

INFLUENȚA INGERĂRII DE PROPOLIS ASUPRA STĂRII REDOX AL ALBUMINEI DIN SERUL UMAN: UN STUDIU EFECTUAT PE PACIENȚI CU STRES OXIDATIV SEVER

S. ERA¹, H. IMAI¹, T. HAYASHI¹, K. OKIHARA², A. NAKATSUMA², H. YAMADA²

¹ Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, JAPONIA

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

² Yamada Apiculture Center, Inc., 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, JAPONIA

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

Rezumat

Albumina din serul uman (ASU) este un amestec de mercaptalbumină (UMA, forma redusă) și nonmercaptalbumină (UNA, formă oxidată). UMA, cu un singur reziduu de sulfhidril este responsabilă pentru cea mai mare fracțiune de sulfhidril reactiv din fluidele extracelulare și s-ar părea că participă în mare măsură la sistemul antioxidant extracelular. Noi am elaborat un sistem convenabil de cromatografie lichidă de performanță înaltă (HPLC) pentru separarea clară a lui ASU în UMA și UNA. Cu ajutorul acestei metode am obținut o valoare medie a [ASU/(UMA + UNA)], de exemplu f(UMA) de 73,2% (n=20) pentru subiecți masculini tineri sănătoși. În prezentul studiu am examinat influența ingerării de propolis asupra stării redox al ASU la pacienți cu stres oxidativ sever, cum este cazul terapiei cancerului. În cazul unui pacient cu ciroză hepatică și cancer esofagian (bărbat, 68 ani), valoarea f(UMA) înaintea radioterapiei fără ingerare de propolis a fost de 66,6%. Pe parcursul celor 2 săptămâni de radioterapie el a luat zilnic 10 tablete de propolis (525 mg de extract de propolis brazilian/zi), după aceea continuând să le ia timp de 4 săptămâni. Valorile f(UMA) înainte, imediat, după și la 4 săptămâni după radioterapie au fost de 63,5, 67,7 respectiv 74,1%. Acestea indică că starea oxidativă datorată radioterapiei poate fi atenuată prin suplimentarea de propolis. Mai mult, o creștere gradată a valorii f(UMA) indică că proprietățile antioxidante ale propolisului pot mări capacitatea totală antioxidantă a pacienților bolnavi de cancer.

Cuvinte cheie: propolis / stres oxidativ / stare redox / albumină din ser (uman)

Introducere

Albumina din serul uman (ASU) este proteina cea mai abundentă din sistemul circulator și are o serie de funcții. Este binecunoscut faptul că joacă un rol important în regularizarea osmotică a fluidului circulator din sistemul vascular și că este capabilă să transporte o mare varietate de substanțe endogene și exogene prin corp (PETERS, 1996). Un alt rol funcțional al acestei molecule pare să fie menținerea potențialului redox în fluidele extracelulare, deoarece este un amestec de mercaptalbumină (forma redusă; la oameni, UMA) și nonmercaptalbumină (forma oxidată; la oameni, UNA), de ex. cuplul redox din plasmă (SOGAMI et al., 1984; SOGAMI et al., 1985a; SOGAMI et al., 1985b). UMA are un grup sulfhidril liber în poziția 34 (Cys-34) și este responsabilă pentru fracțiunea cea mai mare de sulfhidril liber în fluidele extracelulare. UNA este alcătuită din cel puțin trei tipuri de compuși. Compusul major al UNA este amestecul de bisulfid și cisteină sau glutation [UNA(Cys) sau UNA (Glut)], iar celălalt este un produs de oxidare mai mare decât amestecul de disulfid, precum stadiul sulfenic (-SOH), sulfenic (-SO₂H) sau sulfonic (-SO₃H), [UNA(Oxi)] fiind o componentă minoră a fluidelor extracelulare (ERA et al., 1989).

Noi am elaborat un sistem convenabil de cromatografie lichidă de performanță înaltă (HPLC) pentru separarea clară a ASU în UMA și UNA, folosind un Shodex-Asahipak GS-520H sau o coloană ES-502N, și am studiat schimbările dinamice ale stării redox al ASU în diferite stări fiziopatologice (SUZUKI et al., 1992; HAYAKAWA et al., 1997; HAYASHI et al., 2000; KAWAI et al., 2001; SOEJIMA et al., 2002; TOMIDA et al., 2003). În baza rezultatelor obținute am constatat că fracțiunea lui UMA [f(UMA)] a descrescut substanțial în diferite boli în comparație cu cea a unor subiecți sănătoși, la care nu s-a constatat aproape deloc o schimbare a valorii f(UMA).

Scopul prezentului studiu a fost investigarea influenței ingerării de propolis asupra stării redox a ASU la pacienți cu stres oxidativ sever, cum ar fi cei în tratament contra cancerului, deoarece se consideră că propolisul, unul dintre produsele albinelor, joacă un rol benefic ca supliment antioxidant (BANSKOTA et al., 2001).

Materiale și metode

Au fost studiați doi pacienți cu cancer gastrointestinal. Un pacient (femeie, 56 de ani) suferea de cancer gastric și făcuse o gastrectomie curativă. Un alt pacient (bărbat, 68 de ani) suferea atât de ciroză hepatică cât și de cancer esofagian, independente una de cealaltă, și fusese supus radioterapiei împotriva cancerului esofagian. Un subiect sănătos (bărbat, 45 de ani) fără antecedente de boli renale sau hepatice a

participat drept control la acest studiu (unul dintre autori; H.I.). Ca supliment de propolis a fost folosit un extract alcoolic de propolis brazilian (fiecare tabletă de propolis conținea 52,5 mg extract de propolis, Yamada Apiculture Center Inc., Okayama, Japonia). De la fiecare subiect s-a obținut un consimțământ informativ și toate procedurile au fost efectuate în concordanță cu Declarația de la Helsinki. Probele de sânge au fost introduse în eprubete colectoare de sânge sub vid (EDTA-2K, Terumo Co., Tokyo, Japonia), care au fost centrifugate timp de 20 minute la 3.000 rpm într-o centrifugă Kubota 2100 (Kubota Manufacturing Co., Tokyo, Japonia). Plasma rezultată a fost supusă apoi filtrării sub presiune, folosindu-se un filtru Cosmonice (0,45 μ m, Nacalai Tesque., Inc., Kyoto, Japan), speciemenle fiind depozitate până la analiza HPLC la -80°C .

Sistemul HPLC este alcătuit dintr-un autoprovelator de probe model AS-8010, o pompă cu plonjor dublu model CCPM și un detector cu fluorescență model FS-8000 (lungimea undei de excitare 280 nm; lungimea undei de emisie 340 nm) în combinație cu un sistem de supracontrol model SC-8020, toate provenind de la Tosoh Co., Japonia. A fost folosită o coloană Shodex-Asahipak ES-502 N (10 x 0,76 cm I.D., formă DEAE pentru schimb de ioni HPLC, Showa Denko., Japonia; temperatura coloanei $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Eluarea a fost efectuată cu un gradient linear pentru creșterea concentrației de etanol de la 0 la 5% într-un tampon de 0,05 M acetat de sodiu -0,40 M sulfat de sodiu (pH 4,85) (tampon de acetat-sulfat) la o viteză de curgere de 1 ml/min. Probele de ser au fost injectate cu ajutorul unui autoprovelator de probe cu un volum fix de 2 μ l.

Pentru determinarea valorii fiecărei fracțiuni de albumină, de ex. $f(\text{UMA}) = [\text{UMA}/(\text{UMA} + \text{UNA})]$ și $f(\text{UNA}) = [\text{UNA}/(\text{UMA} + \text{UNA})]$, profilele HPLC obținute au fost supuse unei adaptări la o curbă numerică; fiecare formă de peak a fost aproximată cu o funcție Gauss.

Rezultate și discuții

Se știe că ASU este un amestec de UMA și UNA. În plus, există mai multe tipuri de UNA, ca de ex. UNA (Cis), UNA (Glut) și UNA (Oxi). O separare clară a celor trei fracțiuni de ASU, de ex. UMA, [UNA(Cis) & UNA (Glut)] (numită în acest studiu UNA-1) și UNA (Oxi) (numită UNA-2) a fost efectuată în acest studiu cu sistemul nostru de HPLC. Studiile noastre anterioare au demonstrat că starea redox ASU poate fi folosită ca un indice biomarcator al stresului oxidativ din corp (ERA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000; IMAI et al., 2002; TOMIDA et al., 2003).

Figura 1A și figura 1B redau profilele reprezentative HPLC al ASU pentru un subiect sănătos (bărbat, 45 de ani) respectiv un pacient bolnav de ciroză hepatică și cancer esofagian (bărbat, 68 de ani). A existat o separare clară a fracțiunilor UMA, UNA-1 și UNA-2. Valorile fracțiunilor UMA, UNA-1 și UNA-2 au fost de 74,0, 24,3 și 1,7% (fig. 1A) respectiv 63,5, 34,8 și 1,7% (fig. 1B). Valoarea $f(\text{UMA})$ de 74,0% pentru subiectul sănătos al acestui studiu nu s-a deosebit de valoarea medie $f(\text{HMA})$ raportată anterior pentru subiecți sănătoși ($73,2 \pm 2,3\%$) (IMAI et al., 2002). Valoarea $f(\text{UMA})$ de 63,5% al pacientului cu cancer esofagian a fost semnificativ mai scăzută decât cea a subiecților normali, indicând că la acest pacient cu cancer mecanismul de apărare față de stresul oxidativ a fost probabil considerabil redus. Deoarece nu există studii *in vivo* despre efectul antioxidant al propolisului, noi am examinat mai întâi influența ingerării de propolis asupra stării redox al ASU în cazul unui subiect sănătos (bărbat, 45 de ani). Acesta a luat zilnic timp de 4 săptămâni 12 tablete. În mod surprinzător valoarea lui $f(\text{UMA})$ a crescut treptat de la 74,0 (fig. 1A) la 79,2% iar cea a lui $f(\text{UNA-1})$ a scăzut în decurs de 4 săptămâni treptat de la 24,3 (fig. 1) la 19%. Acest lucru sugerează că nivelul antioxidant ar fi putut să crească ca urmare a suplimentării de propolis. De aceea am examinat influența ingerării de propolis asupra stării redox al ASU la doi pacienți suferind de cancer gastrointestinal și care erau supuși unei terapii anticancer.

Cazul I: femeie 56 de ani suferind de cancer gastric, cu gastrectomie curativă. Ea s-a plâns de lipsa poftii de mâncare, cauzată probabil de gastrectomie. Ea a luat zilnic timp de 1 săptămână 5 tablete de propolis pe zi, alte 12 săptămâni 6 tablete pe zi și a continuat să ia 10 tablete pe zi încă timp de 8 săptămâni. În timpul perioadei de suplimentare a propolisului s-a îmbunătățit puțin apetitul, iar valoarea $f(\text{UMA})$ a fost menținută între 73 și 79%, indicând faptul că propolisul este o substanță potențial eficientă în combaterea stresului oxidativ.

Cazul II: bărbat de 68 de ani cu ciroză hepatică și cancer esofagian, tratat cu radioterapie. Valoarea $f(\text{UMA})$ înaintea radioterapiei și a ingerării de propolis a fost de 66,6%. În timpul radioterapiei de 2 săptămâni a luat zilnic zece tablete de propolis și a continuat să le ia timp de 4 săptămâni. Valorile $f(\text{UMA})$ imediat înainte, imediat după și la 4 săptămâni după radioterapie au fost de 63,5 (un profil HPLC este redat în fig. 1B), 67,7 respectiv 74,1%. Se știe că radioterapia cu ^{60}Co , chiar dacă este o doză terapeutică pentru oameni, produce o serie de radicali de oxigen, despre care există părerea generală că sunt răspunzători pentru numeroase stări de stres oxidativ (DAVIES, 1987). Oricum, constatările noastre referitoare la valoarea $f(\text{UMA})$ în cazul 2 sugerează că starea oxidativă datorată radioterapiei poate fi atenuată prin suplimentarea de propolis. Mai mult, creșterea treptată a valorii $f(\text{UMA})$ indică că proprietățile antioxidante ale propolisului ar putea mări capacitatea antioxidantă totală a pacienților suferinzi de cancer.

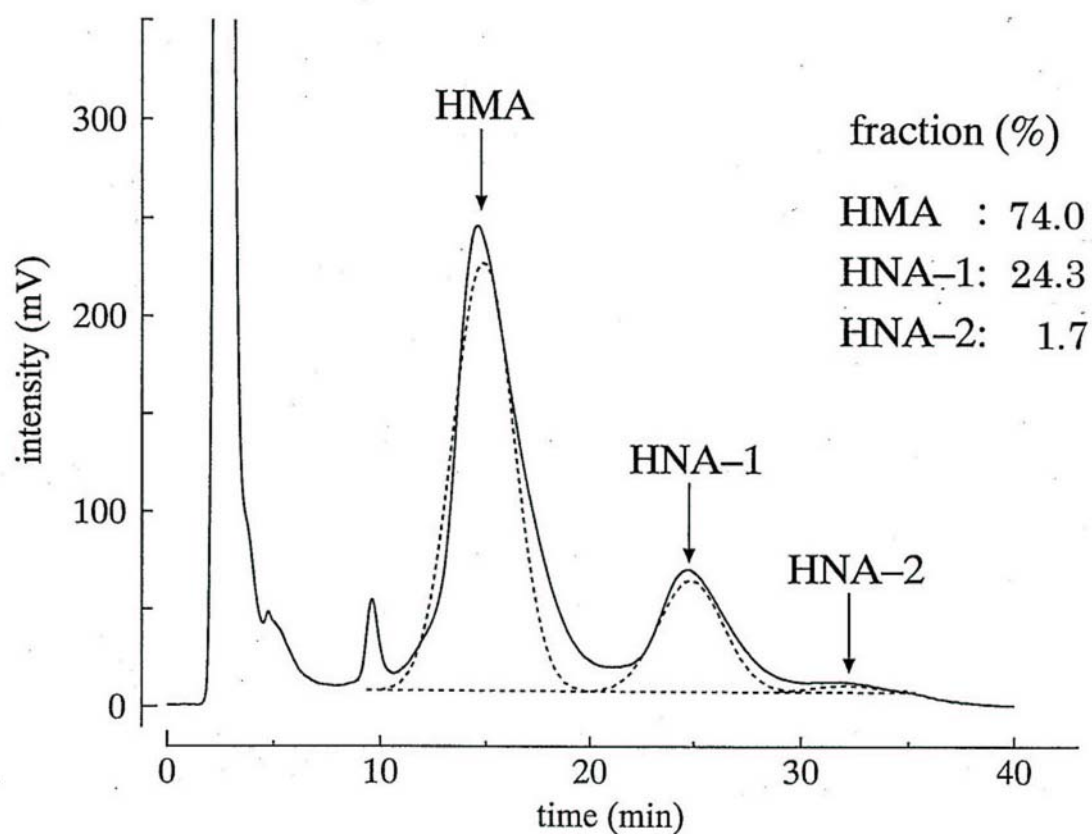


Figura 1A

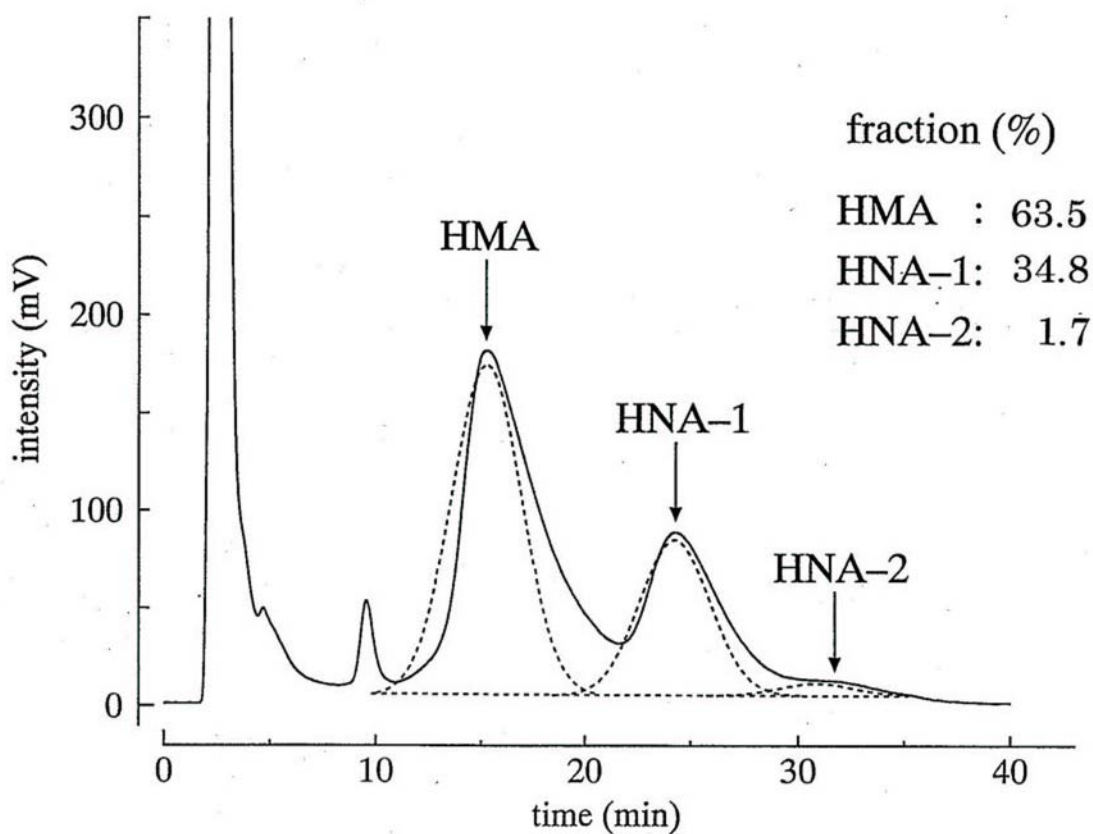


Figura 1B

Figura 1 – Profile HPLC reprezentative pentru serul de la (A) un subiect sănătos (bărbat, 45 de ani) și (B) de la un pacient cu ciroză hepatică și cancer esofagian (bărbat, 68 de ani) obținute cu un sistem HPLC cu detectare fluorescentă (lungimea unde de excitare 280 nm; lungimea unde de emisie 340 nm). Vezi textul pentru condițiile detaliate de eluare. Profilele au fost supuse unei adaptări la curbe numerice (linia punctată). Valorile obținute pentru fiecare fracțiune sunt indicate în partea dreaptă sus a figurii.

Creдем că aceste constatări sunt puternic susținute și de faptul că propolisul joacă un rol benefic ca un supliment antioxidant. Din câte știm, acesta este primul studiu *in vivo* care analizează albumina oxidată și redusă în cazul pacienților cu cancer și stres oxidativ sever și care a supus observării și efectul antioxidant al propolisului. Desigur că pentru confirmarea validității acestor constatări, precum și pentru determinarea semnificației clinice a celor raportate în această prelegere mai sunt necesare studii viitoare, care să se bazeze pe mai multe cazuri.

BIBLIOGRAFIE

- 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