

Zastosowanie preparatu fosfolipidowego z żółtka jaj

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie preparatu fosfolipidowego z żółtka jaj – super lecytyny, ujawnionego w opisie patentowym P.399338.

Reakcje utleniania i redukcji odgrywają niezwykle istotną rolę w regulacji procesów takich jak reakcje enzymatyczne, procesy metaboliczne oraz sygnalizacja międzykomórkowa. Obecność utleniaczy i biologicznych reduktorów w systemach wewnątrzkomórkowych jest niezbędna do zachowania nie tylko równowagi oksydoredukcyjnej, ale również zapewnienia prawidłowego funkcjonowania komórki. Zaburzenie tej równowagi z przewagą występowania czynników silnie utleniających powoduje tzw. stres oksydacyjny. Efektem stresu oksydacyjnego jest narażenie komórek na działanie reaktywnych form tlenu (ROS; *reactive oxygen species*) (Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1995).

Liczne badania kliniczne i doświadczalne nad stresem oksydacyjnym dowodzą, że nadprodukcja ROS towarzyszy wielu zmianom patologicznym takim jak nadciśnienie tętnicze, miażdżycy, choroba wieńcowa, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, cukrzyca typu II oraz choroby nowotworowe. Szacuje się, że stres oksydacyjny jest nieodłącznym elementem ponad stu chorób (Kołodziejczyk J. 3-nitrotyrozyna - marker stresu oksydacyjnego in vitro i in vivo; Diagnostyka Laboratoryjna 2010; 46(2):141-145). Stres oksydacyjny w komórkach powoduje między innymi zaburzenie organizacji cytoszkieletu, zahamowanie syntezy NAD⁺, NADP⁺, uszkodzenie DNA, peroksydację lipidów oraz zaburzenie funkcji fizjologicznej niektórych białek, w tym upośledzenie zdolności katalitycznej enzymów lub ich inaktywację. Peroksydacja tłuszczu w ścianach naczyń przyczynia się do zmiany

morfologii błon, które stają się sztywne, przepuszczalne dla jonów oraz bardziej wrażliwe na uszkodzenia (Karasek M., Lewiński A., Reiter R.J. Melatonina: znaczenie kliniczne i zastosowanie terapeutyczne. *Endokrynologia Polska*. 2001; 52:81-100). Aktywne rodniki w układzie krążenia upośledzają funkcję śródbłonna, wzmagają stan zapalny, zaburzają hemostazę, wpływają na aktywność enzymów, zaburzają równowagę między procesami prokoagulacyjnymi oraz antykoagulacyjnymi.

Stres oksydacyjny odgrywa bardzo ważną rolę w chorobach układu krążenia. Podstawowym mechanizmem w patologii nadciśnienia tętniczego oraz zaburzenia funkcji śródbłonna przez ROS jest ograniczenie biodostępności tlenku azotu (NO) jednego z najważniejszych czynników naczynio-rozkurczających. NO z udziałem ROS przekształcany jest do anionu nadtlenuazotynowego (ONOO⁻), wykazującego działanie naczyniokurczące i prozakrzepowe (Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: 822-827). Równie istotne w patologii wielu chorób w tym chorób układu krążenia jest nitrowanie reszt tyrozynowych w łańcuchu polipeptydowym białek. Nitrowanie tyrozyny powoduje zmianę struktury białka, czego konsekwencją jest upośledzenie lub utrata funkcji fizjologicznej peptydu. Proces nitrowania tyrozyny związany jest ze wzrostem stężenia nadtlenuazotynów (ONOO⁻), w obecności których reszty tyrozyny przyjmują postać rodnika tyrozyłowego, który reagując z dwutlenkiem azotu (NO₂⁻) tworzy 3-nitrotyrozynę. Rodnik tyrozyłowy może również ulec dimeryzacji tworząc 3,3'-dwutyrozynę, czego konsekwencją jest powstanie wiązań krzyżowych modyfikujących strukturę białek. Nitrotyrozynę powszechnie uznaje się za marker zmian zachodzących w wyniku działania reaktywnych form tlenu (Bian K., Ke Y., Kamisaki Y., Murad F. Proteomic Modification by Nitric Oxide. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 101:271-279; Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2004;

101(12):4003-4008; Kołodziejczyk J. 3-nitrotyrozyna - marker stresu oksydacyjnego in vitro i in vivo; *Diagnostyka Laboratoryjna* 2010; 46(2):141-145).

Istotną rolę w redukcji stresu oksydacyjnego odgrywają tzw. antyoksydanty - czynniki, które w wyniku reakcji z ROS neutralizują je całkowicie lub częściowo (do formy mniej reaktywnej). W ostatnich latach podkreśla się znaczenie produktów o charakterze przeciwutleniającym w diecie. Dieta bogata w antyoksydanty może znaleźć zastosowanie zarówno w profilaktyce wielu chorób, jak również stanowić uzupełnienie standardowych terapii medycznych. Naturalnymi przeciwutleniaczami zawartymi w wielu produktach spożywczych są witaminy (A, B, C, D, E), selen, polifenole oraz fosfolipidy, w tym wielonienasycone kwasy tłuszczowe PUFA (polyunsaturated fatty acids) (Myung Seung-Kwon. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2013; 18:346). Jednak PUFA przypisuje się także niekorzystny udział w peroksydacji lipidów w patologii stresu oksydacyjnego. Związane jest to z obecnością nienasyconych wiązań podwójnych między atomami węgla w łańcuchach fosfolipidów, które z chemicznego punktu widzenia są reaktywne i łatwo ulegają reakcji z ROS, tworząc niestabilne, rodnikowe formy lipidowe. Efekt ten jest niezwykle znamieny dla centralnego układu nerwowego, którego budowa opiera się głównie na DHA (kwas dokozaheksaenowy) (Nowak J.Z. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65(2):288-304). Z kolei inne doniesienia wskazują na korzystną rolę PUFA z grupy omega-3 w redukcji stresu oksydacyjnego (Mori T.A., Puddey I.B., Burke V., Croft K.D., Dunstan D.W., Rivera J.H., Beilin L.J. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep.* 2000; 5(1):45-46; Mori T.A., Woodman

R.J., Burke V., Puddey I.B., Croft K.D., Beilin L.J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35(7):772-781). Badania na gryzoniach dowodzą, że PUFA pochodzące z ryb wpływają na wzrost aktywności takich enzymów antyoksydacyjnych jak: katalaza (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz peroksydaza glutationowa (GPX). Można zatem przypuszczać, że przeciwutleniające działanie PUFA jest związane z regulacją aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Jahangiri A., Leifert W.R., Kind K.L., McMurchie E.J. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40(9):1592-15602; Rahman M., Halade G.V., Bhattacharya A., Fernandes G. The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR-gamma and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2009; 2(5):307-316; Chandrasekar B., Fernandes G. Decreased pro-inflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by ω -3 lipids in murine lupus nephritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 200:893-898; Venkatraman J.T., Chandrasekar B., Kim J.D. Fernandes, G. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression of hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone NZB \times NZW F1 mice. *Lipids.* 1994; 29:561-568).

Wiadomo również, że DHA (kwas dokozaheksaenowy) i EPA (kwas eikozapentaenowy) redukuje stres oksydacyjny przez zahamowanie ekspresji oksydazy NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) – enzymu odpowiedzialnego za produkcję ROS (Depner C.M., Philbrick K.A., Jump D.B. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* 2013; 143(3):315-323; Massaro M., Habib A., Lubrano L., Del Turco S., Lazzarini G., Bourcier T., Weksler

B.B., De Caterina R. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(41):15184-15189). U szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem - SHR - dieta wzbogacona w polifenole (przez dodanie 1% fasoli azuki - czerwona soja) obniża poziom stresu oksydacyjnego w aorcie (Mukai Y., Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. J. Nutr. Biochem. 2011; 22(1):16-21). Znane jest również działanie antyoksydacyjne fosfatydylocholiny w przebiegu nadciśnienia (Eshiginia S., Gapparov M.M., Soto Kh. Influence of phospholipids on efficiency of dietary therapy and parameters of lipids metabolism in patients with hypertension]. Vopr. Pitan. 2005;74(5):28-31)

Istotą wynalazku jest zastosowanie preparatu fosfolipidowego otrzymanego sposobem ujawnionym w opisie wynalazku zgłoszonego do UPRP i zarejestrowanego pod numerem P.399338, zwanego super lecytyną, do wytwarzania leku lub jako substancja czynna leku o działaniu przeciwutleniającym, do stosowania przy leczeniu chorób i/lub wspomagająco w terapii chorób o podłożu zapalnym, zwłaszcza chorób nowotworowych (ICD10: C.00.0 do D.48), otyłości (ICD10: E.66.0), cukrzycy (ICD10 E.10.0 do E.14.9), nadciśnienia tętniczego (ICD10 I.10 do I.13.2), miażdżycy (ICD10 I.70.9).

Istotą wynalazku jest także zastosowanie tego preparatu jako środek farmaceutyczny, suplement diety, dodatek żywieniowy lub jako składnik preparatów złożonych, do stosowania przeciw wolnym rodnikom lub jako przeciwutleniacz.

Przedstawione poniżej wyniki wskazują na wyraźne działanie przeciwutleniające preparatu fosfolipidowego z jaj kurzych, przejawiające się obniżeniem poziomu nitrotyrozyny w surowicy krwi badanych zwierząt. Działanie antyoksydacyjne badanego preparatu jest niezależne od efektu

hipotensyjnego, bowiem obniżenie poziomu nitrotyrozyny obserwowane jest zarówno u szczurów z nadciśnieniem (SHR- Spontaneously Hypertensive Rats), jak i zdrowych (WKY - Wistar Kyoto Rats).

Przykład. W doświadczeniu wykorzystano siedmiotygodniowe samce szczurów z nadciśnieniem SHR/NCrl (*Spontaneously Hypertensive Rats*; Charles River), oraz samce zdrowych szczurów WKY/NCrl (Wistar Kyoto Rats; szczep referencyjny dla SHR). Na realizację badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej we Wrocławiu w dniu 15.12.2010 r., numer 61/2010. W doświadczeniu użyto paszę ubogą w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (Labofeed B uboga w PUFA, Kcynia, Polska), wykluczając tym samym wpływ PUFA pochodzących z paszy. Dostęp szczurów do paszy i wody był nieograniczony. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: dwie doświadczalne i dwie kontrolne.

Grupy doświadczalne (LP) stanowiły:

- grupa SHR otrzymująca preparat fosfolipidowy z żółtek jaj, zwany super lecytiną, opisany w zgłoszeniu patentowym P.399338, razem z paszą ubogą (SHR/LP; $n_1=15$),
- grupa WKY otrzymująca tenże preparat razem z paszą ubogą (WKY/LP; $n_2=11$).

Grupy kontrolne (K) stanowiły:

- grupa SHR otrzymująca tylko paszę ubogą w PUFA (SHR/K; $n_3=15$),
- grupa WKY otrzymująca tylko paszę ubogą w PUFA (WKY/K; $n_4=11$),

przy czym n_i to liczba osobników w danej grupie.

Średnie dzienne spożycie preparatu w grupach doświadczalnych wynosiło 1,5 g/osobnika. Tym samym dieta grup wzbogaconych preparatem fosfolipidowym z jaj zawierała 5% fosfatydylocholiny; 0,65% kwasów omega-3 oraz 0,95% omega-6. W Tabeli 1 przedstawiono skład preparatu.

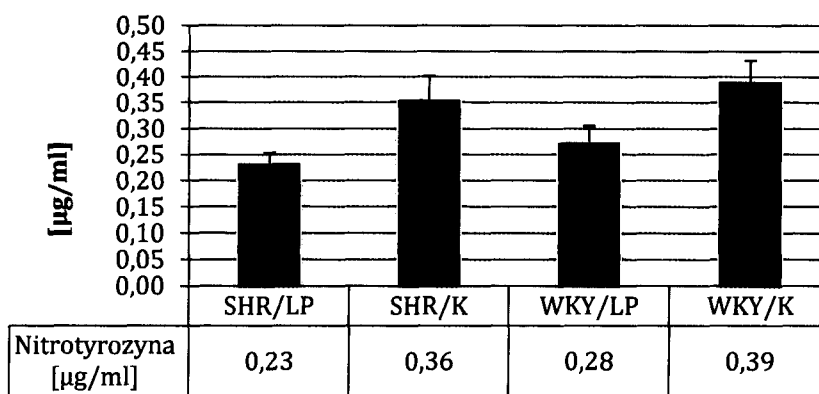
Tabela 1. Procentowy skład kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidowej z żółtka jaja kurzego.

Frakcja	[%]
Czystość jako substancja nierozpuszczalna w acetonie	73,00
Fosfatydylocholina [PC]	81,72
Fosfatydyloetanolamina [PE]	18,27
Profil kwasów tłuszczowych	
C14:00	0,40
C14:01	0,16
C16:00	26,36
C16:01	2,52
C17:00	0,24
C18:00	14,05
C18:01	29,66
C18:02	13,08
C18:03	3,12
C20:02	0,18
C20:03	0,12
C20:04	2,41
C20:05	0,58
C22:06	7,12
ω-3	10,82
ω-6	15,79
ω6/ω3	1,46
Nasycone	41,05
Nienasycone	58,95
MUFA	32,34
PUFA	26,61

Fosfolipidy z jaj podawano przez dwanaście tygodni, po tym czasie wykonano badanie sekcyjne i zabezpieczono materiał do dalszych badań. W surowicy krwi oznaczono poziom nitrotyrozyny przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA (zestaw Nitrotyrosine ELISA; nr 17-376, Merck, MA, USA). Analizę wykonano zgodnie z instrukcją dołączonymi do zestawu. Wyniki dla wszystkich grup szczurów SHR i WKY podsumowano w tabeli 2 oraz na wykresie 1.

Tabela 2. Poziom nitrotyrozyny [$\mu\text{g/ml}$] w surowicy krwi dla każdego osobnika z grup: SHR/K, SHR/LP oraz wartości średnie i odchylenie standardowe dla każdej grup

i.p.	Nitrotyrozyna [$\mu\text{g/ml}$]			
	SHR/LP	SHR/K	WKY/LP	WKY/K
1	0,33	0,77	0,19	0,29
2	0,31	0,71	0,20	0,42
3	0,31	0,42	0,20	0,50
4	0,30	0,39	0,20	0,21
5	0,29	0,39	0,21	0,61
6	0,29	0,37	0,22	0,45
7	0,28	0,35	0,23	0,16
8	0,23	0,34	0,34	0,30
9	0,23	0,26	0,36	0,46
10	0,22	0,26	0,40	0,49
11	0,20	0,24	0,47	0,41
12	0,17	0,23	---	---
13	0,13	0,23	---	---
14	0,11	0,22	---	---
15	0,11	0,16	---	---
Średnia	0,23	0,36	0,28	0,39
SEM	0,02	0,04	0,03	0,04



Wykres 1. Średnie stężenie nitrotyrozyny [$\mu\text{g/ml}$] w surowicy krwi szczurów SHR oraz WKY z grup kontrolnych (K) i doświadczalnych (LP).

Preparat fosfolipidowy z nowej generacji jaj wykazuje działanie antyoksydacyjne obniżając poziom nitrotyrozyny w surowicy krwi zarówno u szczurów z nadciśnieniem (SHR), jak i zdrowych (WKY). Poziom nitrotyrozyny w surowicy krwi grupy SHR otrzymującej preparat (SHR/LP) jest o 34% niższy niż w grupie SHR kontrolnej (SHR/K). U szczurów WKY natomiast, fosfolipidy z nowej generacji jaj, obniżają stężenie nitrotyrozyny o 30% w porównaniu do grupy kontrolnej (WKY/LP vs. WKY/K).

W grupach doświadczalnych (LP) obu badanych szczepów szczurów obserwuje się podobny procentowy spadek poziomu badanego markera stresu oksydacyjnego (nitrotyrozyny) w surowicy krwi (Test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$).

Powyższe wyniki dowodzą, że preparat fosfolipidowy, pochodzący od kur projektowanych a ujawniony w opisie patentowym P.399338, obniża poziom stresu oksydacyjnego. Działanie przeciwutleniające powszechnie uznaje się za korzystne w prewencji oraz terapii wielu chorób. Biorąc pod uwagę stan techniki można przypuszczać, że potencjał antyoksydacyjny preparatu może być związany z obecnością fosfatydylocholiny oraz PUFA z grupy omega-3 (w tym DHA i EPA). Nie można ponadto wykluczyć wpływu innych składników preparatu takich jak niska wartość proporcji kwasów omega-6 do omega-3. Z pewnością korzystny wpływ preparatu fosfolipidowego w patologii stresu oksydacyjnego warunkuje jego złożoność i każdy z elementów składowych może odgrywać częściową rolę w ogólnym efekcie przeciwutleniającym.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław

RZECZNIK PATENTOWY

dr inż. Anna Olszewska
Nr upr. 3330