

©Borgis

Kamila Syska¹, Anna Kosiorek¹, Anna Podsędek², Marcin Różalski¹,
*Jacek Golański¹

Propozycja procedury oceny przeciwplateletowych właściwości preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego w badaniach *in vitro***

¹Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Cezary Watała

²Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. inż. Stanisław Bielecki

A PROPOSAL OF THE IN VITRO LABORATORY PROCEDURE FOR DETERMINATION ANTIPLATELET PROPERTIES OF POLYPHENOLIC EXTRACTS OF PLANT ORIGIN

KEY WORDS: PLATELET AGGREGATION – PLANT EXTRACTS – POLIPHENOLS – FLOW CYTOMETRY – IMPACT-R

SUMMARY

Polyphenolic compounds have pleiotropic effects including the ability to reduce platelet aggregation. However, a commonly approved procedure allowing to detect the antiplatelet properties of these compounds has not been established yet. The aim of our study was to identify the best methods (laboratory procedures) to study the impact of polyphenolic compounds contained in plant extracts on ADP-induced platelet reactivity. The experiment consisted of two steps. At first, from among four plant extracts (Aronox[®], Pycnogenol[®], grape seeds, raspberry seeds) we chose the extract having the strongest inhibitory effect on platelet aggregation. We decide to use the optical aggregometry as a screening method, since it is regarded as the gold standard in studies of platelets' reactivity. In next step, we selected the most effective method of detecting *in vitro* antiplatelet properties of polyphenolic extracts. Totally, we compared: light transmission aggregometry (LTA), impedance aggregometry (MEA), platelet adhesion (Impact-R), expression of selected surface membrane platelet receptors (flow cytometry). In the first step of our experiment, the best inhibitor of platelet aggregation was grape seed extract. In the second step, we found that LTA was the best technique since it allowed to detect a significant inhibition of platelets under by grape seed extract (inhibition score 6). Thus, LTA defended its gold standard position. Our results suggested also that impedance aggregometry (inhibition score 4) was also useful in detection of antiplatelet effects of grape seed extract, whereas Impact-R and flow cytometry were not suitable methods in this case (inhibition score 1 and 0, respectively).

Wstęp

Badania epidemiologiczne wskazują, że wysokie spożycie owoców i warzyw jest ważnym czynnikiem redukującym występowanie chorób sercowo-naczyniowych (1). Korzyści, jakie płyną ze spożywania pokarmów pochodzenia roślinnego, mogą wynikać z właściwości przeciwplateletowych polifenoli (2, 3). Spośród licznych surowców roślinnych hamujących aktywację i reaktywność płytek krwi (4), cztery zostaną bliżej omówione.

Liście i owoce winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) są bogatym źródłem związków polifenolowych (5). Opisanie przez Reneuda (6) w 1992 roku zjawiska, znanego jako „paradoks francuski”, zapoczątkowało zainteresowanie polifenolami roślinnymi, jako związkami o właściwościach przeciwplateletowych. Związki te, zawarte w owocach czerwonych winogron, hamują aktywność płytek krwi (7), między innymi ze względu na to, iż zawarte w nich flawonoidy hamują działanie cyklooksygenazy, redukują produkcję tromboksanu A₂ i nadtlenku wodoru w płytkach krwi oraz hamują aktywację fosfolipazy C i kinazy białkowej C (8).

**Praca współfinansowana z projektów MNiSW N405 065034 oraz „Przygotowanie preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwplateletowych i kardioprotekcyjnych (FLAWOPIRYNA)”, współfinansowanego przez Unię Europejską, ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, nr UDA-POIG.01.03.01-10-129/08.

Wykazano również, że resweratrol znajdujący się w ekstrakcie z owoców winogron odpowiedzialny jest za zmniejszenie produkcji anionu nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) oraz zwiększenie produkcji tlenku azotu (NO^{\cdot}) w płytkach krwi (9). Freedman i wsp. (10) opisują, iż czternastodniowe spożycie soku winogronowego obniża agregację płytek krwi u zdrowych ochotników. Dohadwała i wsp. (8) opisują plejotropowe działanie polifenoli pochodzących z czerwonych winogron.

Bogatym źródłem związków polifenolowych są owoce aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot). Głównymi reprezentantami polifenoli w dojrzałych owocach aronii są: antocyjany (glikozydowe pochodne antocyjanidyny), flawony, flawonole, katechiny (dimery, trimery) oraz kwasy fenolowe (11). Wykazano, że polifenole pochodzące z owoców aronii wykazują właściwości przeciwplatekcyjne (3, 12).

Olas i wsp. (3) oraz Ryszawa i wsp. (12) wskazują, że ekstrakt z owoców aronii wykazuje właściwości antyagregacyjne. Opisany jest także efekt oddziaływań pośrednich tego ekstraktu. W badaniach *in vitro* poprawiał on przeciwplatekową aktywność śródbłonna naczyniowego (13). Kulling i wsp. (14) opisują wszechstronny korzystny wpływ polifenoli pochodzących z owoców aronii czarnoowocowej na zdrowie człowieka, w tym na układ sercowo-naczyniowy.

Piknogenol (*Pycnogenol*[®]) – wyciąg z kory sosny śródziemnomorskiej (*Pinus pinaster* Sol.), pozyskiwany w południowej części Francji, stanowi bogate źródło flawonoidów (katechiny, epikatechiny, monomerów, dimerów katechin i epikatechin, oligomerów procyanidyny) oraz kwasów fenolowych (ferulowego, kawowego). Zaobserwowano, że u palaczy tytoniu piknogenol działa antyagregacyjnie oraz obniża stężenie tromboksanu w surowicy (15). Również u osób niepalących preparat ten hamuje agregację i adhezję płytek krwi (16). Farmakologiczne właściwości piknogenolu podsumowuje w swojej publikacji Rohdewald (17).

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych, kardioprotekcyjne, w tym przeciwplatekowe właściwości preparatów pozyskiwanych z różnych części roślin z rodzaju Malina (*Rubus* L.) nie są dokładnie opisane. Wzmianki na temat polifenolowych ekstraktów uzyskiwanych z owoców malin można znaleźć w pracach opisujących plejotropowe działanie antocyjanin (18). Badania prowadzone przez Torres-Urrutia i wsp. (19) wykazały, że ekstrakt z owoców malin ma właściwości antykoagulacyjne i profibrynolityczne. Brak jest doniesień na temat aktywności biologicznej ekstraktów z pestek malin, stąd włączenie do badań takiego

preparatu pozwoli na wstępną ocenę jego właściwości przeciwplatekowych.

Ze względu na rosnące zainteresowanie preparatami polifenolowymi pochodzenia roślinnego, jako potencjalnym źródłem nowych leków przeciwplatekowych, niezbędne jest opracowanie procedury, która pozwoliłaby na wykrywanie działania związków przeciwplatekowych zawartych w ekstraktach roślinnych. Wykorzystywana jest w tym celu głównie metoda badania agregacji płytek krwi metodą optyczną (LTA – *light transmission aggregometry*) (3, 16, 20-22). Opisana na początku lat 60. (23), mimo wielu mankamentów, w badaniach czynności płytek krwi uznawana jest za „złoty standard”. Coraz częściej do badania wpływu preparatów polifenolowych na funkcje płytek krwi stosowane są metody wykorzystujące krew pełną, w tym metoda agregacji impedancyjnej (24-26) i cytometrii przepływowej (27, 28). W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych na temat wykorzystania do tego celu agregometru Multiplate (29) oraz analizatora Impact-R (30).

Z analizy informacji zawartych w publikacjach wynika, że do oceny *in vitro* czynności płytek krwi najczęściej jest stosowana metoda optyczna (LTA). W niniejszej pracy założono, że dołączenie do LTA jednej z metod badania czynności płytek we krwi pełnej wzbogaci i usprawni metodykę wykrywania przeciwplatekowych właściwości preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego.

Celem pracy było porównanie trzech metod oceny zależnej od ADP reaktywności płytek krwi we krwi pełnej: agregacji impedancyjnej wykonywanej w analizatorze Multiplate[®], (MEA), adhezji/agregacji badanej w analizatorze Impact-R[®] oraz oceny ekspresji wybranych receptorów płytkowych (cytometria przepływowa). Porównanie to ma na celu wskazanie najbardziej użytecznej metody służącej jako uzupełnienie badań wykonywanych za pomocą metody LTA.

Materiał i metody

Ekstrakty roślinne

W eksperymencie wykorzystano 4 ekstrakty roślinne:

- Pycnogenol[®] (piknogenol) – nazwa handlowa (Horphag Research) – standaryzowany wyciąg z kory sosny śródziemnomorskiej (*Pinus pinaster* Sol., subsp *Ailton Atlantica des Villar.*) uzyskano z Drug Research Institute, Modra, SR (Słowacja),
- Aronox[®] – ekstrakt z owoców aronii czarnoowocowej – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, Agropharm SA (Polska),

- Ekstrakt z pestek winorośli właściwej – *Vitis vinifera* L. (OMNIVIR R), CE Roeper GmbH (Niemcy),
- Ekstrakt z pestek maliny właściwej – *Rubus idaeus* L., Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka (Polska).

Zawartość związków polifenolowych w wymienionych ekstraktach przedstawiono w tabeli 1.

Wszystkie powyższe ekstrakty rozpuszczono w 10% DMSO i stosowano w stężeniach – 7,5 oraz 15 µg/ml. Zastosowane stężenia polifenoli mieściły się w dolnych zakresach stężeń stosowanych w podobnych układach badawczych (12, 31).

Krew

Do eksperymentu pobrano krew od 58 zdrowych dawców (20 mężczyzn i 38 kobiet) w wieku 32 ± 6 lat. Osoby uczestniczące w badaniach nie przyjmowały żadnych leków, a analiza morfologii krwi i podstawowych parametrów biochemicznych mieściły się w granicach normy. Krew pobierana była z zastosowaniem zestawów firmy Sarstedt. Antykoagulant dobierano w zależności od metody analizy funkcji płytek krwi (tab. 2).

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej w oparciu o zgodę Komitetu ds. Etyki Badań Naukowych w eksperymentach na ludziach na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr RNN/13/07/KB).

Plan eksperymentu

Eksperyment podzielono na dwie części. Pierwsza miała na celu wybór ekstraktu roślinnego najsil-

niej hamującego aktywację płytek krwi, zależną od ADP, zaś druga wskazanie najbardziej czułej metody, wykrywającej *in vitro* przeciwplatekowe właściwości preparatów polifenolowych (przy zastosowaniu tego samego agonisty). Wszystkie preparaty testowano w dwóch stężeniach – 7,5 oraz 15 µg/ml w przeliczeniu na kwas galusowy. W celu porównania ekstraktów/ skuteczności metod przyznawano punkty – 1 punkt, gdy badany preparat powodował istotne statystycznie zahamowanie aktywacji płytek krwi w stężeniu 15 µg/ml oraz 2 punkty, jeżeli preparat działał w stężeniu 7,5 µg/ml w przeliczeniu na kwas galusowy.

W pierwszym etapie do oceny przeciwplatekowych właściwości preparatów zastosowano metodę uznaną za „złoty standard” w tego typu badaniach, czyli metodę optyczną badania agregacji płytek krwi (LTA). Badano ekstrakty z pestek winogron, malin oraz owoców aronii i piktogenol – ekstrakt z kory sosny śródziemnomorskiej. W drugim etapie zastosowano jeden ekstrakt, który w poprzednim etapie najefektywniej hamował płytki krwi. Stosując skalę punktową porównano trzy metody oceny funkcji płytek wykonywane w krwi pełnej. Dla wszystkich zastosowanych w pracy metod (LTA i oceniane metody) wykonano ranking punktowy.

Badanie agregacji płytek krwi metodą agregacji optycznej

Agregacja optyczna uznawana jest za tak zwany „złoty standard” wśród metod stosowanych do określania reaktywności płytek krwi. Opiera się na monitorowaniu i rejestrowaniu zmian w transmitancji

Tabela 1. Zawartość związków polifenolowych (mg/g preparatu) oznaczona metodą spektrofotometryczną.

Preparat	Polifenole ogółem	Flawanole	Proantocyjanidyny
Pycnogenol®	596,94 ± 19,47	285,29 ± 14,57	284,22 ± 6,11
Aronox®	477,72 ± 11,80	93,90 ± 2,21	nie oznaczono
Ekstrakt z pestek winogron	409,97 ± 7,08	271,77 ± 30,44	68,77 ± 5,29
Ekstrakt z pestek malin	263,30 ± 16,27	93,57 ± 1,19	47,64 ± 1,32
Wyniki prezentowane są jako średnia ± błąd standardowy			

Tabela 2. Dobór antykoagulantu w zależności od wybranej metody analizy funkcji płytek krwi.

Metoda analizy funkcji płytek krwi	Stosowany antykoagulant
Agregacja optyczna Cytometria przepływowa (pomiar ekspresji selektyny-P i aktywnej formy glikoproteiny IIb/IIIa) Impact-R	3,2% buforowany cytrynian sodowy (w stosunku krew:antykoagulant wynoszącym 9:1)
Agregacja impedancyjna	hirudyna – Refludan® (25 µg/ml)

światła padającego na próbkę osocza bogatopłytkowego, które zachodzą w trakcie agregacji płytek krwi w odpowiedzi na agonistę (23).

Osocze bogatopłytkowe otrzymano przez odwirowanie krwi pełnej pobranej do próbki z cytrynianem sodu (250 obr./min, 6 min). Do badań wykorzystano osocze bogatopłytkowe o mianie płytek równym $200 \times 10^9/l$.

Czas inkubacji osocza z preparatem polifenolowym wynosił 10 min (w temperaturze $37^\circ C$). Jako agonistę zastosowano $10 \mu mol/l$ ADP, a pomiary prowadzono w układzie sparowanym. Próbę kontrolną stanowiło osocze bogatopłytkowe z odpowiednią objętością 10% DMSO. Agregację płytek krwi monitorowano przez 10 min, za pomocą optycznego agregometru (Chrono-Log 490-2D, Havertown).

Badanie agregacji płytek krwi z wykorzystaniem aparatu Multiplate

Aparat Multiplate® (DynaByte Medical) pozwala na ocenę funkcji płytek krwi z wykorzystaniem krwi pełnej w oparciu o zasadę agregacji impedancyjnej. Metoda ta opiera się na monitorowaniu zmian w impedancji, które związane są z adhezją agregatów płytkowych na powierzchni elektrod. Urządzenie pozwala na jednoczesne prowadzenie pomiarów w pięciu niezależnych próbach (29).

Krew z ekstraktem inkubowano przed pomiarem 10 min w temperaturze pokojowej. Pomiar agregacji prowadzono jednocześnie w 3 próbach, z czego jedna stanowiła kontrolę, zaś dwie – próby badane zawierające różne stężenia preparatu polifenolowego. Zgodnie z zaleceniem producenta jako agonistę użyto ADP o stężeniu $6,4 \mu mol/l$. Czas pomiaru wynosił 10 min.

Dla obu agregometrycznych metod stężenia ekstraktu w próbach badanych wynosiły $7,5$ i $15 \mu g/ml$ w przeliczeniu na kwas galusowy (przy różnych stężeniach ADP), a wyniki wyrażono w postaci wartości agregacji maksymalnej.

Badanie agregacji oraz adhezji płytek krwi w nieskoagulowanej krwi w warunkach przepływu tętniczego

Analizator Impact-R®, (DiaMed, Cresier) umożliwia badanie adhezji i agregacji płytek krwi we krwi pełnej. Pomiar odbywa się w warunkach symulujących siły ścinające przepływ tętniczy, tj. $1800 s^{-1}$ przez 2 min. Efekt ten jest uzyskiwany poprzez zastosowanie stożka obracającego się w studziencie pomiarowej. Wytworzona w analizatorze siła ścinająca powoduje aktywację płytek – adhezję do powierzchni polistyrenowej, a następnie agregację. Po przemyciu i zabar-

wieniu powierzchni studzienki następuje jej analiza przy użyciu mikroskopu świetlnego połączonego z systemem obrazującym (30).

Stężenia ekstraktu w próbach badanych wynosiły $7,5$ i $15 \mu g/ml$ w przeliczeniu na kwas galusowy. Krew z ekstraktem inkubowano przed pomiarem w czasie 10 min w temperaturze $37^\circ C$. Po inkubacji wszystkie próbki umieszczano w mieszałce (10 rpm na 1 min). Pomiar prowadzono jednocześnie w 3 próbach, z czego jedna stanowiła kontrolę, zaś dwie – próby badane zawierające różną ilość preparatu polifenolowego. Analizę prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Wyniki rejestrowano w postaci dwóch parametrów: SC (*Surface Coverage*) – procentowe pokrycie powierzchni studzienki, które odzwierciedla nasilenie adhezji płytek oraz AS (*Aggregate Size*) – rozmiar agregatów, który odzwierciedla nasilenie agregacji płytek krwi.

Badanie reaktywności płytek krwi metodą cytometrii przepływowej

Pomiar metodą cytometrii przepływowej opiera się na identyfikowaniu antygenów znajdujących się na powierzchni lub wewnątrz komórek. Metoda pozwala na monitorowanie wielu różnych procesów zachodzących podczas aktywacji płytek krwi (32).

Dla oceny efektu przeciwpłytkowego badanego preparatu polifenolowego zastosowano następujące przeciwciała firmy Becton Dickinson:

- anty-CD61 wyznakowane PerCp,
- anty-CD62 wyznakowane PE,
- PAC-1 wyznakowane FITC.

Do krwi pełnej pobranej do próbki z cytrynianem sodu dodawano preparaty polifenolowe o stężeniach $7,5$ i $15 \mu g/ml$, w przeliczeniu na kwas galusowy. Następnie krew inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min i dodawano ADP w takiej ilości, aby jego ostateczne stężenie wynosiło $20 \mu mol/l$ (aktywacja 5 min). Po zakończeniu inkubacji i aktywacji każdą próbkę rozcieńczano 10-krotnie w buforze PBS.

Wyniki rejestrowano jako odsetek obiektów antygeno-pozytywnych dla każdego z badanych parametrów.

Analiza statystyczna danych

Dane przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy lub jako mediany oraz zakresy kwartylowe. W celu weryfikacji normalności rozkładu danych zastosowano test Shapiro-Wilka. Porównując dane nieodbiegające od rozkładu normalnego, zastosowano jednostronny (w pierwszym etapie eksperymentu) lub dwustronny (w etapie drugim) test t-Studenta dla danych sparowanych. W pozostałych przypadkach,

w związku z tym, że dane odbiegały od rozkładu normalnego i ze względu na wielokrotność porównań, wyniki analizowano za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa.

Wyniki

Pierwszy etap eksperymentu wykazał, iż spośród testowanych preparatów polifenolowych najsilniejsze działanie przeciwplatekowe ma piktogenol oraz ekstrakt z pestek winogron (tab. 3). W obu przypadkach zaobserwowano istotne statystycznie zahamowanie agregacji płytek krwi wywołane inkubacją z ekstraktem,

zarówno w stężeniu wynoszącym 7,5, jak i 15 $\mu\text{g/ml}$, w przeliczeniu na kwas galusowy. W przyjętej klasyfikacji oba preparaty otrzymały po 3 punkty. Jednakże tylko w przypadku ekstraktu z pestek winogron zaobserwowano efekt działania zależny (liniowo) od stężenia badanego preparatu (w tabeli nie uwzględniono wyższych stężeń). Stąd wybór ekstraktu z pestek winogron do drugiego etapu badań. W prezentowanym zestawieniu Aronox® (ekstrakt z owoców aronii) zajął dopiero trzecie miejsce, uzyskując dwa punkty, a ekstrakt z pestek malin, nie wykazywał właściwości przeciwplatekowych (0 punktów).

Tabela 3. Wpływ preparatów polifenolowych na agregację płytek krwi zdrowych dawców.

Preparaty	Zmiany reaktywności płytek krwi po inkubacji z preparatem polifenolowym		Istotność statystyczna		Punkty
	Stężenie ekstraktu polifenolowego [$\mu\text{g/ml}$] w przeliczeniu na kwas galusowy				
	7,5	15	7,5	15	
Ekstrakt z owoców aronii (A_{max})	88,6 \pm 5,7	96,2 \pm 4,0	0,041	0,092	2
Ekstrakt z pestek winogron (A_{max})	85,8 \pm 10,7	78,6 \pm 6,0	0,033	0,003	3
Piktogenol (A_{max})	85,1 \pm 5,3	80,1 \pm 6,4	0,012	0,005	3
Ekstrakt z pestek malin (A_{max})	100,0 \pm 4,3	99,1 \pm 4,1	0,489	0,427	0

Wyniki (obliczone jako względne wartości procentowe po inkubacji z ekstraktem z pestek winogron w stosunku do wyników agregacji przed inkubacją) prezentowane są jako średnia z błędem standardowym ($n = 16$). Agregację płytek krwi indukowano ADP o stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$. Osoczki bogatopłytkowe inkubowano z preparatem polifenolowym 10 min w temperaturze 37°C. Istotność różnic między grupą kontrolną (bez inkubacji z preparatem) a badaną (po inkubacji z preparatem) obliczono, wykorzystując dane bezwzględne jednostronnym testem t-Studenta dla danych sparowanych. 1 punkt przyznawano, gdy preparat powodował istotne statystycznie zahamowanie aktywacji płytek krwi w stężeniu 15 $\mu\text{g/ml}$ oraz 2 punkty, jeżeli preparat działał w stężeniu 7,5 $\mu\text{g/ml}$ w przeliczeniu na kwas galusowy. A_{max} – wartość maksymalna agregacji.

Tabela 4. Wpływ ekstraktu z pestek winogron na reaktywność płytek krwi zdrowych dawców.

Stosowana metoda/ badany parametr	Zmiany reaktywności płytek krwi po inkubacji z ekstraktem z pestek winogron		Istotność statystyczna		Punkty
	Stężenie preparatu polifenolowego [$\mu\text{g/ml}$] w przeliczeniu na kwas galusowy				
	7,5	15	7,5	15	
Agregacja impedancyjna (Multiplate)/ A_{max}	78,1 (43,2-97,7)	47,4 (27,2-66,3)	0,038	< 0,0001	3
Agregacja impedancyjna (Multiplate)/AUC	77,7 (47,1-101,4)	51,6 (27,3-66,6)	0,0907	0,0005	1
Analizator Impact-R/AS	90,0 (78,31-119,1)	80,0 (62,1-115,8)	0,4826	0,1175	0
Analizator Impact-R/SC	81,7 (54,8-92,7)	43,3 (22,7-69,7)	0,0979	0,0003	1
Cytometria przepływową/PAC-1	104,6 (97,6-127,7)	101,7 (97,9-113,1)	0,4239	0,4862	0
Cytometria przepływową/CD62	116,0 (107,2-137,0)	118,1 (109,4-153,5)	0,4797	0,968	0
Agregacja turbidymetryczna/ A_{max} *	75,2 \pm 8,4	55,8 \pm 5,4	0,0008	< 0,0001	3
Agregacja turbidymetryczna/AUC*	88,6 \pm 10,4	56,8 \pm 5,5	0,0017	< 0,0001	3

Wyniki (obliczone jako względne wartości procentowe po inkubacji z ekstraktem z pestek winogron w stosunku do wyników agregacji przed inkubacją) prezentowane są jako mediana z zakresem kwartylowym lub średnia z błędem standardowym (w przypadkach oznaczonych*). We wszystkich metodach inkubacja z preparatem polifenolowym trwała 10 min. Jako agonistę stosowano ADP o stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$. Istotność różnic ($n = 16$) między dwoma punktami pomiarowymi (przed inkubacją i po inkubacji z preparatem) obliczono, wykorzystując dane bezwzględne testem Kruskala-Wallisa lub dwustronnym testem t-Studenta dla danych sparowanych (w przypadkach oznaczonych*). 1 punkt przyznawano, gdy ekstrakt z pestek winogron powodował istotne statystycznie zahamowanie aktywacji płytek krwi w stężeniu 15 $\mu\text{g/ml}$ oraz 2 punkty jeżeli preparat działał w stężeniu 7,5 $\mu\text{g/ml}$ w przeliczeniu na kwas galusowy. A_{max} – maksymalna wartość agregacji, AUC – pole pod krzywą, AS – przeciętny rozmiar agregatów, SC – procentowe pokrycie powierzchni studzienki.

W drugim etapie eksperymentu wykazano, że najwyższą punktację (6 punktów) w zakresie oceny przeciwplatekowego działania preparatów polifenolowych, uzyskała metoda agregacji optycznej (tab. 4). Metoda ta pozwalała na uchwycenie istotnego zahamowania płytek krwi pod wpływem ekstraktu z pestek winogron, niezależnie od sposobu wyrażenia wyników (maksymalna agregacja – Amax i pole pod krzywą – AUC). W przeprowadzonej w pracy, przy ocenie metod wykonywanych we krwi pełnej, pierwsze miejsce zajęła metoda agregacji impedancyjnej (4 pkt.). W przypadku tej metody wyniki agregacji wyrażone jako Amax pozwalały na lepsze różnicowanie efektu działania polifenoli niż wyniki AUC.

Ocena czynności płytek krwi z zastosowaniem analizatora Impact-R, w prezentowanym zestawieniu, znalazła się na drugim miejscu (wśród metod wykonywanych we krwi pełnej). Jedyne malejąca wartość parametru SC (procentowe pokrycie powierzchni studzienki agregatami płytek) wskazywała na istotne zahamowanie adhezji płytek krwi po inkubacji z ekstraktem z pestek winogron w stężeniu 15 $\mu\text{g/ml}$.

W zastosowanym w pracy układzie badawczym, analiza funkcji biologicznych płytek krwi metodą cytometrii przepływowej nie wykazała żadnego wpływu ekstraktów polifenolowych na reaktywność płytek krwi.

Dyskusja

W niniejszej pracy wykazano, że metodą, dzięki której w warunkach *in vitro* przeciwplatekową aktywność preparatów polifenolowych, jest uznawana za „złoty standard” metoda agregacji optycznej. Obserwacja ta potwierdza pozycję tej metody w badaniach modelowych, zarówno w eksperymentach wykonywanych z zastosowaniem izolowanych płytek (3, 20, 21), jak i w osoczu bogatopłytkowym (16, 22). Niestety, metoda ta wykazuje szereg ograniczeń, wśród których należy wymienić niezadawalającą powtarzalność, duże objętości stosowanych próbek i czasochłonność (sam pomiar i przygotowywanie próbek).

W niniejszej pracy obiecujące wyniki uzyskano także podczas badania agregacji płytek krwi z użyciem analizatora Multiplate metodą impedancyjną (29). W zastosowanym w pracy rankingu metoda ta zajęła pierwsze miejsce wśród metod badania płytek krwi wykonywanych w krwi pełnej (tab. 4). Według aktualnej analizy dostępnego piśmiennictwa, praca niniejsza po raz pierwszy opisuje zastosowanie agregometru Multiplate do oceny działania preparatów polifenolowych *in vitro*.

We wcześniejszych badaniach różne zespoły badawcze wykorzystywały w podobnym celu agregację impedancyjną, ale przy użyciu agregometru firmy Chrono-Log (24-26). Zasada pomiaru agregacji jest identyczna, ale w analizatorze Multiplate stosuje się mniejsze objętości krwi, zaś pomiar wykonywany jest w jednorazowych kuwetach w pięciu kanałach jednocześnie. Wielokrotne mycie elektrod w starej wersji agregacji impedancyjnej może być źródłem słabej powtarzalności pomiarów (29).

W niniejszej pracy stężenia ekstraktu efektywnie hamujące agregację płytek wynosiły, w przeliczeniu na kwas galusowy, 7,5 (44 $\mu\text{mol/l}$) i 15 $\mu\text{g/ml}$ (88 $\mu\text{mol/l}$). W publikacjach opisujących antyagregacyjny wpływ polifenoli, w których stosowano agregometr impedancyjny firmy Chrono-Log, efekt hamowania agregacji płytek krwi osiągnęto przy stężeniach badanych preparatów w zakresie 54 $\mu\text{g/ml}$ (autorzy nie podają stężenia ADP) (24).

W kolejnej pracy, w której stosowano impedancyjną agregację, hamowanie agregacji indukowanej 10 $\mu\text{mol/l}$ ADP osiągnięto, stosując stężenia preparatów polifenolowych w zakresie 45 $\mu\text{mol/l}$ (25).

Z kolei w innej pracy do skutecznego hamowania agregacji indukowanej kolagenem o stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ zastosowano ekstrakty z pestek winogron w zakresie stężeń od 50 do 250 $\mu\text{g/ml}$ (26).

Wyniki przeprowadzonych badań na tle opisanych powyżej publikacji pozwalają na uznanie agregometru Multiplate jako użytecznego narzędzia służącego do oceny *in vitro* przeciwplatekowych (antyagregacyjnych) właściwości preparatów polifenolowych.

W ograniczonym zakresie, wyniki pracy potwierdziły zasadność stosowania do oceny przeciwplatekowej aktywności preparatów polifenolowych analizatora Impact-R. Inkubacja krwi z ekstraktem z pestek winogron o stężeniu 15 $\mu\text{g/ml}$ powodowała istotne zmniejszenie wartości parametru SC (wskaźnik adhezji), przy niezmienionej wartości parametru AS (wskaźnik agregacji). Wynik ten sugeruje, że badany preparat polifenolowy wykazuje nie tylko właściwości antyagregacyjne, potwierdzone wcześniej omawianymi metodami, ale także hamuje adhezję płytek krwi. Z obserwacji tej można wyciągnąć wniosek, że zastosowanie analizatora Impact-R może być pomocne jedynie w badaniu antyadhezyjnych właściwości preparatów polifenolowych. Warto także zwrócić uwagę na fakt, że w dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji odnośnie podobnych zastosowań aparatu Impact-R, stąd można założyć, że w niniejszej pracy analizator ten po raz pierwszy został wykorzystany do oceny przeciwplatekowych właściwości preparatów polifenolowych.

W przeciwieństwie do opisywanych wyżej metod, ocena ekspresji selektywnego receptora dla fibrynogenu, z zastosowaniem cytometrii przepływowej w wykonanym w pracy porównaniu, nie uzyskała wysokiej noty. Niska przydatność cytometrii przepływowej w niniejszym badaniu nie może przesądzać o braku przydatności tej metody do oceny przeciwplatekownych właściwości preparatów polifenolowych. W innych pracach, przy zastosowaniu odmiennego układu badawczego, była ona stosowana z dużym powodzeniem (27, 28).

Podstawowym założeniem pracy było opracowanie procedury wykrywania przeciwplatekownych właściwości preparatów polifenolowych w zakresie hamowania ich reaktywności po stymulacji ADP. Kryteria te spełniają jedynie metody agregometryczne: optyczna (LTA) i impedancyjna (MEA).

Poza realizacją głównego celu w pracy wykazano, że wśród badanych preparatów (Pycnogenol®, Aronox®, ekstrakt z pestek malin, ekstrakt z pestek winogron), ekstrakt z pestek winogron wykazywał najsilniejsze właściwości przeciwplatekowe. Nie jest to wynik zaskakujący, zważywszy na obecną w piśmiennictwie dużą liczbę informacji na temat wysokiej przeciwplatekowej efektywności preparatów uzyskiwanych z owoców winogron (7-10). Wykazany w pracy brak przeciwplatekownych właściwości ekstraktu z pestek malin jest zgodny z wynikami prezentowanymi w publikacji Torres-Urrutia i wsp. (19).

Wnioski

Wyniki badań potwierdzają zasadność stosowania agregacji optycznej do oceny *in vitro* przeciwplatekownych właściwości preparatów polifenolowych, dodatkowo wskazując na celowość równoległego wykorzystania agregometrii impedancyjnej i z wykorzystaniem analizatora Multiplate.

Jednoczesne zastosowanie obu metod będzie szczególnie przydatne we wstępnej, szybkiej ocenie antyagregacyjnych właściwości preparatów, przed rozpoczęciem właściwych badań przedklinicznych wykorzystujących bardziej zaawansowane technologie.

Piśmiennictwo

1. Retelny VS, Neuendorf A, Roth JL. Nutrition protocols for the prevention of cardiovascular disease. *Nutr Clin Pract* 2008; 23:468-76. 2. Petrovski G, Gurusamy N, Das DK. Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215:22-33. 3. Olas B, Wachowicz B, Tomczak A i wsp. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* *in vitro*. *Platelets* 2008; 19:70-7. 4. Nardini M, Natella F, Scaccini C. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets* 2007; 18:224-43. 5. Lutomski J, Mścisz A. Znaczenie

prewencyjne związków polifenolowych zawartych w winogronach. *Post Fitoter* 2003; 1:6-10. 6. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523-6. 7. Keevil JG, Osman HE, Reed JD i wsp. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000; 130:53-6. 8. Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* 2009; 139:1788S-93S. 9. Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G i wsp. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *J Nutr* 2008; 138:1602-8. 10. Freedman JE, Parker C, Li L i wsp. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001; 103:2792-8. 11. Wolski T, Kalisz O, Prasał M i wsp. Aronia czarnoowocowa – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Eliot – zasobne źródło antyoksydantów. *Post Fitoter* 2007; 3:145-54. 12. Ryszawa N, Kawczynska-Drozd A, Pryjma J i wsp. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57:611-26. 13. Luzak B, Golanski J, Rozalski M i wsp. Extract from *Aronia melanocarpa* fruits potentiates the inhibition of platelet aggregation in the presence of endothelial cells. *Arch Med Sci* 2010; 6:141-4. 14. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 2008; 74:1625-34. 15. Putter M, Grotemeyer KH, Wurthwein G i wsp. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. *Thromb Res* 1999; 95:155-61. 16. Golanski J, Muchova J, Golanski R i wsp. Does pycnogenol intensify the efficacy of acetylsalicylic acid in the inhibition of platelet function? *In vitro* experience. *Post Hig Med Dośw* 2006; 60:316-21. 17. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40:158-68. 18. Saluk-Juszczak J. Anthocyanins as components of functional food for cardiovascular risk prevention. *Post Hig Med Dośw* 2010; 64:451-8. 19. Torres-Urrutia C, Guzman L, Schmeda-Hirschmann G i wsp. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic activity *in vitro* of extracts from selected fruits and vegetables. *Blood Coagul Fibrinol* 2011; 22:197-205. 20. Bucki R, Pastore JJ, Giraud F i wsp. Flavonoid inhibition of platelet procoagulant activity and phosphoinositide synthesis. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1820-8. 21. Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M i wsp. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1079-88. 22. Koleckar V, Brojerova E, Rehakova Z i wsp. *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug Chem Toxicol* 2008; 31:27-35. 23. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine and its reversal. *Nature* 1962; 195:927-35. 24. Singh I, Mok M, Christensen AM i wsp. The effects of polyphenols in *Olive* leaves on platelet function. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18:127-32. 25. Jantan I, Raweh SM, Sirat HM i wsp. Inhibitory effect of compounds from *Zingiberaceae* species on human platelet aggregation. *Phytomed* 2008; 15:306-9. 26. Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE i wsp. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *J Nutr* 2002; 132:3592-8. 27. Heptinstall S, May J, Fox S i wsp. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent *in vitro* and *ex vivo* studies in healthy adults. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47 (Suppl 2):S197-S205. 28. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D i wsp. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thromb Res* 2002; 106:191-7. 29. Toth O, Calatzis A, Penz S i wsp. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96:781-8.

- 30.** Jilma-Stohlawetz P, Horvath M, Eichelberger B i wsp. Platelet function under high-shear conditions from platelet concentrates. *Transfusion* 2008; 48:129-35. **31.** Olas B, Wachowicz B, Nowak P i wsp. Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59:823-35. **32.** Boncler M, Luzak B, Rozalski M i wsp. Acetylsalicylic acid is compounding to antiplatelet effect of C-reactive protein. *Thromb Res* 2007; 119:209-16.

otrzymano/received: 14.10.2011
zaakceptowano/accepted: 07.01.2012

Adres/address:
*dr hab. Jacek Golański
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
KDL, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź
tel.: +48 (42) 639-34-71
e-mail: jacek.golanski@umed.lodz.pl