

## ЭФФЕКТ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОПОЛИСА НА СОСТОЯНИЕ РЕДОКС СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У ЧЕЛОВЕКА: ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

С. ЕРА<sup>1</sup>, Х. ИМАЙ<sup>1</sup>, К. ОКИНАРА<sup>2</sup>, А. НАКАЦУМА<sup>2</sup>, Х. ЯМАДА<sup>2</sup>, ЯПОНИЯ

S. ERA<sup>1</sup>, H. IMAI<sup>1</sup>, T. HAYASHI<sup>1</sup>, K. OKIHARA<sup>2</sup>, A. NAKATSUMA<sup>2</sup>, H. YAMADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, JAPAN

Tel.: +81-58-267-2225, Fax: +81-58-267-2962, E-mail: era@cc.gifu-u.ac.jp, imai@cc.gifu-u.ac.jp

<sup>2</sup> Yamada Apiculture Center, Inc., 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, JAPAN

Tel.: +81-868-54-1199, Fax: +81-868-54-7004, E-mail: 0342@yamada-bee.com, 0438@yamada-bee.com

### Аннотация

Альбумин сыворотки человеческой (HSA) является смесью меркаптальбумина (HMA, сокращенная форма) и нонмеркаптальбумина (HNA, окисляемая форма). HMF, с одним остатком сульфгидрила, отвечает за самую крупную фракцию реактивного сульфгидрила из экстраклеточных жидкостей и, вероятно, в большой степени участвует в противоокислительной экстраклеточной системе. Нами разработана приемлемая система высококачественной жидкостной хроматографии (HPLC) для сепарирования HSA на HMA и HNA. С помощью данного метода нами получено среднее значение  $[HMA/(HMA + HNA)]$ , например  $f(HMA)$  73,2% ( $n = 20$ ) для здоровых молодых мужских особей. В нашей работе мы исследовали эффект поглощения прополиса на состояние редокс HSA у пациентов с острым окислительным стрессом, как в случае терапии рака. В случае пациента с циррозом печени и раком пищевода (мужчина, 68 лет), значение  $f(HMA)$  до радиотерапии и поглощения прополиса составляло 66,6%. В течение двух недель радиотерапии он принимал ежедневно по 10 таблеток прополиса (52,5 мг бразильской вытяжки прополиса/день). Он продолжал принимать таблетки 4 недели. Значения  $f(HMA)$  до, немедленно после и спустя 4 недели после радиотерапии составляли, соответственно, 63,5, 67,7 и 74,1%. Это показывает, что окислительное состояние от радиотерапии можно снижать с помощью прополиса. Более того, постепенное повышение значения  $f(HMA)$  показывает, что противоокисляющие свойства прополиса могут увеличивать общую противоокисляющую способность больных раком.

**Ключевые слова:** прополис/окисляющий стресс/состояние редокс/сывороточный альбумин (человека)

### Введение

Альбумин из человеческой сыворотки (HSA) является самым обильным протеином кровеносной системы и имеет ряд функций. Известно, что он играет важную роль в осмотическом регулировании кровеносной жидкости сосудистой системы и способен транспортировать разнообразные эндогенные и экзогенные вещества в теле (ПЕТЕРС, 1966). Другой функциональной ролью данной молекулы является, вероятно, поддержание потенциала редокс во внеклеточных жидкостях, так как является смесью меркаптальбумина (сокращенная форма у человека, HMA) с нонмеркаптальбумина (окисленная форма у человека, HNA), например пара редокс из плазмы (СОГАМИ с сотр., 1984; СОГАМИ с сотр., 1985а: СОГАМИ с сотр., 1985b). HMA владеет свободной сульфгидрильной группой в позиции 34 (Cys-34) и отвечает за самую крупную фракцию свободного сульфгидрила во внеклеточных жидкостях. HNA состоит из не менее трех типов соединений. Мажорное соединение его – это смесь бисульфида с цистеином или глутатионом  $[HNA(Cys)]$  или  $[HNA(Glut)]$ , а другой является продуктом окисления в большей степени чем смесь дисульфида, как сульфениевая стадия (-SOH)б сульфеническая (-SO<sub>2</sub>H), а  $[HNA(Ox)]$  является минорной составной частью внеклеточных жидкостей (ЕРА с сотр., 1989).

Нами разработана удобная система успешной жидкостной хроматографии (HPLC) для ясного сепарирования HSA в HMA и HNA. применяя Shodex-Asahipak GS-530H или колонку ES-502N. Мы интенсивно изучали динамические изменения состояния редокс HSA в различных физиопатологических состояниях (СУЗУКИ с сотр., 1992; ХАЯКАВА с сотр., 1997; ХАЯШИ с сотр., 2000; КАВАИ с сотр., 2001; СОЭЖИМА с сотр., 2002; ТОМИДА с сотр., 2003). На основе полученных результатов нами отмечено, что фракция HMA  $[f(HMA)]$  существенно понизилась в случае ряда заболеваний сравнительно с ней у здоровых лиц, у которых почти никаких изменений значения  $f(HMA)$  не установлено.

Цель настоящей работы исследование влияния поглощения прополиса на состояние редокс HSA у пациентов с острым окислительным стрессом, например у пациентов, принимающих курс лечения против рака, так как считается, что прополис играет довольно успешную роль как противоокислительная добавка (БАНСОТА с сотр., 2001).

## Материал и методика

Исследованиям подвергнуты два пациента с желудочнокишечным раком. Один из них (женщина, 56 лет) страдала раком желудка и потерпела целебную гастректомию. Второй пациент (мужчина, 68 лет) страдал циррозом печени и раком пищевода и был подвергнут радиотерапии против рака пищевода. Контролем служил здоровый мужчина (45 лет) без почечных или печеночных болезней (один из авторов работы Х.И.). Использована спиртная вытяжка прополиса из Бразилии (каждая таблетка содержала 52,5 мг вытяжки прополиса, Yamada Apiculture Center Inc., Okayama, Japan). От каждого пациента получено согласие на процедуру, которая выполнена в соответствии с Хельсинской Декларации. Пробы крови были введены в пробирки под вакуумом (EDTA-2K, Terumo Co., Tokyo, Japan), которые центрифугированы в течение 20 мин (3000 вращений/мин) в центрифуге Kubota 2100 (Kubota Manufacturing Co., Tokyo, Japan). Полученная плазма подвергнута фильтрованию под давлением при использовании фильтра Cosmonice (0,45  $\mu$ m, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan). Пробы складированы до анализа HPLC при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Система HPLC состоит из автопрелеватором проб модель AS-8010, насоса с автоплунжером модели CCPM и детектора с флюоресценцией модели FS-8000 (длина волны возбуждения нм, длина волны эмиссии 340 нм) в сочетании с системой сверхконтроля модели SC-8020, все от Tosoh Co., Japan. Использована колонка Shodex-Asahipak ES-502N (10 x 0,76 cm I.D., форма DEAE для обмена ионов HPLC, Showa Denko., Japan; температура колонки  $-35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Элюирование осуществлено линейным градиентом для повышения концентрации этанола от 0 до 5% в буферном растворе 0,05 М ацетата натрия  $-0,40$  М сульфата натрия (pH 4,85) при скорости течения 1 мл/мин. Пробы сыворотки иницированы с помощью автопрелеватором проб объемом 2  $\mu$ л.

Для определения значения каждой фракции альбумина, например [HMA/(HMA + HNA)] и  $f(\text{HNA}) = [\text{HNA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$ , полученные профили HPLC были подвергнуты адаптивному к числовой кривой; каждая форма пика приблизительно оценена функцией Гаусса.

## Результаты и дискуссии

Известно, что HSA является смесью HMA и HNA. Более того, существует много типов HNA, например HNA(Cys), HNA(Glut) и HNA(Oxi). Ясное сепарирование трех фракций HSA, например HMA, [HNA(Cys) & HNA(Glut)] (названная в данной работе HNA-1) и HNA(Oxi), (названная HNA-2) осуществлена нами нашей системой HPLC. Наши предыдущие исследования показали, что состояние редокс HSA можно использовать как биомаркирующего показателя окислительного стресса тела (EPA с сотр., 1995; ХАЯШИ с сотр., 2000; ИМАИ с сотр., 2002; ТОМИДА с сотр., 2003).

Рис. 1А и 1В показывают представительные профили HPLC HSA для здорового субъекта (мужчина, 45 лет) и больного с циррозом печени и рака пищевода (мужчина, 68 лет). Отмечено явное сепарирование фракций HMA, HNA-1 и HNA-2. Значения фракций HMA, HNA-1 и HNA-2 составляли 74,0, 24,3 и 1,7% (рис. 1А), соответственно 63,5, 34,8 и 1,7% (рис. 1В). Значение  $f(\text{HMA})$  в 74,0% для здорового субъекта данного исследования не различалось от среднего значения  $f(\text{HMA})$  ранее отмеченное для здоровых субъектов ( $73,2 \pm 2,3\%$ ) (ИМАИ с сотр., 2002). Значение  $f(\text{HMA})$  в 63,5% пациента с раком пищевода было достоверно ниже, чем у нормальных субъектов, указывая, что у этого пациента с раком механизм защиты против окислительного стресса было, вероятно, намного ниже. Так как не имеются исследования *in vivo* о противоокислительном эффекте прополиса, нами сначала изучено влияние поглощения прополиса на состояние редокс HSA в случае здорового субъекта (мужчина, 45 лет). Он принимал ежедневно в течение 4 недель 12 таблеток. К нашему удивлению значение  $f(\text{HMA})$  постепенно повысилось от 74,0 (рис. 1А) до 79,2%, а  $f(\text{HNA-1})$  постепенно снизилось от 24,3 (рис. 1А) до 19% в течение 4 недель. Это подсказывает, что противоокислительный уровень мог бы повышаться при добавлении прополиса. Вот почему нами исследовано влияние применения прополиса на состояние редокс у двух пациентов с желудочнокишечным раком, подвергнутых противораковой терапии.

*Случай 1:* женщина (56 лет) с раком желудка, с целебной гастректомией. Она жаловалась об отсутствии аппетита, причиненном, вероятно, гастректомией. Она принимала ежедневно в течение 1 недели по 5 таблеток прополиса, в течение других 12 недель по 6 таблеток в день и продолжала принимать по 10 таблеток в день в течение других еще 8 недель. В течение периода добавления прополиса аппетит немного улучшился, а значение  $f(\text{HMA})$  поддерживалось в пределах от 73 до 79%, показывая, что прополис является потенциально активным веществом в борьбе с окислительным стрессом.

Случай 2: мужчина (68 лет) с циррозом печени и раком пищевода, леченный радиотерапией. Значение  $f(\text{HMA})$  до радиотерапии и поглощения прополиса составляло 66,6%. Во время радиотерапии (2 недели) он ежедневно принимал по 10 таблеток прополиса. Он продолжал принимать таблетки еще 4 недели. Значения  $f(\text{HMA})$  до, немедленно после и спустя 4 недели после радиотерапии составляли 63,5 (профиль HPLC дан на рис. 1B), 67,7, соответственно, 74,1%. Известно, что радиотерапия  $^{60}\text{Co}$ , даже при терапевтической дозе для человека, вызывает серию радикалов кислорода, о которых есть общее мнение, что являются ответственными за многочисленные состояния окислительного стресса (ДЕВИС, 1987). Во всяком случае, наши наблюдения за значением  $f(\text{HMA})$  в случае 2 подсказывают, что окислитель состояние от радиотерапии может быть снижено добавлением прополиса. Более того, постепенное повышение значения  $f(\text{HMA})$  показывает, что антиокислительные свойства прополиса могли бы повышать общую антиокислительную способность пациентов с раком.

По нашему мнению наши наблюдения поддерживаются и тем, что прополис играет благоприятную роль как антиокислительная добавка. Как мы знаем, это первое исследование *in vivo*, которое анализирует окисленный и сокращенный альбумин в случае пациентов с раком и острым окислительным стрессом и доказал антиокислительный эффект прополиса. Для утверждения этого, а также для определения клинической достоверности доложенного необходимо проводить исследования на эту тему и в дальнейшем (с использованием большего числа пациентов).

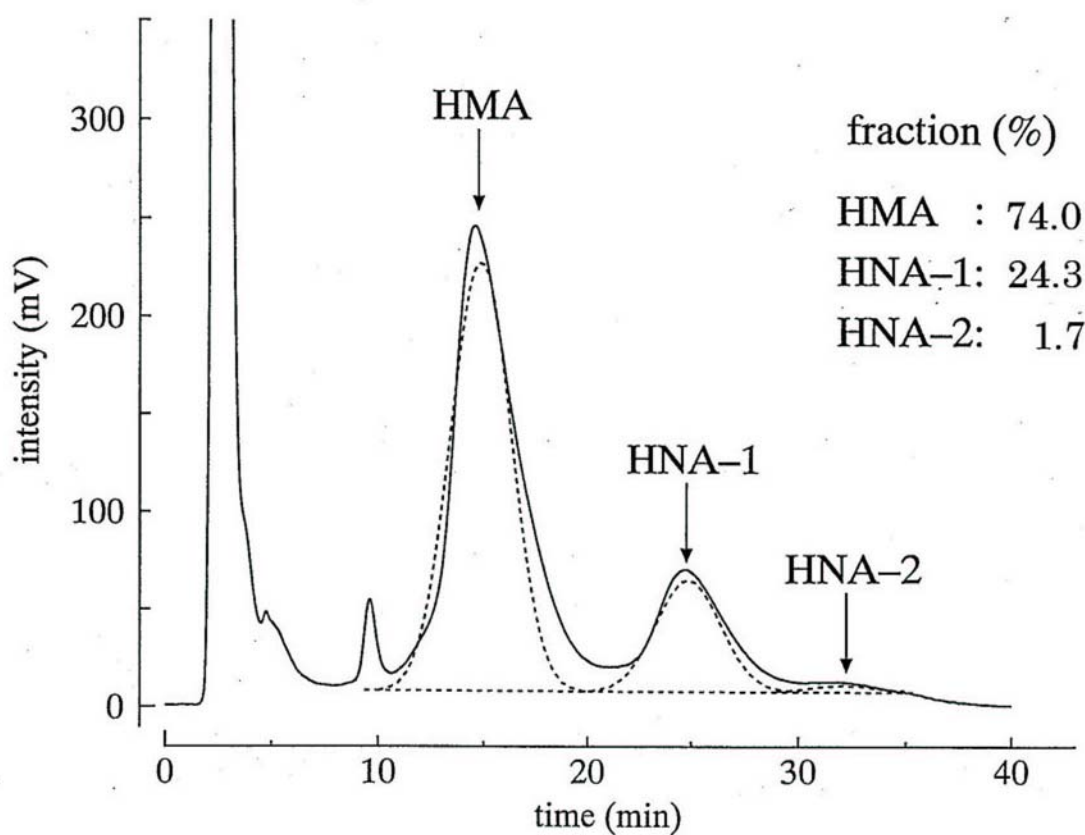


Рис. 1А

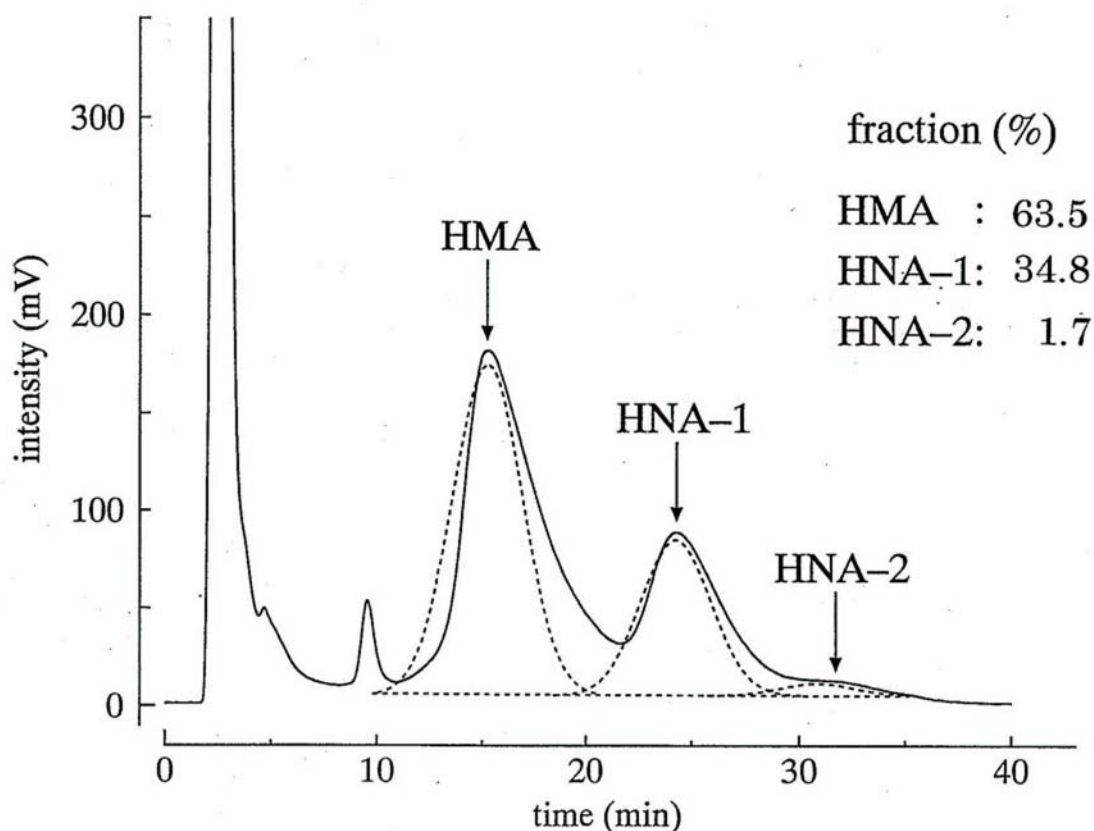


Рис.1В

Рис. 1 Профили HPLC, представительные для сыворотки от (А) здорового субъекта (мужчина, 45 лет) и (В) пациента с циррозом печени и раком пищевода (мужчина, 68 лет), полученные системой HPLC с флуоресцентным детектированием (длина волны возбуждения 280 нм; длина волны эмиссии 340 нм).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Banskota H.A., Tezuka Y., Kadata S., Recent progress in pharmacological research of propolis, *Phytotherapy Res.*, 15 (2001), 561-571
- Davies K.J.A., Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987), 9895-9901
- Era S., Hamaguchi T., Sogami M. et al., Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 31 (1989), 435-442
- Era S., Kuwata K., Imai H. et al., Age-related change in redox state of human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1995), 12-16
- Hayakawa A., Kuwata K., Era S. et al., Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery, *J. Chromatogr. B*, 98 (1997), 27-33
- Hayashi T., Era S., Kawai K. et al., Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract, *Pathophysiology*, 6 (2000), 237-243
- Imai H., Hayashi T., Negawa T., et al., Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training, *Jpn. J. Physiol.*, 52 (2002), 135-140
- Kawai K., Yoh M., Hayashi T. et al., Effect of diabetic retinopathy on redox state of aqueous humor and serum albumin in patients with senile cataract, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 26 (2001), 93-99
- Peters T. Jr., All about albumin, New York, Academic Press, 1996
- Soejima A., Kaneda F., Manno S. et al., Useful markers for detecting decreased serum antioxidant activity in hemodialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.*, 39 (2002), 1040-1046
- Sogami M., Nagaoka S., Era S., et al., Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 24 (1984), 96-103
- Sogami M., Era S., Nagaoka S., et al., HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 25 (1985), 398-402
- Sogami M., Era S., Nagaoka S. et al., High-performance liquid chromatographic studies on mercapt = nonmercapt conversion of human serum albumin II, *J. Chromatogr.*, 332 (1985), 19-27
- Suzuki E., Yasuda K., Takeda N. et al., Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus, *Diabetes Res. Clin. Prac.*, 18 (1992), 153-158
- Tomida M., Hayashi T., Ishimaru J. et al., Observation for the redox state of human synovial fluid albumin from patients with temporomandibular joint disorders, *Acta Sch. Med. Univ. Gifu*, 51 (2003), 21-28