

Laboratoryjna ocena skuteczności działania różnych dawek kwasu acetylosalicylowego oraz przydatności roślinnych preparatów polifenolowych jako wspomaganie leczenia przeciwplateletowego u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego



The laboratory testing of different acetylsalicylic acid doses and the usefulness of plant polyphenol substances as antiplatelet supplementing therapy in patients after coronary artery bypass grafting surgery

Jacek Golański¹, Ryszard Golański², Wiktor Kuliczowski³, Cezary Watała¹

¹Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

²Katedra Kardiologii i Kardiochirurgii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

³Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrze

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2011; 8 (2): 175–182

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy płytki krwi pacjentów przyjmujących kwas acetylosalicylowy (ASA) w dawce 75 mg lub 150 mg na dobę wykazują istotne różnice w zakresie laboratoryjnej oceny skuteczności działania leku oraz czy preparaty polifenolowe pochodzenia roślinnego, dodawane do krwi chorych po operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. *coronary artery bypass grafting* – CABG) w odległym okresie pooperacyjnym (12–14 miesięcy) uzupełniają efektywność działania ASA.

Materiał i metody: Krew 55 chorych w wieku 63 lata \pm 8,4 roku, leczonych operacyjnie z powodu choroby wieńcowej, otrzymujących 75 (24 osoby) lub 150 (31 osób) mg ASA na dobę, inkubowana była z preparatami polifenolowymi Corvitin[®] lub Aronox[®]. Badano zdolność tych preparatów do nasilania skuteczności hamowania reaktywności płytek krwi przez ASA. Do oceny laboratoryjnej skuteczności działania ASA i preparatów polifenolowych na reaktywność płytek zastosowano metodę agregacji optycznej i generacji tromboksanu B₂ (TXB₂) w osoczu, metodę agregacji we krwi pełnej (ang. *whole blood aggregometry* – WBA) oraz pomiar stężenia TXB₂ w surowicy.

Wyniki: W pracy wykazano istotnie większe stężenie TXB₂ w surowicy pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg ASA niż w grupie leczonej dawką 150 mg ASA na dobę.

Wyniki pracy wskazują, że wspomagający przeciwplateletowy efekt działania preparatu polifenolowego Aronox[®] występuje jedynie u chorych przyjmujących dawkę 75 mg ASA na dobę.

Abstract

Aim: The aim of the study was to assess the differences in laboratory antiplatelet effect of two acetylsalicylic acid (ASA) doses, 75 mg/d and 150 mg/d, in cardiovascular patients at 12 to 14 months after coronary artery bypass grafting (CABG). The other objective was to explore the idea that plant-derived polyphenol substances could supplement and compound the antiplatelet effect of ASA.

Material and methods: The study included 55 patients (age 63.0 \pm 8.4 years) at 12-14 months after CABG, treated for that time with ASA at the dose of either 75 mg (24 pts) or 150 mg (31 pts) daily. The blood was incubated *in vitro* for 15 minutes with either Corvitin[®] or Aronox[®] to study their ability to block blood platelet reactivity. In order to investigate the antiplatelet effect of polyphenol substances we used optical aggregometry and TXB₂ generation in plasma. To investigate the low laboratory ASA effect we monitored whole blood aggregometry and serum TXB₂ concentration.

Results: We observed higher TXB₂ serum level in patients treated with 75 mg ASA/day in comparison with the 150 mg/d dose. Patients on a lower ASA dose had a higher rate of low laboratory ASA effect in comparison with patients on a higher ASA dose. We found that the antiplatelet effect of Aronox is present only in patients treated with the 75 mg ASA dose.

Conclusions: In conclusion, to increase the antiplatelet effect in patients after CABG treated with a 75 mg dose of ASA, it can be proposed either to increase the ASA dose to 150 mg per day

Adres do korespondencji: dr hab. Jacek Golański, Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź, tel. +48 42 639 34 71, e-mail: jacek.golanski@umed.lodz.pl

Wnioski: Wyniki uzyskane w omawianym badaniu *in vitro* sugerują, że nie ma potrzeby uzupełniania preparatami polifenolowymi leczenia pacjentów przyjmujących ASA w dawce 150 mg na dobę, a wskazane jest rozpatrzenie zwiększenia dawki 75 mg ASA na dobę lub zastosowania terapii łączonej (ASA + preparat polifenolowy) u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego.

Słowa kluczowe: kwas acetylosalicylowy, niska, oceniana laboratoryjnie skuteczność działania ASA (NOLS-ASA), choroba wieńcowa, zabieg pomstowania aortalno-wieńcowego, leczenie przeciwplatetkowe, roślinne polifenole.

Wstęp

Stale rośnie liczba doniesień na temat związku wysokiej reaktywności płytek krwi, pomimo przyjmowania przez chorych ASA, z występowaniem niekorzystnych zdarzeń naczyńowo-sercowych [1–4]. W pracy celowo zrezygnowano z określenia „oporność na aspirynę” (ang. *aspirin resistance* – AR), gdyż z powodu problemów ze ścisłym zdefiniowaniem zjawiska zaczęto stosować określenie resztkowa reaktywność płytek (ang. *residual platelet reactivity* – RPR) [5], lub wysoka reaktywność płytek krwi pomimo leczenia aspiryną (ang. *high on-aspirin platelet reactivity* – HAPR) [4]. W niniejszej pracy proponuje się przyjęcie określenia: niska, oceniana laboratoryjnie, skuteczność działania ASA (NOLS-ASA). Ten sposób przedstawienia ułatwia odróżnienie obserwacji laboratoryjnych od klinicznych, które nie muszą być w pełni ze sobą zgodne.

Niezależnie od zawości terminologicznych i typu obserwacji nie ma jednak przekonujących dowodów na rozwiązanie tego problemu poprzez zwiększanie dawek ASA [6, 7]. Aktualne zalecenia sugerują stosowanie u chorych po chirurgicznym leczeniu choroby niedokrwiennej serca dawek w zakresie 75–100 mg ASA na dobę [8]. Badania laboratoryjne reaktywności płytek krwi prowadzone we wczesnym okresie pooperacyjnym wykazują jednak, że u chorych przyjmujących dawki 325 mg ASA na dobę zahamowanie generacji tromboksanu i reaktywności płytek krwi jest istotnie wyższe niż w grupie przyjmującej 100 mg ASA [9].

Powyższe badania dotyczą jednakże wczesnego okresu pooperacyjnego. Pojedyncze doniesienia opisują zjawisko wysokiej reaktywności płytek krwi pomimo przyjmowania przez chorych ASA w okresie 1–6 miesięcy po wykonania zabiegu [10, 11], a brak jest doniesień na temat laboratoryjnej oceny skuteczności działania ASA w okresie dłuższym niż pół roku.

Biorąc pod uwagę bardzo wąski zakres zalecanych dawek ASA, należy rozważyć łączenie tego leku z innymi preparatami. Dobrze udokumentowana jest korzyść łączenia ASA z kłopidogrelem [12].

Zważywszy na ryzyko łączenia leków o silnym działaniu, coraz częściej analizowany jest pomysł wspomaganie klasycznego leczenia przez zastosowanie nutriceutyków, w tym preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego [13, 14]. W przypadku pacjentów operowanych z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego, zastosowanie prze-

or to consider the use of dual therapy: low dose ASA (75 mg) supplemented with polyphenol substances.

Key words: acetylsalicylic acid (ASA), low laboratory tested ASA efficacy, coronary disease, coronary artery bypass grafting (CABG) surgery, antiplatelet therapy, plant polyphenols.

ciwutleniaczy może mieć znaczenie ze względu na istotne zaburzenia równowagi redoks (stres oksydacyjny), rejestrowane we krwi tych pacjentów [15].

Liczne publikacje, opisujące korzyści dla pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, wynikające ze stosowania diety bogatej w roślinne polifenole [16–19], skłaniają do sprawdzenia hipotezy o możliwości zastosowania ich do wspomaganie leczenia małymi dawkami ASA.

Pierwszym krokiem w takich działaniach są zwykle badania aktywności przeciwplatetkowej wykonane w układzie *in vitro* [20, 21].

Niezależnie od modelu badania (*ex vivo* czy *in vitro*), do laboratoryjnej oceny skuteczności działania ASA zaleca się stosowanie metod agregometrycznych oraz oznaczania stężenia tromboksanu B₂ (TXB₂) w surowicy [5, 22]. Brak jest w dostępnym piśmiennictwie doniesień opisujących zastosowanie tych metod do laboratoryjnej oceny skuteczności działania ASA u chorych po upływie 6 miesięcy od operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. *coronary artery bypass grafting* – CABG). Co ważne, nie ma informacji o próbach zastosowania preparatów polifenolowych do uzupełniania/wspomagania leczenia przeciwplatetkowego w tej grupie pacjentów.

Cel pracy

Celem pracy była odpowiedź na pytania, czy płytki krwi pacjentów przyjmujących dawki ASA 75 mg lub 150 mg na dobę wykazują istotne różnice w laboratoryjnych wskaźnikach skuteczności działania leku oraz czy preparaty polifenolowe pochodzenia roślinnego, dodawane do krwi chorych po operacji CABG w odległym okresie pooperacyjnym (12–14 miesięcy), uzupełniają przeciwplatetkowe działanie przyjmowanego przez chorych kwasu acetylosalicylowego.

Materiał i metody

Z grupy 180 pacjentów (mężczyzn) leczonych operacyjnie z powodu choroby wieńcowej z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego w Klinice Kardiologii i Katedry Kardiologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i biorących udział w programach naukowych Kliniki wylosowano 30 pacjentów przyjmujących 75 mg ASA na dobę oraz 30 przyjmujących 150 mg ASA na dobę. Ostatecznie w badaniu wzięto udział 55 pacjentów, w wieku 63 lat \pm 8,4 roku:

24 przyjmujących 75 mg ASA i 31 przyjmujących 150 mg ASA na dobę. Charakterystyka pacjentów znajduje się w tabeli I.

Cześć chorych (5 osób) nie zgłosiła się na badania, a u kilku osób dawka ASA została zmieniona już po włączeniu do badania. U chorych oceniano występowanie nawrotów dolegliwości wieńcowych wymagających hospitalizacji (karta wypisowa ze szpitala z odnotowanym niekorzystnym zdarzeniem sercowym).

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej i zatwierdzonych przez Komitet ds. Etyki Badań Naukowych przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr RNN/13/07/KB).

Krew od pacjentów pobierana była do probówek zawierających buforowany 0,105 M cytrynian sodu (Vacutainer™, Becton Dickinson, Plymouth, UK) w stosunku objętościowym 1 : 9.

Pobieranie krwi odbywało się z zachowaniem szczególnej ostrożności w celu uniknięcia niepożądanego aktywacji płytek krwi. Wszystkie badania reaktywności płytek były wykonywane w ciągu 2 godz. od pobrania krwi od pacjenta.

W pracy zastosowano następujące preparaty polifenolowe rozpuszczone w 10-procentowym sulfotlenku dimetylu (ang. *dimethyl sulfoxide* – DMSO):

- Aronox® – ekstrakt z aronii czarnoowocowej [*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott] pochodził z firmy Adamed (Polska). Ekstrakt zawiera 60% polifenoli, w tym minimum 20% antocyjanów.
- Corvitine® – rozpuszczalny w wodzie kompleks kwercetyny z poliwinylpirolidonianem pochodził z firmy SIC „Borshchahivskiy Chemical-Pharmaceutical Plant” CJSC (Ukraina).

Krew lub osocze bogatopłytkowe inkubowano przed wykonaniem pomiaru przez 15 min w temperaturze pokojowej z preparatami o stężeniu 50 µg/ml.

Dobór metod badawczych

Do laboratoryjnej oceny działania ASA w dwóch grupach pacjentów przyjmujących 75 mg lub 150 mg ASA na dobę zastosowano metodę agregacji impedancyjnej z kwasem arachidonowym lub kolagenem jako agonistami oraz oznaczenia TXB₂ w surowicy.

Do oceny wpływu preparatów polifenolowych na płytki krwi zastosowano metodę agregacji optycznej wywołowaną ADP oraz test zahamowania indukowanej mechanicznie generacji tromboksanu (TX). W tym modelu eksperymentalnym powstaje głównie nietrwała forma tromboksanu A₂ (TXA₂). W osoczu (surowicy) po odwirowaniu oznaczana jest stabilna forma TX, czyli TXB₂.

Badanie agregacji płytek w pełnej krwi metodą impedancyjną

Agregacja płytek w pełnej krwi była badana metodą impedancyjną z zastosowaniem agregometru Chrono-Log 592 (USA). Jako agonistów wykorzystano kolagen (1 µg/ml) oraz kwas arachidonowy (0,5 mmol/l) (Chrono-Log, USA). Pomiary wykonywano zgodnie ze zmodyfikowanym proto-

Tab. I. Charakterystyka pacjentów

	75 mg ASA/dobę	150 mg ASA/dobę	Istotność statystyczna
liczba pacjentów	24	31	
czas od wykonania operacji [miesiące]	11,0 (6,0; 16,5)	9,0 (6,0; 15,0)	brak (*)
wiek [lata]	64,8 ± 7,9	61,5 ± 8,5	brak
nadciśnienie	18 (75%)	22 (71%)	brak (**)
dyslipidemia	3 (12,5%)	2 (6,5%)	brak (**)
cukrzyca	7 (29%)	12 (38%)	brak (**)
BMI [kg/m ²]	29,1 ± 3,9	29,3 ± 3,9	brak
płytki krwi [× 10 ⁹ /l]	170,0 ± 49,9	175,6 ± 47,4	brak
CRP [mg/l]	1,9 (1,0; 4,2)	1,5 (0,8; 2,4)	0,088 (*)
UNDW	2 (8,3%)	1 (3,2%)	brak (**)

Dane przedstawione są jako średnie ± odchylenie standardowe lub jako mediany i zakresy kwartylowe; BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index), CRP – białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein), UNDW – udokumentowany nawrót dolegliwości wieńcowych; do analizy istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta, U Manna-Whitneya () lub test dokładny Fishera (**).*

kołem firmy Chrono-Log. Krew (0,5 ml) była rozcieńczana w stosunku 1 : 1 solą fizjologiczną oraz inkubowana przez 10 min w temperaturze 37°C, po czym dodawano agonistów: kwas arachidonowy (AA; stężenie 0,5 mmol/l) lub kolagen (1 µg/ml). Po 6 min odczytywano wartość impedancji wyrażanej w Omach (Ω), odzwierciedlającej nasilenie agregacji płytek krwi.

Badanie agregacji płytek krwi metodą agregometrii optycznej

Osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma* – PRP) otrzymano przez odwirowanie pełnej krwi pobranej na cytrynian sodu z prędkością 1000 obr./min (250 × g) w czasie 6 min. Osocze ubogopłytkowe uzyskiwano po ponownym odwirowaniu pozostałej próbki z szybkością 4000 obr./min (2000 × g) w czasie 10 min. Do badań wykorzystano PRP o mianie płytek równym 200 × 10⁹/l.

Jako agonistę zastosowano 10 µmol/l difosforan adenyzy (ADP). Pomiary prowadzono w układzie sparowanym. Próbę kontrolną stanowiło osocze bogatopłytkowe z odpowiednią ilością 10% DMSO. Agregację płytek krwi monitorowano przez 10 min, za pomocą optycznego agregometru Chrono-Log 490-2D (Chrono-Log, Havertown, PA USA).

Oznaczenie tromboksanu B₂ w surowicy

Krew pobierana była do szklanych probówek bez antykoagulantu. Następnie inkubowana była przez godzinę w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji próbkę odwirowano (2000 × g, 10 min). Do czasu wykonania analizy surowicę przechowywano w temperaturze –70°C.

Oznaczenie tromboksanu B₂ w osoczu

Krew pobierana była do probówek zawierających buforowany 0,105 M cytrynian sodu (Vacutainer™, Becton Dickinson, Plymouth, UK) w stosunku objętościowym 1 : 9.

Generacja tromboksanu wykonywana była metodą mechaniczną, w temperaturze pokojowej poprzez mieszanie 0,5 ml krwi w próbkach typu eppendorf przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej, na mieszadle kołowym (średnica 30 cm, 15 obr./min) [23]. Generację TX hamowano przez dodanie do próbek ASA o stężeniu 500 $\mu\text{mol/l}$. Krew wirowano i przechowywano jak opisano wyżej.

Oznaczenia TXB_2 w surowicy i osoczu (odzwierciedlające generację TX) wykonywano, stosując zestaw do oznaczeń immunoenzymatycznych Thromboxane B_2 EIA Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA). Zamrożone próbki przechowywane były nie dłużej niż 6 miesięcy.

Pozostałe badania laboratoryjne

Morfologię krwi obwodowej wykonywano w analizie Pentra 80 (HORIBA-ABX Diagnostics, Montpellier, Francja). Wszystkie badania biochemiczne zostały wykonane testami firmy Roche Diagnostics (Bazylea, Szwajcaria). U pacjentów wykonywano badania stężenia glukozy, bilirubiny, cholesterolu: całkowitego, frakcji lipoprotein o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins* – LDL) i dużej gęstości (ang. *high density lipoproteins* – HDL), trójglicerydów, białka C-reaktywnego (ang. *C-reactive protein* – CRP) oraz badania aktywności transaminaz. Oznaczenia wykonano w analizatorze Cobas Integra 400 plus.

Kryteria laboratoryjnej oceny skuteczności terapii ASA

Za próg wykrywania niskiej, ocenianej laboratoryjnie, skuteczności działania ASA (NOLS-ASA) przyjęto wartość agregacji z 0,5 mmol/l AA > 0 Ω [10] oraz stężenie TXB_2 w surowicy > 2,378 ng/ml (powyżej trzeciego kwartyla – tab. II).

Analiza statystyczna

Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe lub jako mediany i zakresy kwartylowe (Me, IQR). Porównując dane charakteryzujące się rozkładem nieodbiegającym od rozkładu normalnego (weryfikacja rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka), zastosowano test t-Studenta (dla danych sparowanych oraz niesparowanych). Dane charakteryzujące się rozkładem odbiegającym od normalnego

Tab. II. Agregacja płytek we krwi pełnej oraz stężenie tromboksanu B_2 w surowicy u pacjentów po zabiegu pomostowania aortalno-więcicowego przyjmujących różne dawki ASA

	75 mg ASA/dobę (n = 24)	150 mg ASA/dobę (n = 31)	Istotność statystyczna
TXB_2 [ng/ml]	1,76 (1,08–3,75)	0,97 (0,59–1,19)	0,0002
WBA_{AA} [Ω]	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	brak
$\text{WBA}_{\text{kolagen}}$ [Ω]	7,0 (5,8–10,0)	6,0 (4,0–9,5)	brak

TXB_2 – tromboksan B_2 ; WBA – metoda agregacji we krwi pełnej (ang. *whole blood aggregometry*); wyniki prezentowane są jako mediana z zakresem kwartylowym; agregację płytek krwi indukowano, stosując kolagen o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ lub kwas arachidonowy o stężeniu 0,5 mmol/l ; istotność różnic między grupami oceniano testem jednostronnym U Manna-Whitneya.

analizowano przy użyciu testu: rang Wilcozona (zmienne sparowane), U Manna-Whitneya (dla dwóch zmiennych niesparowanych). Do analizy danych dichotomicznych stosowano test dokładny Fishera.

Opracowanie statystyczne wyników wykonano za pomocą programu StatDirect 2.6.1. (StatsDirect Ltd, UK).

Wyniki

Laboratoryjna ocena skuteczności działania ASA

W pracy wykazano istotnie większe stężenie TXB_2 w surowicy pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg ASA niż w grupie leczonej dawką 150 mg ASA na dobę. Stwierdzono także w tej grupie wyższą reaktywność płytek krwi, ale różnice te nie były znamienne statystycznie (tab. II). Zgodnie z przyjętą klasyfikacją odpowiedzi płytek krwi na podany chorem ASA zarejestrowano w grupie przyjmujących 75 mg ASA 2 chorych (8,3%), których płytki krwi spełniały oba kryteria NOLS-ASA oraz 11 chorych (46%) spełniających jedno kryterium ($\text{TXB}_2 > 2,376 \text{ ng/ml}$). W grupie przyjmujących 150 mg ASA na dobę zarejestrowano jedynie 3 chorych (9,6%) spełniających kryterium zwiększonego stężenia TXB_2 . Znamienność statystyczna częstości występowania większego stężenia TXB_2 w grupie przyjmujących 75 mg ASA niż w grupie przyjmujących 150 mg ASA wyniosła: $p = 0,002$ (test dokładny Fishera).

Wpływ preparatów polifenolowych Aronox® i Corvitine® na agregację indukowaną difosforanem adenozyminy i dynamiczną generację tromboksanu

Preparat Aronox® hamował agregację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym (optyczna metoda badania agregacji) indukowaną ADP o stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$ w grupie pacjentów przyjmujących 75 mg ASA na dobę. Obserwacja ta dotyczy tylko jednego parametru opisującego przebieg agregacji – pola pod krzywą (ang. *area under the curve* – AUC). Prezentując wyniki jako mediany i zakresy kwartylowe (Me; IQR) dla badań wykonanych przed inkubacją płytek krwi z preparatem i po niej, uzyskano odpowiednio 292%*min (181; 320%*min) vs 265%*min (163; 273%*min); $p = 0,034$ (test Wilcozona). Taka sama analiza, ale wykonana dla parametru maksymalnej wartości agregacji (Amax) wykazywała podobną tendencję, lecz zaobserwowane różnice nie miały znamienności statystycznej: 39,0% (29,5; 42,8%) vs 37,0% (29,3; 38,1%); $p = 0,059$.

Wyniki badań wykonanych we krwi chorych przyjmujących 150 mg ASA na dobę oraz analizowane po połączeniu wyników badań obu grup nie wykazały przeciwplatekownych właściwości preparatu.

W tabeli III przedstawiono porównanie względnych zmian agregacji płytek krwi w badaniach wykonanych u chorych należących do trzech grup. Wyniki przedstawione są jako zmiana wartości agregacji (wyrażona w procentach) po inkubacji z preparatem w stosunku do wyjściowej wartości, traktowanej jako 100%. Zarejestrowano nieznaczny, ale

istotny statystycznie spadek wartości względnej agregacji jedynie u pacjentów przyjmujących 75 mg ASA na dobę.

Mimo wysokich wartości stężenia tromboksanu, sugerujących brak skuteczności działania ASA, nie zaobserwowano wpływu badanych preparatów na generację TXA₂ i w konsekwencji na stężenie TXB₂ o osoczu.

Preparat Corviline® nie wykazywał przeciwplatekowej aktywności w żadnym z układów badawczych.

Dyskusja

Wyniki pracy potwierdzają celowość rezygnacji z określeń AR, RPR czy HAPR.

Wykonane w pracy porównanie nie wykazało istotnych różnic w reaktywności płytek krwi, a jedynie różnice w wartościach stężeń TXB₂ w surowicy. Stąd określenie NOLS-ASA obejmujące wszystkie badania laboratoryjne (reaktywność płytek, badania biochemiczne) można uznać za bardziej użyteczne. Ponadto czytelnik jest od razu informowany o „laboratoryjnym” charakterze obserwacji, co pozwoli uniknąć problemów z błędną interpretacją wyników jako zjawiska o charakterze klinicznym.

W związku z powyższym, NOLS-ASA sugeruje stosowanie u pacjentów po zabiegu kardiochirurgicznym dawki 150 mg ASA na dobę. Zaobserwowana różnica w stężeniach TXB₂ jest szczególnie godna uwagi, gdyż badanie to jest najbardziej swoiste i najlepiej odzwierciedla przeciwplatekową skuteczność działania ASA [5, 22]. W pracy nie analizowano klinicznego efektu porównywanych dawek, ale zarejestrowanie dwóch przypadków udokumentowanego nawrotu dolegliwości wieńcowej w grupie pacjentów przyjmujących 75 mg ASA na dobę przy jednym przypadku zarejestrowanym w grupie pacjentów przyjmujących 150 mg ASA, wskazuje kierunek dalszych badań.

Ta ostatnia obserwacja popiera sugestię zawartą w publikacji Marty Brambilli i wsp. [9]. W badaniach tych wykazano wyższą przeciwplatekową skuteczność dawki 325 mg ASA niż 100 mg na dobę. W przeprowadzonej analizie prospektywnej autorzy wskazują na wyższą śmiertelność w grupie przyjmującej niższą dawkę ASA, co – pomimo braku znamienności statystycznej – stanowi interesującą obserwację.

Ze względu na małe liczebności grup w omawianym i naszym badaniu, informacja ta ma małą wartość praktyczną, jest jednak zachętą do dalszych badań. Jednakże ocena laboratoryjna w obu przypadkach nie pozostawia wątpliwości – niższe dawki są mniej skuteczne.

Prostą konsekwencją słabszej skuteczności dawki 75 mg ASA jest stwierdzenie częstszego występowania NOLS-ASA w grupie chorych przyjmujących niższą dawkę ASA.

Według przyjętej w pracy klasyfikacji pacjentów, których płytki krwi wykazywały obie cechy NOLS-ASA (tab. II), w prezentowanym badaniu były jedynie trzy takie przypadki i to wyłącznie w grupie pacjentów przyjmujących niższą dawkę ASA. Jednakże aż 46% chorych w tej grupie miało stężenie TXB₂ w surowicy przekraczające przyjętą przez nas wartość graniczną (tzn. > 2,378 ng/ml).

W niniejszej pracy klasyfikacja i terminologia mają drugorzędne znaczenie. Istotny jest natomiast fakt słabszego laboratoryjnego działania dawki 75 mg ASA na dobę.

Tab. III. Wpływ preparatu Aronox® na zahamowanie agregacji płytek krwi w różnych grupach chorych po zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego

Metoda	Zmiany agregacji płytek krwi po inkubacji z preparatem polifenolowym [%]		
	grupy połączone (n = 55)	grupa 75 mg ASA/dobę (n = 24)	grupa 150 mg ASA/dobę (n = 31)
agregacja ADP 10 µmol/l			
A _{max}	99,7 (91,5–105,0)	91,7 (86,9–101,0)*	103,0 (99,6–109,3)
AUC	101,7 (83,6–108,9)	83,6 (71,6–105,0)**	105,0 (98,7–111,2)

Wyniki prezentowane są jako mediana z zakresem kwartylowym; agregację płytek krwi indukowano, stosując 10 µmol/l difosforanu adenozyry (ADP); A_{max} – maksymalna wartość agregacji; AUC – pole pod krzywą (ang. area under the curve); istotność różnic między zmianami agregacji (obliczonymi jako procentowe wartości względne agregacji po inkubacji z Aronoxem® w stosunku do wyników agregacji przed inkubacją) dla dwóch porównywanych grup oraz grupy połączonej wykonano testem jednostronnym U Manna-Whitneya (* – A_{max} 75 mg ASA ≠ A_{max} 150 mg ASA); p = 0,0011; ** – AUC 75 mg ASA ≠ AUC 150 mg ASA; p = 0,0026.

Oczywiście obserwacja laboratoryjna nie może być w prosty sposób przekładana na efektywność kliniczną, lecz wskazuje na pewną prawidłowość, która z wysokim prawdopodobieństwem mogłaby także wystąpić w praktyce klinicznej.

Wyniki pracy włączają się w nurt badań i dyskusji dotyczących optymalizacji leczenia przeciwplatekowego po zabiegach CABG [6, 7] i dzięki zastosowaniu w pracy najbardziej swoistych metod udało się autorom dostarczyć kolejnego argumentu na rzecz celowości przygotowania projektu wielośrodkowych badań klinicznych weryfikujących aktualne wytyczne [8].

Wyniki pracy wskazują, że przeciwplatekowy efekt działania preparatu polifenolowego Aronox® występuje jedynie u chorych przyjmujących dawkę 75 mg ASA na dobę i należy przypuszczać, że taki efekt niepełnej skuteczności ASA może być obserwowany jedynie w przypadku stosowania zbyt niskich dawek tego leku przeciwplatekowego. Preparaty polifenolowe zastosowano do blokowania szlaku aktywacji płytek zależnego od ADP, starając się odwzorować korzystny dla chorych efekt łączenia ASA z kłopidogrelem [12]. Inkubacja krwi z badanymi preparatami nie miała wpływu na generację TXA₂.

Można więc wnioskować, że w zastosowanym w pracy układzie eksperymentalnym wykazano inne niż ASA działanie polifenoli.

Zastosowanie preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego do wspomaganie lub uzupełnianie leczenia przeciwplatekowego może być uznane za niecelowe, ale poczynione zostały pierwsze próby badań eksperymentalnych [21, 24], a liczne badania dowodzące ich przeciwplatekowej skuteczności uzasadniają sens prowadzenia badań w tym kierunku [18, 25, 26]. W dostępnym piśmiennictwie upatruje się podstaw przeciwplatekowej skuteczności w działaniu antyoksydacyjnym [20], co w przypadku pacjentów po zabiegu kardiochirurgicznym może mieć istotne znaczenie [15].

Przeprowadzone w pracy badania *in vitro* sugerują brak potrzeby uzupełniania preparatami polifenolowymi leczenia pacjentów przyjmujących ASA w dawce 150 mg na dobę, wskazując jednocześnie konieczność weryfikacji celowości stosowania dawki 75 mg ASA na dobę u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego.

W pracy wykazano zdolność preparatu Aronox® do hamowania szlaku aktywacji płytek krwi zależnego od ADP. Dobór agonisty związany jest z dobrze udokumentowaną korzyścią wynikającą z połączenia niskich dawek ASA (81 mg) z kłopidogrelem [12]. Nie można wykluczyć, że zastosowanie mniej agresywnego zestawu o podobnym działaniu, czyli dołączenia preparatów polifenolowych o właściwościach przeciwplateletowych do niskich dawek ASA może także przynieść korzyść kliniczną przy minimalnym ryzyku wystąpienia efektów ubocznych.

Wnioski

Zastosowanie u chorych po zabiegu CABG (w późnym okresie pooperacyjnym) dawki ASA 75 mg na dobę, w ocenie laboratoryjnej jest mniej efektywne niż stosowanie dawki 150 mg na dobę.

Preparat polifenolowy Aronox® może być przydatny jako uzupełnienie terapii niskimi (75 mg na dobę) dawkami ASA.

Praca współfinansowana z projektów MNiSW N405 065034 oraz „Przygotowanie preparatów polifenolowych o pochodzeniu roślinnym 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.

Piśmiennictwo

- Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin „resistance” and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336: 195-198.
- Brister SJ, Buchanan MR. Aspirin “resistance” and its impact on cardiovascular morbidity and mortality: it is real, clinically relevant and should be measured. *Heart* 2009; 95: 1223-1224.
- Aydinalp A, Atar I, Gulmez O, Atar A, Acikel S, Bozbas H, Ozgul A, Ertan C, Ozin B, Muderrisoglu H. The clinical significance of aspirin resistance in patients with chest pain. *Clin Cardiol* 2010; 33: E1-E7.
- Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ten Berg JM, Hackeng CM. High on-aspirin platelet reactivity as measured with aggregation-based, cyclooxygenase-1 inhibition sensitive platelet function tests is associated with the occurrence of atherothrombotic events. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2140-2148.
- Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, Golański J, Sitkiewicz D, Piegowski J, Gorski J, Zembala M, Opolski G, Huber K, Arnesen H, Kristensen SD, De Caterina R. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2009; 30: 426-435.
- Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 2001; 119 (1 Suppl): 39S-63S.
- Zimmermann N, Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 379-390.
- Becker RC, Meade TW, Berger PB, Ezekowitz M, O'Connor CM, Vorchheimer DA, Guyatt GH, Mark DB, Harrington RA; American College of Chest Physicians. The primary and secondary prevention of coronary artery disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133 (6 Suppl): 776S-814S.
- Brambilla M, Parolari A, Camera M, Colli S, Eligini S, Centenaro C, Anselmo A, Alamanni F, Tremoli E. Effect of two doses of aspirin on thromboxane biosynthesis and platelet function in patients undergoing coronary surgery. *Thromb Haemost* 2010; 103: 516-524.
- Golański J, Chłopicki S, Golański R, Gresner P, Iwaszkiewicz A, Watala C. Resistance to aspirin in patients after coronary artery bypass grafting is transient: impact on the monitoring of aspirin antiplatelet therapy. *Thromb Drug Monit* 2005; 27: 484-490.
- Zimmermann N, Kurt M, Winter J, Gams E, Wenzel F, Hohlfeld T. Detection and duration of aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 947-948.
- Sun JC, Teoh KH, Lamy A, Sheth T, Ellins ML, Jung H, Yusuf S, Anand S, Connolly S, Whitlock RP, Eikelboom JW. Randomized trial of aspirin and clopidogrel versus aspirin alone for the prevention of coronary artery bypass graft occlusion: the Preoperative Aspirin and Postoperative Antiplatelets in Coronary Artery Bypass Grafting study. *Am Heart J* 2010; 160: 1178-1184.
- Davi G, Santilli F, Patrono C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: 216-226.
- Naruszewicz M, Laniewska I, Millo B, Dłużniewski M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* 2007; 194: e179-e184.
- Leong JY, van der Merwe J, Pepe S, Bailey M, Perkins A, Lyberty R, Esmore D, Marasco S, Rosenfeldt F. Perioperative metabolic therapy improves redox status and outcomes in cardiac surgery patients: a randomised trial. *Heart Lung Circ* 2010; 19: 584-591.
- Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* 2009; 139: 1788S-1793S.
- Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 348-358.
- Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – a molecular perspective. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1308-1319.
- Michalska M, Gluba A, Mikhailidis DP, Nowak P, Bielecka-Dabrowa A, Rysz J, Banach M. The role of polyphenols in cardiovascular disease. *Med Sci Monit* 2010; 16: RA110-RA119.
- Olas B, Wachowicz B, Tomczak A, Erler J, Stochmal A, Oleszek W. 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: 70-77.
- Golański J, Muchova J, Golański R, Durackova Z, Markuszewski L, Watala C. Does pycnogenol intensify the efficacy of acetylsalicylic acid in the inhibition of platelet function? *In vitro* experience. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 316-321.
- Kidson-Gerber G, Weaver J, Gemmell R, Prasan AM, Chong BH. Serum thromboxane B2 compared to five other platelet function tests for the evaluation of aspirin effect in stable cardiovascular disease. *Heart Lung Circ* 2010; 19: 234-242.
- Nocun M, Ulicna O, Muchova J, Durackova Z, Watala C. French maritime pine bark extract Pycnogenol reduces thromboxane generation in blood from diabetic male rats. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 168-172.
- Kim YS, Pyo MK, Park KM, Park PH, Hahn BS, Wu SJ, Yun-Choi HS. Antiplatelet and antithrombotic effects of a combination of ticlopidine and ginkgo biloba ext (EGb 761). *Thromb Res* 1998; 91: 33-38.
- Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 2005; 81 (1 Suppl): S292-S297.
- Heptinstall S, May J, Fox S, Kwik-Urbe C, Zhao L. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent *in vitro* and *ex vivo* studies in healthy adults. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47 (2 Suppl): S197-S205.