

(19)



(10)

LT 4305 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4305**

(51) Int. Cl.⁶: **C07J 9/00**
A61K 31/575

(21) Paraiškos numeris: **97-074**

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 04 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 10 27**

(45) Patent paskelbimo data: **1998 03 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CA95/00555**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 09 29**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 04 23**

(31, 32, 33) Prioritetas: **314945, 1994 09 29, US**

(72) Išradėjas:

Egon Novak, CA
James P. Kutney, CA
Peter J. Jones, CA

(73) Patent savininkas:

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, University-Industry Liaison
Office, IRC 331-2194 Health Sciences Mall, Vancouver, British Columbia
V6T 1Z3, CA

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Sterolių kompozicijos iš pulpos muilo

(57) Referatas:

Fitosterolių kompozicijų iš pulpos muilo gavimo būdas apima riebalingų nuosėdų išekstrahavimą iš pulpos muilo ir šių nuosėdų išvalymą, sudarant kompozicijas.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su sterolių kompozicijų iš pulpos muilo gavimu ir išgryninimu, su pačiomis kompozicijomis ir su šių kompozicijų bei jų darinių, kaip agentų, skirtų pirminės arba antrinės dislipidemijos profilaktikai bei gydymui, panaudojimu.

Išradimo kilmė

Tiesioginė širdies priepuolio ir anginos priežastis yra degeneracinis procesas, žinomas kaip aterosklerozė. Aterosklerozė atsiranda dėl daugelio susisumavusių paveldėtų (genetinių) ir aplinkos faktorių. Šių faktorių, iš kurių, kaip pasirodo, mūsų civilizacijoje svarbiausias yra maistas, sąveika sukelia aterosklerozės atsiradimą. Cholesterolio užpildytų aterosklerotinių plokštelių augimas pagaliau sulaukia kraujo padavimą širdies raumeniui arba, kitu atveju, smegenims arba kojoms, priklausomai nuo plokštelių padėties arterijų tinkle.

Vienas iš pagrindinių aterosklerozės rizikos faktorių, kurį potencialiai galima keisti, yra cholesterolio kiekis kraujyje. Daugybė gerai dokumentuotų tyrimų parodė, kad cholesterolio kiekis kraujyje iš tiesų yra svarbus širdies priepuolio, o taip pat ir paralyžiaus rizikos prognozuotojys. Ryšys tarp cholesterolio koncentracijos kraujyje ir šių sutrikimų rizikos yra tolygiai (apima visus cholesterolio kiekius) einantis (kuo didesnis kiekis, tuo didesnė susirgimo rizika) ir neturi aiškaus slenksčio (mažinant net ir taip vadinamus mažus kiekius, galima toliau mažinti susirgimo riziką). Pavyzdžiui, 40 metų amžiaus žmonėms 7,0 mmol/l cholesterolio koncentracija kraujyje rodo 3-4 kartus didesnę koronarinių arterijų ligos riziką, nei mažesnė už 5,0 mmol/l cholesterolio koncentracija. Toks ryšys tampa ypatingai staigus, kai kiekiai yra didesni už 5,2 mmol/l. Pavyzdžiui, mirtingumas tarp vyrų su 8,0 mmol/l cholesterolio kiekiais yra beveik šešis kartus didesnis, nei tarp vyrų su 4,0 mmol/l kiekiais. Šie vėlyvesnieji duomenys sutampa su ankstesniaisiais tyrimais.

Kiti platūs klinikiniai tyrimai aiškiai parodė, kad mažinant cholesterolio kiekius, galima sumažinti fatalinio ir nefatalinio miokardo infarkto riziką, angina, pokyčius elektrokardiogramose ir koronarinėje arterijoje, apeinant chirurgiją. Geriausiai žinomas ir pirmasis iš šių bandymų buvo atliktas Lipids Research klinikoje, kurioje koronarinės pirminės profilaktikos bandymai (Coronary Primary Prevention Trials) parodė, kad sumažinus bendrą cholesterolio kiekį kraujyje 1 %, koronarinių arterijų ligos rizika sumažėja 2 %.

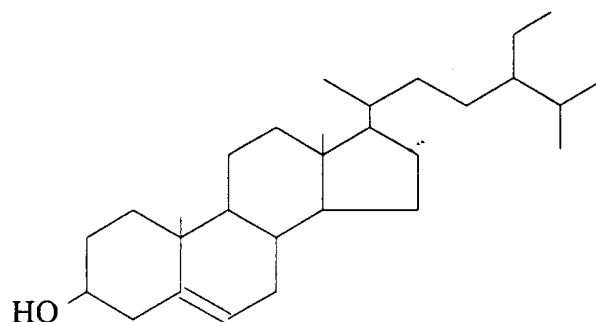
Kad ilgalaikė profilaktinė hipercholesterolemijos terapija būtų vaisinga, reikia ją pradėti palyginus ankstyvame amžiuje ir tęsti neapibrėžtą laiką. Nors mažai riebalų turintis maistas yra kertinis tokios ilgalaikės terapijos akmuo, po 6 mėnesių net iki 60 % pacientų nesutinka su tokia terapija. Šis nesutikimas pastebėtas daugelyje Vakarų šalių, kuriose įprastas maistas yra turtingas riebalais. Daugumos pacientų blogą cholesterolio vaizdą dar paastrina papildomų širdies-kraujagyslių ligų rizikos faktorių įsigalėjimas, tokių kaip aukštas kraujo spaudimas, diabetas, nutukimas ir rūkymas.

Maisto keitimas, kaip aterosklerozės ir kitų širdies-kraujagyslių ligų terapija, labai išstobulėjo per pastaruosius 10-15 metų. Konkrečiau, tyrinėtojai pripažino, kad augalų steroliai (fitosteroliai) efektyviai mažina cholesterolio kiekį plazmoje: Lees et al., *Atherosclerosis*, 28 (1977) 325-338; Kudehodkar et al., *Atherosclerosis*, 23 (1976) 239; Day, *Artery*, 18(3): 125-132 (1991).

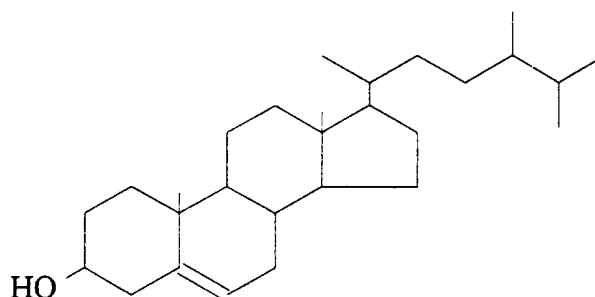
Fitosteroliai yra panašūs į sterolius junginiai, sintezuojami augaluose, ir žmonėms neturi maistinės vertės. Augaluose jie reikalingi ląstelių funkcionavimui, panašiai kaip cholesterolio reikia žmonėms. Vidutinėje Western'o dietoje yra iki 360 mg fitosterolių per dieną. Dabartiniu metu šie augalų steroliai susilaukė didelio dėmesio dėl jų priešvėžinių savybių ir jų sugebėjimo sumažinti cholesterolio kiekį, jeigu jais maitinamos įvairios žinduolių rūšys, įskaitant žmones.

Pagal cheminę struktūrą fitosteroliai yra labai panašūs į cholesterolį. Pagrindiniai fitosteroliai yra beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmasterolis. Iš kitų paminėtini stigmasterolis (beta-sitostanolis), sitostanolis, desmosterolis,

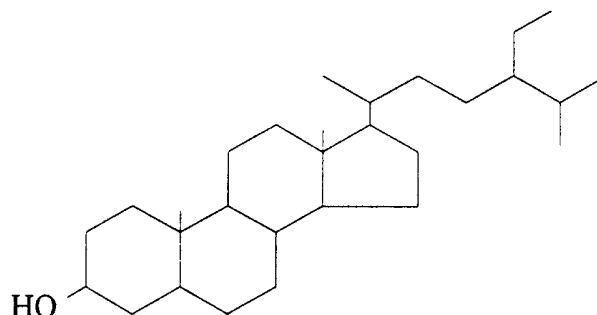
chalinasterolis, poriferasterolis, klionasterolis ir brasikasterolis. Beta-sitosterolio, kampesterolio ir stigmasterolio cheminės formulės yra:



beta-sitosterolis



kampesterolis



stigmasterolis

Mechanizmas, pagal kurį fitosteroliai mažina cholesterolio kiekį gyvūnų plazmoje, yra nežinomas, bet atrodo, kad į jį įeina cholesterolio absorbavimo iš proksimalios tuščiosios žarnos inhibicija, konkuruojant fitosteroliams su cholesteroliu specifinėse įsisavinimo vietose. Tyrimo duomenys taip pat leidžia manyti, kad kai kurie fitosteroliai iš viso nėra absorbuojami proksimaliojoje

tuščiojoje žarnoje (sitostanolis), o tuo atveju, kai vyksta absorbuojimas (beta-sitosterolis), absorbuojami labai riboti kiekiai.

Remiantis šiais tyrimų duomenimis, fitosterolių, kaip dietos priedo, panaudojimas cholesterolio absorbuojimui sumažinti buvo plačiai tyrinėtas. Lees et al., *supra*; Pollak, *Pharmac, Ther.*, 31 (1985) 177-208; Raicht et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 388 (1975) 374-384.

Lees et al., *supra* palygino iš dviejų šaltinių gautų sitosterolio preparatų poveikius į cholesterolio kiekį: sojos sterolius ir talo alyvos sterolius. Buvo rasta, kad augalų sterolio preparatai yra efektyvūs, gydant pacientus, sergančius hipercholesterolemija. Pollak, *supra*, yra apžvalginis straipsnis apie fitosterolius ir jų poveikį į serumo lipidus. Raicht, *supra*, be to, aprašo beta-sitosterolio poveikį į sterolių pusiausvyrą ir sterolių metabolizmo greitį ribojančius fermentus.

Yra bendrai priimta, kad fitosteroliai duoda unikalią ilgalaikio nekenksmingumo, efektyvumo ir visapusiškumo kombinaciją žmonių gydyme. Tebesančios pretenzijos fitosteroliams yra jų išskyrimas iš augalinių šaltinių ir nustatymas papildomų šaltinių, kurie yra nebrangūs, prieinami dideliu mastu ir kurie turi hipocholestereminius efektus, ir jų išvalymas.

Tradiciškai fitosteroliai buvo išskiriami iš šaltinių, tokių kaip kukurūzų aliejus, kviečių daigų aliejus, sojos pupelių pikis ir kukurūzų aliejaus pikis. Panašiu būdu, talo alyvos pikis, kuri gaunama popieriaus gamybos iš medžio, ypatingai iš pušų, procese, buvo naudojama kaip fitosterolių šaltinis. Paprastai šiame procese medžio drožlės yra skaldomos kaustikine soda, susidarant pulpai arba "muilui". Po to muilas distiliuojamas, norint pašalinti lakias medžiagas, ir, kaip liekana, lieka "pikis". Būtent iš šio pikio mokslininkai ir išskyrė fitosterolius.

Šie tradiciniai fitosterolių šaltiniai turi daug trūkumų. Talo alyvos pikis yra ypatingai sudėtinga medžiaga, kurioje yra dervų, riebalų rūgščių, oksidacijos produktų, esterintų medžiagų ir fitosterolių. Nors šis pikis yra nebrangus, nes jis yra įvairių gamybos procesų atliekos, labai sunku išgauti iš jo didelės molekulinės masės

sterolius geromis išeigomis ir didelio švarumo, kurio reikia farmaciniam jų panaudojimui.

US patente Nr.3840570 (Jullian) duodamas fitosterolių gavimo būdas iš talo alyvos pikio, ekstrahuojant vandens-alkoholio-angliavandenilio mišiniu, po to muilinant ir valant. Pradinė medžiaga šiame gavimo būde yra talo alyvos pikis, iš kurio išekstrahuojami fitosteroliai ir įvairios priemaišos. Pripažinta, kad bet kuriame talo alyvos pikio valymo procese yra ypatingai sunku atskirti ilgos grandinės alkoholių ir rūgščių priemaišas nuo sterolių (kurie patys yra didelės molekulinės masės alkoholiai).

Kiti tyrinėtojai taip pat nagrinėjo sterolių išskyrimą iš talo alyvos pikio: US patentas Nr. 2835682 (Steiner and Fritz); US patentas Nr. 2715638 (Albrecht and Herrlinger); US patentas Nr. 2573891 (Christenson). Svarbu pažymėti, kad visuose šiuose išskyrimo būduose pradinė medžiaga buvo talo alyvos pikis, ir juose išliko aukščiau aptartos išgavimo problemos.

Šio išradimo objektas yra sumažinti aukščiau minėtus trūkumus arba jų išvengti.

Išradimo santrauka

Šiame išradime siūlomas fitosterolių kompozicijų iš pulpos muilo gavimo ir išvalymo būdas, apimantis išekstrahavimą iš pulpos muilo riebalingų nuosėdų ir šių nuosėdų išvalymą, susidarant unikaliai fitosterolių kompozicijai. Konkrečiau imant, riebalingos nuosėdos išekstrahuojamos iš pulpos muilo, naudojant ekstrakcijos tirpikliais metodiką. Po to, gauta kompozicija išskiriama iš riebalingų nuosėdų kristalinimo būdu.

Šiame išradime taip pat pateikiamos unikalios kompozicijos, kurios tinka dislipidemijos profilaktikai ir gydymui, ir kuriose yra beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis. Čia pateikiamos fitosterolių kompozicijos labai skiriasi nuo kompozicijų, randamų augaluose, maiste ir aliejuose. Pasirodo, kad stigmastanolio įvedimas didina jų veiksmingumą. Šiose kompozicijose gali būti dar ir įvairių kartu išskiriamų junginių, kurie gali būti tiek fitosteroliai, tiek ir ne fitosteroliai. Atskiru

atveju, tokie junginiai gali būti triterpenai, ilgos grandinės alkoholiai ir kiti alkoholyje tirpūs organiniai junginiai.

Šiame išradime taip pat pateikiamas čia aprašytų kompozicijų panaudojimas pirminės ir antrinės dislipidemijos ir aterosklerozės, įskaitant žmonių ir gyvulių koronarinę širdies ligą, periferinių kraujagyslių ligą ir paralyžių, profilaktikai ir gydymui.

Unikalios šio išradimo kompozicijos parodė puikius rezultatus, mažinant bendrą (TC) ir mažo tankio lipoproteinų (LDL) cholesterolį kraujyje. Be to, gana netikėtai buvo rasta, kad šio išradimo kompozicijos įvairių gyvulių atveju palaiko arba padidina didelio tankio lipoproteinų (HDL) cholesterolio koncentraciją kraujyje. Ši šio išradimo ypatybė yra labai svarbi, turint galvoje tyrinėtojų nustatytą faktą, kad nepriklausomai nuo TC kiekių, kai HDL kiekiai plazmoje sumažėja, aterosklerozės rizika padidėja. Fitosteroliai, išskirti iš talo alyvos pikio, sojos pupelių ir kitų šaltinių, kiek žinoma šio išradimo autoriams, neturi tokio unikalaus HDL efekto.

Nors yra žinoma, kaip galima pagaminti tam tikro tipo fitosterolius iš pikio, distiliuojant medžio drožlių apdirbimo muilą, fitosterolių kompozicijos iš medžio drožlių apdirbimo proceso pulpos muilo komponento iki šiol nebuvo pagamintos. Talo alyvos pikio sudėtis labai skiriasi nuo pulpos muilo sudėties. Manoma, kad šio išradimo kompozicijų stebinantis poveikis yra, bent jau iš dalies, dėl pulpos muilo, kaip pradinės medžiagos, panaudojimo ir dėl unikalaus išskyrimo būdo.

Trumpas brėžinių aprašymas

Įvairūs išradimo aspektai bus iliustruojami toliau duodamais brėžiniais, kurie neapriboja išradimo apimties.

Fig.1 yra vienos šio išradimo kompozicijos (čia ir toliau Forbes-2) dujų chromatografijos atsako vaizdas.

Fig.2 yra fig.1 atsako atvaizdavimas, kai sulaikymo laikas yra nuo 35 iki 45 min.

Fig.3 yra fig.1 atsako atvaizdavimas, kai sulaikymo laikas yra nuo 22 iki 27 min.

Fig.4 yra fig.1 pavaizduoto dujų chromatografijos atsako rodyklė.

Fig.5 yra kitos šio išradimo kompozicijos (čia ir toliau Forbes-3) dujų chromatografijos atsako vaizdas.

Fig.6 yra fig.5 atsako atvaizdavimas, kai sulaikymo laikas yra nuo 32 iki 48 min.

Fig.7 yra fig.5 pavaizduoto dujų chromatografijos atsako rodyklė.

Fig.8 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-1 ir Forbes-2 įtaką į TC koncentracijas žiurkėse.

Fig.9 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-1 ir Forbes-2 įtaką į LDL-cholesterolio koncentracijas žiurkėse.

Fig.10 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-1 ir Forbes-2 įtaką į HDL-cholesterolio koncentracijas žiurkėse.

Fig.11 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-3 įtaką į TC koncentracijas žiurkėnų serume.

Fig.12 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-3 įtaką į LDL-cholesterolio koncentracijas žiurkėnų serume.

Fig.13 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti Forbes-3 įtaką į HDL-cholesterolio koncentracijas žiurkėnų serume.

Fig.14 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų-patinų ir žiurkėnų-patelių cholesterolio kiekius.

Fig.15 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų-patinų cholesterolio kiekius plazmoje.

Fig.16 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų-patelių cholesterolio kiekius plazmoje.

Fig.17 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų-patinų ir žiurkėnų-patelių trigliceridų kiekius plazmoje.

Fig.18 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų-patinų ir žiurkėnų-patelių HDL/apo-B santykius.

Fig.19 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų bendrą cholesterolio kiekį 45 tyrimo dieną.

Fig.20 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į cholesterolio koreliaciją su sitostanoliu.

Fig.21 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų HDL kiekius po daugiau nei 45 dienų.

Fig.22 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų Non-apoA/apoA santykius po daugiau nei 45 dienų.

Fig.23 yra stulpelinė diagrama, vaizduojanti poveikio įvairiomis dietomis efektus į žiurkėnų Non-apoA sterolius po daugiau nei 45 dienų.

Tinkamiausi išradimo įgyvendinimo variantai

Šio išradimo būdas susideda iš tokių stadijų:

(A) pradinės medžiagos - augalinės kilmės pulpos muilo - gavimas;

(B) riebalingų nuosėdų išekstrahavimas iš muilo, panaudojant tinkamą tirpiklį; ir

(C) fitosterolio kompozicijos išskyrimas iš riebalingų nuosėdų.

Yra daugybė galimų augalinės kilmės šaltinių pulpos muilui gauti. Bendrai imant, žinomame būde ("Krafto" būdas) muilui gauti medžio drožlės veikiamos kaustikine soda. Medžio drožlės gali būti gaunamos iš bet kokio kieto arba minkšto medžio, įskaitant (bet neapsiribojant) elgę, kedrą, pušį, melsvąją kanadinę eglę, ąžuolą, cūgą (nuokaną) ir tuopą. Geriausia drožles gauti iš bet kokių Šiaurės Vakarų Amerikos arba Europos miškų medžių.

Ekstrakcijos fazėje muilas sumaišomas su ketono ir vandens tirpalu. Sterolių ekstrakcijai vartojamas angliavandenilinis tirpiklis. Šią stadiją paprastai galima vykdyti 25-150 °C temperatūrų intervale, bet geriausia 50-100 °C temperatūrų intervale. Geriausia ekstrahuoti nuo daugiau nei 15 iki 24 valandų. Svarbu pažymėti,

kad alkoholio panaudojimas nėra reikalingas ir nesiūlomas ekstrakcijos stadijoje. Ekstrakcija pagal šį išradimą vykdoma, naudojant ketono-vandens-angliavandenilio mišinį.

Ketonas yra pasirenkamas iš grupės junginių, turinčių bendrąją formulę $RCOR'$, kurioje R ir R' yra alkilo grupės. Tinkamiausios alkilo grupės yra C_1 - C_6 grupės. Visų geriausia, kai ketonas yra 2-propanonas (acetonas). Angliavandenilis gali būti pasirenkamas iš grupės, apimančios visus C_5 - C_{10} angliavandenilius. Tinkamiausias angliavandenilis yra heksanas.

Kaip pavaizduota fig.1, ekstrakcijos produktas yra riebalingos nuosėdos arba liekana, kuri valoma, norint gauti fitosterolių kompozicijas. Valymo stadiją galima atlikti kristalizacijos būdu, išskiriant chromatografijos metodu arba bet kokia kita tinkama metodika. Geriausia riebalingas nuosėdas ištirpinti alkoholyje, lėtai atšaldyti, po to nufiltruoti ir perplauti šaltu alkoholiu. Liekana išdžiovinama, ir gautas produktas yra fitosterolių kompozicija.

Tinkamiausiame variante valymo stadijoje naudojamas alkoholis yra pasirenkamas iš grupės junginių, kurių bendrosios formulės yra $R-CHOH-R$, RCH_2OH ir R_3COH , kur R yra C_1 - C_4 alkilo grupė. Visų geriausias alkoholis yra metanolis. Atšaldymo stadiją galima vykdyti 10-0 °C temperatūrų intervale, geriausia 3-4 °C temperatūroje, 24 valandas.

Fitosterolių kompozicijos, gaunamos pagal čia aprašytą būdą, gali būti tiesiogiai pridedamos į maisto priedus, vitaminų receptūras ir į vaistus aterosklerozės ir jos pasekmių, paralyžiaus, širdies priepuolių ir periferinių kraujagyslių ligos gydymui ir profilaktikai. Be to, viename šio išradimo įgyvendinimo variante siūloma čia aprašytas fitosterolių kompozicijas gaminti vaisto forma su tinkamais stimulatoriais arba nešikliais. Pavyzdžiui, šios kompozicijos gali būti įterpiamos arba skiriamos kartu su pasirinktais lipidų kieki mažinančiais agentais, norint sumažinti jų dozes, o tuo pačiu ir pastarųjų agentų toksiškumą.

Šio išradimo fitosterolių kompozicijos parodė pastebimą sugebėjimą modifikuoti lipoproteinus, net ir esant mažesnėms fitosterolių koncentracijoms nei

žinomose receptūrose. Tačiau stebėtina, kad šios kompozicijos gali padidinti didelio tankio lipoproteinų (HDL) kiekį plazmoje; toks efektas iki šiol nebuvo susietas su bet kokia kita fitosterolių, gautų iš talo alyvos, kompozicija. Manoma, kad šis unikalus poveikis yra dėl to, kad pradine medžiaga joms gauti yra naudojami pulpos muilai, arba dėl to, kad vienas iš šios kompozicijos elementų yra stigmastanolis.

Tinkamiausiame variante šio išradimo kompozicijos turi tokį fitosterolių santykį: beta-sitosterolis (1); kampesterolis (0,2-0,4) ir stigmastanolis (0,2-0,5). Dar geriau, kai kampesterolis ir stigmastanolis kartu sudaro bent 50 % bendros beta-sitosterolio koncentracijos. Visų geriausiame variante šio išradimo kompozicijose fitosterolių santykis, lyginant su iš sojos pupelių gautais fitosteroliais, yra toks:

	Apytikris švarumas (%)	Žinomų fitosterolių santykis		
		β -sitosterolis	kampesterolis	stigmastanolis
Sojos pupelių		1	0,640	0,005
Forbes-1	91,0	1	0,354	0,414
Forbes-2	77,0	1	0,330	0,203
Forbes-3	90,0	1	0,268	0,299

Dviejų kitų šio išradimo ekstraktų kompozicija ir švarumas yra toks:

	Apytikris švarumas (%)	Kompozicija (%)		
		β -sitosterolis	kampesterolis	stigmastanolis
Forbes-4	99,0	62,6	16,6	23,2
Forbes-5	98,3	64,7	16,4	17,2

Kiekvienoje čia aprašytoje kompozicijoje gali būti papildomų junginių, kurie gali būti fitosteroliai arba ne fitosteroliai. Pavyzdžiui, buvo rasta, kad gali būti palyginus nedideli kiekiai kampestanolio (kito fitosterolio). Be to, gali būti tiesios grandinės riebalų alkoholių, tokių kaip behenilo (C₂₂) ir lignocerilo (C₂₄) alkoholių.

Norint nustatyti šių kartu išskiriamų junginių prigimtį, buvo atlikta labiausiai tinkamų šio išradimo kompozicijų analizė dujų chromatografijos metodu.

Dujų chromatografijos vykdymo sąlygos fitosteroliams buvo tokios: pradinė temperatūra 80 °C, išlaikoma 1 min; pakeliama iki 120 °C 20°C per minutę greičiu ir išlaikoma 7 minutes; pakeliama iki 240 °C 20 °C per minutę greičiu ir išlaikoma 15 minučių; ir pakeliama iki 269 °C 20 °C per minutę greičiu ir išlaikoma 25 minutes. Kiekvieno bandymo gale temperatūra pakeliama iki 320 °C ir išlaikoma mažiausiai 5 minutes. Įleidimo temperatūra buvo 300 °C, o detektoriaus temperatūra buvo 320 °C. Kolonėlės dujų srauto greitis buvo 1 ml per minutę, o atmetamo srauto greitis buvo 4 ml per minutę. Išvalymo srauto greitis buvo 4,5 ml per minutę. Nešančios dujos buvo helis.

Dviejų ir labiausiai tinkamų šio išradimo kompozicijų analizės dujų chromatografijos metodu duomenys parodyti fig.1-7.

Forbes-2 kompozicijoje žinomi steroliai figūrose 1 ir 2 pasirodo 35-45 minučių intervale. Beta-sitosterolio pikas yra 87, kampestrolio - 81 ir stigmastanolio - 84. Fig.2 parodyti 65, 66 ir 77 pikai yra kartu išskiriami junginiai, kurie gali turėti hipocholestereminius poveikius. Tačiau taip pat gali būti, kad šie kartu išskiriami junginiai gali turėti sinergetinį efektą į šios kompozicijos žinomų fitosterolių poveikį. Panašiu būdu, figūrose 5 ir 6 kampesterolio, stigmastanolio ir beta-sitosterolio pikai yra atitinkamai 6, 7 ir 8.

Kitoje tinkamoje šio išradimo kompozicijoje yra tokie komponentai:

kampesterolis	14,1 %
kampestanolis	3,5 %
beta-sitosterolis	62,8 %
stigmastanolis	16,9 %,

o bendra fitosterolių koncentracija yra 97,3 %.

1 PAVYZDYS - Ekstrakcija ir valymas

Trijų kg pulpos muilo partija buvo gauta iš B.C. Chemicals Inc. Pagaminamas mišinys iš 3 l acetono ir 1,5 l vandens, ir į jį sudedamas muilas. Mišinys nepertraukiamai ekstrahuojamas 4,5 l heksano 50 °C temperatūroje, naudojant 18 l garintuvą. Po to, gautas ekstrakcijos produktas džiovinamas natrio sulfatu, ir nugarinamas tirpiklis. Gaunama 460 g liekanos arba riebalingų nuosėdų.

Riebalingos nuosėdos pašildomos, maišomos magnetiniu strypo pavidalo maišikliu ir palaipsniui pridedama 460 ml metanolio. Mišinys virinamas su grįžtamuju šaldytuvu, maišant, 15 min. ir palaipsniui šaldomas 3-5 valandas. Mišinys lakomas šaldytuve 3-4 °C temperatūroje per naktį, po to filtruojamas ir plaunamas (du kartus) 150 ml šalto metanolio. Tada mišinys laikomas vakuume 2 dienas, ir gaunama 100 g 82 % (t.y. 82 g fitosterolių) grynumo mišinio.

2 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikio įvertinimas bandymuose su žiurkėmis

Devyniasdešimt Wistar žiurkių-patinėlių buvo padalinta į 3 eksperimentines grupes: Forbes-1 kompozicija, Forbes-2 kompozicija ir sojos pupelės. Trisdešimt kiekvienoje grupėje esančių žiurkių buvo vėl padalinta į 5 maisto režimų grupes, kaip parodyta 2 lentelėje. Žiurkės buvo laikomos keičiamo šviesos ciklo sąlygomis ir šeriamos baziniu pusiau išgrynintu maistu (1 lentelė), į kurį pridedami skirtingi cholesterolio ir fitosterolių kiekiai (2 lentelė). Kiekvienoje iš 5 maisto grupių 2 pelėms buvo skiriama Forbes-1 kompozicija, 2 pelėms - Forbes-2 kompozicija ir 2 pelėms - iš sojos pupelių gautas fitosterolis (Sigma).

1 lentelė. Eksperimentinio maisto sudėtis

Ingredientai	%
Kazeinas	20
Kukurūzų krakmolas	21,5
Sacharozė	35
Surištas aliejus*	18
DL-metioninas	0,5
Mineralinių medžiagų mišinys	4,00
Vitaminų mišinys	1,00

*Dygmino ir lydytų taukų mišinys santykiu 1:3

2 lentelė. Maisto režimai

Grupės	Steroliai pridėti prie bazinio maisto (%)	
	Cholesterolis	Fitosterolis
1	0	0
2	1	0
3	1	0,2
4	1	0,5
5	1	1

Maitinimo laikotarpio pabaigoje žiurkėms suleidžiama į pilvą deuterio oksido (0,4 ml) ir neduodama maisto ir vandens mažiausiai 2 valandas. Tada žiurkės anestezuojamos halotanu. Iš širdies paimami kraujo mėginiai. Paimami kepenų, mažojo žarnyno ir raumenų mėginiai, pasveriami, įdedami į skystą azotą ir laikomi - 80 °C temperatūroje, kol pasibaigia cholesterolio sintezė. Panaudojant prekybinį rinkinį (Biopacific Diagnostic Inc), nustatomas bendras cholesterolis, LDL ir HDL cholesterolis.

Fitosterolių kompozicijų poveikio į bendrą cholesterolį, LDL ir HDL rezultatai parodyti atitinkamai fig. 8, 9 ir 10. Forbes-1 ir Forbes-2 efektyvumas matomas iš LDL-cholesterolio kiekio sumažėjimo, parodyto fig.9, ir HDL-cholesterolio kiekio padidėjimo, parodyto fig.10; ypatingai veikia Forbes-1. Fig.8 parodyta, kad pridėjus cholesterolio (2 maisto grupė) į bazinę dietą (1 grupė), stebimas cirkuliuojančio cholesterolio koncentracijų padidėjimas. Palaipsniui didinant fitosterolių kiekius (3-5 grupės), stebimas cholesterolio kiekio sunormalėjimas grupėse, gavusiose Forbes-1 ir Forbes-2, bet tokio efekto neturėjo sojos pupelių fitosteroliai, kas buvo nustatyta regresinės analizės būdu. Fig.9 parodyta, kad Forbes-2 ir Forbes-1 fitosteroliai pasižymi didesniu cholesterolio kiekio mažinimo efektyvumu, nei sojos pupelių fitosteroliai LDL atžvilgiu. Fig.10 rodo, kad tinkamiausios šio išradimo kompozicijos, ypatingai Forbes-1, turi didesnę HDL didinimo sugebėjimą, lyginant su sojos pupelių fitosteroliais.

3 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikio įvertinimas bandymuose su žiurkėmis

Šiame eksperimente buvo tiriamas šio išradimo maistinių fitosterolio kompozicijų poveikis į maistinio cholesterolio sukeltą cholesterolio koncentracijų padidėjimą žiurkėnų serume.

Iš viso 40 žiurkėnų-patinėlių (80-100 g), apgyvendintų po vieną nerūdijančio plieno narveliuose su skylutėmis, maitinami graužikų maistu ir aklimatizuojami tris dienas kambaryje (20-20 °C, apšvietimas - 1700-0500). Po to žiurkėnai padalinami į penkias grupes po 8 gyvuliukus kiekvienoje grupėje ir šeriami 34 dienas baziniu pusiau išvalytu maistu (3 lentelė), į kurį pridėta skirtingi kiekiai cholesterolio ir vienos iš šio išradimo fitosterolių kompozicijos (Forbes-3) (4 lentelė).

3 lentelė. Eksperimentinio maisto sudėtis

Ingredientai	% pagal svorį
Kazeinas	20
Kukurūzų krakmolas	28
Sacharozė	36,6
Kukurūzų aliejus	5,0
Celiuliozė	5,0
DL-metioninas	0,5
Mineralinių medžiagų mišinys	4,00
Vitaminų mišinys	1,00
Cholino bitartratas	0,2
Cholesterolis	0,025, 0,25

4 lentelė. Maisto režimai

Grupės	Cholesterolis, pridėtas į kontrolinį maistą, %	Fitosteroliai, pridėti į kontrolinį maistą, %
1	0,025	nėra
2	0,25	nėra
3	0,25	0,25
4	0,25	0,5
5	0,25	1,0

Maitinimo laikotarpio pabaigoje gyvuliukams suleidžiama į pilvą deuterio oksido (0,4 ml) ir neduodama maisto ir vandens mažiausiai 2 valandas. Tada žiurkėnai anestezuojamos halotanu. Iš širdies paimami kraujo mėginiai. Paimami kitų audinių, įskaitant kepenis, mažąjį žarnyną ir raumenis, mėginiai, pasveriami, įdedami į skystą azotą ir laikomi -80 °C temperatūroje, kol pasibaigia cholesterolio

sintezė. Panaudojant prekybinį rinkinį, nustatomas bendras cholesterolis, LDL ir HDL cholesterolis. Rezultatai įvertinami statistiškai, panaudojant variacinės metodikos (SYSTAT) ONEWAY analizę.

Žiurkėnai, šerti daug cholesterolio turinčiu maistu, turėjo daug didesnį bendro cholesterolio ir LDL-cholesterolio kiekį sėrume, negu žiurkėnai, kurie buvo šerti normalų cholesterolio kiekį (0,025 %) turinčiu maistu. Papildomi 0,5 % ir 1 % fitosterolių kiekiai panaikino šį padidėjimą, kurį sukėlė didelis cholesterolio sunaudojimas (fig.11 ir 12). LDL-cholesterolio koncentracija 5 grupėje buvo mažesnė, lyginant su žiurkėnų, šertų normalų cholesterolio kiekį turinčiu maistu, koncentracijomis (fig.12). Be to, buvo neigiama regresinė bendrojo cholesterolio ir LDL-cholesterolio priklausomybė nuo pridėto į maistą fitosterolių kiekio (fig.13).

Fitosterolių priedas sukėlė nedidelį HDL padidėjimą, tačiau aiškaus skirtumo nedavė (fig.13).

4 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikio įvertinimas bandymuose su žiurkėnais (90 dienų bandymas)

Šešios 20 žiurkėnų (10 patinėlių, 10 patelių) grupės buvo šeriamos pusiau išgrynintu maistu, turinčiu 30 % riebalų (polinesočių/sočių riebalų santykis = 0,3) 90 dienų. 1 maistas buvo be cholesterolio. 2-6 maiste buvo 0,25 % (sv/sv) maistinio cholesterolio. 3 ir 4 maiste buvo atitinkamai 0,5 ir 1 % Forbes fitosterolių (didesnio nei 90 % švarumo). Maistas buvo ruošiamas iš pirminių ingredientų kiekvieną savaitę. Riebalų, fitosterolių ir cholesterolio kiekiai buvo nustatomi dujų chromatografijos metodu. Visi gyvuliukai galėjo laisvai prieiti prie vandens ir maisto per visą eksperimento laikotarpį. Gyvuliukai buvo sveriami kiekvieną savaitę. Maisto suvartojimas nustatomas kiekvieną dieną ir išvedamas savaitės vidurkis, pasveriant maisto indelius prieš ir po kiekvieno 24 val. maitinimo laikotarpio. Po 90 dienų gyvuliukai buvo numarinami, naudojant halotaną, ir surenkamas kraujas lipoproteinų vaizdo analizei. Nustatomi bendro cirkuliuojančio cholesterolio, turinčio apoB dalelių ir HDL cholesterolio, bei trigliceridų kiekiai. Taip pat prieš pat numarinimą nustatoma cholesterolio absorbcijos ir sintezės greičiai, naudojant

atitinkamai ^{14}C -cholesterolio išnykimo iš žarnų ir deuterio įsiterpimo į audinių cholesterolį metodikas. Taip apt buvo tirta fitosterolių patekimas į žarnyną ir kitus audinius. Be to, žarnų ir kepenų mėginiai buvo laikomi tam, kad juos būtų galima atiduoti į Senevilio Bio-Research Laboratories (Kvebekas) histopatologiniams, karcinogeniškumo ir fermentų veiklos tyrimams.

Rezultatai:

Rezultatai parodyti fig.14-18. Šiose figūrose grupės dažniausiai pažymėtos skaičiais, kurie atitinka skaičius, nurodytus eksperimento plane. Raidės virš stulpelių stulpelinėse diagramose rodo žymius skirtumus tarp grupių. Ten, kur duotos raidės, stulpeliai, turintys tą pačią raidę, nelabai skiriasi, o stulpeliai su skirtingomis raidėmis yra skirtingi, t.y. statistinis lygis $p < 0,05$.

Fig.14-16 parodė žiurkėnų-patinėlių ir patelių, ėdusių tiriamąjį maistą 90 dienų laikotarpyje, cirkuliuojančio cholesterolio duomenys. Gyvuliukų, ėdusių 2 maistą (bazinį maistą tik su pridėtu cholesteroliu) ir 5 maistą, turintį cholesterolio + sojos pupelių fitosterolių, atveju stebėti dideli bendro cirkuliuojančio cholesterolio kiekių skirtumai priklausomai nuo lyties. Patelės, nors jų cholesterolio kiekiai nesiskyrė nuo patinėlių bazinės dietos grupėje (1 grupė), rodė didesnę atsaką į pridėtą vieną cholesterolį, negu patinėliai. Pridėjus fitosterolių, šis skirtumas išnyko, išskyrus 5 grupę.

Cholesterolio kiekių duomenys, padalinus į grupes pagal lytį, parodyti fig. 15 ir 16. Patinėlių atveju (fig.15), į bazinį maistą pridėjus vien tik cholesterolio, stebimas didelis cirkuliuojančio cholesterolio kiekio padidėjimas. Pridėjus 0,5 % Forbes fitosterolių, stebima cholesterolio kiekio mažėjimo tendencija, tačiau pridėjus 1 % Forbes fitosterolių, išgaunamas statistiškai reikšmingas cholesterolio kiekio sumažėjimas, ir pasiekiami maždaug tokie patys kiekiai, kaip ir kontrolinėje grupėje, kurioje nebuvo pridėta cholesterolio. Kai į maistą pridedama 0,5 ir 1 % sojos pupelių fitosterolių, patinėlių atveju nebuvo aiškaus bendro cirkuliuojančio cholesterolio kiekio sumažėjimo. Kai dėl HDL, tai stebimas skirtingas Forbes efektas, lyginant su sojos pupelėmis - maistas su Forbes nepakeitė HDL kiekių

grupėje, gavusioje tik cholesterolio (2 grupė), tuo tarpu sojos pupelės davė žymų HDL kiekių sumažėjimą abiem tirtais atvejais (5 ir 6 grupės). Didelių apoB turinčių cholesterolio dalelių kiekių skirtumų nepastebėta, tačiau, maitinant cholesteroliu su 1 % Forbes, stebima jų kiekių mažėjimo tendencija, lyginant su kitomis grupėmis.

Patelių tyrimo rezultatai parodyti fig.16. Nagrinėjant bendrą ir HDL cholesterolį, pastebėta aiški pridėto maistinio cholesterolio įtaka. Pridėjus 1 % bet kokio tipo šaltinio fitosterolių, gaunamas aiškus ir panašus bendro ir HDL cholesterolio koncentracijų sumažėjimas. ApoB turinčių dalelių kiekiams maistas neturėjo įtakos.

Žiurkėnų, gavusių tiramąjį maistą 90 dienų laikotarpyje, cirkuliuojančių trigliceridų kiekiai parodyti fig.17. Pastebėtas patelių, gavusių bazinį maistą su cholesteroliu ir su 0,5 % Forbes, cirkuliuojančių trigliceridų kiekių padidėjimas, lyginant su vien tik baziniu maistu, tačiau kitų skirtumų tarp grupių nebuvo pastebėta abiejų lyčių grupėse. Patinėlių atveju maisto įtakos arba tendencijos į trigliceridų koncentraciją nebuvo.

Susumuotoje formoje patinėlių rezultatų išsidėstymas priklausomai nuo tirtojo maisto yra toks:

5 lentelė

	Bendras cholesterolis	LDL	HDL
Forbes 0,5 %	4	2	1
Forbes 1,0 %	1	1	2
Soja 0,5 %	2	3-4	4
Soja 1,0 %	3	4-3	3

Galima aiškiai pastebėti Forbes kompozicijų (tokių kaip šio išradimo) privalumą. Be to, buvo rastas ir HDL:ApoB santykio panašus išsidėstymas patinėliams (fig.18):

Forbes 0,5 %	2
Forbes 1,0 %	1
Soja 0,5 %	4
Soja 1,0 %	3

Taip pat buvo rasta, kad HDL:LDL santykis Forbes kompozicijų atveju yra beveik dvigubai didesnis, lyginant vien tik su β -sitosteroliu.

5 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikiai bandymuose su triušiais

Šiame eksperimente du triušiai buvo tiriami 43 dienas, norint nustatyti vienos iš šio išradimo kompozicijų (1 % Forbes maiste) poveikį į bendrą cholesterolio vaizdą. Rezultatai buvo tokie:

6 lentelė

Triušių bendro cholesterolio vaizdas (mg/dl)		
Data	A triušis	B triušis
95.06.14	95	215
95.06.18	129	162
95.06.26	-	pradedama šerti 1 % Forbes
95.07.07	75	106
95.07.09	-	pradedama šerti 1 % Forbes
96.07.18	90	112
95.07.25	82	118
95.08.01	95	119
95.08.08	76	114

Abiejų triušių (A ir B) atveju matomas bendro cholesterolio sumažėjimas per dvi fitosterolio kompozicijos (1 % Forbes) vartojimo savaites. Poveikis tęsėsi net ir nutraukus 1 % Forbes vartojimą. Šio išradimo kompozicijos poveikis į bendro cholesterolio kiekio mažinimą užsitęsė, praėjus pradinio vartojimo fazei.

6 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikiai bandymuose su apo-E trūkumą turinčiomis pelėmis

Gyvuliukai: Devyniolika 5 savaičių amžiaus apo-E trūkumą turinčių pelių buvo gauta iš Jackson Laboratory, JAV. Gyvuliukai buvo atsitiktinai padalinti į 2 grupes: 9 gyvuliukai buvo kontrolinėje grupėje ir 10 pelių - eksperimentinėje Forbes grupėje. Po 5 dienų adaptacijos laikotarpio, iš pelių uodegų buvo paimtas kraujas į kapiliarinius vamzdelius ir atskirta plazma centrifuguojant kraują. Nustatytas lipidų kiekis pelių plazmoje.

Maistas: Mažai riebalingas, mažai cholesterolio turintis pelių maistas buvo gautas iš Jamieson's Pet Food Distributors Ltd., Vancouver, B.C. Talo alyvos

fitosteroliai buvo išskirti iš talo alyvos muilo, naudojant šiame išradime aprašytą būdą. Grynumas ir kiekvieno atskiro fitosterolio procentinis kiekis mišinyje buvo įvertintas dujų-skysčio chromatografijos metodu. Galutinis produktas buvo 95 % grynumo ir turėjo 69 % sitosterolio, 15 % kampesterolio ir 16 % stigmastanolio. Pelių maistas buvo sumaltas į smulkius miltelius. Į šiuos miltelius pridėta 0,15 % (sv/sv) cholesterolio (Sigma) ir gerai sumaišyta. Šis maistas su cholesterolio priedu buvo vėl sugranuliuotas, išdžiovintas ir naudojamas eksperimentinės grupės pelėms šerti.

Biocheminiai tyrimai: Bendras cholesterolio kiekis plazmoje ir trigliceridai buvo išmatuoti, naudojant fermentų rinkinį (Boehringer Mannheim), o HDL-cholesterolis buvo įvertintas pagal anksčiau literatūroje aprašytą nusodinimo metodą, naudojant polietilenglikolį 6000.

Kūno svoris ir maisto suvartojimas: Pelių kūno svoris ir maisto suvartojimas matuotas kas savaitę.

7 lentelė
Pelės vidutinis kūno svoris (g) (duoti tik kas mėnesį atlikti matavimai)

Data	Forbes grupė	Kontrolinė grupė
95.06.20	21,42	21,02
95.07.24	29,82	28,00
95.08.22	32,12	29,73
95.09.12	34,16*	30,78

*p < 0,05

8 lentelė
Pelės vidutinis maisto suvartojimas per savaitę (g) (duoti tik kas mėnesį atlikti matavimai)

Data	Forbes grupė	Kontrolinė grupė
95.06.26-07.03	19,61	21,21
95.08.01-08.08	32,62*	29,20
95.08.15-08.22	29,32	27,10
95.09.05-09.12	35,56	30,25

*p < 0,05

Kiti duomenys: Naujojo maisto sukeltų pašalinių efektų nepastebėta. Visi abiejų grupių gyvuliukai atrodė normaliai, turėjo normalius įpročius, įskaitant tuštinimosi įprotį. Kontrolinėje grupėje buvo rasta viena negyva pelė 95.07.11. Kadangi pelės kūnas nebuvo laikomas, autopsija nebuvo padaryta. Forbes grupėje

buvo rasta viena dehidratuota, praradusi kūno svorį pelė. Gyvuliukas buvo užmuštas, ir nustatyta, kad jo susirgimo priežastis yra malokliuzija (netaisyklinga dantų sankanda).

Statistikinė analizė: Rezultatai buvo analizuojami pagal dviejų mėginių t-testą, priimant lygius laisvės laipsnių skaičius.

Rezultatai:

Iki šio laiko atlikti rezultatai susumuoti toliau duodamose lentelėse.

9 lentelė

Vidutinis bendro cholesterolio kiekis pelės plazmoje (mg/dl)

Data	Forbes grupė	Kontrolinė grupė
95.06.20	606,28	599,61
95.07.18	1027,96*	1622,56
95.09.06	1168,57*	1508,63

* $p < 0,0001$

10 lentelė

Vidutinis trigliceridų kiekis pelės plazmoje (mg/dl)

Data	Forbes grupė	Kontrolinė grupė
95.06.20	110,97	120,31
95.07.18	210,17	143,71
95.09.06	224,48	152,25

11 lentelė

Vidutinis HDL-cholesterolio kiekis pelės plazmoje (mg/dl)

Data	Forbes grupė (9)	Kontrolinė grupė (7)
95.07.08	42,00*	18,29

* $p < 0,001$

Iš šių rezultatų galima matyti, kad Forbes kompozicijos grupė rodo didelį (33 %) bendro cholesterolio kiekio sumažėjimą, nedidelį trigliceridų kiekio padidėjimą ir didelį (>100 %) HDL-cholesterolio kiekio padidėjimą.

7 PAVYZDYS - Fitosterolių kompozicijos poveikis bandymuose su žiurkėnais (45 dienų bandymas)

Penkiasdešimt GS žiurkėnų buvo pratinami dvi savaites gyvuliukų narvų sąlygomis prieš šeriant juos pusiau išgrynintu maistu 45 dienas. Jie buvo padalinti į 5 grupes, šeriamas 0,25 % cholesterolio kartu su vienu iš keturių augalų sterolių mišinių: sojos pupelių, talo alyvos, gryno sitostanolio ir dirbtinio mišinio,

vaizduojančio talo alyvos fitosterolius. Kontrolinė grupė gavo tik 0,25 % cholesterolio. Tyrimo laikotarpiu kas trys dienos buvo kontroliuojamas jų maisto suvartojimas. Gyvuliukų kūno svoris buvo matuojamas kas savaitę ir audinių paėmimo metu. Trys dienos prieš GS žiurkėnų užmušimą, jie buvo lengvai anestezuojami dietilo eteriu ir intraveniniu būdu per jungo veną įleidžiama 0,4 ml Intralipid'o, turinčio 0,18 mg ^{13}C -cholesterolio. Tuoj po injekcijos per skrandžio zondą gyvuliukams buvo supilta 0,6 ml lipidų mišinio (kokoso riešutų, alyvmedžio ir dygmino aliejų), turinčio 0,44 mg ^{13}C -cholesterolio. Tada GC žiurkėnai buvo laikomi jų vieliniuose narvuose 72 valandas, duodant vandens ir maisto *ad libidum*.

Užmušimo dieną kiekvienam žiurkėnui įleidžiama i.p. 1 ml deuteruoto vandens ir palaikoma vieną valandą prieš užmušant. Gyvuliukai anestezuojami dietilo eteriu ir širdies punkcijos būdu paimami kraujo mėginiai. Paimamos kepenys, tulžies pūslė, mažasis žarnynas, didysis žarnynas ir širdis, užšaldoma skystame azote ir laikoma šaldiklyje $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Skerdiena ir išmatos laikoma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje tolimesnei bendrųjų lipidų ir sterolių analizei.

Maisto suvartojimo, kūno ir kepenų svorio matavimai

GS žiurkėnų maisto suvartojimas buvo matuojamas kas trys dienos. Statistikinė analizė rodo, kad nėra skirtumo tarp visų penkių grupių maisto suvartojimo. Vidutinis suvartojimas per dieną visose penkiose grupėse keitėsi nuo 8,84 iki 9,34 g per dieną, p -reikšmė = 0,4. Gyvuliukų kūno svoris labai padidėjo per tyrimo laikotarpį (nuo maždaug 25 iki 40 g), p -reikšmė $< 0,05$ (suporuotas t-testas). Galutinis jų kūno svoris buvo 112,5-154,3 g intervale. Skirtingose grupėse statistikinio reikšmingumo nepastebėta, p -reikšmė = 0,43.

Kepenų svoriai buvo labai skirtingi atskirose grupėse. Sitostanolio šerta grupė turėjo mažiausią kepenų svorį, lyginant su kontroline ir kitomis grupėmis, šertomis atitinkamai 0,25 % cholesterolio ir įvairiais fitosteroliais. Be to, sojos pupelių fitosterolius gavusi grupė labai skyrėsi nuo sitostanolį gavusios grupės, išanalizavus duomenis pagal Newman-Keuls testą. Bendrai imant, visos augalų steroliais šertos grupės turėjo mažesnius kepenų svorius, lyginant su kontroline

grupe, šerta 0,25 % cholesterolio, p -reikšmė = 0,01. Talo alyvos steroliais ir sitostanolio šertų GS žiurkėnų kepenų vidutinis svoris buvo atitinkamai 15 % ir 20 % mažesnis, nei kontrolinių. Natūrai talo alyva ir dirbtinai paruošta talo alyva turėjo panašius poveikius, kas leidžia manyti, kad sojos pupelių sterolių mišinyje nesantis sterolis (sitostanolis) vaidina pagrindinį vaidmenį sterolių kiekio mažinimui kepenyse.

Lipidų analizė

I. Bendras cholesterolis

Bendro cholesterolio reikšmės buvo nustatytos, naudojant prekybinį fermentinių reagentų rinkinį, VP analizatoriumi. Kraujo mėginiai buvo išmatuoti du kartus, ir šių dviejų reikšmių vidurkis buvo naudotas galutinėje statistikinėje analizėje. Įvairių lipidų analizei naudotas vienos krypties ANOVA su Newman-Keuls ir Bonferroni metodai. Sitostanolis labai mažino GS žiurkėnų bendro cholesterolio kiekį (34 %), lyginant su kontrole. Kontrolinės grupės vidutinė reikšmė buvo 226,9 mg/dl, o sitostanolio gavusios grupės - 151,2 mg/dl, p -reikšmė = 0,007. Talo alyvos fitosteroliai ir dirbtiniai talo alyvos mišiniai rodė panašų plazmos cholesterolio kiekio sumažėjimą (17,5 %), atitinkamai 118,4 mg/dl ir 186,1 mg/dl. Tačiau talo alyvos fitosteroliai (Forbes) rodė didelį bendro cholesterolio kiekio sumažėjimą (175,2 mg/dl), jei analizėje atmetama viena iš skalės išeinančio mėginio reikšmė, p -reikšmė < 0,02 talo alyvos grupėje, lyginant su kontroline grupe (tik 0,25 % cholesterolio). Koreliacija tarp sitostanolio buvimo ir mažesnių kiekių plazmoje buvo reikšminga, p -reikšmė < 0,0001, o r = 0,46.

II. HDL cholesterolis

Didelių skirtumų tarp lipoproteinų, esančių HDL cholesterolyje, apo A dalies reikšmių tarp visų penkių skirtingų grupių pastebėta nebuvo, p -reikšmė = 0,18. Pastebėtas nedidelis (15 %) vidutinės HDL reikšmės sumažėjimas sitostanolio šertoje grupėje. Vis dėlto, šis elementas neturi įtakos į žymų bendro cholesterolio kiekio sumažėjimą, kuris buvo 34 %. Ne apoA lipoproteinų santykis su apoA (HDL) lipoproteinais nelabai keičiasi tarp grupių. Supainiojantis nežymiai mažesnių HDL

reikšmių efektas sitostanolio ir talo alyvos grupėse turėjo įnašą į ne apoA/apoA (HDL) reikšmių nereikšmingo rezultato atsiradimą. Bendrai imant, skirtingų tipų fitosteroliai nekeičia HDL cholesterolio kiekių GS žiurkėnų plazmoje.

III. LDL ir/arba ne apoA steroliai

Sitostanolis efektyviai mažino ne apoA sterolių kiekį plazmoje. Buvo gautas 55 % ne apoA lipoproteinų sumažėjimas, p -reikšmė = 0,02. Panašiai kaip ir jų poveikis į bendrą cholesterolį, talo alyva ir dirbtinis talo alyvos mišinys mažino ne apoA sterolių kiekį atitinkamai 21 %, kas vėl gi rodo, kad yra aiški koreliacija tarp sitostanolio buvimo fitosteroliuose ir jų naudingo poveikio, mažinant cholesterolio kiekius GS žiurkėnų plazmoje. Tačiau šis sumažėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas dėl trigliceridų reikšmių skirtingumų.

IV. Trigliceridas

Taikant vienos krypties ANOVA metodą TG reikšmėms, jos nepatenkina normalumo testo. GS žiurkėnai buvo užmušti ne maisto negavimo sąlygomis (svarbus būvis būsimai cholesterolio sintezės, kinetikos ir absorbcijos analizei). Dėl tokios padėties įvairios reikšmės išėjo iš skalės. Naudojant ANOVA on Ranks, TG reikšmės tarp grupių statistiškai nesiskyrė. Augalų steroliai neveikė TG kiekių GS žiurkėnų plazmoje.

12 lentelė

Poveikių palyginimas				
	Bendras cholesterolis	HDL	LDL	TG
Kontrolė	C	C	C	C
Sojos pupelių β -sitostanolis	4	1	3-4	1-4
Talo alyva (Forbes)	2-3	2-2	2-3	1-4
Stigmastanolis	1	4	1	1-4
Dirbtinė talo alyva	3-2	3-2	4-3-2	1-4

Reziumuojant galima pasakyti, kad iš talo alyvos muilo gauta šio išradimo kompozicija turi tinkamesnį vaizdą dėl to, kad ji didina HDL cholesterolio kiekį ir mažina bendro cholesterolio kiekį. Šis HDL efektas nestebimas dirbtinės talo alyvos kompozicijos atveju. Panašiu būdu, bendras sitostanolio efektas yra nepalankus dėl didelio HDL sumažėjimo.

Nors nėra pilnai aišku, tačiau vis tik atrodo, kad augalų sterolių atveju santykinai hidrofobiniai steroliai daugiau stabdo bendro cholesterolio absorbciją, tuo tarpu kai santykinai hidrofiliniai steroliai turi didesnę įtaką į HDL kiekį. Šio išradimo fitosterolių kompozicijos yra unikalios tuo, kad išsilaiko abu šie poveikiai.

IŠ RADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fitosterolių kompozicijos išskyrimo iš augalinės pulpos muilo būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima:

pulpos muilo maišymą su bealkoholiniu tirpiklio mišiniu, turinčiu ketoną, bendros struktūros $RCOR^1$, kur R ir R^1 yra alkilo grupės, alifatinį angliavandenilį, tokį kaip C_5-C_{10} ir vandenį, ir nuo 25° iki 150°C temperatūroje suformuojant riebalingas nuosėdas; ir

šių riebalingų nuosėdų išvalymą, susidarant fitosterolių kompozicijai.

2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad riebalingas nuosėdas valo perkristalinant.

3. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad pulpos muilą pagamina iš medžio drožlių, tokių kaip kedro, eglės, pušies, melsvosios kanadinės eglės, ažuolo, cūgos (nuokana) ir tuopos.

4. Cholesterolio kiekį mažinanti kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra ne daugiau kaip 70 masės % beta-sitosterolio, bent 10 masės % kampesterolio ir likęs kiekis stigmastanolio.

5. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad kampesterolis ir stigmastanolis kartu paimti sudaro bent 50 % beta-sitosterolio koncentracijos.

6. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad joje beta-sitosterolio santykis yra 1,0, kampesterolio - tarp 0,2 ir 0,4, o stigmastanolio - tarp 0,2 ir 0,5.

7. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad joje beta-sitosterolio santykis yra 1,0, kampesterolio - 0,354, o stigmastanolio - 0,414.

8. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad joje beta-sitosterolio santykis yra 1,0, kampesterolio - 0,330, o stigmastanolio - 0,203.

9. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esančių fitosterolių santykis yra toks: 1,0 beta-sitosterolio: 0,268 kampesterolio: 0,299 stigmastanolio.

10. Kompozicija, besiskirianti tuo, kad ją pagamina pagal 1 punkte apibrėžtą būdą.

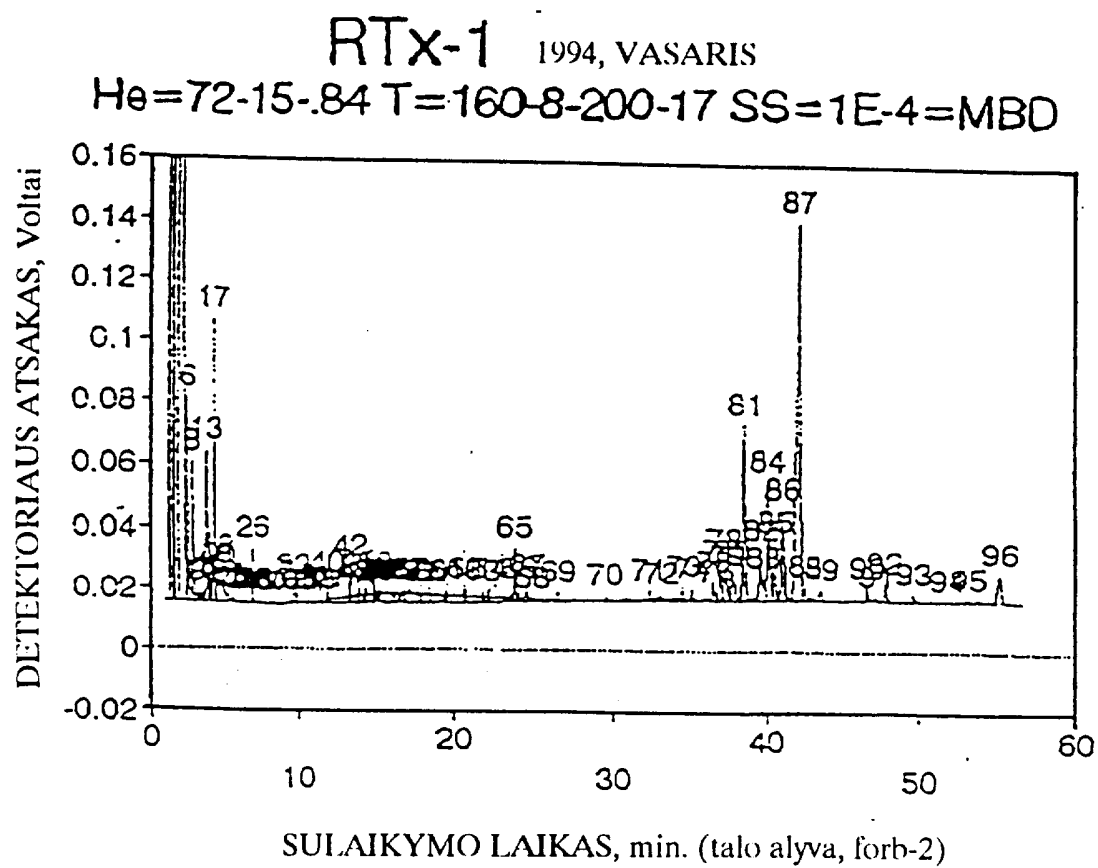
11. Kompozicijos apibrėžtos 4 punkte panaudojimas vaistų, skirtų mažo tankio lipoproteino cholesterolio koncentracijai plazmoje sumažinti, gamybai.

12. Terapiškai efektyvus produktas, skirtas pirminės ir antrinės dislipidemijos ir aterosklerozės profilaktikai ir gydymui, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina kompozicija pagal 4 punktą ir farmaciškai tinkamąs nešiklis.

13. Kompozicija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad papildomai įeina kartu išskiriami junginiai.

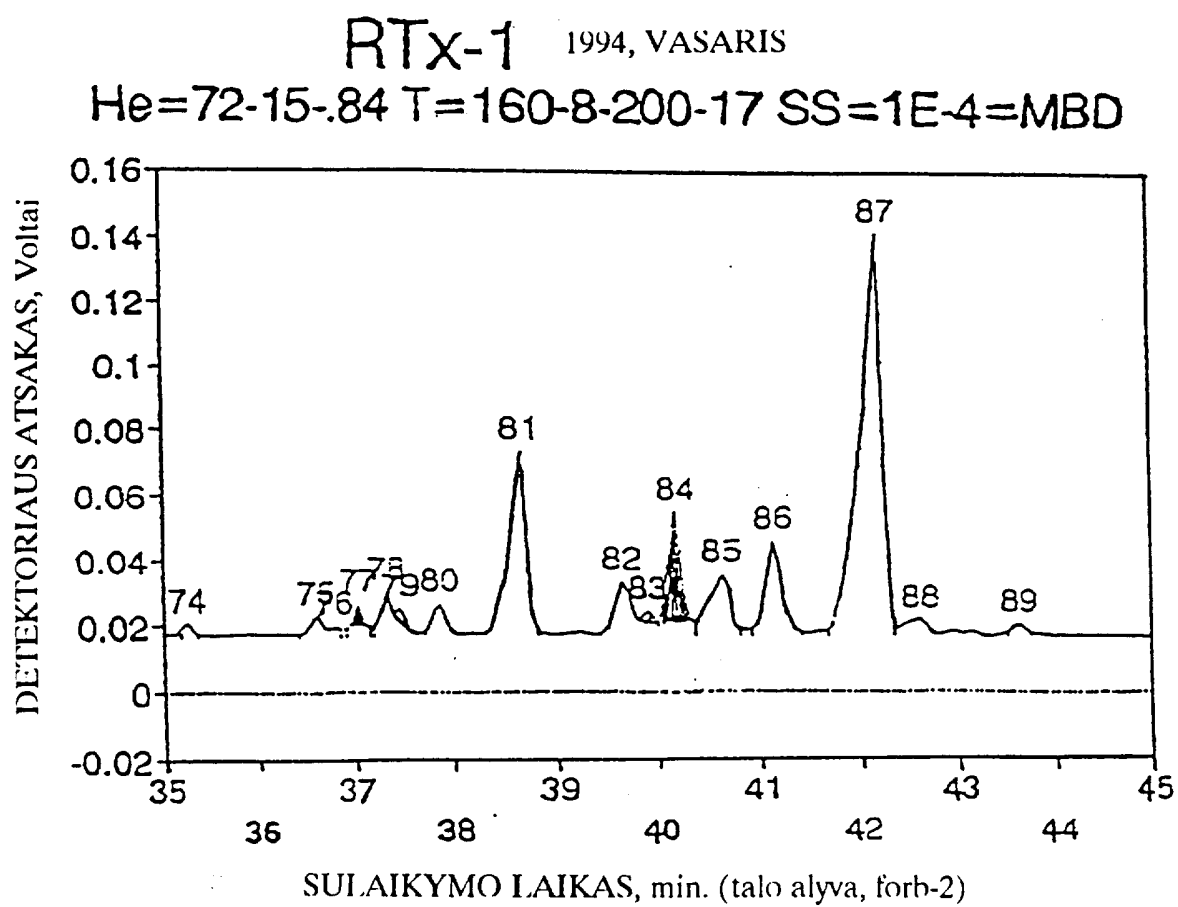
1/23

FIG 1



2/23

FIG 2



3/23

FIG 3

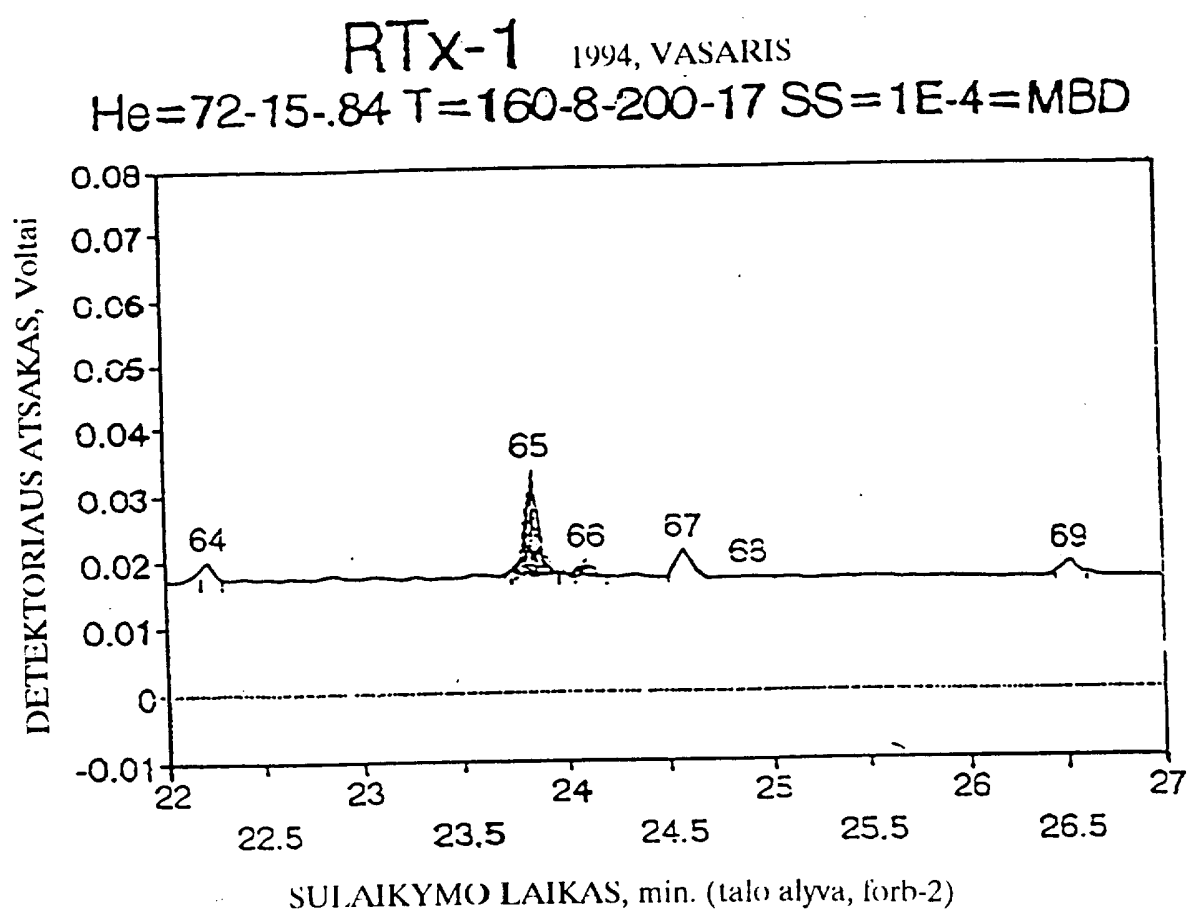


FIG 4

FORBES-2

Indeksas	Laikas min.	Plotas V*5	Plotas %	Bazinė linija V	Aukštis V	Tikras %
73	34.65	0.039	0.051	0.016	0.005	0.890674
74	35.267	0.029	0.037	0.016	0.004	0.646175
75	36.629	0.087	0.114	0.017	0.007	1.990919
76	36.808	0.004	0.005	0.019	0.001	0.087321
77	37.054	0.093	0.121	0.017	0.011	2.113168
78	37.354	0.16	0.208	0.017	0.014	3.632553
79	37.492	0.018	0.024	0.022	0.003	0.419141
80	37.879	0.094	0.123	0.017	0.01	2.148096
81	38.688	0.615	0.798	0.017	0.057	13.93643
82	39.675	0.24	0.311	0.017	0.017	5.431366
83	39.908	0.021	0.027	0.021	0.003	0.471533
84	40.208	0.377	0.49	0.017	0.039	8.557457
85	40.675	0.269	0.35	0.017	0.02	6.112469
86	41.154	0.33	0.428	0.017	0.03	7.474677
87	42.229	1.862	2.416	0.017	0.124	42.1935
88	42.625	0.088	0.114	0.017	0.005	1.990919
89	43.646	0.039	0.05	0.017	0.004	0.87321
90	46.742	0.045	0.059	0.017	0.004	1.030388

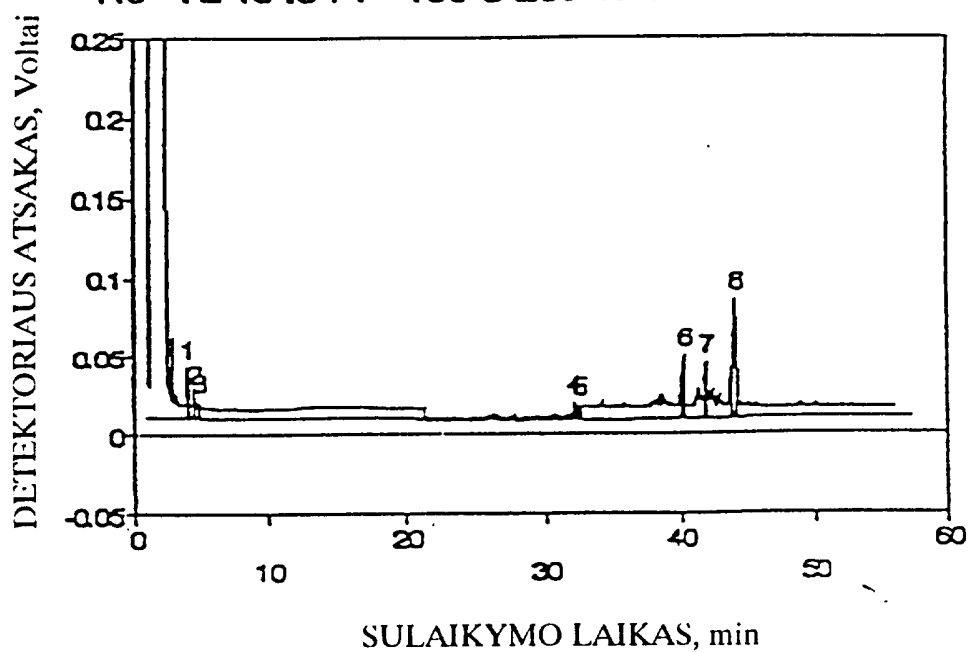
5/23

FIG 5

FORBES-3 SUDĖTIES ANALIZĖ PAGAL DUJŲ-SKYSČIO
CHROMATOGRAFIJĄ

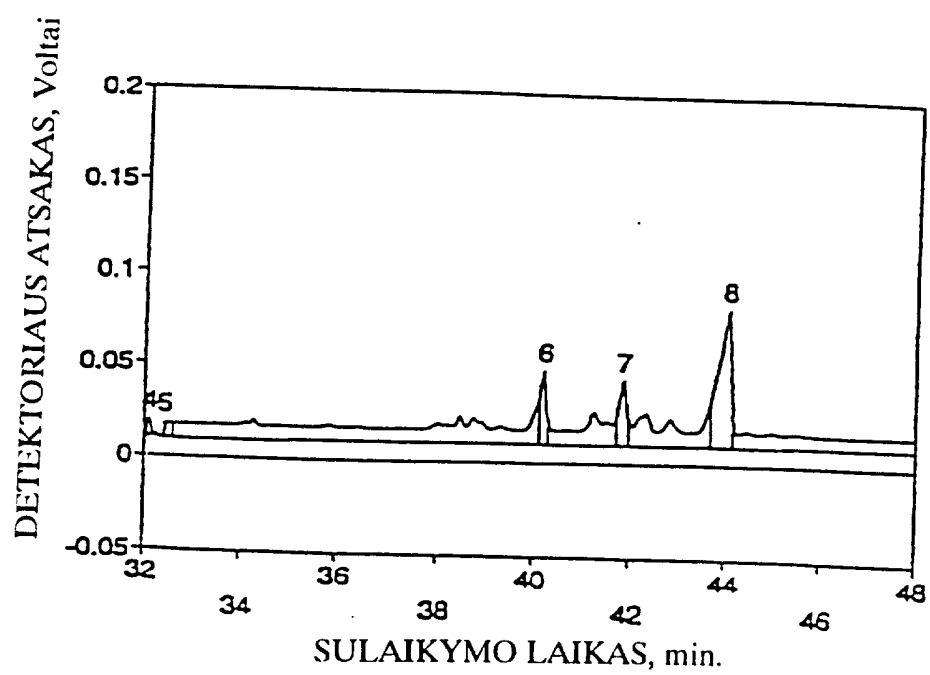
Forb-3 medžiaga (1994 gegužė)

He-72-15-.84 T-160-8-200-17 SS-1E-4-MBD



6/23

FIG 6



7/23

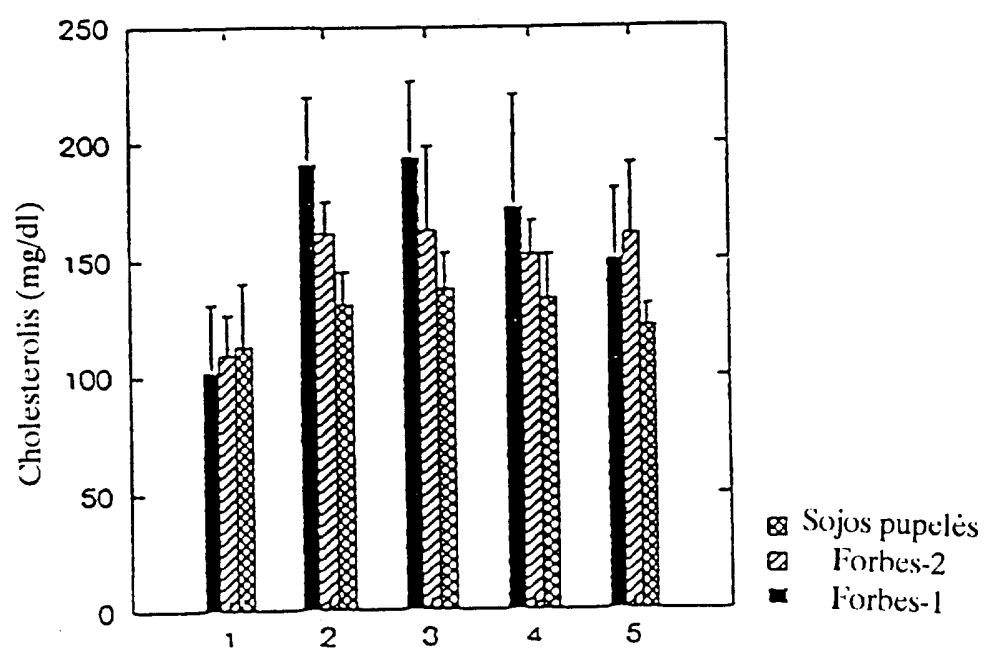
FIG 7

Indeksas	Laikas, min.	Plotas V.sek	Plotas %	Bazinė linija V	Aukštis V
1	4.012	0.078	3.224	0.011	0.033
2	4.496	0.161	6.649	0.011	0.017
3	4.775	0.007	0.269	0.018	0.004
4	32.117	0.05	2.077	0.009	0.011
5	32.433	0.093	3.858	0.009	0.009
6	40.217	0.347	14.328	0.01	0.041
7	41.879	0.389	16.064	0.01	0.038
8	44.058	1.297	53.532	0.01	0.074

8/23

FIG 8

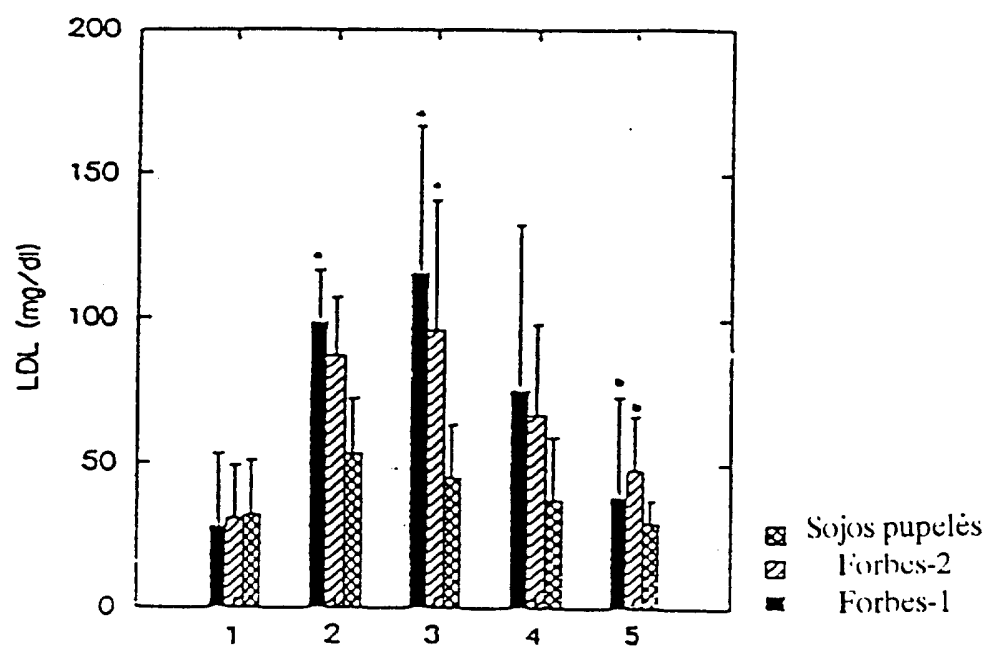
FITOSTEROLIŲ POVEIKIS Į BENDRĄ CHOLESTEROLĮ



9/23

FIG 9

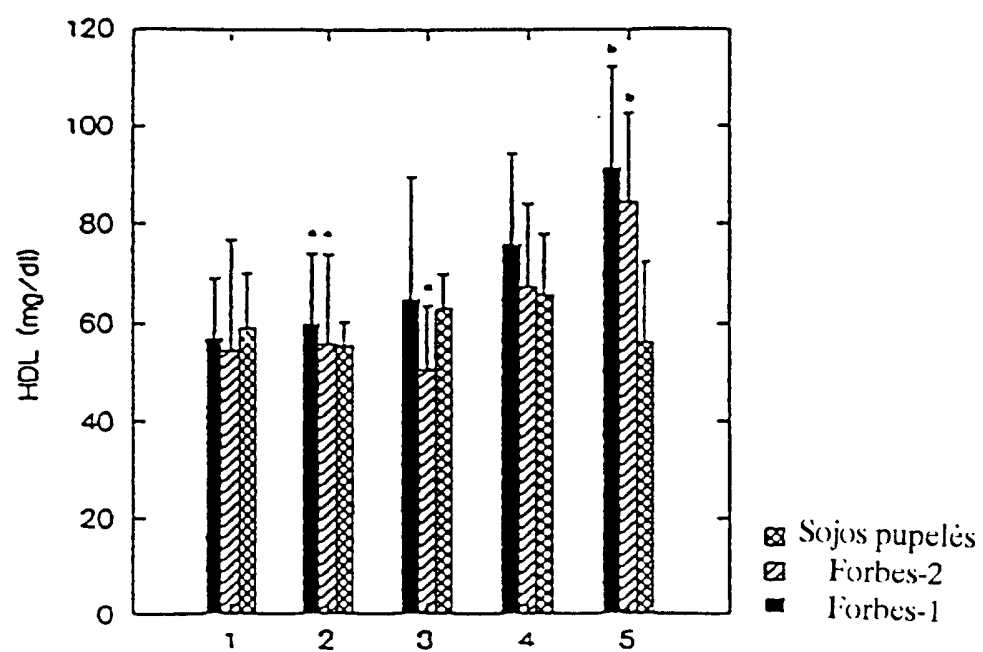
Fitosterolių poveikis į LDL-cholesterolį



10/23

FIG 10

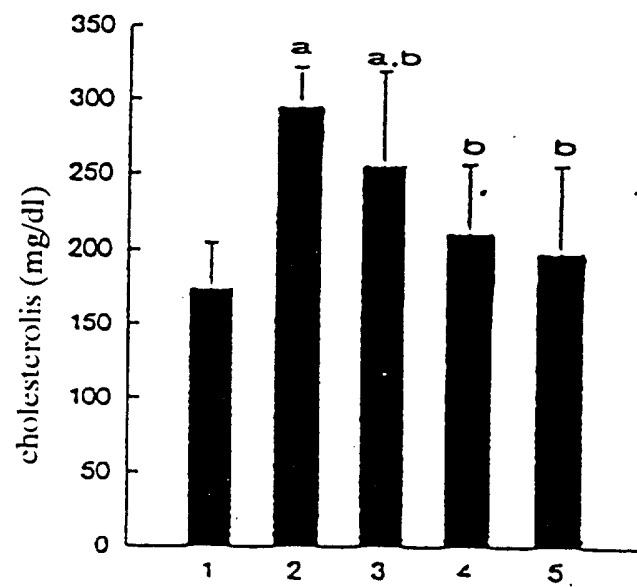
FITOSTEROLIŲ POVEIKIS Į HDL



11/23

FIG 11

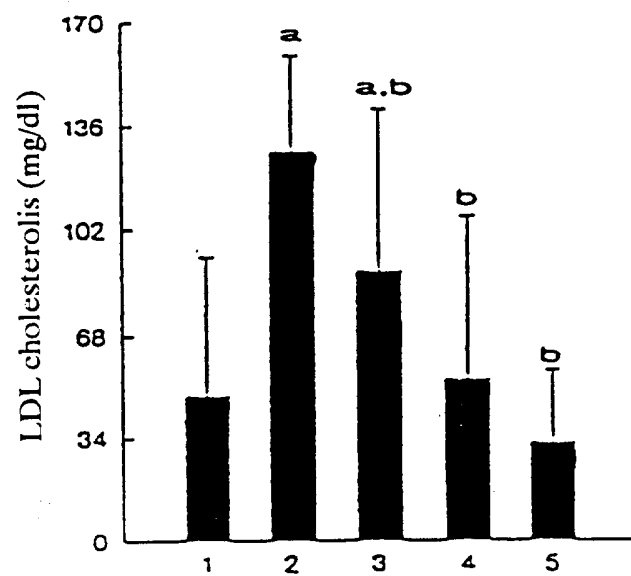
Fitosterolių poveikis į bendrą serumo cholesterolį



12/23

FIG 12

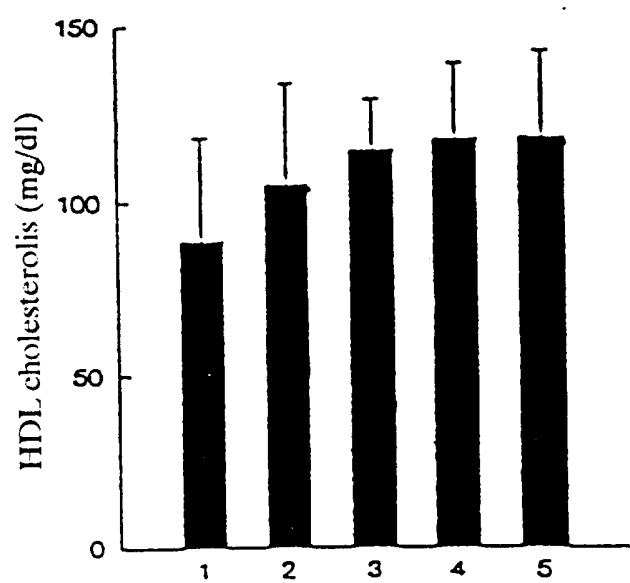
Fitosterolių poveikis į serumo LDL cholesterolį



13/23

FIG 13

Fitosterolių poveikis į serumo HDL cholesterolį



14/23

FIG 14

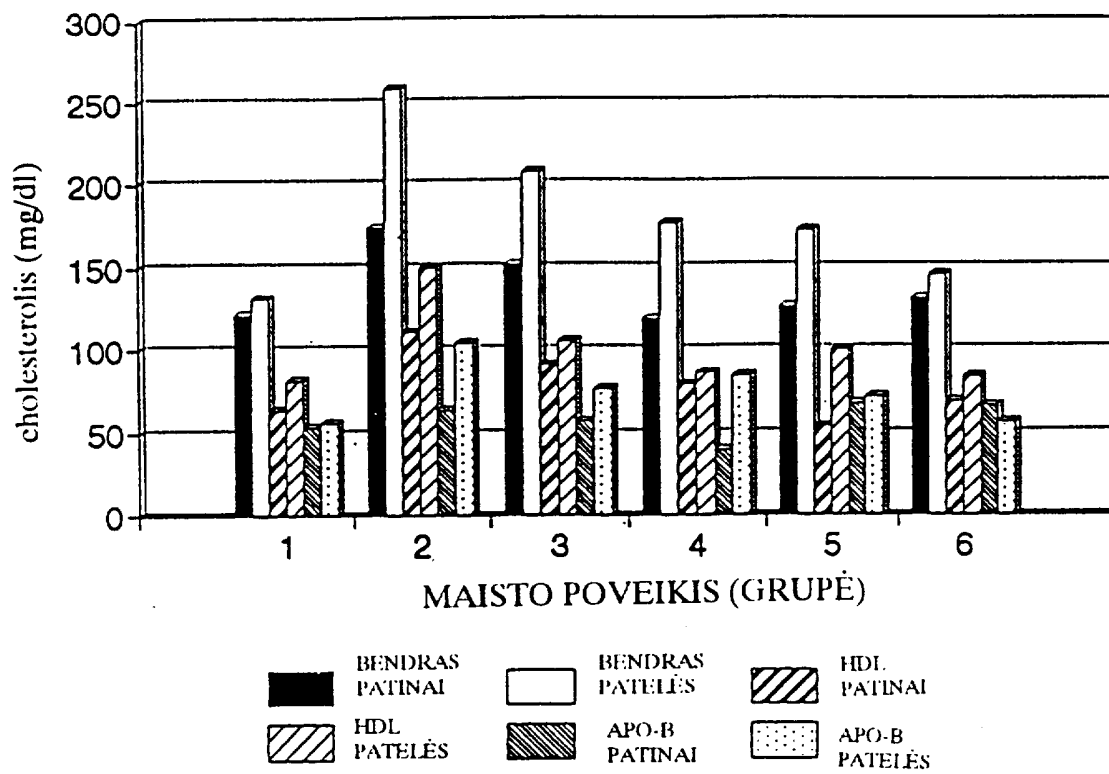
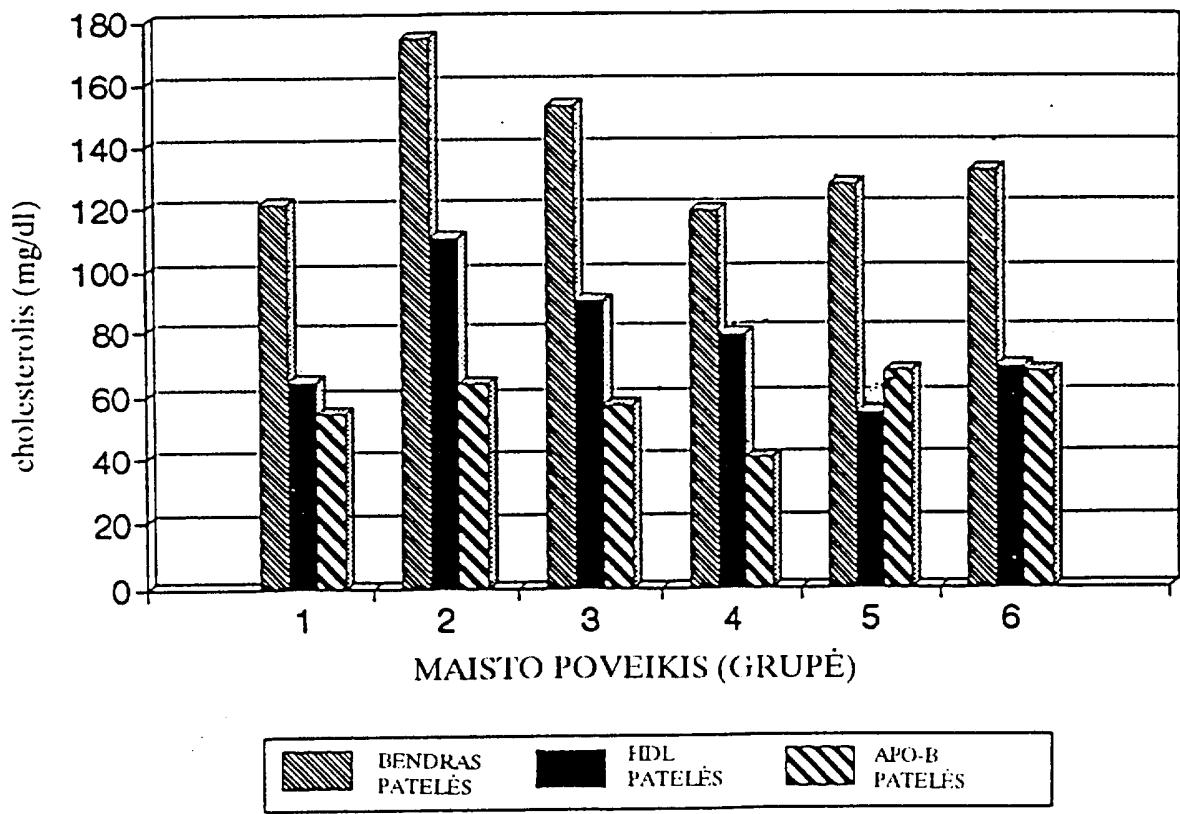
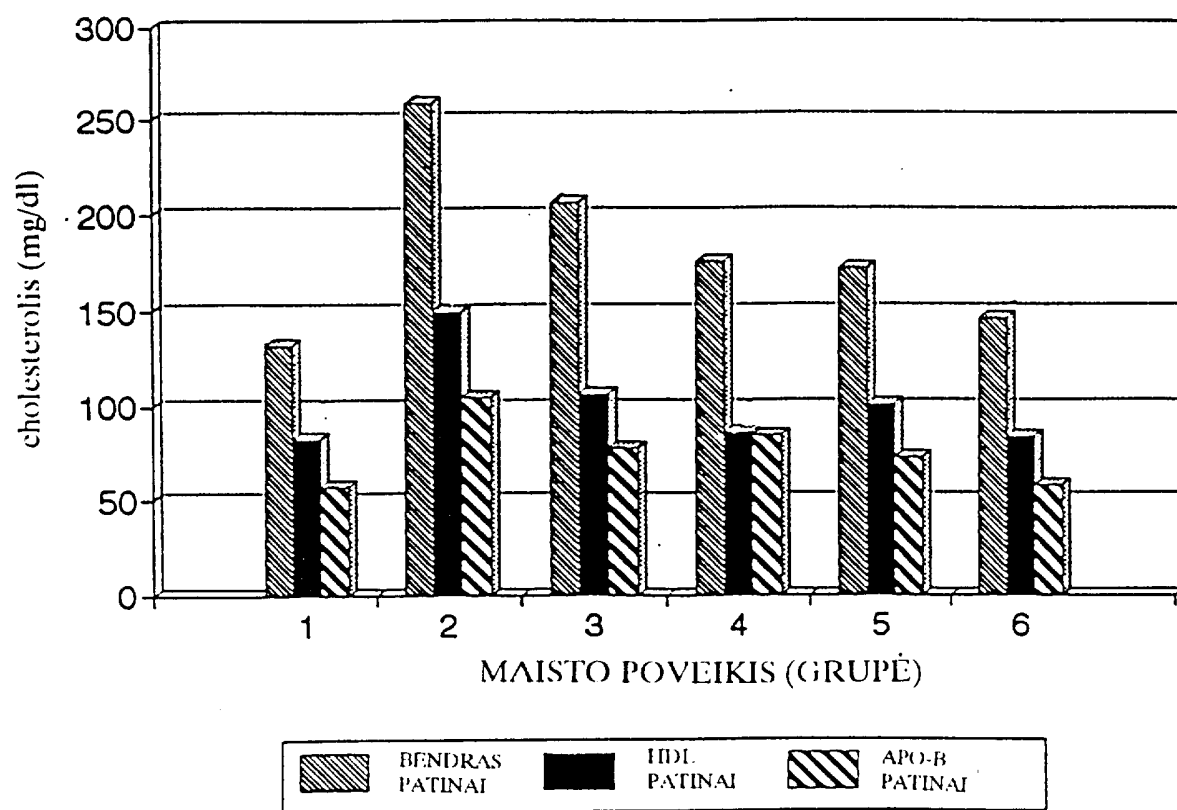


FIG 15



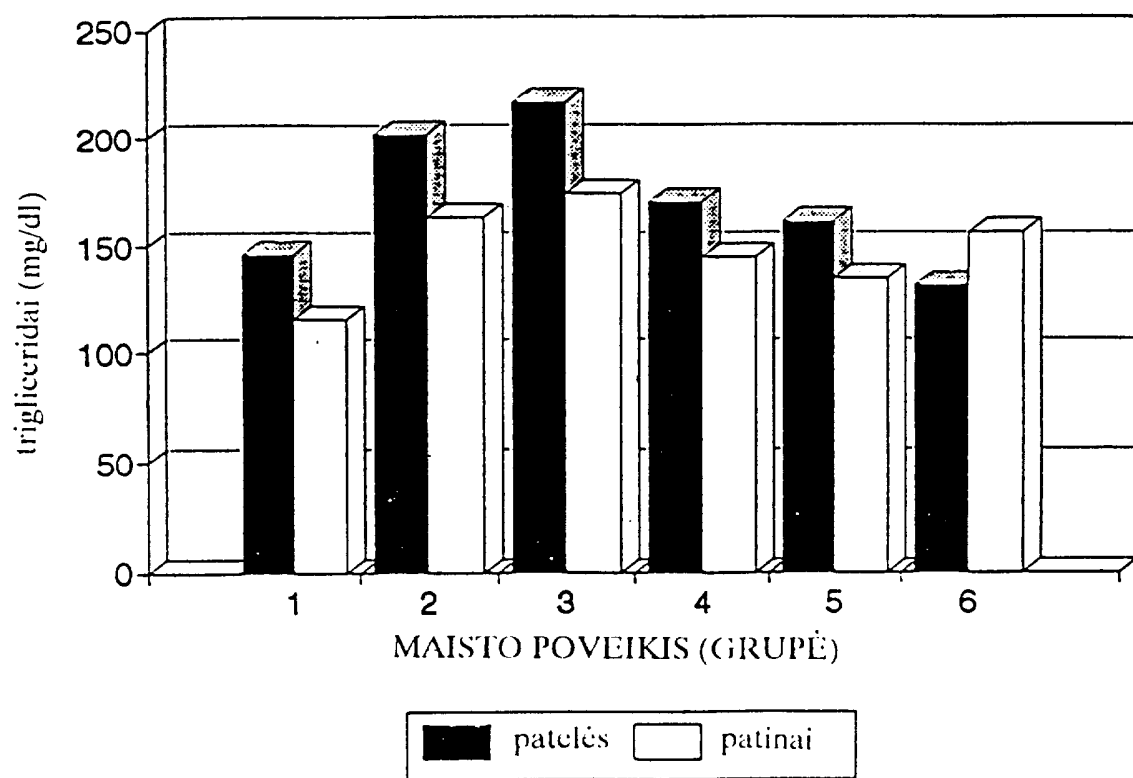
16/23

FIG 16



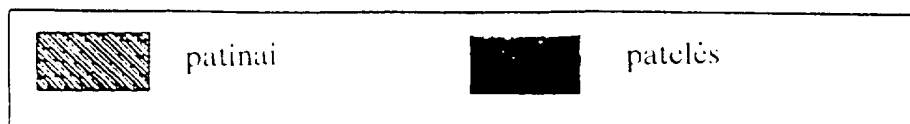
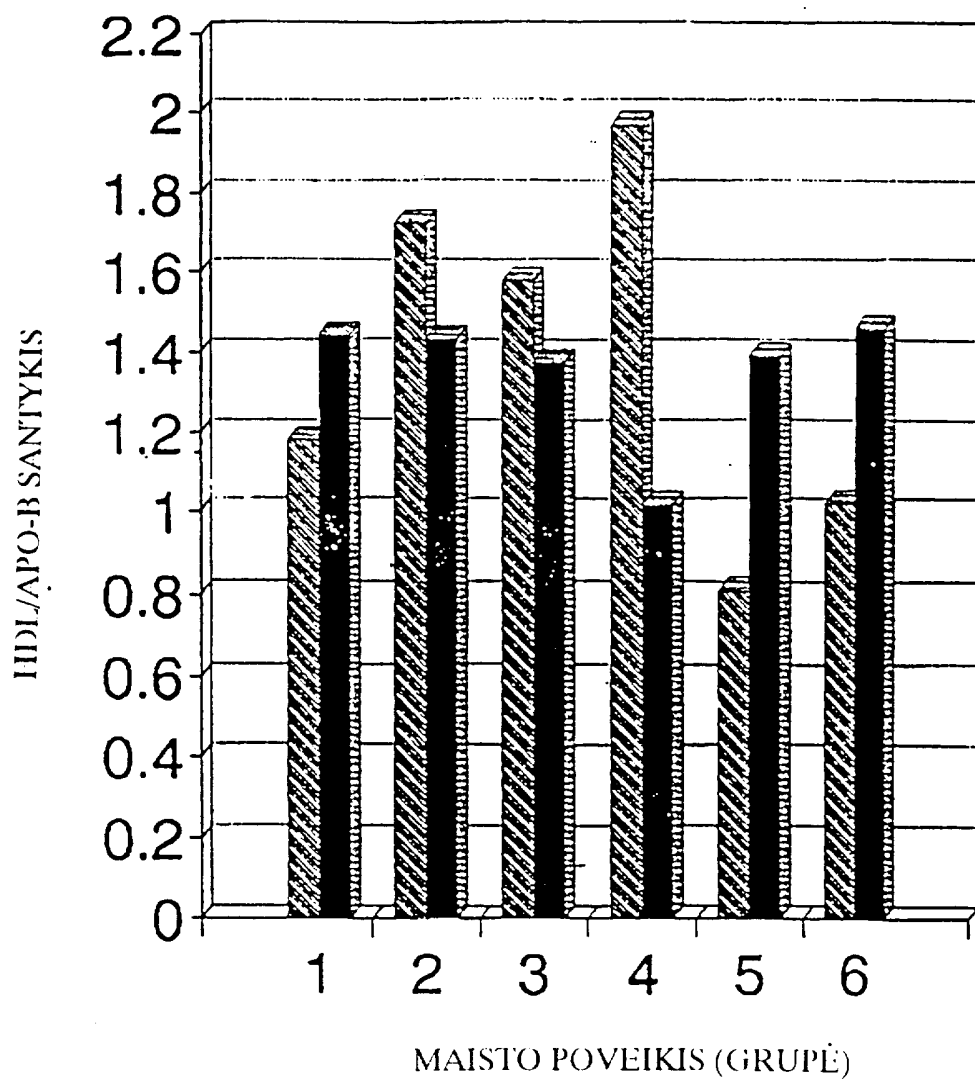
17/23

FIG 17



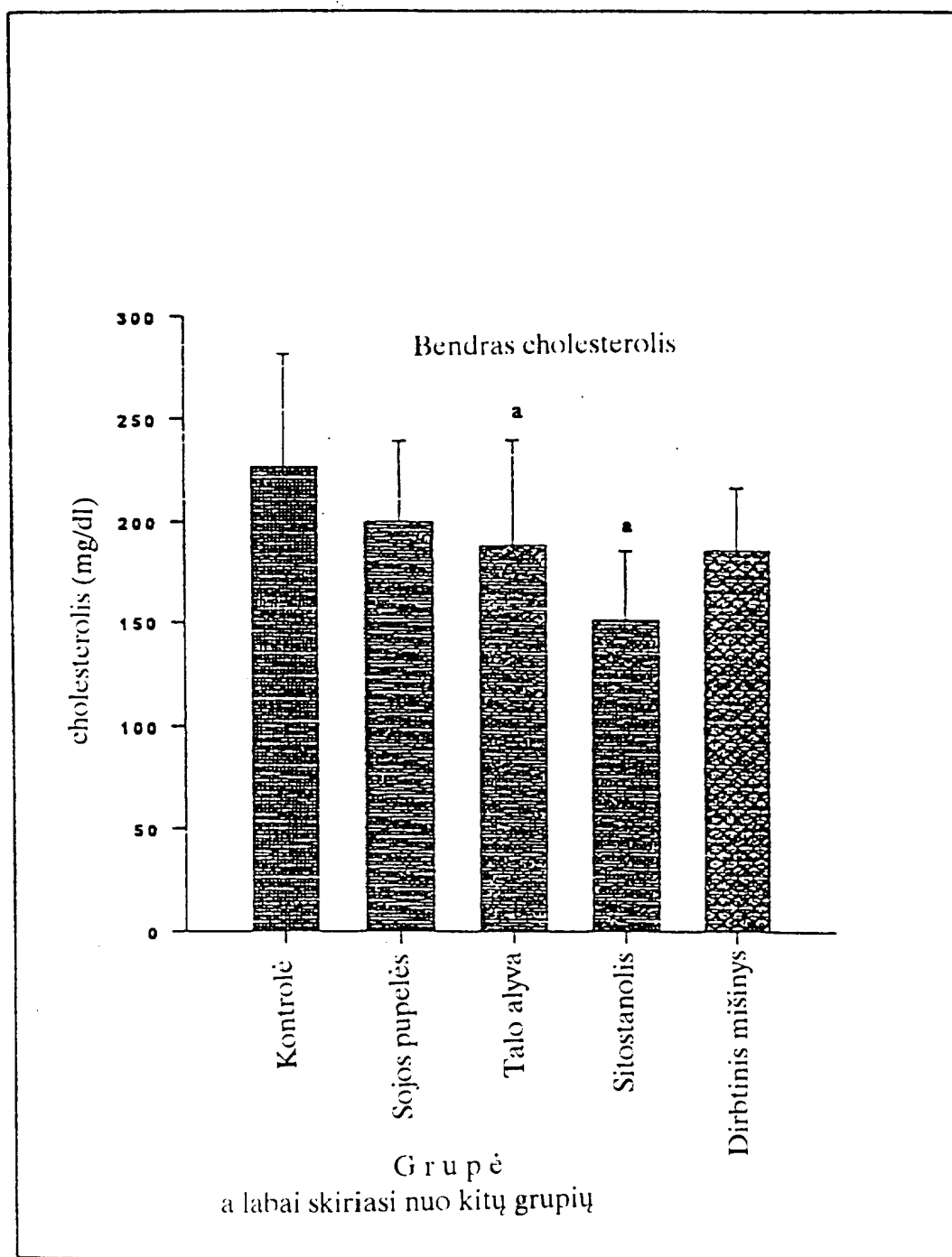
18/23

FIG 18



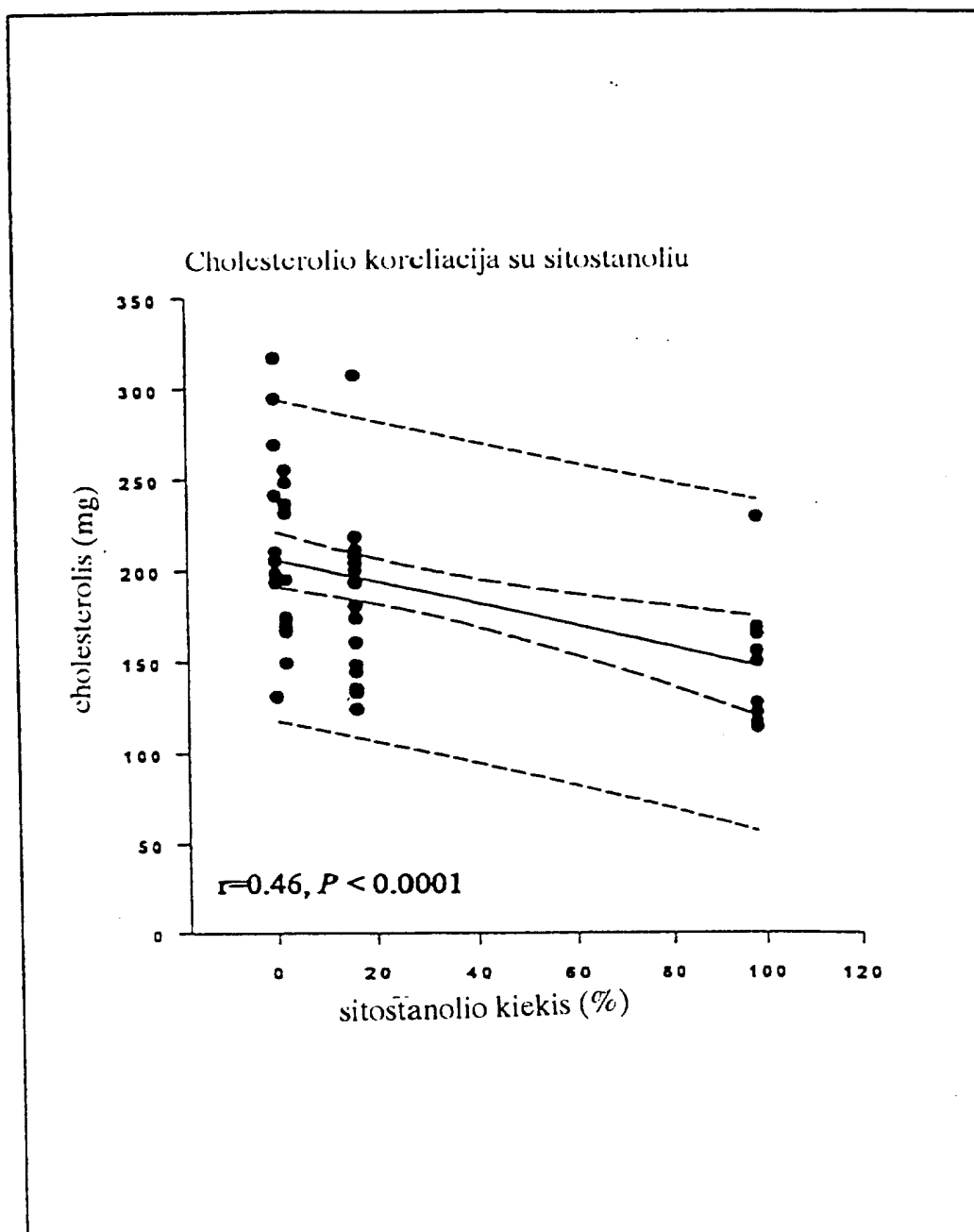
19/23

FIG 19



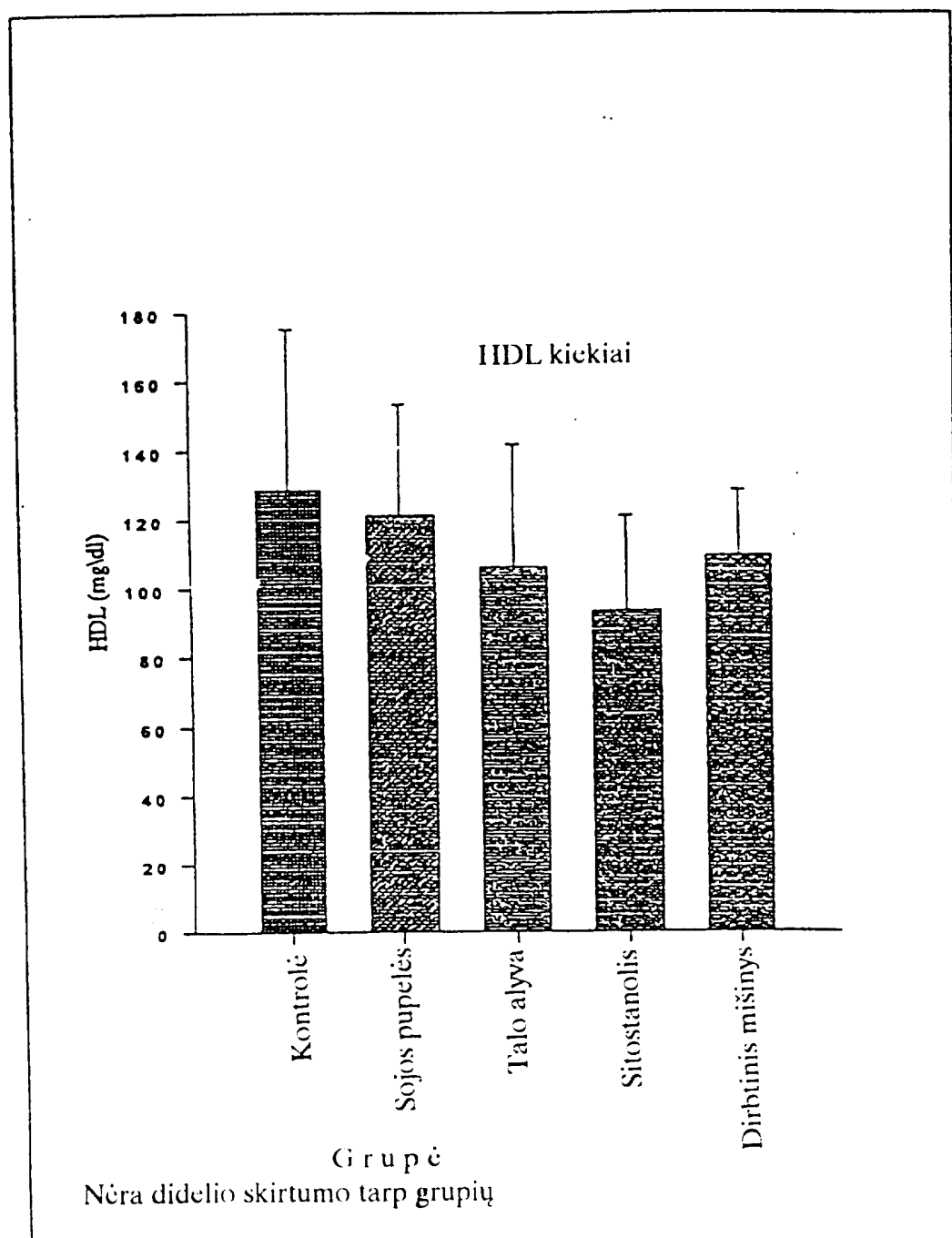
20/23

FIG 20



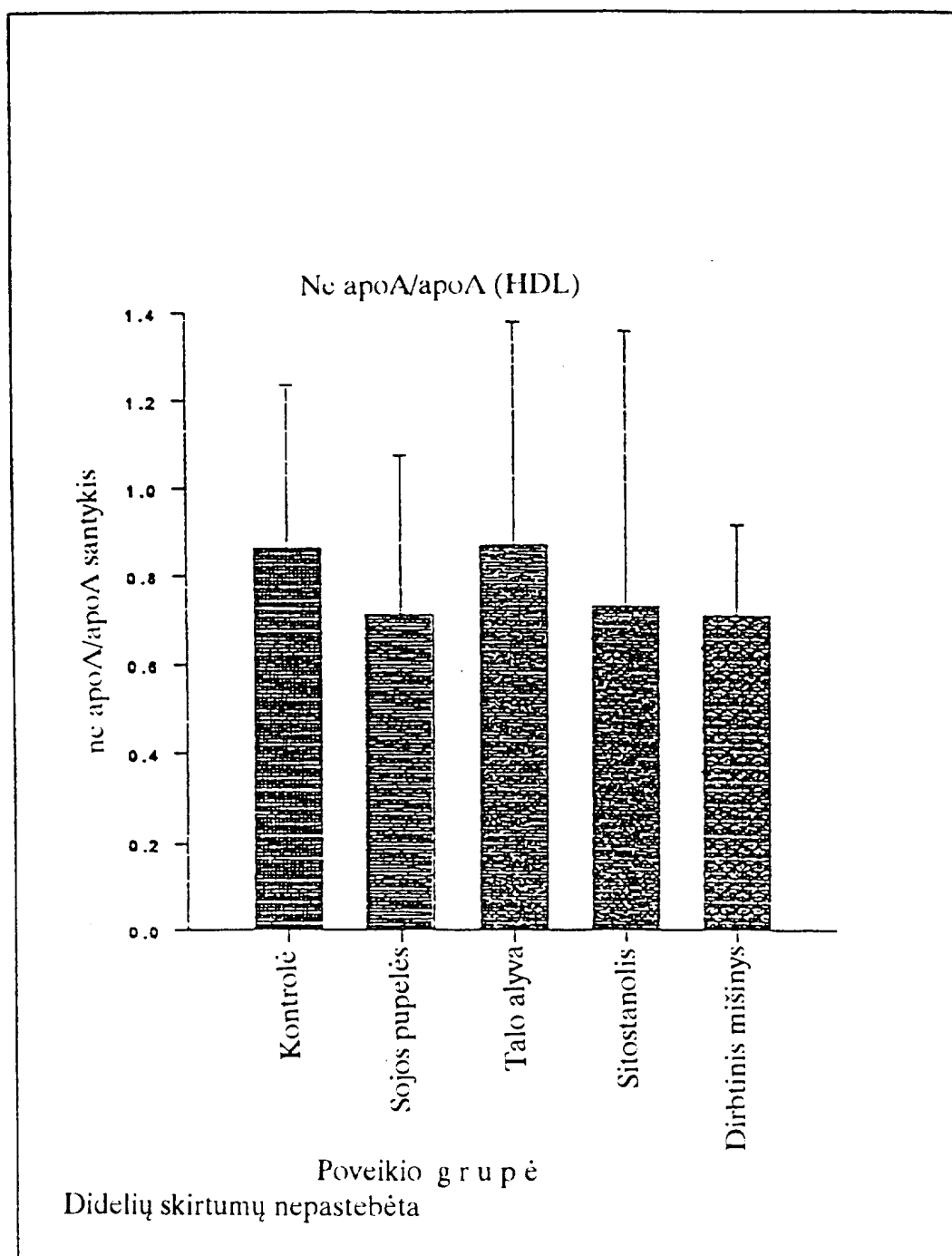
21/23

FIG 21



22/23

FIG 22



23/23

FIG 23

