

GRZEGORZ MIELCARZ, ALEKSANDER BARINOW–WOJEWÓDZKI,
KRZYSZTOF LINKE

WPLYW SUPLEMENTACJI EKSTRAKTEM Z CZERWONEGO WINA NA WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE I FIBRYNOLITYCZNE U LUDZI

Streszczenie

Podjęte badania mają na celu ocenę suplementacji ekstraktem z czerwonego wina na właściwości antyoksydacyjne i przeciwzakrzepowe organizmu u kobiet w starszym wieku (68 – 75 lat).

Badaniom poddano grupę 40 kobiet. Pierwsza grupa 20 kobiet stanowiła grupę placebo. Pozostałe 20 kobiet suplementowano sproszkowanym ekstraktem z wina czerwonego (RWX) w ilości 1g na dobę przez okres dwóch tygodni. Właściwości antyoksydacyjne organizmu oceniono na podstawie pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego oraz całkowitego stężenia polifenoli w osoczu.

Otrzymane wyniki wskazują na korzystny wpływ suplementacji polifenolami zawartymi w RWX na właściwości przeciwzakrzepowe krwi w grupie badanych kobiet w starszym wieku, poprzez wzrost aktywności t-PA (tkankowego aktywatora plazminogenu).

Słowa kluczowe: polifenole, wino, potencjał antyoksydacyjny, fibrynoliza

Wprowadzenie

Choroby układu krążenia charakteryzują się wysoką śmiertelnością w krajach uprzemysłowionych. Badania epidemiologiczne przeprowadzone we Francji dotyczące śmiertelności z powodu chorób układu krążenia wykazały niską śmiertelność w stosunku nie tylko do krajów europejskich, ale również do pozostałych krajów świata, chociaż spożycie tłuszczu nasyconych jest w tym kraju wysokie, tzw. „French Paradox”[7]. Konsumpcja wina czerwonego we Francji jest znacznie wyższa niż innych

Dr hab. G. Mielcarz, Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej, Pracownia Chemii Żywności i Żywnienia Człowieka, prof. dr hab. K. Linke, Katedra i Klinika Gastroenterologii i Żywnienia Człowieka, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, dr hab. A. Barinow - Wojewódzki, Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

krajach o wysokim współczynniku śmiertelności z powodu chorób układu krążenia. Istnieją doniesienia wykazujące korzystny wpływ spożycia czerwonego wina na zapobieganie chorobom układu krążenia. Wpływ ten można wyjaśnić obecnością w winie polifenoli, związków hamujących rozwój miażdżycy oraz zapobiegających zakrzepicy krwi u ludzi [2]. Zawartość w winie polifenoli wynosi 1 – 2 g/L i obejmuje flawanole (kwercetyna i mirecetyna), flavanole (katechina i epigallokatechina) i proantycyjaniny (tanina) [4, 7]. Korzystny wpływ polifenoli zawartych w winie wiąże się z hamowaniem procesów miażdżycowych w tętnicach, poprzez ich działanie antyoksydacyjne na frakcję LDL cholesterolu. Ważnym czynnikiem wpływającym na wzrost śmiertelności z powodu chorób układu krążenia jest nadmierna krzepliwość krwi. Zauważono istotny wpływ polifenoli z wina na właściwości przeciwzakrzepowe krwi, polegający na wspomaganiu procesów fibrynolizy i obniżania agregacji płytek we krwi [5, 3, 10]. Proces fibrynolizy związany jest z szeregiem kaskadowych reakcji zachodzących we krwi, które regulowane są przez układ inhibitorów i aktywatorów. Tkankowy aktywator plazminogenu t-PA przekształca plazminogen w plazminę, która z kolei odpowiada za zapobieganie skrzepom fibryny [9, 6].

Material i metody badań

W badaniach wzięło udział 40 kobiet. 20 kobiet, stanowiło grupę kontrolną i 20 grupę badaną. Zakres wiekowy: 68 - 75 lat. Zgodę na prowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badana grupa kobiet była pensjonariuszkami Domu Opieki Społecznej w Poznaniu, objęta była stałą opieką lekarską, nie wykazywała objawów chorób metabolicznych, cieszyła się względnie dobrym stanem zdrowia. Grupa kontrolna po pobraniu krwi na czczo otrzymała skrobię (jeden gram dziennie) jako placebo, natomiast grupa badana suplementowana była ekstraktem z czerwonego wina bogatego w polifenole (RWX). Ekstrakt ten w postaci proszku otrzymano z Nutriproducts Ltd. (Grandviev, Leeds, UK) i pochodził z czerwonego wina *Cabernet sauvignon*. Grupa badana otrzymywała 1g dziennie ekstraktu w postaci dwóch kapsułek (jedna rano i jedna wieczorem) przez okres dwóch tygodni.

Badania aktywności tkankowego aktywatora plasminogenu t-PA przeprowadzono metodą ELISA z wykorzystaniem firmowej płytki pokrytej przeciwciałami i gotowym zestawem odczynników. Odczytu płytek dokonano na czytniku płytek Muliscan MS przy długości fali $\lambda = 405\text{nm}$. Krew do badań pobierano rano, na czczo oraz po czterech godzinach od podania 1g ekstraktu RWX. Krew pobierano do próbek zawierających 0,5 M cytrynian o pH 4,3.

Oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli w osoczu dokonano w oparciu o metodę spektrofotometryczną Folina-Ciocalteu [8]. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza badanych osób oznaczono w oparciu o zmodyfikowaną metodę FRAP (Fer-

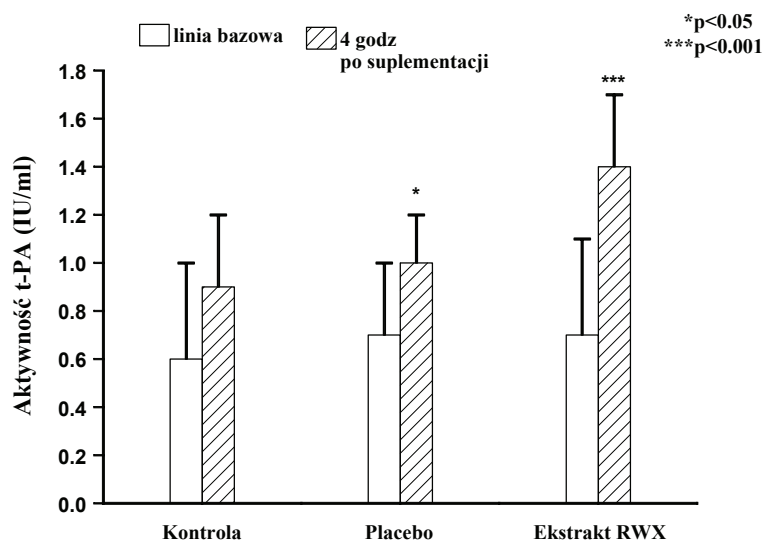
ric Reducing Ability of Plasma) [1]. Modyfikacja tej metody polegała na przystosowaniu jej do oznaczeń z wykorzystaniem czytnika płytek Multiscan MS, co pozwoliło obniżyć koszty analiz oraz znacznie skrócić czas wykonania analiz.

Dla oceny wyników zastosowano test t-Studenta dla zmiennych nie powiązanych, przy uwzględnieniu warunków koniecznych dla jego zastosowania (niezależność obserwacji, rozkład normalny, homogeniczność wariancji).

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu polifenoli zawartych w czerwonym winie na właściwości przeciwutleniające i przeciwzkrzepowe krwi u ludzi, suplementowanych ekstraktem z czerwonego wina w okresie dwóch tygodni.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono porównawcze wyniki zmian w aktywności tkankowego aktywatora plasminogenu t-PA po 4 godzinach od podania ekstraktu polifenoli z czerwonego wina. W grupie kontrolnej w okresie czterech godzin, zaobserwowano brak znamiennej istotnych różnic w aktywności t-PA.



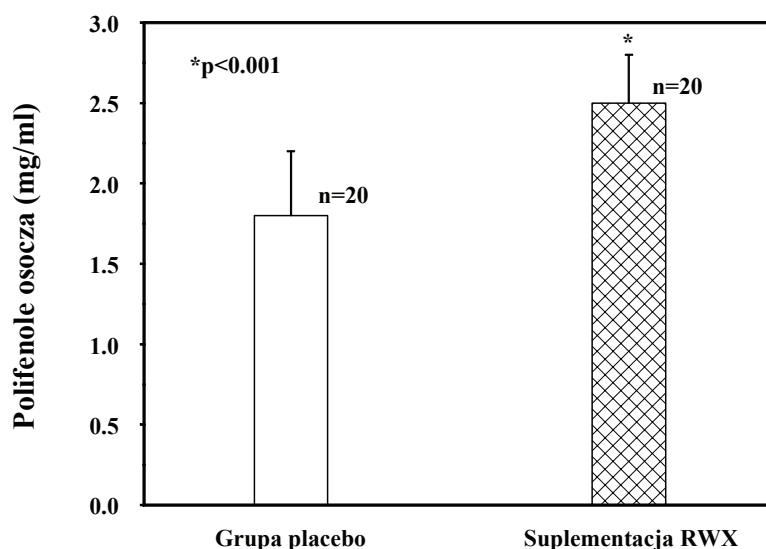
Rys. 1. Aktywność t-PA po 4 godzinach, w grupie kontrolnej, grupie placebo i w grupie suplementowanej ekstraktem z czerwonego wina RWX

Fig. 1. t-PA activity after 4 hours, in control group, placebo group and in group supplemented by red wine extract RWX

Jednak po podaniu placebo w tej samej grupie kobiet zaobserwowano znamienne różnice na poziomie istotności $p < 0,05$. Natomiast suplementacja 1g ekstraktu RWX spowodowała wzrost aktywności t-PA do poziomu istotności $p < 0,001$. Zaobserwowa-

ne zmiany w dziennej aktywności t-PA zaobserwowano już wcześniej [3]. Podwyższona aktywność t-PA występowała rano i wieczorem. Pomiaru aktywności t-PA dokonano w stałych godzinach porannych a zaobserwowany znamieny wzrost aktywności t-PA po czterech godzinach suplementacji RWX, potwierdza korzystny wpływ polifenoli z czerwonego wina na właściwości przeciwzakrzepowe krwi u badanej grupy kobiet w starszym wieku.

Na rys. 2. przedstawiono wzrost całkowitej zawartości polifenoli w osoczu krwi u grupy kobiet suplementowanych ekstraktem z czerwonego wina RWX przez okres dwóch tygodni w porównaniu do grupy placebo ($p < 0,001$).

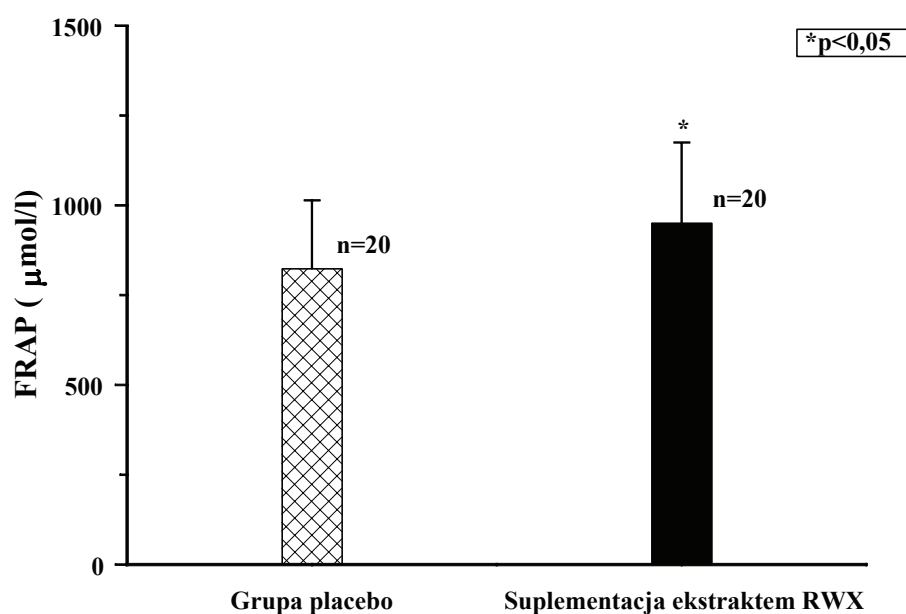


Rys. 2. Całkowita zawartość polifenoli osocza w grupie placebo oraz w grupie suplementowanej ekstraktem z czerwonego wina RWX

Fig. 2. Total plasma polyphenols in placebo group and in group supplemented by red wine extract RWX.

Zawartość całkowita polifenoli w ekstrakcie RWX oznaczona metodą Folina-Ciocalteu wynosiła 450 mg/g. Dwutygodniowa suplementacja polifenolami zawartymi w RWX spowodowała wzrost ich stężenia w osoczu do wartości $2,5 \pm 0,3$ mg/ml. Jednak należy pamiętać, że reakcja Folina-Ciocalteu jest czuła na niemal wszystkie zdolne do oksydacji związki i niekoniecznie odzwierciedla faktyczną zawartość polifenoli w osoczu. Faktycznie za referencyjne metody zawartości polifenoli w osoczu należy uznać metody chromatograficzne oparte na HPLC. Stężenia polifenoli w osoczu są tam dużo niższe (poniżej 100ng/L) [11]. Jednak ze względu za swoją prostotę i niski koszt analizy metoda Folina-Ciocalteu wydaje się przydatna do wykazania różnic w zawartości przed i po suplementacja polifenolami.

Zwiększona zawartość polifenoli w osoczu po suplementacji RWX, miała istotny wpływ na potencjał antyoksydacyjny organizmu. Autorzy podjęli próbę jego oceny poprzez ocenę całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza. W tym celu zastosowano metodę FRAP. Metoda ta polega na redukcji jonu żelazowego (III) do żelazowego (II) w niskim pH z wytworzeniem barwnego kompleksu żelazo-tripirydyltriazyna. Wyniki przedstawiono na rys. 3.



Rys 3. Wartości FRAP w grupie placebo oraz w grupie suplementowanej ekstraktem z czerwonego wina RWX.

Fig. 3. FRAP value in placebo group and in group supplemented by red wine extract RWX.

Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza wzrósł znamienne po dwóch tygodniach w grupie kobiet suplementowanych ekstraktem RWX ($p < 0,05$). Wzrost właściwości przeciwutleniających organizmu wpływa korzystnie na jego zdolność do obrony przeciwko szkodliwemu działaniu stresu oksydacyjnego. Występuje tu zbieżność z wynikami opublikowanymi wcześniej z użyciem tego samego ekstraktu RWX, sugerującymi mechanizm obronny przeciw rozwojowi miażdżycy poprzez obniżoną zdolność frakcji lipoprotein o niskiej gęstości do oksydacji *in vivo*. [5].

Wnioski

1. Suplementacja polifenolami pochodzącymi z czerwonego wina RWX, w postaci sproszkowanego ekstraktu w okresie dwóch tygodni powoduje znamieny ich wzrost w osoczu ($p < 0,05$).
2. Dwutygodniowa suplementacja ekstraktem RWX, powoduje znamieny wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza ($p < 0,001$).
3. Suplementacja ekstraktem polifenoli RWX wpływa korzystnie na właściwości przeciwzakrzepowe krwi poprzez zwiększenie aktywności tkankowego aktywatora plazminogenu t-PA, który ma bezpośredni wpływ na proces fibrylizy.

Literatura

- [1] Benzie I.F., Strain J.J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. *Anal. Biochem.*, 1996, 239, 70 – 76.
- [2] Constant J.: Alcohol, ischemic heart disease and French paradox. *Coron. Artery Dis.* 1997; 8, 645-649
- [3] Kluff C., Jie A.F.H., Rijken D.C., Verheijen J.H.: Daytime fluctuations in blood of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its fast-acting inhibitor (PAI-1). *Thromb Haemost* 1988; 59, 329-332
- [4] Leibovithz B.E., Mueller J.A.: Bioflavonoids and polyphenols: medical applications. *J. Optimal Nutrition* 1993, 2, 17-35.
- [5] Nigdikar S.V., Williams N.R., Griffin B.A., Howard A.N.: Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, 258 – 265.
- [6] Pikaar N.A., Wedel M. van der Beek E.J., van Dokkum W., Kempen H.J., Kluff C., Ockhuizen T., Hermus R.J.: Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation, fibrinolysis, and blood lipids. *Metabolism*. 1987, 36, 538-543.
- [7] Renauld S., De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and French Paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992, 339, 1523-1526.
- [8] Singleton S.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenols with phosphor molybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticulture*, 1965, 16, 144 – 158.
- [9] Sumi H., Hamada H., Tsushima H., Mihara H. Urokinase-like plasminogen activator increased in plasma after alcohol drinking. *Alcohol-Alcohol*, 1988, 23, 33-43.
- [10] Święs J., Robak J., Dabrowski L., Michalska Z., Gryglewski R.J.: Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro. *Pol. J. Pharmacol. Pharm*, 1984, 36 (5), 455 – 463.
- [11] Waterhouse A.L., German J.B., Walzem R.L., Hansen R.J., Kasim-Karakaz S.A.: Is it time for a wine trial? *Am. J.Clin. Nutr.* 1998, 68, 220-221

**EFFECT OF RED WINE EXTRACT SUPPLEMENTATION ON ANTIOXIDANT
AND FIBRYNOLITIC PROPERTIES IN PEOPLE****S u m m a r y**

In our study, we investigated effect of red wine extract on antioxidant and antithrombosis properties in elderly women (age 68 – 75). We investigated 40 women. Twenty women was in placebo group and twenty was supplemented by red wine extract (RWX), 1g per day for two weeks. Antioxidant properties was assessed by total plasma antioxidant status using FRAP method and plasma total polyphenols concentration. We conclude that supplementation of red wine extract has beneficial effect on antithrombosis properties by increased activity of t-PA (tissue plasminogen activator).

Key words: polyphenols, wine, plasma antioxidant status, fibrynolysis ☒