

EINFLUSS DER PROPOLIS AUF DEN REDOX-ZUSTAND DES HUMANEN SERUMALBUMINS: EIN STUDIUM MIT PATIENTEN MIT STRENGEM OXIDATIONSSTRESS

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

¹Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, JAPAN
Tel.: +81-58-267-2225, Fax: +81-58-267-2962, E-mail: era@gifu-u.ac.jp, imai@cc.gifu-u.ac.jp

²Yamada 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

Resümee

Das humane Serumalbumin (HSA) ist ein Gemisch von Mercaptalbumin (HMA, reduzierte Form) und Nonmercaptalbumin (HNA, oxidierte Form). HMA, das einen einzigen Sulfhydrilrückstand aufweist, ist für die größte Sulfhydril-Reagenzfraktion der extrazellulären Flüssigkeit verantwortlich und es scheint, daß es in großem Maße am extrazellulären Antioxidationsystem teilnimmt. Wir stellten für eine klare Abspaltung von HSA in HMA und HNA ein entsprechendes HPLC-System auf. Mithilfe dieser Methode erhielten wir den Durchschnittswert von [HMA/(HMA+HNA)], z.B. f(HMA) von 73,2% (n = 20) im Falle gesunder junger Männer. Im vorliegenden Studium untersuchten wir den Einfluß der Propolis auf den Redoxzustand des HSAs bei Patienten mit strengem Oxidationsstress, wie es der Fall der Krebsbehandlung ist. Bei einem Patienten (68 Jahre) mit Leberzirrhose und Speiseröhrenkrebs betrug der f(HMA)-Wert vor der Radiotherapie und der Einnahme von Propolis 66,6%. Im Laufe der zwei Wochen Radiotherapie nahm er täglich 10 Propolistabletten ein (525 mg Extrakt brasilianischer Propolis/Tag), welche er danach noch vier Wochen einnahm. Die f(HMA)-Werte betrugen vor, sofort und 4 Wochen nach der Radiotherapie 63,5, 67,7 bzw. 74,1%. Das beweist, daß der Oxidationszustand durch Radiotherapie und einem Zusatz von Propolis verbessert werden kann. Außerdem zeigt ein gradiertes Ansteigen des f(HMA)-Wertes, daß die antioxidierenden Eigenschaften der Propolis die gesamte antioxidative Fähigkeit der krebserkrankten Patienten steigern können.

Stichwörter: Propolis/Oxidationsstress/Redoxzustand/Serumalbumin (humanes)

Einleitung

Das humane Serumalbumin (HSA) ist ein Protein, das im Kreislauf mengenmäßig am häufigsten vorkommt und eine Reihe von Funktionen erfüllt. Es ist gut bekannt, daß es eine bedeutende Rolle in der osmotischen Regelung der Flüssigkeitszirkulation im Gefäßsystem innehat und daß es fähig ist, eine große Varietät von endogenen und exogenen Stoffen im Körper zu befördern (PETERS, 1996). Eine weitere funktionale Rolle dieses Moleküls ist wahrscheinlich die Beibehaltung des Redoxpotentials in den extrazellulären Flüssigkeiten, da es ein Gemisch von Mercaptalbumin (reduzierte Form; bei den Menschen HMA) und Nonmercaptalbumin (oxidierte Form; bei den Menschen HNA) ist, z.B. Redoxpaar im Plasma (SOGAMI et al., 1984; SOGAMI et al., 1985a; SOGAMI et al., 1985b). HMA hat eine freie Sulfhydrilgruppe in der Position 34 (Cys-34) und ist für die größte freie Sulfhydrilfraktion in den extrazellulären Flüssigkeiten verantwortlich. HNA besteht aus wenigstens drei Arten von Verbindungen. Die Hauptverbindung von HNA ist ein Gemisch aus Disulfid und Zystein oder Glutation [HNA(Cys) oder HNA(Glut)]. Eine andere Verbindung ist ein bedeutenderes Oxidationsprodukt als das Disulfid-Gemisch, wobei das Sulfen- (-SOH), Sulfin- (-SO₂H) oder Sulfonstadium (-SO₃H) – [HNA(Oxi)] unbedeutendere Bestandteile der extrazellulären Flüssigkeiten sind (ERA et al., 1989).

Wir stellten ein passendes HPLC-System zur klaren Abspaltung von HSA in HMA und HNA auf, wobei wir ein Shodex-Asahipak GS520H oder eine Kolonne ES-502N verwendeten. Wir untersuchten die dynamischen Veränderungen des Redoxzustandes von HSA im Falle verschiedener physiopathologischer Zustände eingehend (SUZUKI et al., 1992; HAYAKAWA et al., 1997; HAYASHI et al., 2000; KAWAI et al., 2001; SOEJIMA et al., 2002; TOMIDA et al., 2003). Aufgrund der erhaltenen Daten stellten wir fest, daß die Fraktion von HMA [f(HMA)] im Falle verschiedener Krankheiten signifikant kleiner war, verglichen wir sie mit derjenigen einiger gesunder Subjekte, bei denen der f(HMA)-Wert sich fast überhaupt nicht veränderte.

Zweck des vorliegenden Studiums war die Untersuchung des Einflusses, den die Propolis auf den Redoxzustand von HSA ausübt, u.zwar bei Patienten mit strengem Oxidationsstress, wie bei Krebsbehandlung, da es bekannt ist, daß die Propolis, eines der Bienenprodukte, eine wohltuende Rolle als antioxidierendes Mittel ausübt (BANSKOTA et al., 2001).

Material und Methoden

Wir studierten zwei Patienten mit Magen- und Darmkrebs. Ein Patient (Frau, 56 Jahre) litt an Magenkrebs und hatte eine kurative Magenektomie hinter sich. Der andere Patient (Mann, 68 Jahre) litt sowohl an Leberzirrhose als auch an Speiseröhrenkrebs, doch ohne jedwelcher Verbindung zwischen den beiden Krankheiten. Für den Speiseröhrenkrebs hatte er Radiotherapie gemacht. Als Kontrolle diente bei diesem Studium ein gesunder Mann (45 Jahre) ohne Vorgeschichten von Nieren- oder Lebererkrankungen

(es handelt sich um einen der Verfasser – H.I.). Als Propoliszusatz diente ein alkoholischer Extrakt von brasilianischer Propolis (jede Propolistablette enthielt 52,5 mg Propolisextrakt, Yamada Apiculture Center Inc., Okayama, Japan). Jedes Subjekt wurde über das Studium unterrichtet und alle Prozeduren fanden in Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung statt. Die Blutproben wurden in Vakuum-Blutprobierröhrchen (EDTA-2K, Terumo Co., Tokyo, Japan) gesammelt und 20 min bei 3000 upm in einer Kubota 2100 Trennschleuder (Kubota Manufacturing Co., Tokyo, Japan) geschleudert. Das erhaltene Plasma wurde unter Druck mit einem Cosmonice-Filter (0,45 µm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) gefiltert und die Spezimene bis zur HPLC-Analyse bei -80°C gelagert.

Das HPLC-System bestand aus einem Autoprobenehmer, Modell AS-8010, einer Pumpe mit Doppelplunger, Modell CCPM, und einem Fluoreszenzdetektor, Modell FS-8000 (Länge der Reizwelle 280 nm; Länge der Ausgabewelle 340 nm), in Kombination mit einem Überkontrollsystem, Modell SC-8020, alle von Tosoh Co., Japan. Verwendet wurde eine Shodex-Asahipak ES-502N-Kolonnen (10 x 0,76 cm I.D., DEAE-Form für HPLC mit Ionenaustausch, Showa Denko., Japan; Temperatur der Kolonne: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradient für die Steigerung der Äthanolkonzentration von 0 auf 5% in einem Puffer von 0,05 M Natriumazetat – 0,40 M Natriumsulfat (pH 4,85) (Azetat-Sulfat-Puffer) bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Serumproben wurden mit einem Autoprobenehmer mit einem festgesetzten Volumen von 2 µl injiziert.

Zur Bestimmung des Wertes einer jeden Albuminfraktion, z.B. $f(\text{HMA}) = [\text{HMA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$ und $f(\text{HNA}) = [\text{HNA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$ wurden die erhaltenen HPLC-Profile einer Zahlenkurve angepaßt. Jede Peakform wurde mit einer Gauss-Funktion annähernd bestimmt.

Ergebnisse und Diskussionen

Es ist bekannt, daß HSA ein Gemisch von HMA und HNA ist. Außerdem gibt es mehrere Arten von HNA, wie z.B. HNA(Cys), HNA(Glut) und HNA(Oxi). Eine klare Trennung der drei HSA-Fractionen – HMA, [HNA(Cys) und HNA(Glut)] (in diesem Studium HNA-1 genannt) und HNA(Oxi) (HNA-2 genannt) – wurde mit unserem HPLC-System unternommen. Unsere vorgehenden Studien bewiesen, daß der Redoxzustand von HSA als ein Biomarker des Oxidationsstres im Körper dienen kann (ERA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000; IMAI et al., 2002; TOMIDA et al., 2003).

Die Abbildungen 1A und 1B veranschaulichen die Repräsentations-HPLC-Profile von HSA im Falle eines gesunden Subjekts (Mann, 45 Jahre) und eines Patienten mit Leberzirrhose und Speiseröhrekrebs (Mann, 68 Jahre). Es gab eine klare Abspaltung der Fractionen HMA, HNA-1 und HNA-2. Die Werte der Fractionen HMA, HNA-1 und HNA-2 waren 74,0, 24,3 und 1,7% (Abb.1A) bzw. 63,5, 34,8 und 1,7% (Abb.1B). Der $f(\text{HMA})$ -Wert (74%) des gesunden Subjekts unterschied sich vom $f(\text{HMA})$ -Durchschnittswert anderer gesunder Subjekte ($73,2 \pm 2,3\%$) (IMAI et al., 2002) nicht. Der $f(\text{HMA})$ -Wert (63,5%) des Patienten mit Speiseröhrekrebs war signifikant niedriger als der der normalen Subjekten, ein Hinweis dafür, daß bei diesem Patienten mit Speiseröhrekrebs der Abwehrmechanismus des Oxidationsstres wahrscheinlich stark vermindert war. Da es keine *in-vivo*-Untersuchungen über die antioxidierende Wirkung der Propolis gibt, untersuchten wir zuerst den Einfluß der Einnahme von Propolis auf den Redox-Zustand von HSA im Falle eines gesunden Subjekts (Mann, 45 Jahre). Dieser nahm 4 Wochen lang täglich 12 Tabletten ein. Überraschenderweise stieg innerhalb von 4 Wochen sein $f(\text{HMA})$ -Wert allmählich von 74,0 (Abb.1A) auf 79,2% und der $f(\text{HNA-1})$ -Wert sank allmählich von 24,3 (Abb.1A) auf 19,9%. Dieses suggeriert, daß das antioxidierende Niveau infolge des Propoliszusatzes steigen konnte. Deswegen untersuchten wir den Einfluß der Propoliseinnahme auf den HSA-Redoxzustand von zwei Patienten, die an Magen- und Darmkrebs litten und eine krebshheilende Behandlung durchmachten.

Erster Fall: Frau, 56 Jahre alt, Magenkrebs mit kurativer Magenektomie. Sie klagte über Appetitlosigkeit, wahrscheinlich Folge der Magenektomie. Täglich nahm sie eine Woche lang 5 Propolistabletten ein, danach 12 Wochen 6 Tabletten/Tag und weitere 8 Wochen 10 Tabletten/Tag. In dieser Periode der Propoliseinnahme verbesserte sich ihr Appetit und der $f(\text{HMA})$ -Wert bewegte sich zwischen 73 und 79%, ein Beweis dafür, daß die Propolis eine potentiell wirksame Substanz in der Bekämpfung des Oxidationsstres ist.

Zweiter Fall: Mann, 68 Jahre alt, Leberzirrhose und Speiseröhrekrebs, Radiotherapie. Vor der Radiotherapie und dem Einnehmen von Propolis hatte er einen $f(\text{HMA})$ -Wert von 66,6%. Während der 2 Wochen dauernden Radiotherapie nahm er täglich 10 Propolistabletten ein und setzte dieses 4 Wochen lang fort. Die $f(\text{HMA})$ -Werte vor, sofort nach und 4 Wochen nach der Radiotherapie betragen 63,5 (ein HPLC-Profil ist in Abb.1B wiedergegeben), 67,7 bzw. 74,1%. Es ist bekannt, daß die Radiotherapie mit ^{60}Co , auch wenn sie für die Menschen eine Therapiedosis darstellt, eine Reihe von Sauerstoffradikalen erzeugt, über die die allgemeine Meinung herrscht, daß sie für zahlreiche Oxidationsstress-Zustände verantwortlich sind (DAVIES, 1987). Unsere Feststellungen im Zusammenhang mit dem $f(\text{HMA})$ -Wert des zweiten Falls suggerieren, daß der durch Radiotherapie verursachte Oxidationszustand durch die Einnahme von Propolis verbessert werden konnte. Noch mehr, die allmähliche Steigerung des $f(\text{HMA})$ -Wertes weist darauf hin, daß die antioxidierenden Eigenschaften der Propolis die gesamte antioxidierende Fähigkeit der Krebskranken steigern konnten.

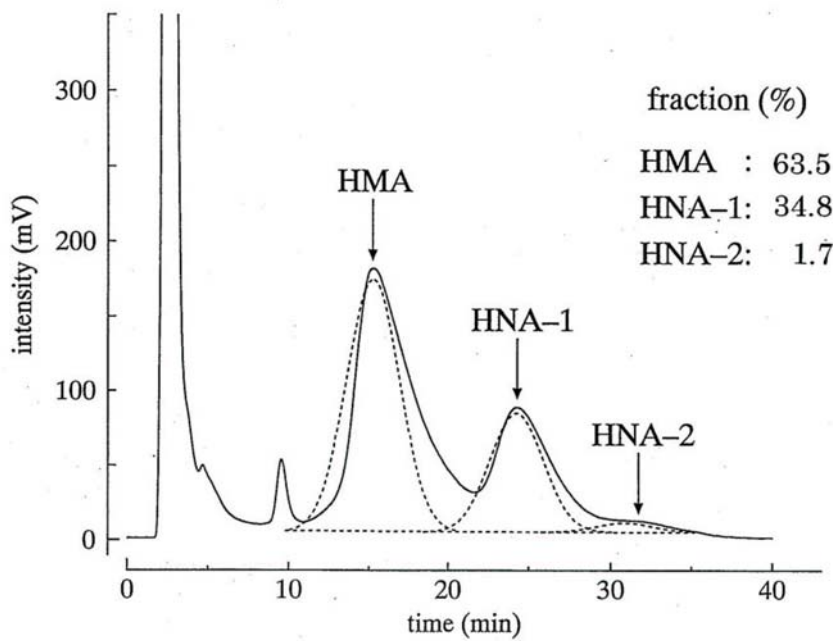
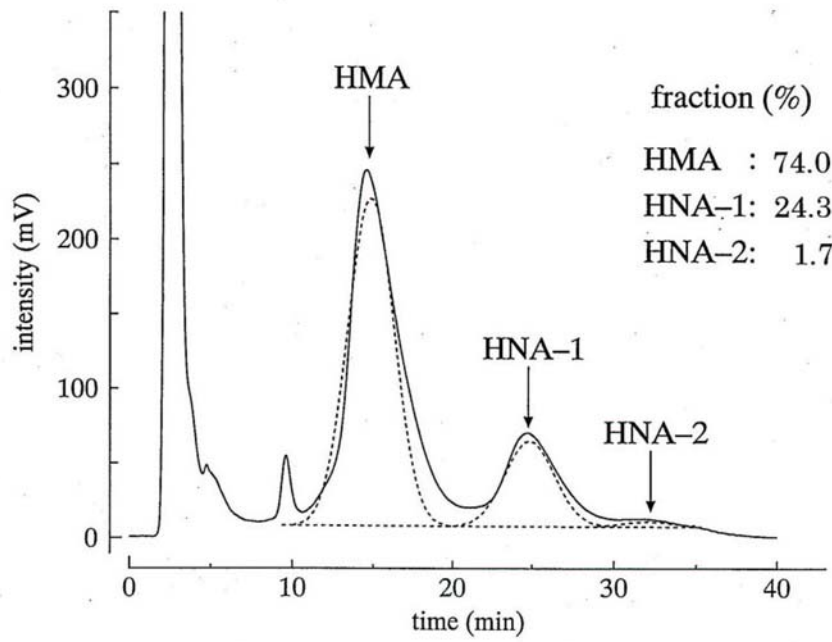


Abb.1 – Repräsentative HPLC-Profile für (A) das Serum eines gesunden Subjekts (Mann, 45 Jahre) und (B) eines Patienten mit Leberzirrhose und Speiseröhrekrebs (Mann, 68 Jahre), erhalten mit einem HPLC-System mit Fluoreszenz-Detektion (Länge der Reizwelle 280 nm; Länge der Ausgabewelle 340 nm). Für die detaillierten Elutionsbedingungen siehe Text. Die Profile wurden an Zahlenkurven angepaßt (punktierte Linie). Die für jede Fraktion erhaltenen Werte sind rechts oben in der Abbildung angeführt.

Wir sind der Meinung, daß diese Feststellung von der Tatsache unterstützt wird, daß die Propolis eine wohltuende Rolle als ein antioxidierendes Zusatzmittel erfüllt. Unserer Kenntnis nach war dieses das erste *in-vivo*-Studium, das das oxidierte und reduzierte Albumin bei Krebskranken mit strengem Oxidationsstress analysierte und dabei die antioxidierende Wirkung der Propolis beobachtete. Zur Bestätigung der Gültigkeit dieser Feststellungen wie auch für die Bestimmung der klinischen Bedeutung der in diesem Vortrag dargestellten Tatsachen sind künftige Studien notwendig, die zahlreiche Fälle erfassen müssen.

L I T E R A T U R

- Banskota HA., Tezuka Y., Kadata S., Recent progress in pharmacological research of propolis, *Pytotherapy 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