekspresję receptora acetylocholino M₃. Wyniki te korespondują z wysokimi wartościami R dla korelacji obliczonych scenariuszy i danych doświadczalnych. Ponieważ żaden pojedynczy związek ani pełna rekombinacja wszystkich testowanych związków nie wykazały silnego wpływu na ekspresję receptora histaminy H₂ lub na receptor acetylocholino M₃ po 10 min, sieć neuronowa służy jako skuteczne narzędzie do identyfikacji działań synergistycznych i anty-synergistycznych.

[0085] Odnośnie do transdukcji sygnału, aktywacja EGFr, Akt1 i ERK1/2 przedstawiały różny obraz. EGFr uważano do tej pory za nasilający wydzielanie kwasu żołądkowego i częściowo aktywowany przez histaminę. Nasze stwierdzenia potwierdzają tę hipotezę. W ten sam sposób działa kofeina, kwas chlorogenowy i C5HT, jak też pełna rekombinacja. Co ciekawe, w poprzednim badaniu, napój kawowy o dużej zawartości kwasu chlorogenowego i kofeiny, ale niskiej N-metylopirydinium, również aktywował EGFr, ale napoje o wysokim stężeniu N-metylopirydinium nie aktywują tego receptora. Następny sygnał EGFr obejmuje sygnał Akt1 i ERK1/2. Uważa się, że Akt1 zwiększa ekspresję H⁺,K⁺-ATPazy i zwiększa aktywność wydzielniczą. Wszystkie związki, z wyjątkiem histaminy i kwasu chlorogenowego, aktywowały sygnał Akt1. To samo działanie powoduje pełna rekombinacja wszystkich związków. W przeciwieństwie do tego, ERK1/2, który uważa się za ostro hamujący wydzielanie żołądkowe, był aktywowany tylko przez N-metylopirydinium. Dodatkowo, pełna rekombinacja redukowała sygnał ERK1/2 poniżej poziomu kontrolnego. Wykazano, że cykliczny AMP i związany z nim czynnik transkrypcyjny, ATF2, nie są swoiście zaburzone przez którykolwiek z badanych związków, aczkolwiek histamina zwiększała wewnątrzkomórkowe stężenia cyklicznego AMP i aktywację ATF2. W ten sam sposób działało N-metylopirydinium. Ponieważ działanie N-metylopirydinium było raczej przeciwwydzielnicze, zwiększenie poziomów cAMP i aktywacja ATF-2 mogą być związane ze wzrostem ekspresji przeciwwydzielniczego receptora somatostatyny. Dodatkowo, kwas chlorogenowy obniżał poziomy cyklicznego AMP i nie aktywował ATF-2 i był ponadto związany ze zmniejszoną aktywnością wydzielniczą komórek HGT-1. Aktywność wydzielniczą charakteryzowano przez pomiary wewnątrzkomórkowego pH i doświadczenia z komorą Ussinga. Kofeina, katechol i C5HT okazały się stymulującymi wydzielanie, podczas gdy kwas chlorogenowy i pirogalol prowadziły do zmniejszania wydzielania. N-metylopirydinium nie wpływa-

ło w ogóle na wewnątrzkomórkowe pH lub na wydzielanie w eksperymentach w komorze Ussinga. Z tego powodu, wykazało przeciwstawne działanie regulacyjne na indukowane kofeiną wydzielanie.

[0086] Podsumowując nasze stwierdzenia, działanie biologiczne pojedynczego związku zawsze może być inne niż działanie tego samego związku w złożonym roztworze. Nasze badania potwierdzają hipotezę o synergistycznych i anty-synergistycznych interakcjach różnych związków.

Przykład 3: Analiza ilościowa NMP i C5HT w próbkach kawy

[0087] Analizowano ilość N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów (C5HT) i N-metylopirydynium (NMP) w szeregu kaw, mających różny stopień upalenia i różną obróbkę wstępną. Odnotowano, że stężenie NMP w napojach kawowych rośnie razem ze stopniem upalenia. Stężenie C5HT maleje w napojach kawowych wraz ze stopniem upalenia. Kawy odkofeinowane i odwoskowane wykazują znacząco niższą zawartość C5HT w porównaniu do nietraktowanych.

[0088] *Analiza ilościowa*

N-alkanoilo-5-hydroksytryptamid (C5HT) i N-metylopirydynium (NMP) oznaczano ilościowo w próbkach kawy. Kody próbek zastąpiono łatwo dostępnymi skrótami dla poprawy przyporządkowania (Tabela 4).

Tabela 4

Informacje o oznaczeniach analizowanych kaw

Oznaczenie kawy surowej		Stopień palenia	Skrót
nietraktowana	Columbia 50006	50, 80, 110 Skt	"nietraktowana Col 5"
	Columbia 26902A	50, 80, 110 Skt	"nietraktowana Col 2"
odkofeinowana	26902 A+26831 A	50, 80, 110 Skt	"odkofeinowana 2+2"
odwoskowana	Columbia 50006	50, 80, 110 Skt	"odwoskowana Col 5"
	Columbia 26902 A	50, 80 Skt	"odwoskowana Col 2"

[0089] Do analizy ilościowej N-alkanoilo-5-hydroksytryptamidów (C5HT) próbki świeżo przygotowanego napoju kawowego zmieszano ze znakowanymi deuterem wzorcami wewnętrznymi i rozcieńczono metanolem po zrównoważeniu. Oziębienie i wirowanie dało precypitat brązowej barwy i żółtawy supernatant, który wstrzyknięto do układu HPLC-MS/MS bez dalszej obróbki. Fig. 16 przedstawia reprezentatywną analizę. Termin „Skt” i „stopnie skali,” stosuje się tu jako równoznaczne.

[0090] Podczas gdy analizowane napoje kawowe wykazywały zasadniczo te same tendencje w odniesieniu do stężenia NMP i C5HT w zależności od stopnia upalenia (w stopniach skali), w napoju odwoskowanym Columbia 2 (oznaczonym na Fig. 15) przy średnim stopniu upalenia, stwierdzono znacznie zwiększoną zawartość (+60%) NMP w porównaniu do innych próbek. Ta kawa (odwoskowana Col 2, 80 Skt) i jej nietraktowany odpowiednik zastosowana była w eksperymentach z wysyceniem NMP.

[0091] Z danych ilościowych dla każdej próbki kawy wyliczono bezwymiarowy współczynnik, będący ilorazem stężenia NMP (mg/l) i C5HT (μg/l) x 100. Ten zaproponowany współczynnik ma na celu zilustrowanie

zależności pomiędzy C5HT a NMP w skrócie. Oprócz niniejszych próbek, dane dla dostępnych w handlu kaw, uzyskane w poprzednich badaniach, przedstawiono na Fig. 16 dla celów porównawczych.

[0092] Na podstawie zaproponowanego czynnika można zauważyć, że odwoskowana Columbia 2, upalana w 80 stopniach skali, odstaje od porównywanych próbek w szczególny sposób. Osiągnięto tu nietypową zależność pomiędzy stężeniami NMP i C5HT, bez potrzeby nadawania bardzo ciemnego koloru palenia.

[0093] Domieszkowanie N-metylopirydynium do napoju kawowego

Standaryzowane napoje kawowe przygotowano z próbki „nietraktowanej Columbia 2, 80 Skt” i „odwoskowanej Columbia 2, 80 Skt”. Roztwór wzorcowy jodku N-metylopirydynium domieszkowano do napoju przygotowanego z odwoskowanej palonej kawy, uzyskując zawartość NMP +100%, +200% i +300% w odniesieniu do wyjściowej zawartości NMP w mieszaninie. Po liofilizacji próbki poddano dalszej obróbce.

Tabela 5

Przegląd stężeń NMP w domieszkowanych napojach kawowych

Próbka	Dodatek NMP ⁺ (mg/l)	Końcowe stężenie NMP ⁺ (mg/l)
nietraktowana Columbia 2	-	15,4
odwoskowana Columbia 2	-	27,5
	29,5 (+100%)	57,0
	59,8 (+200%)	87,3
	89,3 (+300%)	116,8

Przykład 4: Wydzielanie protonów w komórkach żołądka w odpowiedzi na NMP i trygonelinę

[0094] Do dwóch wybranych kaw dodano poniżej określone różne ilości N-metylopirydynium. Ponadto, scharakteryzowano trygonelinę, jako substancję prekursorową dla N-metylopirydynium, jako jedną substancję, w odniesieniu do jej wpływu na wydzielanie protonów w ludzkich komórkach żołądka *in vitro*.

[0095] Hodowla komórek

Do doświadczeń *in vitro* stosowano linię komórek nowotworowych HGT-1 (linia ludzkich komórek nowotworu żołądka). Komórki izolowano z pierwotnego guza żołądka 60-letniego mężczyzny. Linia komórek HGT-1 została wyprowadzona przez Dr. Loboisse (Laboratory of Pathological Anatomy, Nantes, Francja) w 1982. Linia komórkowa rośnie przylegając i mikroskopowo wykazuje morfologię rombu, charakterystyczną dla komórek nabłonkowych.

[0096] Linie komórkową hodowano w inkubatorze w 37°C i 5% CO₂. Wolne od glutaminy podłoże Eagle w modyfikacji Dulbecco stosowano, jako podłoże hodowli, z dodatkiem:

- 20% surowicy płodowej bydlęcej
- 2% penicyliny/streptomycyny
- 2% glutaminy.

[0097] Dla zminimalizowania wpływu fizjologicznie aktywnych składników surowicy płodowej bydłęcej stosuje się równoważne podłoża do hodowli 24 h przed przeprowadzeniem eksperymentu, ale bez dodatku surowicy. Hodowanie komórek HGT-1 prowadzi się w butelkach do hodowli komórkowej (75 cm²) lub płytkach do hodowli komórkowej (6-studzienkowych, 24-studzienkowych, 6-SNAP-studzienkowych) Liczba komórek stosowanych do pojedynczego eksperymentu, jak również dalsze szczegóły dotyczące przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów przedstawiono szczegółowo w odpowiednich częściach.

[0098] *Pomiar wydzielania wewnątrzkomórkowego pH*

Pomiar wewnątrzkomórkowego pH prowadzi się za pomocą cytometrii przepływowej. Wewnątrzkomórkowe pH poddaje się ścisłej regulacji do zakresu pH 6,8 - 7,4. Większe wahania są kompensowane przez wewnątrzkomórkowy bufor białczanowy. Wewnątrzkomórkowe pH można stosować jako wskaźnik transportu jonów H⁺ przez błonę komórkową. Transport jonów H⁺ netto z wnętrza na zewnątrz komórki skutkuje odpowiednio krótkotrwałym wzrostem wewnątrzkomórkowego pH i spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów H⁺.

[0099] Eksperymenty przeprowadza się następująco. Komórki HGT-1 są płukane ogrzanym wcześniej PBS i następnie zeszkrobane do 5 ml PBS i ponownie zawieszone. Zawiesina jest wzbogacana do 1x10⁶ żywych komórek na ml i 2 ml każdej zawiesiny komórek wprowadza się do probówek FACS. Teraz komórki wiruje się przy 1000 obr./min przez 5 min, supernatant odrzuca się, osad zawiesza się ponownie w 2 ml każdego ogrzanego uprzednio do 37°C roztworu i inkubuje w 37°C przez 10 min. Po ponownym wirowaniu, próbkę roztworu pobiera się, komórki zawiesza się ponownie w 2 ml przygotowanego uprzednio 3 μM roztworu SNARF-AM i wkłada do lodu na 30 min. Roztwór barwiący usuwa się przez nowe wirowanie i osad komórek zawiesza się ponownie w 1 ml zimnego PBS. Podczas pomiaru FACS próbki utrzymuje się w lodzie. W celu ustalenia krzywej kalibracyjnej do każdej probówki FACS wprowadza się 500 μl roztworu buforu kalibracyjnego (20 mmol/l NaCl, 110 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgSO₄, 18 mmol/l D-glukoza i 20 mmol/l HEPES) razem z 1 μl nigerycyny. Dla krzywej kalibracyjnej, dodatkowe trzy probówki wypełnia się wzbogaconą zawiesiną komórek i inkubuje z PBS. Po barwieniu SNARF-AM komórki zawiesza się ponownie w 20 μl zimnego PBS i 5 μl z każdej z nich wprowadza się do przygotowanych probówek kalibracyjnych. Pomiary przeprowadza się analogicznie jak dla próbek.

[0100] Wyniki pomiarów przedstawia się jako iloraz proporcjonalny (ang. ratiometric quotient) mediany zliczeń dwóch maksymalnych emisji barwnika 580 nm i 640 nm i przelicza się na wewnątrzkomórkowe pH, stosując krzywą kalibracyjną. Dla przedstawienia wyników wprowadzono indeks protonów wewnątrzkomórkowych. Oblicza się go jako log₂ ze względnego stosunku wewnątrzkomórkowego stężenia jonów H⁺ traktowanej próbki do nietraktowanej kontroli. Im niższy jest ten indeks, tym więcej protonów uległo przemieszczeniu.

[0101] *Pomiar wydzielania prądem przez nabłonkowy*

Do pomiaru prądu jonowego w pojedynczej warstwie komórek HGT-1, zastosowano komorę Ussinga z firmy Harvard-Apparatus. Do zapisu prądu i napięcia, stosowano interfejs firmy KMSI. Zasadniczo składa się ona z dwóch przedziałów, komory wierzchołkowej i podstawnej. Pomiędzy obiema komorami można zamocować próbkę tkankową lub komórki hodowane na specjalnej błonie. Podczas eksperymentów, w komorze utrzymuje się temperaturę 37°C dzięki termostatowi. W zestawie eksperymentalnym komórki HGT-1 hoduje się na wkładkach błonowych ze studzienkami SNAP. W przygotowaniu eksperymentu umieszcza 100 000 ko-

mórek na studzienkę. Integralność pojedynczej warstwy komórek zapewnia się przez opór przeznabłonkowy, stosując komorę ENDOHM i kontrolę mikroskopową. Wkładka ze studzienkami SNAP jest umieszczana między obiema komorami na specjalnej ramce. Podczas pomiarów, możliwe jest stosowanie pewnych prądów lub napięć za pomocą interfejsu przez dwie elektrody napięciowe i dwie elektrody prądowe (elektrody AgCl), które umieszcza się po obu stronach wkładki ze studzienkami SNAP. Do pomiaru prądów jonowych wybiera się ustawienie wartości modalnej prądu zwarcia (I_{sc}). W tym celu napięcie ustala się na 0 woltów. Ponieważ przez aktywny i zależny od dyfuzji transport ładunku ponad monowarstwą komórek gromadzi się potencjał elektryczny, przykłada się przez elektrody ściśle określoną ilość prądu, aby uzyskać potencjał 0 mV. Częstotliwość stosowanego prądu wybiera się tak, że gromadzenie potencjału może nastąpić w krótkim czasie. Zatem, zmierzony prąd reprezentuje pomiar mających miejsce zdarzeń transportowych. W celu określenia swoistości zdarzeń transportowych, stosuje się pewne inhibitory, dla których znany jest transporter lub blokowany kanał. W ten sposób mogą zostać określone transportery lub kanały jonowe odpowiedzialne za zmiany krzywej prądu po zastosowaniu substancji, której działanie ma być zbadane.

Dla ustawienia eksperymentu w niniejszym badaniu przedmiotem zainteresowania była aktywność H^+ , K^+ -ATPazy. Histamina jest fizjologicznym stymulatorem tego wymiennika H^+/K^+ . Farmakologicznym inhibitorem wiążącym się selektywnie z czynnościową podjednostką tej pompy protonowej jest omeprazol.

[0102] Przygotowanie próbek

Dla ustawienia eksperymentu, wybrano Arabica Columbia 2, nietraktowana, 80 stopni skali (Col2) i Arabica Columbia s2**, odwoskowana, 80 stopni skali (Col2**). Kawy zaparzano standardowymi sposobami. Następnie Arabica Columbia** została wzbogacona 2,95 mg/100 ml, 5,8 mg/100 ml lub 8,93 mg/100 ml N-metylopirydynium. Napoje kawowe liofilizowano do eksperymentów z hodowlami komórkowymi. Do doświadczeń stosowano kawy w stężeniu 2,5 mg/ml buforu fosforanowego.

[0103] Dla charakteryzowania trygoneliny, zastosowano stężenie zgodne z "Lehrbuch der Lebensmittelchemie" (497 μ M). Histaminę we wszystkich eksperymentach stosowano w stężeniu 1 mM.

[0104] Wszystkie substancje i liofilizaty kawy przygotowywano w buforze fosforanowym (PBS).

[0105] Wpływ wzbogaconych kaw na wydzielanie

Komórki HGT-1 można było istotnie stymulować histaminą w porównaniu do kontroli ($-0,38 \pm 0,06$; $p \leq 0,001$). Testowane kawy wykazywały całkowicie osłabiony potencjał wydzielniczy w porównaniu do komórek stymulowanych histaminą. Col2 ($-0,21 \pm 0,02$) stymulowała aktywność wydzielniczą znacząco silniej w porównaniu do Col2** ($0,09 \pm 0,03$) ($p \leq 0,05$). Kawy Col2**, wzbogacone w N-metylopirydynium, wykazywały słabsze działanie niż Col2. 3-krotne wzbogacenie w N-metylopirydynium ($+8,93$ mg/100 ml) Col2** powodowało istotnie ($p \leq 0,001$) słabszą aktywność wydzielniczą ($0,19 \pm 0,03$) w porównaniu do Col2**. Jednakże, wzbogacenie Col2** 5,98/100 ml w N-metylopirydynium powodowało już istotnie niższe wydzielanie ($0,03 \pm 0,01$) w porównaniu do Col2** ($p \leq 0,05$) (Fig. 17).

[0106] Doświadczenie z hodowlami komórkowymi i kawami, wzbogaconymi w N-metylopirydynium mogą potwierdzić hamujący wpływ N-metylopirydynium na potencjał wydzielniczy napojów kawowych. Dodatkowo, można wykazać, że traktowanie Col2 powodowało słabszy potencjał wydzielniczy powstałego produktu Col2** w porównaniu do produktu wyjściowego.

[0107] Wpływ trygoneliny na wydzielanie

N-metylopirydinium jest wytwarzane przez pirolityczną dekarboksylację trygoneliny. W konsekwencji, przedstawiono działanie pojedynczej substancji trygoneliny na aktywność wydzielniczą komórek HGT-1. Histamina stymulowała wydzielanie istotnie ($-0,67 \pm 0,06$; $p \leq 0,001$). Inkubacja z trygoneliną powodowała istotnie zmniejszoną aktywność wydzielniczą w porównaniu do kontroli ($0,46 \pm 0,04$; $p \leq 0,001$) (cf. Fig. 18).

[0108] Doświadczenie dotyczące zależnego od stężenia działania trygoneliny wykazało istotny związek. Stopniowy spadek działania hamującego trygoneliny można wykazać dla zakresu stężeń od 4970, 497, 49,7, 4,97 μM . IPX zmniejszał się od 0,7 po traktowaniu komórek najwyższym stężeniem 4870 μM do -0,4 po traktowaniu stężeniem 4,97 μM (Fig. 19).

[0109] Hamujący wpływ trygoneliny na wydzielanie w porównaniu do kontroli można również potwierdzić w doświadczeniu w komorze dyfuzyjnej. Po zastosowaniu 497 μM roztworu trygoneliny, prąd zwarcia zmniejszył się z $+2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ do $-25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. W przeciwieństwie do tego, N-metylopirydinium, jako pojedyncza substancja, nie miało wykrywalnego działania na prąd zwarcia (Fig. 20).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ekstraktu wzbogaconego w N-metylopirydinium (NMP) z materiału organicznego zawierającego trygonelinę, przy czym sposób ten obejmuje następujące etapy:

- (a) odwoskowanie materiału organicznego zawierającego trygonelinę;
- (b) palenie materiału organicznego zawierającego trygonelinę;
- (c) traktowanie palonego materiału organicznego zawierającego trygonelinę gorącą wodą w celu uzyskania wodnego ekstraktu; i
- (d) dodanie NMP do wodnego ekstraktu.

2. Sposób według zastrzeżenia 1, w którym stopień upalenia materiału organicznego zawierającego trygonelinę po paleniu w etapie (b) wynosi co najmniej 50 stopni skali.

3. Sposób według zastrzeżenia 1 lub 2, w którym do ekstraktu wodnego w etapie (d) dodaje się co najmniej 2,95 mg/100 ml NMP.

4. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 3, w którym końcowy ekstrakt wzbogacony w NMP zawiera co najmniej 23 mg/l NMP.

5. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 4, w którym stosunek NMP/N-alkanoilo-5-hydroksytryptamid (C5HT) $\times 100$ w końcowym ekstrakcie wzbogaconym w NMP wynosi co najmniej 100.

6. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 5, w którym materiał organiczny zawierający trygonelinę jest wybrany z grupy obejmującej kawę, w szczególności *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea spp.*, i

Psilanthus spp., członków *Fabaceae*, w szczególności *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum* i *Trigonella foenum-graecum*, członków *Chenopodiaceae*, w szczególności *Chenopodium quinoa*, i członków *Poaceae*, w szczególności *Avena sativa*.

7. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 6, w którym materiałem organicznym zawierającym trygonelinę jest *Coffea arabica*, *provenience Columbia* lub *Coffea arabica*, *provenience Brazil*.

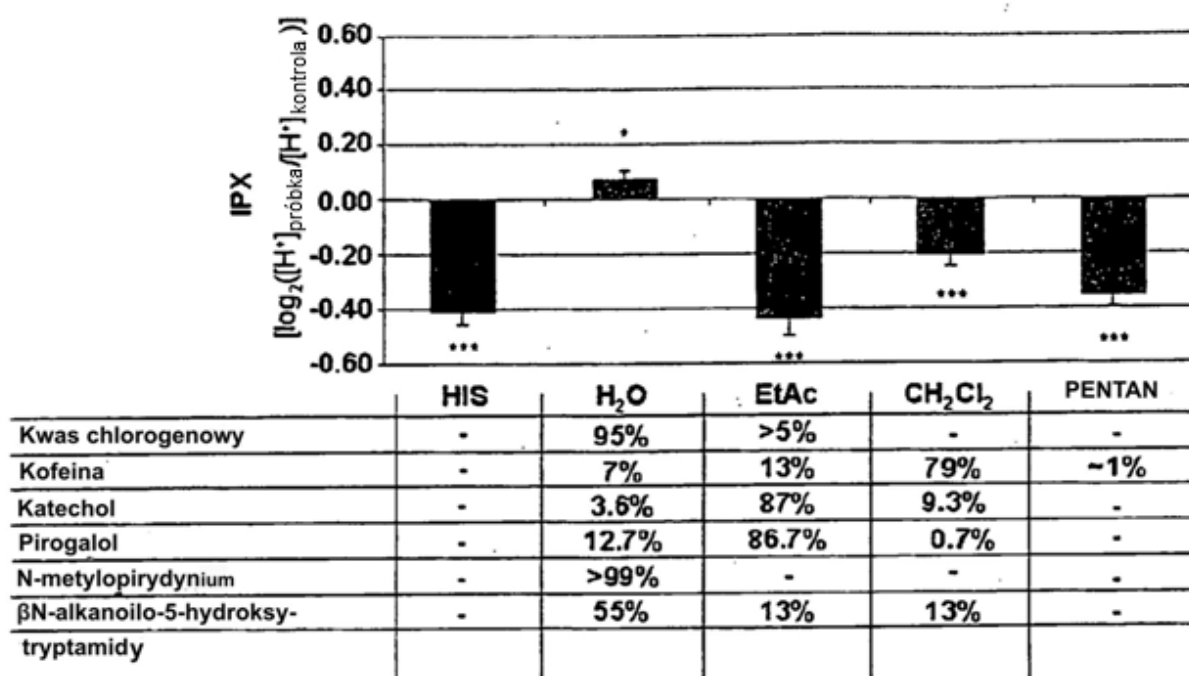


Figura 1

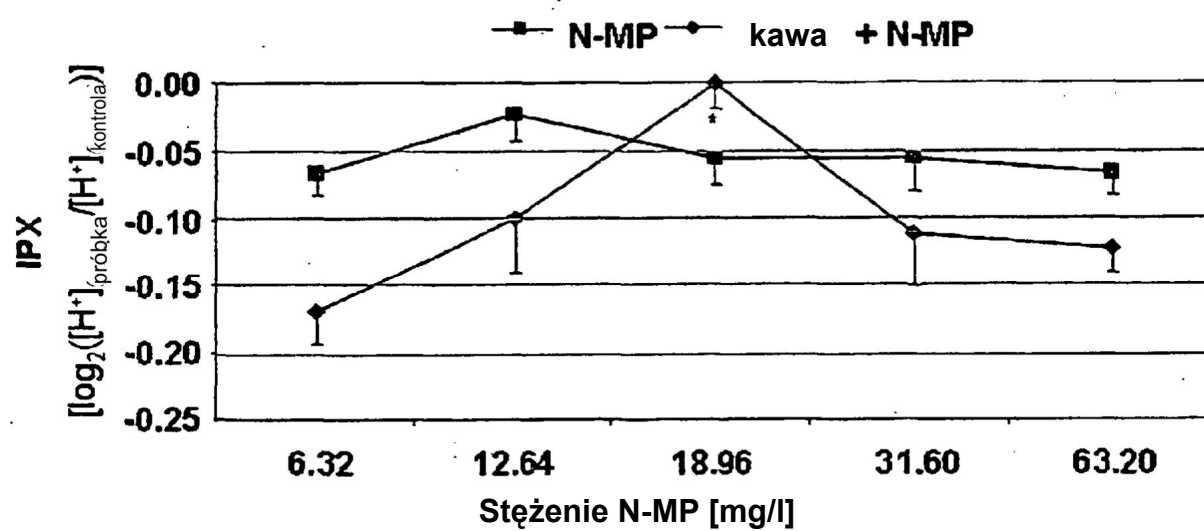


Figura 2

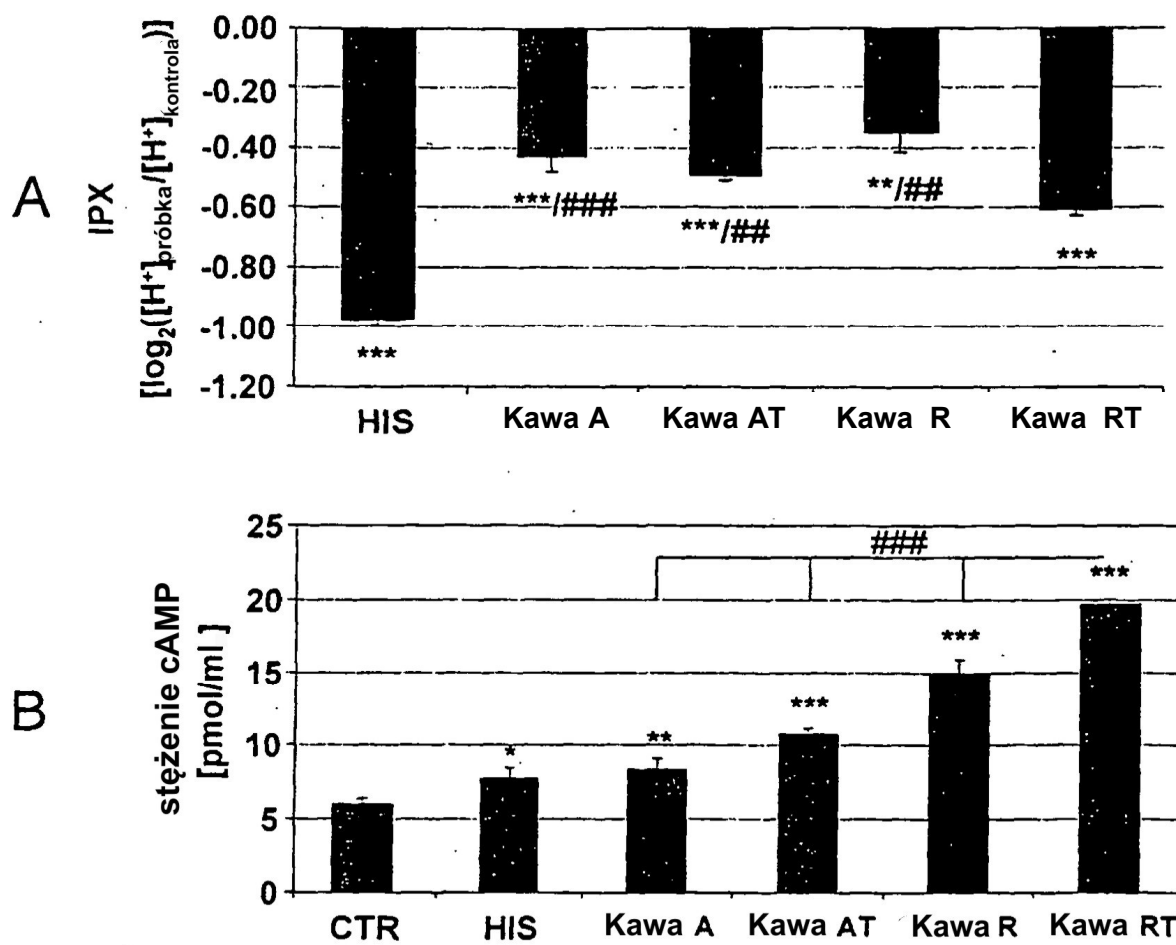


Figura 3

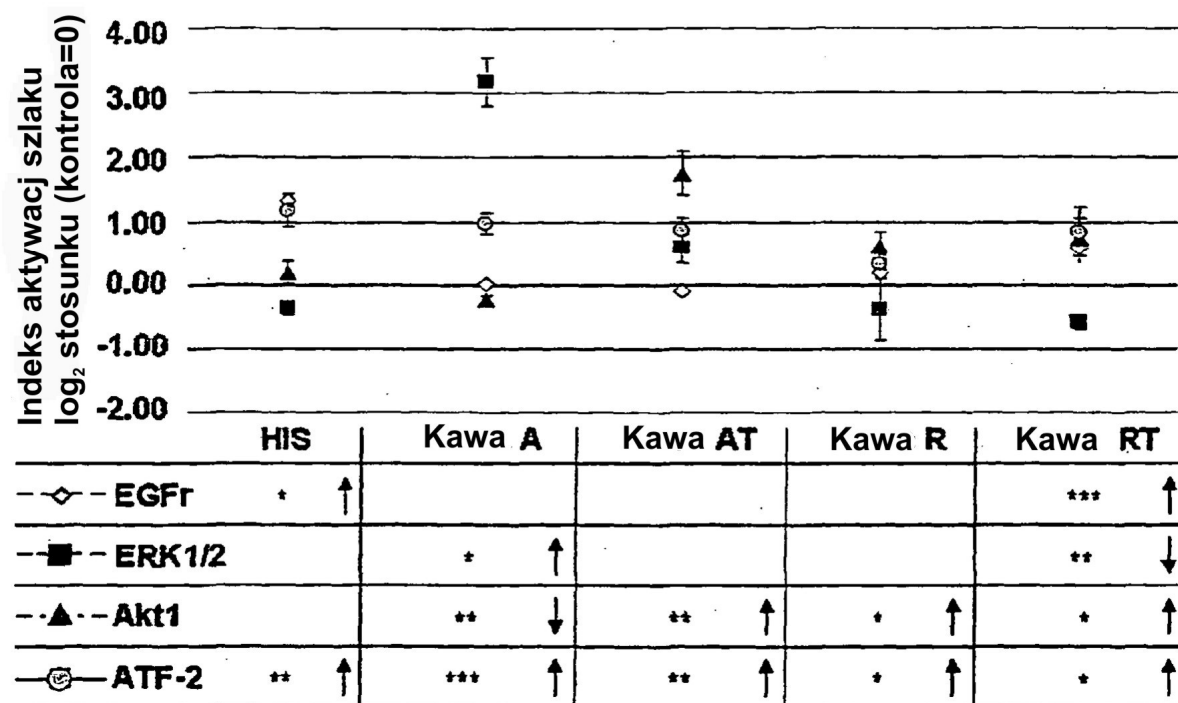


Figura 4

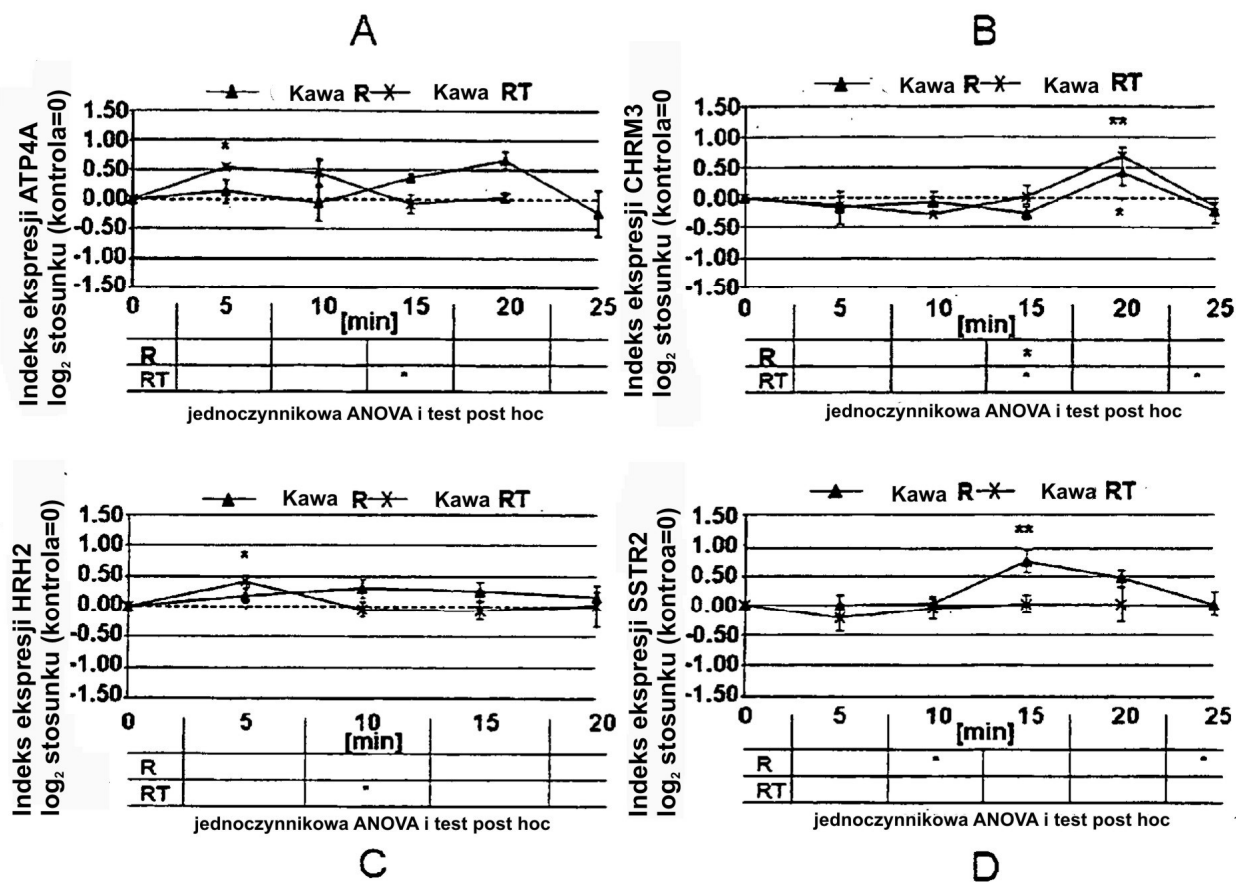


Figura 5

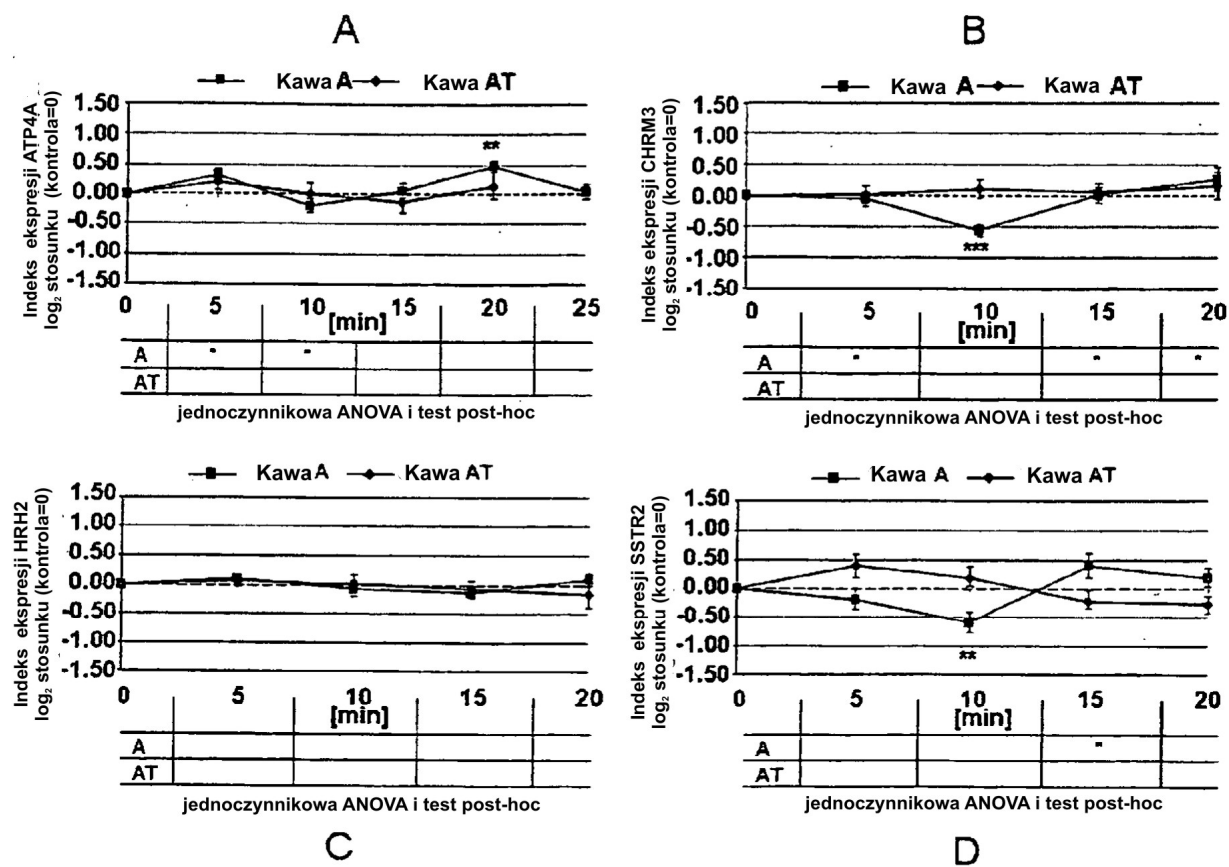


Figura 6

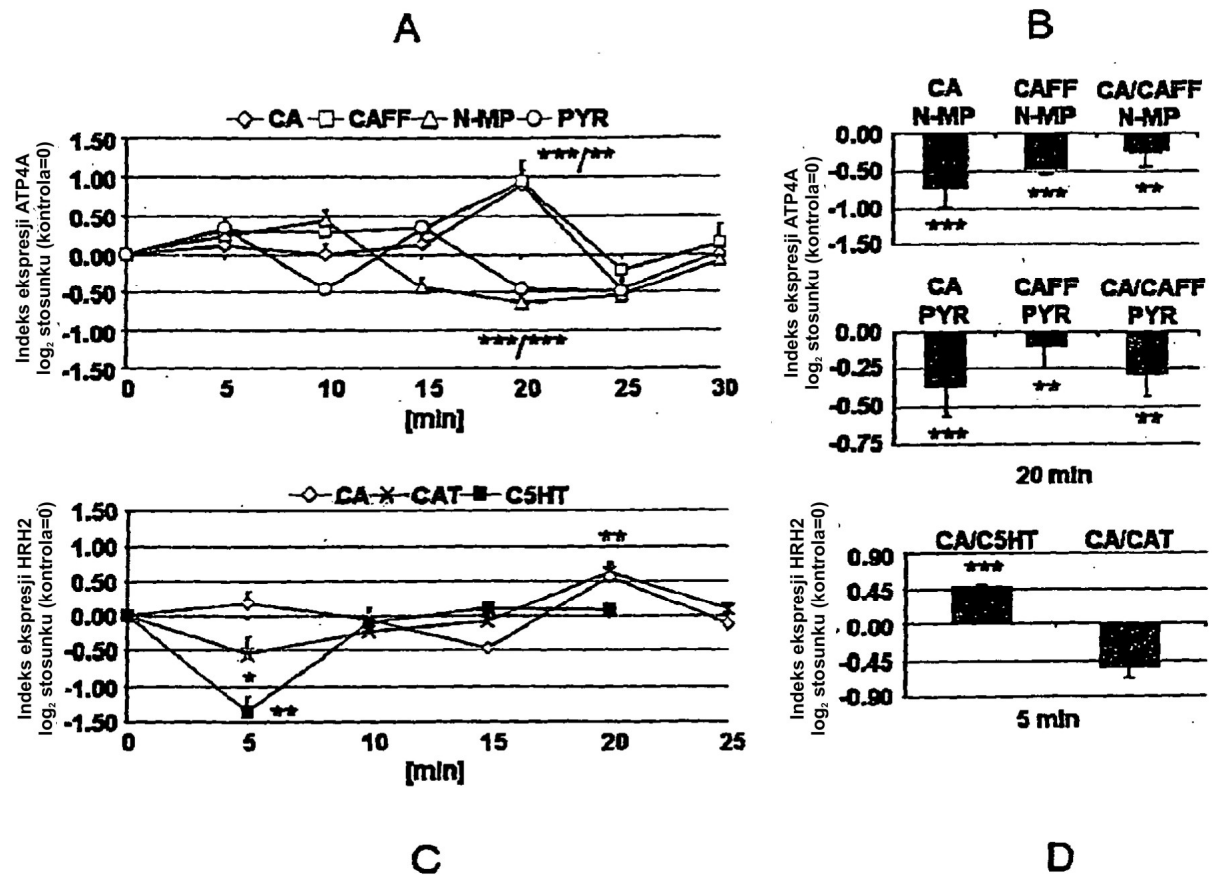


Figura 7

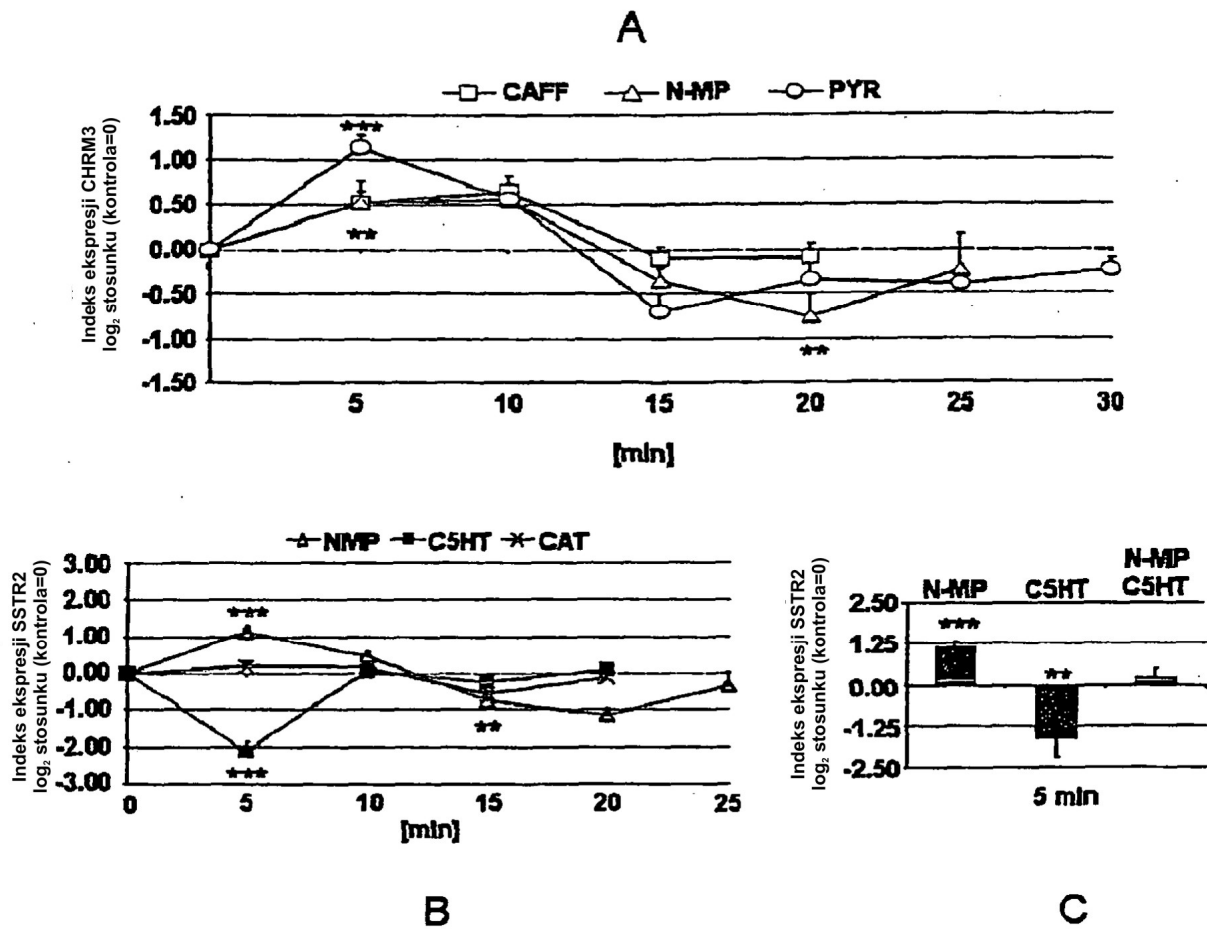


Figura 8

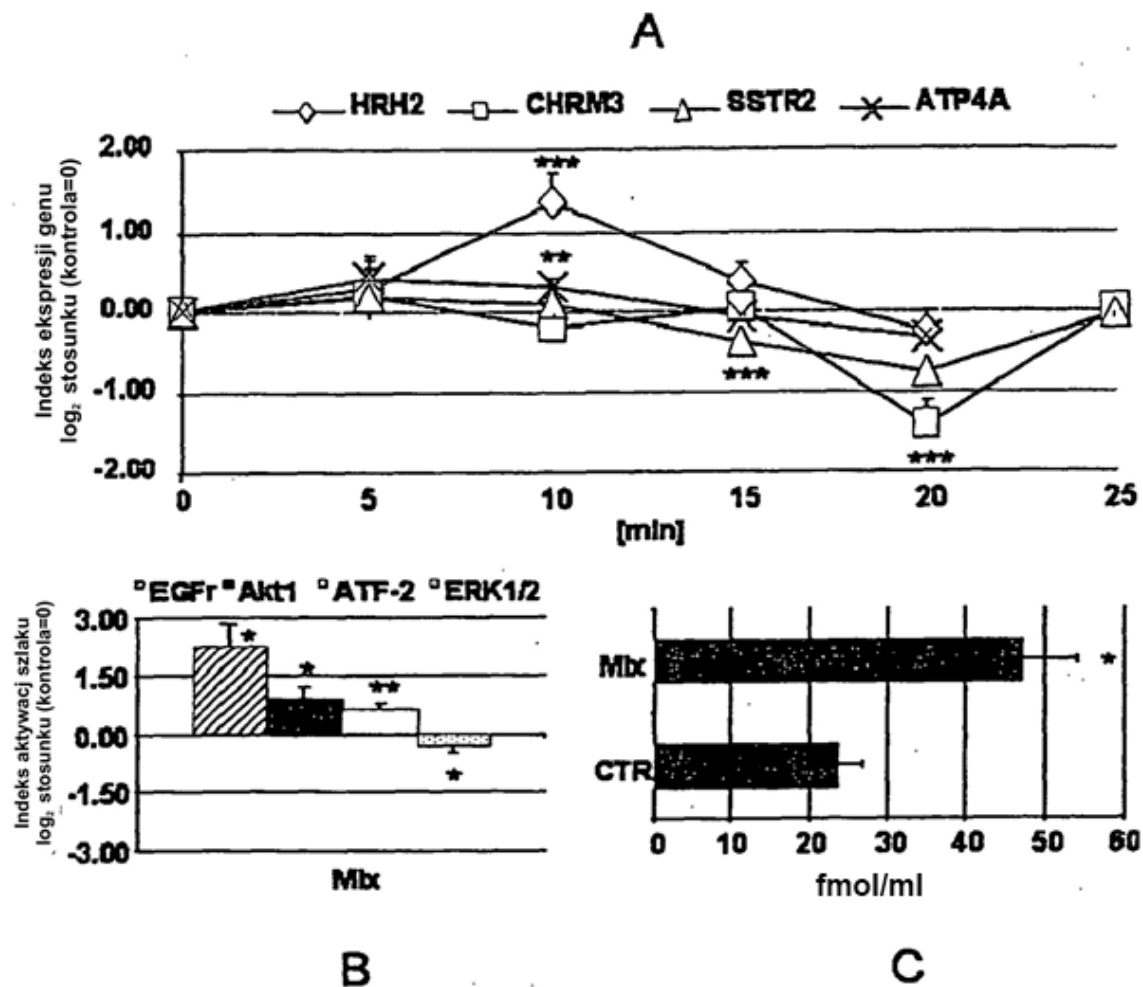


Figura 9

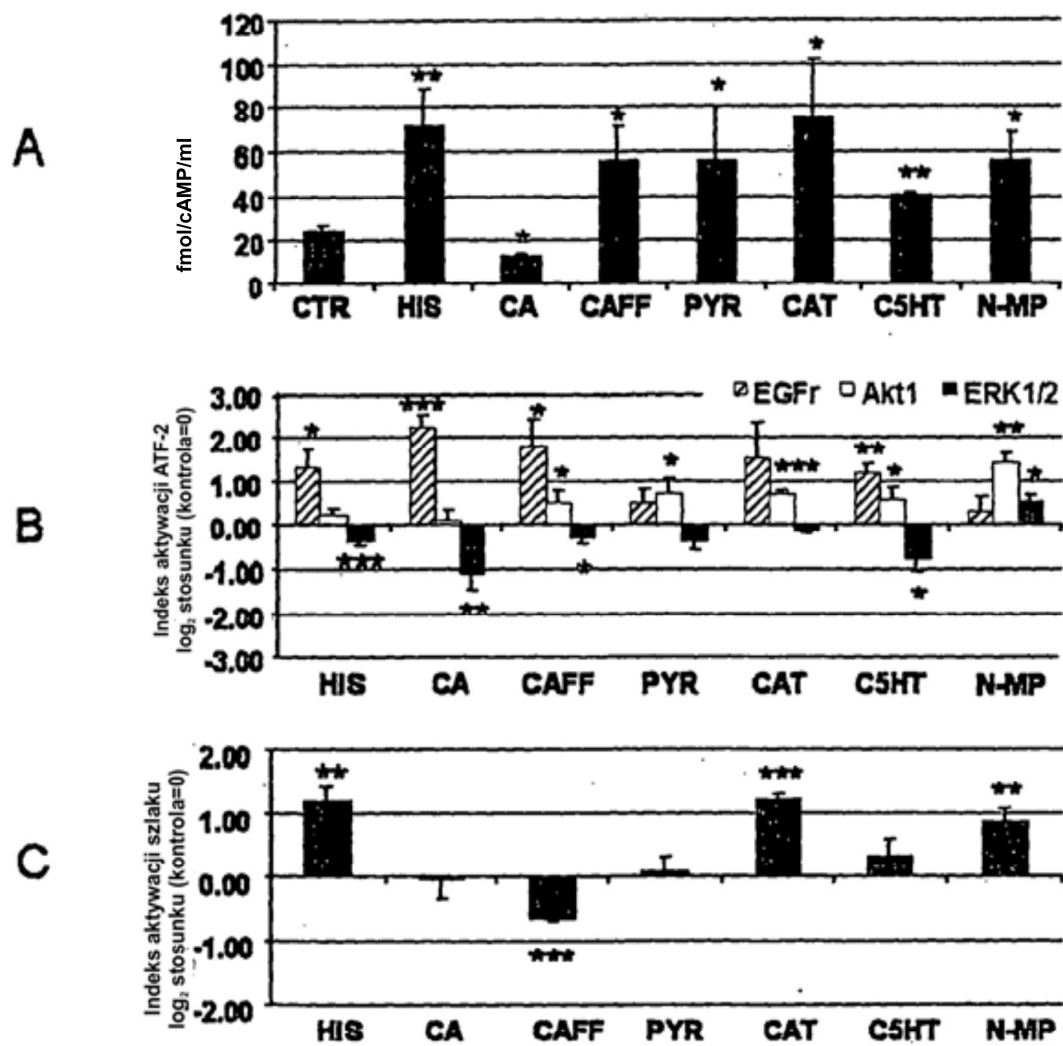


Figura 10

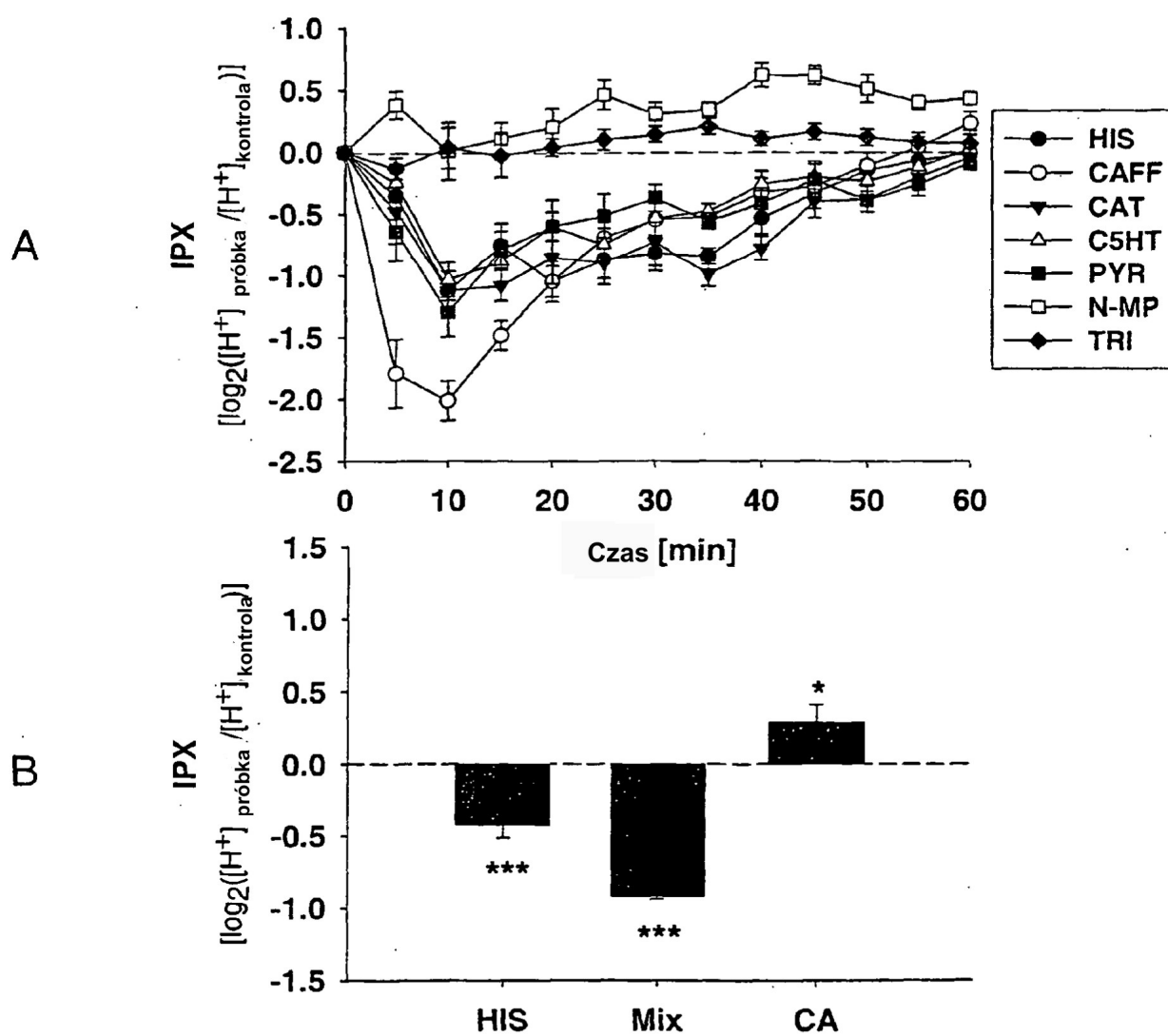


Figura 11

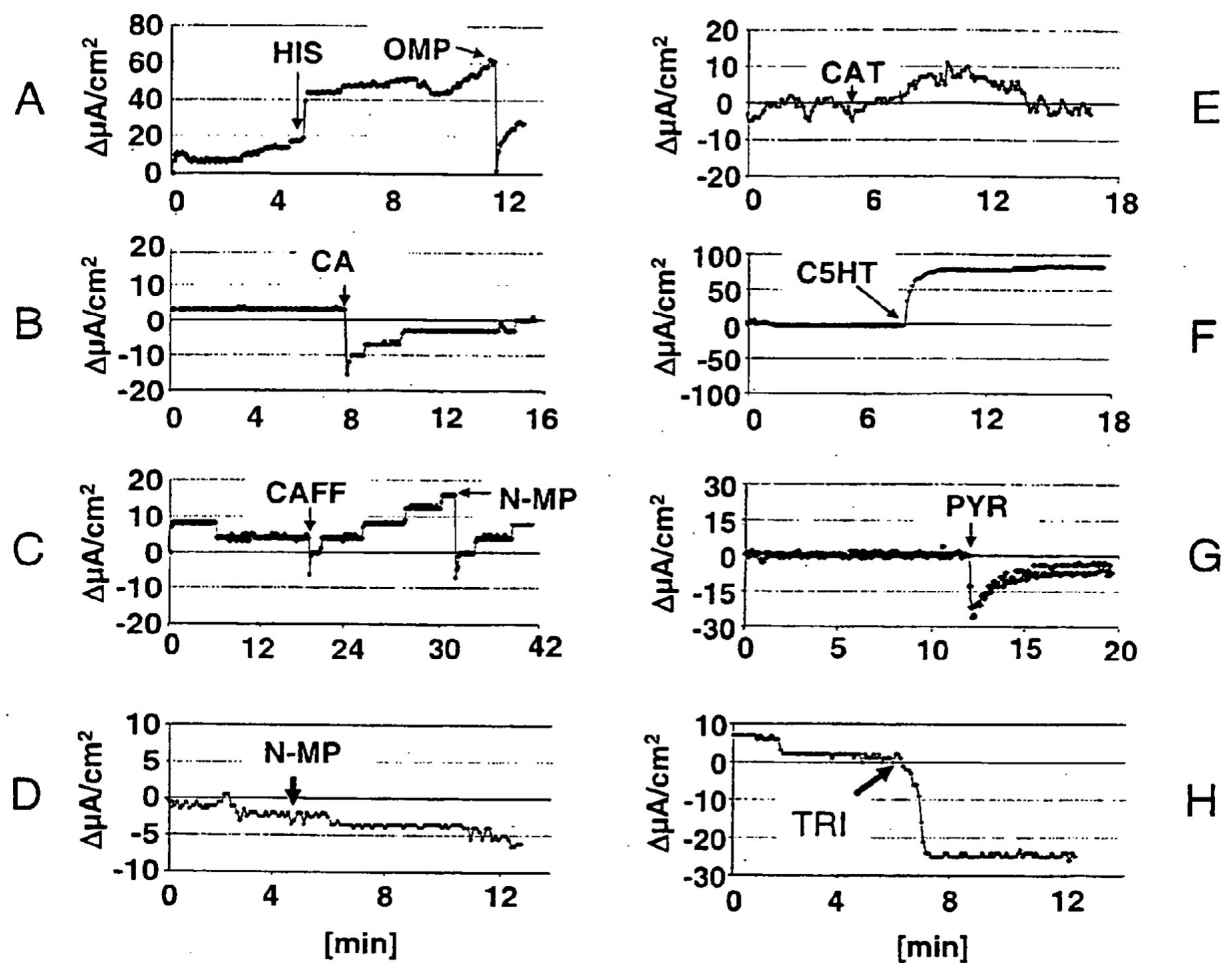


Figura 12

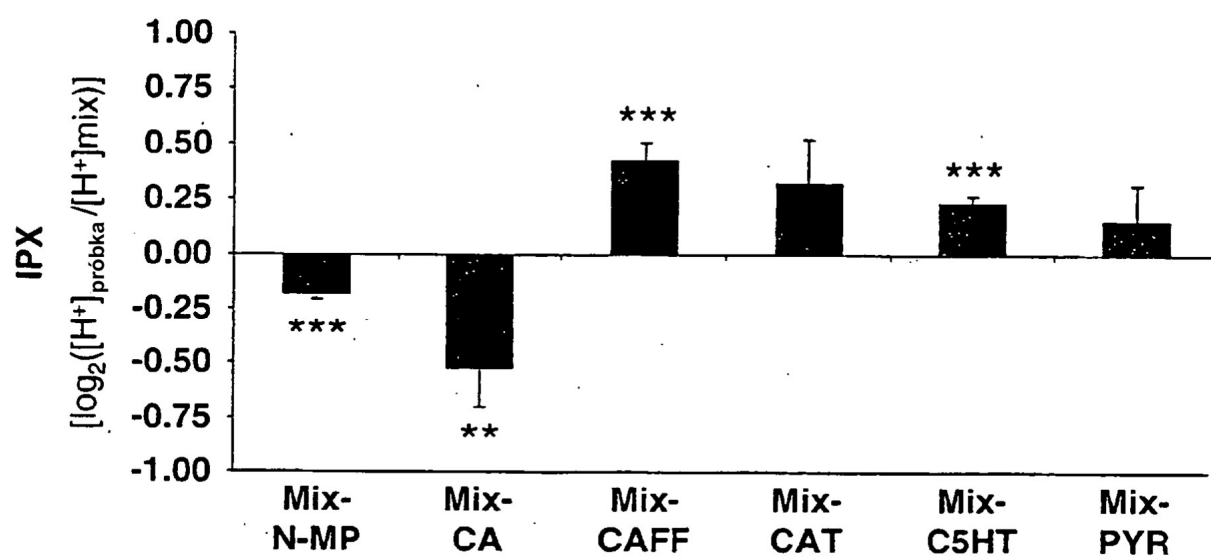


Figura 13

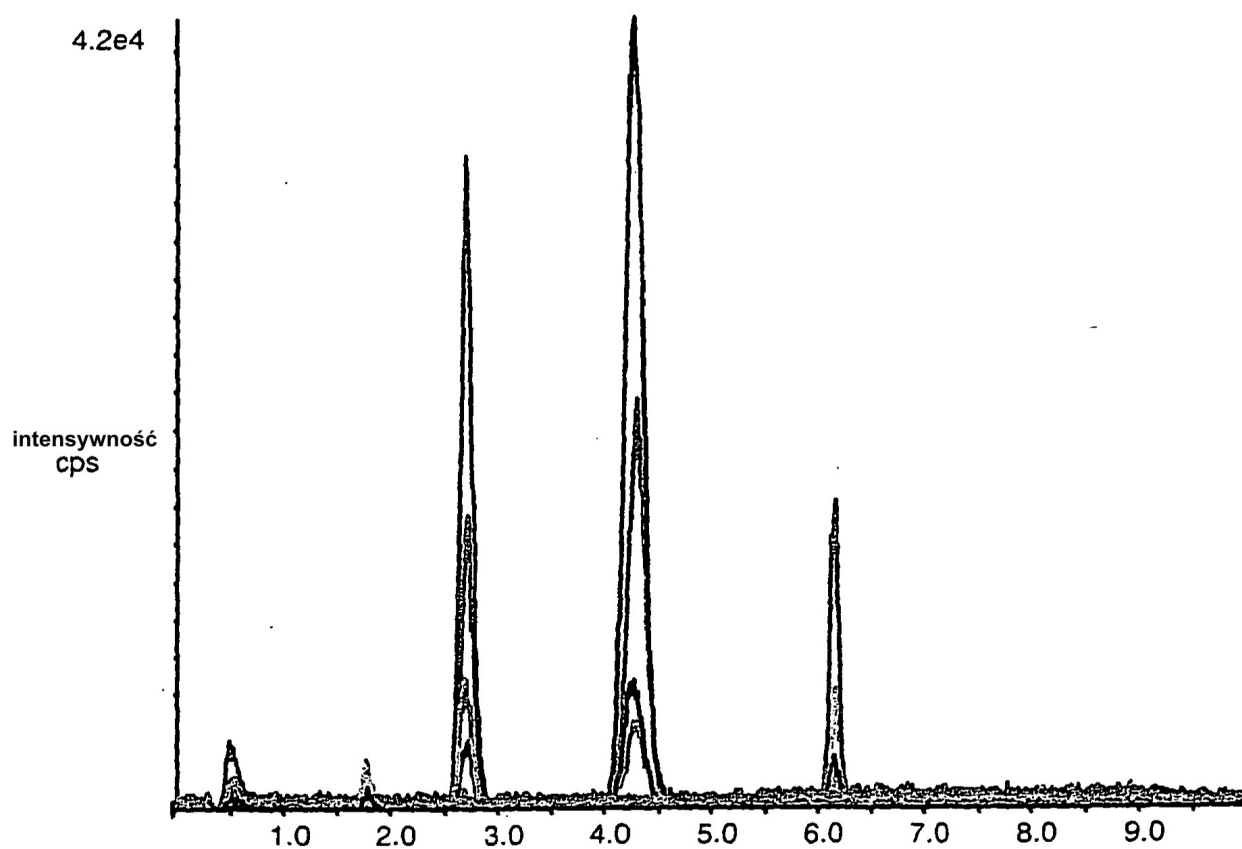


Figura 14

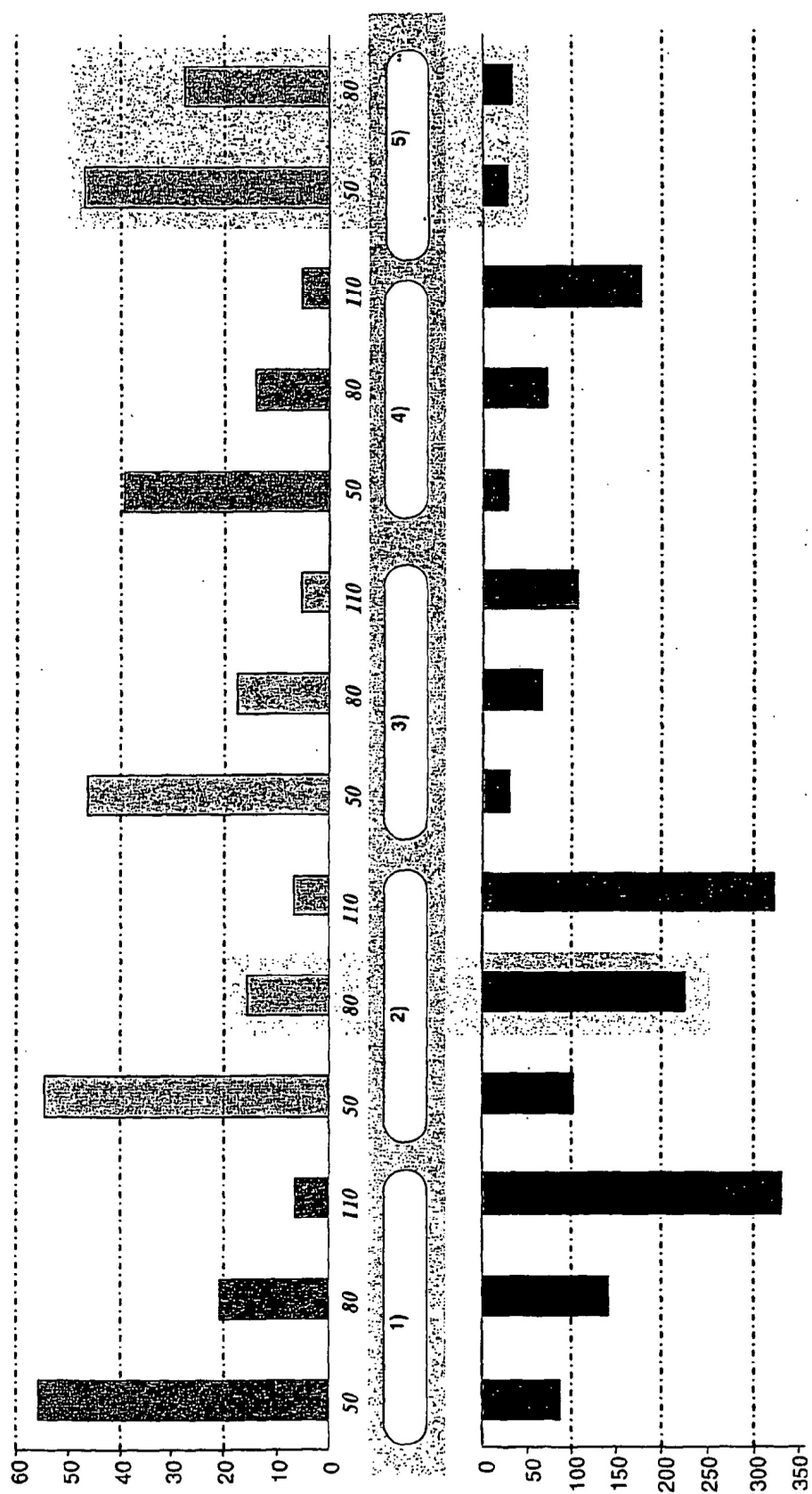


Figura 15

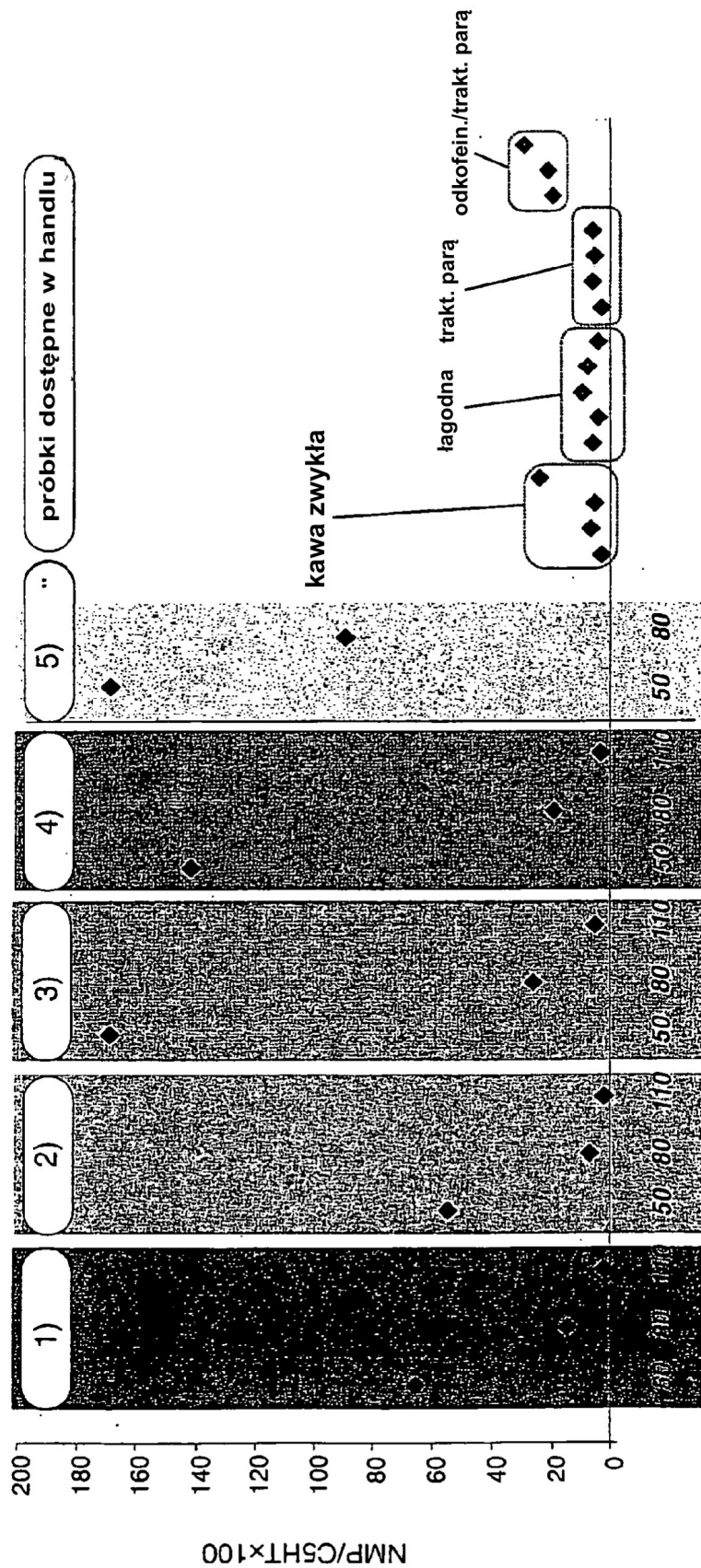


Figura 16

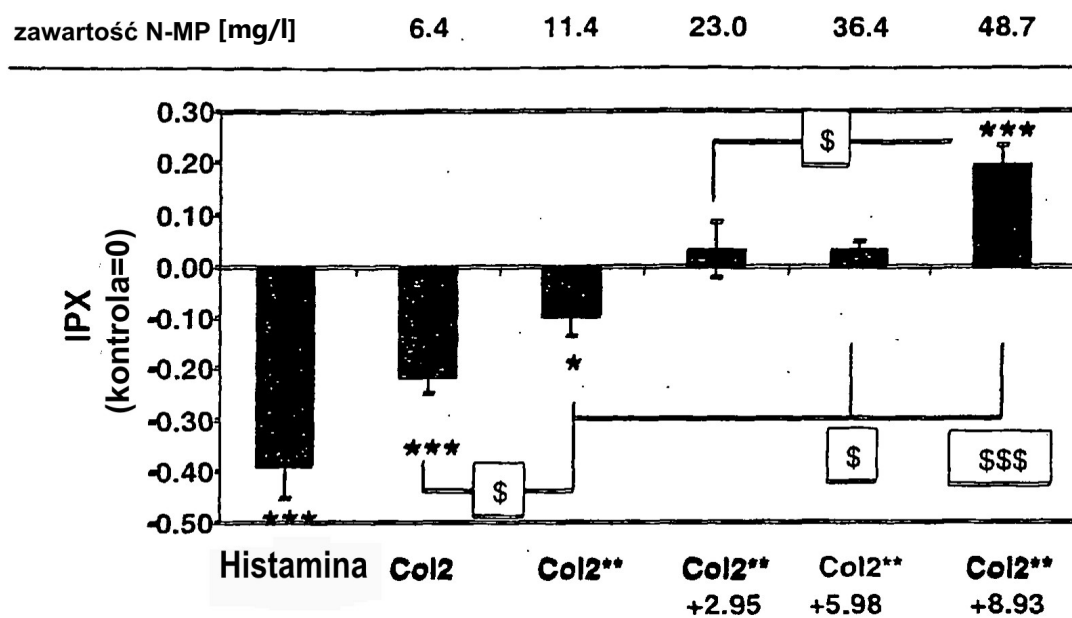


Figura 17

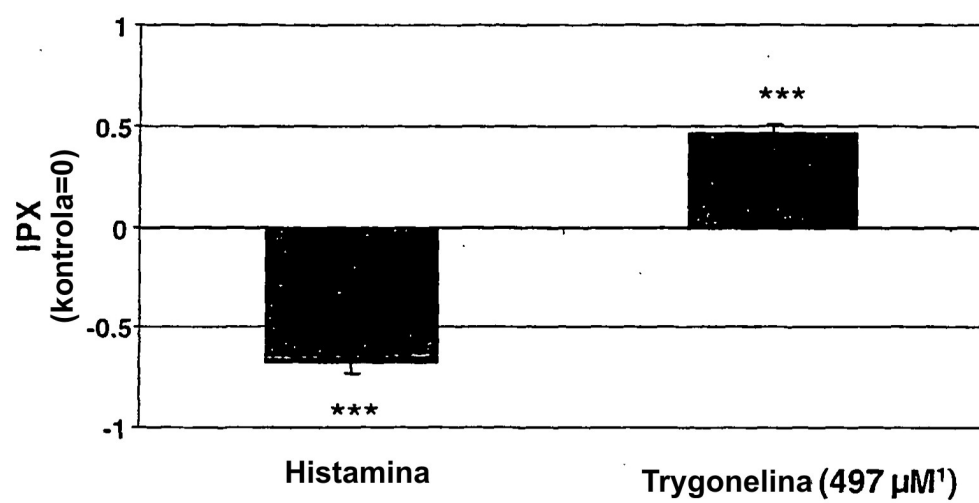


Figura 18

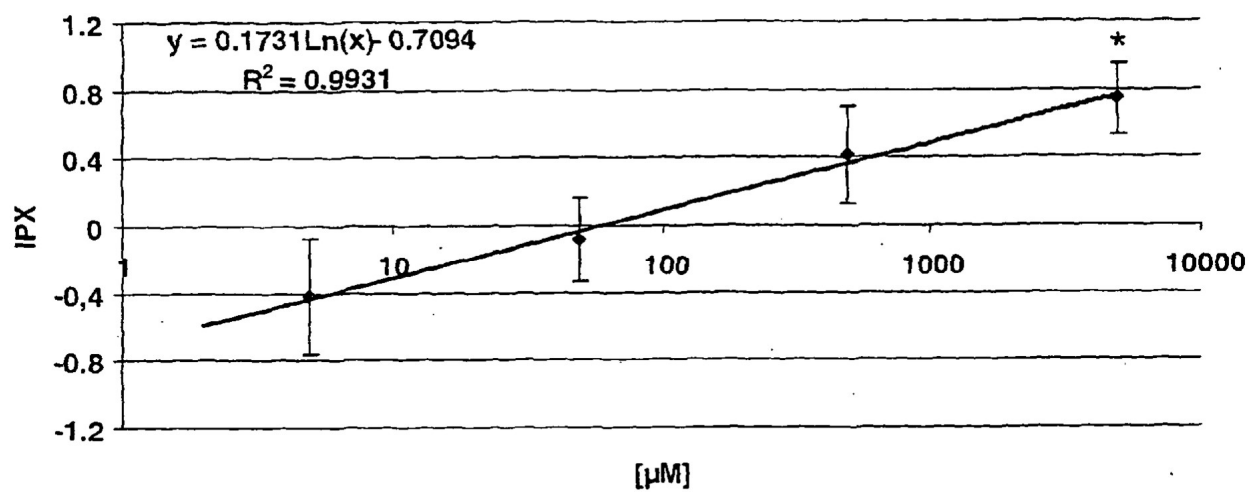


Figura 19

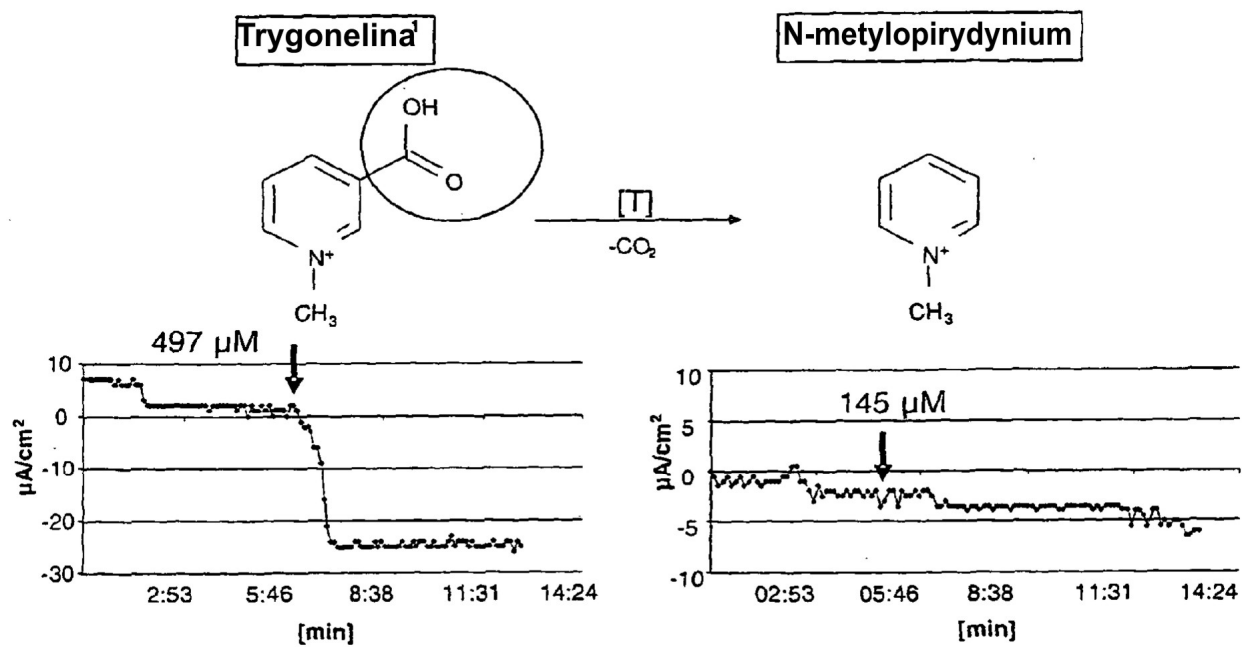


Figura 20

ODNOŚNIKI CYTOWANE W OPISIE

Listę cytowanych przez zgłaszającego odnośników zamieszczono jedynie dla wygody czytającego. Lista ta nie stanowi części dokumentu patentu europejskiego. Mimo że dołożono największej staranności przy jej zestawieniu, nie można wykluczyć błędów lub przeoczeń i EPO nie ponosi żadnej odpowiedzialności w tym względzie.

Literatura niepatentowa cytowana w opisie

- **EHRlich A ; BASSE H ; HENKEL-ERNST J ; HEY B ; MENTHE J ; LÜCKER PW.** Effect of differently processed coffee on the gastric activity difference and intragastric pH in healthy volunteers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2006, vol. 20, 155-161
[0004]