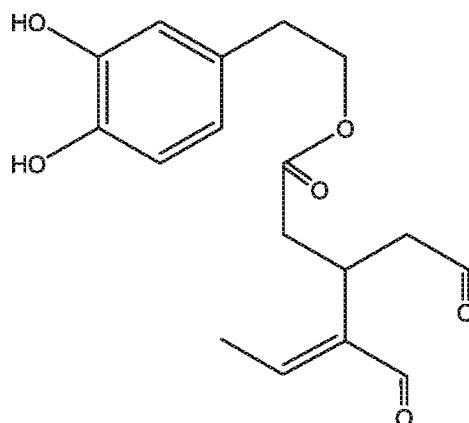


### Zastosowanie oleaceiny, zwłaszcza z *Ligustrum vulgare* L.

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie oleaceiny do wytwarzania preparatu do stabilizowania blaszki miażdżycowej. Preparat według wynalazku może być stosowany w szczególności w zapobieganiu i leczeniu chorób będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, zwłaszcza niedokrwienego udaru mózgu i zawału serca. Oleaceina jest związkami o wzorze 1, określanym w piśmiennictwie również jako 3,4-DHPEA-EDA, stanowiący 3,4-dihydroksyfenyloetanol (hydroksytyrozol) zestryfikowany dialdehydową pochodną kwasu enolowego.



wzór 1

Blaszka miażdżycowa jest zmianą występującą w ścianie tętnic (błona wewnętrzna) powstającą w przebiegu miażdżycy. Blaszka składa się z masy lipidowej (głównie LDL), komórek oraz włókniaka. Uwypukła się do światła naczynia i zmniejsza jego średnicę. Może to powodować niedokrwienie narządów zaopatrywanych przez daną tętnicę.

Niekontrolowany rozpad blaszki miażdżycowej gromadzącej się wraz z postępowaniem miażdżycy w tętnicach, głównie w aorcie, tętnicach wieńcowych i mózgowych, rzadziej w tętnicach kończyn, może być bezpośrednią przyczyną poważnych następstw, takich jak niedokrwieny udar mózgu lub zawał serca. Blaszka miażdżycowa może pękać, aktywując osoczowe czynniki krzepnięcia, co z kolei prowadzi do wytworzenia skrzepu.

Może to zmniejszyć przepustowość naczyń, a w skrajnym przypadku spowodować całkowite zamknięcie światła tętnicy. W ten sposób dochodzi najczęściej do zamknięcia tętnicy wieńcowej i w konsekwencji zawału serca. W podobny sposób, zamknięcia tętnicy mózgowej, w następstwie rozpadu blaszki miażdżycowej, prowadzi do niedokrwiennego udaru mózgu. W podobny sposób może dojść do niedokrwiennych chorób kończyn.

Blaszka miażdżycowa uszkadza również głębsze warstwy ściany tętnicy, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju tętniaków.

Dlatego u pacjentów cierpiących na miażdżycę pożądane jest stabilizowanie blaszki miażdżycowej. Pożądane jest również stabilizowanie uszkodzonej blaszki miażdżycowej w celu obniżenia szybkości jej rozpadu, a w następstwie złagodzenie przebiegu zawału serca lub udaru mózgu.

Przyjmuje się, że kluczową rolę w rozpadzie blaszki miażdżycowej odgrywają zewnątrzkomórkowe metaloproteiny uwalniane przez makrofagi. Wśród nich, metaloproteinaza 9 (MMP 9) odpowiada za degradację żelatyny, kolagenu typu IV i V, co prowadzi do osłabienia osłony włóknistej blaszki miażdżycowej i przyczynia się do jej rozpadu (Fatar M, Stroick M, Griebel M, Hennerici M. Matrixmetalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:141-51).

Celem wynalazku jest dostarczenie preparatu, który mógłby być wykorzystany do stabilizacji blaszki miażdżycowej poprzez skuteczne hamowanie procesu jej rozpadu następującego z udziałem metaloproteiny-9. Preparat taki mógłby być wykorzystany do leczenia i zapobiegania chorobom powstającym w wyniku rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności zawału serca, choroby niedokrwiennej serca, niedokrwiennego udaru mózgu oraz niedokrwienia kończyn.

Nieoczekiwanie tak określony cel udało się zrealizować w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie oleaceiny do wytwarzania preparatu do leczenia i zapobiegania chorobom będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności wybranych z grupy obejmującej: niedokrwienny udar mózgu, zawał serca oraz chorobę niedokrwinną serca.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie oleaceiny do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej.

Korzystnie, wytwarzany preparat stosuje się do stabilizowania blaszki miażdżycowej.

Korzystnie, oleaceinę uzyskuje się z *Ligustrum vulgare* L.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie *Ligustrum vulgare* L. do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę do stabilizowania blaszki miażdżycowej, zwłaszcza do leczenia i zapobiegania chorobom będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności wybranych z grupy obejmującej: niedokrwienny udar mózgu, zawał serca oraz chorobę niedokrwienną serca.

Przykład. 1. Uzyskiwanie oleaceiny z liści ligustra pospolitego (*Ligustrum vulgare* L.)

Ligustr pospolity (*Ligustrum vulgare* L.) jest rośliną ozdobną powszechnie występującą w Europie, wykorzystywaną często do sadzenia żywopłotów. Izolacji oleaceiny zawartej w liściach ligustra pospolitego dokonano sposobem uzyskanym poprzez zmodyfikowanie metody opracowanej przez Kiss i wsp. (Journal of Ethnopharmacology 120 (2008) 220–225) w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do izolacji użyto 400g rozdrobnionego surowca. W pierwszym etapie liście ligustra czterokrotnie ekstrahowano wodą destylowaną w temperaturze 30°C w płuczce ultradźwiękowej każdorazowo przez 30 minut. Ekstrakcje przeprowadzono w stosunku 1:10 surowca do rozpuszczalnika. Wyciągi wodne przesączono przez watę i połączono. Uzyskany wyciąg wodny zatężono na drodze liofilizacji do objętości ok. 1l. W celu uzyskania mniej zanieczyszczonego wyciągu oraz zwiększenia wydajności procesu izolacji pożądanego związku użyto eteru dietylowego zamiast octanu etylu. Wcześniejsze analizy wykazały bowiem, że wyciąg octanu etylu zawiera więcej związków chemicznych, co tym samym utrudnia proces izolacji oleaceiny. W związku z tym zagęszczony wyciąg wodny poddano następnie 5-krotnej ekstrakcji eterem dietylowym w stosunku 1:1 rozpuszczalnika do ekstraktu. Wyciąg eterowy zagęszczono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C. Uzyskano ok. 5g wyciągu eterowego. Kolejna modyfikacja polegała na użyciu aparatury oraz rozpuszczalników w układzie izokratycznym. Wg publikacji Kiss i wsp. (2008) oczyszczanie wyciągu octanu etylu polegało na zastosowaniu kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym (0.125–0.25mm; 5.5cm×10 cm) przy użyciu gradientu rozpuszczalników chloroform- octan etylu (100-0%) oraz octan etylu-metanol (100-0%). W zmodyfikowanej metodzie wyciąg eterowy poddawano rozdziałowi przy użyciu chromatografii typu Flash na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny chloroformu i octanu etylu (85:15) w układzie izokratycznym przez 60 minut (20 ml/min). Uzyskano 9 frakcji, z których do dalszego rozdziału wybrano frakcje 3 i 4.

Frakcje te poddano dalszemu rozdziałowi na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny toluenu, octanu metylu i metanolu (84:11:5) w układzie izokratycznym przez 60 minut (20 ml/min). Uzyskano 5 frakcji. Z frakcji 3 naniesionej na kolumnę wypełnioną sephadexem wyizolowano oleaceinę przy użyciu mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1), podobnie jak w pierwotnej metodzie. Uzyskano 1,289g związku. Tożsamość związku potwierdzono metodami NMR (patrz fig. 1) oraz HPLC-DAD-MS/MS (patrz fig. 2).

<b>Etap izolacji</b>	<b>Metoda pierwotna</b>	<b>Metoda zmodyfikowana</b>
I ekstrakcja	4xwoda; łaznia ultradźwiękowa; 30 min	4xwoda; łaznia ultradźwiękowa; 30 min
II ekstrakcja	5x octan etylu (1:1)	5x eter dietylowy (1:1)
I rozdział	Żel krzemionkowy; kolumna szklana (0.125–0.25mm; 5.5cm×10 cm); gradient chloroform-octan etylu (100-0%) i octan etylu-metanol (100-0%)	Żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
II rozdział		Żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
doczyszczanie	Sephadex; kolumna szklana (2×25 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)	Sephadex; kolumna szklana (2×45 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)

Przykład 2. Stabilizacja blaszki miażdżycowej izolowanej z tętnicy szyjnej.

Blaszki miażdżycowe (n=15) były uzyskiwane od pacjentów poddawanych zabiegowi wycięcia błony wewnętrznej tętnicy szyjnej (endarterektomia). Uzyskane blaszki dzielono na dwie części, które inkubowano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (kontrola) lub w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej w obecności oleaceiny w stężeniach 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$  przez 24 godziny w temperaturze 37°C po uprzedniej stymulacji roztworem lipopolisacharydu o stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$ . Kontrolę niestymulowaną stanowił roztwór soli

fizjologicznej, w której blaszkę inkubowano 2 godziny. Wpływ oleaceiny na produkcję metaloproteinazy-9 (MMP-9) został określony przy użyciu metody immunochemicznej ELISA (R&D System). Ilość MMP-9 (ng/ml) przeliczano na masę blaszki miażdżycowej, a następnie określono w % w porównaniu do kontroli stymulowanej. Wartość  $IC_{50}$ , czyli stężenie związku, przy którym reakcja zostaje zahamowana w 50%, określono na poziomie  $9.07 \pm 1.2 \mu M$  (średnia  $\pm$  błąd standardowy).

Zaprezentowany na fig. 3 wykres przedstawia zależność produkcja MMP-9 [%] od stężenia oleaceiny (5,10,20  $\mu M$ ).

Wyniki eksperymentu wykazują na zdolność oleaceiny do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej. Obniżenie produkcji MMP-9 stabilizuje blaszkę miażdżycową i hamuje jej rozpad. W związku z uzyskanym efektem oleaceina nadaje się do stosowania w leczeniu i profilaktyce chorób będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności