

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy: Przeciwpłytkowe właściwości preparatów polifenolowych uzyskanych z liści jeżyny i liści maliny

Autor rozprawy: mgr Dominika Dudzińska

Promotor: prof. dr hab. Cezary Watała

W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie związkami polifenolowymi jako składnikami diety o potencjalnych właściwościach kardioprotekcyjnych. Liczne badania naukowe wykazują, iż polifenole mogą pozytywnie regulować funkcję komórek śródbłonka oraz płytek krwi. Coraz więcej badań wskazuje na fakt, że niejadalne dla człowieka części roślin są bogatym źródłem związków polifenolowych o właściwościach prozdrowotnych. Doniesienia naukowe podkreślają prozdrowotne i antyoksydacyjne właściwości liści pochodzących od roślin z rodzaju *Rubus* sp., dlatego też, w bieżącej pracy podjęto próbę określenia przeciwpłytkowych właściwości ekstraktów z liści jeżyny (*Rubus caesius* L.) i maliny (*Rubus idaeus* L.). Badano zarówno bezpośredni wpływ ekstraktów na płytki krwi, jak i ich zdolność do modulacji przeciwpłytkowych właściwości poprzez oddziaływanie na komórki śródbłonka i neutrofile.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że oba ekstrakty obniżają parametry aktywacji i reaktywności płytek krwi monitorowane przy użyciu cytometrii przepływowej, jak i zmniejszają agregację płytek we krwi pełnej. Ponieważ nie udało się wykazać wpływu preparatów na agregację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym oraz wykazano, że usunięcie neutrofilów z krwi pełnej osłabia działanie ekstraktów, dalsze badania skupiały się na próbie wyjaśnienia mechanizmu działania preparatów zależnego od neutrofilów. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż badane preparaty nie wpływają na aktywację neutrofilów oraz tworzenie się agregatów płytkowo-neutrofilowych. Niewielki wzrost odsetka agregatów płytkowo-neutrofilowych oraz aktywacja neutrofilów zaobserwowana w wyniku analizy cytometrycznej prób krwi pełnej po agregacji impedancyjnej, jest wynikiem „uzbrojenia” neutrofilów w odpowiedzi na siły ścinania w kuwecie agregometrycznej. „Uzbrojone” neutrofile potrafią silniej odpowiadać na czynniki stymulujące, nawet na te słabe. Obserwację tę potwierdza analiza cytometryczna,

która ujawniła, że neutrofile niepoddane siłom ścinania, nie ulegają aktywacji w wyniku inkubacji z ekstraktami.

W niniejszej pracy wykazano również, że ekstrakty działają jako zmiatacze RFT, generowanych przez stymulowane neutrofile. Zjawisko to może tłumaczyć rozbieżność w wynikach, uzyskanych podczas badania wpływu ekstraktów na agregację płytek we krwi pełnej i osoczu bogatopłytkowym. W bieżącej pracy badano również wpływ ekstraktów na wybrane przeciwpłytkowe właściwości komórek śródbłonka, takie jak aktywność i ekspresja śródbłonkowej apyrazy. Wykazano, brak negatywnego oddziaływania na proliferację i żywotność komórek śródbłonka. Pomimo to oba preparaty w wyższych stężeniach prowadzą do zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 oraz obniżenia aktywności apyrazowej antygeny CD39. Obserwacje te mogą świadczyć o braku pozytywnego wpływu ekstraktów z liści jeżyny i liści maliny na śródbłonek naczyniowy.

Podsumowując, ekstrakty z liści maliny zwyczajnej i jeżyny popielicy stanowią źródło polifenoli o znaczących właściwościach przeciwutleniających, ponadto wykazują silne działanie przeciwpłytkowe, co czyni je obiecującym źródłem do pozyskiwania suplementów diety o działaniu kardioprotekcyjnym.

Recently, the interest has aroused regarding the use of polyphenols as dietary compounds, exhibiting cardioprotective properties. Several lines of evidence indicate that polyphenols may positively regulate endothelial cell function and blood platelet reactivity. Generally, inedible plant parts are very often and abundant source of polyphenols, beneficial for human health. In fact, scientific data put emphasis on antioxidative and biological activity of leaves of plants belonging to the genus *Rubus* sp. For this reason, in the current work an approach was taken to estimate antiplatelet properties of dewberry (*Rubus caesius* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves extracts. In this study the direct effects of the extracts on platelet function were assessed, as well as the abilities of the extracts to act indirectly on platelets via endothelial cells and neutrophils.

Results obtained in this study suggest that both extracts decrease parameters of blood platelets activation and reactivity, assed with flow cytometry. Moreover, both extracts downregulate platelet aggregation in the whole blood samples, monitored with the impedance aggregometry. As far as we found that there was no effect of either extract

on platelet aggregation in PRP and that the removal of neutrophils from whole blood caused declines in antiaggregatory effects of both extracts, further studies were focused upon explanation of the mechanisms of the action of these extracts on platelets.

Results presented in this work, allow to state that the investigated extracts do not demonstrate an influence on neutrophil activation and platelet-neutrophil aggregation. Slight increase in platelet-neutrophil aggregation detected with the use of whole blood impedance aggregometry, may be due to some methodological restraints and may result from the neutrophil priming caused by a sheer stress in aggregometry cuvette. Primed neutrophils respond stronger on even weak stimuli. This observation was confirmed with a flow cytometry analysis of neutrophils not exposed on sheer stress, where the lack of neutrophil activation upon their exposure to extracts was evidenced.

In this work, extracts were shown to scavenge ROS generated by neutrophils. This phenomenon may explain differentiated results of the influence of extracts on platelet aggregation in whole blood and PRP. In the current work the influence of the extracts on selected antiplatelet properties of endothelial cells, such as activity and the expression of endothelial apyrase was also assessed. Whereas the lack of a negative impact of either extract on endothelial viability and proliferation was demonstrated, both extracts used in higher concentrations increased the expression of ICAM-1 and decreased apyrase activity.

These observations may point to the lack of beneficial influence of dewberry and raspberry leaf extracts on endothelial cells.

In summary, dewberry and raspberry leaves extracts are the sources of polyphenols with significant antioxidative properties. That is why they may be considered as a convenient material to obtain dietary supplements with cardioprotective properties.