

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet
Programvezető: Dr. Zupkó István Ph.D.
Intézet: Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Témavezető: Dr. Gáspár Róbert Ph.D.

Seres Adrienn Pharm.D.

**A MÉH (*APIS MELLIFERA*) HERETEJ NEMI HORMON
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PATKÁNYBAN**

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Dr. Falkay György MTA doktor

Tagok: Dr. Földesi Imre Ph.D.
Dr. Zádori János Ph.D.

Bírálni bizottság:

Elnök: Dr. Révész Piroska MTA doktor

Opponensek: Dr. Szökő Éva MTA doktor
Dr. Perjési Pál Ph.D.

Tag: Dr. Baczkó István Ph.D.

Titkár: Dr. Szakonyi Gerda Ph.D.

Szeged

2014

Bevezetés

Számos méhészeti terméket (*Apis mellifera*) alkalmaznak a népgyógyászatban, ill. a gyógyszeres terápia kiegészítéseként. Közülük legismertebbek a méz, a propolisz, a méhméreg és a méhpempő. Ezen méhészeti termékek hatásait először a népi gyógyászatban figyelték meg, később váltak a bizonyítékon alapuló orvoslás részévé.

Jelenleg is igen intenzíven vizsgálják a méhpempőt. A méhpempő a dolgozó méhek garatmirigyének a váladéka, a kifejlett méhkirálynőnek és lárva állapotának legfőbb tápláléka. Az már ismert, hogy a méhek táplálkozása összefügg termékenységükkel, így ha a lárvát méhpempővel táplálják, az királynővé fejlődik. Mindezek mellett, a kifejlett méhkirálynő termékenysége is összefüggésbe hozható a méhpempő fogyasztásával. Ezen tények, ill. a méhpempő tradicionális alkalmazása a menopauza tüneteinek enyhítésére mind azt sugallják, hogy a méhpempő ösztrogénszerű hatással rendelkezhet. Néhány, a méhpempőből izolált zsírsavról (10-hidroxi-*transz*-2-dekanoátsav és származékai) igazolták különböző sejtvonalakon, hogy kötődik az ösztrogén receptorhoz (ER) és hipertrófizálja a patkányok miometriumát.

Kevésbé ismert azonban a heretej (HT), melynek előállítását, a méhpempőhöz hasonlóan, a dolgozó méhek végzik. A hereméhek fészekaljának fő komponense a HT, de már nem tartalmazza a lárva és a báb fejlődési alakokat. A HT viszkózus, sárga színű, enyhén édes folyadék, melyet a méhészek a mézhez hasonlóan pergetéssel készítenek, így távolítva el a lárvákat és a bábokat. Ismert, hogy a méhkirálynőhöz hasonlóan, a hereméheknek is saját, speciális táplálékuk van, a HT, melynek fogyasztása összefügg a hereméhek termékenységével. A HT, mint külön méhészeti termék, az angolszász szakirodalomban nem ismert, habár a hereméhek fészekalját Kínában, Oroszországban és Erdélyben neurovegetatív, ill. szexuális problémák kezelésére alkalmazzák, mindemellett általános roboráló szerként is jelen van a népi gyógyászatban. Romániában a fagyasztott hereméh fészekaljat alkalmazzák például idős emberek rehabilitációjára és aktivitásuk fokozására. Az Apilarnil (hereméh lárva) esetében androgén és anabolikus hatásról is beszámoltak. A népgyógyászati megfigyelések és az ez idáig publikált közlemények valamilyen nemi hormonhatást sejtetnek.

Célkitűzések

Munkánk célja a HT nemi hormon hatásainak a vizsgálata patkányokban, ill. a népgyógyászati megfigyelések alátámasztása, ezért a célkitűzéseink a következők voltak:

1. Kísérleteink célja a nyers HT androgén hatásainak feltérképezése volt Hershberger teszt alkalmazásával kasztrált hím patkányokban. Az *in vivo* eredményeink alátámasztására az androgén-érzékeny SLAP (Spot14-like androgen-inducible protein) mRNS ill. fehérje expressziójának vizsgálatát tűztük ki célul a prosztata szövetben valós idejű RT-PCR és Western blot módszerek alkalmazásával. Miután a nyers HT androgén hatását bizonyítani tudtuk, a hatásért felelős komponens(ek)et próbáltuk meghatározni biológiai aktivitást kereső frakcionálásokkal, ill. MS és NMR spektroszkópiai vizsgálatokkal
2. A továbbiakban célunk volt a nyers HT ösztrogén hatásainak meghatározása nőstény patkányokban uterotróp teszt alkalmazásával. Az *in vivo* eredményeket követően valós idejű RT-PCR és Western blot módszerek alkalmazásával vizsgálni kívántuk az ösztrogénfüggő C3 (Complement component 3) mRNS és fehérje expressziójának változását a patkány uterusban. Végül, az androgén vizsgálatokhoz hasonlóan, biológiai aktivitást kereső frakcionálásokkal, ill. MS és NMR spektroszkópiai vizsgálatokkal a hatásért felelős vegyület(ek) meghatározása volt a célunk.
3. A következőkben célul tűztük ki a nyers HT esetleges gesztagén hatásainak feltérképezését, így téve teljessé a HT nemi hormon hatásainak a megismerését. Valós idejű RT-PCR és Western blot módszerekkel terveztük vizsgálni a gesztagén-érzékeny CRLR (Calcitonin receptor-like receptor) mRNS és fehérje expresszióját a patkány uterusban.

Anyagok és módszerek

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (engedélyszám: IV/01758-0/2008 ill. IV./198/2013.). Kísérleteinkben Sprague-Dawley patkányokat használtunk, melyeket szabályozott körülmények között Kísérleti Állatistállóban tartottunk, ahol rágcsálóknak való takarmányt és csapvizet kaptak *ad libitum*.

Heretej gyűjtése

A HT-et repcevirágzaskor, késő tavasszal gyűjtötték, pergetéssel készítették el, leválasztva a lárva és báb alakokat. A nyers HT-et műanyag fagyasztócsövekbe szétosztottuk, a kísérletek megkezdéséig -20°C-on tartottuk és a kísérletekben desztillált vízzel hígítva alkalmaztuk.

Hormon hatások vizsgálata *in vivo*

Hershberger teszt

Az androgén hatások vizsgálata során módosított Hershberger tesztet alkalmaztunk. Kísérleteinkben 230-240 g-os Sprague-Dawley hím patkányokat kasztráltunk. 10 nappal később, az egészséges állatokat randomizáltuk és csoportokba osztottuk. Testtömegeiket a kísérlet 1., 4., 7. és 10. napján mértük. Az állatokat 10 napig naponta egyszer kezeltük a kísérleti anyagokkal. Az utolsó kezelést követő napon az állatokat leöltük, androgén-érzékeny szerveiket (makk, ondóhólyag, ventrális prosztata, nagy farokemelő izom) eltávolítottuk és megmértük. A szervtömegeket mg/100 g testtömeg arányban tüntettük fel, relatív szervtömegként. A kivéreztetés előtt, szívpunkcióval 1 ml vért gyűjtöttünk csoportonként 5 állattól. A plazma mintákat a vizsgálat kezdetéig -70 °C-on tartottuk. A plazma tesztoszteron szinteket enzimmunoassay (EIA) kit segítségével határoztuk meg. A fényelnyelést SPECTROstar Nano microplate olvasóval mértük.

Uterotróp teszt

A nyers HT ösztrogén hatásainak meghatározásához 20-21 napos, nemileg éretlen Sprague-Dawley nőstény patkányokat randomizáltunk, csoportokba osztottunk és 4 egymást követő napon kezeltünk a kísérleti anyagokkal. Az utolsó kezelést követően 24 órával az állatokat

leöltük, a méhszövetet eltávolítottuk, majd tömegüket megmértük. Az uterusok tömegeit mg/100 g testtömeg arányban tüntettük fel, relatív szervtömegként.

Vemhességmegtartó teszt

A nyers HT gesztagén hatásainak feltérképezésére 160-180 g-os ivarérett nőtény és 220-240 g-os hím Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. Amely hüvelykenetben hímivarsejtek meglétét igazoltuk, azt a nőtényt, mint 1. napos vemhes állatot elkülönítettük. A vemhességük 8. napján az állatokat kétoldali petefészek eltávolításnak vetettük alá, miközben a meglévő főtuszokat (implantációs helyeket) megszámoltuk. A petefészek irtott vemhes nőtényeket 3 csoportba osztottuk, melyeket a vemhességük 8-14. napján kezeltünk naponta egyszer. A vemhesség 15. napján a túlélő főtuszokat megszámoltuk és a kiindulási főtuszok számának százalékában adtuk meg.

Hormonfüggő fehérjék vizsgálata RT-PCR és Western blot módszerekkel

A nyers HT nemi hormon hatásainak az igazolására hormonfüggő fehérjék, úgymint az androgénfüggő SLAP, az ösztrogén-érzékeny C3, ill. a gesztagénfüggő CRLR mRNS-ének és fehérjéinek expresszióját vizsgáltuk. Ventrális prosztata és uterusz mintákat gyűjtöttünk kasztrált/petefészek irtott Sprague-Dawley patkányokból a kísérleti anyagokkal történő kezeléseket követően.

A valós idejű RT-PCR vizsgálatokhoz a mintákból TRI reagenssel RNS-t izoláltunk. 1 µg totál RNS-ből kiindulva RNA-to-CT 1-Step Kit vagy High-capacity RNA-to-cDNA Kit segítségével elvégeztük a reverz transzkripciót és a felsokszorozást ABI StepOne Real-Time PCR készülékben. Eredményeinket az RQ (relative quantity) összehasonlításával kaptuk, melyhez az áttörési pontokat (C_T : az a ciklusszám, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd.) használtuk fel.

A Western blot mérésekhez a szöveteket RIPA lízis pufferben homogenizáltuk. Zsebenként 50 µg (prosztata szövet esetén), ill. 20 µg (uterusz szövet esetén) fehérjét vittünk fel 4-12 %-os NuPAGE Bis-Tris géltre és XCell SureLock Mini-Cell Units készüléken elektroforézisnek vetettük alá. A gélen lévő szétválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk át iBlot Gel Transfer alkalmazásával. Az antitest kötődését WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit segítségével detektáltuk. Az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása, a háttér intenzitás kivonása után Kodak 1D Images szoftverrel történt. Az optikai denzitásokat a háttér kivonásával számítottuk és az általunk meghatározott egységekben adtuk meg.

Biológiai aktivitást kereső vizsgálatok

A nyers HT-et vízzel hígítottuk, petróleum éterrel extraháltuk, majd a petróleum éteres fázist összegyűjtve vízzel újra extraháltuk. Ezt az egyesített vizes fázist vittük fel oktadecil-szilika oszlopra és alacsony nyomású reverz fázisú oszlopkromatográfiának vetettük alá vizes, vizes-metanolos, metanolos és diklórmétános eluensekkel. A frakciókat eluáltuk az oszlopról, egyesítettük a vizes-metanolos kivonatokat, majd beszárítottuk a mintákat. Az androgén hatást RT-PCR technikával, míg az ösztrogén hatást uterotróp teszttel tettük követhetővé a frakcionálás során. A kivonatokat további frakcionálásnak vetettük alá ismételt alacsony nyomású reverz fázisú oszlopkromatográfia alkalmazásával. Az elválasztás követésére vékonyréteg kromatográfiát használtunk és az elválasztásokat vanillin-kénsav reagenssel detektáltuk.

HRMS és NMR mérések

Az androgén komponensek meghatározásához GC-HRMS vizsgálatokat végeztünk el, a méréshez Waters GCT-Premier tömegspektrométert használtunk. Az adatgyűjtések a MassLynx V.4.1. szoftver segítségével történtek. Az ösztrogén hatású vegyületek feltárásához HR-ESI-MS méréseket végeztünk LTQ FT Ultra spektrométer alkalmazásával. A szükséges adatokat az Xcalibur 2.0. szoftver segítségével gyűjtöttük össze.

Az NMR spektrumok MeOH-d₄-ben lettek felvéve, 298 K-en Varian 800 MHz NMR spektrométer alkalmazásával. Az NMR mérésekhez (¹H, ¹H-Presat, GHSQCAD, GHMBCAD, egy-és kétdimenziós zTOCSY) szükséges pulzusszekvenciák a VNMRJ 3.2 szoftver könyvtárából származnak.

Statisztika

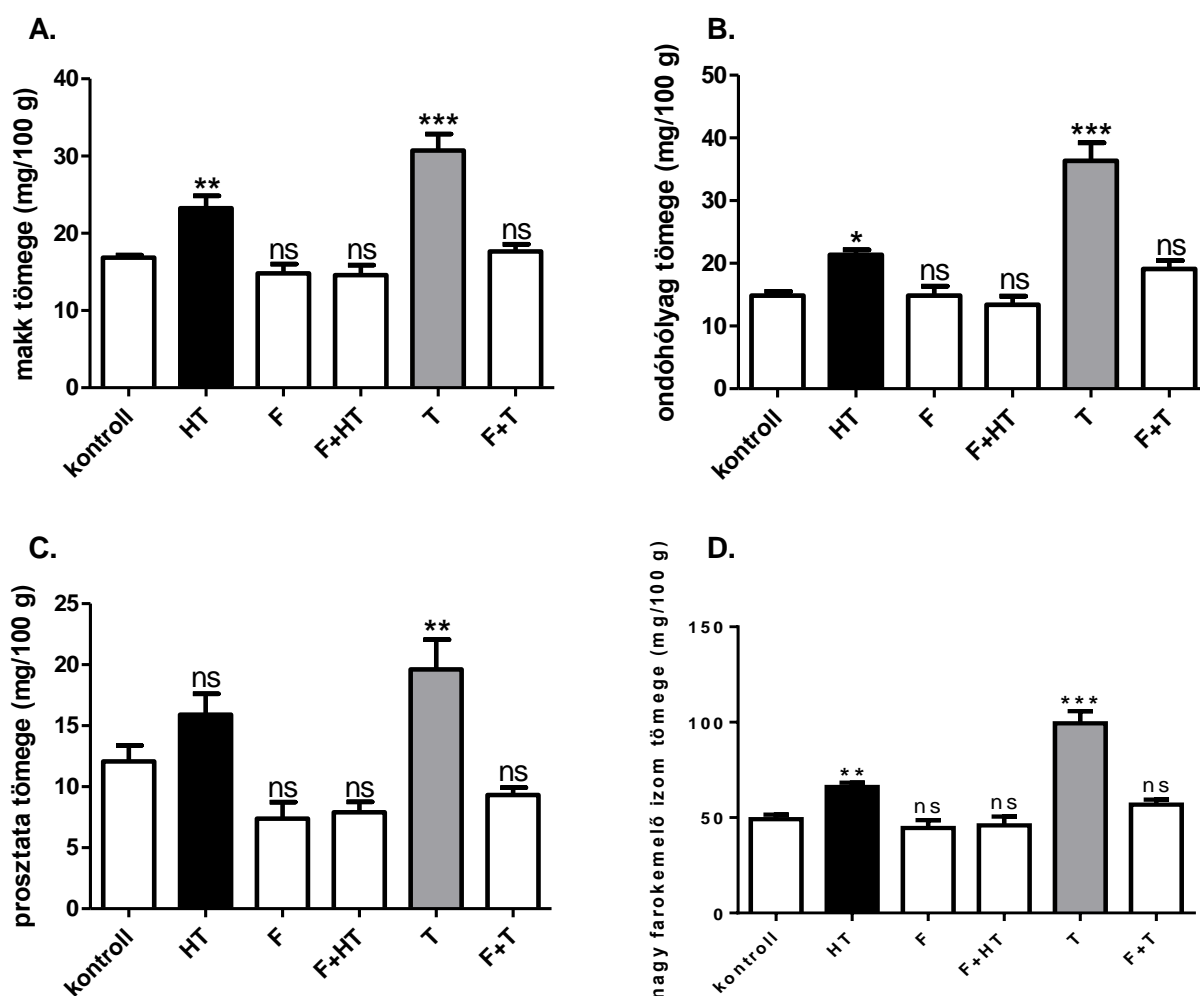
Az *in vivo* és a molekuláris farmakológiai vizsgálatok eredményeit Prism 4.0 szoftver segítségével ANOVA Newman-Keuls, ill. Dunnett's teszttel elemeztük. Az értékeket SEM-ben tüntettük fel, szignifikancia határnak a p<0,05 értéket tekintettük.

Eredmények

A heretej androgén hatása

A nyers heretej *in vivo* androgén hatása

A kontroll csoporthoz képest a nyers HT nem fokozta a testtömeget, ellenben képes volt emelni az androgén-érzékeny szervek, úgymint a mák, az ondóhólyag és a nagy farokemelő izom tömegét. A prosztata tömegét kis mértékben fokozta ugyan, de az a változás nem volt szignifikáns. A tesztoszteron minden mért androgén-érzékeny szerv tömegét növelte és ez a hatása a HT hatásánál nagyobbak bizonyult. A szervtömegek flutamiddal történő kezelést követően nem változtak, de a HT szervtömeg növelő hatását a flutamid képes volt kivédeni. A flutamid a tesztoszteron hatásait is gátolta (1. ábra).



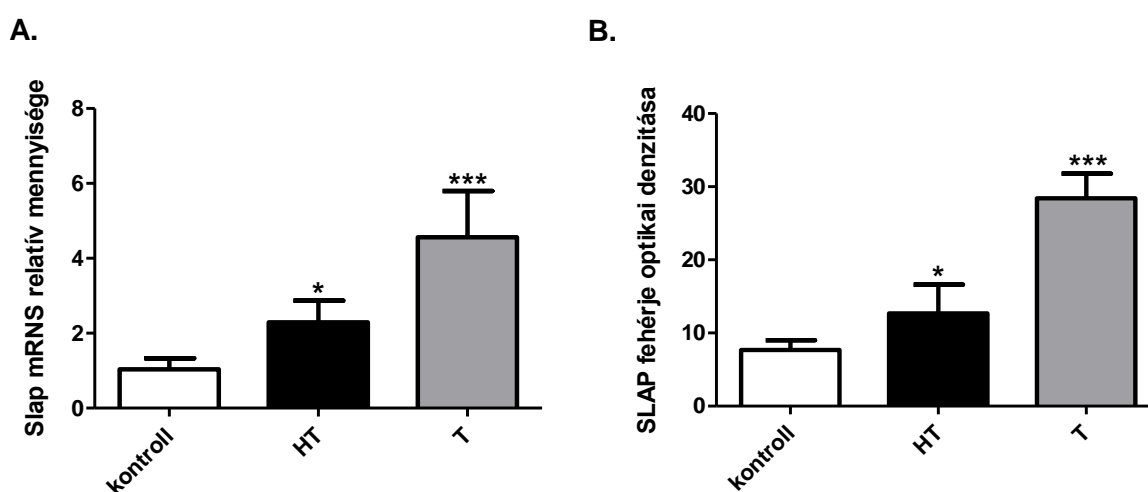
1. ábra: Az androgén-érzékeny szervek tömegének változása nyers heretej (HT) és tesztoszteron (T) kezelés hatására. A HT és a pozitív kontroll tesztoszteron fokozta a mák (A), az ondóhólyag (B), a nagy farokemelő izom (D) relatív tömegét (mg/100 g testtömeg). Ezen hatások minden esetben flutamiddal (F) követően nem változtak, de a HT szervtömeg növelő hatását a flutamid képes volt kivédeni.

gátolhatók voltak. A HT, a tesztoszteronnal ellentétben, nem növelte szignifikánsan a prosztata tömegét (C). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nem szignifikáns

Mind a HT, mind a tesztoszteron képes volt fokozni a plazma tesztoszteron szintjét. A flutamid mindkét vegyület plazma tesztoszteron szintet emelő hatását gátolta, ugyanakkor a flutamid kezelés önmagában nem változtatta meg a hormonszintet.

Slap mRNS és fehérje mérések prosztata szövetben

A nyers HT fokozta Slap mRNS expresszióját a ventrális prosztatában, de ez a hatás szignifikánsan gyengébbnek bizonyult, mint a tesztoszteron esetében. A Western blot mérések során, a HT fokozta a SLAP fehérje expresszióját is a prosztata szövetben (2. ábra).

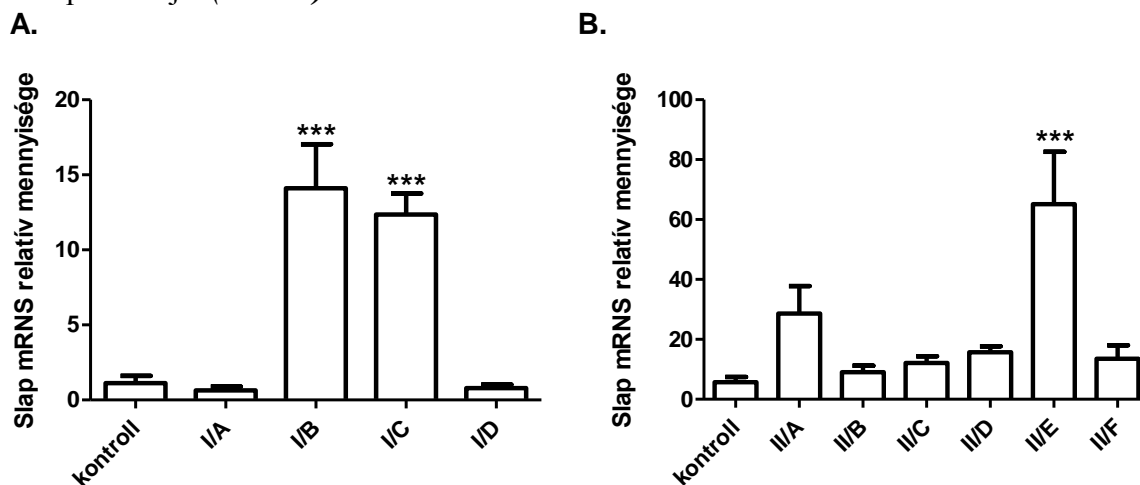


2. ábra: A SLAP (Spot14-like androgen-inducible protein) RT-PCR és Western blot vizsgálata patkány prosztata szövetben. A nyers heretej (HT) fokozta a Slap expresszióját a prosztatában (A). A Western blot vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a HT növelte a SLAP fehérje expresszióját is a prosztata szövetben. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Biológiai aktivitást kereső vizsgálatok

Miután a nyers HT androgén hatását igazoltuk, a hatásért felelős komponensek izolálásához biológiai aktivitást kereső vizsgálatokat végeztünk el. Az első reverz fázisú oszlopkromatográfiás elválasztást követően a 4 kapott frakcióból 2 (I/B és I/C) fokozta a Slap mRNS expresszióját. A két frakció hatása között nem volt szignifikáns különbség. Az I/B és I/C frakciók további szétválasztása során az I/B frakció esetében az androgén hatás teljes eltűnését tapasztaltuk. Az I/C frakció második reverz fázisú oszlopkromatográfiás elválasztása során már kisebb lépésekben történt az elválasztás. Minden oszlopkromatográfiás lépésnél az azonos komponenseket tartalmazó frakciókat egyesítettük. A második

elválasztásnál kapott 6 frakcióból már csak egyetlen egy (II/E) volt képes fokozni a Slap mRNS expresszióját (3. ábra).

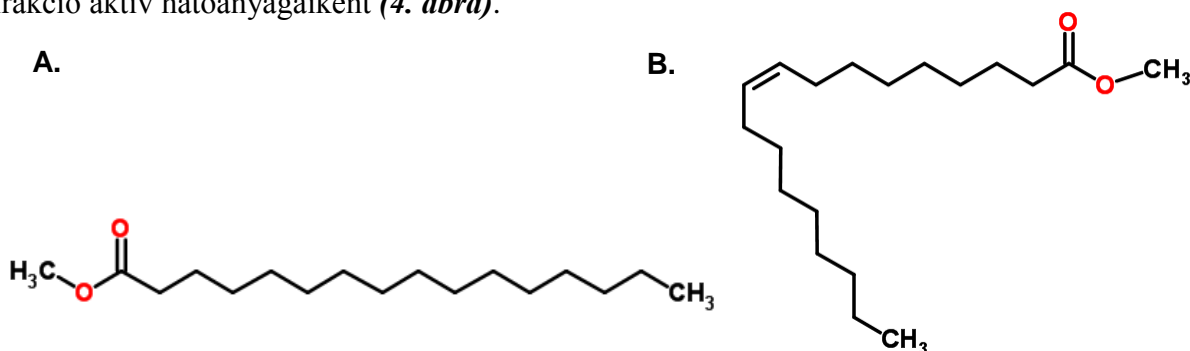


3. ábra: Biológiai aktivitást kereső vizsgálatok. Első lépésben a 40%, 60%, 80%-os vizes MeOH kivonat (I/B) és a 100%-os MeOH frakció (I/C) fokozta a Slap mRNS expresszióját az RT-PCR vizsgálatok során (A). A további elválasztás során az I/B kivonat hatását veszítette. A 75%-os vizes metanolos kivonatok közül csak a II/E frakció volt képes fokozni a Slap mRNS expresszióját (B).

I/A: 20% vizes MeOH frakció; **I/B:** 40%, 60%, 80% vizes MeOH frakció; **I/C:** 100% MeOH frakció; **I/D:** diklórmétános frakció; **II/A:** 70% vizes acetonos frakció; **II/B, II/C, II/D és II/E:** 75% vizes acetonos frakció; **II/F:** 100% vizes acetonos frakció; *** $p < 0.001$

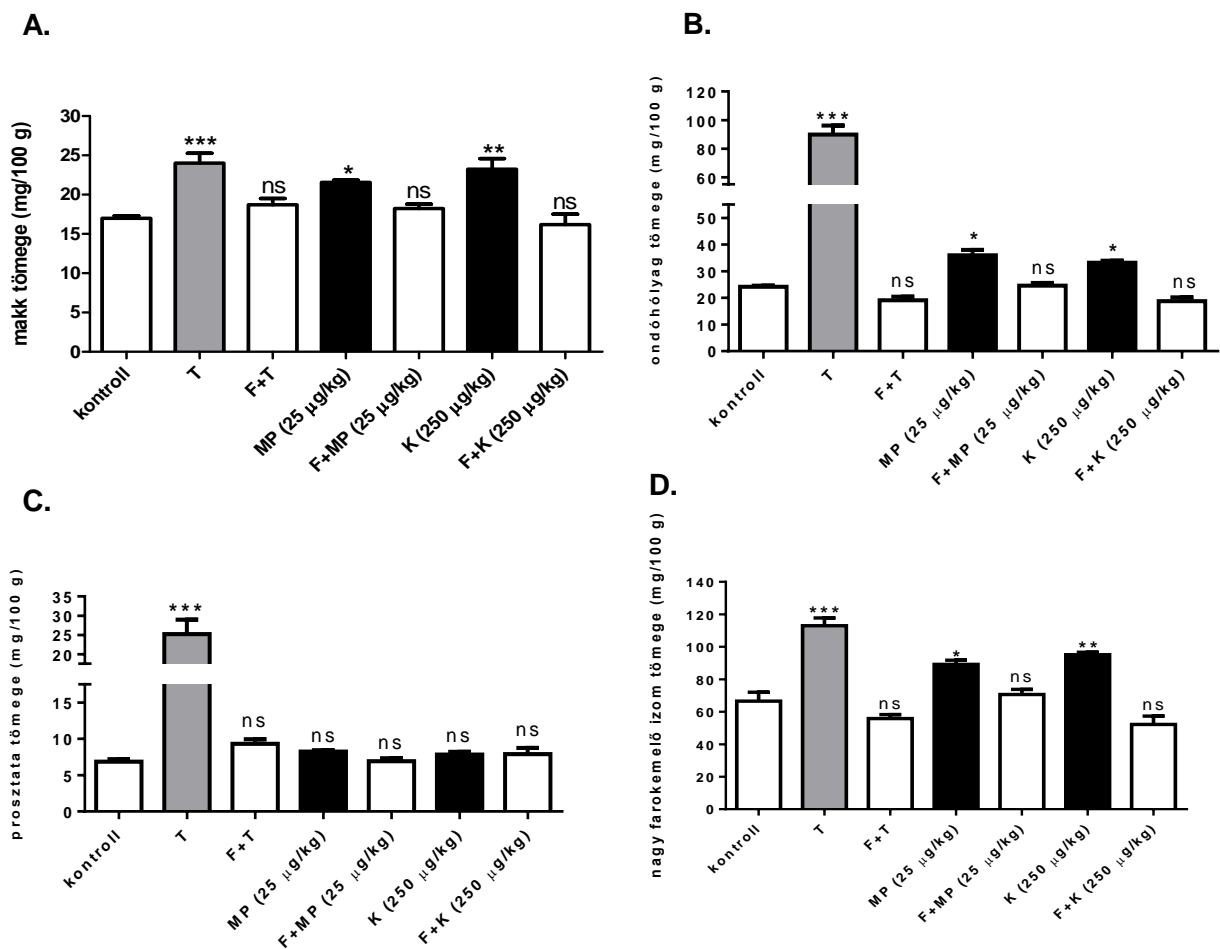
A nyers heretej androgén hatóanyagainak azonosítása

A II/E frakció aktív komponenseinek a jellemzésére GC-HRMS és NMR spektroszkópiai méréseket alkalmaztunk. A gázkromatográfiás kromatogram 2 fő komponens jelenlétét igazolta (RT 9,03 és 9,73 min) a mintában. Ezen komponensek pontos tömegének értékei 270,0258-nak ill. 296,2707-nek adódtak, amely a $C_{17}H_{34}O_2$ (metil-palmitát; MP) és $C_{19}H_{36}O_2$ (metil-oleát; MO) összegképleteknek felel meg. Az adatbázis és a szakirodalom adatai alapján, a 2 fő komponens a már jól ismert zsírsav metil-észterek, a MP és a MO. Ezt a feltevést támasztották alá a 1H és ^{13}C NMR adatok, valamint a gázkromatográfiás kromatogramok és spektrumok, melyeket a tiszta MP és MO méréseinek a II/E frakció méréseinek összehasonlításával kaptunk. Így egyértelműen a MP és a MO azonosítható a II/E frakció aktív hatóanyagaiként (4. ábra).



4. ábra: A metil-palmitát (A) és a metil-oleát (B) szerkezete (ChemSpider adatbázis)

Az azonosított komponensek szerepét az androgén hatás kialakításában egyszerűsített Hershberger teszt segítségével és plazma tesztoszteron szint meghatározásával vizsgáltuk. A MO-ot, a MP-ot és a HT-ben előforduló sajátos 4:3=MO:MP arányú kombinációjukat 2,5, 25 és 250 µg/kg dózisokban adagoltuk. A MP 25 µg/kg dózisa és a kombináció legmagasabb adagja (250 µg/kg) a prosztata kivételével fokozták az androgén-érzékeny szervek tömegét. Ezen androgén hatások, a nyers HT-hez hasonlóan, flutamiddal gátolhatók voltak (5. ábra).



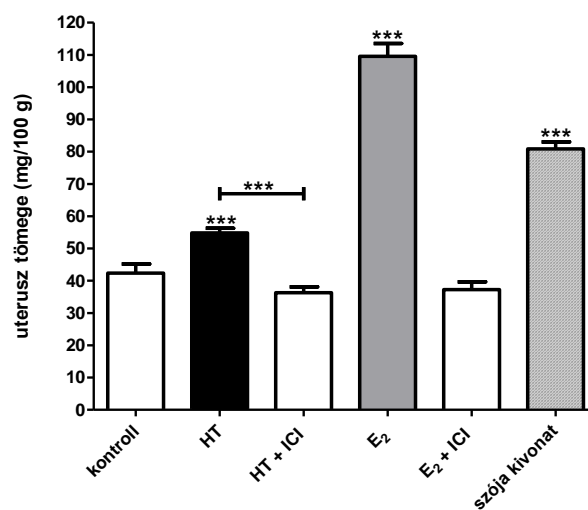
5. ábra: Az androgén-érzékeny szervek tömegének változása 25 µg/kg (közepes dózis) metil-palmitát és 250 µg/kg (nagy dózis) metil-oleát és metil-palmitát kombinációs (K) kezelés hatására kasztrált patkányokban. Ezen adagok fokozták a májk (A), az ondóhólyag (B), a nagy farokemelő izom (D) relatív tömegét (mg/100 g testtömeg). Ez a hatás flutamiddal (F) gátolható volt. A nyers HT-hez hasonlóan, az említett komponensek nem befolyásolták szignifikánsan e prosztata tömegét (C). Tesztoszteront (T) alkalmaztunk pozitív kontrollként. *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ns: nem szignifikáns

A plazma tesztoszteron szintre a MO és a MP egyik alkalmazott adagban sem volt hatással. Ezzel ellentétben a legnagyobb dózisban alkalmazott kombinációjuk fokozta a plazma tesztoszteron szintjét.

A heretej ösztrogén hatása

A nyers heretej *in vivo* ösztrogén hatása

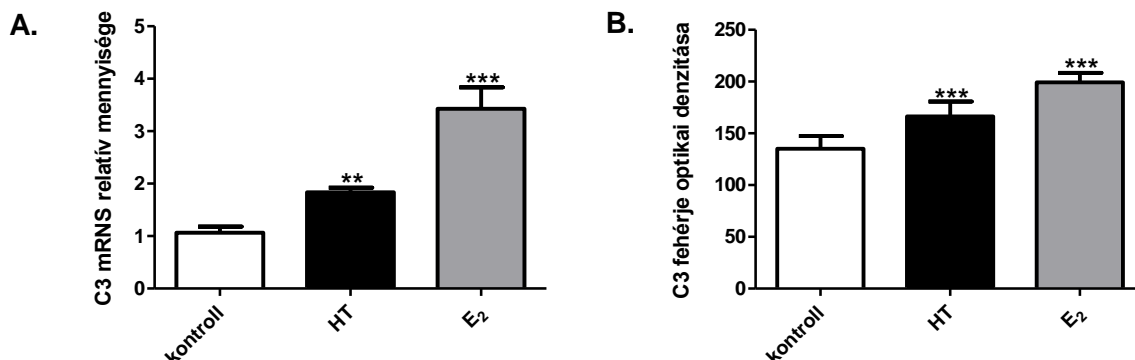
A 17 β -ösztadiol-valerát (E₂) növelte a patkány uterusz relatív tömegét, mely hatása az antiösztrogén ICI 182.780 (ICI) vegyülettel gátolható volt. A nyers HT szintén fokozta az uteruszok relatív tömegét és az ICI gátolta ezt a hatást az E₂ esetéhez hasonlóan. A szója kivonat is képes volt fokozni az uteruszok relatív tömegét (6. ábra).



6. ábra: A patkány uterusz tömegének változása nyers heretejjel (HT), 17 β -ösztadiol-valeráttal (E₂) és szója kivonattal történő kezelést követően. A HT, az E₂ és a szója kivonat is fokozta az uteruszok relatív tömegét. Mindezen hatások ICI 182.780 (ICI)-érzékenyek voltak. *** p<0.001; ns: nem szignifikáns

C3 mRNS és fehérje mérések patkány uterusz szövetben

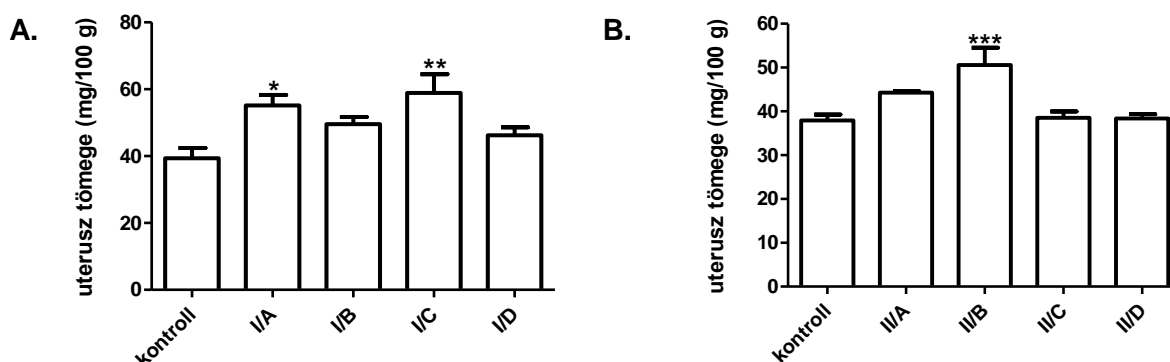
Az RT-PCR mérések eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a HT fokozta a C3 mRNS expresszióját a méhszövetben. A pozitív kontroll E₂ is szignifikáns hatást mutatott. A Western blot vizsgálatokban a HT növelte a C3 fehérje mennyiségét az uteruszban, és az előzőkhöz hasonlóan az E₂ is hatásosnak bizonyult (7. ábra).



7. ábra: A complement component 3 (C3) mRNS és fehérje expressziójának RT-PCR és Western blot vizsgálata patkány uteruszban. A nyers heretej (HT) fokozta az ösztrogén-érzékeny C3 mRNS expresszióját (A) és fehérje mennyiségét (B) a patkány uterusz szövetben. ** p<0.01; *** p<0.001

Biológiai aktivitást kereső vizsgálatok

Az első elválasztást követően, az azonos komponenseket tartalmazó kivonatokat egyesítettük és hatásait uterotróp teszttel vizsgáltuk. További frakcionálást végeztünk az aktívnak mutató I/C kivonattal, de így ez a frakció hatását veszítette, ezért nem végeztünk további vizsgálatokat ezzel a kivonattal. Eredményeink alapján az I/A és I/B frakciók további elválasztása történt meg. Az ösztrogén hatást mutató I/A kivonat legfőbb komponense kisebb mennyiségben az I/B frakcióban is megtalálható volt, így ezeket a frakciókat egyesítve folytattuk oszlopkromatográfiás vizsgálatokat. A második oszlopkromatográfiás elválasztásnál kisebb lépésekben történt a frakciók gyűjtése, így sokkal hatékonyabb tisztítást érthtünk el (8. ábra).

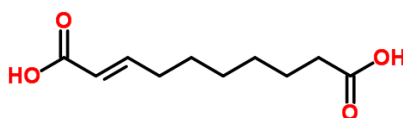


8. ábra: Biológiai aktivitást kereső vizsgálatok. Az I/A és I/C kivonatok fokozták a méhszövet relatív tömegét (A). Második lépésben már csak a II/B frakció volt képes az uterusz tömegének növelésére (B).

I/A: 20% vizes MeOH frakció; **I/B:** 40%, 60%, 80% vizes MeOH frakció; **I/C:** 100% MeOH frakció; **I/D:** diklórmetános frakció; **II/A:** 20% vizes MeOH frakció; **II/B:** 35% vizes MeOH frakció; **II/C:** 70% vizes MeOH frakció; **II/D:** 75% vizes MeOH frakció; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

A nyers heretej ösztrogén hatóanyagainak azonosítása

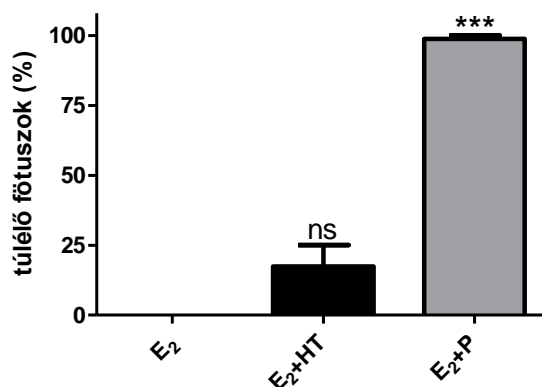
A II/B frakció fő komponensét HR-ESI-MS és NMR vizsgálatok adatai alapján azonosítottuk. A ¹H NMR spektrum analízise *transz* kettős kötés jelenlétét jelezte, amit az 5,80 (H-2, J=15,5 és 1,5 Hz) és a 6,92 ppm (H-3, J=15,5 és 6,9 Hz) értékeknél mutatkozó tripletek két dublettje igazolt. Egy- és kétdimenziós ZTOCSY spektrumokon megfigyelt metilén és olefin protonok közötti korreláció ill. HSQC és HMBC spektrumokon észlelt két karboxil-csoport jelenléte a C-2 és C-9 helyeken lehetővé tette a vegyület azonosítását. A frakció fő komponensként a deka-2-én dikarbonsav volt azonosítható (9. ábra).



9. ábra: A deka-2-én dikarbonsav szerkezete (ChemSpider adatbázis)
A heretej gesztagén hatása

A nyers heretej *in vivo* gesztagén hatása

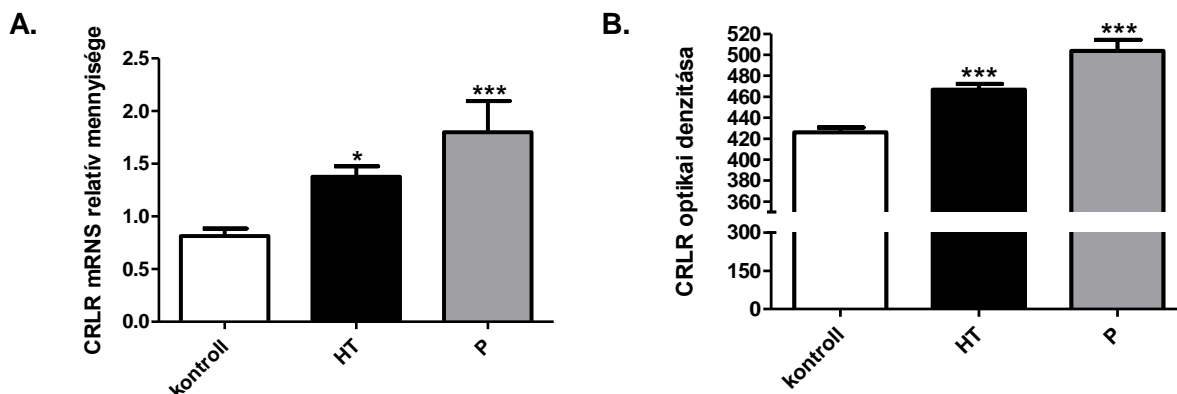
A nyers HT gesztagén hatását vemhességmegtartó teszt segítségével vizsgáltuk. A kísérletek során az E₂ önmagában (negatív kontroll) a főtuszok teljes elhalásához vezetett, míg kombinációja HT-jel a főtuszok 17,4 %-ának életben maradását eredményezte. Habár a kombináció számszerűen fokozta a túlélő főtuszok számát, szignifikáns hatásról mégsem beszélhetünk. Pozitív kontrollként alkalmazott E₂ és progeszteron (P) kombinációja a főtuszok 98,8 %-ának életben maradását eredményezte (10. ábra).



10. ábra: A heretej (HT) vemhesség megtartó hatása petefészek irtott vemhes patkányokban 17 β -ösztradiol-valerát (E₂), E₂ és HT kombináció, valamint E₂ és progeszteron (P) kezelés hatására. A HT a főtuszok 17,4%-át tartotta életben. ***: p<0,001; ns: nem szignifikáns

CRLR mRNS és fehérje mérések patkány uterusz szövetben

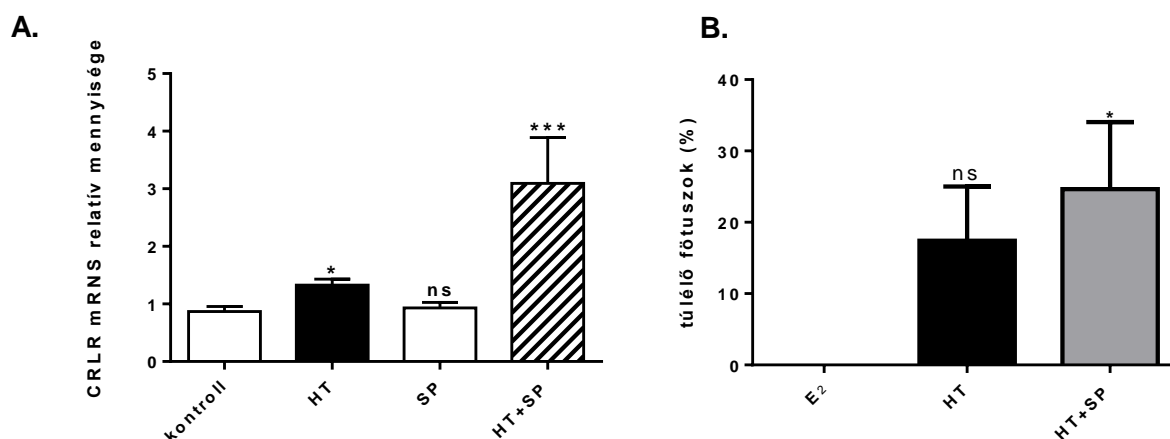
RT-PCR mérések során azt tapasztaltuk, hogy a HT, a progeszteronhoz hasonlóan fokozza a CRLR mRNS-ének expresszióját. A Western blot mérések során is hasonló eredményeket kaptunk, HT kezelés hatására az uteruszból izolált CRLR fehérje mennyisége megnövekedett (11. ábra).



11. ábra: A Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) mRNS és fehérje expressziójának változása a RT-PCR és Western blot vizsgálatokban. A nyers heretej (HT) fokozta a gesztagén-érzékeny CRLR mRNS (A) és fehérje (B) expresszióját a patkány méhszövetében. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

A heretej gesztagén hatáserősségének mérése

A további kísérleteinkbe egy a HT-hez hasonlóan gyenge gesztagén hatású vegyületet vontunk be. A spironolaktont (SP) önmagában és HT-jel kombinációban vizsgáltuk. A spironolaktont önmagában nem volt képes fokozni a CRLR mRNS-ének a mennyiségét, de kombinálva heretejjel jelentős CRLR mRNS-szint növekedést figyeltünk meg. A vemhességmegtartó teszt alapján azt találtuk, hogy a HT-et spironolaktonnal kombinálva is csupán a főtuszok mintegy 21,4%-a maradt életben, habár ez a hatás már szignifikánsnak mutatkozott (12. ábra).



12. ábra: A heretej (HT)-spironolaktont (SP) kombináció CRLR mRNS expresszióra kifejtett hatása ill. vemhességmegtartó hatása. A spironolaktont önmagában nem mutatott a CRLR mRNS expressziójára gyakorolt hatást, ellenben kombinációban jóval nagyobb hatást mutatott, mint a HT önmagában (A). A kombináció képes volt életben tartani a főtuszok 21,4%-át (B).). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns: nem szignifikáns

Eredmények értékelése, következtetések

A HT egy kevésbé ismert méhészeti termék, amely a hereméh fészekalj lárva és báb fejlődési alakoktól megtisztított kivonata, ill. a hereméhék és lárváik legfőbb tápláléka. A népi gyógyászatban alkalmazzák mind HT-et, mind a fagyasztott hereméh lárvákat, melyek táplálék kiegészítőként, ill. afrodisiakumként is elérhetőek (Frozen drone larvae royal jelly®, Apidom Ltd, Oroszország; Apilarnil Potent®, S.C. Biofarm S.A., Románia). Mivel a HT-et mindkét nemből szexuális problémák kezelésére alkalmazzák, feltételeztük, hogy a HT nemi hormon hatásokkal is rendelkezik. Ezért célunk volt mind női, mind férfi nemi hormon hatások feltérképezése és a hatásért felelős vegyületek azonosítása.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az eddig ismeretlen HT jól definiálható nemi hormon hatásokat mutatott hím és nőstény patkányokban. A HT jelentős androgén hatással rendelkezik, mivel szignifikánsan képes volt fokozni, a prosztatát kivételével, az androgén-érzékeny szervek tömegét kasztrált patkányokban. A HT *in vivo* androgén hatását molekuláris szinten is bizonyítottuk, a HT képes volt fokozni a SLAP mRNS és fehérje expresszióját is a prosztatában. A biológiai aktivitást kereső frakcionálásokat követően NMR és MS mérésekkel izoláltuk az androgén hatásért felelős két komponenst, a MP-ot és a MO-ot. A pontos hatásmechanizmusuk megismerése további kísérletek igényelne, de a szakirodalmi adatok alapján a nemi hormonok bioszintézisében lehet szerepük. A tény, mely szerint a HT, ill. a MP és a MO anabolikus hatás nélkül képesek fokozni az androgén-érzékeny szervek tömegét, egy új terápiát jelenthet a férfiak infertilitási problémáinak kezelésében.

Mindezek mellett a HT ösztrogén hatást mutatott nőstény patkányokban, ugyanis fokozta a méhszövet tömegét nemileg éretlen patkányokban. A HT C3 fehérje expressziót növelő hatása újabb bizonyítékot jelent ösztrogén hatásának alátámasztására. Az izolált deka-2-én dikarbonsav nagy szerkezeti hasonlóságot mutat a méhpempő ösztrogén hatású vegyületeivel, melyek képesek kötődni a humán ER-hoz. Ezen hasonlóság alapján feltehetően az általunk azonosított vegyület is a humán ER-hoz kötődve fejti ki hatását. A HT megismert ösztrogén hatása alátámasztja a népgyógyászati alkalmazását és a méhpempőhöz hasonlóan újabb terápiás lehetőséget jelenthet a nők ösztrogénhiánnyal járó problémáiban.

A HT androgén és ösztrogén hatása mellett gyenge gesztagen hatást is mutat, mely egy másik gyenge gesztagénnel kombinálva jelentősen fokozódik. Gesztagen hatását molekuláris vizsgálataink is alátámasztják. A pontos hatásmechanizmusa jelenleg még ismeretlen, de a HT ösztrogén vagy androgén hatásáért felelős komponensei rendelkezhetnek akár gyenge gesztagen hatással is.

- III Seres Adrienn**, Gáspár Róbert: Ösztrogén és androgén moduláló hatások vizsgálata heretejjel patkányokban in vivo
XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, Hungary, 2009 (Poszter)
- IV Seres Adrienn**, Gáspár Róbert: A heretej androgén moduláló hatásának vizsgálata patkányokon in vivo
Common Scientific Conference of Hungarian Physiological Society (MÉT) and Hungarian Society for Experimental and Clinical Pharmacology (MFT), Szeged, Hungary, 2010 (Poszter)
- V Adrienn Seres**, Eszter Ducza, Róbert Gáspár: Sexual hormone-like effect of raw drone milk in female rats
Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines 3rd PharmSciFair Meeting, Prague, Czech Republic, 2011 (Poszter)
- VI Seres AB**, Ducza E and Gáspár R: Estrogenic and gestagenic effect of raw drone milk
Diczfalusy Symposium on reproductive health, Szeged, Hungary, 2011 (Poszter)
- VII Adrienn Seres**, Eszter Ducza, Róbert Gáspár: Sexual hormone-like effect of raw drone milk in female rats
„Molekulától a gyógyszerig” TÁMOP Conference, Szeged, Hungary, 2012 (Poszter)
- VIII Seres Adrienn**: A heretej ösztrogén hatásának vizsgálata patkányban
XX. Szent-Györgyi Napok, Szeged, Hungary, 2013 (Előadás)
- IX Seres AB**, Ducza E, Báthori M, Hunyadi A, Béni Z, Dékány, Hajagos Tóth J, Verli J, Gáspár R: Androgenic effect of honeybee drone milk in castrated rats
Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific Conference, Split, Croatia, 2014 (Poszter és előadás)

NYILATKOZAT SAJÁT MUNKÁRÓL

Név:

Seres Adrienn Pharm.D.

A doktori értekezés címe:

Sexual hormone effects of honeybee (*Apis mellifera*) drone milk in male and female rats

Én, Seres Adrienn teljes felelősségem tudatában kijelentem, hogy a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskolában elkészített doktori (Ph.D.) disszertációm saját kutatási eredményeimre alapulnak. Kutatómunkám, eredményeim publikálása, valamint disszertációm megírása során a Magyar Tudományos Akadémia Tudományetikai Kódexében lefektetett alapelvek és ajánlások szerint jártam el.

Szeged, 2014. 08. 25.

Seres Adrienn