

Preparat polifenolowy o działaniu przeciwplatekcyjnym, sposób jego wytwarzania, środek farmaceutyczny, dodatek żywieniowy oraz zastosowanie preparatu polifenolowego o działaniu przeciwplatekcyjnym.

Przedmiotem wynalazku jest preparat polifenolowy o działaniu przeciwplatekcyjnym, sposób jego wytwarzania, środek farmaceutyczny, dodatek żywieniowy oraz zastosowanie preparatu polifenolowego o działaniu przeciwplatekcyjnym.

Pozytywny wpływ związków polifenolowych pochodzenia roślinnego na układ krążenia opisywany jest w licznych pracach przeglądowych (Janeczko, 2004; Peluso, 2006; Rimbach i wsp., 2007; Stangl i wsp., 2007). Różnorodne właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne oraz ich wielokierunkowa aktywność biologiczna jest wynikiem bardzo zróżnicowanej struktury związków polifenolowych. Związki te wykazują aktywność antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwalergiczną, antyhepatotoksyczną, antymutagenną, przeciwnowotworową i przeciwmiażdżycową (Williamson i Manach, 2005; Manach i wsp., 2005). Ze względu na wielokierunkowe ochronne działanie polifenoli wobec układu krążenia, coraz częściej rozpatrywane jest opracowanie nowej profilaktyki i strategii leczenia w chorobach sercowo-naczyniowych z zastosowaniem polifenoli roślinnych (Peluso, 2006). Flawonoidy są z powodzeniem wykorzystywane w chorobach układu krążenia, powszechnie znane są wieloskładnikowe preparaty, takie jak rutinokorbin czy detralex (Janeczko, 2004).

Wśród polifenoli wykazujących bioaktywność wymienia się prenyloflawonoidy, obecne w ekstraktach z szyszek chmielu, a w szczególności chalkony, np. ksantohumol i desmetyloksantohumol. Desmetyloksantohumol jest prekursorem 8-prenyloaringeny, wykazującej działanie estrogenne silniejsze od innych znanych fitoestrogenów (Milligen et al., 1999). Ksantohumol jest natomiast prekursorem izoksantohumolu, który wykazuje działanie antyproliferacyjne o

niezwykle szerokim spektrum mechanizmów inhibicji na etapie inicjacji, promocji i progresji karcenogenezy (Gerhauser et al. 2002).

Wykorzystanie aktywności biologicznej chalconów zawartych w szyszkach chmielu stało się przedmiotem badań, przy czym badania te nakierowane są na pozyskanie sposobów umożliwiających zwiększenie ilości prenyloflawonoidów zawartych w ekstraktach z chmielu lub opracowanie metod pozwalających na uzyskiwanie określonych kompozycji określonych prenyloflawonoidów wykazujących pożądane właściwości.

Zgłoszenie patentowe EP1543834 ujawnia sposób wytwarzania ekstraktów z chmielu o zwiększonej ilości prenyloflawonoidów lub ich pochodnych posiadających aktywność estrogeną oraz antyproliferacyjną. W ujawnionym sposobie, produkt z chmielu poddaje się reakcji izomeryzacji w obecności zasady, co sprzyja zwiększeniu ilości 8-prenyloaringeny w produkcie, zapewniając wielokrotne zwiększenie aktywności estrogennej preparatu w ten sposób otrzymanego. Jednocześnie, ze względu na proliferacyjne właściwości 8-prenyloargeny, zgłaszający podkreślili znaczenie odpowiedniego nadmiaru ksantohumolu w kompozycji uzyskanej ujawnionym sposobem.

Amerykańskie zgłoszenie patentowe US2005/0042318 ujawnia ekstrakt z chmielu zawierający zwiększoną ilość prenylochalconów, znajdujący zastosowanie w leczeniu lub profilaktyce chorób związanych z deficytem estrogeny.

Sposób uzyskiwania związków aktywnych o właściwościach estrogennych z szyszek chmielu został ujawniony w WO83.00701 A1. Ekstrakt z użyciem dwutlenku węgla z szyszek chmielu traktuje się wodą jako czynnikiem azeotropującym, a następnie estrogenne związki aktywne uzyskuje się poprzez ekstrakcję z użyciem eteru lub metod chromatograficznych.

Niemieckie zgłoszenie patentowe EP 199 39 350 A1 ujawnia ekstrakt z chmielu cechujący się zwiększoną zawartością ksantohumolu, ilość w ekstrakcie

prenylonaringeniny jest nieokreślona. Wskazane zastosowanie ujawnionego ekstraktu to dodatek do piwa i soków owocowych.

Chociaż ujawnienia ze stanu techniki wskazują na korzystne właściwości prenyloflawonoidów zawartych w ekstraktach z chmielu, to jednocześnie ze stanu techniki wynika, iż znane ekstrakty z chmielu, ze względu na proliferacyjne właściwości 8-prenylnaringeniny, muszą posiadać odpowiedni składnik antyproliferacyjny, np. nadmiar ksantohumolu. Jednocześnie zawartość w ekstrakcie związków lipofilnych utrudnia liofilizację preparatów tego typu.

Celem wynalazku jest opracowanie preparatu polifenolowego o nowych właściwościach znajdującego zastosowanie w wytwarzaniu środków farmaceutycznych mających zastosowanie do leczenia i profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych oraz dodatków żywieniowych o działaniu ochronnym na układ sercowo-naczyniowy. Celem wynalazku jest również opracowanie sposobu otrzymywania takiego preparatu.

W wyniku badań, twórcy wynalazku stwierdzili, iż odtłuszczony ekstrakt z wychmielin, tj. odpadów chmielowych, wykazuje nieoczekiwane działanie przeciwpłytkowe.

Przedmiotem wynalazku jest preparat polifenolowy o działaniu przeciwpłytkowym charakteryzujący się tym, że zawiera odtłuszczony ekstrakt z wychmielin.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania preparatu polifenolowego o działaniu przeciwpłytkowym charakteryzujący się tym, że rozdrobnione wychmieliny poddaje się co najmniej jednokrotnej ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym, korzystnie w temperaturze pokojowej, uzyskany ekstrakt sączy się, a następnie usuwa rozpuszczalnik organiczny, po czym z otrzymanego wodnego ekstraktu usuwa się związki lipofilne i ewentualnie uzyskany ekstrakt następnie zatęża się i liofilizuje.

Korzystnie w sposobie według wynalazku, jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się aceton, korzystnie 70% wodny roztwór acetonu.

Również korzystnie w sposobie według wynalazku, wspomniane związki lipofilne usuwa się poprzez ekstrakcję chloroformem, korzystnie w stosunku objętościowym 1:1.

Przedmiotem wynalazku jest również środek farmaceutyczny o działaniu przeciwplateczkowym zawierający substancję czynną oraz ewentualnie środki pomocnicze charakteryzujący się tym, że jako substancję czynną zawiera odtłuszczony ekstrakt z wychmielin.

Przedmiotem wynalazku jest również dodatek żywieniowy dla ludzi lub zwierząt, znamienny tym, że zawiera odtłuszczony ekstrakt z wychmielin.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie odtłuszczonego ekstraktu z wychmielin do wytwarzania leku do leczenia lub profilaktyki chorób układu krążenia u ludzi lub zwierząt, przy czym leczenie i/lub profilaktyka wspomnianych chorób związana jest z agregacją płytek krwi.

Korzystnie w zastosowaniu według wynalazku wymienionymi chorobami są: miażdżyca, choroba niedokrwienna serca, choroby aorty i naczyń obwodowych, choroby żył obwodowych, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie odtłuszczonego ekstraktu z wychmielin do wytwarzania dodatku żywieniowego o przeznaczeniu dla ludzi lub zwierząt.

Przez wychmieliny rozumie się stały odpad poprodukcyjny, powstający podczas produkcji olejku chmielowego używanego w piwowarstwie w wyniku ekstrakcji szyszek chmielowych. Wychmieliny są uciążliwym, pylistym odpadem, którego utylizacja jest ważnym problemem ze względu na zanieczyszczenie środowiska. Są to odpady, które nie mogą być odprowadzane do systemów kanalizacyjnych jako ścieki, ponieważ powodują ich blokadę.

Przez odtłuszczony ekstrakt z wychmielin rozumie się ekstrakt z którego usunięte zostały związki lipofilne, w tym prenyloflawonoidy.

Preparat o działaniu przeciwplateczkowym oznacza preparat hamujący reaktywność płytek krwi. Znane w stanie techniki metody pozwalające na określenie

aktywności przeciwplatekowej preparatu to metoda agregacji turbidymetrycznej lub agregacji impedancyjnej.

Sposób otrzymywania preparatu zgodnie z wynalazkiem polega na ekstrakcji polifenoli z wychmielin poprzez co najmniej jednokrotną ekstrakcję przy użyciu rozpuszczalnika organicznego. Odpowiedni rozpuszczalnik wybiera się z grupy alkoholi oraz ich wodnych roztworów, ketonów oraz ich wodnych roztworów bez lub z dodatkiem kwasu nieorganicznego lub organicznego, oraz mieszanin wymienionych rozpuszczalników. Rozpuszczalnikiem korzystnym w sposobie według wynalazku jest rozpuszczalnik o średniej polarności, jakim jest np. aceton. W przypadku ekstrakcji wychmielin, korzystne z punktu widzenia wydajności procesu okazało się zastosowanie trzykrotnej ekstrakcji 70% wodnym roztworem acetonu w temperaturze pokojowej, przy zastosowaniu 10-krotnego nadmiaru ekstrahenta w stosunku do ilości substratu. Ekstrakcję prowadzono z zastosowaniem mieszania, po czym ekstrakty odsączano oraz zatężano aż do usunięcia rozpuszczalnika organicznego. Z tak uzyskanego ekstraktu usuwa się związki lipofilne. Można to osiągnąć na przykład poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikiem takim jak chloroform, przy czym odtłuszczony ekstrakt wodny zatęży się następnie w celu usunięcia pozostałości chloroformu. Dobre efekty osiągnąć można również stosując w miejsce chloroformu inne rozpuszczalniki niepolarne, takie jak heksan. Tak otrzymany preparat ewentualnie poddaje się liofilizacji i przechowuje bez dostępu światła w temperaturze 4⁰ C, w szczelnych opakowaniach. Zawartość polifenoli ogółem wynosi średnio 240 mg/g preparatu w przeliczeniu na kwas galusowy. Przez zawartość polifenoli ogółem w przeliczeniu na kwas galusowy rozumie się zawartość oznaczoną zgodnie z metodą oznaczania zawartości związków polifenolowych Folina-Ciocalteu (Bordonaba i Terry 2008).

Badania agregacji płytek metodą impedancyjną oraz metodą agregometrii optycznej wodnych roztworów liofilizatu preparatu polifenolowego, przeprowadzone zarówno u zdrowych ochotników, jak i u pacjentów przyjmujących profilaktycznie kwas acetylosalicylowy (ASA), wykazały wysoką aktywność przeciwplatekową preparatu w obu badanych grupach, przy czym

większą aktywność stwierdzono u pacjentów przyjmujących ASA. Preparat może więc znaleźć zastosowania w leczeniu i profilaktyce schorzeń, których leczenie i profilaktyka związana jest z oddziaływaniem na agregację płytek krwi. Wykazana aktywność przeciwplatekowa preparatu według wynalazku w odniesieniu do agregacji indukowanej dwufosforanem adenozy (ADP) stanowi bardzo korzystną właściwość preparatu. Taki profil aktywności umożliwia bowiem zastosowanie preparatu jako środka wspomagającego klasyczne leczenie przeciwplatekowe małymi dawkami kwasu acetylosalicylowego u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca.

Wieloparametrowe badania cytotoksyczności wskazały jednocześnie, iż preparat według wynalazku nie jest substancją cytotoksyczną.

Preparat według wynalazku można stosować jako substancję czynną z grupy środków farmaceutycznych o działaniu przeciwplatekowym w połączeniu z konwencjonalnie stosowanymi w praktyce farmaceutycznej dopuszczalnymi dodatkami znanymi ze stanu techniki, przy czym preparat można poddawać znanym sposobom pozwalającym na nadanie postaci stałych lub płynnych kompozycji farmaceutycznych, które można podawać drogą doustną lub pozajelitową. Stężenie preparatu we krwi/osoczu wykazujące pożądane właściwości przeciwplatekowe to 7,5 – 15 µg/ml w przeliczeniu na kwas galusowy. W poszczególnych przypadkach dawka może być odpowiednio dostosowana przez fachowca w dziedzinie do wielkości odpowiadającej szczególnemu zastosowaniu, przy czym wykonane badania cytotoksyczności preparatu wskazują, iż preparaty według wynalazku zawierające ilość polifenoli ogółem mniejszą niż 30 µg/ml przygotowanego roztworu nie wykazują cytotoksyczności. Ze względu na swoje działanie przeciwplatekowe, preparat może również znaleźć zastosowanie przy wytwarzaniu dodatków żywieniowych (suplementów diety), w szczególności wskazanych do podawania u osób z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych wg SCORE (Systemic Coronary Risk Evaluation) >5% (chorzy podwyższonego ryzyka) i < 10% (chorzy podwyższonego ryzyka ze wskazaniami do zastosowania ASA w ramach prewencji pierwotnej). Przez SCORE rozumie się skalę ryzyka SCORE. Jest to narzędzie służące do oceny indywidualnego

ryzyka zgonu z powodu chorób układu krążenia w ciągu następnych 10 lat na podstawie czynników ryzyka występujących u danej osoby. Skala została opracowana przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne.

W przypadku zastosowania preparatu według wynalazku do wytwarzania dodatku żywieniowego, możliwy jest dodatek znanych w przemyśle spożywczym materiałów pomocniczych, a ich właściwości i ewentualny dobór w celu wytworzenia odpowiedniej kompozycji jest dobrze opisany w literaturze i nie wykacza poza rutynowe działanie fachowca w danej dziedzinie.

Obok korzystnych właściwości jakie wykazuje preparat, dodatkowo dzięki odłuszczeniu pozbawiony wykazującej proliferacyjne i estrogenne właściwości prenyloargeniny, zaletą rozwiązań według wynalazku jest również prostota procesu otrzymywania preparatu, łatwa dostępność oraz niski koszt surowca podstawowego, stanowiącego w istocie uciążliwy materiał odpadowy.

Poniżej przedstawiono opis załączonych figur:

Fig 1. przedstawia krzywą kalibracyjną do oznaczania polifenoli metodą Folina-Ciocalteu

Fig. 2 przedstawia krzywą kalibracyjną do oznaczania zawartości katechiny
Rozwiązanie według wynalazku zostało przedstawione w sposób bardziej szczegółowy w przykładach realizacji wynalazku zamieszczonych poniżej. Poniższe przykłady w żaden sposób nie ograniczają zakresu wynalazku.

Przykłady

Przykład 1

1. Otrzymywanie preparatu polifenolowego z wychmielin

Naważkę rozdrobnionych wychmielin, poddano procesowi trzykrotnej ekstrakcji 70% roztworem acetonu w temperaturze pokojowej w czasie 30 minut (I ekstrakcja) oraz 15 minut (II i III ekstrakcja). Stosowano każdorazowo 10-cio krotny nadmiar ekstrahenta w stosunku do masy surowca (v/w). Ekstrakcję prowadzono z zastosowaniem mieszadła magnetycznego. Uzyskane ekstrakty sączono. W kolejnym etapie, połączone ekstrakty, zatężono 6-krotnie na wyparce próżniowej w temperaturze <math><40\text{ }^\circ\text{C}</math> w celu usunięcia rozpuszczalnika

organicznego. Uzyskany wodny ekstrakt następnie 4-krotnie ekstrahowano chloroformem (1:1, v/v) celem usunięcia związków lipofilnych. Odtłuszczony ekstrakt wodny następnie około 2-krotnie zatężano w celu usunięcia pozostałości chloroformu i liofilizowano. Rozdrobniony stały preparat polifenolowy do czasu analizy przechowywano w zamkniętych szklanych naczyniach w temperaturze 4°C bez dostępu światła

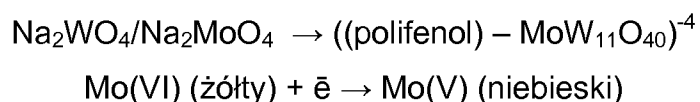
2. Przygotowanie roztworu podstawowego

W celu dokonania analizy otrzymanego preparatu polifenolowego, roztwór podstawowy do analizy przygotowano w następujący sposób: odważono 20 mg preparatu polifenolowego i rozpuszczono w 10 cm³ 10% wodnego roztworu dimetylosulfotlenku (DMSO), a następnie próbki wstawiano na 5 minut do łaźni ultradźwiękowej. Tak przygotowany roztwór poddano analizie na oznaczenie zawartości związków polifenolowych,

3. Oznaczanie zawartości związków polifenolowych metodą Folina–Ciocalteu'a [Bordonaba i Terry, 2008]

Metoda ta oparta jest na właściwościach redukujących związków polifenolowych. Odczynnik Folina–Ciocalteu'a zawiera kompleks związków wolframowo–molibdenowych (H₃PW₁₂O₄₀ i H₃PMo₁₂O₄₀), które przy utlenianiu polifenoli przechodzą w niebiesko zabarwione formy tlenowe (W₈O₂₃ i Mo₈O₂₃), posiadające maksimum absorpcji przy 760 nm.

Intensywność barwy jest proporcjonalna do ilości występujących w roztworze substancji fenolowych.



Oznaczenie wykonano w następujący sposób:

Próba właściwa: 10 cm³ wody destylowanej,
0,2 – 2 cm³ roztworu próby badanej,
0,5 cm³ odczynnika Folina–Ciocalteu'a,

5 cm³ 20% Na₂CO₃.

Całość uzupełniano wodą do 50 cm³.

Próba odniesienia nie zawierała próby badanej. Po 20 min mierzono absorbancję próby właściwej wobec próby odniesienia przy długości fali 760 nm. Zawartość polifenoli wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej przedstawionej na Fig. 1, do sporządzenia której użyto metanolowego roztworu kwasu galusowego o stężeniu 0,2 mg/cm³.

4. Oznaczanie zawartości flawanoli metodą wanilinową [Swain-Hillis, 1959]

Preparat podstawowy otrzymany zgodnie z pkt. 2 Przykładu 1 przebadano na zawartość flawanoli zgodnie z poniżej przedstawioną metodyką.

Metoda wanilinowa oparta jest na reakcji waniliny z monomerami i polimerami katechin. Charakterystyczna czerwona barwa jest stabilna w środowisku 70% H₂SO₄ i posiada maksimum absorpcji przy $\lambda = 500$ nm.

Wykonanie oznaczenia:

Przygotowano następujące próby:

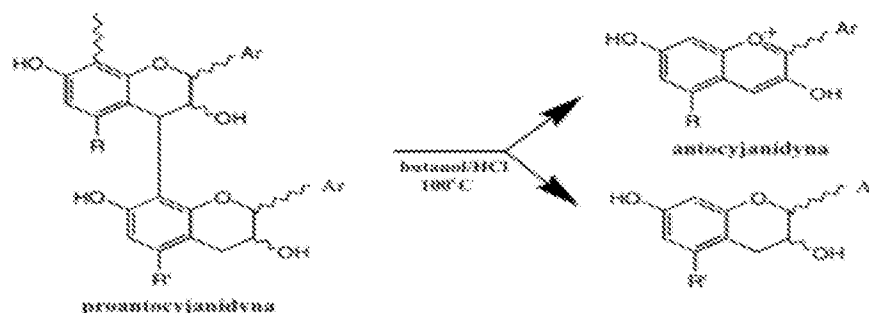
- a - 0,2–0,4 cm³ badanego roztworu podstawowego rozcieńczonego 5 razy dopełniano wodą destylowaną do 2 cm³ i dodawano 4 cm³ odczynnika wanilinowego (1 g waniliny w 100 cm³ 70% H₂SO₄),
- b - 0,2–0,4 cm³ badanego roztworu podstawowego rozcieńczonego 5 razy dopełniano wodą destylowaną do 2 cm³ i dodawano 4 cm³ 70% H₂SO₄,
- c - do 2 cm³ wody destylowanej dodawano 4 cm³ odczynnika wanilinowego,
- d - do 2 cm³ wody destylowanej dodawano 4 cm³ 70% H₂SO₄,

Próby umieszczano w zimnej łaźni wodnej, aby ich temperatura nie przekroczyła 35 °C. Po 15 minutach mierzono absorbancję prób a, b, c względem próby d przy $\lambda=500$ nm. Z krzywej wzorcowej odczytywano stężenie katechiny w próbce, odpowiadające absorbancji $A = A_a - (A_b + A_c)$.

Do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto wodnego roztworu (+)katechiny o stężeniu 0,05 mg/cm³. Krzywą zależności absorbancji $A = A_a - (A_b + A_c)$ w funkcji stężenia (+) katechiny przedstawiono na Fig 2.

5. Oznaczenie proantocyjanidyn [Rösch *et al.*, 2003]

Preparat podstawowy otrzymany zgodnie z pkt. 2 Przykładu 1 przebadano na obecność proantocyjanidyn zgodnie z poniżej przedstawioną metodą. Procyjanidyny ogrzewane w temperaturze 100°C w środowisku zakwaszonego kwasem solnym butanolu ulegają depolimeryzacji i utlenieniu do odpowiednich barwnych antocyjanidyn.



Wykonanie oznaczenia:

Do 0,2-0,4 cm³ roztworu podstawowego uzupełnionego do 0,4 cm³ 10% DMSO dodano 9,6 cm³ mieszaniny zawierającej butanol i stężony kwas solny (9:1, v/v). Następnie próby ogrzewano 90 min we wrzącej łaźni wodnej. Po oziębieniu próby przesączono, uzupełniono do objętości 10 cm³ i zmierzono absorbancję (A) przy długości fali $\lambda = 550$ nm wobec mieszaniny butanol/HCl. Zawartość proantocyjanidyn przeliczono na cyjanidynę stosując molowy współczynnik absorpcji $\varepsilon = 17360$ dm³/mol*cm.

Stężenie cyjanidyny w mieszaninie reakcyjnej obliczono z zależności:

$$C_{\text{cyjanidyny}} = 0,0165 A \text{ [mg/cm}^3\text{]}$$

6. Charakterystyka polifenoli w otrzymanych preparatach z wychmielin

Poniżej przedstawiona tablica 1 zawiera dane pochodzące z oznaczeń zawartości 9 preparatów otrzymanych z wychmielin sposobem według wynalazku. W tablicy przedstawiono zawartość polifenoli ogółem (oznaczoną zgodnie z pkt. 3 niniejszego przykładu), flawanoli (oznaczonych zgodnie z pkt. 4

niniejszego przykładu) oraz proantocyjanidyn oznaczonych zgodnie z pkt. 5 niniejszego przykładu).

Tablica 1. Zawartość polifenoli w preparacie wychmielin

Nr preparatu	Zawartość (mg/g preparatu)		
	Polifenole ogółem	Flawanole	Proantocyjanidyny
1	232,99 ± 21,62	119,83 ± 5,78	93,40 ± 4,37
2	244,83 ± 15,34	121,41 ± 2,64	87,82 ± 4,17
3	247,24 ± 14,63	126,10 ± 5,25	98,47 ± 3,04
4	198,50 ± 10,33	85,18 ± 3,20	81,09 ± 3,19
5	229,55 ± 5,67	100,10 ± 3,67	96,64 ± 7,16
6	242,59 ± 13,38	123,01 ± 7,06	95,91 ± 6,73
7	258,07 ± 11,03	134,85 ± 3,42	99,23 ± 8,07
8	252,82 ± 17,26	121,01 ± 5,85	87,11 ± 2,20
9	248,41 ± 2,94	127,09 ± 5,08	106,03 ± 3,45
średnia	239,44 ± 17,75	117,62 ± 15,32	93,97 ± 7,54

Przykład 2

1. Przygotowanie badanych preparatów polifenolowych.

Do badania włączono ekstrakty otrzymane z dwóch niezależnych preparatyk przeprowadzonych zgodnie ze sposobem opisanym w pkt. 1 przykładu 1. Badane preparaty z wychmielin oznaczone zostały w niniejszym przykładzie jako EO4(1) oraz EO4(2). Do każdego cyklu badań przygotowano roztwór roboczy preparatu polifenolowego EO4 o stężeniu w przeliczeniu na kwas galusowy 1,5 mg/ml w 10% DMSO. Roztwór sporządzono zgodnie z poniżej przedstawionym schematem:

- 7,5 mg liofilizowanego ekstraktu polifenolowego rozpuszczano w 1000 µl uprzednio sporządzonego roztworu (PBS bez Ca i Mg z dodatkiem DMSO do końcowego stężenia 10%). Tak sporządzony roztwór stanowił roztwór wyjściowy.

- roztwór wyjściowy następnie wytrząsano 1 min. (850 rpm, 37°C) i 15 min. (500 rpm, 37°C)
- roztwór następnie odwirowano (5 min., 9200 g)
- w przypadku obecności osadu do dalszych testów ściągano supernatant
- roztwory, w których nie wystąpił osad oraz supernatanty rozcieńczano tak, aby ostateczne stężenie kwasu galusowego w roztworach wynosiło 1,5 mg/ml

2. Badana populacja

Badania wpływu preparatów polifenolowych na funkcję płytek były prowadzone na zdrowych ochotnikach (Zespół 1) oraz chorych na choroby sercowo-naczyniowe, po zabiegu chirurgicznego leczenia choroby niedokrwiennej serca, przyjmujących przewlekle kwas acetylosalicylowy (ASA) w dawce 150 lub 75 mg ASA na dobę (Zespół 2). Zastosowanie takiego podejścia i podziału pracy pomiędzy Zespołami ma uzasadnienie merytoryczne (potencjalne różnice w odpowiedzi pomiędzy zdrowymi dawcami i pacjentami na terapii ASA). Założono stosowanie takich samych procedur i protokołów przez oba Zespoły (z wyjątkiem badania wpływu polifenoli na agregację wywoływaną przez kwas arachidonowy (AA) u pacjentów przyjmujących ASA).

Krew pobierana była z zastosowaniem zestawów firmy Sarstedt. Antykoagulant dobierano w zależności od metody analizy funkcji płytek krwi. Do badania agregacji metodą optyczną zastosowano 3,2% buforowany cytrynian sodowy. Do badania agregacji metodą impedancyjną - hirudynę Refluidan® (25 ug/ml). W obu przypadkach zachowano proporcję krew: antykoagulant wynoszącą 9:1.

Pobieranie krwi było poprzedzone wyrażeniem pisemnej zgody osoby na badania (po wyjaśnieniu celu i charakteru badania). Na przeprowadzenie eksperymentu została wydana zgoda Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi numer RNN/13/07/KB z dnia 16.01.2007 r.

3. Schemat badania

Badaniu działania preparatu polifenolowego poddawane były próbki krwi od zdrowych dawców i pacjentów po interwencjach wieńcowych przyjmujących długotrwanie ASA. Zastosowana metodyka badania to badania sparowane z randomizacją ze stratyfikacją (losowanie pozycji próbek w agregometrze dla z góry założonego panelu stężeń).

Zarówno dla metody impedancyjnej jak i metody turbidymetrycznej jako jednostkę obserwacyjną zastosowano parametr określony jako wynik agregacji (Aggregation Score – AS)

$$AS = \text{maksymalna agregacja (Amax)} \times \text{pole pod krzywą (AUC)}$$

Szacowanie wielkości próby wykonano na podstawie parametru agregacji maksymalnej (Amax), przyjmując:

Poziom istotności = 0,05

Moc testu = 0,8

Zastosowano test t-Studenta dla prób zależnych.

Oznaczenia wykonywano w układzie sparowanym (pomiar przed i po podaniu testowanego związku). Skuteczność inhibicyjna flawonoidów jest niska i oszacowano ją na 10%. Przyjęto 10% zmienność pomiarową. Po przyjęciu takich warunków minimalna liczba powtórzeń wynosi 16 osób dla każdego badanego preparatu (16 zdrowych dawców i 16 chorych na choroby sercowo-naczyniowe).

4. Metody badania agregacji płytek krwi

A/ Badanie agregacji płytek krwi metodą agregometrii optycznej (LTA)

Agregacja optyczna uznawana jest za tak zwany złoty standard wśród metod badających reaktywność płytek krwi. Opiera się na monitorowaniu i rejestrowaniu zmian w transmitancji światła padającego na próbkę osocza bogatopłytkowego, które zachodzą w trakcie agregacji płytek krwi w odpowiedzi na agonistę.

Osocze bogatopłytkowe (PRP) otrzymano przez odwirowanie pełnej krwi pobranej na cytrynian sodu (250xg, 6 min). Supernatant ściągnięto i pozostałość

wirowano ponownie (2000xg, 10 min). Do badań wykorzystano PRP o mianie płytek $200 \times 10^9/L$.

Stężenia preparatu EO4 w próbie wynosiły 7,5 i 15 $\mu g/ml$ w przeliczeniu na kwas galusowy, zaś jako agonistę zastosowano 5 i 10 $\mu mol/L$ ADP. Czas inkubacji osocza z preparatem wynosił 10 min (w temperaturze $37^\circ C$). Pomiar prowadzono w układzie sparowanym. Próbę kontrolną stanowiło osocze bogatopłytkowe z odpowiednią ilością 10% DMSO. Agregację płytek krwi monitorowano przez 15 minut, za pomocą optycznego agregometru Chrono-Log 490-2D (Chrono-Log, Havertown, PA USA)

B/ Badanie agregacji płytek krwi metodą impedancyjną (MEA)

Aparat Multiplate (Dynabyte Medical) pozwala na ocenę funkcji płytek krwi we krwi pełnej w oparciu o zasady agregometrii 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.

Stężenia preparatu EO4 w próbach badanych wynosiły 7,5 i 15 $\mu g/ml$ w przeliczeniu na kwas galusowy. Krew z ekstraktem inkubowano przed pomiarem 15 min w temperaturze pokojowej. Pomiar agregacji prowadzono jednocześnie w 3 próbach, z czego jedna stanowiła kontrolę zaś dwie – próby badane zawierające różną ilość preparatu polifenolowego. Zgodnie z zaleceniem producenta, jako agonistę użyto 6,4 $\mu mol/L$ ADP, kolagen o stężeniu 3,2 $\mu g/ml$ oraz kwas arachidonowy o stężeniu 0,5 $\mu mol/L$. Czas pomiaru wynosił 15 min.

Statystyczna analiza danych

Dane przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy lub jako mediany i zakresy kwartylowe. W celu weryfikacji normalności rozkładu danych zastosowano test Shapiro-Wilka. Porównując dane nieodbiegające od rozkładu normalnego zastosowano jednostronny test t-Studenta dla danych sparowanych o rozkładzie normalnym, stosowano poprawkę Bonferroniego. Do opracowania danych o rozkładzie odbiegającym od normalnego stosowano test Wilcoxon. Wyniki zestawiono w poniższych tablicach, gdzie podano wyniki agregacji (AS) dla

poszczególnych stężeń preparatów (Stęż. EO4) jak również procent hamowania (% inh.) oraz poziom istotności (p).

Tablica 2. Wyniki hamowania agregacji we krwi pełnej (agonista kolagen)

Zespół 1 (zdrowi ochotnicy)							
Agonista	AS (kolagen 3,2/μg/ml)						
Stęż. EO4	0	7,5	% inh.	p	15	% inh	p
EO4(1)	1155,7 ±181,0	1022,5 ±106,6	5,6 ± 9,8	0,140	920,0 ± 76,1	15,0 ± 6,1	0,038
EO4(2)	1155,7 ± 181,0	974,0 ± 101,9	10,1 ± 10,2	0,0942	998,8 ± 67,8	4,7 ± 11,6	0,166
Zespół 2 (pacjenci z chorobami krążenia)							
EO4(1)	610,1 ± 97,5	447,5 ± 57,8	19,0 ± 9,1	0,0182	380,9 ± 57,7	30,0 ± 10,6	0,003
EO4(2)	634,9 ± 104,9	570,8 ± 74,8	0,3 ± 9,8	0,3538	429,6 ± 61,9	15,1 ± 17,1	0,179

Tablica 3. Wyniki hamowania agregacji płytek we krwi pełnej (agonista ADP)

Zespół 1 (zdrowi ochotnicy)							
Ago-nista	AS (ADP 6,4 μM)						
Stęż. EO4	0	7,5	% inh	p	15	% inh	p
EO4(1)	558,2 ± 48,0	532,8 ±86,1	4,7 ±12,9	0,3588	571,7 ± 74,4	-3,1 ± 11,2	0,4149
EO4(2)	558,2 ± 48,0	548,8 ± 88,1	1,0 ± 15,1	0,4531	626,0 ± 63,9	-14,7 ± 11,6	0,1548
Zespół 2 (pacjenci)							
EO4(1)	328,0 ± 107,6	181,7 ± 51,4	28,0 ± 14,7	0,0185	177,4 ± 57,3	10,6 ± 23,3	0,076
EO4(2)	337,0 ± 110,2	176,9 ± 51,2	28,3 15,3	0,0185	120,0 ± 38,3	44,3 ± 13,3	0,0071

Tablica 4. Wyniki hamowania agregacji we krwi pełnej (agonista kwas arachidonowy (AA) - W przypadku Zespołu 2 nie stosowano AA, gdyż byłoby to bezzasadne: pacjenci przyjmują ASA co skutkuje hamowaniem agregacji indukowanej kwasem arachidonowym.

Zespół 1 (zdrowi ochotnicy)							
Agonista	AS (AA 0,5 mM)						
Stęż. EO4	0	7,5	% inh	p	15	% inh	p
EO4(1)	652,5 ± 56,1	708,1 ± 63,6	-9,5 ± 6,5	0,1049	733,5 ± 118,3	-9,9 ± 8,9	0,19
EO4(2)	652,5 ± 56,1	694,8 ± 63,7	-6,8 ± 4,8	0,1165	609,9 ± 41,2	5,3 ± 3,9	0,08

Tablica 5 Wyniki hamowania agregacji w osoczu bogatopłytkowym (agonista ADP)

Zespół 1 (zdrowi ochotnicy)								
Ago-nista	AS (ADP 5 µM)							
Stęż. EO4	0	7,5	% inh	p	0	15	% inh	p
EO4(1)	37,8 ± 5,9	32,4 ± 10,7	17,1 ± 19,9	0,2188	48,7 ± 10,3	35,9 ± 14,5	27,6 ± 32,5	0,2176
EO4(2)	50,3 ± 9,8	31,2 ± 10,3	41,4 ± 20,8	0,0592	48,7 ± 10,3	27,8 ± 9,7	46,1 ± 17,5	0,063
Zespół 2 (pacjenci)								
EO4(1)	22,2 ± 4,1	6,4 ± 2,1	71,9 ± 5,4	0,0008	15,7 ± 3,6	7,8 ± 3,6	49,3 ± 25,3	0,065
EO4(2)	19,8 ± 3,9	8,8 ± 3,5	63,1 ± 11,2	0,002	17,1 ± 2,5	8,2 ± 2,7	54,1 ± 17,5	0,0113

Tablica 6 Wyniki hamowania agregacji w osoczu bogatopłytkowym (agonista ADP)

Zespół 1 (zdrowi ochotnicy)								
Ago-nista	AS (ADP 10 µM)							
Stęż. EO4	0	7,5	% inh	p	0	15	% inh	p
EO4(1)	51,8 ± 6,6	28,5 ± 9,3	50,8 ± 13,6	0,002	51,1 ± 7,3	38,7 ± 13,2	27,8 ± 22,9	0,1704

EO4(2)	52,7 ± 6,6	33,6 ± 9,6	39,1 ± 15,6	0,028	51,1 ± 7,3	33,7 ± 10,0	36,9 ± 19,1	0,057
Zespół 2 (pacjenci)								
EO4(1)	40,5 ± 7,9	12,0 ± 4,9	70,7 ± 8,1	0,003	26,0 ± 6,4	20,2 ± 4,6	16,3 ± 15,8	0,2272
EO4(2)	40,5 ± 7,9	12,1 ± 3,3	69,8 ± 7,4	0,003	28,3 ± 6,8	9,4 ± 1,9	59,3 ± 9,7	0,0195

Oba oceniane preparaty EO4(1) o EO4(2) posiadają zbliżoną, wysoką aktywność przeciwplatekową oraz podobny profil działania - przeciwplatekowa aktywność dotyczy głównie agregacji indukowanej ADP. Hamujący efekt preparatu na agregację indukowaną ADP jest nieznacznie wyższy u pacjentów pozostających na leczeniu ASA w porównaniu z grupą zdrowych dawców.

Przykład 3

Oznaczenie cytotoksyczności

Oznaczenie cytotoksyczności dla preparatu otrzymanego zgodnie ze sposobem opisanym w przykładzie 1 i oznaczanego w niniejszym przykładzie jako EO4 zostało wykonane w oparciu o wieloparametryczne zautomatyzowane badanie cytotoksyczności HCS „Cell health assay”, przy użyciu aparatu Thermo Scientific Cellomics® ArrayScan umożliwiającym automatyczną analizę mikroskopową, co pozwala na zbadanie uszkodzeń struktur komórkowych wywołanych przez analizowany preparat. Dzięki użyciu 3 barwników fluorescencyjnych (MitoTracker - Invitrogen, YO-PRO 1 – Invitrogen, Hoechst 33342 – Sigma) przeprowadzono ocenę wpływu badanych ekstraktów na rozmiar i morfologię jądra, integralność błony cytoplazmatycznej oraz aktywność mitochondriów. Testy przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych przy użyciu 5 linii komórkowych (HepG2, HMEC-1, A549, Caco-2, 3T3). Pomiary przeprowadzono przy użyciu automatycznej stacji pipetującej JANUS firmy Perkin Elmer. Preparat zbadano w 5 stężeniach, pomiary wykonano w duplikatach w 5 niezależnych powtórzeniach.

Na podstawie nieprzetworzonych danych eksperymentalnych przeprowadzono analizę statystyczną znamienności zaobserwowanych różnic w wartościach średnich dla trzech wybranych parametrów pomiarowych, mierzących natężenie

fluorescencji i powierzchnię wybarwioną w komórkach za pomocą barwników fluorescencyjnych. Wybrane parametry obrazują:

1. Powierzchnię jądra komórkowego (Hoechst (Sigma))
2. Akumulację barwnika YO-PRO1 (Invitrogen) wskazującą na uszkodzenie błony cytoplazmatycznej
3. Potencjał mitochondrialny (MitoTracker – Invitrogen)

Następnie statystycznie znamienne różnice dla każdego testowanego stężenia każdej substancji, które wskazują na zmiany morfologiczne i funkcjonalne w komórkach obrazujące działanie cytotoksyczne, przypisano wartości punktowe zgodnie z przedstawionym poniżej schematem oceny obserwowanych efektów.

Różnice podlegające punktacji :

1. Zmniejszenie lub zwiększenie powierzchni jądra
2. Wzrost akumulacji YO-PRO1
3. Spadek potencjału mitochondrialnego

Poniższa tablica 7 ilustruje przypisane wartości punktowe przyznawane badanym preparatom w teście „Cell health assay” .

Tablica 7. Wartości punktowe przyjęte w teście „Cell health assay”.

Zdarzenie	Punkty	Maksymalna liczba pkt.
Istotna różnica w jednej linii komórkowej	0.2 za każde zdarzenie	3
Ta sama różnica w więcej niż jednej linii komórkowej	1 za każdą kolejną linię	12
Więcej niż jedna różnica w jednej linii	1 za każdą kolejną różnicę	10

Poniżej przedstawiona tablica 8 ilustruje działanie cytotoksyczne preparatu polifenolowego (EO4) w oparciu o kumulatywny indeks cytotoksyczności obliczany dla każdej z badanych substancji na podstawie wyników uzyskanych w wieloparametrycznym pomiarze „cell health assay”

Tablica 8. Pomiar cytotoksyczności preparatu polifenolowego z zastosowaniem naringiny jako kontroli negatywnej oraz kaempferolu jako kontroli pozytywnej.

	5 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	40 µg/ml	50 µg/ml	Suma
Naringina	0,0	0,0	0,2	1,4	0,2	1,8
EO4	0,0	0,0	0,2	2,6	5,0	7,8
Kaempferol	2,6	1,4	8,4	8,4	6,2	27,0

Uzyskane wyniki wskazują, że badany preparat polifenolowy nie jest cytotoksyczny w stężeniach poniżej niż 30 µg/ml .