

Dieta bogata w polifenole roślinne obniża agregację płytek krwi u kobiet z rakiem piersi

A polyphenol-rich diet is associated with decreased platelet aggregation in breast cancer patients

Agnieszka Sut¹, Maria Pytel², Marek Zadrożny³, Marcin Różalski¹, Jacek Golański¹

¹Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Onkologiczne Centrum Terapeutyczno-Diagnostyczne Nu-Med, Tomaszów Mazowiecki

³Klinika Chirurgii Onkologicznej i Raka Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Streszczenie

Właściwości przeciwplateletowe i przeciwzapalne związków polifenolowych są dobrze udokumentowane. Celem niniejszej pracy było zbadanie zależności pomiędzy spożyciem polifenoli roślinnych a agregacją płytek krwi u nowo zdiagnozowanych pacjentek z rakiem piersi. Wartość odżywcza diety, w tym spożycie polifenoli roślinnych oszacowano korzystając z bazy *Phenol Explorer* oraz programów dietetycznych. Agregacja płytek krwi była indukowana kwasem arachidonowym (0,5 mmol/l), kolagenem (3,2 µg/ml) lub ADP (6,4 µmol/l) i mierzona we krwi pełnej za pomocą agregometru impedancyjnego Multiplate®. Zarejestrowano znacząco wyższą agregację płytek krwi w grupie pacjentek o niskim spożyciu polifenoli w porównaniu do grupy wysokiego spożycia. Wartości mediany agregacji wyrażonej jako pole pod krzywą agregacji (U) wynosiły odpowiednio: kwas arachidonowy 84,8 vs. 65,3, P=0,003; ADP: 76,5 vs. 67,8, P=0,006; kolagen 79,5 vs. 64,3, P=0,024. Badanie to po raz pierwszy pokazuje związek pomiędzy dietą bogatą w polifenole a obniżoną reaktywnością płytek krwi u kobiet z rakiem piersi.

Abstract

It is well documented that plant polyphenols have both anti-cancer and anti-platelet effects. Hence, the aim of this work was to investigate a relationship between dietary intake of polyphenols and platelet aggregation in newly-diagnosed breast cancer patients. The nutritional value of a diet, including dietary intake of plant polyphenols was estimated. Platelet aggregation was induced with arachidonic acid (0.5 mmol/l), collagen (3.2 µg/ml) or ADP (6.4 µmol/l) and measured using multiple electrode aggregometry (Multiplate®) in whole blood. It was found that platelet aggregation was significantly higher in the low polyphenol intake group than the high intake group: the respective values (area under the aggregation curve recorded in units; U) were arachidonic acid: 84.8 vs. 65.3, P=0.003; ADP: 76.5 vs. 67.8, P=0.006; collagen 79.5 vs. 64.3, p=0.024 respectively. The study indicates, for the first time, an association between diet rich in polyphenols and reduced platelet reactivity in breast cancer patients.

Słowa kluczowe: rak piersi, polifenole, agregacja płytek krwi

Key words: breast cancer, polyphenols, platelet aggregation

Wprowadzenie

Wiele badań dokumentuje przeciwplateletową [1], przeciwzapalną [2] oraz przeciwnowotworową [3] aktywność związków polifenolowych pochodzenia roślinnego. Wykazano również, że za pomocą diety można modulować funkcję płytek krwi [4, 5]. Zjawisko to ma implikacje zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne, stąd przeciwplateletowe i przeciwzapalne właściwości polifenoli próbuje się wykorzystać do wspomaganie profilaktyki i terapii chorób nowotworowych [6, 7].

Dowodzono, że ryzyko wystąpienia raka piersi jest znacznie niższe u kobiet z wysokim spożyciem flawonoli i flawonów. Meta-analiza przeprowadzona przez Grosso i wsp. udowodniła związek

pomiędzy całkowitym spożyciem flawonoidów a zmniejszonym ryzykiem raka piersi [8], natomiast meta-analiza badań typu *case-control* wykazała znaczące obniżenie ryzyka względnego zachorowania na nowotwór związane z wysoką zawartością izoflawonów i lignanów w diecie [9, 10, 11, 12].

Polifenole są grupą heterogenną, stąd prowadzone są badania mające na celu wskazanie grupy związków o najsilniejszym działaniu przeciwnowotworowym, szczególnie w przypadku często występującego raka piersi. Dane epidemiologiczne sugerują, że wysokie spożycie izoflawonów związane jest z korzystnym efektem klinicznym [13, 14]. Kolejnymi grupami polifenoli o wysokiej wartości w profilaktyce i wspomaganie leczenia raka piersi są

flawanole [15] i pochodne stilbenu (głównie resweratrol) [14, 16]. Przeciwnowotworowe działanie różnych związków polifenolowych pochodzenia roślinnego jest wielokierunkowe i związane z ich zdolnością do neutralizowania reaktywnych form tlenu oraz modulującym oddziaływaniem na procesy apoptozy, proliferacji i różnicowania komórek nowotworowych [14, 16].

Jako, że płytki krwi są obecnie postrzegane jako istotny czynnik w progresji choroby nowotworowej, rozważane jest zastosowanie leków przeciwplatek w terapii uzupełniającej i w leczeniu chorób nowotworowych [17, 18].

Ponieważ obecnie nie ma badań opisujących wpływ diety bogatej w polifenole roślinne na reaktywność płytek krwi, celem przeprowadzonego badania było określenie czy wysokie spożycie polifenoli wraz z dietą obniża agregację płytek krwi u pacjentek cierpiących na raka piersi.

Materiały i metody

Pacjenci

Do badania włączono 60 kobiet z rakiem piersi (55,9±14,7 lat). Pacjentki były rekrutowane w Klinice Chirurgii Onkologicznej i Raka

Piersi Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Kryteria włączenia były następujące: obecność lokoregionalnego raka piersi bez obecnej metastazy potwierdzone badaniem histologicznym, brak leczenia onkologicznego w przeszłości. Kryteria wyłączenia stanowiły: stosowanie diet alternatywnych oraz stosowanie leków zawierających kwas acetylosalicylowy lub jego pochodne (na 2 tygodnie przed badaniem). Wszyscy pacjenci podpisali świadomą, dobrowolną zgodę na udział w badaniu. Uzyskano zgodę komisji bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (RNN/21/16/KE). Szczegółowa charakterystyka pacjentek przedstawiona jest w tabeli I.

Pobranie krwi i badania laboratoryjne

Podczas standardowej procedury pobrania krwi, od zakwalifikowanych pacjentów przed operacją pobrano dodatkową próbkę krwi (4,9 ml) w celu wykonania badania agregacji impedancyjnej. Badania morfologii krwi (Sysmex XN-2000, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) oraz poziomu CRP (VITROS CRP Slidemethod, Ortho-Clinical Diagnostics, Inc, Rochester, NY, USA) zostały wykonane w szpitalnym laboratorium.

Z wyników morfologii krwi wyliczono wskaźniki: NLR (*Neutrophil-Lymphocyte Ratio*) jako stosunek bezwzględnej liczby neutrofilii do bezwzględnej liczby limfocytów, wskaźnik PLR (*Platelet-Lymphocyte Ratio*) jako stosunek bezwzględnej liczby płytek krwi do bezwzględnej liczby limfocytów oraz MPVLR (*Mean Platelet Volume-to-Lymphocyte Ratio*) jako wartość średniej objętości płytek krwi do bezwzględnej liczby limfocytów.

Kwestionariusz dietetyczny i oszacowanie pobrania polifenoli

W celu oceny wartości odżywczej diety, w tym spożycia polifenoli roślinnych, użyto kwestionariusza częstości spożycia (FFQ; *Food Frequency Questionnaire*) oraz bazy *Phenol Explorer* [19]. Punktem odcięcia (podstawa podziału na podgrupę o niskim i wysokim pobraniu polifenoli w diecie) była mediana spożycia polifenoli w całej grupie, która wynosiła 1780 mg/dobę.

Wielokanałowa agregometria impedancyjna (MEA, Multiple Electrode Aggregometry)

Agregację płytek we krwi pełnej mierzono za pomocą pięciokanałowego, półautomatycznego agregometru (Multiplate® Analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) według zaleceń producenta. Jako agonistów stosowano: ADP (ADPtest) – stężenie końcowe 6,4 µmol/l, AA (ASPItest) – stężenie końcowe 0,5 mmol/l lub kolagen (COLtest) – stężenie końcowe 3,2 µg/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); wzrost wartości impedancji wynikający z agregacji płytek i ich adhezji do elektrod pomiarowych był rejestrowany w sposób ciągły przez sześć

Tabela I. Charakterystyka pacjentek z rakiem piersi (n=60) podzielonych na podgrupy niskiego i wysokiego spożycia polifenoli.

Zmienne		Grupa wysokiego spożycia polifenoli n=32	Grupa niskiego spożycia polifenoli n=28	P=
Wiek (lata)		57,3±14,8	54,3±14,6	ns
BMI		26,5±3,81	26,9±4,69	ns
Stopień złośliwości nowotworu	G1	3	2	ns
	G2	13	13	ns
	G3	6	5	ns
	nieznany	10	8	ns
Status HER2	Pozytywny	2	3	ns
	Negatywny	13	13	ns
Status ER	Pozytywny	13	14	ns
	Negatywny	5	3	ns
Status PR	Pozytywny	13	14	ns
	Negatywny	7	4	ns
Ki-67 [%]		39	36	ns
Status menopauzalny	Pomenopauzalny	22	20	ns
	Przedmenopauzalny	10	8	ns
Rak piersi w rodzinie	Tak	10	9	ns
	Nie	22	19	ns
Hemoglobina (g/dl)		14,1±4,35	13,2±2,1	ns
Leukocyty (x 10 ⁹ /l)		6,9±1,7	7,7±1,9	0,034
Granulocyty (x 10 ⁹ /l)		4,3±1,4	5,1±1,8	0,014
Limfocyty (x 10 ⁹ /l)		1,98±0,69	1,86±0,74	ns
Płytki krwi (x 10 ⁹ /l)		242,6±6,7	249,4±40,1	ns
Średnia objętość płytek (fL)		10,0±0,8	11,0±1,0	ns
NLR		2,12 (1,91-3,96)	2,96 (1,80-3,76)	0,084
PLR		117,3 (88,8-165,0)	145,7 (110,9-176,4)	ns
MPVLR		5,41 (4,69-6,76)	6,28 (5,43-8,66)	0,055
CRP mg/l		0,25 (0,19-0,40)	0,59 (0,25-0,88)	0,014

Dane ciągłe przedstawiono jako średnią ± SD lub jako medianę (zakres międzykwartylowy: LQ-UQ). Dane jakościowe są przedstawione jako liczby bezwzględne. Istotność różnic analizowano za pomocą testu U Manna-Whitneya (dane ciągłe) lub dokładnego testu Fishera (dane jakościowe).

NLR (*Neutrophil-Lymphocyte Ratio*) - liczba neutrofilii/liczba limfocytów, PLR (*Platelet-Lymphocyte Ratio*) - liczba płytek krwi/ liczba limfocytów, MPVLR (*Mean Platelet Volume-to-Lymphocyte Ratio*) - średnia objętość płytki/liczba limfocytów.

minut. Stopień agregacji płytek wyrażano jako pole pod krzywą (w jednostkach U).

Analiza statystyczna

Do zweryfikowania normalności rozkładu zastosowany został test Shapiro-Wilka, natomiast do określenia jednorodności wariancji test Brown-Forsythe'a. Zmienne posiadające rozkład normalny przedstawione zostały jako wartość średnia i odchylenie standardowe (SD). Zmienne nie wykazujące rozkładu normalnego zostały przedstawione jako mediana i zakresy kwartylowe (od 25% kwartyła do 75% kwartyła). Do charakterystyki reaktywności płytek u pacjentów, zmienne ciągle analizowano za pomocą testu U Manna-Whitney'a, a dane jakościowe testem Fishera. Obliczona wielkość próbki dla mocy co najmniej 0,8 i istotności co najmniej 0,05 wynosiła 30 pacjentów w każdej grupie. Analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania statystycznego StatsDirect w wersji 2.7.8 (StatsDirectLtd, Altrincham, Wielka Brytania).

Wyniki

Spożycie polifenoli

Używając FFQ, oszacowano dzienne spożycie polifenoli roślinnych. Bazując na tych danych, pacjentki zostały podzielone na dwie grupy (punkt odcięcia wynosił 1780mg/dobę): wysokiego spożycia polifenoli - n=32 (HDIP; *High Dietary Intake of Polyphenols*) i niskiego spożycia - n=28 (LDIP; *Low Dietary Intake of Polyphenols*).

Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy grupami w zakresie cech guza: stopnia złośliwości, statusu: receptorowego, HER2 oraz Ki-67. Karmienie piersią było znacząco dłuższe u kobiet w grupie HDIP. Ponadto, stężenie białka CRP, liczba leukocytów i granulocytów było znacznie wyższe w grupie LDIP. Opis grupy badanej przedstawiony jest szczegółowo w tabeli I.

Agregacja płytek krwi

Stopień agregacji płytek krwi (MEA), w grupach niskiego i wysokiego spożycia przedstawiony jest na rycinie 1. Wysokie spożycie polifenoli znacząco obniżyło agregację we krwi pełnej indukowaną AA, ADP, jak również kolagenem (ryc. 1).

Współczynnik korelacji rang Spearmana (Rho)

Stwierdzono statystycznie istotną, ujemną korelację pomiędzy stopniem agregacji płytek a całkowitym spożyciem polifenoli w diecie (stopień korelacji niski do średniego):

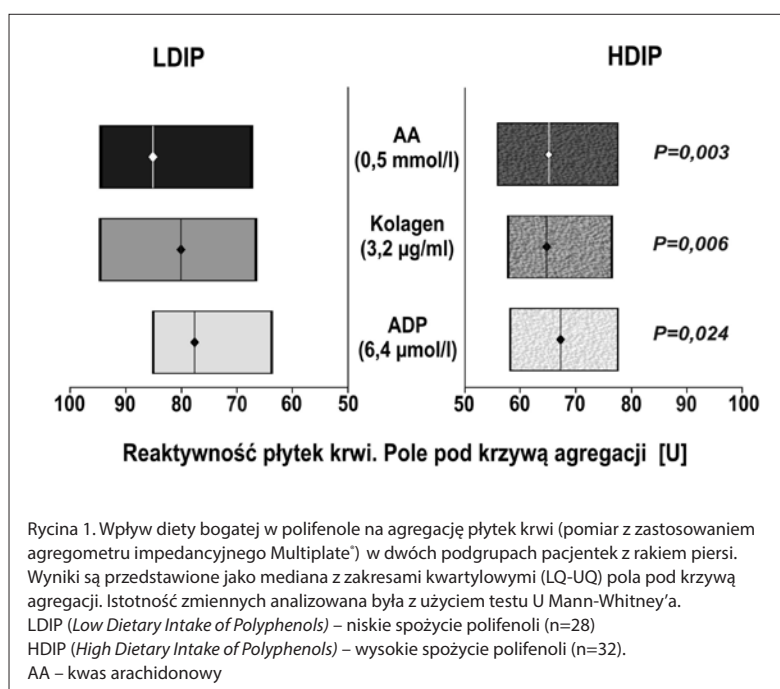
- $Rho = -0,31$ (95% CI: -0,53 do -0,07), $P = 0,009$ dla agregacji indukowanej AA
- $Rho = -0,28$ (95% CI: -0,50 do -0,03), $P = 0,023$ dla agregacji indukowanej kolagenem
- $Rho = -0,23$ (95% CI: -0,48 do -0,01), $P = 0,017$ dla agregacji indukowanej ADP
- $Rho = -0,41$ (95% CI: -0,64 do -0,11), $P = 0,005$ dla CRP

Dyskusja

Coraz częściej pojawiają się publikacje sugerujące zastosowanie leków przeciwplatek jako uzupełnienie standardowej terapii w chorobach nowotworowych [17, 18]. Nasze badania wykazują, że możliwe jest zastosowanie diety bogatej w polifenole jako zamiennika tych leków i przez to ograniczenie możliwych skutków ubocznych związanych z terapią przeciwplatekową. Wykazano, że spożycie co najmniej 100mg flawonoli prowadzi do 3-11% zahamowania agregacji płytek krwi indukowanej kolagenem lub ADP [20]. Bachmair i wsp. donosi, że spożycie flawan-3-oli jest powiązane z obniżoną agregacją wywołaną kolagenem [4]. Wyniki dużej meta-analizy potwierdzają korelację pomiędzy spożywaniem produktów bogatych w polifenole roślinne a znaczącym zahamowaniem agregacji indukowanej kolagenem lub ADP [20]. Z drugiej strony, doskonale wiadomo, że substancje o działaniu przeciwkrzepliwym i przeciwplatekowym, włączając flawonoidy, odgrywają istotną rolę w hamowaniu wzrostu nowotworu. Ponadto, sugeruje się, że hamowanie reaktywności płytek zmniejsza ryzyko i nasilenie metastazy [12]. Dodatkowo, wydzielanie cytokin prozapalnych z aktywowanych płytek krwi przyczynia się do progresji nowotworowej [21].

Wyniki naszych badań obserwacyjnych po raz pierwszy sugerują zależność pomiędzy wysokim spożyciem polifenoli roślinnych i obniżoną reaktywnością płytek krwi u pacjentek z rakiem piersi. Ponadto zauważyliśmy zmniejszenie stężenia markerów stanu zapalnego (leukocytów, CRP) oraz wskaźników wyliczanych z morfologii krwi obwodowej takich jak PLR, NLR, MPVLR.

Zastosowanie współczynników wyliczanych z morfologii w diagnostyce chorób nowotworowych zostało już wcześniej opisane w publikacji Wójcik i wsp. [22], w której zauważono istotnie wyższą liczbę leukocytów, bezwzględną liczbę neutrofilii, płytek krwi i stężenie CRP oraz istotnie niższą bezwzględną liczbę limfocytów u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Wartości NLR i PLR u chorych były znacznie wyższe niż w grupie referencyjnej.



Wyniki naszego badania są obiecujące i będą ponownie analizowane na większej grupie pacjentów. Wiadomo, że pozytywny wpływ polifenoli przyjmowanych z dietą na przebieg chorób nowotworowych jest wielokierunkowy [14, 16]. Niniejsza praca skupia się głównie na przeciwplatekownych właściwościach tych związków. Na obecnym etapie badań nie możemy dokładnie opisać szczegółowego mechanizmu odpowiadającego za interakcje płytki krwi – stan zapalny - rak piersi, niemniej badania wstępne ukazują możliwość działania przeciwplatekowego i przeciwzapalnego polifenoli zawartych w diecie kobiet z rakiem piersi, co może być wykorzystane jako innowacyjna, nefarmakologiczna, naturalna terapia wspomagająca.

Wykazanie w niniejszej pracy, że dieta bogata w polifenole roślinne obniża agregację płytek krwi u kobiet chorujących na raka piersi jest szczególnie interesujące, gdyż w aktualnie prowadzonych badaniach nie udało się nam wykazać podobnej zależności u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i w grupie kontrolnej (dane przygotowujemy do publikacji).

Wskazana jest także dalsza analiza grup związków polifenolowych o najsilniejszych właściwościach przeciwplatekowych w tym typie schorzenia nowotworowego. W polskiej populacji mogą to być flawanole obecne w herbacie i czekoladzie (dane przygotowujemy do publikacji).

Wnioski

Wyniki pracy sugerują konieczność uwzględniania diety bogatej w związki bioaktywne jako czynnika hamującego reaktywność płytek krwi u pacjentek z nowotworem piersi.

Należy zweryfikować przeciwzapalne działanie polifenoli zawartych w diecie i wytypować związki polifenolowe przydatne w profilaktyce i leczeniu raka piersi w polskiej populacji.

Podziękowania

Badania były finansowane z grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (No. 503/6-020-01/503-01).

Piśmiennictwo

1. Faggio C, Sureda A, Morabito S, et al. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *Eur J Pharmacol.* 2017; 807: 91-101.
2. Pounis G, Bonaccio M, Di Castelnuovo A, et al. Polyphenol intake is associated with low-grade inflammation, using a novel data analysis from the Moli-sani study. *Thromb Haemost.* 2016; 115: 344-352.
3. Gardaneh M, Shojaei S, Rahimi Shamabadi A, et al. Breast Cancer Cell Apoptosis is Synergistically Induced by Curcumin, Trastuzumab, and Glutathione Peroxidase-1 but Robustly Inhibited by Gli1 Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Nutr Cancer.* 2018; 70: 288-296.
4. Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, et al. Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacol Ther.* 2014; 144: 97-113.
5. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018; 73: 318-326.
6. Shapira N. The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention. *Eur J Cancer Prev.* 2017; 26: 385-395.
7. Lazzaroni M, Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S, et al. A Presurgical Study of Lecithin Formulation of Green Tea Extract in Women with Early Breast Cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa).* 2017; 10: 363-370.

8. Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61.
9. Kowalczyk A, Bodalska A, Miranowicz M, et al. Insights into novel anticancer applications for apigenin. *Advances in Clinical and Experimental Medicine.* 2017; 26: 1143-1146.
10. Hui C, Qi X, Qianyong Z, et al. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One.* 2013; 8: e54318.
11. Lei L, Yang Y, He H, et al. Flavan-3-ols consumption and cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Oncotarget.* 2016; 7: 73573-73592.
12. Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur J Med Chem.* 2017; 142: 213-228.
13. Maskarinec G, Ju D, Morimoto Y, et al. Soy Food Intake and Biomarkers of Breast Cancer Risk: Possible Difference in Asian Women? *Nutr Cancer.* 2017; 69: 146-153.
14. Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2017; 20: 512-521.
15. Zhu W, Jia L, Chen G, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates radiation-induced acute skin damage in breast cancer patients undergoing adjuvant radiotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7: 48607-48613.
16. Dybkowska E, Sadowska A, Swiderski F, et al. The occurrence of resveratrol in foodstuffs and its potential for supporting cancer prevention and treatment. A review. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny.* 2018; 69: 5-14.
17. Denslow A, Switalska M, Jarosz J, et al. Clopidogrel in a combined therapy with anticancer drugs-effect on tumor growth, metastasis, and treatment toxicity: Studies in animal models. *PLoS One.* 2017; 12: e0188740.
18. Mitrugno A, Sylman JL, Rigg RA, et al. Carpe low-dose aspirin: the new anti-cancer face of an old anti-platelet drug. *Platelets.* 2017; 1-6.
19. Grosso G, Stepaniak U, Topor-Madry R, et al. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition.* 2014; 30: 1398-1403.
20. Ostertag LM, O'Kennedy N, Kroon PA, et al. Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54: 60-81.
21. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets.* 2018: 1-5.
22. Wojcik E, Stasiak Z, Rychlik U, et al. NLR and PLR ratios in prognostic assessment of non-small cell lung cancer patients. *Diagn Lab.* 2016; 52: 13-20.

Autor do korespondencji:

dr hab. Jacek Golański
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
tel. +48 42 2725731
e-mail: jacek.golanski@umed.lodz.pl

Otrzymano: 18.06.2018

Akceptacja do druku: 06.07.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów