

## **Přípravek Natto NKCP má dvojí funkci v předcházení trombózy**

Purifikovaný Natto Culture Filtrate "NKCP", funkční doplněk stravy nezávisle vyvinutý v Daiwa Pharmaceutical byl studován k určení jeho aktivních součástí a účinků na koagulační / fibrinolytický systém. Výsledky ukázaly, že na rozdíl od subtilisin proteázy, standardně známé jako nattokináza, má hlavní složka NKCP, bacillopeptidáza, jak účinek rozpouštění trombu, tak také účinek omezující tvorbu trombu. Mimo to, vylepšuje NKCP tekutost krve a začíná být jasné, že NKCP má další užitečné účinky, které nebyly prozatím plně pochopeny. Daiwa Pharmaceutical vidí NKCP jako "nattokinázu druhé generace" a zamýšlí ji plně využít v zlepšování zdraví.

### **Aktivní složka - bacillopeptidáza**

Jelikož bylo zjištěno, že některé proteázy vytvářené *Bacillus subtilis* mají fyziologické funkce, jako např. antitrombotický účinek, zvedla se očekávání pro prevenci trombózy. Hlavní složka NKCP, bacillopeptidáza, je jednou z proteáz, kterou *Bacillus subtilis* vylučuje mimo buňky.

Subtilisin proteáza byla dlouho známá jako nattokináza s antitrombotickým účinkem. Daiwa Pharmaceutical zjistila na základě detailně zpracovaných studií o primárních sekvencích aminokyselin a molekulární váhy bacillopeptidázy, že se bacillopeptidáza poměrně liší od subtilisin proteázy, přestože jsou obě vylučovány *Bacillus subtilis*.

Hlavní složka NKCP, bacillopeptidáza, má molekulární váhu 34 kDa a subtilisin proteáza váží 27 kDa. Je zřetelné, že jejich molekulární váhy jsou odlišné. K vysvětlení dalších rozdílů těchto dvou proteáz identifikovala Daiwa Pharmaceutical primární sekvence aminokyselin u bacillopeptidázy a provedla analýzu založenou na genetickém kódu *Bacillus subtilis*, který již byl stanoven.

Bylo zjištěno, že bacillopeptidáza je složena ze čtvrtiny bacillopeptidázy F, serinové proteázy s molekulární vahou okolo 120 kDa a tato bacillopeptidáza obsahuje doménu, která působí jako serinová proteáza, podobně jako plazmin. Základní výsledky této studie ověřily teorii, že tento fragment vykazuje trombolýtický účinek: roztok NKCP ve fyziologickém roztoku byl schopen rozpustit umělé tromby a hydrolyzovat syntetizovaný plazminový substrát. Výsledky této analýzy ukázaly, že sekvence aminokyselin u NKCP je odlišná také od běžné nattokinázy.

Přestože historicky je známo, že pouze subtilisin proteáza je považována za nattokinázu, stává se jasnějším, že další peptidáza, bacillopeptidáza, má antitrombotický účinek a její další použitelnost se stále zkoumá.

### **Regulace antikoagulačním a fibrinolytickým působením**

Nejdůležitější charakteristický rys NKCP, který obsahuje bacillopeptidázu vyloučenou *Bacillus subtilis*, je kombinace jeho trombolýtického působení s antikoagulačním působením, inhibujícím vytváření trombu. Ve studii, kde byl fyziologický solný roztok NKCP přidán k čerstvé lidské krvi, se snížily koagulační indikátory trombin/antitrombin III komplexu a monomeru fibrinu, potvrzující jeho in vitro heparinu podobný antikoagulační účinek. NKCP také prodloužil koagulaci v modelu tvorby trombu u krys, závisející na dávce.

Je známo, že subtilisin proteáza má nižší antikoagulační aktivitu než bacillopeptidáza. Přestože přesné srovnání enzymové aktivity není možné pro chybění jakékoliv protilátky proti subtilisin proteáze, má

subtilisin proteáza přibližně 8 krát vyšší fibrinolytickou aktivitu, avšak NKCP má přibližně 100 krát vyšší antikoagulační aktivitu. To, že má bacillopeptidáza 100 krát vyšší antikoagulační aktivitu, bylo zjištěno v experimentu, který zahrnoval inhibici koagulace v krvi, kde bylo nutné přidat 100 krát více množství subtilisin proteázy než množství NKCP k zabránění koagulace krve. Mechanismus, kterým NKCP zabraňuje koagulaci krve je neznámý. Nicméně, provedené studie prokázaly, že mechanismus, kterým to pracuje je podobný jako u heparinu, avšak specifický, protože se nejedná o inhibici vápníku tvorbou chelátu, tak jak je tomu u kyseliny ethylenediaminetetraoctové (EDTA).

Antikoagulační aktivita, která zabraňuje tvorbě trombu je příznivější než fibrinolytická aktivita, která rozpouští již utvořené tromby, ke snížení rizika vytváření trombu v každodenním životě, kdy se trombus tvoří u lidí s nemocemi způsobenými špatným životním stylem nebo při dlouhodobém stání. NKCP, který má jak fibrinolytický tak i antikoagulační účinek, napomáhá regulaci rovnováhy mezi oběma těmito pochody. Daiwa Pharmaceutical vidí NKCP jako "nový typ nattokinázy s duálním účinkem", který může být použit jak v základních tak i klinických studiích prevence trombózy.

### **Klinická studie využívající jako indikátor tekutost krve**

Bylo zjištěno, že NKCP reguluje rovnováhu mezi krevní koagulací a fibrinolýzou, ale je velmi složité objasnit mechanismus jeho působení. Základní a klinické studie, které se zaměřují na zlepšení tekutosti krve, jsou na dobré cestě k vysvětlení tohoto postupu v klinických podmínkách.

Ve studii účinnosti NKCP na zlepšení tekutosti krve, bylo 13-ti zdravým dospělým dobrovolníkům po dobu jednoho týdne perorálně podáván NKCP k určení času euglobulinové lýzy (ELT) jako indikátoru fibrinolytické aktivity. Bylo zjištěno, že podávání 2-4 tablet (250-500 mg NKCP) denně, zvýšilo jejich fibrinolytickou aktivitu. Jednomu zdravému dobrovolníkovi bylo podáváno NKCP po každém jídle, v počtu 8 tablet (1000 mg NKCP) denně a jeho tekutost krve byla určena pomocí micro channel array flow analyzeru (MC-FAN). Doba průchodu plné krve se zjevně zkrátila od 7. dne včetně. Avšak není dostatek důkazů k prokázání, do jaké míry souvisí výsledky studie tekutosti krve pomocí výpočtu ELT a MC-FAN s rizikem trombózy. Prováděny jsou další konkrétní klinické výzkumy.

**Jako jeden z těchto výzkumů plánuje Daiwa Pharmaceutical klinickou studii, kde jako indikátor budou použity subjektivní příznaky způsobené poruchou krevního oběhu, jelikož mnoho uživatelů NKCP uvádělo zlepšení subjektivních příznaků, jako např. menší ztuhlost v ramenou. Výsledkem toho byly důkazy, že zlepšení subjektivních příznaků způsobených poruchami krevního oběhu souvisí se sníženým rizikem vytváření trombu. Další studie jsou očekávány.**

### **Vývoj metody originální analýzy**

Mnoho doplňků stravy s natto a extrakty natto kultur bylo vyvinuto pro jejich antitrombotický účinek. Avšak neexistuje žádný spolehlivý postup k určení jejich aktivní složky. Jako garanci účinku NKCP vytvořila Daiwa Pharmaceutical kvalitativní a kvantitativní metody analýzy k určení obsahu a účinku bacillopeptidázy. K určení stanoveného množství bacillopeptidázy, je vyvinuta metoda sendvičové ELISA, která používá králičí protilátky proti bílkovině vytvářené Bacillus subtilis založené na sekvencích bazí bacillopeptidázy. Tato metoda stanovení již byla ověřena v Japan Food Research Laboratories a nyní se potvrzuje.

Daiwa Pharmaceutical zamýšlí posílit vědecký podklad pro prospěch NKCP jako funkčního doplňku výživy k aktivnímu využití NKCP pro zlepšování zdraví.