

(19)



(10)

LT 4322 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4322**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 31/35**

A01N 43/16

(21) Paraiškos numeris: **97-077**

C07D 313/00

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 04 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1998 01 26**

(45) Patento paskelbimo data: **1998 04 27**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/12963**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 10 03**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 04 29**

(31, 32, 33) Prioritetas: **317226, 1994 10 03, US**

(72) Išradėjas:

Jr. Leo J. Romanczyk,, US

Jr. John F. Hammerstone,, US

Margaret M. Buck, US

(73) Patento savininkas:

MARS, INCORPORATED, 6885 Elm Street, McLean, Virginia 22101, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Antineoplazminiai kakavos ekstraktai, jų gavimo būdai ir panaudojimas

(57) Referatas:

Išradime aprašomi kakavos ekstraktai, turintys polifenolių, geriausiai procianidinių, tokių ekstraktų gavimo būdai, o taip pat ir jų, kaip antineoplazminių agentų arba antioksidantų, panaudojimas.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su kakavos ekstraktais, tokiais kaip polifenoliai, geriau praturtinti procianidiniais fenoliai. Šis išradimas taip pat susijęs su tokių ekstraktų gavimo būdais, o taip pat ir su šių ekstraktų, pavyzdžiui, kaip antineoplazminių agentų ir antioksidantų, panaudojimu.

Šiame aprašyme cituojamų dokumentų pilni duomenys yra duoti literatūros skyrelyje šio aprašymo gale prieš apibrėžtį. Šie dokumentai susiję su šio išradimo sritimi; visi jie pridedami kaip literatūros šaltiniai.

Išradimo kilmė

Polifenoliai yra nepaprastai įvairi junginių grupė (Ferreira, D., Steynberg, J.P., Roux, D.G. and Brandt, E.V., Diversity of Structure and Function in Oligomeric Flavanoids, Tetrahedron, **48**:10, 1743-1803 (1992), kurie plačiai sutinkami įvairiuose augaluose; kai kurie iš jų įeina į maisto grandinę. Kai kuriais atvejais jie atstovauja svarbią žmogaus maistui junginių klasę. Nors kai kurie polifenoliai laikomi nemaistiniais, susidomėjimais šiais junginiais atsirado dėl jų galimo naudingo poveikio sveikatai. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad kvercetas (flavonoidas) pasižymi antikarcinogeniniu aktyvumu bandymuose su eksperimentiniais gyvuliukais (Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G and Newmark, H.L., Quercetin and Rutin as Inhibitors of Azoxymethanol - Induces Colonic Neoplasia, Carcinogenesis, **7**, 1193-1196 (1991) Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S. and Sugimura, T., Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate Induced Tumor Promotion and Ornithine Decarboxylase Activity by Quercetin: Possible Involvement of Lipxygenase Inhibition, Carcinogenesis, **4**, 1301-1305 (1983). Buvo parodyta, kad (+)-katechinas ir (-)-epikatechinas (flavan-3-olis) inhibuoja *Leukemia* viruso atvirkštinės transkriptazės aktyvumą (Chu, S.-C., Hsieh, Y.-S. and Lim, J.-Y., Inhibitory Effects of Flavanoids on Maloney Murine

Leukemia Virus Reverse Transcriptase Activity, *J. of Natural Products*, **55**;2, 179-183 (1992). Taip pat buvo parodyta, kad nobotaninas (oligomerinis hidrolizuojamas taninas) pasižymi priešnavikiniu aktyvumu (Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T., *Molecular Structures and Pharmacological Activities of Polyphenols - Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Others - Presented at the XVIth International Conference of the Groupe Polyphenols*, Lisbon, Portugal, July 13-16, 1992). Statistikos duomenys taip pat parodė, kad mirtingumas nuo skrandžio vėžio yra daug mažesnis arbatą gaminančiose Japonijos srityse. Buvo aprašyta, kad epigalokatechino galatas yra farmakologiškai aktyvi medžiaga žaliojoje arbatoje, kuri stabdo pelių odos auglius (Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T., *Molecular Structures and Pharmacological Activities of Polyphenols - Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Others - Presented at the XVIth International Conference of the Groupe Polyphenols*, Lisbon, Portugal, July 13-16, 1992). Taip pat buvo parodyta, kad elago rūgštis pasižymi antikarcinogeniniu aktyvumu įvairiuose gyvuliukų auglių modeliuose (Boukharta, M., Jalbert, G. and Castonguay, A., *Efficacy of Ellagitannins and Ellagic Acid as Cancer Chemopreventive Agents - International Conference of the Groupe Polyphenols*, Lisbon, Portugal, July 13-16, 1992). Galų gale proantocianidino oligomerus užpatentavo Kikkoman Corporation, jų kaip antimutagenų panaudojimui. Iš tiesų, fenolinių junginių, kaip maisto produktų ir jų sugebėjimo moduluoti auglių augimą eksperimentinių gyvuliukų modeliuose, sritis neseniai buvo aptarta 22-jame Nacionaliniame Amerikos Chemikų Draugijos suvažiavime (National Meeting of The American Chemical Society) (Phenolic Compounds in Foods and Their Effects on Health II. Antioxidants & Cancer Prevention, Huang, M.-T., Ho, C.-T., and Lee, C.Y. editors, ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, D.C. (1992) ir Phenolic Compounds in Foods and Their Effects on Health I. Analysis, Occurrence & Chemistry, Ho, C.-T., Lee, C.Y., and Huang, M.-T editors, ACS Symposium Series 506, American Chemical Society, Washington, D.C. (1992).

Tačiau nei viename iš šių pranešimų nesvarstomi ir nesiūlomi kakavos ekstraktai, tokių ekstraktų gavimo būdai arba koks nors kakavos ekstraktų, kaip antineoplazminių agentų, panaudojimas.

Kadangi nefermentuotos kakavos pupelės turi gana didelius polifenolių kiekius, išradėjai laiko galimu dalyku, kad kakavos ekstraktai turės panašų aktyvumą ir turės panašią panaudojimo galimybę, pvz., kakavoje esantys junginiai gali būti nustatyti, išekstrahuojant tokius junginius iš kakavos ir tikrinant ekstraktų aktyvumą. Nacionalinis Vėžio institutas (National Cancer Institute) atliko įvairių *Theobroma* ir *Herrania* veislių priešvėžinio aktyvumo skryningą, kuris buvo jų plataus gamtinių produktų selekcijos programos dalis. Buvo paskelbta, kad kai kurių kakavos audinių ekstraktų aktyvumas yra nedidelis, ir darbas nebuvo tęsiamas. Taigi, antineoplazminių arba priešvėžinių tyrimų srityje kakava ir jos ekstraktai nelaikomi naudingais; t.y. antineoplazminių ir priešvėžinių tyrimų sukauptos žinios šios srities specialistus nuveda į šalį nuo kakavos ir jos ekstraktų panaudojimo vėžio terapijoje. Kadangi buvo sukurta daug analizės metodikų kakavos polifenolių įnašui į skonį tirti (Clapperton, J., Hammerstone, J.F. Jr., Romanczyk, L.J. Jr., Chan, J., Yow, S., Lim, D. and Lockwood, R., Polyphenols and Cocoa Flavor - International Conference of the Groupe Polyphenols, Lisbon, Portugal, July 13-16, Presented at the XVIth International Conference of the Groupe Polyphenols, Lisbon, Portugal, July 13-16, 1992), išradėjai nusprendė panaudoti analogiškus metodus gauti mėginiams, skirtiems priešvėžiniam skryningui, nežiūrint į antineoplazminių arba priešvėžinių tyrimų srityje turimas žinias. Netikėtai ir priešingai iki šiol žinomiems faktams, pvz. Nacionalinio Vėžio institute atliktam skryningui, išradėjai atrado, kad kakavos ekstraktai, kuriuose yra procianidinių, yra labai naudingi, kaip priešvėžiniai arba antineoplazminiai agentai. Be to, išradėjai parodė, kad procianidinių turintys kakavos ekstraktai gali būti panaudojami kaip antioksidantai.

Išradimo tikslai ir santrauka

Šio išradimo tikslas yra sukurti kakavos ekstraktų gavimo būdą.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti kakavos ekstraktą.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti antioksidantinę kompoziciją.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra parodyti DNR topoizomerazės II fermento aktyvumo inhibavimą.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra kakavos ekstraktų panaudojimas auglių ir vėžio gydymui.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti priešvėžines, priešnavikines arba antineoplazmines kompozicijas.

Tolimesnis šio išradimo tikslas yra pateikti priešvėžinių, priešnavikinių arba antineoplazminių kompozicijų gavimo būdą.

Be to, šio išradimo tikslas yra pateikti rinkinį, skirtą panaudoti auglių arba vėžio gydymui.

Netikėtai buvo atrasta, kad kakavos ekstraktas pasižymi priešnavikiniu, priešvėžiniu arba antineoplazminiu aktyvumu; arba jis yra antioksidantinė kompozicija; arba jis inhibuoja DNR topoizomerazės II fermento aktyvumą. Šiame išradime pateikiamas iš esmės grynas kakavos ekstraktas. Pageidautina, kad ekstrakto būtų polifenolio(ių), tokio kaip polifenolis(iai), praturtintas kakavos procianidinu(ais), tokiais kaip polifenoliai, turintys bent vieną kakavos procianidiną, pasirinktą iš (-)-epikatechino, procianidino B-2, procianidino oligomerų 2-12, geriau 2-5 arba 4-12, procianidino B-5, procianidino A-2 ir procianidino C-1. Šis išradimas taip pat pateikia priešnavikines, priešvėžines arba antineoplazmines, arba antioksidantines, arba DNR topoizomerazės II inhibitoriausias kompozicijas, į kurias įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas arba sintetinis kakavos polifenolis(iai), toks kaip polifenolis(iai), praturtintas procianidinu(ais), ir tinkamas nešiklis. Pageidautina, kad ekstrakto būtų kakavos procianidino(ų). Geriausia kakavos ekstraktą gauti būdu, kuris susideda iš kakavos pupelių sumalimo į miltus, šių miltų nuriebalinimo ir aktyvaus junginio(ių) išekstrahavimo iš šių miltų.

Be to, šis išradimas apima kakavos ekstraktų panaudojimą gydyti pacientams, kuriuos reikia gydyti priešnavikiniais, priešvėžiniais arba antineoplazminiais

agentais, arba antioksidantais, arba DNR topoizomerazės II inhibitoriais, skiriant jiems kompoziciją, į kurią įeina efektyvus kiekis iš esmės gryno kakavos ekstrakto arba sintetinio kakavos polifenolio(ių), arba procianidino(ų), ir nešiklis. Kakavos ekstraktas gali būti kakavos procianidinas(ai); jį geriausia gauti, sumalant kakavos pupeles į miltus, nuriebalinant šiuos miltus ir išekstrahuojant veiklųjį junginį(ius) iš šių miltų.

Be to, šis išradimas pateikia rinkinį gydymui paciento, kurį reikia gydyti priešnavikiniu, priešvėžiniu arba antineoplazminiu agentu, arba antioksidantu, arba DNR topoizomerazės II inhibitoriumi; į šį rinkinį įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas arba sintetinis kakavos polifenolis(iai) ir tinkamas nešiklis, kurį galima sumaišyti su ekstraktu arba sintetiniu polifenoliu(iais) arba procianidinu(ais).

Šie ir kiti tikslai ir realizavimo variantai yra atskleisti arba paaiškės iš toliau duodamo smulkaus išradimo aprašymo.

Trumpas brėžinių aprašymas

Toliau duodamas smulkus aprašymas bus geriau suprantamas, pailiustruojant jį pridedamais brėžiniais, kuriuose:

Fig.1 parodyta būdinga nevalytų kakavos procianidinių frakcionavimo gelio pralaidumo chromatograma;

Fig.2A parodyta būdinga kakavos procianidinių, išekstrahuotų iš nefermentuotos kakavos, atvirkščiosios fazės HPLC chromatograma, rodanti atskyrimą (išplovimo vaizdą);

Fig.2B parodytas būdingas kakavos procianidinių, išekstrahuotų iš nefermentuotos kakavos, normalios fazės HPLC atskyrimas;

Fig.3 parodytos keletas būdingų procianidinių struktūros;

Fig.5 ir 6A-6D parodytos dozės-atsako priklausomybės tarp kakavos ekstraktų ir ACHN (fig.5) ir PC-3 (fig.6A-6D) (išlikimo dalis priklauso nuo dozės, µg/ml); M&M2 F4/92, M&MA+E U12P1, M&MB+E Y192P1, M&MC+E U12P2, M&MD+E U12P2;

Fig.7A-7H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, A+B, A+E ir A+D frakcijų ir PC-3 ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 0212P3, MM-1 B 0162P1, MM-1 C 0122P3, MM-1 D 0122P3, MM-1 E 0292P8, MM-1 A/B 0292P6, MM-1 A/E 0292P6, MM-1 A/D 0292P6;

Fig.8A-8H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, A+B, B+E ir D+E frakcijų ir Nasopharyngeal/HeLa ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 092K3, MM-1 B 0212K5, MM-1 C 0162K3, MM-1 D 0212K5, MM-1 E 0292K5, MM-1 A/B 0292K3, MM-1 B/E 0292K4, MM-1 D/E 0292K5;

Fig.9A-9H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, B+D, A+E ir D+E frakcijų ir HTC-116 ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 C 0192H5, D 0192H5, E 0192H5, MM-1 B&D 0262H2, A/E 0262H3, MM-1 D&E 0262H1;

Fig.10A-10H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, B+D, C+D ir A+E frakcijų ir ACHN inkstų ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 092A5, MM-1 B 092A5, MM-1 C 0192A7, MM-1 D 0192A7, M&M1 E 0192A7, MM-1 B&D 0302A6, MM-1 C&D 0302A6, MM-1 A&E 0262A6;

Fig.11A-11H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, A+E, B+E ir C+E frakcijų ir A-549 plaučių ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 019258, MM-1 B 09256, MM-1 C 019259, MM-1 D 019258, MM-1 E 019258, A/E 026254, MM-1 B&E 030255, MM-1 C&E N6255;

Fig.12A-12H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinų A, B, C, D, E, B+C, C+D ir D+E frakcijų ir SK-5 melanomos ląstelių linijos (išlikimo dalis priklausomai nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A 0212S4, MM-1 B 0212S4, MM-1 C 0212S4, MM-1 D 0212S4, MM-1 E N32S1, MM-1 B&C N32S2, MM-1 C&D N32S3, MM-1 D&E N32S3;

Fig.13A-13H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių A, B, C, D, E, B+C, C+E ir D+E frakcijų ir MCF-7 krūties ląstelių linijos (išlikimo dalis priklauso nuo dozės, $\mu\text{g/ml}$); MM-1 A N22M4, MM-1 B N22M4, MM-1 C N22M4, MM-1 D N22M3, MM-1 E 0302M2, MM-1 B/C 0302M4, MM-1 C&E N22M3, MM-1 D&E N22M3;

Fig.14 parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos ekstrakto procianidino (konkrečiau D frakcijos) ir CCRF-CEM T-ląstelės leukemijos ląstelių linijos (ląstelės/ml priklauso nuo augimo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai yra 125 μg D frakcijos, neužtušuoti apverstai trikampiai yra 250 μg D frakcijos, užtušuoti apverstai trikampiai yra 500 μg D frakcijos);

Fig.15A parodyta XTT ir kristalvioleto citotoksiškumo MCF-7 p168 krūties vėžio ląstelėms, apdorotoms D+E frakcija, palyginimo bandymai (neužtušuoti apskritimai yra XTT, o užtušuoti apskritimai yra kristalvioletas);

Fig.15B parodyta tipiška dozės-atsako kreivė, gauta MDA MB231 krūties ląstelių linijai, paveiktai įvairiais nevalytų polifenolių, gautų iš UIT-1 kakavos genotipo, kiekiais (optinis tankis (540 nm) priklauso nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - tirpiklis, neužtušuoti apverstai trikampiai - 250 $\mu\text{g/ml}$, užtušuoti apverstai trikampiai - 100 $\mu\text{g/ml}$, neužtušuoti kvadratėliai - 10 $\mu\text{g/ml}$; optinis tankis 2,0 yra didžiausias plokštelės atskaitymas, ir jis nebūtinai rodo ląstelių skaičių);

Fig.15C parodyta tipiška dozės-atsako kreivė, gauta PC-3 prostatos vėžinių ląstelių linijai, paveiktai įvairiais nevalytų polifenolių, gautų iš UIT-1 kakavos genotipo, kiekiais (optinis tankis (540 nm) priklauso nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - tirpiklis, neužtušuoti apverstai trikampiai - 250 $\mu\text{g/ml}$, užtušuoti apverstai trikampiai - 100 $\mu\text{g/ml}$, neužtušuoti kvadratėliai - 10 $\mu\text{g/ml}$);

Fig.15D parodyta tipiška dozės-atsako kreivė, gauta MCF-7 p168 krūties vėžio ląstelių linijai, paveiktai įvairiais nevalytų polifenolių, gautų iš UIT-1 kakavos

genotipo, kiekiais (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - tirpiklis, neužtušuoti apversti trikampiai - 250 µg/ml, užtušuoti apversti trikampiai - 100 µg/ml, neužtušuoti kvadratėliai - 10 µg/ml užtušuoti kvadratėliai - 1 µg/ml; optinis tankis 2,0 yra didžiausias plokštelės atskaitymas, ir jis nebūtinai rodo ląstelių skaičių);

Fig.15E parodyta tipiška dozės-atsako kreivė, gauta Hela gimdos kaklelio vėžio ląstelių linijai, paveiktai įvairiais nevalytų polifenolių, gautų iš UIT-1 kakavos genotipo, kiekiais (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - tirpiklis, neužtušuoti apversti trikampiai - 250 µg/ml, užtušuoti apversti trikampiai - 100 µg/ml, neužtušuoti kvadratėliai - 10 µg/ml; optinis tankis 2,0 yra didžiausias plokštelės atskaitymas, ir jis nebūtinai rodo ląstelių skaičių);

Fig.15F parodyti citotoksiški poveikiai į Hela gimdos kaklelio vėžio ląstelių liniją, paveikus įvairiomis kakavos polifenolių frakcijomis (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra 100 µg/ml A-E frakcijų, užtušuoti apskritimai - 100 µg/ml A-C frakcijų, neužtušuoti apversti trikampiai - 100 µg/ml D&E frakcijų; optinis tankis 2,0 yra didžiausias plokštelės atskaitymas, ir jis nerodo ląstelių skaičiaus);

Fig.15G parodyti citotoksiški poveikiai, esant 100 µg/ml kiekiui, į SKBR-3 krūties vėžio ląstelių liniją, paveikus įvairiomis kakavos polifenolių frakcijomis (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra A-E frakcijos, užtušuoti apskritimai - A-C frakcijos, neužtušuoti apversti trikampiai - D&E frakcijos;

Fig.15H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidino D+E frakcijų poveikio į Hela ląsteles (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - 100 µg/ml, neužtušuoti apversti trikampiai - 75 µg/ml, užtušuoti apversti trikampiai - 50 µg/ml, neužtušuoti kvadratėliai - 25 µg/ml užtušuoti kvadratėliai - 10 µg/ml;

optinis tankis 2,0 yra didžiausias plokštelės atskaitymas, ir jis nerodo ląstelių skaičiaus);

Fig.15 I parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidino D+E frakcijų poveikio į SKBR-3 ląsteles (optinis tankis (540 nm) priklausomai nuo dienų; neužtušuoti apskritimai yra kontrolė, užtušuoti apskritimai - 100 µg/ml, neužtušuoti apversti trikampiai - 75 µg/ml, užtušuoti apversti trikampiai - 50 µg/ml, neužtušuoti kvadratėliai - 25 µg/ml užtušuoti kvadratėliai - 10 µg/ml);

Fig.15J parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidino D+E frakcijų poveikio į Hela ląsteles, naudojant Soft Agar Cloning bandymą (stulpelinė diagrama; kolonijų skaičius priklausomai nuo kontrolės, 1, 10, 50 ir 100 µg/ml);

Fig.15K parodyta Hela ląstelių augimo stabdymas, paveikus nevalytais polifenolių ekstraktais, gautais iš aštuonių skirtingų kakavos genotipų (kontrolės % priklausomai nuo koncentracijos, µg/ml; neužtušuoti apskritimai yra C-1, užtušuoti apskritimai - C-2, neužtušuoti apversti trikampiai - C-3, užtušuoti apversti trikampiai - C-4, neužtušuoti kvadratėliai - C-5, užtušuoti kvadratėliai - C-6, neužtušuoti trikampiai - C-7, užtušuoti trikampiai - C-8; C-1 = UF-12: sodininkystės veislė = Criollo, o pažymėjimas yra UF-12 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-2 = NA-33: sodininkystės veislė = Forastero, o pažymėjimas yra NA-33 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-3 = EEG-48: sodininkystės veislė = Forastero, o pažymėjimas yra EEG-48 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-4 = nežinomas: sodininkystės veislė = Forastero, o pažymėjimas yra "nežinoma" (Vakarų Afrika) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-5 = UF-613: sodininkystės veislė = Trinitario, o pažymėjimas yra UF-613 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-6 = ICS-100: sodininkystės veislė = Trinitario, o pažymėjimas yra ICS-100 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas

teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-7 = ICS-139: sodininkystės veislė = Trinitario, o pažymėjimas yra ICS-139 (Brazilija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai; C-8 = UIT-1: sodininkystės veislė = Trinitario, o pažymėjimas yra UIT-1 (Malazija) kakavos (pašalintas kofeinas / pašalintas teobrominas) polifenolių nevalyti ekstraktai;

Fig.15L parodytas Hela ląstelių augimo stabdymas, paveikus nevalytais kakavos polifenolių ekstraktais, gautais iš fermentuotų kakavos pupelių ir išdžiovintų kakavos pupelių (fermentacijos ir džiovinimo saulėje eigoje; kontrolės % priklauso nuo koncentracijos, $\mu\text{g/ml}$; neužtušuoti apskritimai - nulinės dienos frakcija, užtušuoti apskritimai - 1 dienos frakcija, neužtušuoti apversti trikampiai - 2 dienos frakcija, užtušuoti apversti trikampiai - 3 dienos frakcija, neužtušuoti kvadratai - 4 dienos frakcija ir užtušuoti kvadratai - 9 dienos frakcija);

Fig.15M parodytas fermentiškai oksiduotų kakavos procianidinių poveikis į Hela ląsteles (dozė-atsakas polifenoloksidaze paveiktiems nevalytiems kakavos polifenoliams; kontrolės % priklauso nuo koncentracijos, $\mu\text{g/ml}$; užtušuoti kvadratai yra nevalyti UIT-1 (su kofeinu ir teobrominu), neužtušuoti apskritimai - nevalyti UIT-1 (be kofeino ir teobromino) ir užtušuoti apskritimai - nevalyti UIT-1 (katalizuoti polifenoloksidaze);

Fig.15N parodytas būdingas pusiau preparatyvinis kombinuotų kakavos procianidinių D ir E frakcijų atskyrimas atvirkščiosios fazės HPLC metodu;

Fig.16 parodytos tipiškos Rancimat'o oksidacijos kreivės kakavos procianidinių ekstraktams ir frakcijoms, lyginant su sintetiniais antioksidantais BHA ir BHT (sutartiniai vienetai priklauso nuo laiko; punktyrinė linija ir kryželiai (+) yra BHA ir BHT; * yra D-E; x yra nevalyti; neužtušuoti kvadratai yra A-C; o neužtušuoti rombai yra kontrolė);

Fig.17 parodytas elektroforezės agarozės gelyje vaizdas, rodantis topoizomerazės II katalizuotos kinetoplastų DNR surišimo pašalinimo inhibiciją kakavos procianidinių frakcijomis (1 takelyje yra 0,5 μg markerio (M) monomerinio ilgio kinetoplastų uždarnosios DNR; 2 ir 20 takeliuose yra kinetoplastų DNR, kuri

buvo inkubuota su topoizomerase II, esant 4 % DMSO, bet nesant kakavos procianidinų. (kontrolė - C); 3 ir 4 takeliuose yra kinetoplastų DNR, kuri buvo inkubuota su topoizomerase II, esant 0,5 ir 5,0 µg/ml A frakcijos kakavos procianidinų; 5 ir 6 takeliuose yra kinetoplastų DNR, kuri buvo inkubuota su topoizomerase II, esant 0,5 ir 5,0 µg/ml B frakcijos kakavos procianidinų; 7, 8, 9, 13, 14 ir 15 takeliai yra replikatai kinetoplastų DNR, kuri buvo inkubuoti su topoizomerase II, esant 0,05, 0,5 ir 5,0 µg/ml D frakcijos kakavos procianidinų; 10, 11, 12, 16, 17 ir 18 takeliai yra replikatai kinetoplastų DNR, kuri buvo inkubuoti su topoizomerase II, esant 0,05, 0,5 ir 5,0 µg/ml E frakcijos kakavos procianidinų; 19 takelis yra replikatas kinetoplastų DNR, kuri buvo inkubuota su topoizomerase II, esant 5,0 µg/ml E frakcijos kakavos procianidinų);

Fig.18 parodyta dozės-atsako priklausomybė tarp D frakcijos kakavos procianidinų ir tobulo ir netobulo DNR atstatymo ląstelių linijų (išlikimo dalis priklausomai nuo µg/ml; kairioji pusė - xrs-6 netobulo DNR atstatymo ląstelių linija, MM-1 D D282X1; dešinioji pusė - BR1 tobulo DNR atstatymo ląstelių linija, MM-1 D D282B1);

Fig.19 parodytos dozės-atsako kreivės adriamicinui atsparioms MCF-7 ląstelėms, lyginant su MCF-7 p168 tėvinių ląstelių linija, paveikus kakavos D+E frakcija (kontrolės % priklausomai nuo koncentracijos, µg/ml); neužtušuoti apskritimai - MCF-7 p168; užtušuoti apskritimai - MCF-7 ADR); ir

Fig.20 parodyta dozės-atsako priklausomybės Hela ląstelėms, paveikus dvylikos frakcijų, gautų normalios fazės pusiau preparatyvinės HPLC būdu, 100 µg/ml ir 25 µg/ml kiekiais (stulpelinė diagrama, kontrolės % priklausomai nuo kontrolės ir 1-12 frakcijų).

Smulkus išradimo aprašymas

Kaip aukščiau minėta, dabar buvo netikėtai atrasta, kad kakavos ekstraktai pasižymi priešvėžiniu, priešnavikiniu arba antineoplazminiu aktyvumu, antioksidantiniu aktyvumu ir inhibuoja DNR topoizomerezės II fermentą. Paprastai

kakavos ekstraktai gaminami, sumalant kakavos pupeles į miltus, nuriebalinant šiuos miltus ir išekstrahuojant veiklų junginį(ius) iš nuriebalintų miltų. Miltai gali būti gaunami džiovinant šaltyje kakavos pupeles ir pulpą, atskiriant kakavos pupeles nuo pulpos, išlukštenant šaltyje išdžiovintas kakavos pupeles ir sumalant išlukštentas pupeles. Veiklų junginį(ius) galima išekstrahuoti ekstrakcijos tirpikliais metodais. Ekstraktus galima išgryninti, pavyzdžiui, gelio pralaidumo chromatografijos arba preparatyvinės didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodais arba kombinuojant tokius metodus. Buvo nustatyta, kad aktyvūs ekstraktai, nebūtinai bandant surišti juos su tam tikra teorija, yra kakavos polifenoliai, tokie kaip procianidinai. Šie kakavos procianidinai turi žymų priešvėžinį, priešnavikinį arba antineoplazminį aktyvumą, antioksidantinį aktyvumą ir inhibuoja DNR topoizomerazės II fermentą.

Priešvėžinės, priešnavikinės arba antineoplazminės, arba antioksidantinės, arba DNR topoizomerazės II fermentą inhibuojančios kompozicijos, į kurias įeina šio išradimo kakavos polifenoliai arba procianidinai, gali būti pagaminamos standartiniais, farmacijos specialistams žinomais būdais. Tokios kompozicijos gali būti skiriamos pacientui, kuriam reikalingas toks skyrimas, tokiomis dozėmis ir būdais, kuriuos gerai žino medicinos specialistai, priimant dėmesin tokius faktorius, kaip paciento amžių, lytį, svorį ir atskiro paciento stovį bei vaisto vartojimo būdą. Kompozicijos gali būti vartojamos kartu arba pakaitomis su kitais antineoplazminiais, priešnavikininiais arba priešvėžiniais agentais arba antioksidantiniais, arba DNR topoizomerazės II fermentą inhibuojančiais agentais ir/arba su agentais, kurie sumažina arba palengvina antineoplazminių, priešnavikinių arba priešvėžinių, arba antioksidantinių, arba DNR topoizomerazės II fermentą inhibuojančių agentų kenksmingą poveikį, vėl gi priimant dėmesin tokius faktorius, kaip amžius, lytis, svoris ir atskiro paciento stovis, bei vaisto vartojimo būdas.

Šio išradimo kompozicijų pavyzdžiai apima kietas peroralinio vartojimo kompozicijas, tokias kaip kapsulės, tabletės, piliulės ir pan., o taip pat kramtomas

kietas kompozicijas, kurioms šis išradimas yra labai tinkamas, nes jos yra iš valgomo šaltinio (pvz., kakava arba šokoladu paskanintos kietos kompozicijos); skystus preparatus įvedimui per angas, pvz., peroraliniam, nazaliniam, analiniam, vaginaliniam ir t.t. vartojimo būdui tinkamas kompozicijas, tokias kaip suspensijos, sirupai arba eleksyrai; ir preparatus parenteriniam, subkutaniniam, intraderminiam, intraraumeniniam arba intraveniniam vartojimui (pvz., vartojimui injekcijų būdu), tokias kaip sterilios suspensijos arba emulsijos. Tačiau veiklusis ingredientas šiose kompozicijose gali sudaryti kompleksus su baltymais, ir tuo atveju, jei jis bus įleidžiamas į kraują, gali būti sukeltas krešėjimas dėl kraujo baltymų nusėdimo, ir tai patyręs specialistas turi turėti omenyje. Tokiose kompozicijose veiklusis kakavos ekstraktas gali būti sumaišomas su tinkamu nešikliu, skiedikliu arba pagalbine medžiaga, tokia kaip sterilus vanduo, fiziologinis druskos tirpalas, gliukozė ir pan. Šio išradimo kakavos ekstraktas gali būti paruošiamas liofilizuotoje formoje, skirtoje ištirpinimui, pavyzdžiui, izotoniniame vandeniniame druskos buferyje.

Be to, šis išradimas taip pat apima rinkinį, kuriame pateikiamas aktyvusis kakavos ekstraktas. Rinkinyje gali būti atskira dėžutė, kurioje yra tinkamas nešiklis, skiediklis arba pagalbinė medžiaga. Rinkinyje taip pat gali būti papildomas priešvėžinis, priešnavikinis arba antineoplazminis agentas, arba antioksidantas, arba DNR topoizomerazės II fermentą inhibuojantis agentas ir/arba agentas, kuris sumažina arba palengvina antineoplazminių, priešnavikinių arba priešvėžinių agentų, arba antioksidantinių, arba DNR topoizomerazės II fermentą inhibuojančių agentų kenksmingus poveikius, skirtas vartoti kartu arba pakaitomis su išradimo veikliuoju komponentu. Papildomas agentas(ai) gali būti pateikiamas atskiroje dėžutėje(se) arba gali būti sumaišytas su veikliuoju kakavos ekstraktu. Be to, rinkinyje gali būti ingredientų sumaišymo arba suderinimo ir/arba vartojimo instrukcijos.

Be to, kadangi šiame išradime aprašomi kakavos ekstraktai, kuriuose pageidautina, kad būtų procianidinių, iš šio aprašymo patyręs chemikas-organikas galės įvertinti ir numatyti galimus sintetinius veikliųjų junginių gavimo būdus. Tokiu

būdu, šis išradimas apima ir sintetinius kakavos polifenolius arba procianidinus, arba jų darinius, kurie apima (bet neapsiriboja) glikozidus, galatus, esterius ir t.t. ir pan.

Toliau duodami pavyzdžiai yra skirti iliustracijai ir neturi būti laikomi, kaip šio išradimo apribojimas; gali būti daug jų variacijų, nenukrypstant nuo išradimo srities ir objekto.

PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys: Kakavos šaltinis ir paruošimo būdas

Keletas *Theobroma cacao* genotipų, kurie atstovauja tris pripažintas kakavos sodininkystės veisles (Enriquez G.A. and Soria J.V., Cocoa Cultivars Register IICA, Turrialba, Costa Rica (1967; Engels J.M.M., Genetic Resources of Cacao: A Catalogue of the CATIE Collection, Tech. Bull. 7, Turrialba, Costa Rica (1981), buvo gauta iš trijų pagrindinių kakavų auginančių pasaulio šaltinių. Šių genotipų, naudotų šiame darbe, sąrašas duotas 1 lentelėje. Nuskintos kakavos ankštys buvo išlukštenamos ir pupelės su minkšta mase apdorojamos džiovinant šaltyje. Minkšta masė rankiniu būdu atskiriama nuo šaltai išdžiovintos masės, o pupelės analizuojamos toliau duodamu būdu. Nuo nefermentuotų, šaltai išdžiovintų kakavos pupelių iš pradžių rankiniu būdu nuimami lukštai, ir pupelės sumalamos į smulkius miltus TEKMAR malūnu. Tada gauta masė nuriebalinama per naktį Soxlet'o ekstraktoriumi, tirpikliu naudojant perdistiliuotą heksaną. Tirpiklio liekana pašalinama iš nuriebalintos masės, vakuumuojant kambario temperatūroje.

1 lentelė: *Theobroma cacao* medžiagos šaltinio aprašymas

Genotipas	Kilmė	Sodininkystės veislė
UIT-1	Malazija	Trinitario
Nežinoma	Vakarų Afrika	Forastero
ICS-100	Brazilija	Trinitario
ICS-39	Brazilija	Trinitario
UF-613	Brazilija	Trinitario
EEG-48	Brazilija	Forastero
UF-12	Brazilija	Criollo
NA-33	Brazilija	Forastero

2 pavyzdys: Procianidinių ekstrakcijos metodikos**A. 1 metodika**

Procianidiniai buvo ekstrahuojami iš 1 pavyzdyje aprašytų nuriebalintų, nefermentuotų, šaltyje išdžiovintų kakavos pupelių, naudojant modifikuotą Jalal ir Collin (1977) aprašytą metodą. Procianidiniai buvo ekstrahuojami iš 50 g nuriebalintos kakavos masės partijų 2x 400 ml 70 % acetono/dejonizuoto vandens, o po to 400 ml 70 % metanolio/dejonizuoto vandens. Ekstraktai sumaišomi kartu, ir tirpikliai nugarinami rotoriniu garintuvu 45 °C temperatūroje daliniame vakuume. Gauta vandeninė fazė praskiedžiama iki 1 l dejonizuotu vandeniu ir ekstrahuojama 2x 400 ml CHCl₃. Tirpiklio fazė atmetama. Tada vandeninė fazė ekstrahuojama 4x 50 ml etilacetato. Susidariusi emulsija suskaldoma centrifuguojant Sorvall RC 28S centrifuga, esant 2000xg, 30 min. 10 °C temperatūroje. Į sumaišytus etilacetato ekstraktus pridedama 100-200 ml dejonizuoto vandens. Tirpiklis nugarinamas rotoriniu garintuvu 45 °C temperatūroje daliniame vakuume. Gauta vandeninė fazė šaldoma skystame N₂, o po to džiovinama šaltyje, panaudojant LABCONCO Freeze Dry System. Nevalytų procianidinių, gautų iš įvairių kakavos genotipų, išeigos duotos 2 lentelėje.

2 lentelė: Nevalytų procianidinių išėigos

Genotipas	Kilmė	Išėiga, %
UIT-1	Malazija	3,81
Nežinoma	Vakarų Afrika	2,55
ICS-100	Brazilija	3,42
ICS-39	Brazilija	3,45
UF-613	Brazilija	2,98
EEG-48	Brazilija	3,15
UF-12	Brazilija	1,21
NA-33	Brazilija	2,23

B. 2 metodas

Kitu atveju procianidiniai buvo ekstrahuojami iš 1 pavyzdyje aprašytų nuriebalintų, nefermentuotų, šaltyje išdžiovintų kakavos pupelių 70 % acetono tirpalu vandenyje. Dešimt gramų nuriebalintos medžiagos maišoma su 100 ml tirpiklio 5-10 min., kad susidarytų suspensija. Ši suspensija centrifuguojama 15 min. 4 °C temperatūroje, esant 3000xg, ir nuopilas perleidžiamas per stiklo vatą. Filtratas distiliuojamas daliniame vakuume, o gauta vandeninė fazė šaldoma skystu N₂, o po to džiovinama šaltyje, panaudojant LABCONCO Freeze Dry System. Nevalytų procianidinių išėigos buvo 15-20 % ribose.

Nesigilinant į kokias nors ypatingas teorijas, galima manyti, kad nevalytų procianidinių išėigų skirtumai atspindi skirtumus, susijusius su skirtingais genotipais, geografine kilme, sodininkystės veisle ir paruošimo būdu.

3 pavyzdys: Dalinis kakavos procianidinių išvalymas

A. Gelio pralaidumo chromatografija

Antrajame pavyzdyje gauti procianidiniai buvo dalinai valomi, panaudojant skysčių chromatografiją per Sephadex LH-20 (28 x 2,5 cm). Atskyrimas palengvėja, panaudojus laipsnišką perėjimo iš vandens į metanolį gradientą. Pradinė gradiento sudėtis buvo 15 % metanolio dejonizuotame vandenyje, po to, keičiant kas 30 min.,

naudota 25 % metanolio dejonizuotame vandenyje, 35 % metanolio dejonizuotame vandenyje, 70 % metanolio dejonizuotame vandenyje ir pagaliau 100 % metanolis. Iš kolonėlės išbėgantis skystis, kai išsiplauna ksantino alkaloidai (kofeinas ir teobrominas), surenkamas kaip viena frakcija. Frakcija, kurioje nebėra ksantino alkaloidų, buvo toliau frakcionuojama, ir gaunamos penkios subfrakcijos, pažymėtos nuo MM2A iki MM2E. Iš kiekvienos subfrakcijos pašalinamas tirpiklis, nugarinant rotoriniu garintuvu 45 °C temperatūroje daliniame vakuume. Gauta vandeninė fazė šaldoma skystu N₂ ir per naktį džiovinama šaltyje, panaudojant LABCONCO Freeze Dry System. Būdinga gelio pralaidumo chromatograma, parodanti šį frakcionavimą, duota fig.1. Tokiu būdu išskirstyta apie 100 mg medžiagos.

Fig.1: Nevalytų procianidinių gelio pralaidumo per Sephadex LH-20 chromatograma

Chromatografavimo sąlygos: kolonėlė: 28 x 2,5 cm Sephadex LH-20; mobili fazė: metanolio/vandens laipsniškas gradientas, 15:85, 25:75, 35:65, 70:30, 100:0, keičiama kas 0,5 val; srauto greitis: 1,5 ml/min; detektorius: UV @ $\lambda_1 = 254$ nm ir $\lambda_2 = 365$ nm; diagramos greitis: 0,5 mm/min; kolonėlės įkrova: 120 mg.

B. Pusiau preparatyvinė didelio efektyvumo skysčių chromatografija (HPLC)

1 metodas: Atskyrimas, panaudojant atvirkščiąją fazę

2 ir/arba 3A pavyzdžiuose gauti procianidiniai buvo dalinai valomi, panaudojant pusiau preparatyvinę HPLC. Hewlett Packard 1050 HPLC sistema su keičiamo bangos ilgio detektoriumi, Rheodyne 7010 įleidimo vožtuvu, turinčiu 1 ml įleidimo kilpą, buvo sujungta su Pharmacia FRAC-100 frakcijų kolektoriumi. Išskirstymas atliekamas Phenomenex Ultracarb 10 μ m ODS kolonėle (250 x 22,5 mm), sujungta su Phenomenex Ultracarb 10 μ m ODS Ultracarb (60 x 10 mm) apsaugine kolonėle. Mobilios fazės sudėtis buvo: A = vanduo; B = metanolis, naudojant tokias tiesinio gradiento sąlygas: [laikas, %A]; (0,85), (60,50), (90,0) ir (110,0), esant 5 ml/min. srauto greičiui.

Būdingas procianidinių, esančių D+E frakcijose, atskyrimo pusiau preparatyvine HPLC vaizdas parodytas fig.15N. Atskiri pikai arba pasirinktos chromatografinės sritys, skirtos tolimesniam valymui arba tyrimui, surinktos tam tikrais laiko intervalais arba rankiniu būdu, panaudojant frakcijų kolektorių. Įleidimo įkrovos sudarė 25-100 mg medžiagos.

2 metodas. Atskyrimas, panaudojant normalią fazę

Procianidinių ekstraktai, gauti 2 ir/arba 3A pavyzdžiuose, buvo dalinai valomi, panaudojant pusiau preparatyvinę HPLC. Hewlett Packard 1050 HPLC sistema, Millipore-Waters Model 480 LC detektorius, su nustatytu 254 nm bangos ilgiu buvo sujungta su Pharmacia Frac-100 frakcijų kolektoriumi, pasirenkant piko režimą. Išskirstymas buvo atliktas Supelco 5 μ Supelcosil LC-Si kolonėle (250 x 10 mm), sujungta su Supelco 5 μ Supelguard LC-Si apsaugine kolonėle (20 x 4,6 mm). Procianidinai buvo išplaunami tiesiniu gradientu tokiomis sąlygomis: (laikas, %A, %B); (0, 82, 14), (30, 67,6, 28,4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70, 10, 86), o po to 10 min. buvo atstoma pusiausvyra. Mobilios fazės sudėtis buvo: A = dichlormetanas; B = metanolis ir C = acto rūgštis:vanduo (1:1). Naudotas 3 ml/min srauto greitis. Komponentai buvo detektuojami UV 250 nm bangos ilgio šviesa ir registruojami Kipp & Zonan BD41 saviraščiu. Suleidžiami tūriai buvo 100-250 μ l (10 mg procianidino ekstraktų, ištirpintų 0,25 ml 70 % acetono tirpalo vandenyje) ribose. Būdingas pusiau preparatyvinės HPLC vaizdas parodytas fig. 15O. Atskiri pikai arba pasirinktos chromatografinės sritys, skirtos tolimesniam valymui arba tyrimui, surinktos tam tikrais laiko intervalais arba rankiniu būdu, panaudojant frakcijų kolektorių.

HPLC sąlygos: 250x10 mm Supelco Supelcosil LC-Si (5 μ m) pusiau preparatyvinė kolonėlė, 20x4,6 mm Supelco Supelcosil LC-Si (5 μ m) apsauginė kolonėlė; detektorius: Waters LC Spektrophotometer Model 480 @ 254 nm; srauto greitis: 3 ml/min; kolonėlės temperatūra: kambario temperatūra; įleidimas: 250 μ l ekstrakto 70 % acetono tirpalo vandenyje.

Gradientas: laikas (min)	CH ₂ Cl ₂	Metanolis	Acto rūgštis/H ₂ O (1:1)
0	82	14	4
30	67,6	28,4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

Buvo gautos tokios frakcijos:

Frakcija	Tipas
1	dimerai
2	trimerai
3	tetramerai
4	pentamerai
5	heksamerai
6	heptamerai
7	oktamerai
8	nonamerai
9	dekamerai
10	undekamerai
11	dodekamerai
12	aukštesnieji oligomerai

4 pavyzdys: Procianidinių ekstraktų analizė analitinės HPLC metodu

1 metodas: Atskyrimas, panaudojant atvirkščiąją fazę

Procianidinių ekstraktai, gauti 3 pavyzdyje, buvo nufiltruoti per 0,45 μ filtrą ir analizuoti Hewlett Packard 1092 trinare HPLC sistema, kurioje yra diodų eilutės detektorius ir HP modelio 1046A programuojamas fluorescencinis detektorius. Išskirstymas buvo atliktas 45 °C temperatūroje, panaudojant Hewlett- Packard 5 μ

Hypersil ODS kolonėlę (200 x 2,1 mm). Flavanoliai ir procianidiniai buvo išplaunami 60 % B keitimo į A gradientu, po to išplaunant kolonėlę B, esant 0,3 ml/min. srauto greičiui. Mobilios fazės sudėtis buvo: B = 0,5 % acto rūgštis metanolyje ir A = 0,5 % acto rūgštis dejonizuotame vandenyje. Acto rūgšties kiekius A ir B mobilioje fazėje galima padidinti iki 2 %. Komponentus galima detektuoti pagal fluorescenciją, kai $\lambda_{ex} = 276$ nm ir $\lambda_{em} = 316$ nm. (+)-Katechino ir (-)-epikatechino koncentracijos buvo nustatytos, pasinaudojant etaloniniais standartiniais tirpalais. Procianidinių kiekiai buvo nustatyti, panaudojant (-)-epikatechino atsako daugiklį. Būdingos HPLC chromatogramos, rodančios vieno kakavos genotipo įvairių komponentų atskyrimą, parodytos fig.2A. Panašus HPLC vaizdas gautas ir kitiems kakavos genotipams.

HPLC sąlygos: kolonėlė: 200x2,1 mm Hewlett Packard Hypersil ODS (5 μ); apsauginė kolonėlė: 20x 2,1 mm Hewlett Packard Hypersil ODS (5 μ); detektoriai: diodų eilutė @ 280 nm, fluorescencija $\lambda_{ex} = 276$ nm, $\lambda_{em} = 316$ nm; srauto greitis: 0,3 ml/min.; kolonėlės temperatūra: 45 °C.

Gradientas: laikas (min.)	0,5% acto rūgštis dejonizuotame vandenyje	0,5% acto rūgštis metanolyje
0	100	0
50	40	60
60	0	100

2 metodas: Atskyrimas, panaudojant normalią fazę

Procianidinių ekstraktai, gauti 2 ir/arba 3 pavyzdyje, buvo nufiltruoti per 0,45 μ filtrą ir analizuoti Hewlett Packard 1090 Series II HPLC sistema, kurioje yra HP modelio 1046A programuojamas fluorescencinis detektorius ir diodų eilutės detektorius. Išskirstymas buvo atliktas 37 °C temperatūroje, panaudojant 5 μ Phenomenex Lichrosphere Silica 100 kolonėlę (250 x 3,2 mm), sujungtą su Supelco Supelguard LC-Si 5 μ apsaugine kolonėle (20 x 4,6 mm). Procianidiniai buvo išplaunami tiesiniu gradientu, esant tokioms sąlygoms: (laikas, %A, %B); (0, 82,

14), (30, 67,6, 28,4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70, 10, 86), o po to 8 min. buvo atstoma pusiaulyra. Mobilios fazės sudėtis buvo: A = dichlormetanas; B = metanolis ir C = acto rūgštis:vanduo (1:1). Naudotas 3 ml/min srauto greitis. Komponentai buvo detektuojami pagal fluorescenciją, kai $\lambda_{ex} = 276$ nm ir $\lambda_{em} = 316$ nm, arba pagal UV, esant 280 nm bangos ilgiui. Būdinga HPLC chromatograma, rodanti vieno kakavos genotipo įvairių procianidinų atskyrimą, parodyta fig. 2B. Panašūs HPLC vaizdai gauti ir kitiems kakavos genotipams.

HPLC sąlygos: 250x3,2 mm Phenomenex Lichrosphere Silica 100 kolonėlė (5 μ); 20x 4,6 mm Supelco Supelguard LC-Si (5 μ) apsauginė kolonėlė; detektoriai: fotodiodų eilutė @ 280 nm, fluorescencija $\lambda_{ex} = 276$ nm, $\lambda_{em} = 316$ nm; srauto greitis: 0,5 ml/min.; kolonėlės temperatūra: 37 °C.

Gradientas: laikas (min)	CH ₂ Cl ₂	Metanolis	Acto rūgštis/H ₂ O (1:1)
0	82	14	4
30	67,6	28,4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

5 pavyzdys: Procianidinų identifikavimas

Procianidiniai buvo išvalyti, panaudojant skysčių chromatografiją per Sephadex LH-20 (28 x 2,5 mm) kolonėlę, po to pusiau preparatyvinę HPLC, naudojant 10 μ μ Bondapak C18 (100 x 8 mm) kolonėlę, arba pusiau preparatyvinę HPLC, naudojant 5 μ Supelcosil LC-Si (250 x 10 mm) kolonėlę.

Dalinai išvalytos medžiagos buvo analizuojamos, panaudojant bombardavimo greitais atomais masių spektrometriją (FAB-MS) VG ZAB-T didelės skiriamosios gebos MS sistema, naudojant skysčių antrinių jonų masių spektrometrijos (LSIMS) metodiką teigiamų ir neigiamų jonų variantais. Jonizacijos šaltiniu buvo naudota cezio jonų patranka, esant 30 kV, o "Magic Bullet Matrix" (ditioteritolis /ditioteritriolis 1:1) buvo naudotas kaip protonų donorius.

Šių frakcijų analitiniai tyrimai LSIMS metodu parodė, kad jose yra daug flavan-3-olio oligomerų, kurie duoti 3 lentelėje.

3 lentelė: Kakavos procianidinių frakcijų LSIMS (teigiami jonai) duomenys

Oligomeras	$(M+1)^+ m/z$	$(M+Na)^+ m/z$	Mol. svoris
monomeraai (katechinai)	291	313	290
dimeras(ai)	577/579	599/601	576/587
trimeras(ai)	865/867	887/889	884/866
tetrameras(ai)	1155	1177	1154
pentameras(ai)	1443	1465	1442
heksameras(ai)	1731	1753	1730
heptameras(ai)	---	2041	2018
oktameras(ai)	---	2329	2306
nonameras(ai)	---	2617	2594
dekameras(ai)	---	2905	2882
undekameras(ai)	---	---	3170
dodekameras(ai)	---	---	3458

Didžiausios masės fragmento jonai sutampa su ankstesniame darbe aprašytais tiek teigiamų, tiek ir neigiamų procianidinių jonų FAB-MS analizės duomenimis (Self, R., Eagles, J., Galletti, G.C., Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Lee, A.G.H., Magnolato, D., Richili, U., Gujur, R. and Haslam, E., Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Polyphenols (*syn.* Vegetable Tannins), Biomed. Environ. Mass Spec. **13**, 449-468 (1986) ir Porter, L.J., Ma, Z. and Chan, B.G., Cocoa Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of Some Minor Metabolites, Phytochemistry, **30**, 1657-1663 (1991). Jonas, atitinkantis m/z 577 $(M+H)^+$, ir jo natrio aduktas su m/z 599 $(M+Na)^+$ duoda pagrindo manyti, kad išskirtose medžiagose yra dvigubai sujungti procianidino dimerai. Įdomu pažymėti, kad aukštesnieji oligomeraai labiau linkę sudaryti natrio aduktus $(M+Na)^+$, nei protonuotus molekulinis jonus $(M+H)^+$. Eksperimentiniu būdu buvo identifikuoti

procianidino izomerai B-2, B-5 ir C-1, remiantis Revilla, E., Bourzeix, M. and Alonso, E., Analysis of Catechins and Procyanidins in Grape Seeds by HPLC with Photodiode Array Detection, *Chromatographia*, **31**, 465-468 (1991), Self, R., Eagles, J., Galletti, G.C., Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Lee, A.G.H., Magnolato, D., Richili, U., Gujur, R. and Haslam, E., Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Polyphenols (*syn.* Vegetable Tannins), *Biomed. Environ. Mass Spec.* **13**, 449-468 (1986) ir Porter, L.J., Ma, Z. and Chan, B.G., Cocoa Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of Some Minor Metabolites, *Phytochemistry*, **30**, 1657-1663 (1991) darbai. Procianidinai iki oktamero ir dekamero buvo patvirtinti FAB-MS metodu dalinai išvalytose frakcijose. Be to, procianidinių iki dodekamerų buvimas buvo pastebėtas normalios fazės HPLC analizėje (žr. fig.2B). Nepretenduoiant į kokią nors ypatingą teoriją, manoma, kad dodekamas yra tirpumo tirpikliuose, kurie buvo naudoti ekstrakcijos ir valymo schemose. riba. 4 lentelėje duotos procianidinių, rastų ksantino alkaloidų neturinčiose išskirtose medžiagose, santykinės koncentracijos, remiantis atvirkščios fazės HPLC analizės duomenimis. 5 lentelėje duotos santykinės procianidinių koncentracijos, remiantis normalios fazės HPLC analizės duomenimis.

4 lentelė: Santykinės procianidinių koncentracijos ksantino alkaloidų neturinčiose išskirtose medžiagose

Komponentas	Molekulinis svoris	Kiekis, %
(+)-katechinas	290	1,6
(-)-epikatechinas	290	38,2
B-2 dimeras	578	11,0
B-5 dimeras	578	5,3
C-1 trimeras	866	9,3
dvigubai sujungti dimerai	576	3,0
tetrameras(ai)	1154	4,5
pentameras-oktameras	1442-2306	24,5
nežinomi ir aukštesnieji oligomerai	---	2,6

5 lentelė: Santykinės procianidinių koncentracijos vandeninio acetono ekstraktuose

Komponentas	Molekulinis svoris	Kiekis, %
(+)-katechinas ir (-)-epikatechiinas	292 (tas pats abiemis)	41,9
B-2 ir B-5 dimerai	578	13,9
trimerai	884/866	11,3
tetramerai	1154	9,9
pentamerai	1442	7,8
heksamerai	1730	5,1
heptamerai	2018	4,2
oktamerai	2306	2,8
nonamerai	2594	1,6
dekamerai	2882	0,7
undekamerai	3170	0,2
dodekamerai	3458	<0,1

Fig.3 parodyta keleta procianidinių struktūros, o fig.4A-4E - būdingos penkių frakcijų, naudotų toliau aprašytame priešvėžinio arba antineoplazminio aktyvumo skryninge, HPLC chromatogramos. Fig.4A-4E duotų HPLC sąlygos buvo tokios:

HPLC sąlygos: Hewlett Packard 1090 tretinė HPLC sistema su HP Model 1046A programuojamu fluorescenciniu detektoriumi; kolonėlė: Hewlett Packard 5 μ Hypersil ODS (200 x 2,1 mm), 60 % B keičiant į A tiesinis gradientas, esant 0,3 ml/min. srauto greičiui; B = 0,5 % acto rūgštis metanolyje; A = 0,5 % acto rūgštis dejonizuotame vandenyje; λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 316 nm.

Fig.15O parodytos būdingos kitų 12 frakcijų, naudotų priešvėžinio arba antineoplazminio aktyvumo skryninge, pusiau preparatyvinės HPLC chromatogramos (HPLC sąlygos tokios pačios, kaip nurodyta aukščiau).

6 pavyzdys: Kakavos ekstraktų (procianidinų) priešvėžinis, priešnavikinis arba antineoplazminis aktyvumas

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromido) mikrotitro plokštelių tetrazolinis citotoksiškumo tyrimas, kurį pirmasis sukūrė Mosman (1983), buvo panaudotas 5 pavyzdžio tiriamųjų mėginių skryningui. Tiriamieji mėginiai, standartai (cis-platina ir chorambucilas) ir MTT reagentas buvo ištirpinti 100 % DMSO (dimetilsulfoksido), pagaminant 10 mg/ml koncentracijas. Praskiedimų eilė buvo pagaminta iš pradinių tirpalų. Tiriamųjų mėginių atveju pagaminta serija praskiedimų nuo 0,01 iki 100 µg/ml 0,5 % DMSO.

Visos žmogaus auglių ląstelių linijos buvo gautos iš American Type Culture Collection. Ląstelės buvo auginamos monosluoksnių pavidalu alfa-MEM, turinčiame 10 % jaučio fetalinio serumo, 100 vienetų/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino ir 240 vienetų/ml nistatino. Ląstelės buvo laikomos drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje 37 °C temperatūroje.

Po tripsinizacijos, ląstelės buvo suskaičiuojamos, ir jų koncentracija padaroma 50×10^5 ląstelių/ml (šis kiekis kito priklausomai nuo vėžinių ląstelių linijos). Po 200 µl ląstelių suspensijos buvo įdedama į 4 eilutes mikrotitro plokštelių su 96 duobutėmis. Palaikius 4 val. kad ląstelės prisijungtų, į šių keturių eilučių duobutes įpilama po 2 µl DMSO turinčio tiriamojo mėginio. Pradiniuose dozės-atsako eksperimentuose dozių intervalui nustatyti naudojami besiskiriantys laipsniu mėginio praskiedimai. Tada BIO RAD MP450 plokštelių matuokliu buvo matuojami optiniai tankiai, esant 540 nm bangos ilgiui. Keturiais vienodais tiriamųjų medžiagų kiekiais paveiktų duobučių optinio tankio vidurkis buvo lyginamas su kontrole, ir rezultatai išreiškiami procentais nuo kontrolės plius/minus standartinis nukrypimas. MTT redukcija į violetinės spalvos produktą - formazaną - yra tiesiškai susijusi su gyvybingų ląstelių skaičiumi duobutėje. Taigi, matuojant redukcijos produkto optinį tankį, galima gauti ląstelių išlikimo procentus, esant tam tikrai tiriamojo mėginio dozei. Kontrolinėse duobutėse galutinė DMSO koncentracija buvo 1 %.

Pagal šią metodiką pirmiausia buvo išbandyti du mėginiai. MM1 mėginys yra labai negryna iš kakavos išskirta procianidinių medžiaga, kurioje buvo pastebimi kofeino ir teobromino kiekiai. MM2 mėginys buvo iš kakavos išskirta procianidinių medžiaga, dalinai išvalyta gelio pralaidumo chromatografijos metodu. MM2 kofeino ir teobromino nebuvo. Naudojant aukščiau aprašytas metodikas, buvo atliktas abiejų mėginių aktyvumo skryningas prieš toliau duodamų vėžinių ląstelių linijas:

HCT 116 gaubiamosios žarnos vėžys

ACHN inkstų adenokarcinoma

SK-5 melanoma

A498 inkstų adenokarcinoma

MCF-7 krūties vėžys

PC-3 prostatos vėžys

CAPAN-2 kasos vėžys.

MM1 atveju buvo stebimas labai mažas arba ir visai nestebima jokio aktyvumo prieš šias tirtas ląstelių linijas. Rasta, kad MM2 rodo aktyvumą prieš HCT-116, PC-3 ir ACHN vėžinių ląstelių linijas. Tačiau buvo rasta, kad ir MM1, ir MM2 trukdo MTT sąveikai, ir pasidaro neaiškus optinio tankio sumažėjimas, kuris turėtų atspindėti gyvybingų ląstelių skaičiaus sumažėjimą. Šis trukdymas taip pat turėjo įnašą į dideles paklaidų ribas, kadangi pasirodė, kad cheminė reakcija greičiau vyko duobutėse pagal plokštelės perimetrą. Tipiškas šių efektų pavyzdys parodytas fig.5. Esant didelėms tiriamosios medžiagos koncentracijoms, galima būtų laukti didelio išlikusių ląstelių skaičiaus sumažėjimo, daug didesnio nei parodyta. Vis dėlto, mikroskopiniai tyrimai parodė, kad atsiranda citotoksiniai efektai, nežiūrint į MTT reakcijos trukdymo efektus. Pavyzdžiui, šiuo būdu buvo gauta MM2 poveikio į ACHN ląstelių liniją IC_{50} reikšmė, lygi 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Išradėjų nuomone, šie preliminariniai rezultatai reikalauja pataisyti tyrimo metodiką, kad būtų galima išvengti MTT reakcijos trukdymo. Tai buvo atlikta tokiu būdu. Inkubavus plokšteles 18 valandų 37 °C temperatūroje, drėgnoje 5 % CO_2 atmosferoje, terpė buvo kruopščiai išsiurbta iš duobučių ir pakeista 100 μl šviežiai

pagamintos McCoy terpės. Tada į kiekvieną plokštelės duobutę buvo pridėta po 11 μ l MTT (5 mg/ml) pagrindinio tirpalo PBS (fosfatiname buferyje su NaCl). Palaikius 4 valandas drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje 37 °C temperatūroje, į visas plokštelės duobutes pridėta po 100 μ l 0,04 N HCl izopropanolyje ir kruopščiai sumaišyta, kad ištirtų susidaręs formazanas, kurį pagamina gyvybingos ląstelės. Be to, buvo nuspręsta papildomai frakcionuoti procianidinus, norint nustatyti atskirus aktyvius komponentus. Buvo pagamintos penkios frakcijos, atitinkančios fig.1 parodytas sritis, kurių komponentų pasiskirstymas parodytas fig.4A-4E. Mėginiai buvo pavadinti MM2A-MM2E, norint atspindėti jų analitinį apibūdinimą ir pažymėti, kad nėra kofeino ir teobromino.

Tikrintas kiekvienos frakcijos aktyvumas prieš HTC-116, PC-3 ir ACHN vėžinių ląstelių linijas. Rezultatai parodė, kad aktyvumas nėra sukonzentruotas kokioje nors vienoje atskiroje frakcijoje. Šio tipo rezultatą nereikia laikyti nelauktu, kadangi komponentai iš „aktyvaus“ gamtinio produkto išskirtoje medžiagoje gali turėti sinergetinius poveikius. Kakavos procianidinių medžiagą (MM2) sudaro per dvidešimt nustatomų komponentų. Gali būti, kad aktyvumas greičiau yra susijęs su komponentų, esančių atskirose frakcijose, kompozicija, negu su atskiro komponento(ų) aktyvumu.

Remiantis šiais rezultatais, buvo nuspręsta sumaišyti frakcijas ir pakartoti bandymus su tomis pačiomis ląstelių linijomis. Keletas frakcijų kombinacijų rodė citotoksinį poveikį į PC-3 vėžinių ląstelių linijas. Konkrečiau, buvo gautos IC₅₀ reikšmės, lygios 40 μ g/ml kiekvienai MM2A ir MM2E kombinacijai, ir 20 μ g/ml - kiekvienai MM2C ir MM2E kombinacijai. Taip pat buvo nustatytas aktyvumas prieš HCT-116 ir ACHN ląstelių linijas, bet kaip ir anksčiau, tikslių duomenų gavimui trukdo sąveika su MTT indikatoriumi. Duomenų patikslinimui, analogiški eksperimentai buvo pakartotinai atlikti su HTC-116 ir ACHN linijomis. Tačiau šie rezultatai buvo neįtikinantys dėl užteršimo bakterijomis ir tiriamojo mėginio medžiagos išsieikvojimo. Fig.6A-6D rodo dozės-atsako priklausomybę tarp kakavos ekstraktų kombinacijų ir PC-3 vėžinių ląstelių.

Vis dėlto, iš šių duomenų aišku, kad kakavos ekstraktai, ypač kakavos polifenoliai arba procianidinais turi žymų priešnavikinį, priešvėžinį arba antineoplazminį aktyvumą, ypač žmogaus PC-3 (prostatos), HCT-116 (gaubiamosios žarnos) ir ACHN (inkstų) vėžinių ląstelių atžvilgiu. Be to, šie rezultatai leidžia manyti, kad tam tikros procianidinių frakcijos gali būti atsakingos už aktyvumą prieš PC-3 ląstelių liniją.

7 pavyzdys: Kakavos ekstraktų (procianidinių) priešvėžinis, priešnavikinis arba antineoplazminis aktyvumas

Norint patvirtinti aukščiau aprašytus duomenis ir toliau tirti frakcijų kombinacijas, buvo atliktas kitas išsamus skryningas.

Visos pagamintos medžiagos ir metodikos buvo tokios pačios kaip aprašyta aukščiau, išskyrus tai, kad vietoj standartinių keturių pakartojimų tai pačiai dozei, buvo atliekami 8 arba 12 pakartojimų. Šiame tyrime buvo atliktas penkių atskirų kakavos frakcijų arba jų kombinacijų skryningas tokioms vėžinių ląstelių linijoms:

PC-3 prostata
KB Nasopharyngeal/HeLa
HCT-116 gaubiamoji žarna
ACHN inkstai
MCF-7 krūtys
SK-5 melanoma
A-549 plaučiai
CCRF-CEM T-ląstelių leukemija.

Atskiri skryningo eksperimentai susidėjo iš A, B, C, D ir E frakcijų (žr. fig. 4A-4E ir jų aptarimą, *supra*) įvairių dozių kiekių (0,01-100 µg/ml) tyrimo kiekvienos ląstelių linijos atžvilgiu. Kombinacijų skryningas atliktas, sumaišant vienodas dozes frakcijų A+B, A+C, A+C, A+E, B+C, B+D, B+E, C+D, C+E ir D+E, kiekvienos ląstelių linijos atžvilgiu. Šių bandymų rezultatai aptarti atskirai, o po to duodama bendras aptarimas.

A. PC-3 prostatos ląstelių linija

Fig.7A-7H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir PC-3 ląstelių linijos. Fig.7D ir 7E rodo, kad D ir E frakcijos buvo aktyvios, ir jų IC_{50} reikšmė yra 75 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} reikšmės, gautos iš kitų procianidinių frakcijų kombinacijų dozės-atsako kreivių, buvo 60-80 $\mu\text{g/ml}$ intervale, kai kombinacijose buvo D arba E frakcijos. Atskiros IC_{50} reikšmės duotos 6 lentelėje.

B. KB Nasopharyngeal/HeLa ląstelių linija

Fig.8A-8H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir KB Nasopharyngeal/HeLa ląstelių linijos. Fig.8D ir 8E rodo, kad D ir E frakcijos buvo aktyvios, ir jų IC_{50} reikšmė yra 75 $\mu\text{g/ml}$. Fig.8F-8H vaizduoja būdingus rezultatus, gautus frakcijų kombinacijų tyrime. Šiuo atveju A+B procianidinių frakcijų kombinacija neturėjo poveikio, tuo tarpu B+E ir D+E kombinacijos buvo aktyvios, ir jų IC_{50} reikšmė buvo 60 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} reikšmės, gautos iš kitų procianidinių frakcijų kombinacijų dozės-atsako kreivių, buvo 60-80 $\mu\text{g/ml}$ intervale, kai kombinacijose buvo D arba E frakcijos. Atskiros IC_{50} reikšmės duotos 6 lentelėje. Šie rezultatai buvo iš esmės tokie patys, kaip ir PC-3 ląstelių linijai gauti rezultatai.

C. HCT-116 gaubiamosios žarnos ląstelių linija

Fig.9A-9H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir HCT-16 gaubiamosios žarnos ląstelių linijos. Fig.9D ir 9E rodo, kad E frakcija buvo aktyvi, ir jos IC_{50} reikšmė yra apytikriai 400 $\mu\text{g/ml}$. Ši reikšmė buvo gauta, ekstrapoliuojant esamą kreivę. Atkreipkite dėmesį, kad D frakcijos dozės-atsako kreivės polinkis taip pat rodo aktyvumą. Tačiau iš šios kreivės nebuvo nustatyta IC_{50} reikšmė, nes šis kreivės polinkis yra labai nedidelis ir negalima gauti patikimos reikšmės. Fig.9F-9H vaizduoja būdingus frakcijų kombinacijų tyrimo rezultatus. Šiuo atveju B+D procianidinių frakcijų kombinacija nerodė pastebimo aktyvumo, tuo tarpu A+E ir D+E kombinacijos buvo aktyvios ir turėjo IC_{50} reikšmes, atitinkamai lygias 500 $\mu\text{g/ml}$ ir 85 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} reikšmės, gautos

iš kitų frakcijų kombinacijų dozės-atsako kreivių, vidutiniškai buvo apie 250 µg/ml, kai kombinacijose buvo E frakcija. Ekstrapoliuotos IC₅₀ reikšmės duotos 6 lentelėje.

D. ACHN inkstų ląstelių linija

Fig.10A-10H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir ACHN inkstų ląstelių linijos. Fig.10D-10E rodo, kad nei viena atskira frakcija nebuvo aktyvi prieš šią ląstelių liniją. Fig.10F-10H vaizduoja būdingus frakcijų kombinacijų tyrimo rezultatus. Šiuo atveju B+C procianidinių frakcijų kombinacija buvo neaktyvi, tuo tarpu A+E kombinacijos ekstrapoliuota IC₅₀ reikšmė buvo apytikriai 500 µg/ml. Dozės-atsako kreivės, panašios į C+D kombinacijos kreivę, buvo laikomos neaktyviomis, nes jų polinkiai buvo labai maži. Kitų frakcijų kombinacijų ekstrapoliuotos ID₅₀ reikšmės duotos 6 lentelėje.

E. A-549 plaučių ląstelių linija

Fig.11A-11H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir A-549 plaučių ląstelių linijos. Nei vienos atskiros frakcijos atveju aktyvumo nerasta; aktyvumo nebuvo ir šiame bandyme naudotų dozių intervale frakcijų kombinacijų atveju. Tačiau procianidinių frakcijos vis dėlto gali būti naudingos šios ląstelių linijos atžvilgiu.

F. SK-5 melanomos ląstelių linija

Fig.12A-12H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir SK-5 melanomos ląstelių linijos. Nei vienos atskiros frakcijos atveju aktyvumo nerasta; aktyvumo nebuvo ir šiame bandyme naudotų dozių intervale frakcijų kombinacijų atveju. Tačiau procianidinių frakcijos vis dėlto gali būti naudingos šios ląstelių linijos atžvilgiu.

G. MCF-7 krūties ląstelių linija

Fig.13A-13H parodyta tipiška dozės-atsako priklausomybė tarp kakavos procianidinių frakcijų ir MCF-7 krūties ląstelių linijos. Nei vienos atskiros frakcijos atveju aktyvumo nerasta; aktyvumo nebuvo ir šiame bandyme naudotų dozių intervale frakcijų kombinacijų atveju. Tačiau procianidinių frakcijos vis dėlto gali būti naudingos šios ląstelių linijos atžvilgiu.

H. CCRF-CEM T-ląstelių leukemijos linija

Netipiškos dozės-atsako kreivės buvo iš pradžių gautos CCRF-CEM T-ląstelių leukemijos linijos atveju. Tačiau ląstelių, suskaičiuotų mikroskopu, skaičiaus priklausomybė nuo laiko, esant skirtingoms frakcijų koncentracijoms, rodo, kad 500 µg A, B ir D frakcijų dozė davė 80 % augimo sumažinimą per keturių dienų laikotarpį. Būdinga dozės-atsako priklausomybė parodyta fig.14.

I. Apibendrinimas

Šiuose bandymuose gautos IC_{50} reikšmės duotos 6 lentelėje visoms ląstelių linijoms, išskyrus CCRF-CEM T-ląstelių leukemiją. T-ląstelių leukemija buvo sąmoningai neįtraukta į lentelę, kadangi buvo naudotoa skirtinga bandymo metodika. Šių rezultatų apibendrinimas rodo, kad didžiausias aktyvumas yra susijęs su D ir E frakcijomis. Šios frakcijos buvo aktyviausios prieš PC-3 (prostatos) ir KB (nasopharyngeal/HeLa) ląstelių linijas. Šios frakcijos taip pat rodo aktyvumą prieš HCT-116 (gaubiamosios žarnos) ir ACHN (inkstų) ląstelių linijas nors ir tik esant daug didesnėms dozėms. Aktyvumo prieš MCF-7 (krūties), SK-5 (melanoma) ir A-549 (plaučių) linijas nerasta. Tačiau vis dėlto procianidinių frakcijos gali būti naudingos ir šių ląstelių linijų atžvilgiu. Aktyvumas buvo rastas ir prieš CCRF-CEM (T-ląstelių leukemijos) ląstelių liniją. Taip pat reikia pažymėti, kad D ir E frakcijų kompozicija yra sudėtingiausia. Tokiu būdu, iš šių duomenų aišku, kad kakavos ekstraktai, ypačiai kakavos procianidiniai, turi žymų priešnavikinį, priešvėžinį arba antineoplazminį aktyvumą.

6 lentelė: Kakavos procianidinų frakcijų poveikio prieš įvairias ląstelių linijas IC₅₀ reikšmės

Frakcija	PC-3	KB	HCT-116	ACHN	MCF-7	SK-5	A-549
A							
B							
C							
D	90	80					
E	75	75	400				
A+B							
A+C	125	100					
A+D	75	75					
A+E	80	75	500	500			
B+C							
B+D	75	80					
B+E	60	65	200				
C+D	80	75		1000			
C+E	80	70	250				
D+E	80	60	85				

Didesnės nei 100 µg/ml reikšmės gautos, ekstrapoliuojant dozės-atsako kreives

7 pavyzdys: Kakavos ekstraktų (procianidinų) priešvėžinis, priešnavikinis arba antineoplazminis aktyvumas

Buvo panaudota keletas papildomų *in vitro* bandymų metodikų, norint papildyti ir išplėsti 6 ir 7 pavyzdžiuose pateiktus rezultatus.

A metodas Nudažymo kristalvioletu bandymas

Visos žmogaus vėžinės ląstelės buvo gautos iš American Type Culture Collection. Ląstelės buvo auginamos monosluoksnių pavidalu IMEM, turinčioje 10

% fetalinio jaučio serumo be antibiotikų. Ląstelės buvo laikomos drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje 37 °C temperatūroje.

Po tripsinizacijos ląstelės buvo suskaičiuotos ir padaryta 1000-2000 ląstelių/100 µl koncentracija. Ląstelių proliferacija buvo nustatoma, padengiant ląstelėmis (1000-2000 ląstelių/duobutei) mikrotitro plokštelę su 96 duobutėmis. Įdėjus 100 µl ląstelių į kiekvieną duobutę, paliekama, kad jos prisijungtų, 24 valandas. Baigiantis 24 valandų laikotarpiui, pridedami įvairių kakavos frakcijų skirtingi kiekiai, norint gauti dozės-atsako rezultatus. Kakavos frakcijos buvo ištirpintos terpėje, pagaminant du kartus didesnes koncentracijas, ir į tris duobutes dedant tą patį kiekį, pridedama 100 µl kiekvieno tirpalo. Sekančių dienų bėgyje plokštelės buvo dažomos 50 µl kristalvioleto (2,5 g kristalvioleto ištirpinta 125 ml metanolio ir 375 ml vandens) 15 minučių. Dažas pašalinamas, o plokštelė atsargiai pamerkiama į šaltą vandenį, kad būtų pašalintas dažo perteklius. Plovimas kartojamas dar du kartus, ir plokštelės paliekamos išdžiūti. Likęs dažas tirpinamas, pridedant į kiekvieną duobutę 100 µl 0,1 M natrio citrato 50 % etanolyje. Ištirpinus, ELISA plokštelių skaičiuokliu, esant 540 nm bangos ilgiui (palyginimo filtras 410 nm), nustatomas ląstelių skaičius. ELISA skaičiuoklio duomenys apdorojami grafiškai, ant y ašies atidedant optinį tankį, o ant x ašies - augimo dienas.

B metodas. Klonavimo minkštame agare bandymas

Ląstelės klonuojamos minkštame agare pagal Nawata, H., Chong, M.T., Bronzert, D. and Lippman, M.E. Estradiol-Independent Growth of a Subline of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in Culture, J. Biol. Chem., **256**:13, 6895-6902 (1981) aprašytą metodiką. Atskirų ląstelių suspensijos buvo pagamintos terpėje, kurioje yra 0,8 % agaro su įvairiomis kakavos frakcijų koncentracijomis. Suspensijos buvo išpilstytos lygiomis dalimis į 35 mm skersmens lėkšteles ir padengtos terpe, turinčia 1,0 % agaro. Po 10 inkubacijos dienų, Ominicron 3600 Image Analysis sistema nustatomas didesnių nei 60 µm kolonijų skaičius. Rezultatai apdorojami grafiškai, atidedant ant y ašies kolonijų skaičių, o ant x ašies - kakavos frakcijos koncentraciją.

C metodas. XTT-mikrokultūros tetrazolio bandymas

Įvairių kakavos frakcijų skryningui panaudota XTT bandymo metodika, kurią aprašė Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazin Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Canur Research*, **48**, 4827-4833 (1988). XTT bandymas buvo iš esmės toks pats, kaip ir bandymas, aprašytas naudojant MTT metodiką (6 pavyzdys), išskyrus tokius pakeitimus. XTT ((2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolio hidroksidas) buvo pagamintas, padarant 1 mg/ml koncentraciją, serumo neturintioje terpėje, prieš tai pašildytoje iki 37 °C. PMS pagamintas, imant 5 mM koncentraciją PBS. XTT ir PMS sumaišomi santykiu: 10 µl PMS 1 mililitrui XTT, ir 50 µl PMS-XTT įpilama į kiekvieną duobutę. Inkubavus 37 °C temperatūroje 4 valandas, plokštelės maišomos 30 min. mechaniniu vibratoriumi ir matuojamas optinis tankis 450-600 nm intervale. Rezultatai apdorojami grafiškai, atidedant ant y ašies optinį tankį, o ant x ašies - augimo dienas arba koncentraciją.

A ir C metodų atveju, rezultatai taip pat apdorojami grafiškai, atidedant ant y ašies procentus nuo kontrolės, o ant x ašies - augimo dienas arba koncentraciją.

XTT ir kristalvioleto bandymų metodikos buvo palygintos D&E frakcijos (3B pavyzdys) kakavos ekstraktams MCF-7 p168 krūties vėžio ląstelių linijos atžvilgiu, norint nustatyti, kuris iš šių bandymų yra jautriausias. Kaip parodyta fig.15A, abu bandymai davė tuos pačius dozės-atsako efektus, kai koncentracijos yra didesnės už 75 µg/ml. Esant mažesnėms už šią reikšmę koncentracijoms, kristalvioleto bandymas davė didesnius standartinius nukrypimus nei XTT bandymo rezultatai. Tačiau, kadangi kristalvioleto bandymą lengviau naudoti, visi tolimesni bandymai, jeigu nenurodyta kitaip, buvo atlikti pagal šią metodiką.

Pateikti kristalvioleto bandymo rezultatai (fig.15B-15E), norint parodyti nevalytų polifenolių ekstraktų (2 pavyzdys) poveikį atitinkamai į krūties vėžio ląstelių liniją MDA MB231, prostatos vėžio ląstelių liniją PC-3, krūties vėžio ląstelių

liniją MCF-7 p163 ir gimdos kaklelio vėžio ląstelių liniją Hela. Visais atvejais 250 $\mu\text{g/ml}$ dozė pilnai inhibavo visų vėžinių ląstelių augimą per 5-7 dienas. Pasirodė, kad Hela ląstelių linija yra labiau jautri ekstraktui, kadangi 100 $\mu\text{g/ml}$ dozė taip pat inhibavo augimą. Taip pat buvo bandytos 3B pavyzdžio kakavos frakcijų poveikis Hela ir kito krūties vėžio - SKBR-3 - ląstelių linijai. Rezultatai (fig.15F ir 15G) parodė, kad D&E frakcija turi didžiausią aktyvumą. Kaip parodyta fig.15H ir 15I, abiems ląstelių linijoms buvo gautos apie 40 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} reikšmės.

D&E kakavos frakcijos taip pat buvo ištirtos klonavimo minkštame agare bandyme, kuriame buvo nustatyta tiriamojo junginio(ių) sugebėjimas inhibuoti nuo pririšimo nepriklausantį augimą. Kaip parodyta fig.15J, 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentracija pilnai inhibuoja Hela ląstelių kolonijų susidarymą.

Buvo taip pat ištirta nevalytų fenolių ekstraktų, gautų iš aštuonių skirtingų kakavos genotipų, atstovaujančių tris sodininkystės veisles, poveikis į Hela ląstelių liniją. Kaip parodyta fig.15K, įvairios kakavos veislės rodo panašius dozės-atsako efektus. UIT-1 atmaina parodė didžiausią aktyvumą prieš Hela ląstelių liniją. Šie rezultatai rodo, kad visi kakavos genotipai turi fenolių frakciją, kuri rodo aktyvumą prieš bent vieną žmogaus vėžinių ląstelių liniją, nepriklausomai nuo geografinės kilmės, sodininkystės veislės ir genotipo.

Kita bandymų eilė buvo atlikta su nevalytais polifenolių ekstraktais, pagamintais, paimant kiekvieną dieną mėginius iš vienos tonos apimties tradicinio 5 dienų trukmės Brazilijos kakavos pupelių fermentavimo proceso, po kurio eina 4 dienų trukmės džiovavimo saulėje stadija. Rezultatai, parodyti fig.15L, nerodo aiškių šių pradinių apdorojimo stadijų efekto, kas leidžia manyti, kad polifenolių kompozicija mažai keičiasi. Tačiau yra žinoma (Lehrman, D.W.; Patterson, G.R. In Biotechnology; Reed, G., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, 1983, Vol.5, Chapter 12), kad fermentacijos stadijoje polifenoloksidazė (PPO) oksiduoja polifenolius. Norint nustatyti, kokį poveikį fermentiniu būdu oksiduoti polifenoliai turi į aktyvumą, atliktas kitas eksperimentas. Nevalyta PPO buvo pagaminta, ekstrahuojant smulkiai sumaltas, nefermentuotas, šaltai išdžiovintas, nuriebalintas Brazilijos kakavos

pupelės acetonu, imant 1 gramui miltelių 10 ml acetono. Suspensija centrifuguojama 15 min., esant 3000 aps./min. Tai buvo kartojama tris kartus, kiekvieną kartą atskiriant nuopilą, o išekstrahavus ketvirtą kartą, nufiltruojama per Biuchnerio piltuvą. Acetonu išekstrahuoti milteliai paliekami išdžiūti ore, o po to atliekamas bandymas pagal McLord and Kilara (1983) aprašytą metodiką. Į nevalytų polifenolių tirpalą (100 µg/10 ml citratinio-fosfatinio buferio, 0,02 M, pH 5,5) pridedama 100 mg acetonu išekstrahuotų miltelių (4000 vien./mg baltymo) ir maišoma oro srove burbuliuojant per suspensiją 30 min. Mėginys centrifuguojamas 15 min., esant 5000xg, ir nuopilas ekstrahuojamas 3 x 20 ml etilacetato. Etilacetato ekstraktai sumaišomi, sausai nudistiliuojama daliniame vakuume, pridedama 5 ml vandens ir liofilizuojama. Tada ši medžiaga tirinama Hela ląstelių atžvilgiu, ir lyginamos dozės-atsako kreivės su nevalytų polifenolių ekstraktų, kurie nebuvo apdoroti fermentu, kreivėmis. Rezultatai (fig.15M) parodė žymų fermentiškai oksiduotų ekstraktų dozės-atsako kreivės poslinkį, rodantį, kad oksiduoti produktai yra stipresni inhibitoriai nei jų gamtinės formos.

9 pavyzdys: Kakavos ekstraktų, turinčių procianidinų, antioksidacinis aktyvumas

Literatūriniai duomenys leidžia manyti, kad yra ryšys tarp gamtoje atsirandančių antioksidantų (vitaminų C, E ir B-karoteno) ir ligos tikimybės sumažėjimo, įskaitant vėžį (Designing Foods, Manipulating Foods to Promote Health, Inform, 4:4, 344-369 (1993); Caragay, A.B., Cancer Preventive Foods and Ingredients, Food Technology, 46:4, 65-79 (1992)). Paprastai manoma, kad šie antioksidantai veikia tam tikrus oksidacinius ir laisvaradikalinius procesus, kurie yra kai kurių tipų auglių atsiradimo skatinimo priežastis. Be to, kai kurie augalų polifenoliniai junginiai, kurie, kaip buvo parodyta, yra antikarcinogeniniai, taip pat turi nemažą antioksidantinį aktyvumą (Ho et al., 1992; Huang et al., 1992).

Norint nustatyti, ar kakavos ekstraktai, turintys procianidinų, turi antioksidantinių savybių, buvo naudotas standartinis Rancimat'o metodas. Kakavos ekstraktams gauti panaudotos 1, 2 ir 3 pavyzdžiuose aprašytos metodikos; ekstraktai

buvo toliau apdorojami, norint gauti dvi frakcijas iš gelio pralaidumo chromatografijos. Šios dvi frakcijos iš esmės buvo A-C frakcijų ir D ir E frakcijų kombinacijos (žr. fig.1), kurių antioksidantinės savybės buvo lyginamos su sintetiniais antioksidantais BHA ir BHT.

Žemės riešutų aliejus buvo išspausstas iš nepakeptų žemės riešutų, nuėmus odeles. Kiekvienas tiriamasis junginys buvo įterptas į aliejų, sudarant 2 koncentracijų lygius: ≈ 100 m.d ir ≈ 20 m.d. (tikslūs kiekiai duoti 7 lentelėje). Į kiekvieną mėginį pridedama 50 μ l antioksidanto tirpalo metanolyje antioksidanto dispergavimui palengvinti. Kontrolinis mėginys buvo pagamintas su 50 μ l metanolio, neturinčio antioksidanto.

Buvo tiriami sudvejinti mėginiai, norint nustatyti oksidacinį stabilumą, naudojant Rancimat'o stabilumo testą 100 °C temperatūroje, kai oro greitis yra 20 cm^3/min . Eksperimento parametrai pasirinkti taip, kad jie atitiktų parametrus, naudotus aktyvaus deguonies metode (AOM) arba Swift'o stabilumo teste (Van Oosten, C.W., Poot, C and Hensen, A.C., The Precision of Swift Stability Test, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **83**:4, 133-135 (1981). Rezultatai duoti 8 lentelėje, t.y. valandos, reikalingos 100 mekv. peroksido kiekiui pasiekti.

7 lentelė: Antioksidantų koncentracijos

Mėginys	m.d	
	1 lygis	2 lygis
Butilintas hidroksitoluenas (BHT)	24	120
Butilintas hidroksianizolas (BHA)	24	120
Nevalyta kakvos butilacetatinė frakcija	22	110
A-C frakcija	20	100
D-E frakcija	20	100

8 lentelė: Riešutų aliejaus su įvairiais antioksidantais oksidacinis stabilumas

Mėginys	20 m.d.	100 m.d.
Kontrolė	10,5±0,7 (vidurkis)	
BHT	16,5±2,1	12,5±2,1
BHA	13,5±2,1	14,0±1,4
Nevalyta kakavos frakcija	18,0±0,0	19,0±1,4
A-C frakcija	16,0±6,4	17,5±0,0
D-E frakcija	14,0±1,4	12,5±0,7

Šie rezultatai rodo padidintą riešutų aliejaus su visais tirtaisiais priedais oksidacinį stabilumą. Didžiausias oksidacinio stabilumo padidėjimas buvo gautas mėginyje su įterptu nevalytu etilacetatiniu kakavos ekstraktu. Šie rezultatai rodo, kad kakavos ekstraktai, turintys procianidinų, turi tokį patį arba didesnį antioksidacinį potencialą, nei vienodi sintetinių BHA ir BHT kiekiai. Iš to seka, kad šio išradimo medžiagos gali būti naudojamos vietoj BHT arba BHA tais atvejais, kur naudojami BHT arba BHA, pavyzdžiui, tokiais kaip antioksidantai ir/arba maisto priedai. Be to, šiuo požiūriu reikia pažymėti, kad išradimo medžiagos yra iš maistinio šaltinio. Turėdamas šiuos rezultatus, patyręs specialistas, nedarydamas eksperimentų, galės lengvai nustatyti tinkamą išradimo medžiagos kiekį, naudojant ją vietoj BHA arba BHT, pvz., kiekį, kurį reikia pridėti į maistą.

10 pavyzdys: Topoizomerazės II inhibicijos tyrimas

DNR topoizomerazės I ir II yra fermentai, kurie katalizuoja DNR grandinių suskaldymą ir susijungimą, kontroliuodami DNR topologines būsenas (Wang, J.C., DNA Topoisomerases, Ann. Rev. Biochem., **54**, 665-697 (1985). Šalia intraląstelinių topoizomerazės tyrimų, vienas iš svarbiausių atradimų buvo topoizomerazės II, kaip pirminio ląstelės taikinio, nustatymas eilei kliniškai svarbių priešnavikinių junginių (Yamashita, Y., Kawada, S.-Z. and Nakano, H., Induction of Mammalian Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Nonintercalative Flavanoids,

Genistein and Orbol., Biochem. Pharm., **39**:4, 737-744 (1990), kurie apima įsiterpiančius agentus (m-AMSA, Adriamycin® ir elipticiną), o taip pat ir neįsiterpiančius epipodofilotoksinus. Kai kurie duomenys rodo, kad kai kurie priešnavikiniai vaistai turi bendrą savybę stabilizuoti DNR-topoizomerazės II kompleksą ("skaldomas kompleksas"), kuriam susidūrus su denatūruojančiais agentais, indukuojamas DNR suskaldymas (Muller, M.T., Helal, K., Soisson, S and Spitzer, J.R., A Rapid and Quantitative Microtiter Assay for Eukaryotic Topoisomerase II, Nuc. Acid Res., **17**:9499 (1989). Buvo pasiūlyta, kad šis priešnavikinių vaistų sukeltas skaldomas kompleksas pagamina didelio tūrio DNR aduktus, kurie gali sunaikinti ląsteles.

Pagal šį patrauklų modelį, specifinis naujas DNR topoizomerazės II skaldomo komplekso induktorius yra tinkamas kaip priešvėžinis, priešnavikinis arba antineoplazminis agentas. Bandant nustatyti citotoksinius junginius, turinčius aktyvumą, taikomą į DNR, buvo atliktas kakavos procianidinių padidinto citotoksinio aktyvumo prieš keletą DNR naikinimui jautrių ląstelių linijų skryningas ir fermentinis tyrimas su žmogaus topoizomeraze II, gauta iš limfomos.

A. Kinetoplastų DNR surišimo pašalinimas topoizomeraze II

Topoizomerazės II kinetoplastų DNR surišimo pašalinimo inhibavimas *in vitro*, kaip aprašė Muller, M.T., Helal, K., Soisson, S and Spitzer, J.R., A Rapid and Quantitative Microtiter Assay for Eukaryotic Topoisomerase II, Nuc. Acid Res., **17**:9499 (1989), buvo atliktas tokiu būdu. Branduolių ekstraktai, turintys topoizomerazės II aktyvumą, buvo pagaminti iš žmogaus limfomos, modifikuojant Miller, K.G., Liu, L.F. and Englund, P.A., Homogeneous Type II DNA Topoisomerase from Hela Cell Nuclei, J. Biol. Chem., **256**:9334 (1981) ir Danks, M.K., Schmidt, C.A., Cirtain, M.C., Suttle, D.P., and Beck, W.T., Altered Catalytic Activity of and DNA Cleavage by DNR Topoisomerase II from Human Leukemic Cells Selected for Resistance to VM-26, Biochem., **27**:8861 (1988) metodus. Vieno išvalyto fermento vieneto užtenka 0,25µg kinetoplastų DNR surišimui pašalinti per 30 min. 34 °C temperatūroje. Kinetoplastų DNR buvo gauta iš *Crithidia fasciculata*

tripanosomos. Visos reakcijos buvo vykdomos 0,5 ml talpos mikrocentrifuginiuose mėgintuvėliuose, kuriuose buvo 19,5 μ l H₂O, 2,5 μ l 10x buferio (1x buferyje yra 50 mM tris-HCl, pH 8,0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 0,5 mM ditioneitolio ir 30 μ g BSA/ml), 1 μ l kinetoplastų DNR (0,2 μ g) ir 1 μ l DMSO turinčių įvairios koncentracijos kakavos procianidinų bandomųjų frakcijų. Ši kombinacija kruopščiai sumaišoma ir laikoma lede. Prieš pat inkubaciją vandens vonioje 34 °C temperatūroje 30 minučių, pridedamas vienas topoizomerazės vienetas.

Po inkubacijos, surišimo pašalinimo bandymas sustabdomas, pridedant 5 μ l stop-buferio (5 % sarkosilo, 0,0025 % bromfenolio mėlio, 25 % glicerolio), ir padedama ant ledo. Atliekama DNR elektroforezė 1 % agarozės gelyje TAE buferyje, turinčiame etidžio bromido (0,5 μ g/ml). Apšvietus ultravioletine 310 nm bangos ligo šviesa, galima matyti DNR. Geliai buvo nufotografuoti Polaroid Land kamera.

Fig.17 rodo šių eksperimentų rezultatus. Pilnai surišta kinetoplastų DNR nemigruoja į 1 % agarozės gelį. Topoizomerazės II sukeltas kinetoplastų DNR surišimo pašalinimas duoda monomerinę DNR (monomerinis žiedas, I ir II formos), kuri migruoja į gelį. Fermento inhibicija, kurią sukelia kakavos procianidinų pridėjimas, matoma iš laipsniško monomero juostų išnykimo, didėjant koncentracijai. Remiantis šiais rezultatais buvo parodyta, kad kakavos procianidinų A, B, D ir E frakcijos inhibuoja topoizomerazę II, kai jų koncentracijos yra 0,5-5,0 μ g/ml intervale. Šios inhibitoriaus koncentracijos yra labai panašios į koncentracijas, gautas mitoksantronui ir m-AMSA [4'-(9-akridinilamino)metansulfon-m-anizidinui].

B. Vaistams jautrios ląstelių linijos

Atliktas kakavos procianidinų skryningas keleto DNR naikinimui jautrių ląstelių linijų atžvilgiu. Viena iš ląstelių linijų buvo xrs-6 DNR dvigrandininis suskaldytas-atstatytas mutantas, sukurtas P. Jeggo (Kemp, L.M., Sedgwick, S.G. and Jeggo, P.A., X-ray Sensitive Mutants of Chinese Hamster Ovary Cells Defective in Double Strand Break Rejoining, *Mutat. Res.*, **132**:189 (1984)). xrs-6 ląstelių linijos

DNR atstatymo nepakankamumas daro jas ypatingai jautrias apspinduliavimui Rentgeno spinduliais ir junginiams, kurie tiesiogiai duoda DNR dvigubos grandinės trūkius, tokiems kaip bleomicinas, ir junginiams, kurie inhibuoja topoizomerazę II, ir tokiu būdu gali netiesiogiai sukelti dvigubos grandinės trūkius, kaip pasiūlė Warters, R.L., Lyons, B.W., Li, T.M. and Chen, D.J., Topoisomerase II Activity in a DNA Double-Strand Break Repair Deficient Chinese Hamster Ovary Cell Line, *Mutat. Res.*, **254**:167 (1991). Citotoksiškumas atstatymo nepakankamumą turinčiai linijai buvo lyginamas su citotoksiškumu tobulą DNR atstatymą turinčiai CHO linijai - BR1. Padidintas citotoksiškumas atstatymo nepakankamumą turinčiai linijai (xrs-6) buvo interpretuojamas kaip DNR skaldomos dvigubos grandinės trūkio susidarymo įrodymas.

Tobulą DNR atstatymą turinčią CHO liniją (BR1) sukūrė Barrows, L.R., Borchers, A.H., and Paxton, M.B., Transfectant CHO Cells Expressing O⁶-alkylguanine-DNR-alkyltransferase Display Increased Resistance to DNA Damage Other than O⁶-guanine Alkylation, *Carcinogenesis*, **8**:1853 (1987); ji ekspresuoja O⁶-alkilguanin-DNR-alkiltransferazę, apart normalių CHO DNR atstatymo fermentų. CHO dvigubos grandinės trūkio atstatymo nepakankamumą turinčią liniją (xrs-6) padovanojo Dr. P. Jeggo ir jo bendradarbiai (Jeggo, P.A., Caldecott, K., Pidsley, S., and Banks, G.R., Sensitivity of Chinese Hamster Ovary Mutants Defective in DNA Double Strand Break Repair to Topoisomerase II Inhibitors, *Cancer Res.*, **49**:7057 (1989). Abi šios linijos buvo auginamos monosluoksnių pavidalu alfa-MEM, turinčioje serumo ir antibiotikų, kaip aprašyta 6 pavyzdyje. Ląstelės buvo laikomos 37 °C temperatūroje, drėgnoje 5 % CO₂ atmosferoje. Prieš apdorojimą kakavos procianidinais, ląstelės, išaugintos monosluoksniais, buvo atskirtos, paveikiant tripsinu. Bandymai atlikti, naudojant 6 pavyzdyje aprašytą MTT bandymo metodiką.

Rezultatai (fig.18) rodo, kad nėra padidinto citotoksiškumo xrs-6 ląstelių atžvilgiu, kas leidžia manyti, kad kakavos procianidinais inhibuoja topoizomerazę II skirtingu nuo skaldomos dvigubos grandinės trūkio susidarymo būdu. Tai yra

kakavos procianidiniai sąveikauja su topoizomerase II prieš sąveikaujant jai su DNR, susidarant nesuskaldomam kompleksui.

Nesuskaldomą kompleksą sudarantys junginiai atrasti palyginus neseniai. Antraciklinų, podofilino alkaloidų, antracendionų, akridinų ir elipticinų atstovai buvo priimti klinikiniam naudojimui, kaip priešvėžiniai, priešnavikiniai arba antineoplazminiai vaistai, ir jie duoda suskaldomus kompleksus (Liu, L.P., DNA Topoisomerase Poisons as Antitumor Drugs, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 351-375 (1989)). Neseniai buvo rasta keletas naujų topoizomerazės II inhibitorių klasių, kurie atrodo nesudaro suskaldomų kompleksų. Tokie inhibitoriai yra amonafidas (Hsiang, Y.-H., Jiang, J.B., and Liu, L.F., Topoisomerase II Mediated DNA Cleavage by Amonafide and Its Structural Analogs, *Mol. Pharmacol.*, **36**, 371-376 (1989)), distamicinas (Fesen, M. and Pommier, Y., Mammalian Topoisomerase II Activity is Modulated by the DNR Minor Groove Binder - Distainycin in Simian Virus 40 DNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 11354-11359 (1989)), flavanoidai (Yamashita, Y., Kawada, S.-Z. and Nakano, H., Induction of Mammalian Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Nonintercalative Flavanoids, Genistein and Orbol., *Biochem. Pharm.*, **39**:4, 737-744 (1990)), saintopinas (Yamashita, Y., Kawada, S.-Z., Fujii, N. and Nakano, H., Induction of Mammalian DNA Topoisomerase I and II Mediated DNA Cleavage by Saintopin, a New Antitumor Agent from Fungus, *Biochem.*, **30**, 5838-5845 (1991)), membranonas (Drake, F.H., Hofmann, G.A., Mong, S.-M., Bartus, J.O., Hertzberg, R.P., Johnson, R.K., Mattern, M.R., and Mirabelli, C.K., *In vitro* and Intracellular Inhibition of Topoisomerase II by the Antitumor Agent Membranone, *Cancer Research*, **49**, 2578-2583 (1989)), terpenoidai (Rawada et al., 1991), antrapirazolai (Fry, D.W., Boritzki, T.J., Besserer, J.A., and Jackson, R.C., *In vitro* Strand Scission and Inhibition of Nucleic Acid Synthesis on L1210 Leukemia Cells by a New Class of DNA Complexes, the anthra[1,9-CD]pyrazol-6(2H)-ones (anthrapyrazoles), *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3499-3508 (1985)), dioksopiperazinais (Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R. and Andoh, T., Inhibition of Topoisomerase II by Antitumor Agents bis(2,6-

dioxopiperazine) Derivatives, *Cancer Research*, **51**, 4903-4908 (1991) ir jūrų akridinas - dercitinas (Burres, N.S., Sazesh, J., Gunawardana, G.P., and Clement, J.J., Antitumor Activity and Nuclein Acid Binding Properties of Dercitin, a New Acridine Alkaloid Isolated from Marine *Dercitus* species Sponge, *Cancer Research*, **49**, 5267-5274 (1989).

Kadangi kakavos procianidinai inaktyvuoja topoizomerazę II prieš susidarant suskaldomam kompleksui, jie turi chemoterapinę vertę arba vieni, arba kombinacijoje su kitais žinomais ir mechaniškai nustatytais topoizomerazės II inhibitoriais. Be to, pasirodo, kad kakavos procianidinai yra nauja topoizomerazės II inhibitorių klasė (Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Lee, K.J.-H., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K.F., and Lee, K.-H., Tannin as Potent Inhibitors of DNA Topoisomerase II *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **82**:5, 487-492 (1993), ir jie gali būti mažiau toksiški ląstelėms nei kiti žinomi inhibitoriai, o tai padidina jų naudingumą chemoterapijoje.

Žmogaus krūties vėžio ląstelių linija MCF-7 (ADR), kuri ekspresuoja su membranomis surištą glikoproteiną (gp170, suteikiantį atsparumą daugeliui vaistų) (Leonessa, F., Jacobson, M., Boyle, B., Lippman, J., McGarvey, M., and Clarke, R. Effect of Tamoxifen on the Multidrug-Resistant Phenotype in Human Breast Cancer Cells: Isobolograms, Drug Accumulation, and Mr 170,000 Glycoprotein (gp 170) Binding Studies, *Cancer Research*, **54**, 441-447 (1994), ir jų tėvinė linija MCF-7 p168 buvo panaudotos kakavos D&E frakcijų poveikio tyrimams. Kaip parodyta fig.19, tėvinę liniją inhibuoja D&E frakcijų vis didėjančios dozės, tuo tarpu adriamicinui (ADR) atsparią liniją mažiau veikia didelės dozės. Šie rezultatai rodo, kad D&E kakavos frakcijos turi poveikį į daugeliui vaistų atsparias ląstelių linijas.

11 pavyzdys: Procianidinų sintezė

Procianidinai buvo sintezuoti pagal Delcour, J.A., Ferreira, D. and Roux, D.G., Synthesis of Condensed Tannins, Part 9, The Condensation Sequence of Leucocyanidin with (+)-Catechin and with the Resultant Procyanidins, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1711-1717 (1983) sukurtas metodikas, jas modifikavus. Apart

(+)-katechino kondensacijos su dihidrokvercetinu redukuojančiomis sąlygomis, taip pat buvo naudotas (-)-epikatechinas, norint atspindėti dideles (-)-epikatechino, kuris paprastai būna nefermentuotose kakavos pupelėse, koncentracijas. Sintezės produktai buvo išskirti, išvalyti, išanalizuoti ir identifikuoti 3, 4 ir 5 pavyzdžiuose aprašytais metodais. Tokiu būdu buvo gauti biflavanoidai, triflavanoidai ir tetraflavanoidai, ir panaudoti kaip analitiniai standartai kakavos ekstraktams aukščiau aprašytu būdu.

12 pavyzdys: Normalios fazės pusiau preparatyvinių frakcijų tyrimas

Kadangi polifenoliniai ekstraktai susideda iš daugelio medžiagų, reikia nustatyti, kurie komponentai yra veiklūs prieš vėžinių ląstelių linijas, tolimesniam jų išvalymui, dozės-atsako tyrimams ir išsamiam struktūros nustatymui. Kakavos procianidinių išskirstymui pagal oligomerų dydį panaudotas normalios fazės pusiau preparatyvinis chromatografinis skirstymas (3B pavyzdys). Apart pradinio ekstrakto, buvo gauta dvylika frakcijų (fig. 2B ir 15 O), ir šios frakcijos, imant 100 µg/ml ir 25 µg/ml dozes, buvo išbandytos su Hela ląstelėmis, norint nustatyti, kuris oligomeras turi didžiausią aktyvumą. Kaip parodyta fig.20, 4-11 frakcijos (pentameras-dodekameras) turėjo IC_{50} reikšmę, apytikriai lygią 25 µg/ml. Šie rezultatai rodo, kad būtent šie oligomerai turi didžiausią aktyvumą prieš Hela ląsteles. Be to, kakavos D&E frakcijų normalios fazės HPLC analizė parodė, kad ši frakcija turi didesnę šių oligomerų kiekį.

Iš to, kas pasakyta aukščiau, aišku, kad šio išradimo kakavos polifenolių ekstraktas, taip pat kompozicijos, būdas ir rinkinys gali būti panaudojami praktikoje. Šiuo požiūriu jau buvo minėta, kad išradimas susijęs su maistiniu šaltiniu, ir kad aktyvumas *in vitro* gali parodyti bent jau tam tikrą aktyvumą *in vivo*, ypatingai panaudojant aukščiau aptartas dozes.

Be to, aukščiau duotas aprašymas rodo, kad kakavos polifenolių ekstraktas, o taip pat kompozicijos, jų gavimo būdas ir rinkinys turi antioksidantinį aktyvumą, kuris yra panašus į BHT ir BHA aktyvumą, bei oksidacijos stabilizavimą. Taigi, šio

išradimo medžiagos gali būti naudojamos vietoj BHT arba BHA tais atvejais, kur naudojami BHT ir BHA, tokiais kaip antioksidantai, pavyzdžiui, pridedami į maistą antioksidantai. Šio išradimo medžiagos gali būti naudojamos vietoj topoizomerazės inhibitorių ten, kur naudojami šie inhibitoriai. Tokiu būdu, yra daugybė kompozicijų ir metodų, kuriuos nagrinėja šis išradimas, pavyzdžiui, antioksidantų arba konservantų kompozicijos, topoizomerazę inhibuojančios kompozicijos, maisto apsaugojimo būdai arba bet koks norimas dalykas, toks kaip apsauga nuo oksidacijos, ir topoizomerazės inhibavimo būdai, susiję su ekstraktu ir/arba kakavos polifenoliu(iais), arba susiję su maisto, o taip pat ir topoizomerazės sąlyčiu su atitinkama kompozicija arba su ekstraktu ir/arba su kakavos polifenoliu(iais).

Smulkiai aprašius tinkamiausius šio išradimo įgyvendinimo variantus, turi būti suprantama, kad šio išradimo, kurio apimtis duota apibrėžtyje, neapriboja konkrečios, aprašyme duotos detalės; galimos įvairios jo variacijos, nenukrypstant nuo išradimo objekto ir sferos.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Iš esmės grynas kakavos ekstraktas, kuriame yra kakavos polifenolio(ių).
2. Ekstraktas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jį gauna būdu, į kurį įeina:
kakavos pupelių sumalimas į miltus,
šių miltų nuriebalinimas ir
kakavos polifenolio(ių) išekstrahavimas iš šių miltų ir jų išvalymas.
3. Ekstraktas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad kakavos sumalimo į miltus būdas apima:
pupelių ir pulpos išdžiovinimą šaltyje,
pulpos atskyrimą nuo pupelių šaltyje išdžiovintoje masėje,
šaltyje išdžiovintų kakavos pupelių išlukštenimą ir
išlukštentų pupelių sumalimą.
4. Ekstraktas pagal bet kurį iš 2 arba 3 punktų, besiskiriantis tuo, kad į jo gavimo būdą įeina dar ir ekstrakto valymas gelio pralaidumo chromatografijos ir/arba preparatyvinės didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu.
5. Ekstraktas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame esantis polifenolis(iai) yra bent vienas iš kakavos procianidinų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro: (-)-epikatechinas, procianidinas B-2, procianidino oligomerai 4-12, procianidinas B-5, procianidinas A-2 ir procianidinas C-1.
6. Antineoplazminė kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas arba sintetinis kakavos polifenolis(iai) ir tinkamas nešiklis.
7. Antineoplazminė kompozicija pagal 6 punktą, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas, turintis kakavos procianidino(ų).

8. Antineoplazminė kompozicija pagal 7 punktą, besiskirianti tuo, kad kakavos procianidiną(us) gauna būdu, į kurį įeina:

kakavos pupelių sumalimas į miltus,

šių miltų nuriebalinimas ir

kakavos polifenolio(ių) išekstrahavimas iš šių miltų ir jų išvalymas.

9. Antineoplazminė kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad kakavos sumalimo į miltus būdas apima:

pupelių ir pulpos išdžiovinimą šaltyje,

pulpos atskyrimą nuo pupelių šaltyje išdžiovintoje masėje,

šaltyje išdžiovintų kakavos pupelių išlukštenimą ir

išlukštentų pupelių sumalimą.

10. Antineoplazminė kompozicija pagal bet kurį iš 8 arba 9 punktų, besiskirianti tuo, kad į jos gavimo būdą įeina dar ir ekstrakto valymas gelio pralaidumo chromatografijos ir/arba preparatyvinės didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu.

11. Antineoplazminė kompozicija pagal 10 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esantis polifenolis(iai) yra bent vienas iš kakavos procianidinų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro: (-)-epikatechinas, procianidinas B-2, procianidino oligomerai 4-12, procianidinas B-5, procianidinas A-2 ir procianidinas C-1.

12. Antineoplazminės kompozicijos, kurioje yra iš esmės gryno kakavos ekstrakto arba sintetinio kakavos polifenolio(ių) efektyvus kiekis ir tinkamas nešiklis panaudojimas vaistų gamyboje.

13. Panaudojimas pagal 12 punktą, besiskiriantis tuo, kad antineoplazminis agentas yra iš esmės grynas kakavos ekstraktas, turintis kakavos procianidino(ų).

14. Panaudojimas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad kakavos procianidiną(us) gauna būdu, į kurį įeina:

kakavos pupelių sumalimas į miltus,

šių miltų nuriebalinimas ir

kakavos polifenolio(ių) išekstrahavimas iš šių miltų ir jų išvalymas.

15. Panaudojimas pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad kakavos pupelių sumalimo į miltus būdas apima:

pupelių ir pulpos išdžiovinimą šaltyje,
pulpos atskyrimą nuo pupelių šaltyje išdžiovintoje masėje,
šaltyje išdžiovintų kakavos pupelių išlukštenimą ir
išlukštentų pupelių sumalimą.

16. Panaudojimas pagal bet kurį iš 14 arba 15 punktų, besiskiriantis tuo, kad į antineoplazminio agento gavimo būdą įeina dar ir ekstrakto valymas gelio pralaidumo chromatografijos ir/arba preparatyvinės didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu.

17. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad ekstrakte esantis polifenolis(iai) yra bent vienas iš kakavos procianidinų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro: (-)-epikatechinas, procianidinas B-2, procianidino oligomerai 4-12, procianidinas B-5, procianidinas A-2 ir procianidinas C-1.

18. Rinkinys, skirtas gydymui paciento, kurį reikia gydyti antineoplazminiu agentu, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas, turintis procianidino(ų) arba sintetinio kakavos polifenolio(ių), ir tinkamas nešiklis.

19. Rinkinys pagal 18 punktą, besiskiriantis tuo, kad antineoplazminis agentas yra iš esmės grynas kakavos ekstraktas, turintis procianidino(ų), ir rinkinyje yra ingredientų sumaišymo ir/arba rinkinio vartojimo instrukcijos.

20. Liofilizuota antineoplazminė kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas arba sintetinis kakavos polifenolis(iai).

21. Liofilizuota antineoplazminė kompozicija pagal 20 punktą, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas, turintis kakavos procianidino(ų).

22. Antioksidanto arba konservanto kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas pagal 1 punktą arba sintetinis kakavos polifenolis(iai).

23. Topoizomerazę inhibuojanti kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina iš esmės grynas kakavos ekstraktas pagal 1 punktą arba sintetinis kakavos polifenolis(iai).

24. Norimo objekto išlaikymo arba apsaugojimo nuo oksidacijos būdas, besiskiriantis tuo, kad šis objektas paveikiamas kompozicija pagal 22 punktą.

25. Būdas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad objektas yra maisto produktai.

26. Topoizomerazės inhibavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad topoizomerazė paveikiama kompozicija pagal 23 punktą.

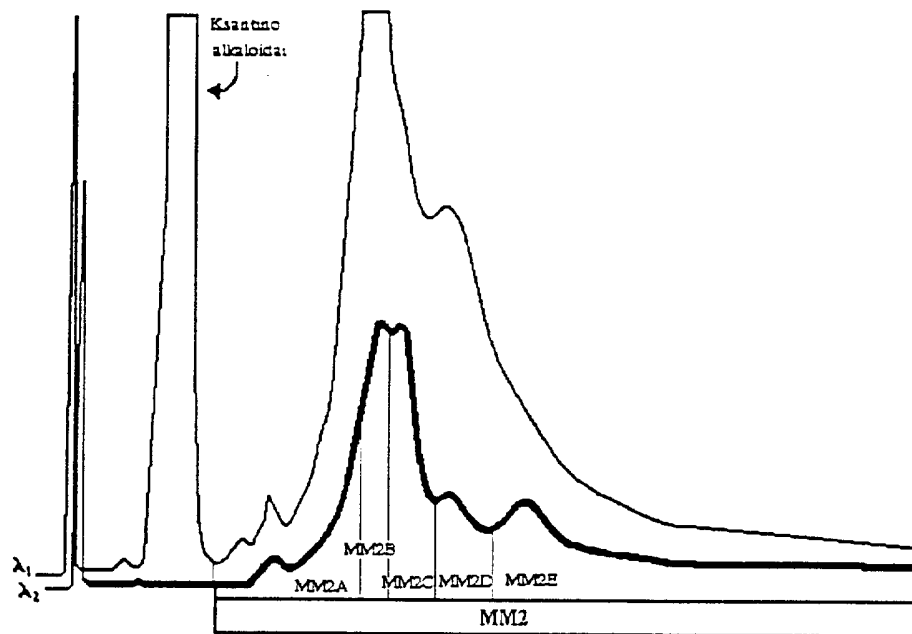


Fig.1

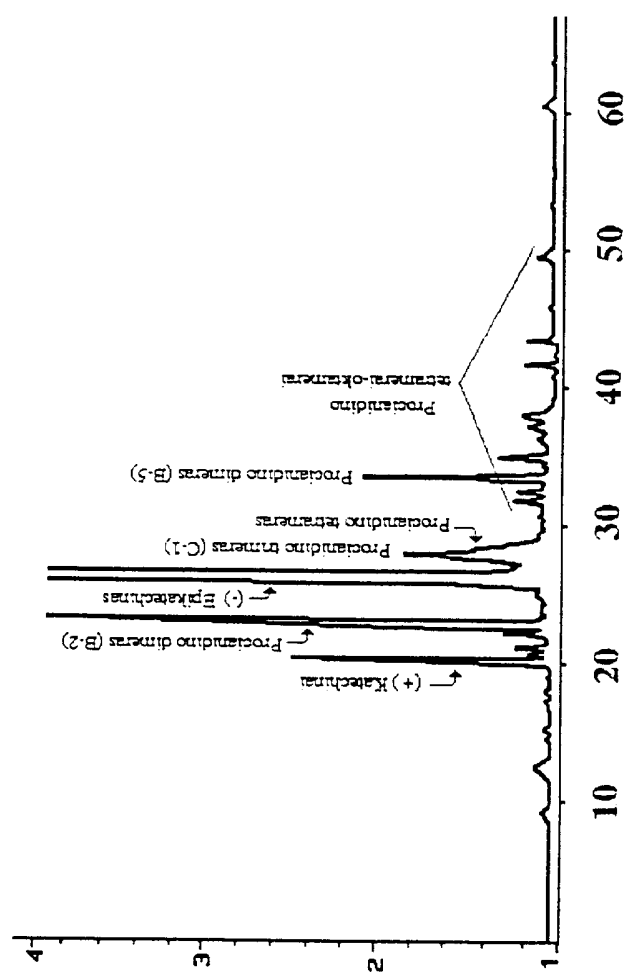


Fig.2A

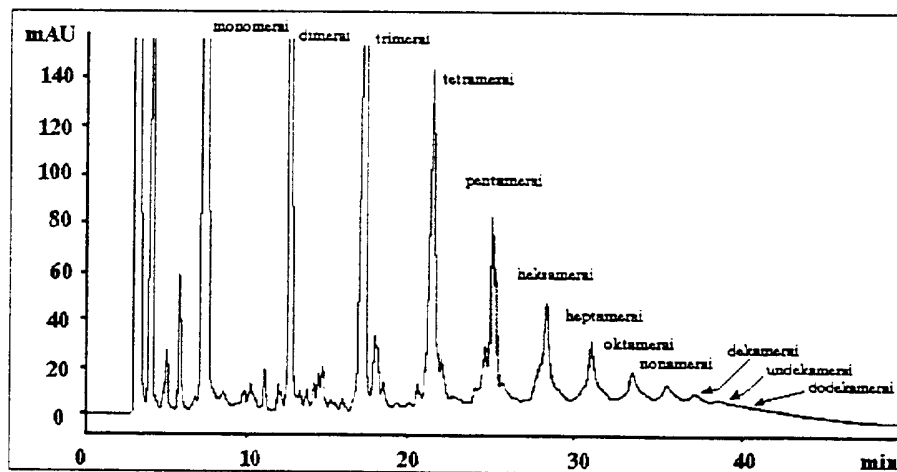
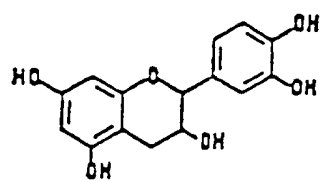
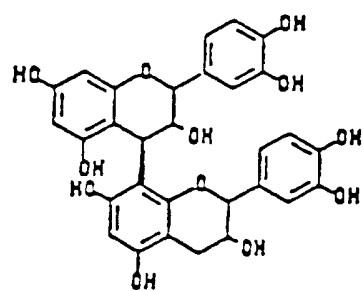


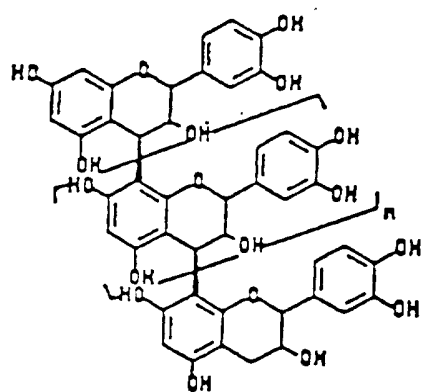
Fig2B.



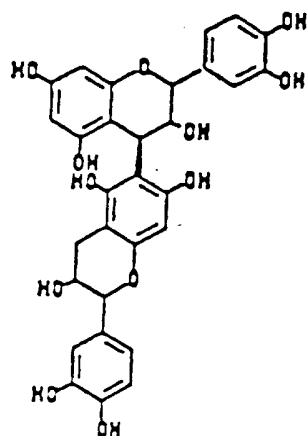
(-) epikatechinas



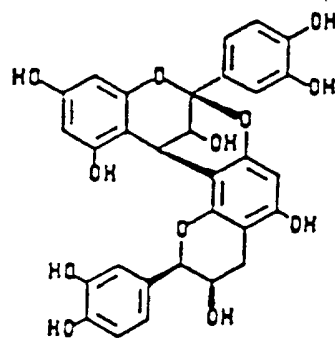
procianidinas B-2



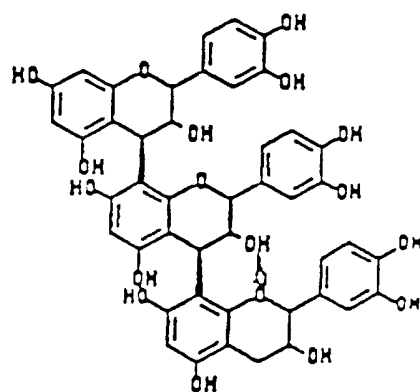
procianidino oligomerai n=2-5



procianidinas B-5



procianidinas A-2



procianidinas C-1

Fig.3

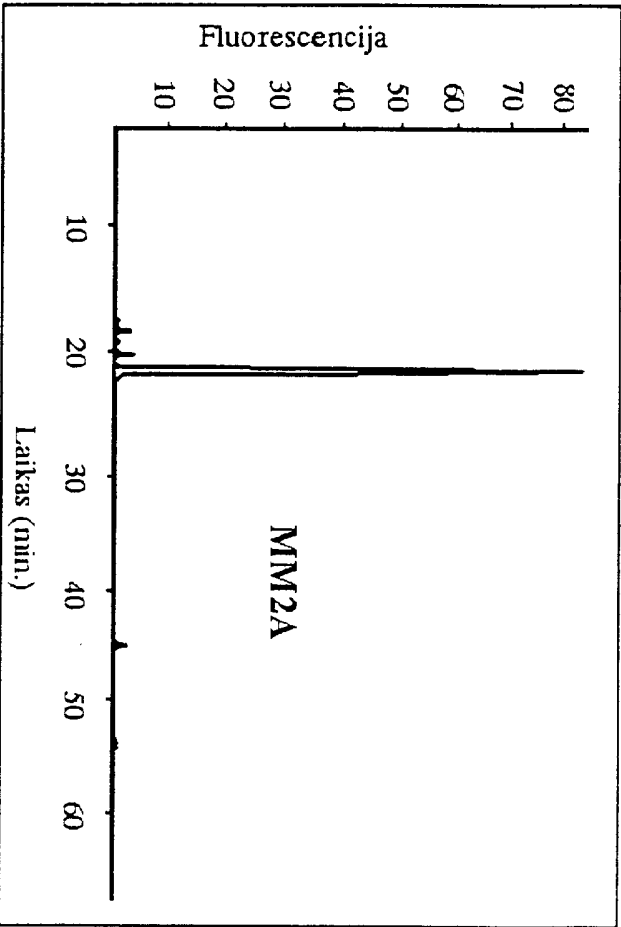


Fig.4A

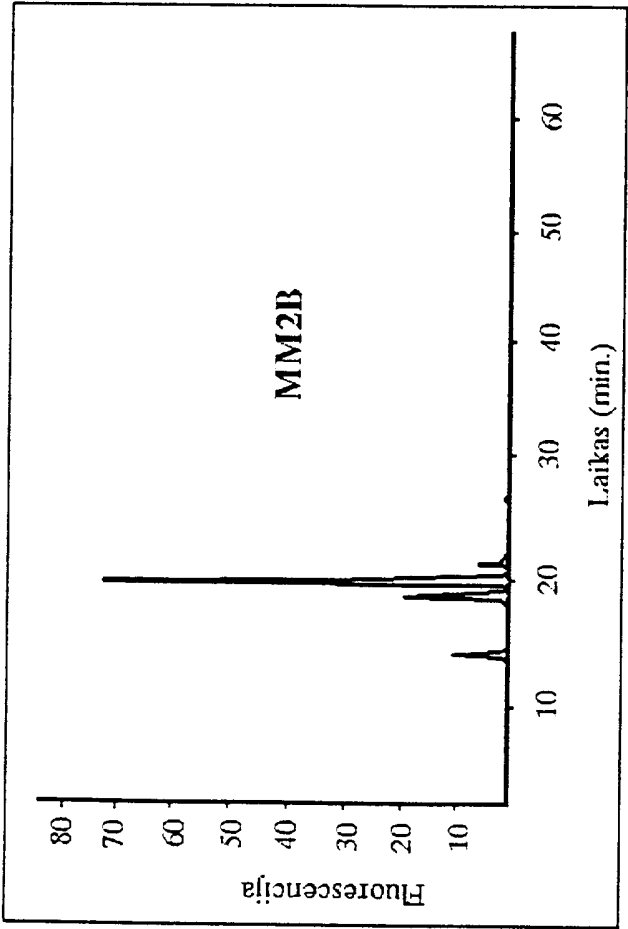


Fig.4B

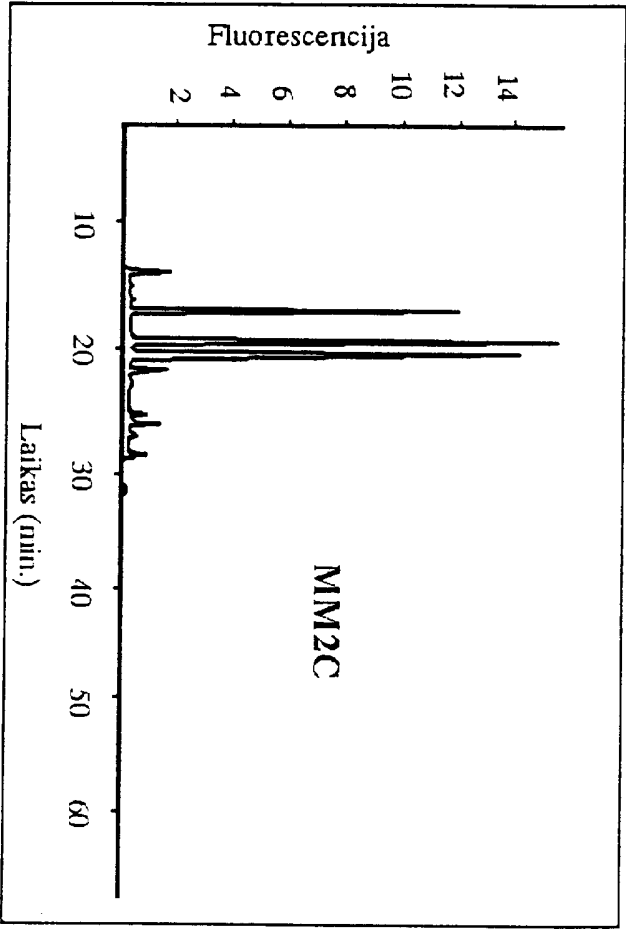


Fig.4C

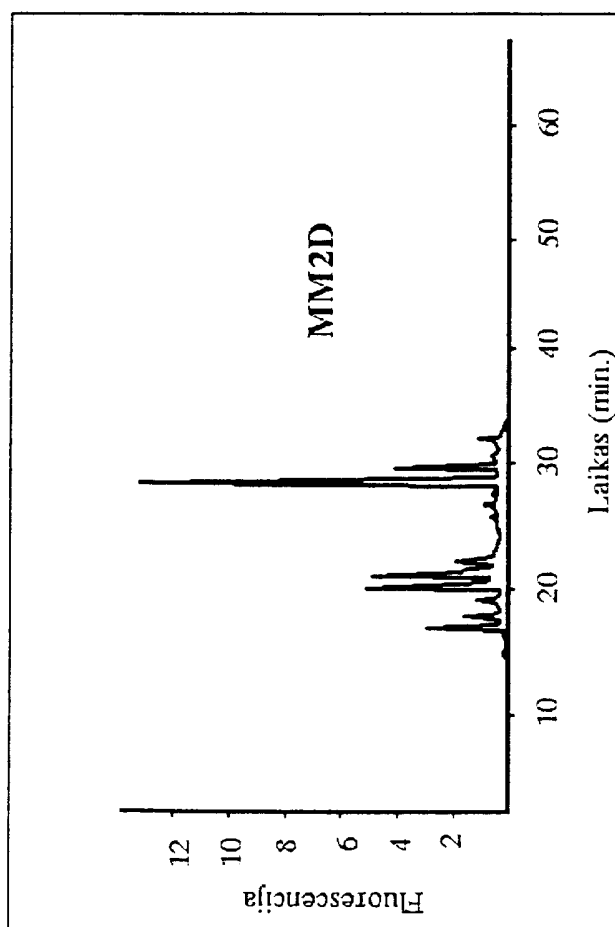


Fig.4D

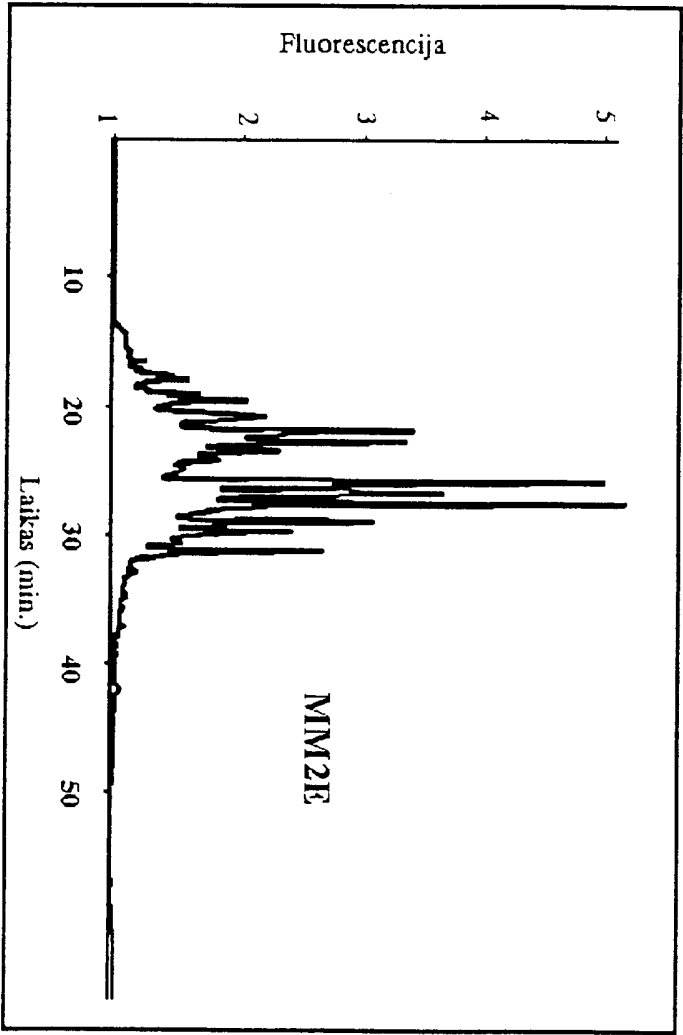


Fig.4E

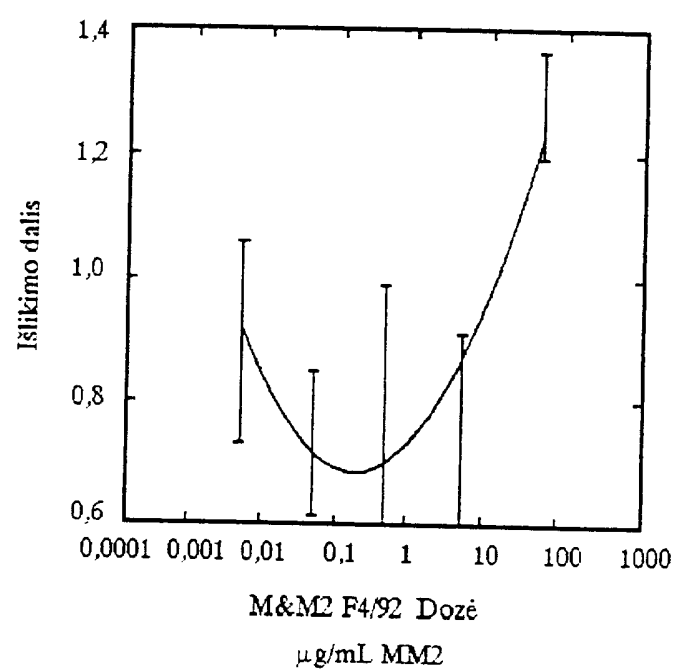


Fig.5

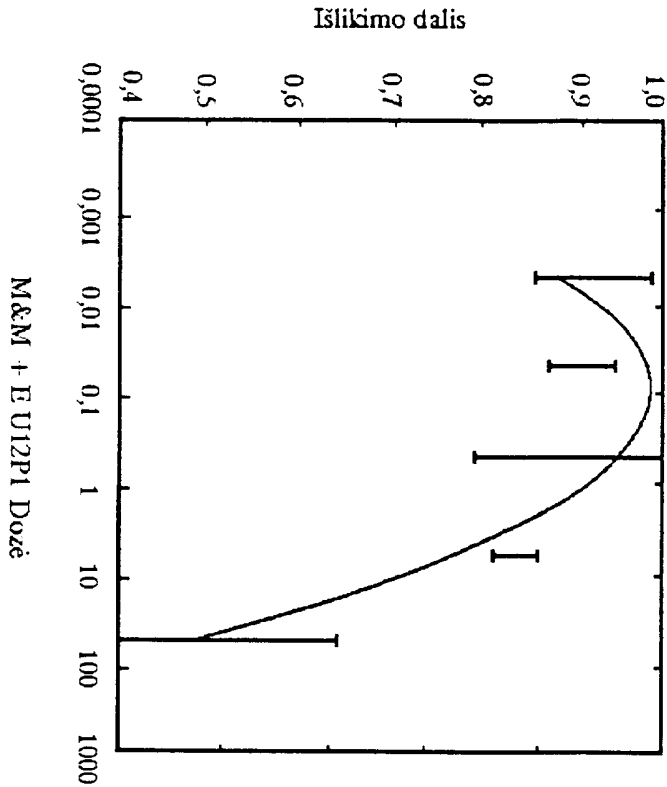


Fig.6A

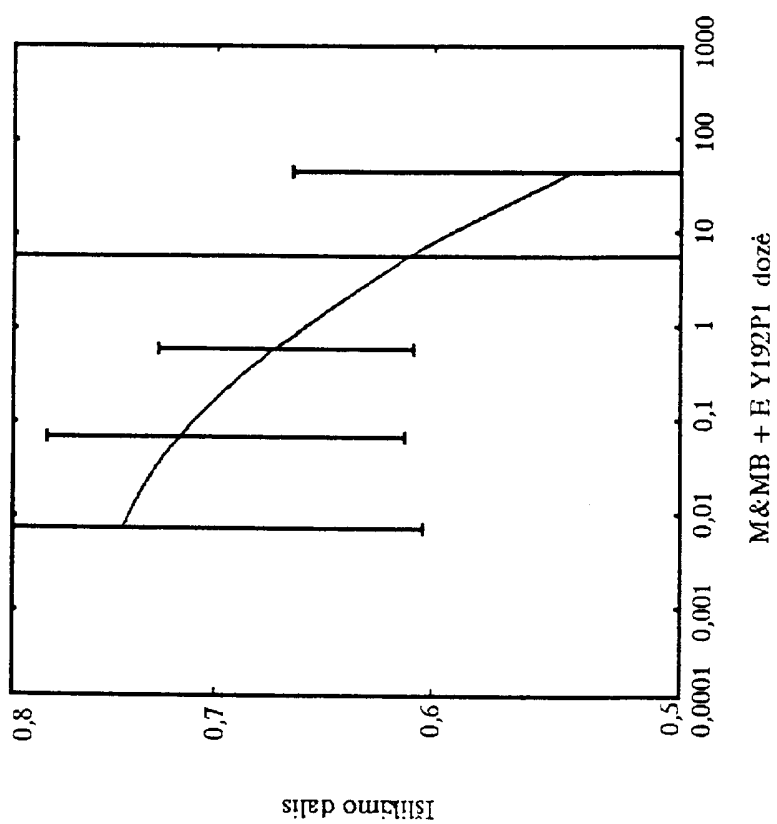


Fig.6B

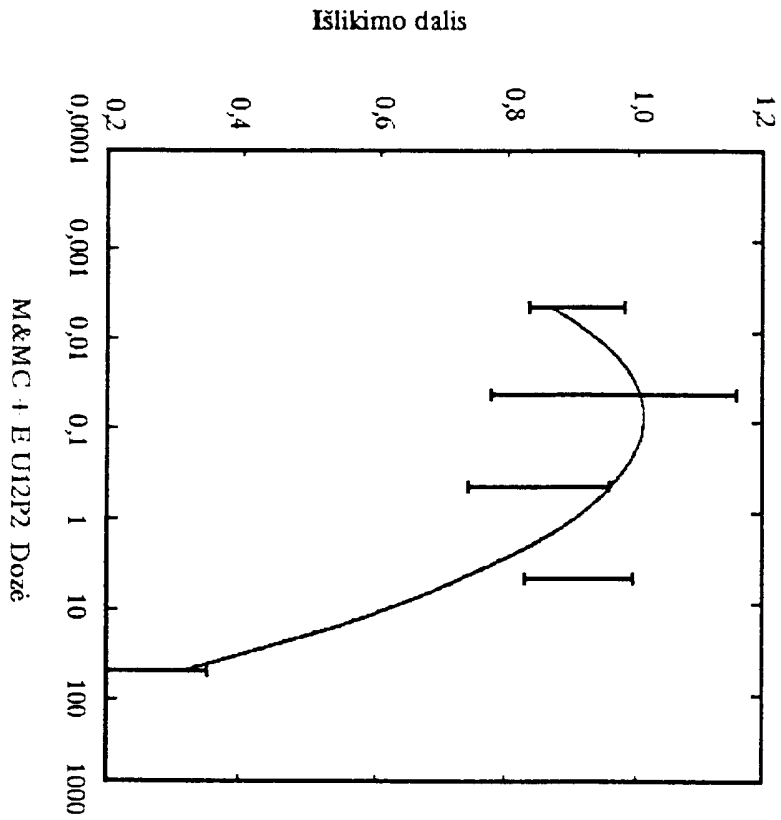


Fig.6C

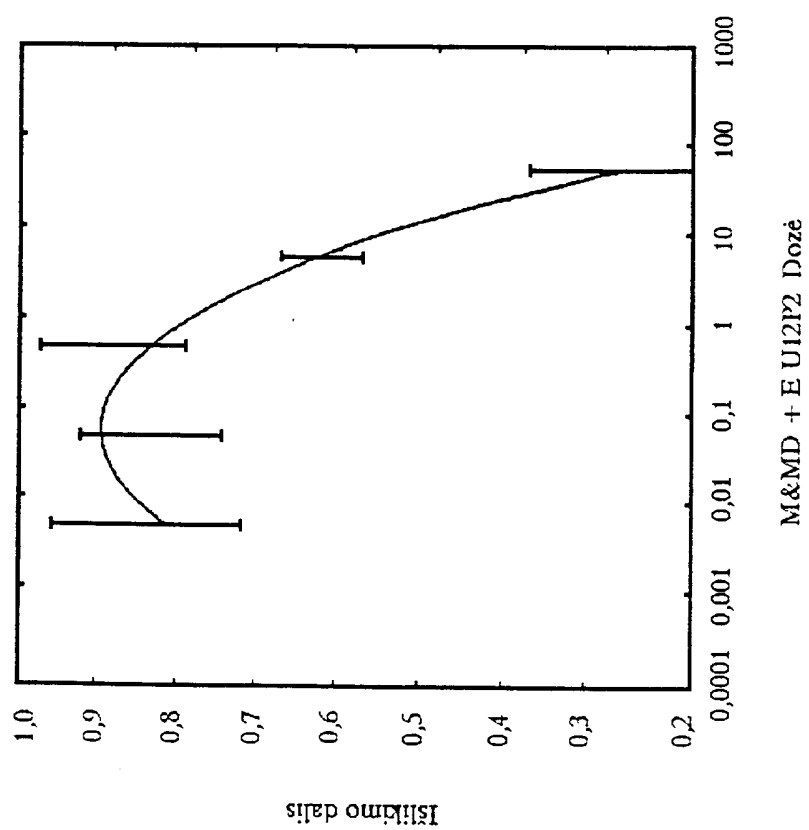


Fig.6D

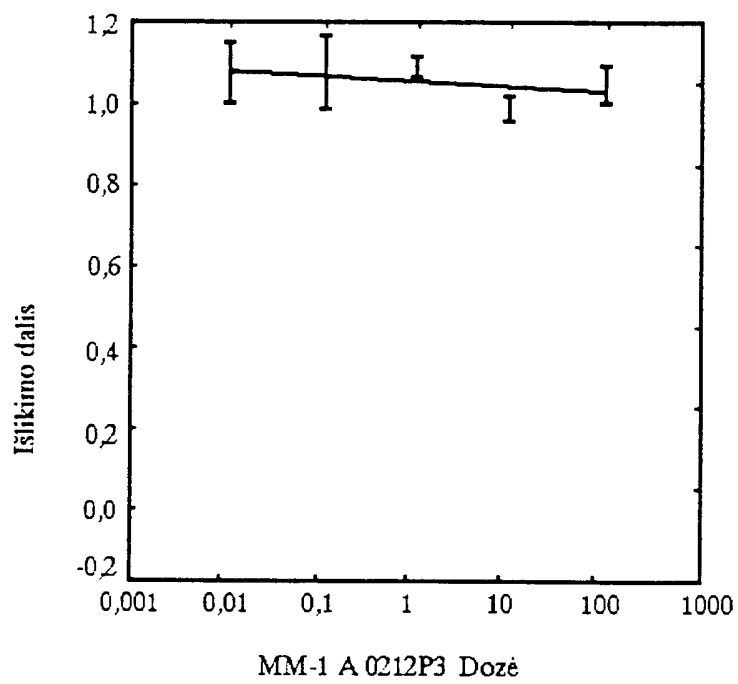


Fig.7A

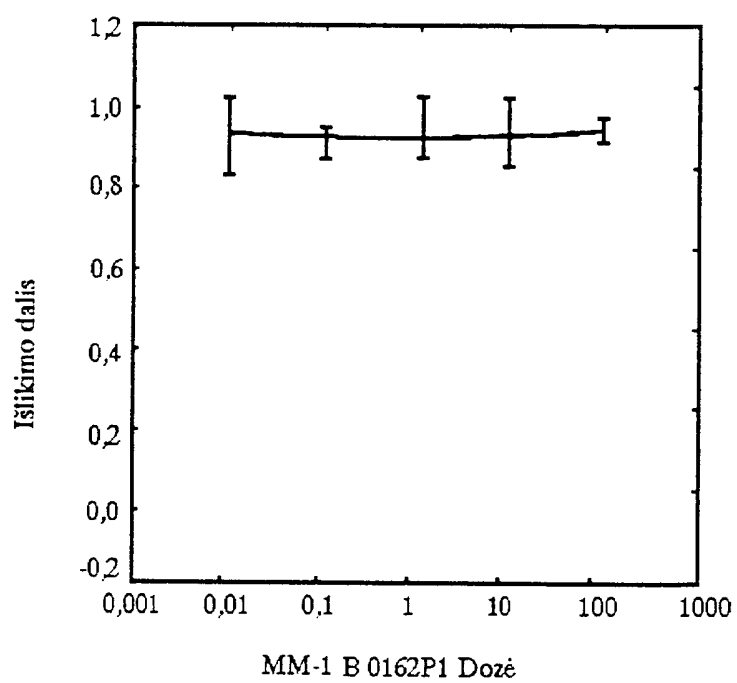


Fig.7B

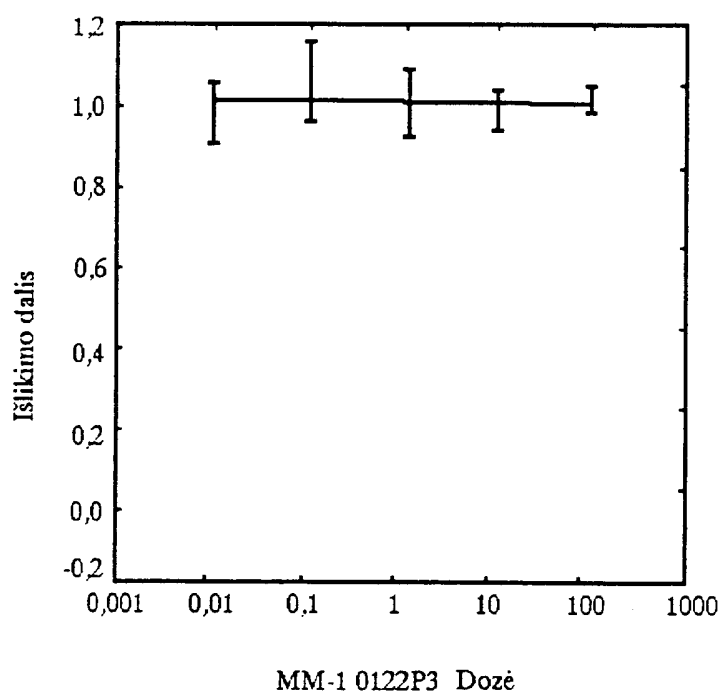


Fig.7C

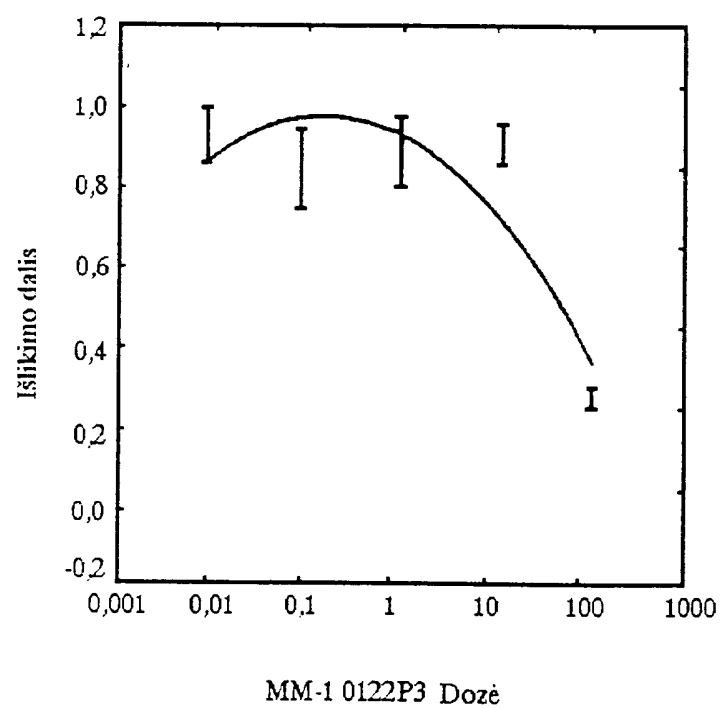


Fig.7D

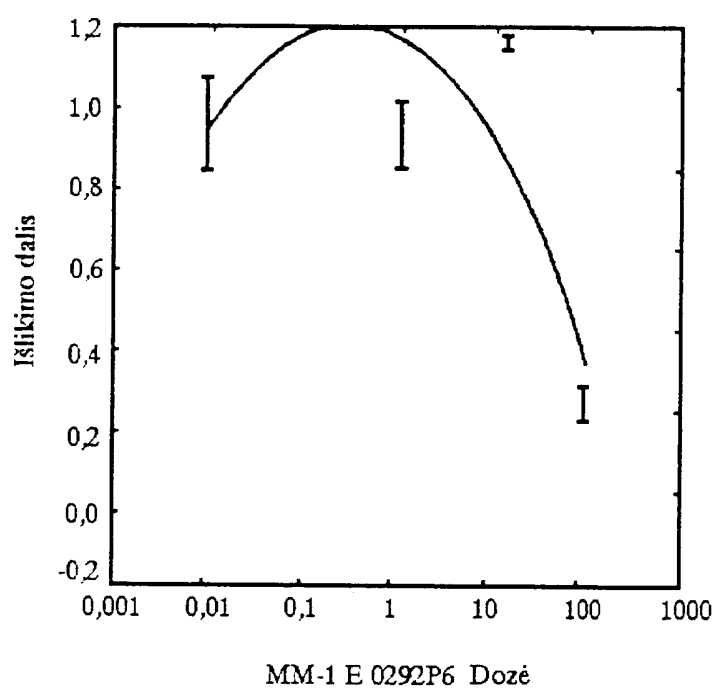


Fig.7E

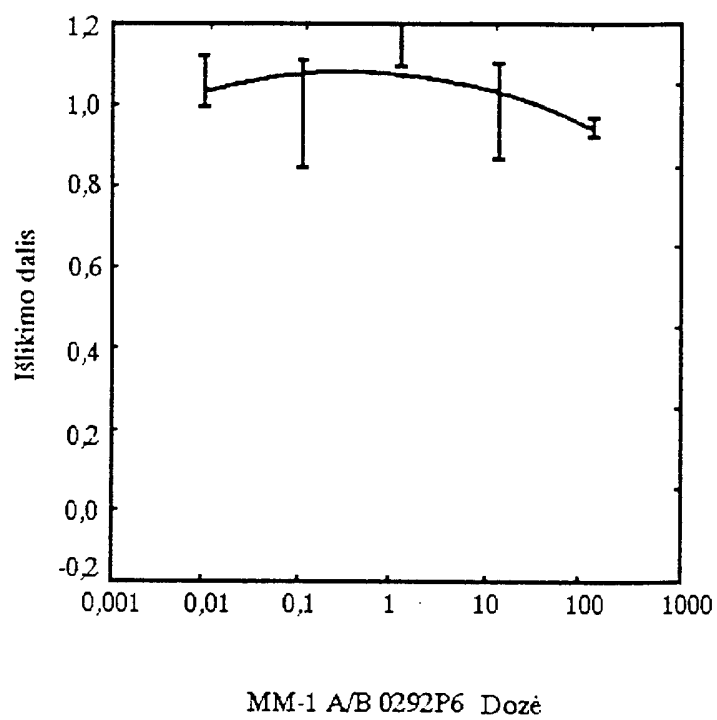


Fig.7F

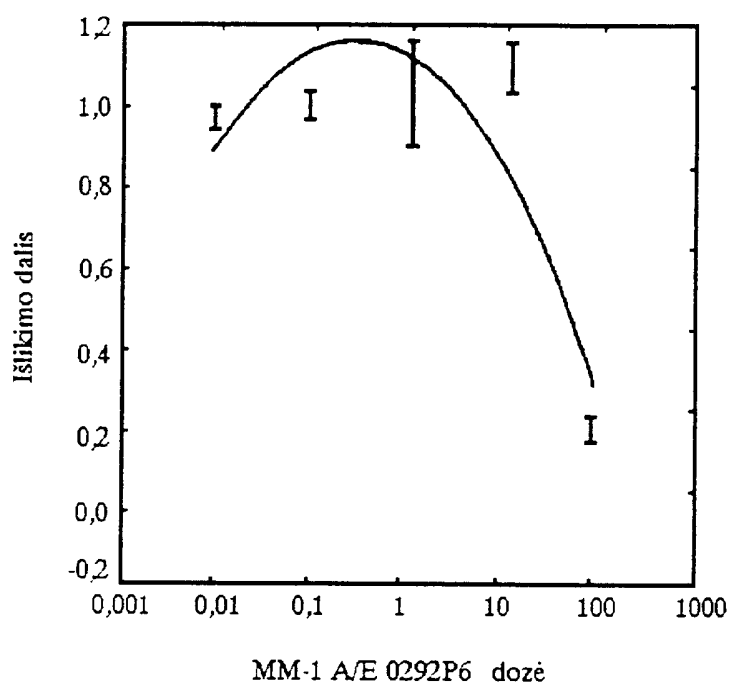


Fig.7G

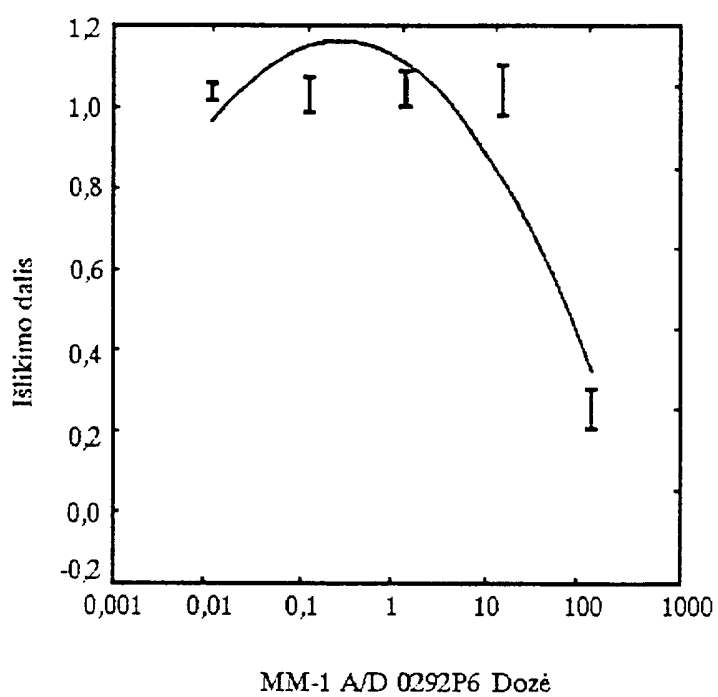


Fig.7H

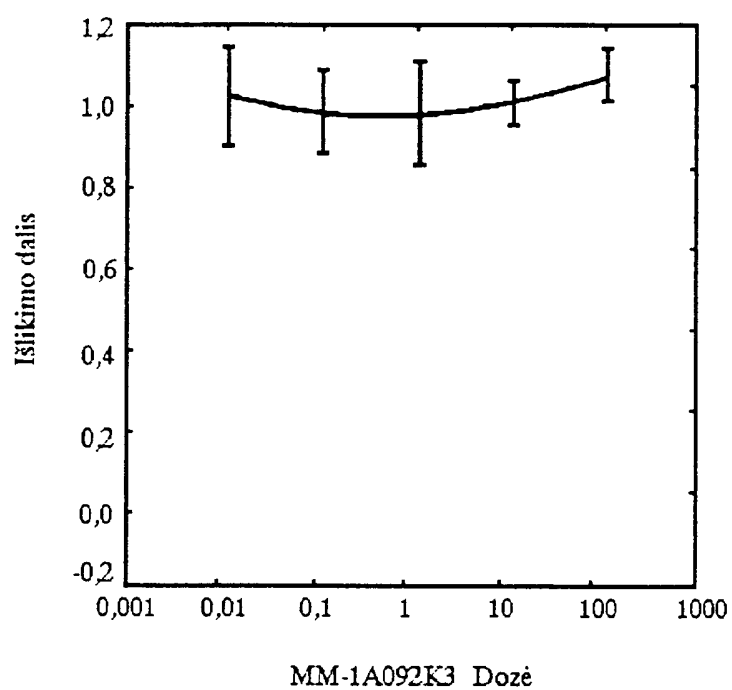


Fig.8A

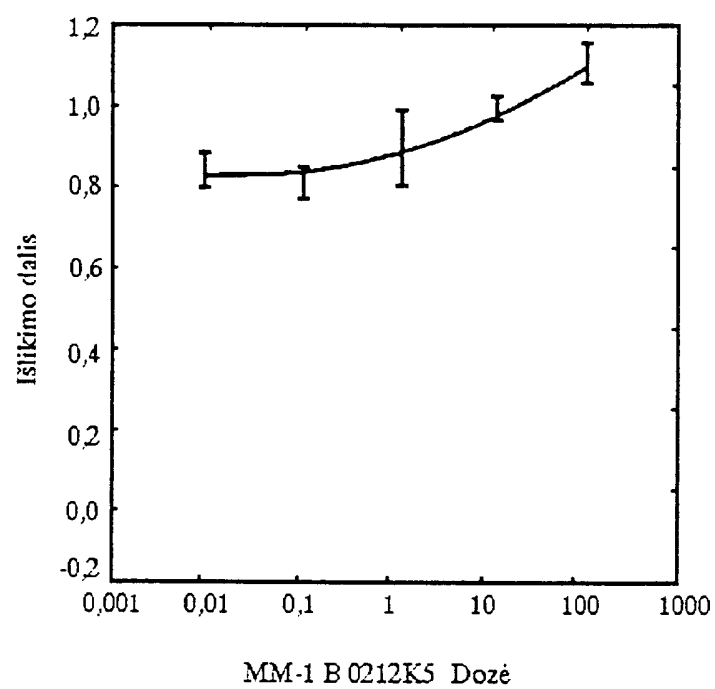


Fig.8B

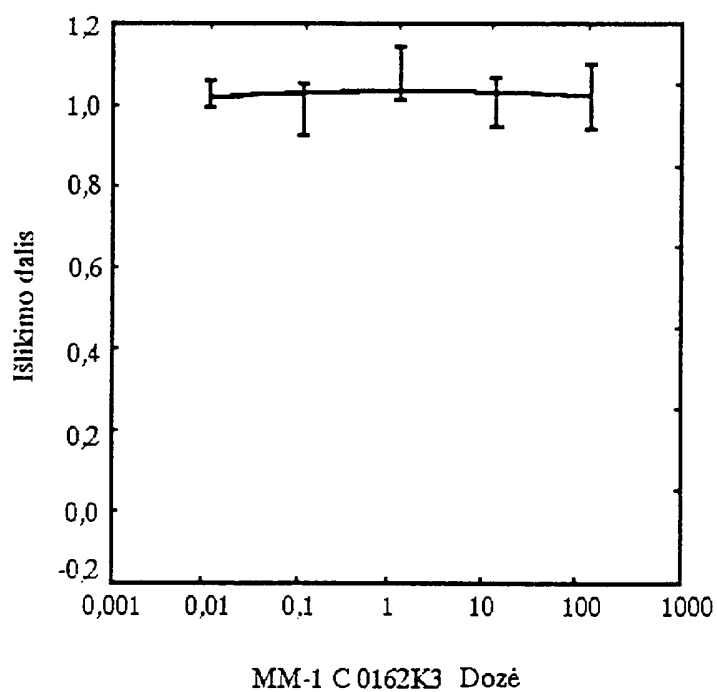


Fig.8C

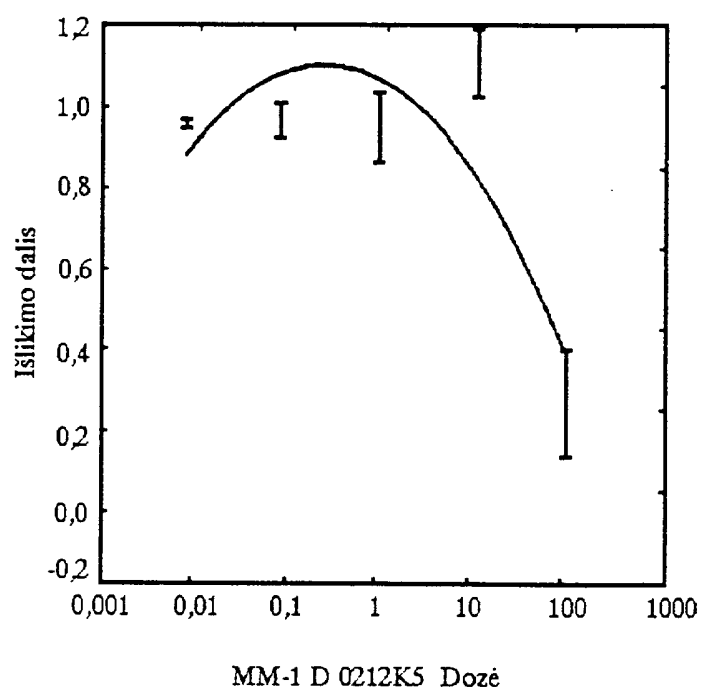


Fig.8D

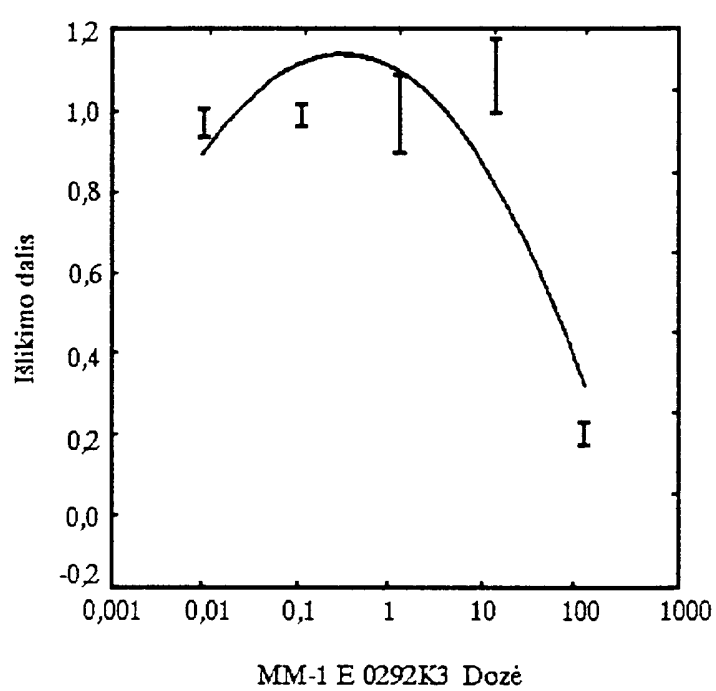


Fig.8E

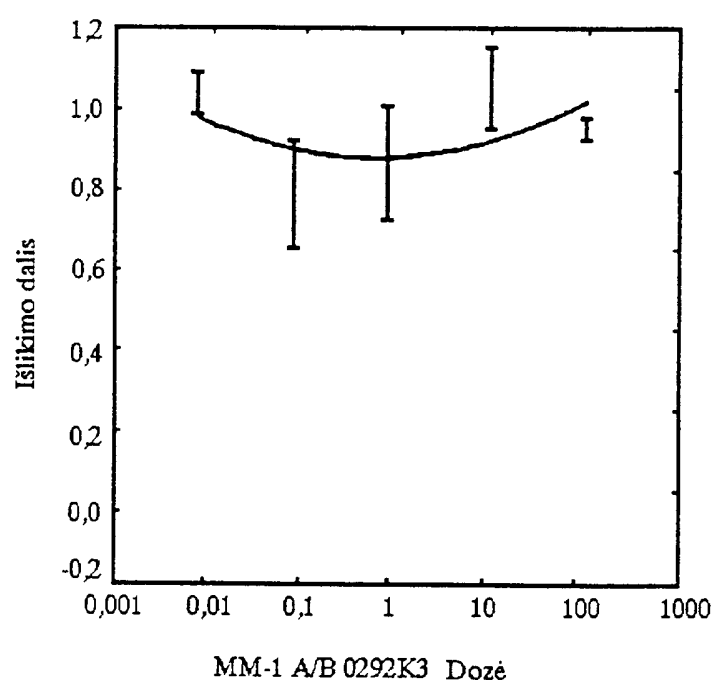


Fig.8F

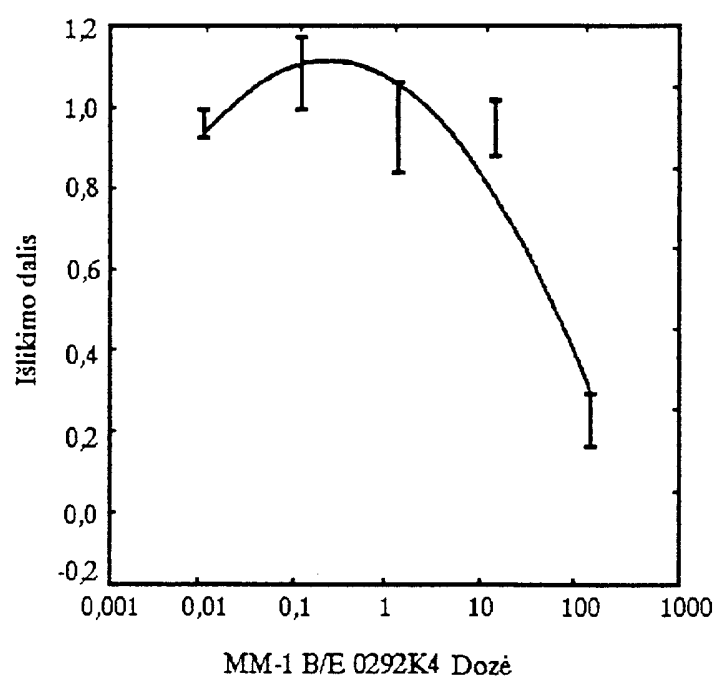


Fig.8G

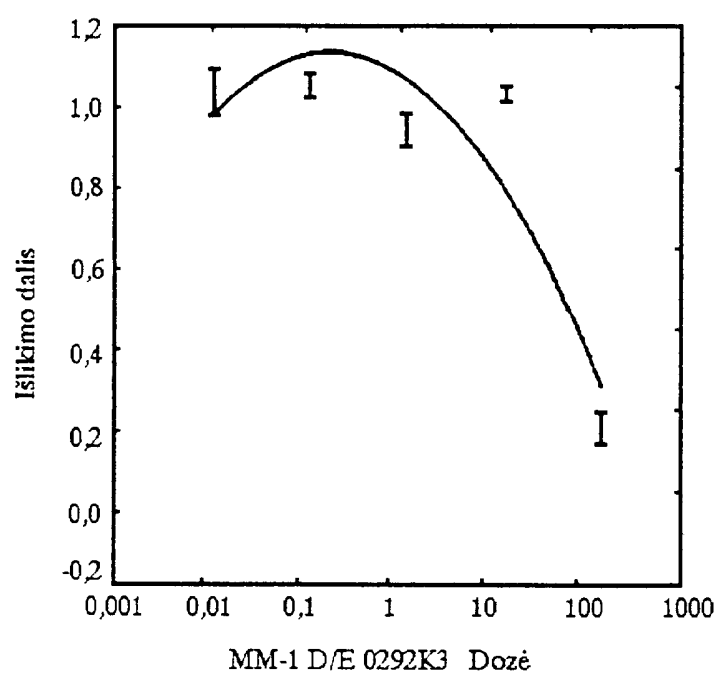


Fig.8H

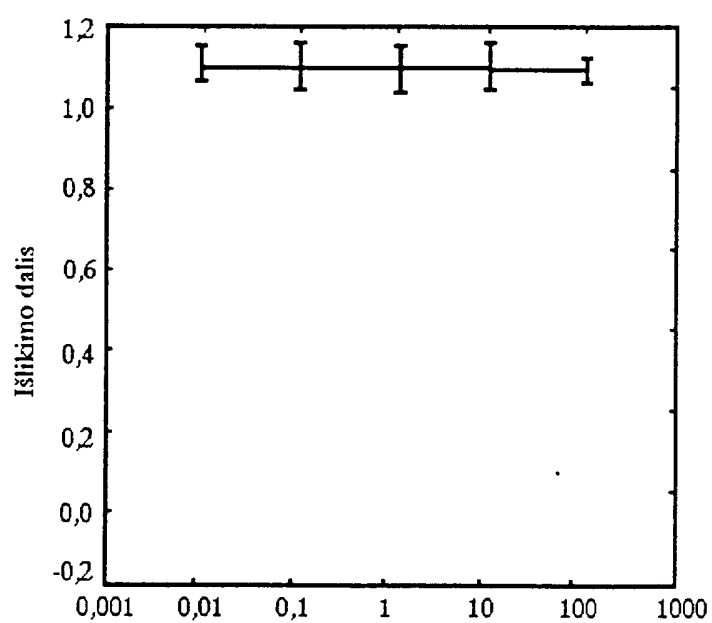


Fig.9A

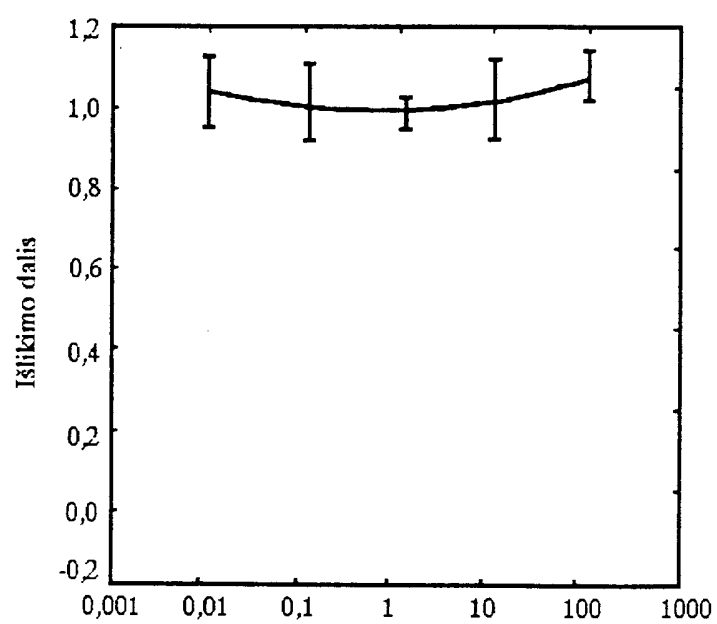


Fig.9B

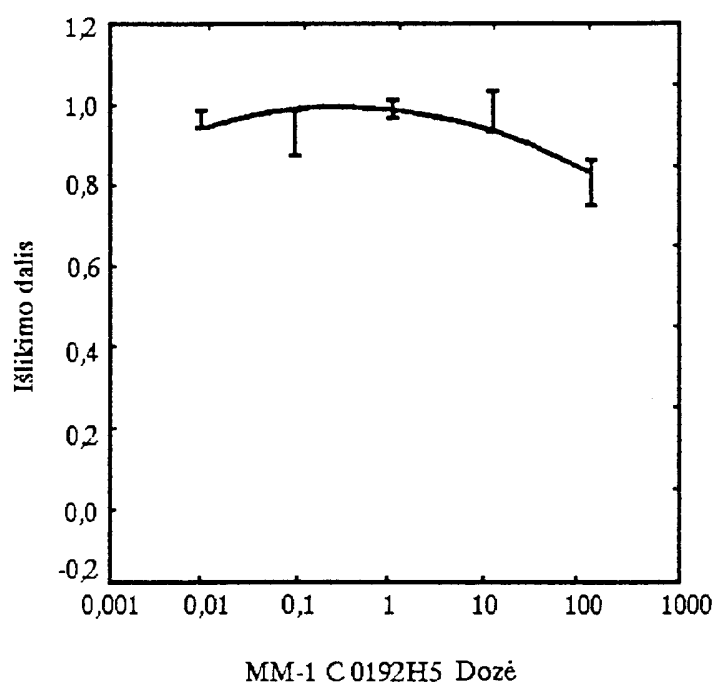


Fig.9C

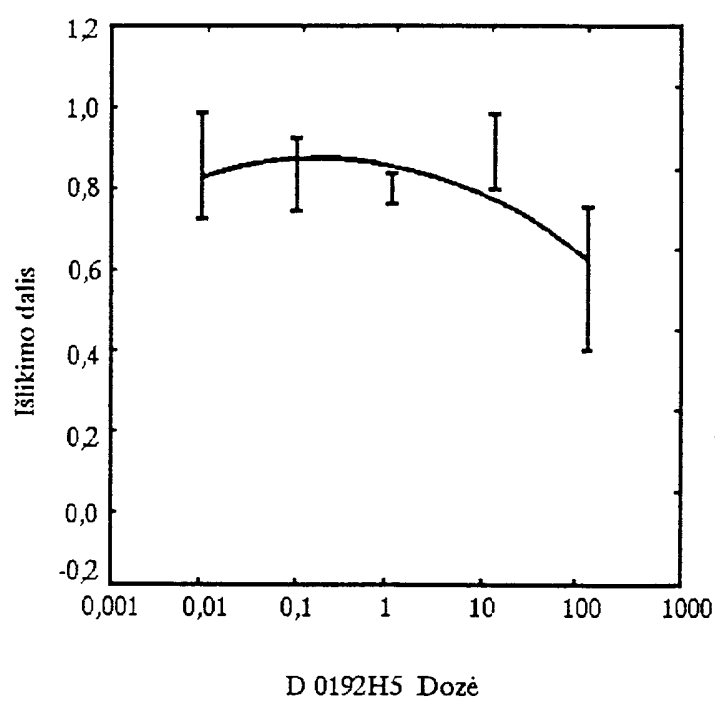


Fig.9D

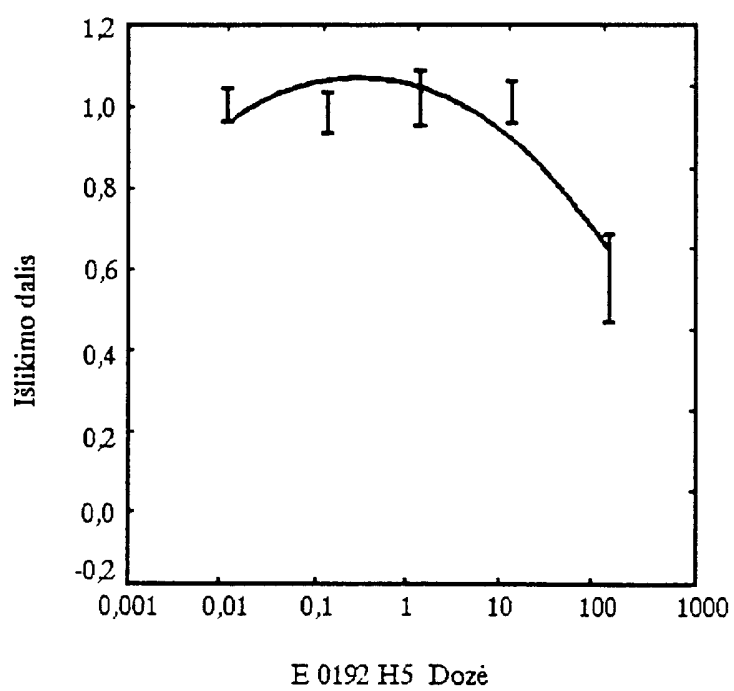


Fig.9E

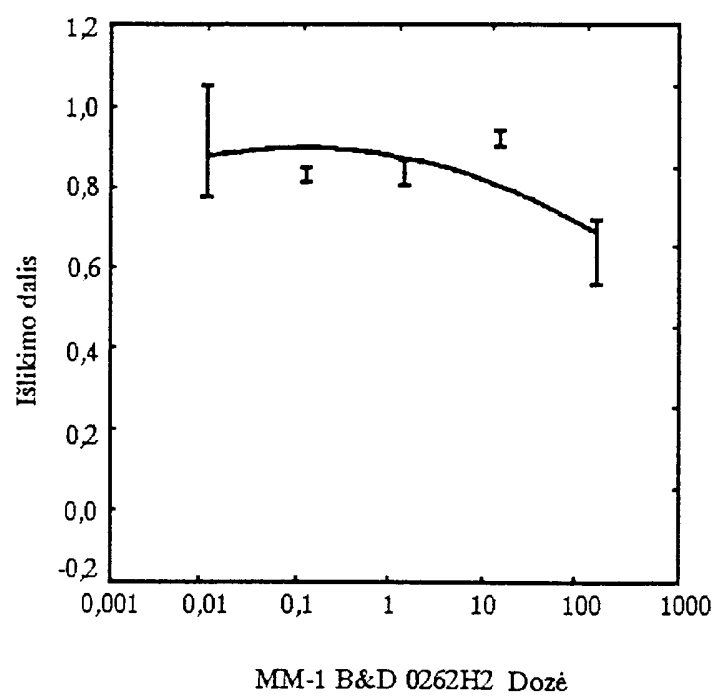


Fig.9F

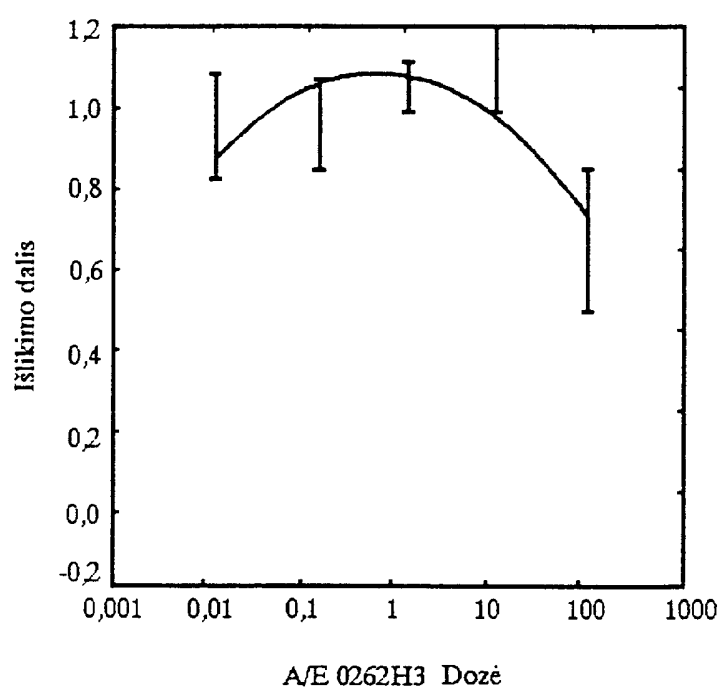


Fig.9G

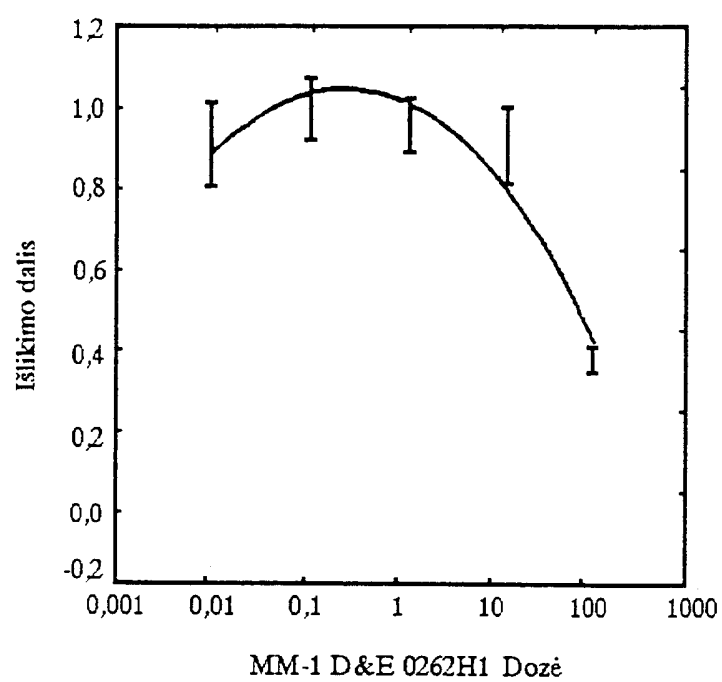


Fig.9H

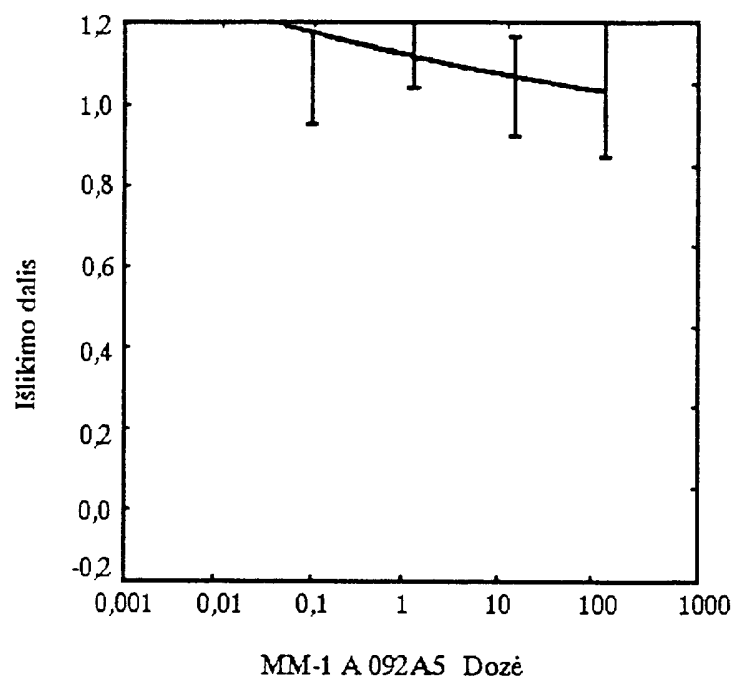


Fig.10A

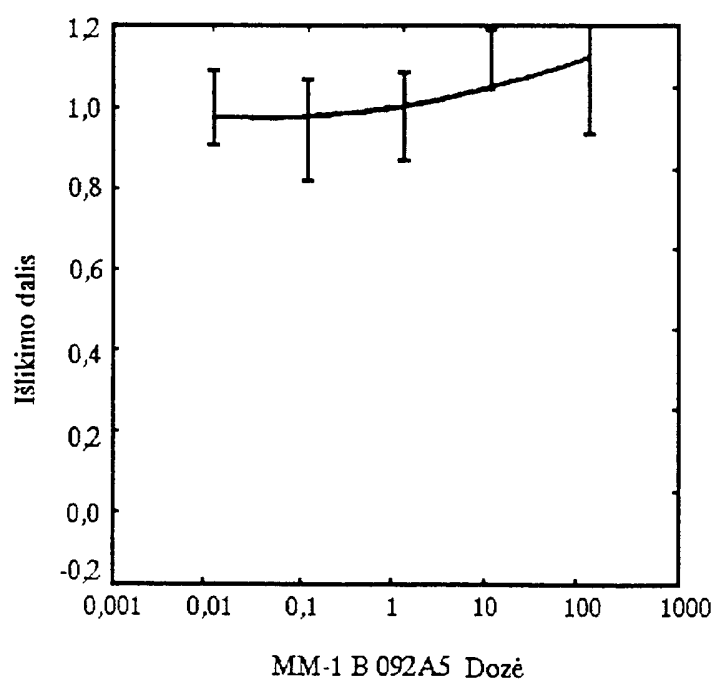


Fig.10B

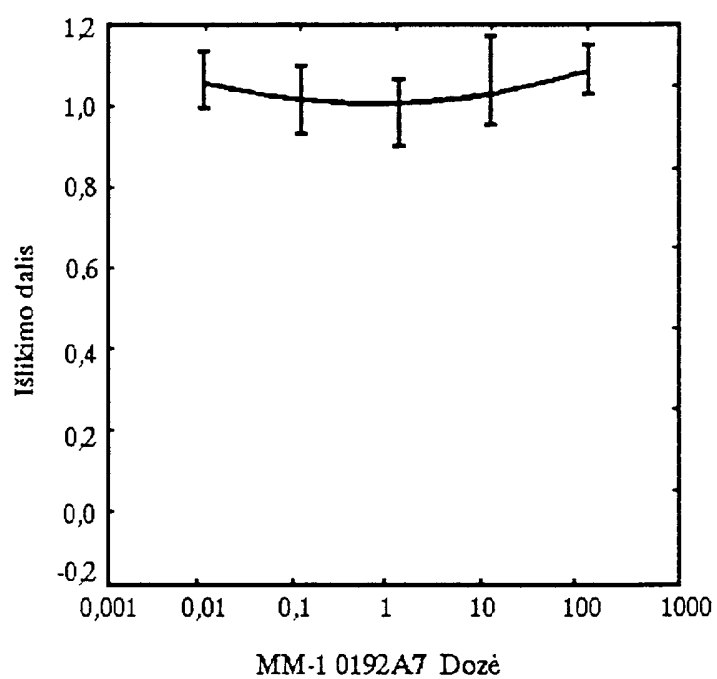


Fig.10C

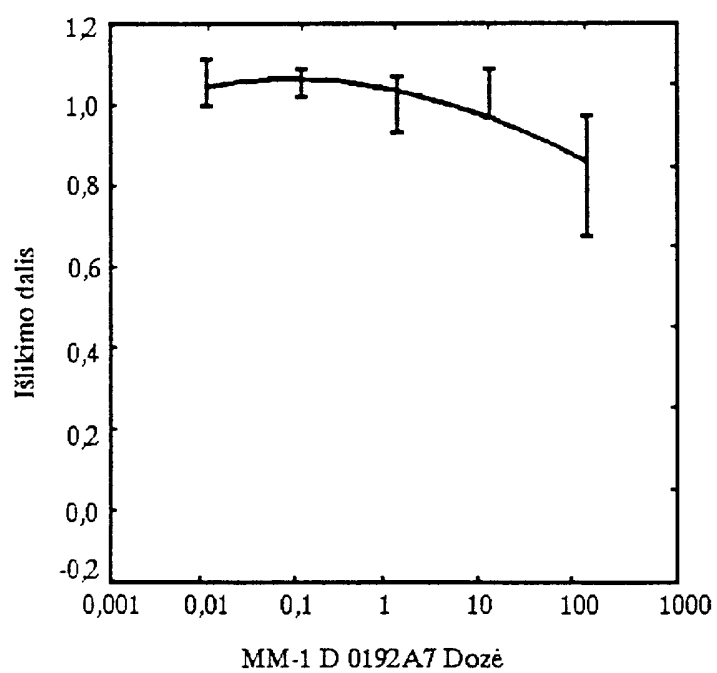


Fig.10D

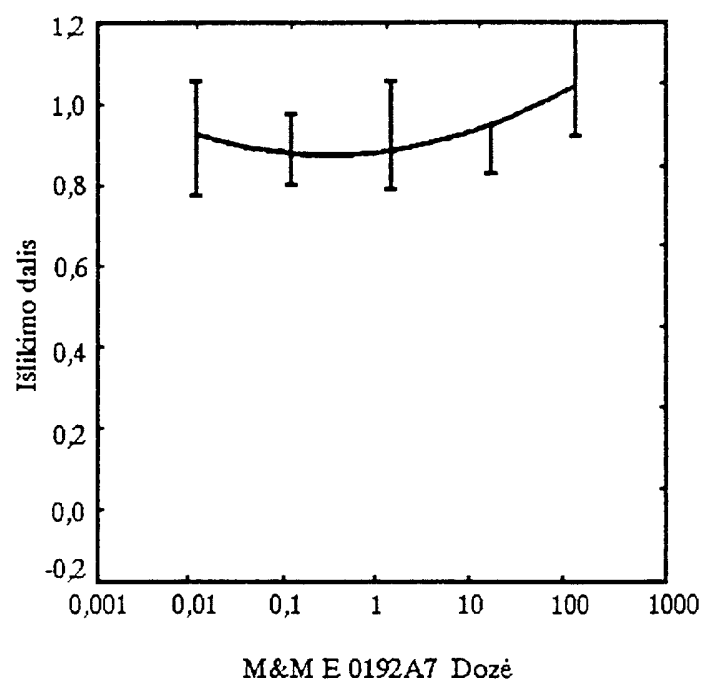


Fig.10E

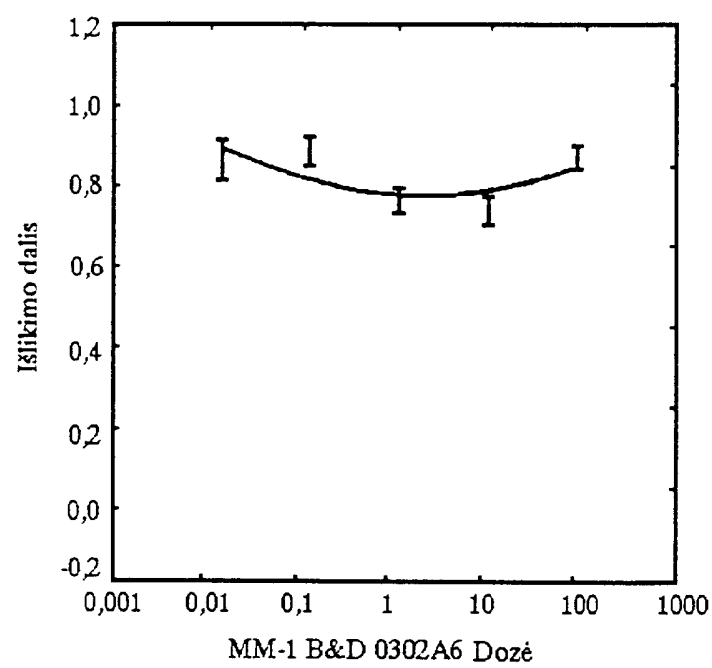


Fig.10F

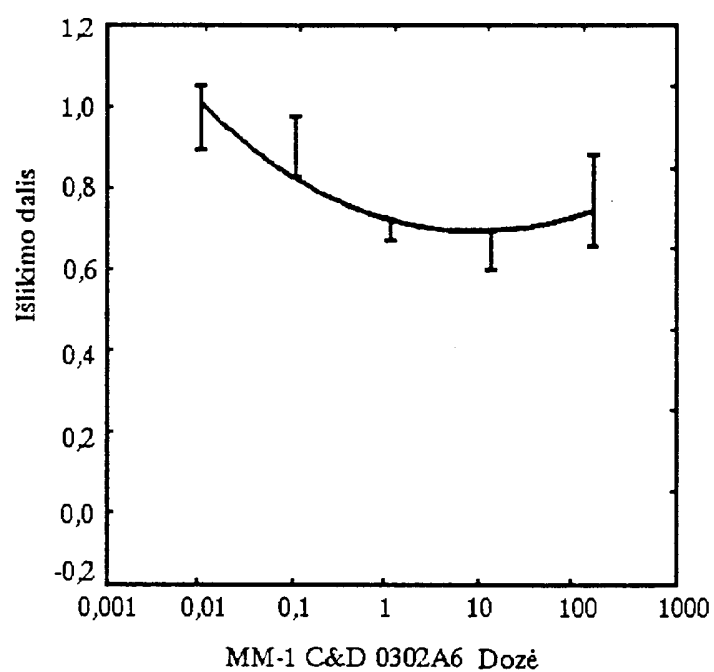


Fig.10G

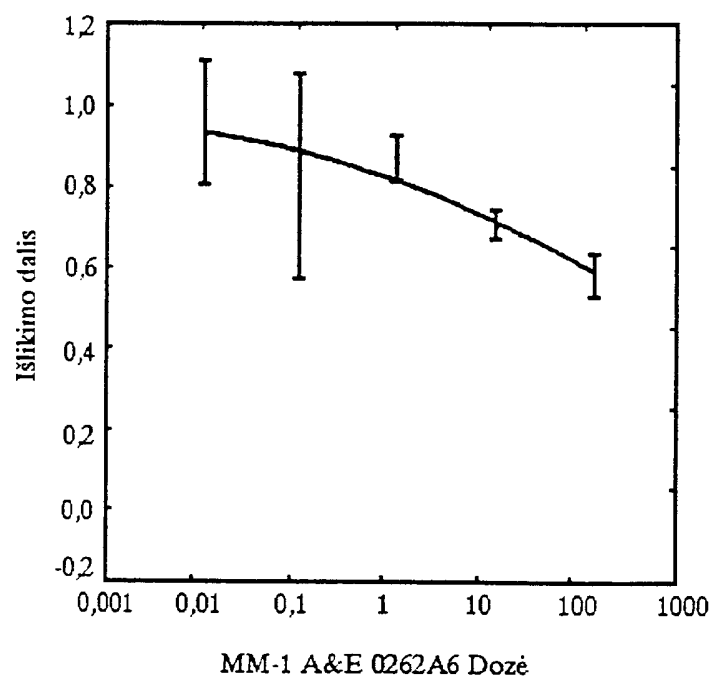


Fig.10H

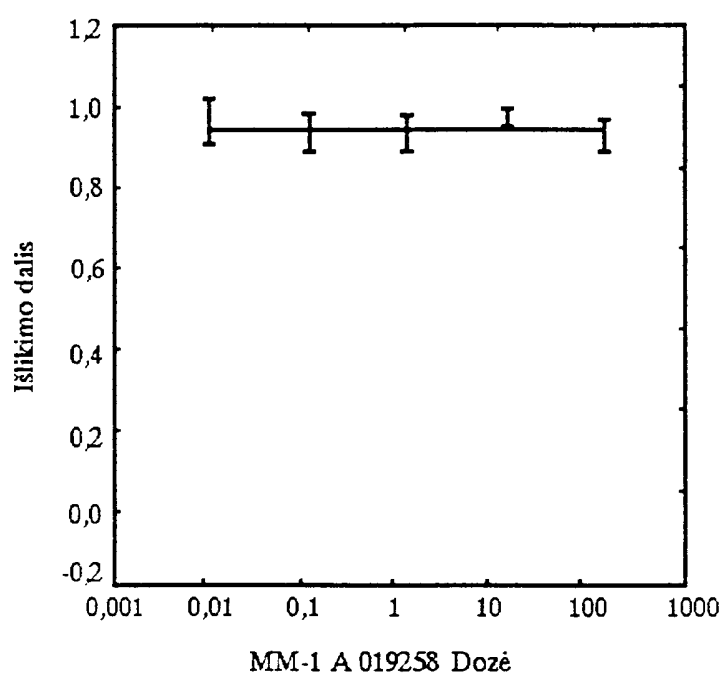


Fig.11A

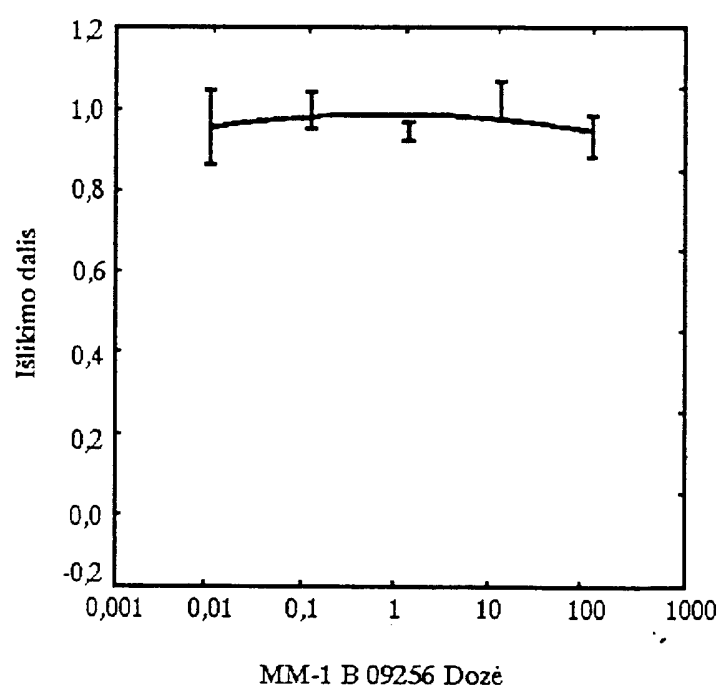


Fig.11B

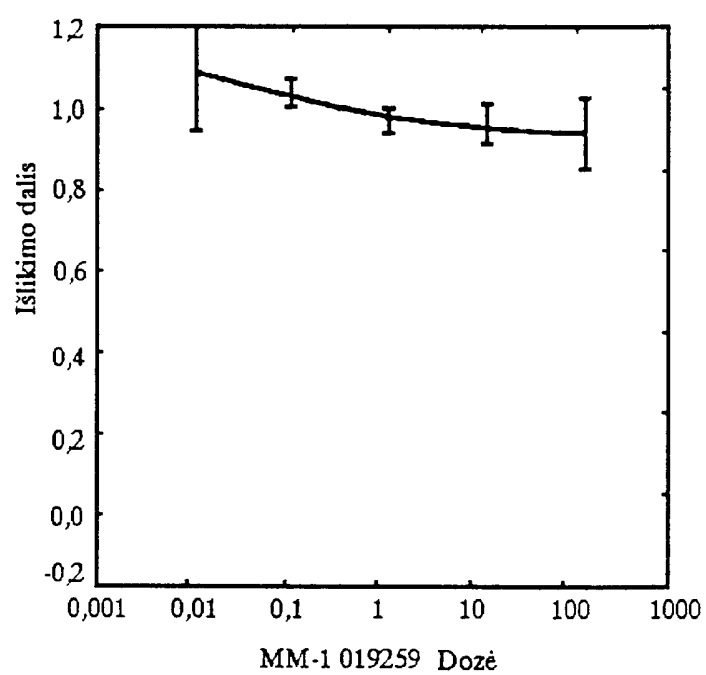


Fig.11C

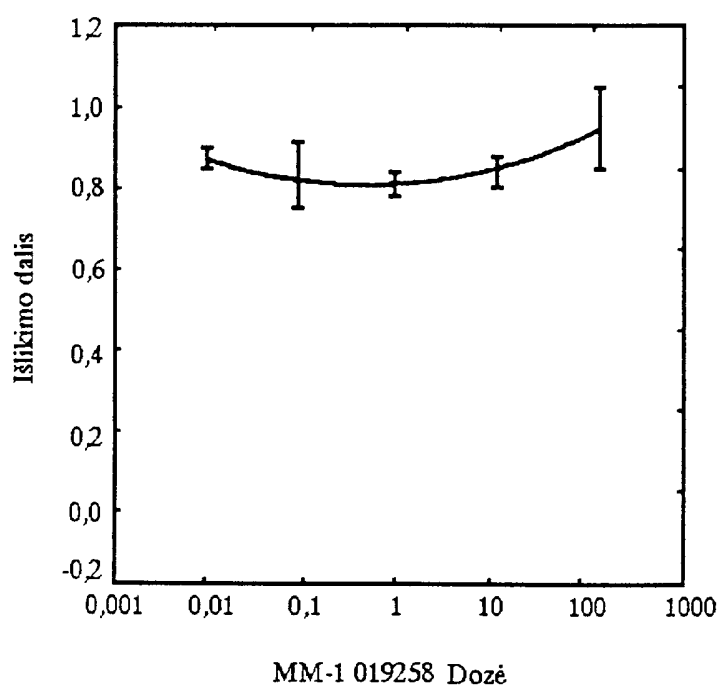


Fig.11D

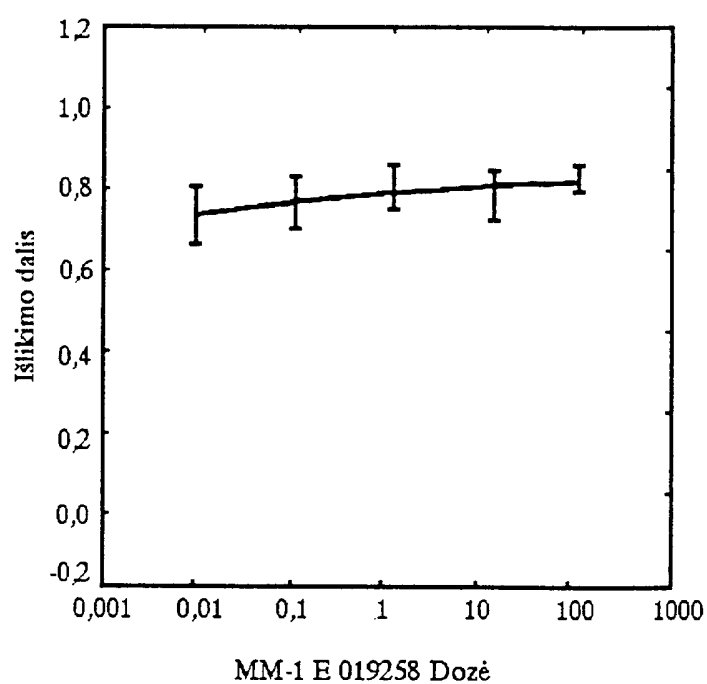


Fig.11E

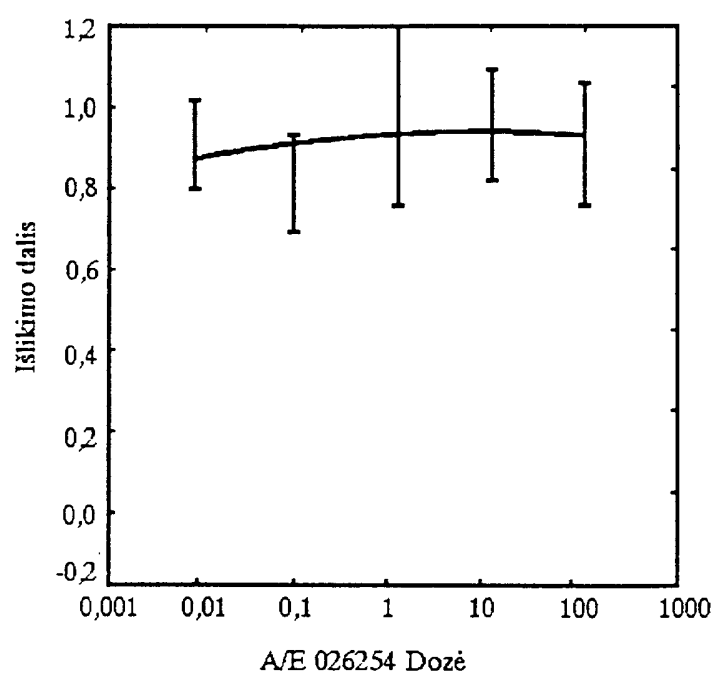


Fig.11F

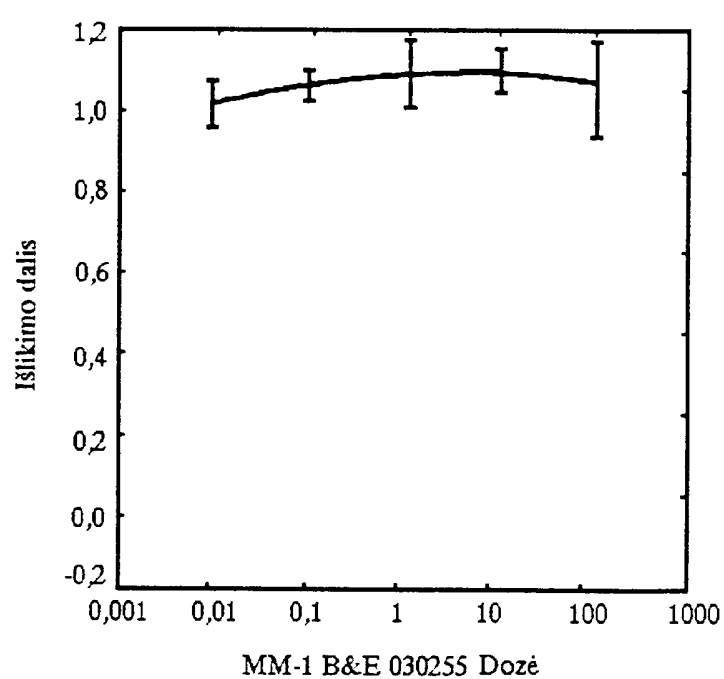


Fig.11G

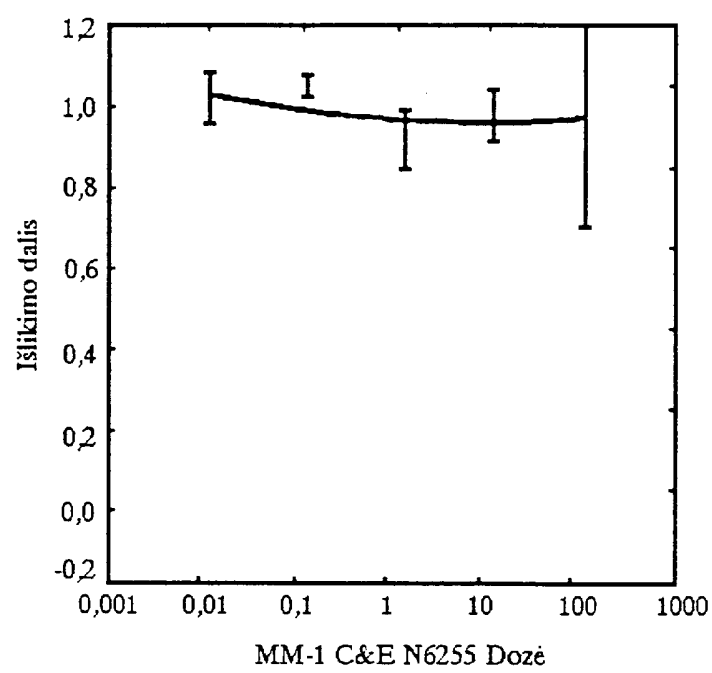


Fig.11H

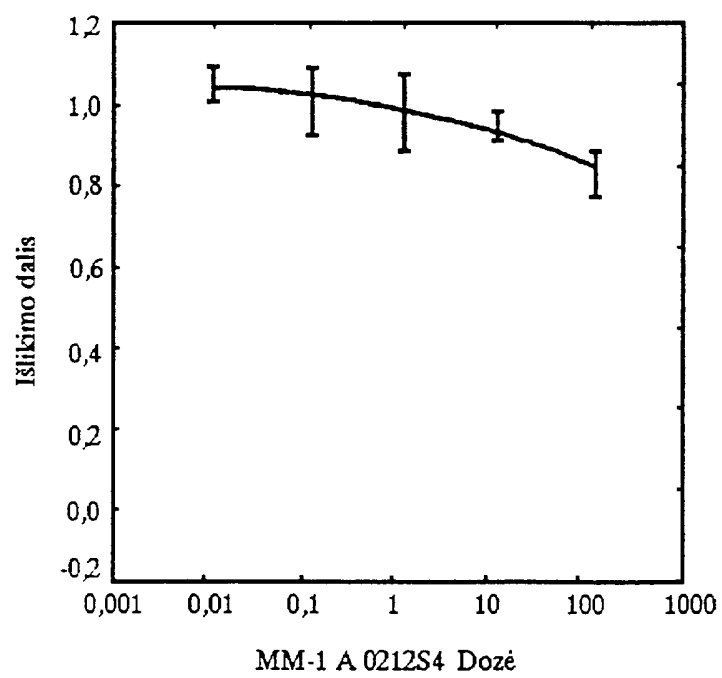


Fig.12A

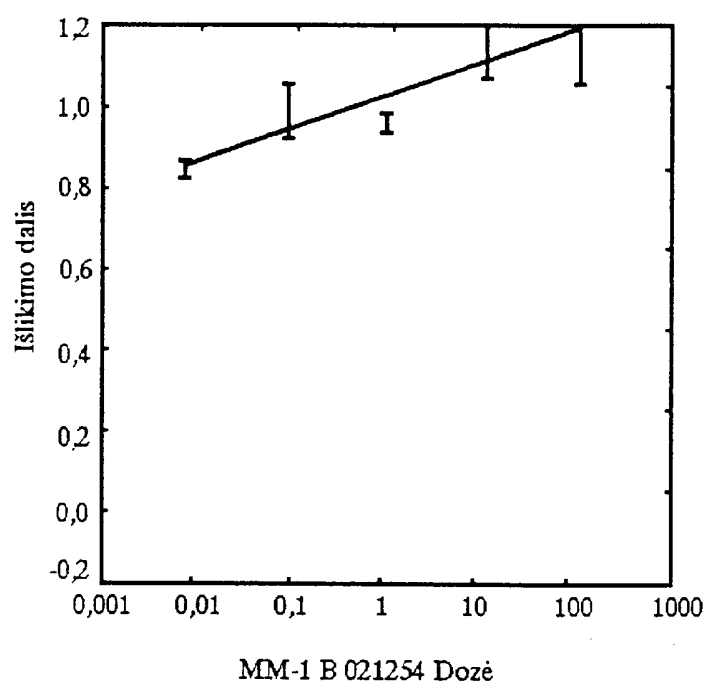


Fig.12B

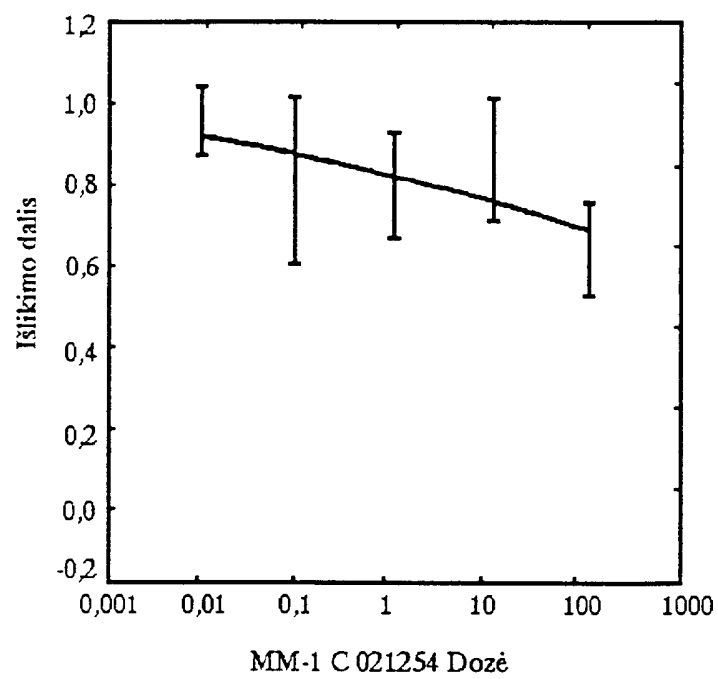


Fig.12C

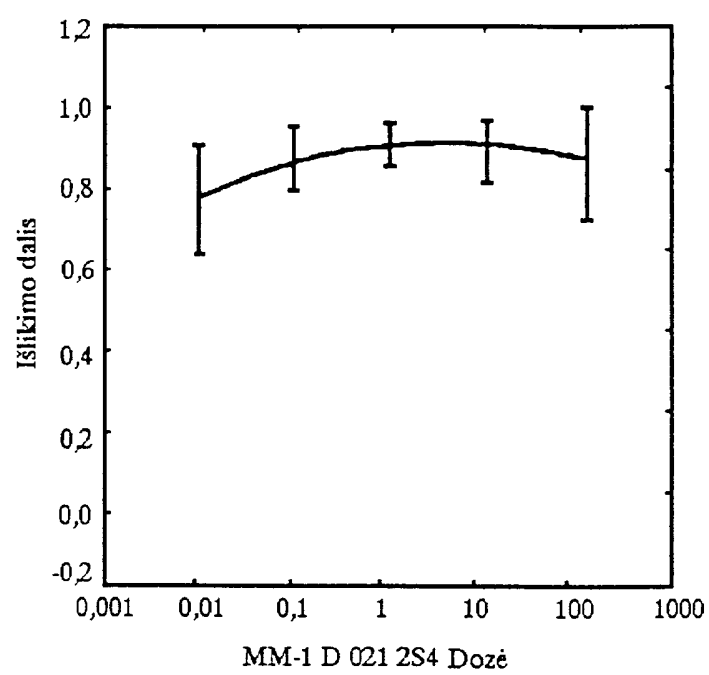


Fig.12D

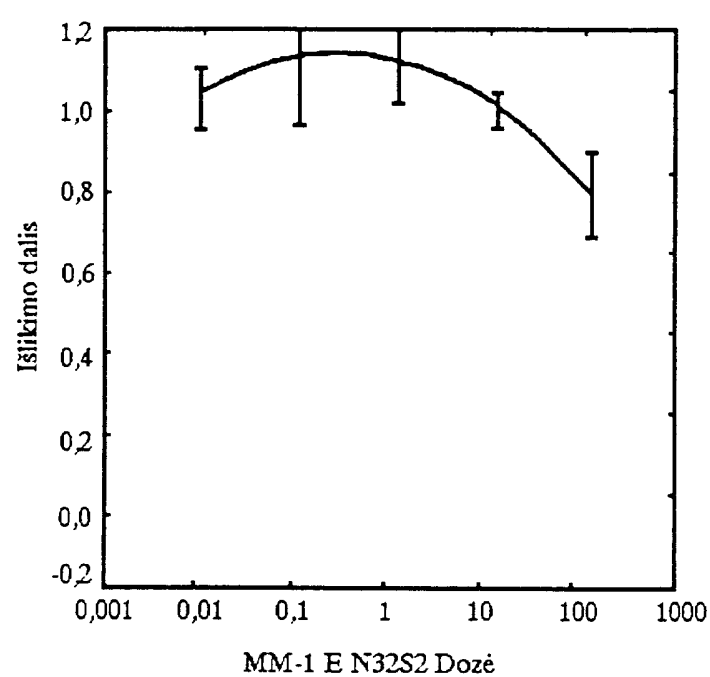


Fig.12E

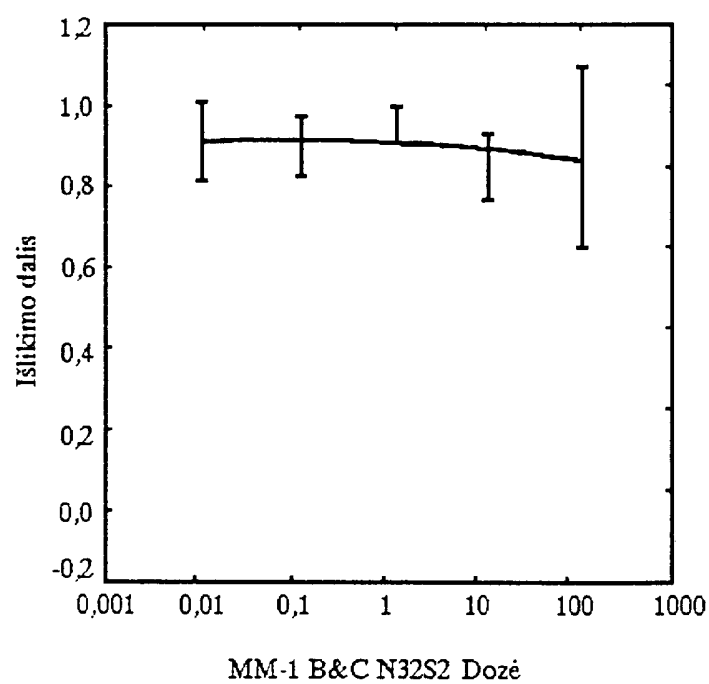


Fig.12F

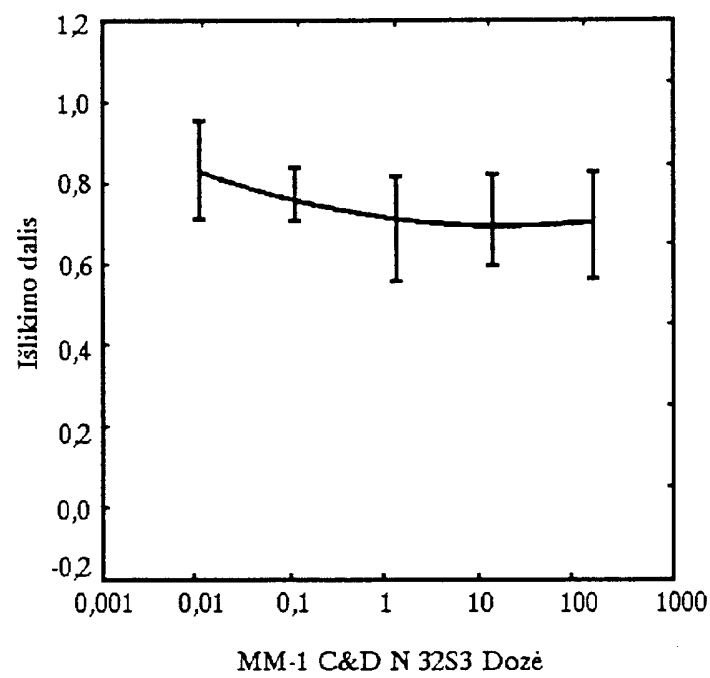


Fig.12G

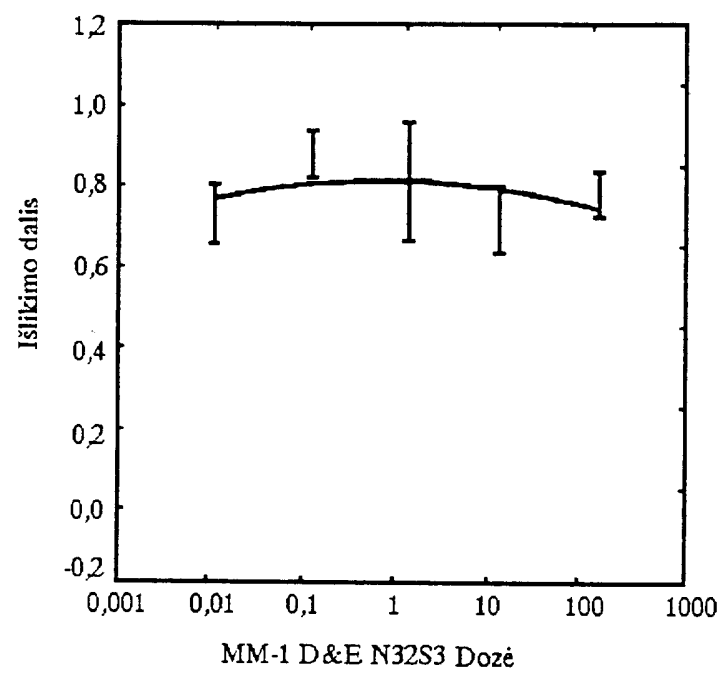


Fig.12H

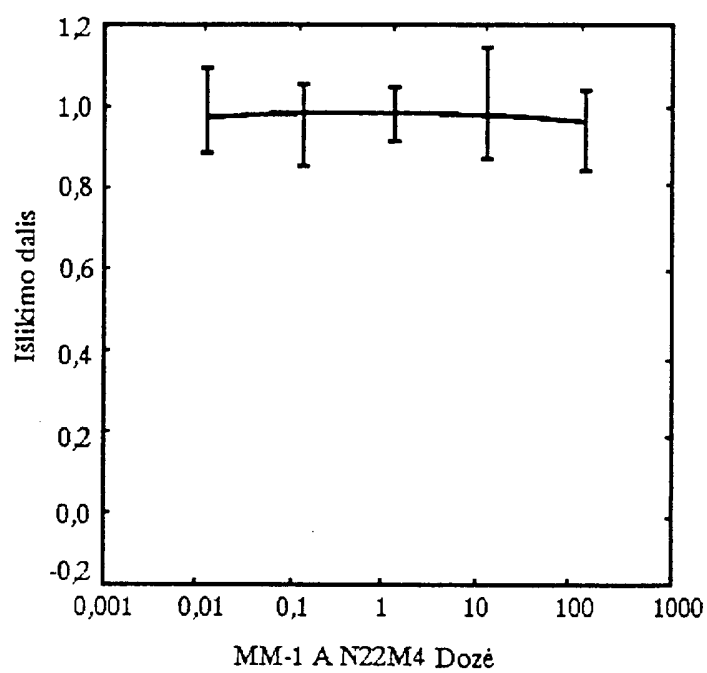


Fig.13A

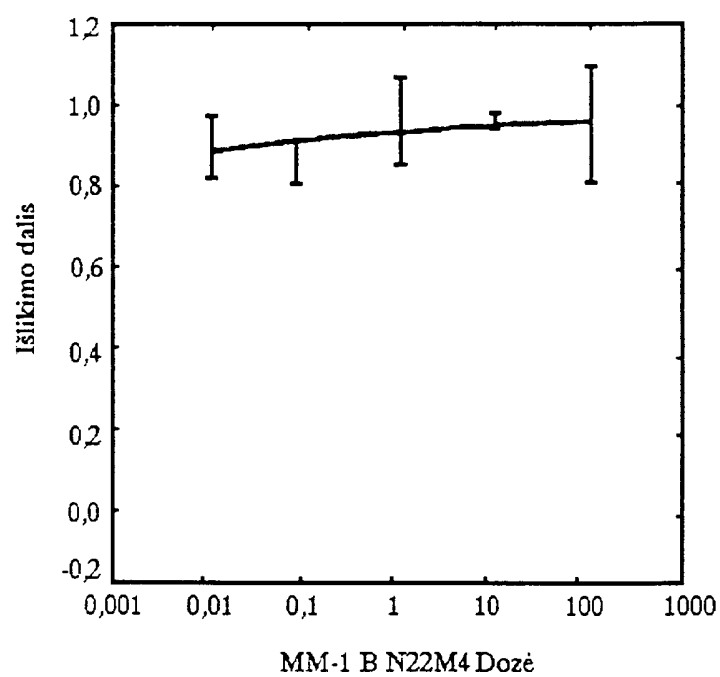


Fig.13B

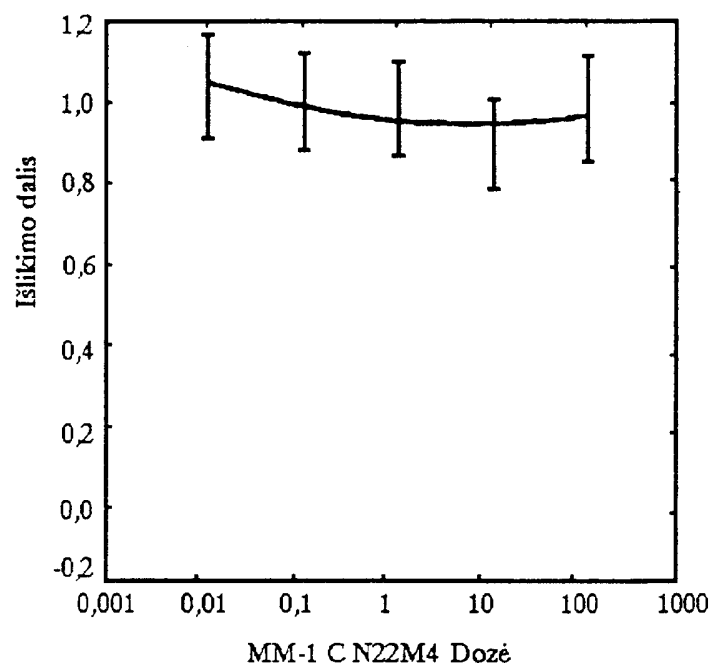


Fig.13C

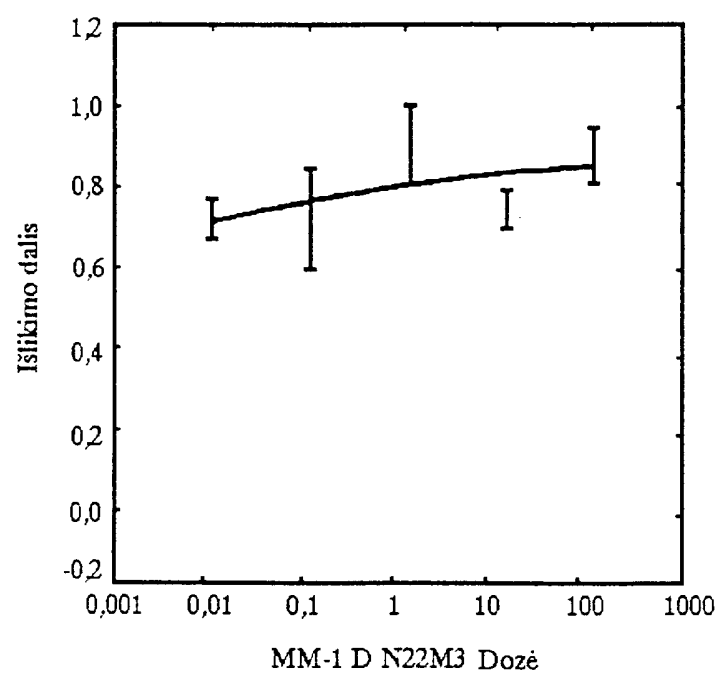


Fig.13D

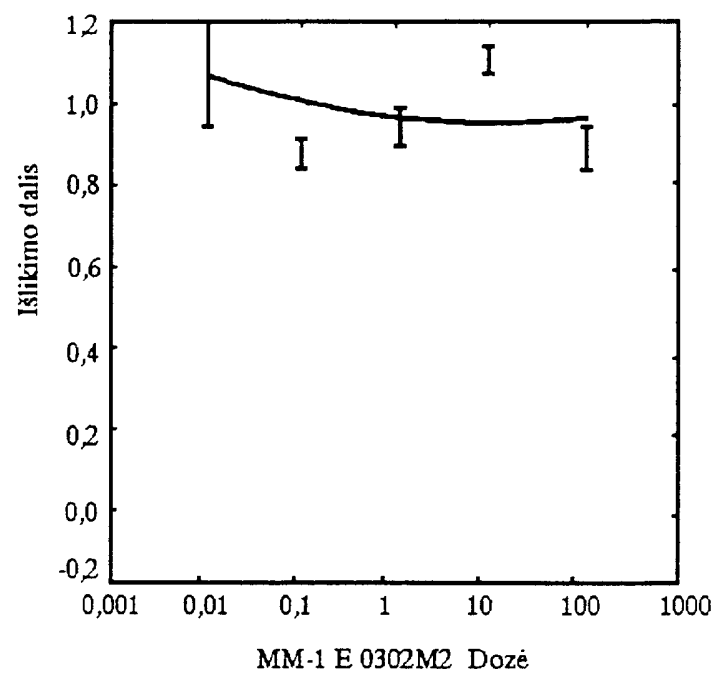


Fig.13E

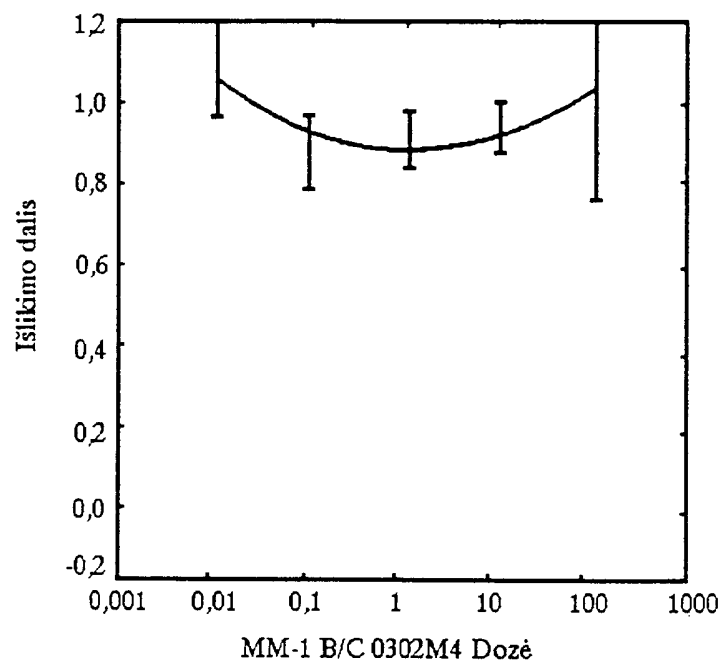


Fig.13F

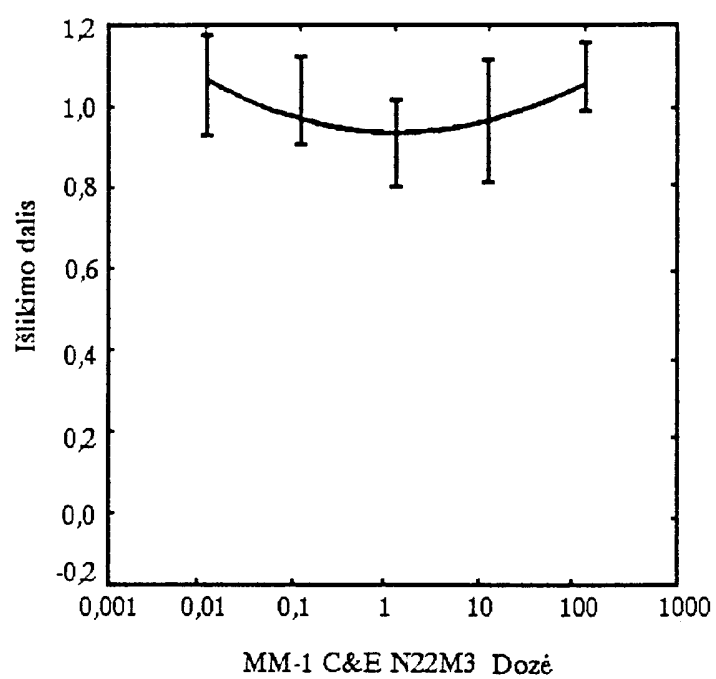


Fig.13G

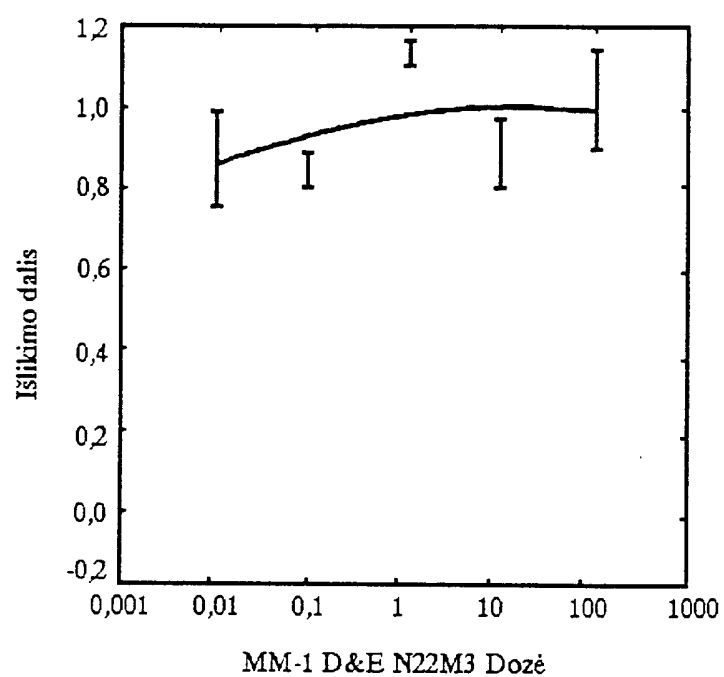


Fig.13H

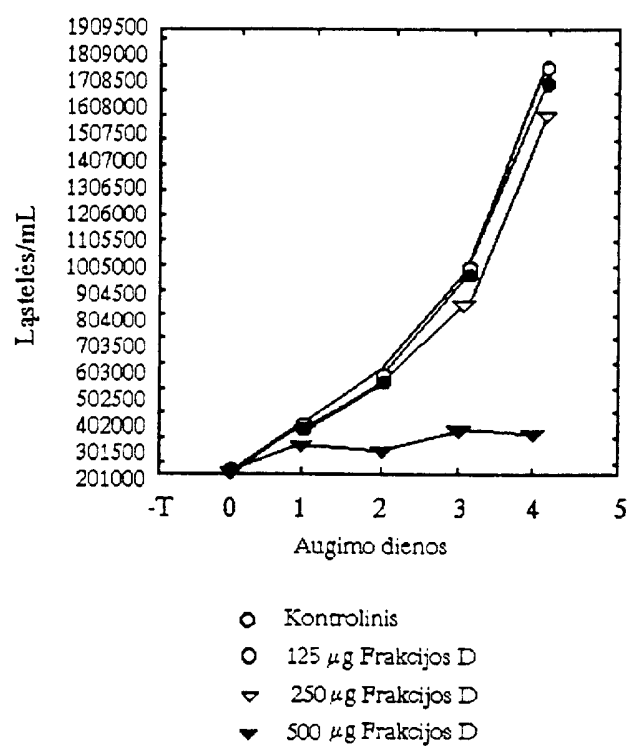


Fig.14

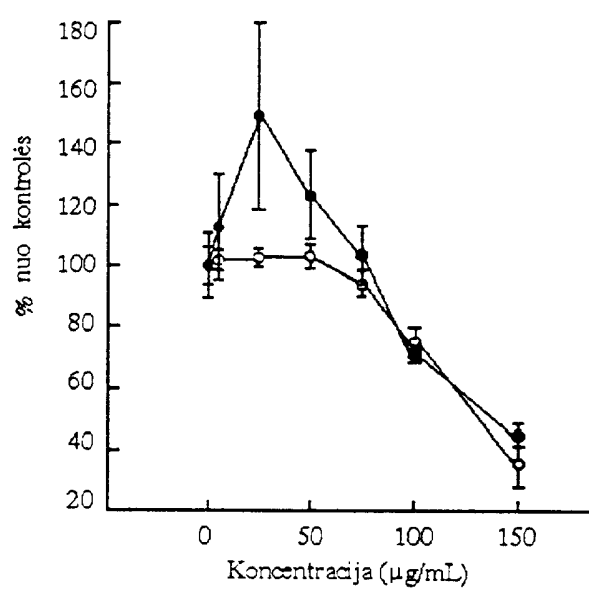


Fig.15A

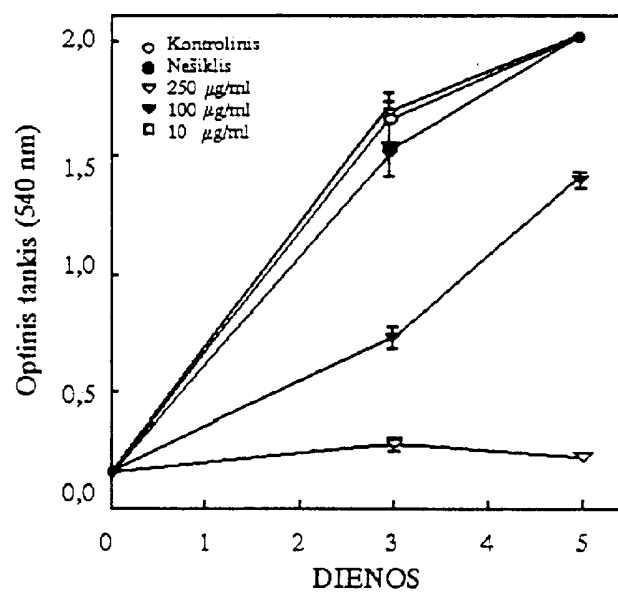


Fig.15B

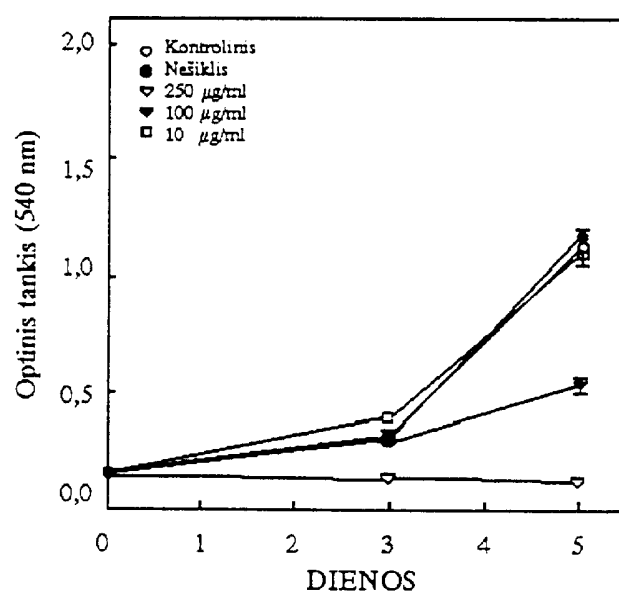


Fig.15C

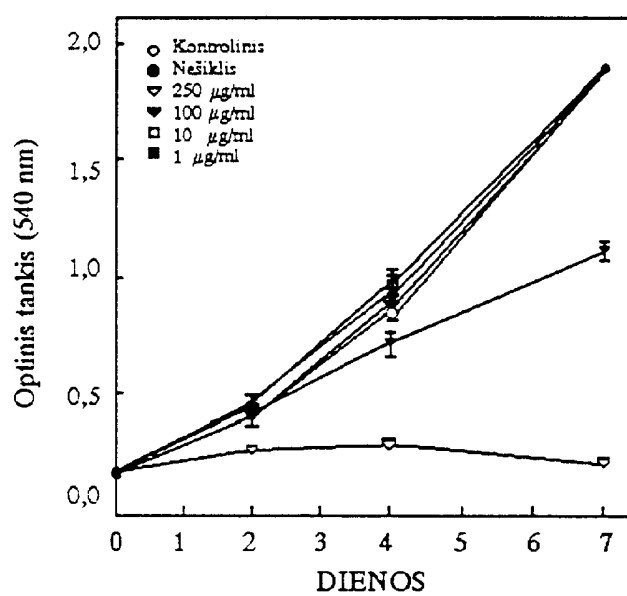


Fig.15D

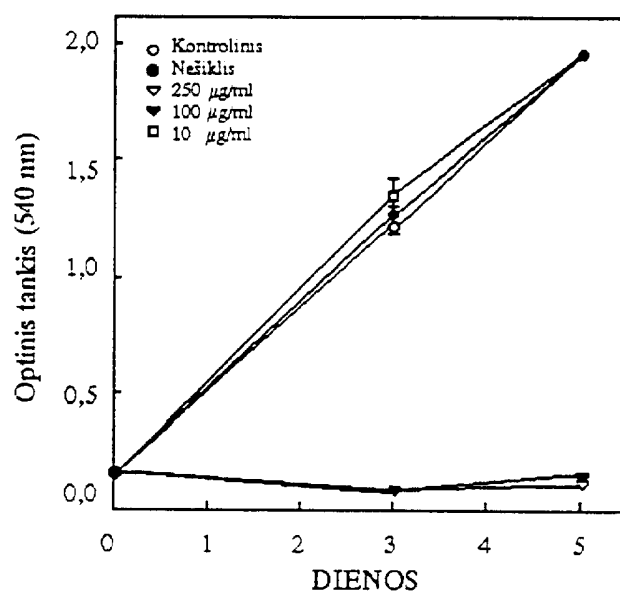


Fig.15E

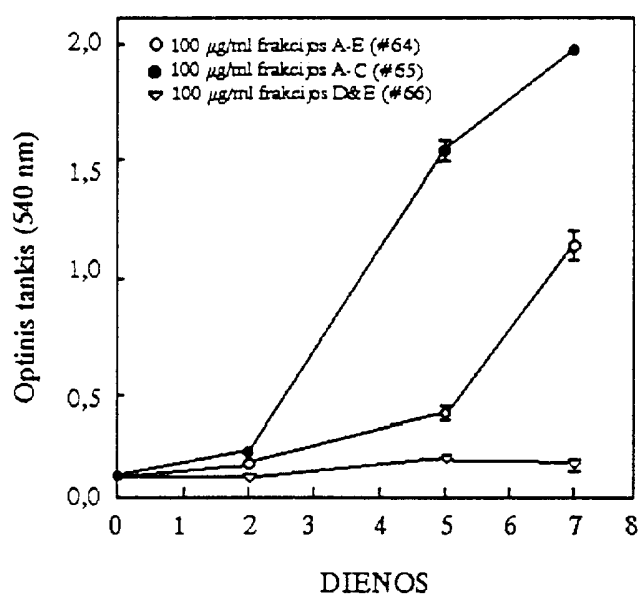


Fig.15F

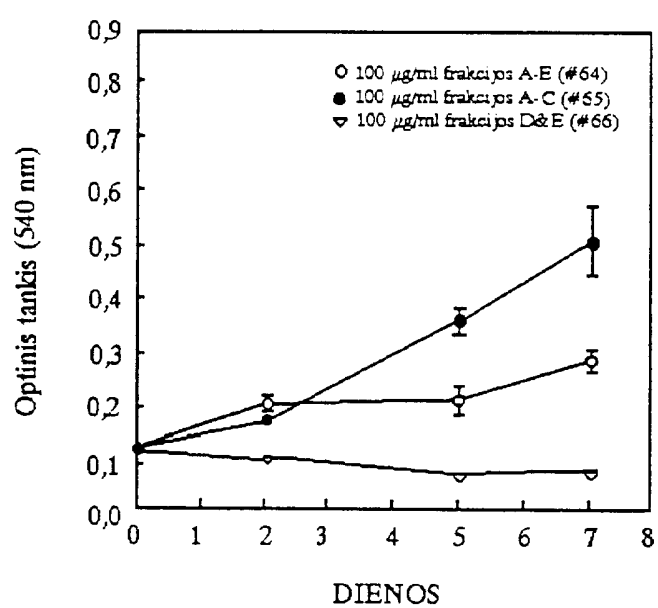


Fig.15G

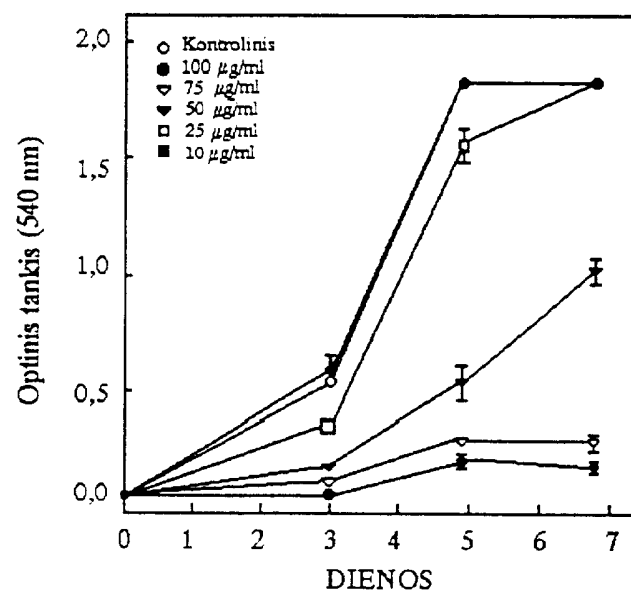


Fig.15H

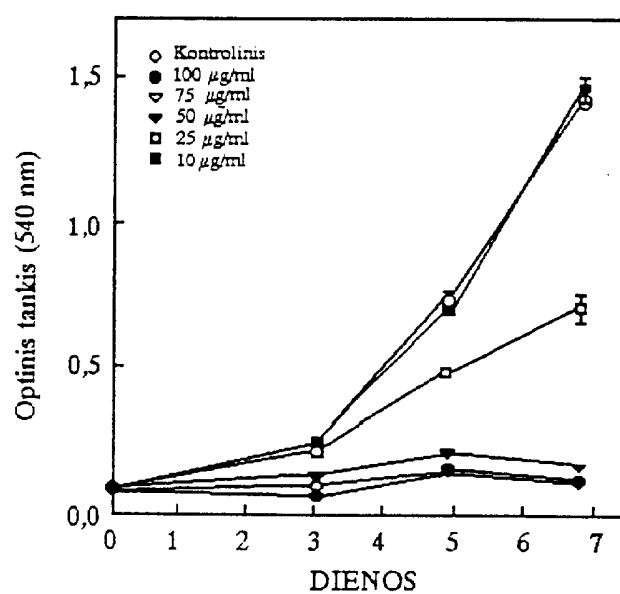


Fig.15I

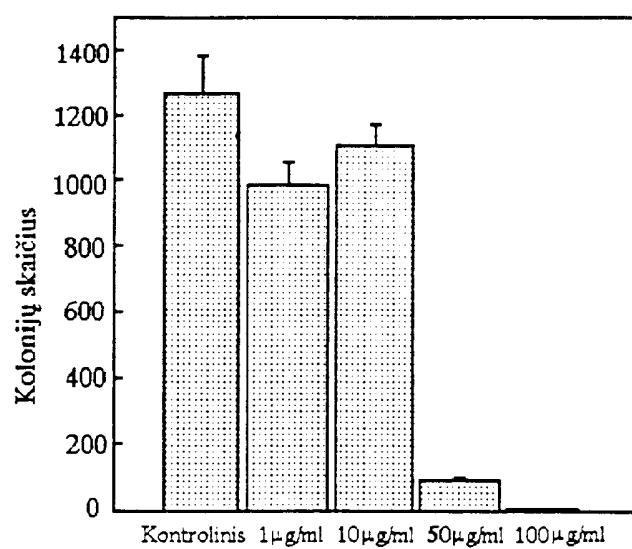


Fig.15J

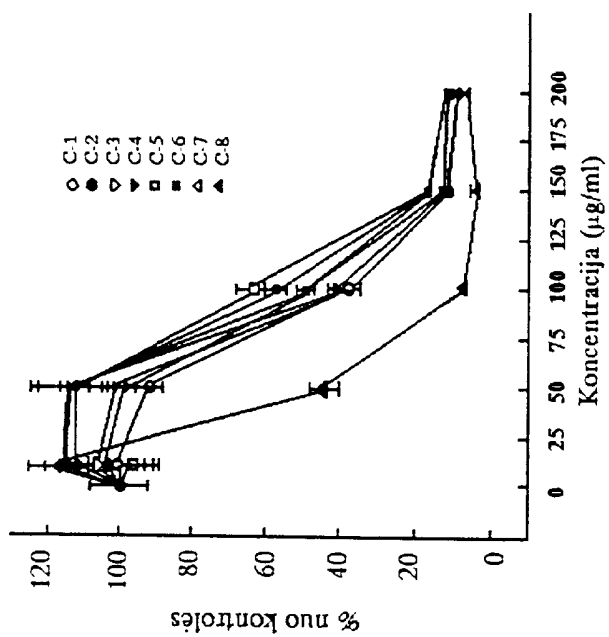


Fig.15K

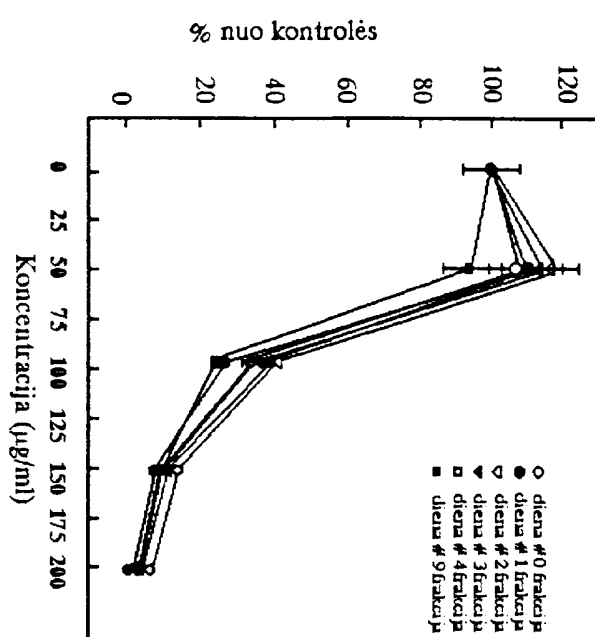


Fig.15L

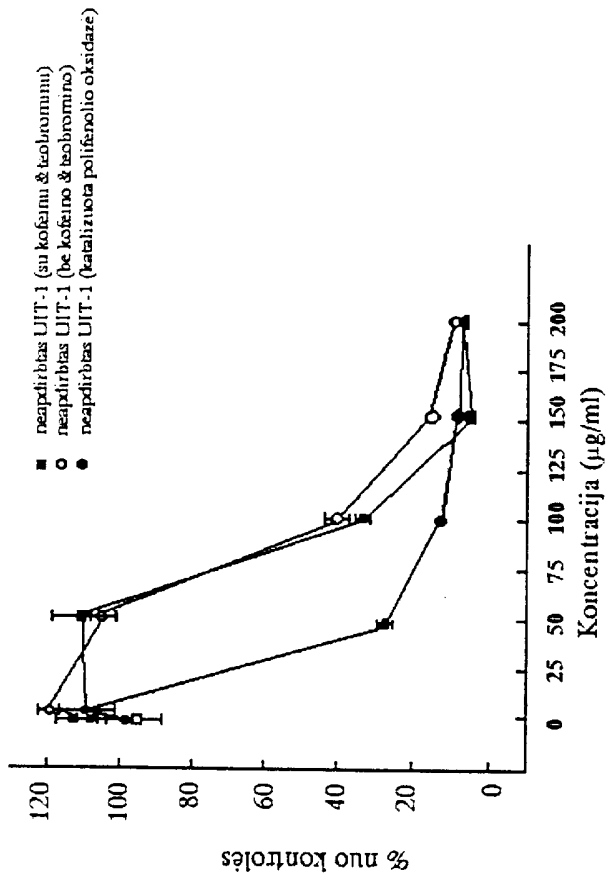


Fig.15M

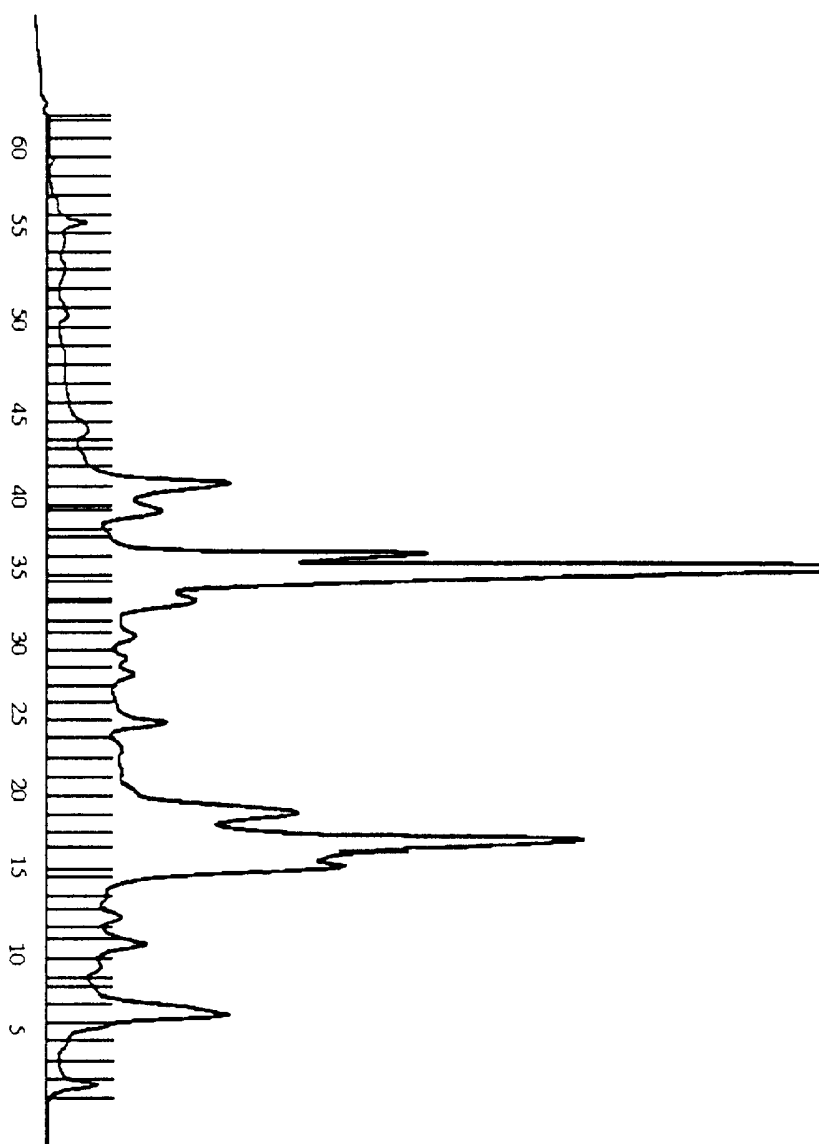


Fig.15N

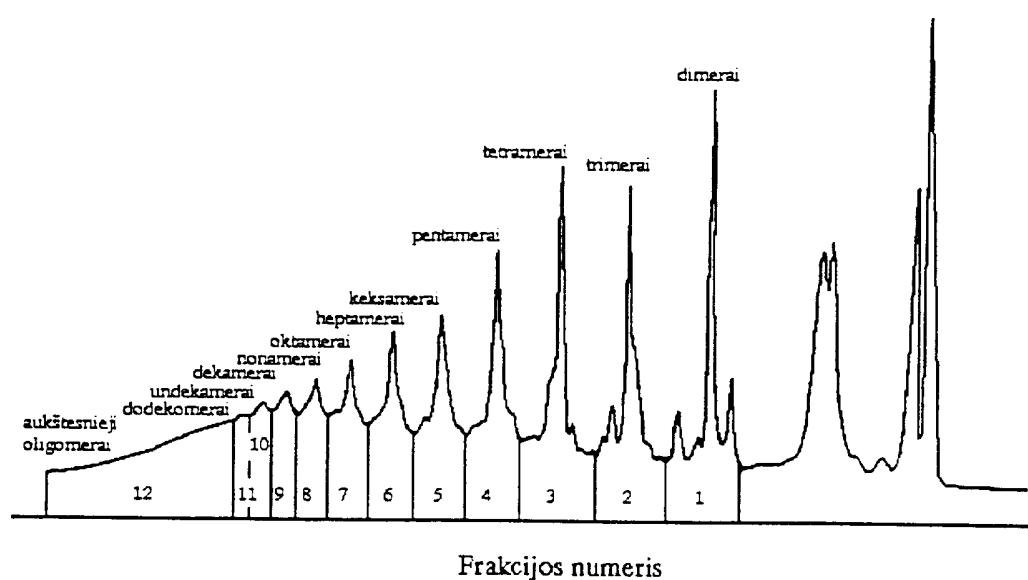


Fig.150

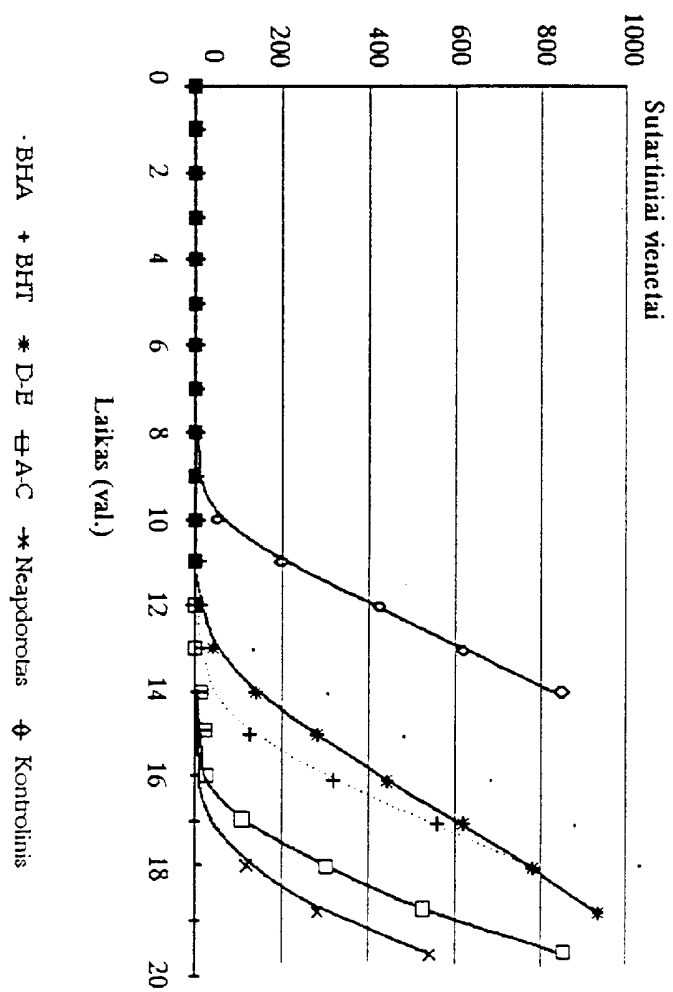


Fig.16

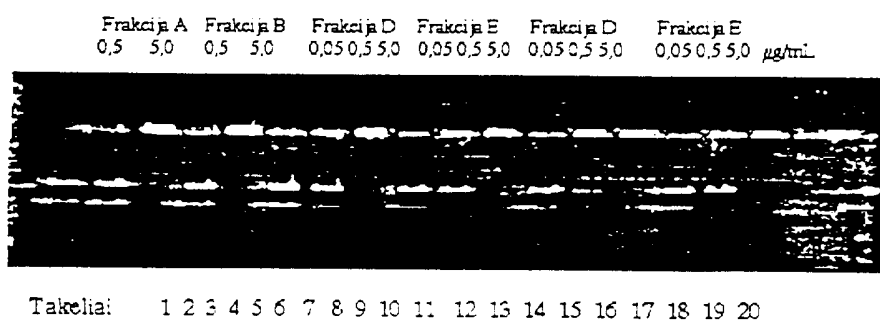


Fig.17

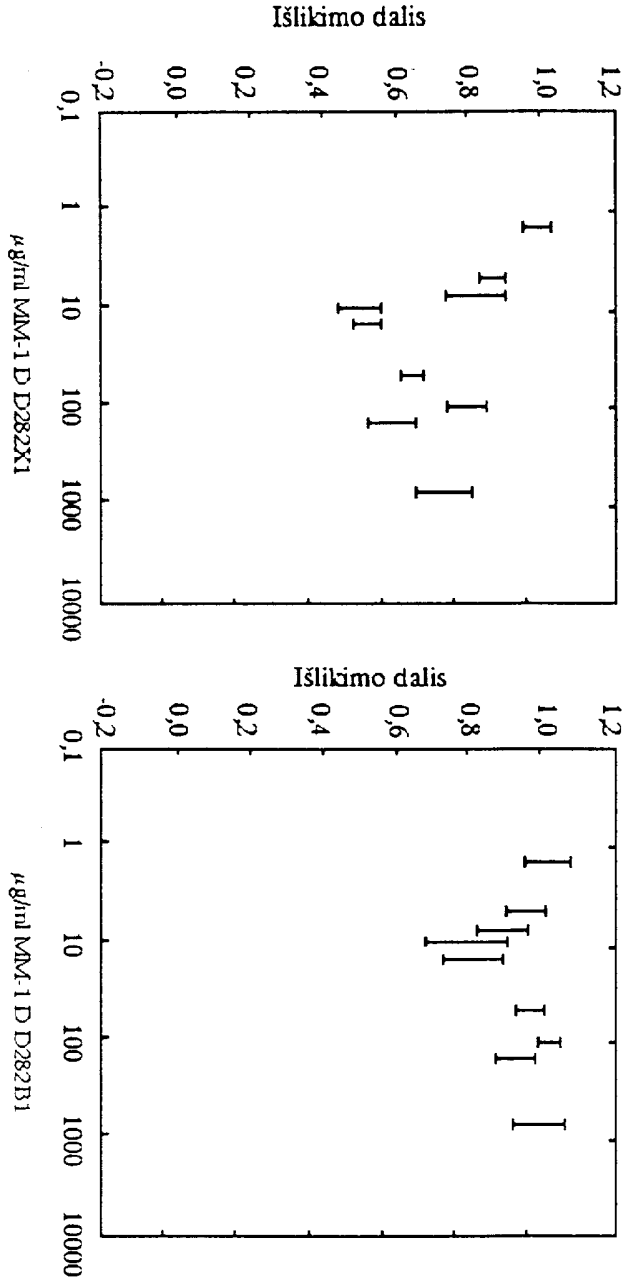


Fig.18

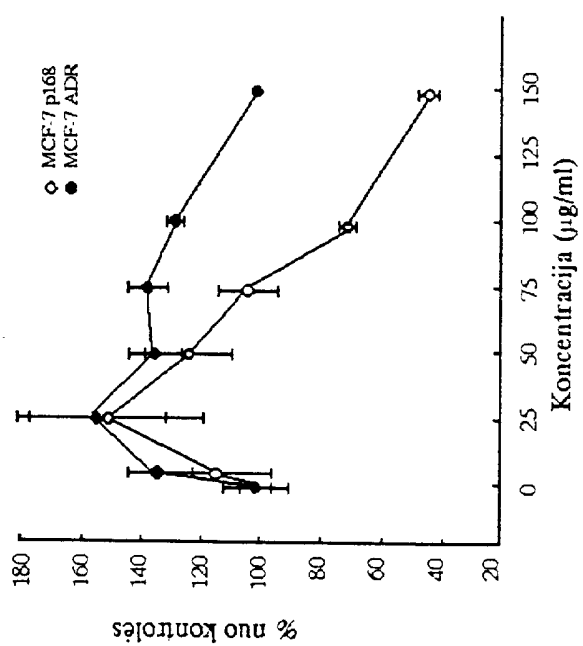


Fig.19

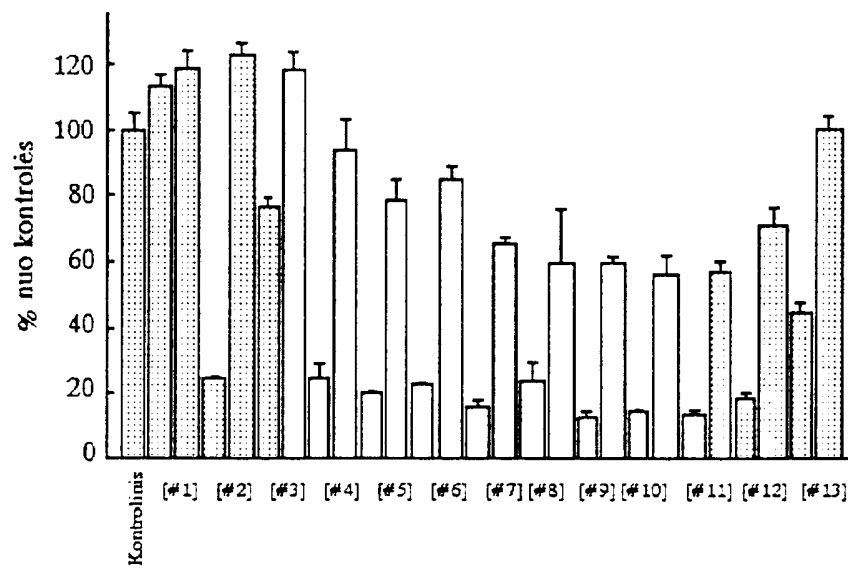


Fig.20

