

Markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou

Miroslav Mydlík^{1,2}, Katarína Derzsiová¹, Ivana Koborová³, Katarína Šebeková³

¹IV. interná klinika LF UPJŠ v Košiciach a UN L. Pasteura Košice, Slovenská republika

²Ústav experimentálnej medicíny LF UPJŠ v Košiciach, Slovenská republika

³Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK v Bratislave, Slovenská republika

Súhrn

Úvod: Akútna intermitentná porfýria (AIP) je autozomálna dedičná choroba spôsobená deficitom 3. enzýmu v metabolicknej ceste biosyntézy hemu, porfobilinogén deaminázy. Klinický priebeh tejto choroby je charakterizovaný akútnymi záchvatmi, najčastejšie s bolesťou brucha. **Cieľom** našej štúdie bolo vyšetriť niektoré markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s AIP a zistiť, či sliny by mohli byť použité na sledovanie progresie choroby. Sliny sú atraktívnou biologickou tekutinou na stanovenie biochemických ukazovateľov za rôznych patologických podmienok. Výhodou je, že odber slín sa uskutočňuje neinvazívne a na vyšetrenie je potrebné iba malé množstvo. **Metódy:** Krv a celkové nestimulované sliny boli odobraté od 16 chorých s AIP v štádiu remisie a od 20 zdravých jedincov. Markery oxidačného a karbonylového stresu – koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs) a látky reaktívne s kyselinou tiobarbitúrovou (TBARS) boli vyšetrené spektrofluorometrickou metódou, produkty pokročilej oxidácie bielkovín (AOPPs), celková antioxidačná kapacita (TAC) a schopnosť plazmy/slín redukovať železité ióny (FRAP/FRAS) boli vyšetrené spektrofotometrickými metódami u vyššie uvedených skupín. **Výsledky:** Koncové produkty pokročilej glykácie a látky reaktívne s kyselinou tiobarbitúrovou v plazme aj slinách boli významne vyššie u chorých s AIP v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,001$), resp. $p < 0,05$. Produkty pokročilej oxidácie proteínov v plazme u AIP v porovnaní s kontrolnou skupinou nevykazovali štatistickú významnosť ($p > 0,05$), ale v slinách boli významne nižšie ($p < 0,001$). Koncentrácie ukazovateľov antioxidačného statusu v plazme aj slinách boli signifikantne nižšie v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,001$). **Záver:** Podľa nášho najlepšieho vedomia toto je prvá štúdia, ktorá poukázala na zvýšené koncentrácie markerov oxidačného a karbonylového stresu a na znížený antioxidačný status v plazme a slinách u pacientov s AIP. Okrem toho, štúdia potvrdzuje, že sliny môžu byť sľubnou tekutinou na štúdium príslušných biomarkerov v širokom spektre ľudských biomedicínskych podmienok.

Kľúčové slová: akútna intermitentná porfýria – biomarkery – oxidačný a karbonylový stres – sliny a plazma

Plasma and salivary markers of oxidative and carbonyl stress in patients with acute intermittent porphyria

Summary

Background: Acute intermittent porphyria (AIP) is an autosomal inherited disease caused by deficiency of the third enzyme in the heme biosynthetic pathway, porphobilinogen deaminase. The clinical course of the disease is characterized by acute attacks, most often with abdominal pain. **The aim of our study** was to investigate selected markers of oxidative and carbonyl stress in plasma and saliva in patients with AIP and to find out whether saliva could be used for monitoring the disease progression. Saliva is an attractive biological fluid for determination of biochemical markers in various pathological conditions. The advantage is that saliva can be collected non-invasively, and the examination needs only a small volume of saliva. **Methods:** Blood and total non-stimulated saliva were collected from 16 patients with AIP in remission, and from 20 healthy individuals. Markers of oxidative and carbonyl stress – advanced glycation end products (AGEs), and thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) were determined by spectrofluorometric methods, advanced oxidation protein products (AOPPs), total antioxidant capacity (TAC) and ferric reducing ability of plasma/saliva (FRAP/FRAS) were investigated by spectrophotometric methods in the above mentioned groups. **Results:** Advanced glycation end products and thiobarbituric acid reacting substances in plasma and saliva were significantly higher in patients with AIP in comparison to the control group ($p < 0.001$)

and ($p < 0.05$). Advanced oxidation protein products in AIP if compared to the control group did not show statistical significance ($p > 0.05$), but the levels in the saliva were significantly lower ($p < 0.001$). The concentrations of markers of antioxidant status of plasma and saliva were significantly lower in AIP if compared to the control group ($p < 0.001$). **Conclusions:** According to the best of our knowledge this is the first study to demonstrate increased concentrations of markers of oxidative and carbonyl stress and decreased antioxidant status of plasma and saliva in patients with AIP. Moreover, the study suggests that the saliva might be a promising fluid to study relevant biomarkers in a wide array of human biomedical conditions.

Key words: acute intermittent porphyria – biomarkers – oxidative and carbonyl stress – plasma and saliva

Úvod

Porfýrie tvoria skupinu hereditárnych metabolických defektov biosyntézy hemu, ktoré sa prejavujú nadprodukciou a akumuláciou prekursorov hemu – porfyrínov. Akútna intermitentná porfýria (AIP) je z nich najčastejšia autozomálna dedičná choroba spôsobená deficitom 3. enzýmu v metabolickej ceste biosyntézy hemu, porfobilinogén deaminázy. Choroba je charakterizovaná akútnymi záchvatmi spojenými so symptómami autonómneho, periférneho a centrálného nervového systému. Prudké bolesti brucha bez peritonitídy a so sprievodnými príznakmi, ako je nauzea alebo vracanie, hypertenzia a tachykardia, sú základné najdôležitejšie symptómy akútneho záchvatu. Okrem toho môžu byť prítomné aj ďalšie príznaky, ako je periférna neuropatia, bolesti svalov alebo parézy, mentálne poruchy, napr. depresia, insomnie, agitovanosť a iné. Akútny záchvat môžu vyvolať aj niektoré bežne používané lieky. Z toho dôvodu je potrebné posúdiť prostredníctvom webovej stránky spoločnosti European Porphyria Network (EPNET), či liek je bezpečný alebo nebezpečný pre chorých s AIP. Počas akútneho záchvatu prekursor porfyrínu, porfobilinogén a δ -aminolevulová kyselina (D-ALA), sa vylučujú vo veľkom množstve do moču. V štádiu remisie, keď pacienti sú asymptomatickí, väčšina z nich má stále zvýšenú koncentráciu porfobilinogénu a D-ALA v moči. Liečba AIP v akútnom záchvate spočíva v i.v. podaní hemarginátu v 5% glukóze počas 4–5 dní, ktorý blokuje nadprodukcii prekursorov hemu a ich následné vylučovanie do moču. Okrem toho je potrebné podávať i.v. infúzie 5% glukózy, fenotiazíny, pyridoxín a iné [1–4].

Oxidačný stres je výsledkom nerovnováhy medzi anti-oxidačným obranným mechanizmom a nadmernou tvorbou oxidantov, čo vedie k poškodeniu buniek a tkanív. Poškodenie tkaniva je spôsobené množstvom enzymatických a neenzymatických biochemických reakcií, ktoré produkujú vysoko reaktívne medziprodukty, tzv. voľné radikály. Tieto voľné radikály vznikajú endogénne alebo exogénne. Mnohé štúdie poukázali na súvislosť medzi oxidačným poškodením molekúl a patofyziologickým mechanizmom rôznych závažných chorôb [5–9].

Sliny predstavujú vhodnú diagnostickú tekutinu na stanovenie biochemických ukazovateľov za rôznych patologických podmienok. Výhodou je, že odber slín sa uskutočňuje neinvazívne a na vyšetrenie je potrebný iba malý objem. Okrem toho opakované vyšetrenie marke-

rov v slinách môže byť vhodné aj na dlhodobé monitorovanie liečebnej odpovede v priebehu choroby. Posledné 2–3 desaťročia sa rozšírila štúdia slín ako diagnostického biomarkera pre rôzne systémové a iné choroby [6,7].

Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť niektoré vybrané markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou.

Skupina vyšetrených chorých a metódy

V štúdiu sme vyšetrili 16 chorých s AIP (12 žien, 4 muži), priemerného veku $48,3 \pm 7$ rokov. U týchto chorých boli vyšetrené okrem laboratórnych ukazovateľov pre AIP (δ -aminolevulová kyselina a porfobilinogén v moči) aj niektoré markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách. Porfobilinogén a D-ALA v moči boli vyšetrené chromatografickou a spektrofotometrickou metódou s použitím komerčnej súpravy ClinRep® Complete Kit for δ -Aminolevulinic Acid and Porphobilinogen in Urine (Column Test), (RECIPE, Germany) [10,11]. Marker karbonylového stresu, koncové produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end products – AGEs), v plazme a slinách bol vyšetrený spektrofotometrickou metódou a hodnoty boli vyjadrené v arbitrálnych jednotkách na liter, resp. prepočítané na gram celkových bielkovín [12]. Marker oxidácie proteínov, produkty pokročilej oxidácie bielkovín (advanced oxidation protein products – AOPPs), bol vyšetrený spektrofotometrickou metódou [13,14]. Markery antioxidačného statusu, schopnosť plazmy redukovať železité ióny (ferric reducing ability of plasma – FRAP) a schopnosť slín redukovať železité ióny (ferric reducing ability of saliva – FRAS) [15] a celková antioxidačná kapacita (total antioxidant capacity – TAC) [16] v plazme a slinách boli vyšetrené spektrofotometrickými metódami. Látky reaktívne s kyselinou tiobarbitúrovou (thiobarbituric acid reactive substances – TBARS), tj. malondialdehyd (MDA), ukazovateľ peroxidácie lipidov počas oxidačného stresu, v plazme a slinách boli vyšetrené spektrofotometrickou metódou [17]. Vyššie uvedené vyšetrenia boli uskutočnené u chorých v štádiu remisie, tj. vo veľmi dobrom klinickom stave. Kontrolnú skupinu pre ukazovatele v plazme tvorilo 70 probandov priemerného veku $45,8 \pm 15,6$ rokov a pre sliny 20 zdravých jedincov priemerného veku $38,5 \pm 6$ rokov. Odber krvi a slín bol uskutočnený nalačno medzi 8.30–9.45 hod, asi po 10-hodinovom hladovaní. Krv bola odobratá do skúmaviek K_2 EDTA a celková nestimulovaná

slina do sterilnej skúmavky. Vzorky plazmy a sliny boli skladované až do spracovania pri -20 °C. Výsledky udávame ako priemer ± smerodajná odchýlka (standard deviation –

SD). Dáta sme hodnotili nepárovým dvojstranným Studentovým t-testom a korelačnou analýzou (Pearsonov korelačný koeficient) použitím štatistického softvéru SPSS

Tab. 1. Markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou (hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD)

markery	plazma	plazma	sliny	sliny
	kontrolná skupina	chorí s AIP	kontrolná skupina	chorí s AIP
AGEs (AU/l)	10 759 ± 3 426	20 577 ± 6 019	4 985 ± 484	11 103 ± 9 095
	p < 0,001		p < 0,001	
AGEs (AU/g)	143,2 ± 45,7	290,6 ± 85	3 834 ± 372	10 384 ± 7 617
	p < 0,001		p < 0,001	
AOPPs (µmol/l)	103,1 ± 65	79,1 ± 17	143,5 ± 108,4	46,87 ± 31,1
	p > 0,05		p < 0,001	
AOPPs (µmol/g)	1,47 ± 0,93	1,11 ± 0,24	110,4 ± 83,4	45,95 ± 30,9
	p > 0,05		p < 0,001	

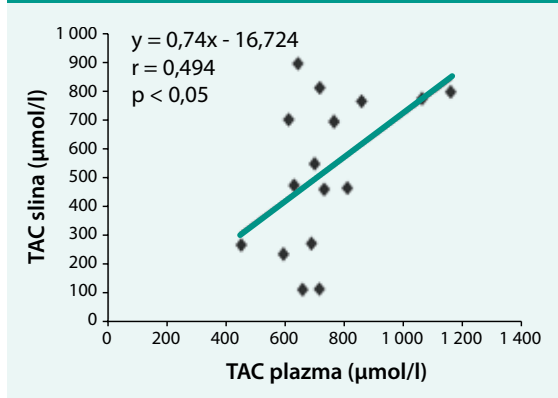
AIP – akútna intermitentná porfýria AGEs – koncové produkty pokročilej glykácie AOPPs – produkty pokročilej oxidácie bielkovín AU/g – arbitrárne jednotky prepočítané na gram bielkovín µmol/g – µmol prepočítaný na gram bielkovín

Tab. 2. Markery oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou (hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD)

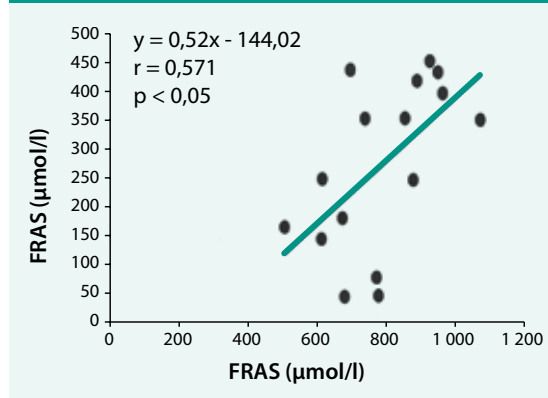
markery	plazma	plazma	sliny	sliny
	kontrolná skupina	chorí s AIP	kontrolná skupina	chorí s AIP
TBARS (µmol/l)	1,76 ± 1,0	3,21 ± 1,25	0,285 ± 0,24	0,463 ± 0,32
	p < 0,001		p < 0,05	
FRAP/FRAS (µmol/l)	1 061 ± 284	792 ± 155	585,3 ± 295	270,3 ± 142,1
	p < 0,001		p < 0,001	
TAC (µmol/l)	1 011 ± 248	739 ± 174	801,5 ± 513	527,5 ± 259,6
	p < 0,001		p < 0,001	

AIP – akútna intermitentná porfýria TBARS – látky reaktívne s kyselinou thiobarbiturovou FRAP – schopnosť plazmy redukovať železité ióny FRAS – schopnosť slín redukovať železité ióny TAC – celková antioxidačná kapacita

Graf 1. Priama závislosť medzi celkovou antioxidačnou kapacitou (TAC) v plazme a slinách u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou



Graf 2. Priama závislosť medzi schopnosťou plazmy redukovať železité ióny (FRAP) a schopnosťou slín redukovať železité ióny (FRAS) u chorých s akútnou intermitentnou porfýriou



(v. 16 pre Windows, SPSS, Chicago, Illinois, USA). Za štatisticky významné sme považovali $p < 0,05$.

Výsledky

Koncentrácia porfobilinogénu v moči u chorých s AIP bola význame zvýšená ($5,05 \pm 2,8$ mg/24 hod) v porovnaní s referenčným rozsahom ($0,1\text{--}1,7$ mg/24 hod; $p < 0,001$). Koncentrácia D-ALA prepočítaná na gram kreatinínu (Kr) v moči bola taktiež význame zvýšená ($6,25 \pm 3,1$ mg/g Kr) v porovnaní s referenčným rozsahom ($< 4,0$ mg/g Kr; $p < 0,01$). Hodnoty markera karbonylového stresu, AGEs a oxidačného stresu TBARS v plazme boli význame vyššie v skupine chorých s AIP v porovnaní s našou kontrolnou skupinou ($p < 0,001$). Nezistili sme štatistickú významnosť v koncentrácii AOPPs v plazme medzi AIP a kontrolnou skupinou ($p > 0,05$). Koncentrácie celkovej antioxidačnej kapacity a schopnosti plazmy redukovať železité ióny boli význame nižšie u AIP chorých v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,001$). Podobne aj v slinách sme zistili význame zvýšené hodnoty AGEs ($p < 0,001$) a TBARS ($p < 0,05$). Koncentrácie AOPPs, TAC a FRAS v slinách boli signifikantne nižšie u AIP chorých v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,001$, **tab. 1** a **tab. 2**). Okrem toho sa zistila priama závislosť medzi TAC v plazme a slinách ($r = 0,494$; $p < 0,05$) (**graf 1**) a medzi FRAP a FRAS ($r = 0,571$; $p < 0,05$) (**graf 2**).

Diskusia

Predložená štúdia, vyšetrenie markerov oxidačného a karbonylového stresu v slinách u chorých s AIP, je podľa našich vedomostí prvá v dostupnej literatúre. Charakteristiku vyšetrených markerov oxidačného a karbonylového stresu sme uviedli v inej práci [9]. V tejto štúdii sme zistili význame zvýšenú koncentráciu markerov oxidačného (TBARS) a karbonylového (AGEs) stresu v plazme aj v slinách v skupine chorých s AIP v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tieto markery boli zvýšené aj pri iných chorobách [6,7]. Nezistili sme rozdiel v koncentrácii markera oxidácie proteínov, produktov pokročilej oxidácie bielkovín (AOPPs) v plazme medzi AIP a kontrolnou skupinou, ale koncentrácia v slinách bola význame znížená. Antioxidačný stav u chorých s AIP sme vyšetřili dvomi spôsobmi: ako TAC a FRAP/FRAS. Koncentrácie obidvoch markerov v plazme aj v slinách boli nižšie ako u kontrolnej skupiny. Zistili sme význame korelácie medzi ich koncentráciami v plazme a slinách, ale nezistili sme medzi MDA v plazme a slinách v protiklade s literárnym údajom pri inom ochorení [6].

V dostupnej literatúre sa diskutuje o vhodnosti použitia slín na detekciu biomarkerov za rôznych patologických podmienok. V našej prvej štúdii, v ktorej sme použili sliny ako biologický materiál, sme vyšetřili niektoré základné biochemické ukazovatele, ale našim cieľom bolo vyšetřiť kyselinu oxalovú a askorbovú v slinách a plazme [18]. V posledných rokoch v mnohých laboratóriách skúmali použiteľnosť slinných biomarkerov oxidačného stresu pre ich potenciálnu klinickú aplikáciu a dokumentovali ich schopnosť rozlíšiť chorobný

stav od fyziologického. Tieto tvrdenia sľubujú prístup k diagnóze, prevencii, liečbe, observácii a pochopenia tej ktorej choroby, ako aj pre sledovanie odpovede na liečbu. Sliny zostávajú sľubnou oblasťou pre objav biomarkerov v širokom spektre ľudských biomedicínskych podmienok. Nakoľko koncentrácia markerov oxidačného stresu v slinách závisí od cirkadianného rytmu, na prítomnosti alebo neprítomnosti orálneho ochorenia a iných faktoroch, bude potrebné vypracovať štandardizáciu slinných študijných protokolov, ktoré budú slúžiť pre výskum a aj pre klinické použitie biomarkerov v slinách [6–8].

Záver

Na základe našich výsledkov, zvýšené koncentrácie markerov oxidačného a karbonylového stresu v plazme a slinách u chorých s AIP, môžeme konštatovať, že oxidačný stres sa podieľa na patogenéze akútnej intermitentnej porfýrie. Je predpoklad, že po štandardizácii podmienok pre odber slín, budú sliny potenciálne vhodné ako biologická tekutina aj na monitorovanie akútnej intermitentnej porfýrie.

Literatúra

1. Besur S, Schmeltzer P, Bonkovsky HL. Acute porphyrias. *J Emerg Med* 2015; 49(3): 305–312. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2015.04.034>>.
2. Mydlík M, Derzsiová K, Legáth L et al. Klinické a biochemické poruchy pri akútnej intermitentnej porfýrii a porfýrii variegata. *Interná Med* 2016; 16(2): 58–62.
3. Ventura P, Capellini MD, Rocchi E. The acute porphyrias: a diagnosis and therapeutic challenge in internal and emergency medicine. *Int Emerg Med* 2009; 4(4): 297–308. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11739-009-0261-4>>.
4. Sardh E, Harper P, Andersson Dan EH et al. Plasma porphobilinogen as a sensitive biomarker to monitor the clinical and therapeutic course of acute intermittent porphyria attacks. *Europ J Intern Med* 2009; 20(2): 201–207. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2008.06.012>>.
5. Kamodyová N, Tóthová L, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external factors. *Disease Markers* 2013; 34(5): 313–321. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3233/DMA-130975>>.
6. Wang J, Schipper HM, Velly AM et al. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Free Radic Biol Med* 2015; 85: 95–104. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.005>>.
7. Karlík M, Valkovič P, Hančinová V et al. Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2015; 48(1–2): 24–28. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.023>>.
8. Peluso I, Raguzzini A. Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Pathol Res Int* 2016; 2016: 5480267. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/5480267>>.
9. Mydlík M, Derzsiová K, Javorská K et al. Markery oxidačného a karbonylového stresu u hemodialyzovaných chorých. *Interná Med* 2015; 15(7–8): 324–328.
10. Mauzeral D, Granick S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* 1956; 219(1): 435–446.
11. Kyselina 5-aminolevulová (ALA) / Porfobilinogén (PBG). Chromatografia – spektrofotometria. Biosystems Reagents & Instruments. Slovenský preklad. 2016. Dostupné z DOI: <<http://www.jktrading.cz/mb-file-11017-ala-pbg-1505.pdf>>

12. Münch G, Keis R, Wesels A et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35(9): 669–677.
13. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49(5): 1304–1313.
14. Anderstam B, Ann-Christin BH, Valli A et al. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: application in uremic samples. *Clin Chim Acta* 2008; 393(2): 114–118. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.03.029>>.
15. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70–76.
16. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37(4): 277–285.
17. Behuliak M, Palffy R, Gardlik R et al. Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. *Dis Markers* 2009; 26(2): 49–53. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3233/DMA-2009-0606>>.
18. Mydlík M, Derzsiová K, Jenča A et al. Kyselina oxalová a askorbová v slinách pri chronickej renálnej insuficiencii. *Akt Nefrol* 2006; 12(2): 41–44.

prof. MUDr. Miroslav Mydlík, DrSc.

✉ miroslav.mydlik@unlp.sk

IV. interná klinika LF UPJŠ a UN L. Pasteura v Košiciach, Slovenská republika

www.unlp.sk

Doručeno do redakcie 16. 8. 2016

Prijato po recenzii 26. 9. 2016