

The influence of procyanidolic oligomers on plasma anticoagulant activity

Wpływ oligomerów procyanidolowych na aktywność antykoagulacyjną osocza

Alina Grzywacz, Piotr Psuja, Maria Zozulińska, Jolanta Bednarska, Zofia Turowiecka, Krzysztof Lewandowski, Krystyna Zawilska

Laboratory of Haemostasis, Department of Haematology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland (Pracownia Hemostazy Kliniki Hematologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

Abstract

Background. Procyanidolic oligomers (PO) inhibit the degradation of subendothelial connective tissue by collagenase and elastase neutralization. Their efficacy in postphlebitic syndrome and venous insufficiency may suggest an additional systemic action mediated by endothelium. Therefore, the plasma anticoagulant response and the tissue plasma pathway inhibitor (TFPI) release induced by PO was assessed.

Material and methods. Twenty-six patients, both surgical and medical, aged 29–86 years, who required antithrombotic prophylaxis for at least 5 days, were included in the study. The patients with higher thrombotic risk received either unfractionated heparin (UFH; 5000 IU bid, s.c., $n = 8$) or low molecular weight heparin (LMWH; 2850 IU AXa/0.3 mL o.d, s.c., $n = 8$). The patients with lower thrombotic risk received PO (150 mg bid, p.o., $n = 10$). In the control group there were age- and sex-matched healthy volunteers, to whom a placebo was administered. Blood samples were drawn before, on the 1, 4, 8 h, as well as on the days 2, 5 after administration of the study medication.

Results. The TFPI concentration did not change significantly from the baseline value at any time, either in patients or in controls. Anti-Xa activity increased at 1 h until day 5 after administration of each study medication. Anti-IIa activity increased at 1 hour and remained elevated until day 5 under UFH and LMWH treatment, but only until day 2 in the PO group. The area under the curve of both anti-Xa and anti-IIa activity was similar in all three study groups but significantly larger as compared to the controls.

Conclusions. Procyanidolic oligomers, like heparin and LMWH, induce anticoagulant response in plasma, but do not release TFPI into the blood.

Key words: procyanidolic oligomers, anti-IIa activity, anti-Xa activity, tissue factor pathway inhibitor, heparin, low molecular weight heparin

Streszczenie

Wstęp. Oligomery procyanidolowe (PO) hamują degradację podśródbłonkowej tkanki łącznej poprzez neutralizację kolagenazy i elastazy. Skuteczność PO w zespole pozakrzepowym i niewydolności żyłnej może sugerować ich dodatkowe działanie układowe, w którym pośredniczy śródbłonek. Było to przesłanką do oceny odpowiedzi antykoagulacyjnej osocza wywołanej przez PO i uwalniania inhibitora drogi zewnątrz-pochodnej (TFPI).

Materiał i metody. Do badania włączono 26 chorych z oddziałów chirurgicznego i internistycznego w wieku 29–86 lat, u których konieczne było zastosowanie profilaktycznej terapii przeciwzakrzepowej przez co naj-

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr n. med. Alina Grzywacz

Oddział Chorób Wewnętrznych i Hematologii, Szpital im. J. Strusia
ul. Szkolna 8/12, 61–833 Poznań, Poland

mniej 5 dni. Chorzy z dużym ryzykiem zakrzepowym otrzymywali albo heparynę niefrakcjonowaną (UFH; 5000 j.m. dwa razy dziennie podskórnie, $n = 8$), albo heparynę drobnocząsteczkową (LMWH; 2850 j.m. AXa/ /0,3 ml raz dziennie podskórnie, $n = 8$). Pacjenci, u których ryzyko zakrzepowe było małe, otrzymywali PO (150 mg dwa razy dziennie doustnie, $n = 10$). Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy zaklasyfikowani według wieku i płci, otrzymujący placebo. Krew do badań pobierano przed podaniem leku oraz w 1., 4. i 8. godzinie oraz w 2. i 5. dniu od podania leku.

Wyniki. Stężenie TFPI nie zmieniło się w porównaniu z wartością wyjściową zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej. Aktywność anty-Xa zwiększała się od 1. godziny do 5. dnia po podaniu każdego leku. Aktywność anty-IIa była zwiększona od 1. godziny do 5. dnia po podaniu UFH i LMWH, ale tylko do 2. dnia po PO. Całkowita aktywność anty-Xa i anty-IIa, oceniana jako wielkość pola pod krzywą w badanym czasie, była podobna we wszystkich grupach badanych, ale znacząco wyższa w porównaniu z grupą kontrolną.

Wnioski. Oligomery procyanidolowe, podobnie jak heparyna niefrakcjonowana i drobnocząsteczkowa, wywołują odpowiedź antykoagulacyjną w osoczu, ale nie powodują uwalniania TFPI do krwi.

Słowa kluczowe: oligomery procyanidolowe, aktywność anty-Xa, aktywność anty-IIa, inhibitor drogi zewnątrzpodrodnej, heparyna, heparyna drobnocząsteczkowa

Introduction

Varicose vein walls differ from normal venous walls by an important loss of their collagen content and an increase of their glycosaminoglycan component, essentially of hyaluronan [1]. The decrease in fibrous protein content can be attributed to the increase of proteolytic (collagenolytic) activity, as well as to free radicals [2]. Glycosaminoglycan increase reflects a deregulation of the normal program of matrix biosynthesis by the cells of varicose vein walls, essentially smooth muscle cells [3]. Some flavonoid drugs are capable of correcting these deviations by decreasing proteolytic attack on fibrous proteins and by the accumulation of proteoglycans and hyaluronan [4]. These effects, due to interactions between flavonoid drugs and the cells and fibrous proteins of venous walls, differ according to the nature of such drugs [5]. Differences in the intensity of the actions of flavonoid drugs with apparently closely related structures might be dependent on the conformation of these drugs and their interaction with the triple helical structure of collagen fibers as well as with the cell membranes [6].

Procyanidolic oligomers (PO) inhibit the degradation of subendothelial connective tissue by the neutralization of collagenase and elastase [7, 8]. These compounds interact with glucosamine incorporation in cultured venous wall explants, and thereby induce a decrease of the hyaluronan content in the pericellular matrix [9]. Moreover, procyanidin fractions (dimers to hexamers) provide protective effects due to their ability to scavenge free radicals and inhibit lipid oxidation [10]. Their efficacy in postphlebotic syndrome and venous in-

Wstęp

Ważnym elementem żyłkowej przebudowy ściany naczyń żylnych jest utrata zawartości kolagenu i wzrost zawartości glikozaminoglikanów, głównie hialuronianu [1]. Zmniejszenie zawartości białek włóknikowych może wynikać ze zwiększenia aktywności proteolitycznej (kolagenolitycznej) oraz działania wolnych rodników [2]. Nadmiar glikozaminoglikanów odzwierciedla zaburzenia regulacji prawidłowego programu biosyntezy macierzy pozakomórkowej przez komórki żyłkowatych ścian naczyń, głównie komórki mięśni gładkich [3]. Niektóre leki zawierające flawonoidy mają właściwości korygujące te zaburzenia poprzez zmniejszenie proteolizy białek włóknikowych oraz gromadzenia proteoglikanów i hialuronianu [4]. Te efekty, będące wynikiem interakcji między lekami flawonoidowymi a komórkami i białkami włóknikowymi ścian naczyń żylnych, różnią się w zależności od natury tych preparatów [5]. Różnice w intensywności działania leków flawonoidowych na pokrewne struktury mogą zależeć od struktury tych preparatów oraz ich interakcji z włóknami kolagenowymi, jak również z błonami komórkowymi [6].

Oligomery procyanidolowe (PO) hamują degradację podśródbłonkowej tkanki łącznej poprzez unieczynnianie enzymów kolagenazy i elastazy [7, 8]. W warunkach hodowli te składniki konkurują z wbudowaniem glukozaminy do ścian naczyń żylnych i w ten sposób zmniejszają zawartość hialuronianu w macierzy pozakomórkowej [9]. Ponadto, frakcje procyanidynowe (dimery do heksamerów) wykazują działanie ochronne ze względu na ich zdolność do usuwania wolnych rodni-

sufficiency may suggest an additional systemic action mediated by endothelium [11–13].

Endothelial cells produce and bind tissue factor pathway inhibitor (TFPI), a potent natural inhibitor of factor Xa and of factor VIIa/tissue factor complexes [14]. Heparin, low molecular heparin fractions and some other glycosaminoglycans release TFPI into the blood and accelerate its antithrombotic effect [15]. The local anticoagulant action of TFPI may control thrombus formation following vascular or endothelial damage. Currently, anticoagulant medication is one of the most efficient means of management of vascular wall protection and repair. Therefore, in this study we evaluated the effect of oral ingestion of procyanidolic oligomers (Endotelon) on TFPI release into the blood, and induction of anticoagulant (anti-Xa, anti-IIa) response in plasma, as compared to subcutaneous prophylactic administration of unfractionated heparin (UFH) or low molecular weight heparin (LMWH).

Material and methods

Twenty-six patients, both surgical and medical, aged 29–86, mean 59 years, who required antithrombotic prophylaxis for at least five days were included into the study. The patients with high thrombotic risk received either UFH (Heparin, Polfa, Poland; 5000 IU bid, s.c., n = 8) or LMWH (Fraxiparine, Sanofi Winthrop, France; 2850 IU AXa/0.3 mL o.d., s.c., n = 8). The patients with low thrombotic risk received procyanidolic oligomers (Endotelon, Sanofi Winthrop, France, 150 mg mg bid, p.o., n = 10). In the control group of 14, cases were age- and sex-matched healthy volunteers, to whom placebo was administered. Both patients and persons from the control group did not receive any antithrombotic medication for at least 10 days before the study. Their screening tests of coagulation (platelet count, activated partial thromboplastin time and prothrombin time) were within the normal range. The patients with contraindication to anticoagulant treatment because of haemorrhagic diathesis, active peptic ulcers, gastrointestinal neoplasia or serious hepatic or renal insufficiency, were excluded from the investigation. Written informed consent was obtained from both patients and controls under the approval of the Local University Ethical Committee (No 1171/98).

Blood samples for analysis were drawn from the antecubital vein before, at 1, 4, 8 hours and on days 2, 5 after administration of the study medication [16]. The samples were mixed (9:1, v:v) with 3.2% solution of sodium citrate, centrifuged (2000 × g, 10 min) and platelet pure plasmas were stored at –50°C until assay. The haemostatic measurements included TFPI concen-

ków i hamowania oksydacji lipidów [10]. Ich skuteczność w leczeniu zespołu pozakrzepowego i niewydolności żyłnej może sugerować, że wykazują dodatkowe działanie systemowe, w którym pośredniczy śródbłonek naczyń [11–13].

Komórki śródbłonna wytwarzają i wiążą inhibitor zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (TFPI), który jest silnym naturalnym inhibitorem czynnika Xa i kompleksów czynnika VIIa z czynnikiem tkankowym [14]. Heparyna, jej drobnocząsteczkowe frakcje i niektóre inne glikozaminoglikany uwalniają TFPI do krwi i w ten sposób zwiększa się ich efekt przeciwzakrzepowy [15]. Miejscowe antykoagulacyjne działanie TFPI może odpowiadać za kontrolę tworzenia zakrzepu po uszkodzeniu śródbłonna lub całej ściany naczynia. Obecnie uważa się, że stosowanie leków przeciwzakrzepowych jest jednym z najbardziej skutecznych sposobów postępowania służących do ochrony i naprawy ściany naczyniowej. Autorzy niniejszej pracy postanowili zbadać efekt oligomerów procyanidolowych podanych drogą doustną (Endotelon) na uwalnianie TFPI do krwi i wywoływanie odpowiedzi antykoagulacyjnej (anty-Xa, anti-IIa) w osoczu w porównaniu z heparyną niefrakcjonowaną (UFH) i jej drobnocząsteczkowymi frakcjami (LMWH) podanymi w dawkach profilaktycznych drogą podskórną.

Material i metody

Do badania włączono 26 chorych z oddziałów chirurgicznego i internistycznego, w wieku 29–86 lat (średnio 59 lat), u których konieczne było zastosowanie profilaktycznej terapii przeciwzakrzepowej przez co najmniej 5 dni. Chorzy z dużym ryzykiem zakrzepowym otrzymywali albo UFH (Heparinum, Polfa, Polska; 5000 j.m. dwa razy dziennie podskórną, n = 8) albo LMWH (Fraxiparine, Sanofi Winthrop, Francja; 2850 j.m. AXa/0,3 ml jeden raz dziennie, n = 8). Pacjenci, u których ryzyko zakrzepowe było małe, otrzymywali oligomery procyanidolowe (Endotelon, Sanofi Winthrop, Francja, 150 mg dwa razy dziennie doustnie, n = 10). Grupę kontrolną stanowiło 14 zdrowych ochotników zakwalifikowanych według płci i wieku, otrzymujących placebo. Ani chorzy, ani osoby z grupy kontrolnej nie przyjmowali żadnych leków przeciwzakrzepowych przez co najmniej 10 dni przed badaniem. Wyniki przesiewowych badań układu krzepnięcia (liczba płytek krwi, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, czas protrombinowy) mieściły się w granicach normy u wszystkich badanych. Wykluczono chorych z przeciwwskazaniami do leczenia przeciwzakrzepowego z powodu skazy krwotocznej, czynnej choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, nowotworu w obrębie przewodu pokarmowego oraz

tration (Total TFPI Elisa Kit, American Diagnostica Inc., USA), as well as plasma anti-Xa and anti-IIa activity (Coatest Heparin, Chromogenix, Sweden). The measurements were performed using a microspectrophotometer (Organon Teknika) at $\lambda = 450$ nm.

The results were expressed as median values. The Gaussian distribution was controlled by Shapiro-Wilk analysis. As a consequence, the non-parametric Kruskal-Wallis and Friedman tests were used for statistical analysis of significant differences at $p = 0.05$. The area under the time-dependent curve (AUC) of biological measurements was calculated and compared according to study medication. The Statistica for Windows program was used for mathematical counting.

Results

The TFPI concentration did not change significantly from the baseline value at any time, either in patients or in controls.

Anti-Xa activity increased significantly ($p < 0.05$) at 1 hour until day 5 after administration of each study medication with peak value (median, IU/ml) of 0.207 at 4 hour in the PO group; 0.306 also at 4 hour in the LMWH group and with double peak of 0.258 and 0.239 at 1 hour and 8 hour in the UFH group respectively (Figure 1). Area under the time-dependent curve (AUC) values were comparable for the three study medication and significantly ($p < 0.05$) different from placebo (Figure 2).

Anti-IIa activity increased at 1 hour and remained elevated until day 5 under UFH and LMWH treatment, but only until day 2 in the PO group (Figure 3). The peak values (median, IU/ml) were obtained at 1 hour (0.139) for PO, at 4 h (0.209) for LMWH and at 1 hour (0.195) for UFH (Figure 3). Area under the time-dependent curve was similar in all study groups but significantly ($p < 0.05$) larger as compared to the controls (Figure 4).

Discussion

The search for anticoagulant action of orally ingested procyanidolic oligomers revealed the moderated anti-Xa and anti-IIa response in plasma that was not accompanied by TFPI release. The anti-Xa and anti-IIa activity in plasma reached values similar to those induced by prophylactic administration of heparin and its low molecular weight fraction. The procyanidolic oligomers exerted a real anticoagulation in plasma, as it could not be observed after ingestion of placebo in the control group of patients. The elimination of anticoagulant activity in plasma induced by procyanidolic oligomers followed the kinetics of its intestinal absorption with the maximal concentration in plasma at 4 hour and half-time

ciężkiej niewydolności nerek lub wątroby. Wszyscy badani oraz osoby z grupy kontrolnej podpisały zgodę na uczestnictwo w badaniu. Zgodę na przeprowadzenie próby wyraziła Uczelniana Komisja Etyczna Akademii Medycznej w Poznaniu (nr 1171/98).

Krew do analiz pobierano z nakłucia żyły odłokciowej przed podaniem badanego leku oraz w 1., 4. i 8. godzinie oraz w 2. i 5. dniu po podaniu leku [16]. Próbkę krwi mieszano w stosunku objętościowym 9:1 z 3,2-procentowym roztworem cytrynianu sodu i wirowano z prędkością $2000 \times g$ w czasie 10 min. Przygotowane w ten sposób osocze ubogopłytkowe przechowywano w temperaturze -50°C do czasu wykonania oznaczeń laboratoryjnych, jednak nie dłużej niż 3 miesiące. Badania obejmowały oznaczenie stężenia TFPI (Total TFPI Elisa Kit, American Diagnostica Inc., Stany Zjednoczone), jak również osoczowej aktywności anty-Xa i anty IIa (Coatest Heparin, Chromogenix, Szwecja). Pomiar absorpcji wykonano przy użyciu mikrospektrofotometru (Organon Teknika) przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

Wyniki przedstawiono w postaci mediany. Rozkład Gaussa sprawdzono za pomocą analizy Shapiro-Wilka. Wobec nieparametrycznego rozkładu wartości do analizy statystycznej zastosowano testy Kruskala-Wallisa i Friedmana. Za istotne przyjęto różnice przy $p = 0,05$. Obliczono wielkość pola pod krzywą (AUC) w zależności od czasu dla każdego z oznaczanych parametrów. Uzyskane wartości porównano między badanymi grupami. Do obliczeń matematycznych zastosowano program komputerowy Statistica for Windows.

Wyniki

Stężenie TFPI nie zmieniło się istotnie w porównaniu z wartością wyjściową w żadnym czasie pomiaru, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej.

Aktywność anty-Xa była zwiększona od 1. godziny do 5. dnia po podaniu każdego z badanych leków ($p < 0,05$). Maksymalne wartości (jm./ml) wynosiły odpowiednio 0,207 w 4. godzinie w grupie otrzymującej PO; 0,306 również w 4. godzinie w grupie otrzymującej LMWH; natomiast po podaniu UFH obserwowano podwójny szczyt wartości: 0,258 w 1. godzinie i 0,239 w 8. godzinie (ryc. 1). Wartości AUC były podobne we wszystkich trzech grupach badanych i istotnie większe ($p < 0,05$) niż w grupie kontrolnej (ryc. 2).

Aktywność anty-IIa zwiększyła się w 1. godzinie i pozostawała na podwyższonym poziomie do 5. dnia po podaniu UFH i LMWH, ale tylko do 2. dnia po podaniu PO. Maksymalne wartości (jm./ml) uzyskano w 1. godzinie — 0,139 w grupie otrzymującej PO, w 4. godzinie — 0,209 w grupie otrzymującej LMWH i w 1. godzinie — 0,195 w grupie stosującej UFH (ryc. 3). Wartości AUC

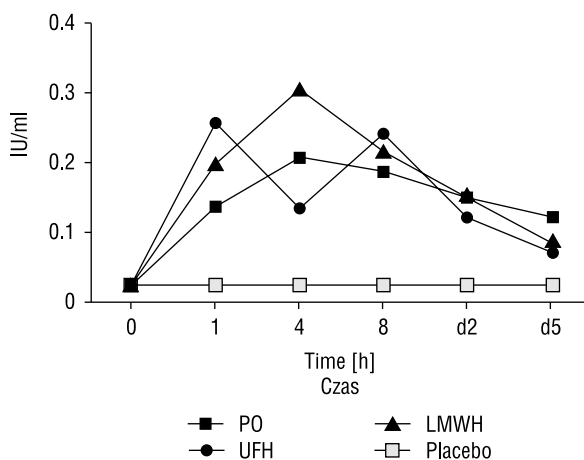


Figure 1. Kinetics of anti-Xa activity
Rycina 1. Kinetyka aktywności anti-Xa

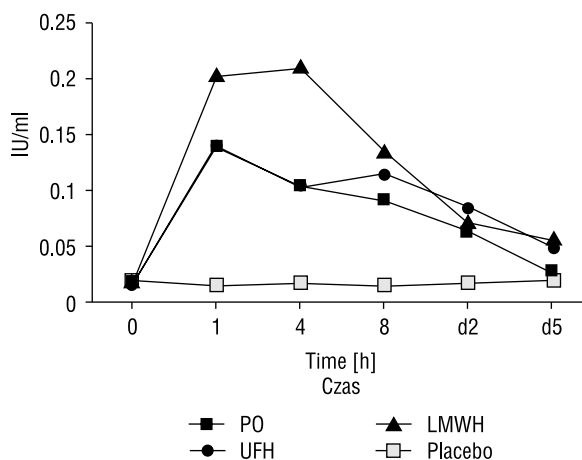


Figure 3. Kinetics of anti-IIa activity
Rycina 3. Kinetyka aktywności anti-IIa

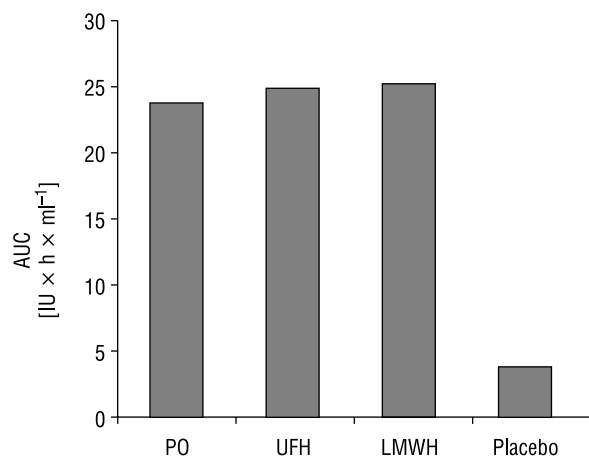


Figure 2. Total anti-Xa activity
Rycina 2. Całkowita aktywność anti-Xa

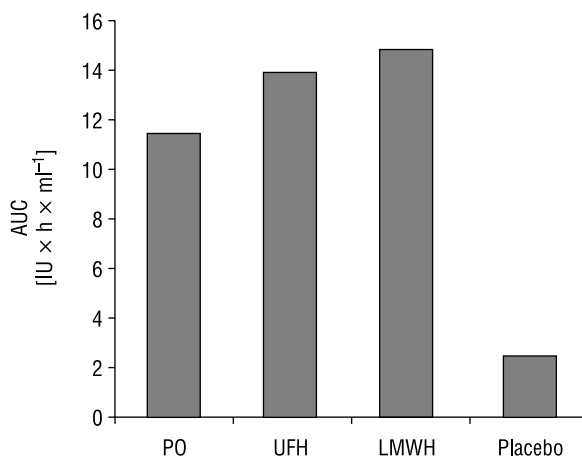


Figure 4. Total anti-IIa activity
Rycina 4. Całkowita aktywność anti-IIa

of plasma elimination between 46–120 h [16]. This observation additionally supports the significance of the anticoagulant properties shared by the investigated compounds.

The procyanidolic oligomers induced both anti-Xa and anti-IIa activity, similar to LMWH and UFH. Therefore, the anticoagulant action mediated by antithrombin may be suggested. It remains to be further evaluated if procyanidolic oligomers directly interact with circulating antithrombin. However, it may not exclude the possibility of the antithrombin release from endothelium or dissociation of specific glycosaminoglycans i.e. heparan or dermatan sulphate from the vascular wall. These endogenous polysaccharides induce anti-Xa and anti-IIa activity in plasma, accelerating the inhibitory action of antithrombin or heparin cofactor II [17]. It has been shown that procyanidolic oligomers bind to ves-

były podobne we wszystkich grupach badanych i istotnie większe ($p < 0,05$) niż w grupie kontrolnej (ryc. 4).

Dyskusja

Poszukiwanie działania antykoagulacyjnego podanych doustnie PO wykazało umiarkowaną odpowiedź anti-Xa i anti-IIa w osoczu, której nie towarzyszyło uwalnianie TFPI. Aktywność anti-Xa i anti-IIa w osoczu osiągnęła wartości podobne do wywoływanych przez profilaktyczne dawki heparyny niefrakcjonowanej i jej drobnocząsteczkowych frakcji. Oligomery procyanidolowe wykazywały rzeczywiste działanie antykoagulacyjne w osoczu. Działania tego nie obserwowano po podaniu placebo w grupie kontrolnej. Eliminacja aktywności antykoagulacyjnej w osoczu wywołanej przez PO naśladowała kinetykę ich jelitowego wchłaniania z maksymalnym stężeniem w osoczu po 4 godzinach i okresem półtrwania

sels, probably because of the high affinity to proline incorporated in elastin and collagen components of extracellular matrices [3]. The observation provided by the present study suggests that this local interaction is not accompanied by a significant release of TFPI from endothelium.

Tissue plasma pathway inhibitor is an important factor of anticoagulant function of heparin and LMWHs. Its inhibitory activity in plasma is increased upon its release from endothelium, following the displacement from the bind sites by heparin and heparin fractions [14]. It has been shown that therapeutic administration of heparin induces a significant increase of plasma TFPI concentration: about 3-fold after intravenous and 0.5–2-fold following subcutaneous injection [15]. In our patients, neither the heparin nor the LMWH in much lower, “prophylactic” doses induced a significant release of TFPI.

It should be stressed that assessment of pharmacokinetics and especially drugs’ elimination was not the aim of this study. Clearance of anti-Xa activity is not associated with renal sufficiency. It depends on antithrombin, which inactivates clotting proteases, including thrombin (IIa) and factors Xa, IXa, XIa, XIIa by forming stoichiometric 1:1 complexes, and this reaction is enhanced in the presence of heparin. These complexes of antithrombin bound to coagulation factors are cleared through hepatic receptor route [18]. We included patients without renal insufficiency according to their normal serum creatinine level. Creatinine clearance as an indicator of glomerular filtration rate (GFR) may be applied to pharmacokinetics study only when the clearance of a studied drug or its active derivatives is largely renal [19]. Elimination of PO and its metabolites is primarily faecal ($\pm 70\%$) with limited elimination via the urinary ($\pm 20\%$) and respiratory ($\pm 5\%$) tracts (corporate data sheet). Low doses of heparin, as administered to our patients, are cleared rapidly from plasma by cellular mechanism of clearance by the binding of heparin to receptors on endothelial cells and macrophages where it is internalized and depolymerized. At therapeutic doses, heparin is cleared by a combination of both cellular and renal mechanisms of clearance [20]. Only for LMWHs, renal insufficiency limits their clinical use. The guidelines accepted in Poland indicate a serum creatinine concentration above 150 $\mu\text{M/L}$, but not any value of creatinine clearance, as the contraindication for LMWHs administration only at therapeutic doses [21]. Furthermore, in our study, plasma anticoagulant activity was assessed in age-matched patients and controls. Therefore, demographic factors influenced our results in the same way in both groups.

wynoszącym 46–120 godzin [16]. Ta obserwacja dodatkowo potwierdza znaczenie antykoagulacyjnych właściwości badanych związków.

Oligomery procyanidolowe wywołały aktywność zarówno anty-Xa, jak i anty-IIa, podobnie jak LMWH i UFH. Może to sugerować, że w działaniu antykoagulacyjnym pośredniczy antytrombina. Wyjaśnienia wymaga, czy oligomery procyanidolowe współdziałają bezpośrednio z krążącą antytrombiną. Nie można jednak wykluczyć możliwości uwalniania antytrombiny ze śródbłonka lub oddzielenia specyficznych glikozaminoglikanów, czyli heparanu lub siarczanu dermatanu od ściany naczyniowej. Te endogenne polisacharydy wywołują aktywność anty-Xa i anty-IIa w osoczu, wzmacniając inhibitorowe działanie antytrombiny lub kofaktora heparyny II [17]. Wykazano, że oligomery procyanidolowe wiążą się do ściany naczyniowej, prawdopodobnie ze względu na wysokie powinowactwo do proliny wbudowanej do elastyny i kolagenu, które są składnikami macierzy pozakomórkowej [3]. Obserwacje poczynione przez autorów niniejszego badania sugerują, że tej lokalnej interakcji nie towarzyszy znaczące uwalnianie TFPI ze śródbłonka.

Inhibitor zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia jest ważnym czynnikiem warunkującym antykoagulacyjne działanie heparyny i jej drobnocząsteczkowych frakcji. Jego inhibitorowe działanie w osoczu jest nasilane przez uwalnianie TFPI ze śródbłonka, następujące po przemieszczeniu z miejsc wiążących heparynę i jej frakcje [14]. Wiadomo, że lecznicze dawki heparyny wywołują znaczący wzrost osoczowego stężenia TFPI: około 3-krotne po podaniu dożylnym i 0,5–2-krotne po podaniu podskórnym [15]. U badanych chorych ani heparyna, ani LMWH (obie zastosowane w znacznie niższych, profilaktycznych dawkach) nie wywoływały istotnego uwalniania TFPI.

Należy podkreślić, że celem niniejszej pracy nie była ocena farmakokinetyki, a tym bardziej eliminacji leków. Eliminacja aktywności anty-Xa nie jest integralnie związana z wydolnością nerek, ale zależy ona od antytrombiny, która unieczynnia proteazy krzepnięcia (trombinę, czynniki Xa, IXa, XIa, XIIa) przez tworzenie z nimi stechiometrycznych kompleksów 1:1, a reakcja ta nasila się w obecności heparyny. Utworzone kompleksy antytrombiny z czynnikami krzepnięcia są usuwane z krążenia w wątrobie na drodze receptorowej [18]. Do badań nie kwalifikowano chorych z niewydolnością nerek na podstawie oznaczenia stężenia kreatyniny. Klirens kreatyniny można wykorzystać w ocenie farmakokinetycznej leku jako miernik filtracji kłębkowej (GFR), gdy dany lek lub jego czynne metabolity są wydalone głównie przez nerki [19]. Eliminacja PO i jego

Procyanidolic oligomers are the natural vegetal components, present especially in fruits and leaves. They have been successfully introduced as an adjunctive medication in the management of chronic venous insufficiency [11–13]. Their efficacy has been attributed to protective action against collagen and elastin degradation in vascular walls [3]. Our study indicates the possibility of additional activity of the procyanidolic oligomers. Following the induction of anti-IIa and anti-Xa activity in plasma, these compounds might also be able to neutralize the destructive influence of serine proteases of coagulation cascade, i.e. thrombin upon the endothelium.

Conclusion

Oral administration of procyanidolic oligomers induces an anticoagulant response in plasma comparable to prophylactic heparin treatment, but not accompanied by TFPI release.

This research was supported by the grant 502-2-01-42 from the Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland.

References

- Niebes P (1987) Physiopathologie de la veine variqueuse. *Act Méd Int*, 48: 1301–1310.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR et al. (2000) A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr*, 130: 2115S–2119S.
- Drubaix I, Viljanen-Tarifa E, Robert AM, Robert L (1995) Rôle des glycosaminoglycannes dans la maladie veineuse, mode d'action de médicaments flavonoïdes. *Pathol Biol*, 43: 461–470.
- Wegrowski J, Robert AM, Moczar M (1984) The effect of procyanidolic oligomers on the composition of normal and hypercholesterolemic rabbits aortas. *Biochem Pharmacol*, 33: 3491–3497.
- Masquellier J, Michaud J, Laparra J, Dumon MC (1979) Flavonoïdes et pycnogénols. *Int J Vitam Nutr Res*, 49: 307–311.
- Masquellier J, Dumon MC, Dumas J (1981) Stabilisation du collagène par les oligomères procyanidoliques. *Acta Ther*, 7: 101–105.
- Robert AM, Tixier JM, Robert L, Legeais JM, Renard G (2001) Effect of procyanidolic oligomers on the permeability of the blood-brain barrier. *Pathol Biol*, 49: 298–304.
- Tixier JM, Godeau G, Robert AM, Hornebeck W (1984) Evidence by in vivo and in vitro studies that binding of pycnogenols to elastin affects its rate of degradation by elastases. *Biochem Pharmacol*, 33: 3933–3939.
- Drubaix I, Maraval M, Robert L, Robert AM (1997) Hyaluronic acid (hyaluronan) levels in pathological human saphenous veins. Effects of procyanidol oligomers. *Pathol Biol*, 45: 86–91.
- Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML et al (2000) Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 945–951.

metabolitów odbywa się głównie z kałem (ok. 70%), a tylko w ograniczony sposób przez nerki (ok. 20%) i drogi oddechowe (ok. 5%) (informacja producenta leku). Eliminacja heparyny podanej w małej zapobiegawczej dawce — czyli takiej, jaką stosowano w niniejszym badaniu — polega na wiązaniu heparyny z receptorami na komórkach śródbłonna i makrofagach, gdzie ulega ona depolimeryzacji. Dopiero dawki lecznicze powodują, że część heparyny jest usuwana przez nerki [20]. Jedynie w przypadku heparyn drobnocząsteczkowych niewydolność nerek jest czynnikiem ograniczającym ich lecznicze zastosowanie. W przyjętych w Polsce wytycznych podaje się, że stężenie kreatyniny powyżej 150 mmol/l, a nie klirens kreatyniny stanowi przeciwwskazanie do stosowania heparyn drobnocząsteczkowych w dawkach leczniczych [21]. Ponadto, w przedstawionej pracy oceniano aktywność antykoagulacyjną osocza w podobnych pod względem demograficznym grupach chorych i grupie kontrolnej. Dlatego czynniki związane z wiekiem w jednakowy sposób wpływały na oznaczane parametry w grupie badanej, jak i grupie kontrolnej.

Oligomery procyanidolowe są naturalnymi składnikami pochodzenia roślinnego, które występują głównie w owocach i liściach. Z powodzeniem znalazły zastosowanie jako leki wspomagające w leczeniu przewlekłej niewydolności żyłnej [11–13]. Ich skuteczność przypisuje się działaniu ochronnemu przed degradacją kolagenu i elastyny w ścianie naczyniowej [3]. Niniejsze badanie wskazuje na możliwość dodatkowego działania oligomerów procyanidolowych. Poza wywoływaniem aktywności anty-Xa i anty-IIa w osoczu te składniki mogłyby również neutralizować destrukcyjny wpływ proteaz serynowych kaskady krzepnięcia, na przykład trombiny na śródbłonu.

Wniosek

Doustne podanie oligomerów procyanidolowych wywołuje w osoczu aktywność antykoagulacyjną podobną do uzyskiwanej podczas zapobiegawczego stosowania heparyny, ale nie powoduje uwolnienia inhibitora zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (TFPI).

Pracę sfinansowano z projektu badawczego 502-2-01-42 Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

- Delacroix P (1981) Étude en double aveugle de l'Endotelon dans l'insuffisance veineuse chronique. *Rev Méd*, 22: 1793–1802.
- Pecking A, Picandet B, Hacene K, Lokiec F, Guerin P (1987) Oligomères procyanidoliques (Endotelon) et système lymphatique. *Arteres Veines*, 6: 512–513.

13. Thebaut JF, Thebaut P, Vin F (1985) Étude de l'Endotelon dans les manifestations fonctionelles de l'insuffisance veineuse périphérique. *Gaz Med Fr*, 92: 22–25.
14. Hoppensteadt DA, Jeske W, Fareed J, Bermes W Jr. (1995) The role of tissue factor pathway inhibitor in mediation of the antithrombotic actions of heparin and low molecular weight heparin. *Blood Coagul Fibrinol*, 6: 57–64.
15. Hoppensteadt DA, Walenga JM, Fasanella A, Jeske W, Fareed J (1995) TFPI antigen levels in normal human volunteers after intravenous and subcutaneous administration of unfractionated heparin and a low molecular weight heparin. *Thromb Res*, 77: 175–185.
16. Laparra J, Michaud J, Lesca MF, Blanquet P, Masquelier J (1978) Étude pharmacocinétique des oligomères procyanidoliques totaux du raisin. *Acta Ther*, 4: 233–245.
17. Sié P, Ofosu F, Fernandez F, Buchanan MR, Petitou M, Boneu B (1986) Respective role of antithrombin III and heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effect of heparin and of various sulphated polysaccharides. *Br J Haematol*, 64: 707–714.
18. Pizzo S (1987) Serpin receptor I: a hepatic receptor that mediates the clearance of antithrombin III — protease complexes. *Am J Med*, 87: 10S.
19. Orłowski T, Gaciong Z, Perkowska-Francka A (1997) Farmakoterapia w niewydolności nerek. In: Orłowski T (ed) *Choroby nerek*. PZWL, Warszawa 148–204.
20. Hirsh J, Fuster V (1994) Guide to anticoagulant therapy. Part I: Heparin. *AHA Medical/Scientific Statement Special Report*. *Circulation*, 89: 1449–1486.
21. Wytyczne profilaktyki i leczenia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (2002) *Med Prakt*, 5 (suppl): 14.