

## ***Orvos- és Egészségtudományi Szekció***

---

*Lektorálták: Dr. Fekete Béla (PEME;SE)  
Dr. Székely Andrea (SE)*

## Tartalom

<i>Dr. Seres Adrienn: A heretej ösztrogénhatásának vizsgálata patkányban – SZTE, Gyógyszertudományok Doktori Iskola.....</i>	<i>348</i>
<i>Dr. Molnár Judit: Növényi eredetű szeszkviterpének tumorelleses hatásának vizsgálata in vitro - SZTE, Gyógyszertudományok Doktori Iskola.....</i>	<i>356</i>
<i>Szénási Tibor: Hmgb1 elősegíti a matrilin-1 gén aktivációját a porcfejlődés korai szakaszában – SZTE ÁOK, Multidiszciplinális Orvostudományok.....</i>	<i>364</i>
<i>Dr. Fejes Zsolt: Felső-légúti betegségek kontra mandula műtét – Nemzetközi Közszolgálati Egyetem, Katonai Műszaki Doktori Iskola .....</i>	<i>375</i>
<i>Dobos Attila - Nagy Éva: Idegenség és egészség – antropológusi pozíciók a biomedikális modell értelmezésében – SE-ETK, Alapozó Gyógyszertudományi Intézet, Társadalomtudományi Tanszék.....</i>	<i>383</i>
<i>Dr. Pák Krisztián, Dr. Gesztelyi Rudolf: Tud-e a tengerimalac szívből hazudni? - az adozin receptor rezerv meghatározásának nehézségei tengerimalac bal pitvaron – DE OEC, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszék .....</i>	<i>388</i>

## ABSTRACT

Numerous honeybee products are used in medicine, but the literature furnishes no information concerning effects of the drone milk (DM), although drone brood which is similar to DM was reported to elicit hormone-like strengthening effect. In certain countries, DM is traditionally used to treat infertility and to promote vitality in both men and women. The aim of this study was to determine the putative estrogen hormone-like effect of raw DM in rats and to identify effective compounds.

Uterotrophic assays revealed that DM increased the relative weight of the immature rat uterus. This effect was confirmed by RT-PCR and Western blot methods in which the mRNA and protein expressions of estrogen-dependent complement component C3 peptide were determined. Column chromatography and uterotrophic assays were used to fractionate and check bioactivity, respectively.

The active compound after the last fractionation was identified by NMR and MS techniques as E-dec-2-enedioic acid, which is very similar to fatty acids with estrogenic activity that were isolated earlier from royal jelly.

These results lead us to suppose that E-dec-2-enedioic acid is responsible for the estrogen-like effect of DM. This appears to be the first report on the pharmacological effects of DM and E-dec-2-enedioic acid in mammals.

---

### I. Bevezetés

---

A fitoösztrogének - melyek számos különböző komponenst foglalnak magukba, úgymint flavanoidok, lignánok, kumesztánok, stilbének -, olyan növényi származékok, melyek szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak a  $17\beta$ -ösztradiollal (1). Számos közlemény született a szintén ösztrogénhatású szója izoflavanoidokról, mint például a daidzein, és aktív metabolitja az equol, a genistein ill. a glycitein (2). Ezek a jól ismert vegyületek enyhítik menopauza tüneteit, az éjszakai izzadást, a hangulatingadozásokat (3), mivel képesek kötődni az ösztrogén receptorhoz (4; 5).

A növényi szteroloknak fontos szerepe van a rovarok életében is, hiszen ezekből az anyagokból kiindulva a rovarok képesek számos enzim (hidroxilázok, dehidrogenázok) segítségével saját hormonjaik előállítására (6). A mézelő méhek fitoszterinekből olyan ecdiszteroidokat állítanak elő, melyek szabályozzák vedlésüket, átalakulásukat és szaporodásukat (7). Az ecdiszteroidok, mint például a 20-hidroxiecdizon anabolikus hatással rendelkeznek (8). Mindezek mellett számos a méhpempőből izolált zsírsavról (10-hidroxi-trans-2-dekanoátsav és származékai) igazolták különböző sejtvonalakon, hogy kötődik az ösztrogén receptorhoz és hipertrófiázja a patkányok miometriumát (9). Ezen *in vitro* és *in vivo* eredmények alapján a méhpempő a hormonpótló terápia alternatívája lehet menopauzában (10) és jótékony hatású a különböző fertilitási problémák kezelésében (11).

Kevésbé ismert, hogy a méhkirálynőhöz hasonlóan, a hereméheknek saját, speciális táplálékuk van, melyet heretejnek neveznek. A heretej, mint külön méhészeti termék az angolszász szakirodalomban ismeretlen, habár a hereméhek fészekalját Kínában, Oroszországban és Erdélyben tradicionálisan klimax, szexuális problémák kezelésére alkalmazzák, mindemellett általános roboráló szerként is jelen van a népgyógyászatban. Romániában például az Apilarnilt, amely fagyasztott hereméh fészekaljat tartalmaz, alkalmazzák idős emberek rehabilitására és aktivitásuk fokozására (11). A hereméhek fészekaljának fő komponense a heretej, mely a dolgozó méhek garatmirigyének a váladéka, de már nem tartalmazza a lárva és a báb fejlődési alakokat. A heretejet méhészek a mézhez hasonlóan pergetéssel készítik és a hereméh fészekaljhoz hasonló felhasználási területen alkalmazzák a népi gyógyászatban.

Mivel a méhpempő ösztrogénhatást mutat az emlős szervezetben és ugyanaz a mirigy végzi az elválasztását mind a heretejnek, mind a méhpempőnek, így vizsgálatainkban célul tűztük ki a heretej lehetséges ösztrogénhatásának a feltérképezését és a hatásért felelős komponens feltárását.

## II. Módszerek és anyagok

### II.1. Heretej gyűjtése

A heretejet repcevirágzáskor, késő tavasszal gyűjtötték, magán méhészetben készítették el, leválasztva a lárva és báb alakokat. A nyers heretejet műanyag fagyasztócsövekbe szétosztottuk és a kísérletek megkezdéséig -20°C-on tartottuk.

### II.2. Uterotróp teszt

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).

Kísérleteinkben még nem ivarérett nőstény Sprague-Dawley nőstény patkányokat használtunk, melyeket a Charles River Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be. Az állatokat kontrollált hőmérsékletű (20-23°C), páratartalmú (40-60 %) és világítású (12 órás világos-sötét periódus) Kísérleti Állattisztálóban tartottuk, ahol rágcsálótápot és csapvizet kaptak *ad libitum*.

Az uterotróp tesztet Song és munkatársai 2002-ben megjelent publikációja alapján végeztük (12). 20-21 napos (50-55 g) Sprague-Dawley nőstény patkányokat 6 csoportba (n=10) osztottunk és 4 egymást követő napon kezeltünk a kísérleti anyagokkal. A kísérleti elrendezést az **1. táblázat** mutatja.

Csoport	Kezelés	Dózis	Adagolás
1	víz (kontroll)	0.5 ml/nap	per os
2	heretej	570 mg/kg/nap	per os
3	heretej + ICI 182.780	570 mg/kg/nap + 400 µg/kg/nap	per os + szubkután
4	17β-ösztradiol-valerát	3.93 µg/kg/nap	szubkután
5	17β-ösztradiol-valerát + ICI 182.780	3.93 µg/kg/nap + 400 µg/kg/nap	szubkután + szubkután
6	szója izoflavon	500 mg/kg/nap	per os

1. táblázat

A heretejet desztillált vízzel hígítottuk, a szója kivonatot (Aktív Meno kapszula, Drogerie Markt, Karlsruhe, Németország) pedig 0,5 %-os metil-cellulóz nyákban (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) szuszpendáltuk. Minden kapszula 25 mg szója izoflavont, emellett C-, E- és H-vitamint és folsavat, valamint dikálcium-foszfátot és cink-oxidot tartalmazott.

A **2. táblázat** a biológiai aktivitást kereső frakcionálás kísérleti elrendezését mutatja.

Frakció	Kiindulási mennyiség (g)	Frakció mennyisége (mg)	Dózis (mg/kg)	Vivőanyag
I/A	16.20	310.0	26.000	metil-cellulóz nyák
I/B	16.20	10.0	0.840	metil-cellulóz nyák
I/C	16.20	60.0	5.000	metil-cellulóz nyák
I/D	16.20	880.0	0.074	olíva olaj
II/A	178.16	15.9	0.121	metil-cellulóz nyák
II/B	178.16	60.0	0.458	metil-cellulóz nyák
II/C	178.16	14.3	0.109	olíva olaj
II/D	178.16	14.6	0.111	olíva olaj

2. táblázat

Ebben az esetben a per os kezelést követően a hatásos frakciókat a fentebb említett uterotróp teszttel igazoltuk. A kontroll csoportot 0,5 %-os metil-cellulóz nyákkal vagy olíva olajjal kezeltük.

Az utolsó kezelést követően 24 órával az állatokat mély izoflurán (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) anesztéziában leöltük, a méhszövetet eltávolítottuk, a környező szövetektől, zsírszövettől megtisztítottuk, majd tömegét analitikai mérlegen (HR-202, ACD Instruments, Oxfordshire, UK) megmértük. A szervtömegeket testtömegre számítva mg/testtömeg kg-ban tüntettük fel.

### II.3. RT-PCR mérés

Vizsgálatainkban, 8 nappal a kezelések kezdete előtt 160-180 g-os nőstény patkányok petefészket izoflurán anesztéziában eltávolítottuk, majd 2 napig kezeltük a vizsgálati anyagokkal. A kontroll csoport olíva olajat, mint vivőanyagot, a pozitív kontroll csoport szubkután  $17\beta$ -ösztadiol-valerátot (96,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{nap}$ ), a harmadik csoport pedig per os heretejet (0,5 g/kg/nap) kapott. Az utolsó kezelést követően 24 órával az állatokat mély izoflurán anesztéziában leöltük, a méhszövetet eltávolítottuk. A környező szövetektől, zsírszövettől megtisztítva a mintákat egy éjszakán keresztül 4°C-on RNAlater oldatban (Life Technologies, Budapest, Magyarország) tároltuk, majd ezt az oldatot eltávolítva a vizsgálat kezdetéig -70°C-on tartottuk a mintákat.

A mintákból TRI reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) totál RNS-t izoláltunk, mely mennyiségi és minőségi meghatározása nanotróp technikával (BioSpec Nano, Shimadzu Biotech, Budapest, Magyarország) történt 260-280 nm-en (OD: 1,6-2,0). Első lépésben 1  $\mu\text{g}$  totál RNS-ből kiindulva reverz transzkripció során cDNS-t szintetizáltunk High-capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, Budapest, Magyarország) felhasználásával. Az RNS mintákat először 60 percig 37°C-on, majd 5 percig 95°C-on, végül 5 percig 4°C-on tartottuk és az így elkészült cDNS-t -20°C-on tároltuk. A PCR termékek (C3, GAPDH) felsokszorozását TaqMan Gene Expression Master Mix-szel (Life Technologies, Budapest, Magyarország) végeztük ABI StepOne Real-Time PCR készülékben (Life Technologies, Budapest, Magyarország). 2 percig 50°C-on, majd 10 percig 95°C-on, végül 40 cikluson keresztül 15 másodpercig 95°C-on és 1 percig 60°C-on történt a felsokszorozás. Eredményeinket az RQ (relative quantitation) összehasonlításával kaptuk, melyhez az áttörési pontokat ( $C_T$ : az a ciklusszám, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd) használtuk fel.

### II.4. Western blot vizsgálat

160-180 g-os nőstény patkányok petefészket eltávolítva, a RT-PCR vizsgálatnál leírt módon történt a kezelés, mely végeztével uterus mintákat gyűjtöttünk. A szöveteket Sartorius Mikro Dismembrator U készülékkel (Sartorius, Goettingen, Németország) elporítottuk és RIPA lízis pufferben homogenizáltuk, mely tartalmaz még nátrium-ortovanadátot, PMSF-et és

proteáz inhibitor koktélt. A mintákat 10 percig 10.000 g fordulaton 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó frakcióból totál fehérjét mértünk. Zsebenként 20 µg fehérjét vittünk fel 4-12 %-os NuPAGE Bis-Tris géltre (Life Technologies, Budapest, Magyarország) és XCell SureLock Mini-Cell Units (Life Technologies, Budapest, Magyarország) készüléken elektroforézisnek vetettük alá. A gélen lévő szétválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk át iBlot Gel Transfer System (Life Technologies, Budapest, Magyarország) alkalmazásával. Az antitest kötődését WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies, Budapest, Magyarország) segítségével detektáltuk. A membránt rázógépen komplement komponens C3 és β-aktin poliklonális antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:200) inkubáltuk a blokkoló pufferben. Az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása, a háttér intenzitás kivonása után Kodak 1D Images szoftverrel (Carestream Health, Rochester, NY, USA) történt.

### ***II.5. Biológiai aktivitást kereső frakcionálás***

---

A biológiai aktivitást kereső frakcionálásokat az Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziái Intézetével együttműködésben végeztük. A nyers heretejet (165 ml) vízzel hígítottuk, petróleum éterrel (5 x 200 ml) extraháltuk, majd a petróleum éteres fázist összegyűjtve vízzel (3 x 10 ml) újra extraháltuk. Ezt az egyesített vizes fázist vittük fel oktadecil-szilika oszlopra (ChemieUeticon-C-Gel, Chemie Ueticon, Ueticon am See, Svájc; 0,06-0,02 µm) és alacsony nyomású reverz fázisú oszlopkromatográfiának vetettük alá. Így négy frakciót nyertünk, melyeket I/A (vizes), I/B (vizes-metanolos), I/C (metanolos), I/D (diklórometános) jelzéssel jelöltünk. A frakciókat eluáltuk az oszlopról, egyesítettük a vizes-metanolos kivonatokat, majd beszárítottuk a mintákat. A kivonatokat további frakcionálásnak vetettük alá ismételt alacsony nyomású reverz fázisú oszlopkromatográfia alkalmazásával (növekvő metanol tartalom mellett), mely során négy újabb frakciót nyertünk (II/A, II/B, II/C, II/D) az uterotróp teszthez. A hatásos II/B frakciót tovább tisztítottuk, az elválasztás követésére vékonyréteg kromatográfiát alkalmaztunk és az így kapott III/B frakciót NMR és tömegspektrometriai vizsgálatoknak vetettük alá.

### ***II.6. HRMS és NMR mérések***

---

A HRMS és NMR méréseket a Richter Gedeon Nyrt. Spektroszkópiái Munkacsoportjával szoros együttműködésben végeztük el. A HRMS vizsgálatokhoz szükséges mintákat metanolban oldottuk, a méréshez LTQ FT Ultra spektrométert (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) használtunk.

Az NMR spektrumok MeOH-d4-ben (Merck, Darmstadt, Németország) Shigemi mintatartó csövekben (Shigemi, Allison Park, PA, USA) lettek felvéve, 298 K-en Varian 800 MHz NMR spektrométer alkalmazásával. Az NMR mérésekhez (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-Présat, GHSQCAD, GHMBCAD, egy- és kétdimenziós zTOCSY) szükséges pulzusszekvenciák a VNMRJ 3.2 szoftver könyvtárából származnak.

### ***II.7. Statisztika***

---

Az uterotróp teszt és a molekuláris farmakológiai vizsgálatok eredményeit Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével ANOVA Newman-Keuls teszttel elemeztük. Az értékeket SEM-ben tüntettük fel, a szignifikancia p<0,05 értéknél elfogadott.

A HRMS vizsgálatokból származó adatokat Xcalibur 2.0 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) elemeztük.

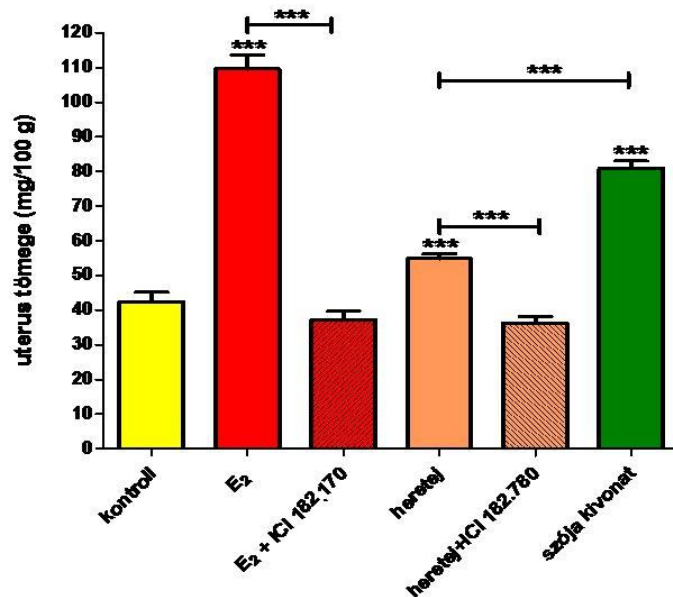
## **III. Eredmények**

---

### ***III.1. In vivo ösztrogénhatás***

---

Elsőként a nyers heretej ösztrogén hatását vizsgáltuk uterotróp teszttel (**1. ábra**)

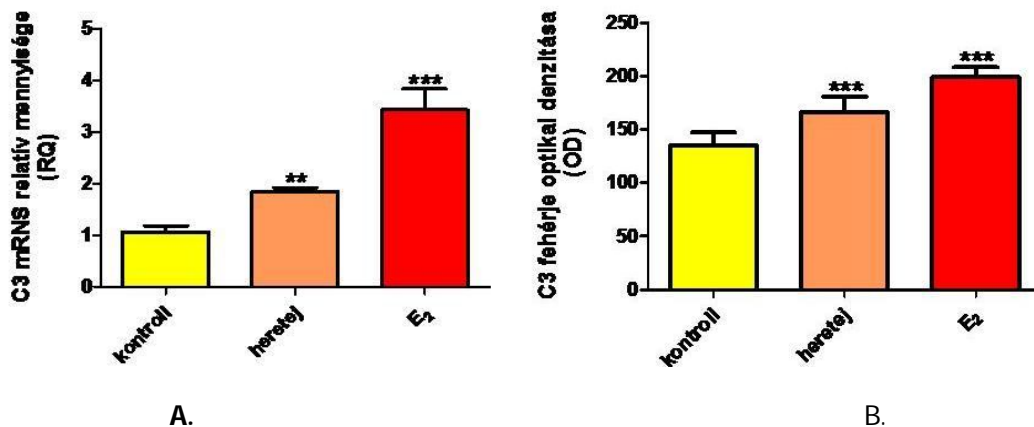


1. ábra: Különböző kezelések hatására bekövetkező uterus tömegváltozások infantilis patkányokban (n=10). A heretej és a 17 $\beta$ -ösztradiol-valerát (E<sub>2</sub>) fokozta az uterus tömegét, mely hatás az ICI 182.780-val gátolható volt mindkét esetben. \*\*\* p<0,001

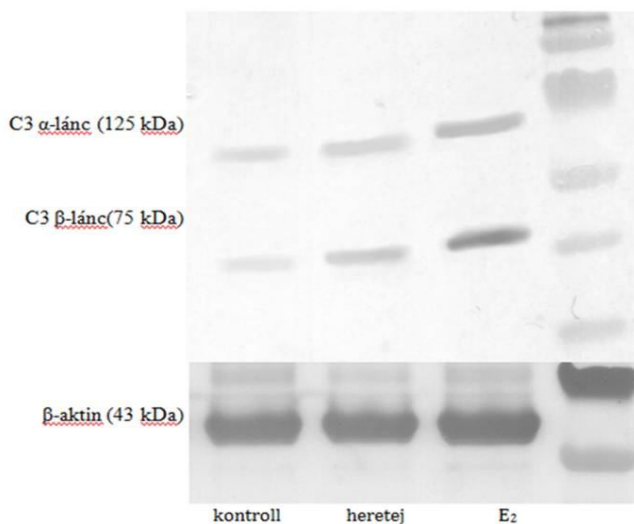
A kísérletek validálásához pozitív kontrollként 17 $\beta$ -ösztradiol-valerátot használtunk, mely a kontroll csoporthoz viszonyítva 42,35  $\pm$  2,85 S.E.M. értékről 109,60  $\pm$  4,00 S.E.M. értékre növelte az uterus tömegét. A heretej kezelés az uterus tömegét 54,84  $\pm$  1,41 S.E.M. értékig tudta megemelni. Mind a 17 $\beta$ -ösztradiol-valerát, mind a heretej által kiváltott uterus tömegnövekedés az antiösztrogén ICI 182.780 jelenlétében gátolható volt. Ez az előbbi esetben 37,25  $\pm$  2,41 S.E.M. értékre, míg a heretej esetén 36,30  $\pm$  1,77 S.E.M. értékre csökkentette az uterusok tömegét. A tisztított szója izoflavanoidokkal történő kezelés hatására az uterusok tömege 80,90  $\pm$  S.E.M. értéket mutatott.

A RT-PCR mérések eredményeként azt találtuk, hogy a heretej majdnem duplájára növelte a komplement komponens C3 (C3) mRNS expresszióját a patkány uterusban. A pozitív kontroll, 17 $\beta$ -ösztradiol-valerát esetében is jól látszik a C3 mRNS expressziót fokozó hatás (2. ábra).

2. ábra: Patkány uterusból (n=6) izolált komplement komponens C3 mRNS expressziójának a változása a kezelések hatására. A nyers heretej képes volt fokozni az ösztrogén-dependens C3 mRNS expresszióját, hasonlóan a 17 $\beta$ -ösztradiol-valeráthoz. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001



A Western blot mérések során azt tapasztaltuk, hogy a heretej kezelés hatására az uterusból izolált C3 fehérje mennyisége megnövekedett, hasonlóan a  $17\beta$ -ösztradiol-valeráthoz (**3A. ábra**). A gélfotón (**3B. ábra**) a C3 fehérje  $\alpha$ -és  $\beta$ -láncra vált szét; mindkét lánc optikai denzitását feltüntettük a 3A. ábrán.

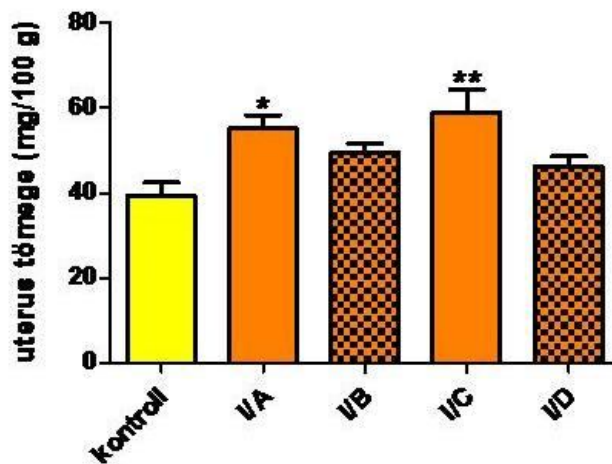


**3. ábra:** Patkány uterusból ( $n=6$ ) izolált komplement komponens C3 fehérjének változása a kezelések hatására. A nyers heretej fokozta az ösztrogén-dependens C3 fehérjét az uterusban, hasonlóan a  $17\beta$ -ösztradiol-valeráthoz (A). A gélen  $\alpha$ -és  $\beta$ -láncokat detektáltunk (B).

\*\*\*  $p < 0,001$

### III.2. Frakcionálás

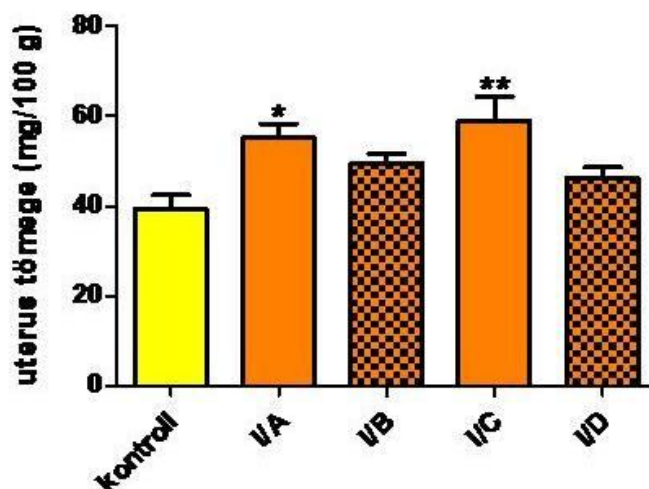
A nyers heretejet vízzel hígítottuk, majd petróleum éterrel kiráztuk, hogy az apoláris szennyezéseket eltávolítsuk. Ezt az előtisztított kivonatot ismételt reverz fázisú oszlopkromatográfiának alávetve nyertünk négy frakciót az uterotróp teszthez, melynek eredményét a **4. ábra** mutatja be.



**4. ábra:** Biológiai aktivitást kereső frakcionálás: 1. lépés. A 20 %-os metanolos (I/A) és a tiszta metanolos (I/C) frakció fokozta az uterus tömegét ( $n=10$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

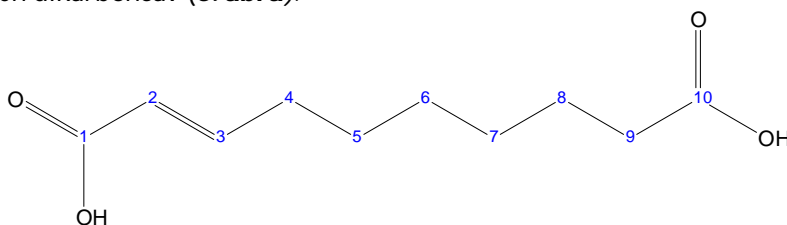
Az első frakcionálás eredményei alapján két frakció (I/A, I/C) képes volt fokozni az uterus tömegét. Mivel az I/A jelű frakció fő komponense az I/C frakcióban is jelen volt, így ezeket a frakciókat egyesítve további oszlopkromatográfiás tisztítást végeztünk el. Így négy tovább tisztított frakciót nyertünk a bioaktivitást vizsgáló uterotróp teszthez (**5. ábra**).





**5. ábra:** Biológiai aktivitást kereső frakcionálás: 2. lépés. Csak a II/B jelű frakció volt képes fokozni az uterus tömegét ( $n=10$ ), a többi frakció hatástalannak bizonyult. \*\*\*  $p<0,001$

Az aktív II/B frakcióból preparatív vékonyréteg-kromatográfiás tisztítást követően nyert III/A frakciót tömegspektrometriai és NMR méréseknek vetettük alá. Habár ez a frakció még mindig többkomponensű volt, a fő komponenszt azonosítani tudtuk. Az izolált fehér, színtelen, amorf por a deka-2-én dikarbonsav (**6. ábra**).



**6. ábra** Deka-2-én dikarbonsav szerkezete és szénatom számozása.

#### IV. Következtetés

A heretej egy kevésbé ismert tisztított herefészekalj kivonat, amely már nem tartalmazza a lárva és báb alakokat. Ez a sárgás, tejszerű, enyhén édes ízű méhészeti termék a hereméhek minden fejlődési alakjának a legfőbb tápláléka. Mivel a herefészekaljat a népgyógyászatban különböző szexuális problémák kezelésére alkalmazzák (11), így azt feltételeztük, hogy a heretej is hormonhatással rendelkezhet. Ezért női nemi hormonhatás igazolása mellett, a hatásos komponens azonosítása is célunk volt.

A nyers heretej infantilis nőtény patkányokban fokozta az uterus tömegét és ez hatás ösztrogén-antagonistával gátolható volt, hasonlóan a  $17\beta$ -ösztradiol-valeráthoz. Ez az eredmény egyértelműen azt jelzi, hogy a nyers heretej ösztrogénhatással rendelkezik. Habár a heretej hatása kissé elmarad a szója izoflavonoidok mellett, hatása mégis jelentős, mivel a heretej tisztítatlan formában volt jelen, míg a szója készítmény már tiszta izoflavonoidokat tartalmazott.

Az uterotróp teszt mellett molekuláris farmakológiai vizsgálatokat is végeztünk a hormon hatás alátámasztására. A komplement komponens C3 expressziója a patkány uterusban az ösztrogénhatás kiváló molekuláris markere (13). A C3 fehérje mRNS szintjének heretej kezelés hatására bekövetkező emelkedése igazolta az uterotróp teszt eredményeit. A Western blot vizsgálatok is hasonló eredményt mutattak, a heretej fokozta a C3 fehérje

expresszióját patkány uterusban. Molekuláris farmakológiai vizsgálataink eredménye teljes összhangban van az *in vivo* teszt eredményeivel.

A hatásos komponens azonosításához háromlépéses bioaktivitást kereső frakcionálást végeztünk, melyet MS és NMR mérésekkel egészítettünk ki. A frakcionálásokat követően egy olyan többkomponensű frakciót nyertünk, amelyből már izolálható volt a fő komponens. Az azonosított deka-2-én dikarbonsav nagy szerkezeti hasonlóságot mutat a méhpempóból korábban izolált ösztrogénhatású zsírsavakkal (9). Habár a deka-2-én dikarbonsavat korábban már izolálták a dolgozó törpe méhek (*Apis florea*) garatmirigy váladékának fő komponenseként (14) és ezen zsírsavak, valamint egyéb garatmirigy feromonok bioszintézise ismert (15), mégis elsőként sikerült kimutatnunk a heretej ösztrogénszerű hatását, mely feltételezéseink szerint összefügg deka-2-én dikarbonsav tartalmával. A heretej igazolt ösztrogén hatása alátámasztja népgyógyászati alkalmazását és új lehetőséget nyújthat ösztrogén-hiányos állapotok kezelésében.

---

## VI. Irodalomjegyzék

---

1. Zhao E, Mu Q: Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci Pharm* 2011;79:1-20
2. Barnes S: The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphat Res Biol*. 2010; 8:89-98
3. Aso T: Equol improves menopausal symptoms in Japanese women. *J Nutr* 2010;140:1386S-1389S.
4. Blake C, Fabick KM, Setchell KD, Lund TD, Lephart ED: Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. *BMC Neurosci* 2011;12:28.
5. de Lima Toccafondo Vieira M, Duarte RF, Campos LM, Nunan Ede A: Comparison of the estrogenic potencies of standardized soy extracts by immature rat uterotrophic bioassay. *Phytomedicine* 2008;15:31-37.
6. Yamazaki Y, Kiuchi M, Takeuchi H, Kubo T: Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochem Mol Biol* 2011;41:283-293.
7. Hartfelder K, Bitondi MM, Santana WC, Simoes ZL: Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochem Mol Biol* 2002;32:211-216.
8. Dinan L, Lafont R: Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 2006;191:1-8.
9. Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, et al.: Estrogenic activities of Fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008;5:295-302.
10. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, et al.: Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2005;101:215-220.
11. Bogdanov S: The Bee Products: The Wonders of the Bee Hexagon., 2011.
12. Song YS, Jin C, Jung KJ, Park EH: Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J Ethnopharmacol* 2002;82:89-95.
13. Diel P, Schulz T, Smolnikar K, et al.: Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;73:1-10.
14. Keeling CI SK, Koeniger N, Koeniger G, Punchihewa RWK: Quantitative analysis of the mandibular gland components of the dwarf honey bee (*Apis florea* Fabricus). *Apidologie* 2000;31:293-299.
15. Plettner E, Slessor KN., Winston ML.: Biosynthesis of mandibular acids in honey bees (*Apis mellifera*): de novo synthesis, route of fatty acids hydroxylation and caste selective beta-oxidation. *Insect Biochem* 1998;28:31-42.

## ABSTRACT

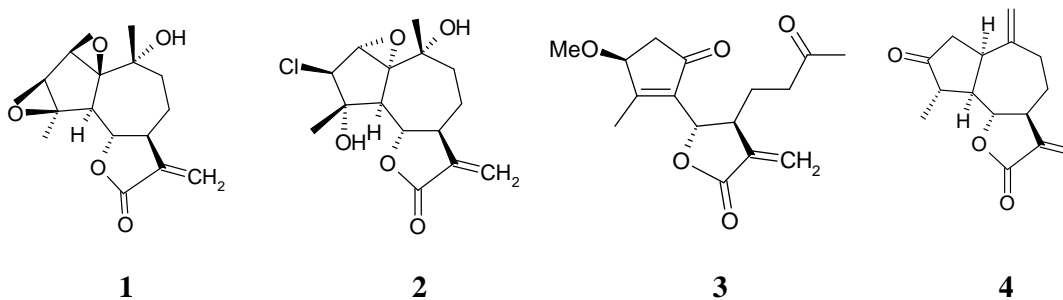
Plants and plant extracts play a crucial role in the research of novel antineoplastic agents. Four sesquiterpene lactones, artecamin (**1**), 3 $\beta$ -chloro-4 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -dihydroxy-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epoxy-5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ H-guaia-11(13)-en-12,6 $\alpha$ -olide (**2**), 3-O-methyl-iso-seco-tanaparthalide (**3**) and 4 $\beta$ ,15-dihydro-3-dehydrozaluzanin C (**4**) were isolated from two traditionally used Asteraceae species (*Onopordum acanthium* and *Artemisia asiatica*). MTT-assay was used to determine the antiproliferative effect on human adherent cancer cell lines such as gynecological cell lines (HeLa, MCF7) and skin adenocarcinoma cell line (A431). The compounds were additionally tested on HL-60 leukemia cell line by cell counting and reasonable IC<sub>50</sub> values were obtained (3.6 – 13.5  $\mu$ M). Treatment with the tested compounds resulted in disturbance of cell cycle characterized by an increase of hypodiploid population (subG1), decrease of cells in G1 phase and increase of S+G2/M cells. Compound **1** elicited a concentration-dependent chromatin condensation and disruption of membrane integrity as revealed by Hoechst 33258-propidium staining. Treatments with compounds **1** and **2** for 24 h resulted in significant increase of activities of caspases 3 and 9 indicating the tested sesquiterpenes induced the mitochondrial pathway of apoptosis. These experimental results indicate that sesquiterpene lactones be regarded as potential starting structures for development of novel anticancer agents.

## 1. Bevezetés

A rák a vezető halálokok között szerepel a gazdaságilag fejlett országokban, az összmortalitás mintegy harmadáért tehető felelőssé (Jemal *et al.*, 2011). A megelőzés és a diagnosztika mellett a gyógyszeres terápia lehetne a legfontosabb része ezen betegségek kezelésének. A növények ill. a belőlük izolált természetes vegyületek régóta használatosak a malignus betegségek gyógyításában. A növényvilágra, mint kimeríthetetlen forrásra kell gondolnunk új hatóanyagok keresésekor. Napjainkban használt hatóanyagok mintegy kétharmada természetes eredetű: növényből izolált természetes vegyület vagy annak szintetikus analógjai, a tumorelles vegyületek esetében ez az arány még magasabb (Cragg and Newman, 2009). A klinikumban ma használatos természetes eredetű vagy félszintetikus tumorelles szerek között meghatározók a vinka alkaloidok, taxánok és kaptopotecin-analógok. Mindez azt is jelenti, hogy új hatóanyagok keresése során is érdemes a növényvilág felé fordulni, a találati arány növelése érdekében célszerű az etnofarmakológiai (népgyógyászati) adatokat is figyelembe venni.

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetének egyik kutatási területe a természetes eredetű vegyületek és szintetikus analógiák tumorelles hatásának vizsgálata. A természetes eredetű vegyületek izolálása és szerkezetük meghatározása a Gyógyszerésztudományi Kar Farmakognóziail Intézetében történik. Az ázsiai hagyományos gyógyászatban tumor kezelésére is használt *Artemisia asiatica* nevű növényből sikerült farmakológialag kevésbé jellemzett szeszkviterpéneket izolálni. Az irodalomból ismert, hogy a növény levelének és virágzatának kivonata gátolta tumorsejtek osztódását, melyet szakirodalom a növény flavonoid tartalmával magyaráz (Réthy *et al.*, 2007, Csupor-Löffler *et al.*, 2009). Egy rokon Asteraceae-faj, az *Onopordum acanthium* föld feletti részéből további szeszkviterpének izolálása folyamatban van. A szeszkviterpénekek kapcsolatban nincsenek irodalmi adatok, de előzetes vizsgálataink alapján felelősek lehetnek az előbb említett hatásokért. A munkaterv előzményeként meghatároztuk a szeszkviterpének antiproliferatív hatását az

intézetünkben rutinszerűen használt humán adherens sejtvonalakon (HeLa, A431, MCF7) MTT-assay segítségével. A négy leghatásosabb vegyületet [artekanin (**1**), 3 $\beta$ -kloro-4 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -dihidroxi-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ H-gvaja-11(13)-én-12,6 $\alpha$ -olid (**2**), 3-O-metil-iso-szezo-tanapartolid (**3**), 4 $\beta$ ,15-dihidro-3-dehidrozaluzanin C (**4**)] az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány pályázati támogatásával a Bécsi Orvostudományi Egyetemen teszteltük tovább HL-60 leukémia sejtvonalon. Jelen munkánk célja a négy leghatékonyabb szeszkviterpén hatásmechanizmusának feltárása az intézetünkben rendelkezésre álló módszertani háttér segítségével.



1. ábra A vizsgált szeszkviterpének kémiai szerkezete

## 2. Módszerek

### 2.1. Sejtek

Az antiproliferatív hatást három humán adherens és egy szuszpenziós sejtvonalon vizsgáltuk *in vitro* körülmények között: HeLa: cervix adenocarcinoma, A431: bőr adenokarcinóma, MCF7: emlő adenokarcinóma, HL-60 humán promyelotikus leukémia. Az adherens sejteket minimális esszenciális médiumban (MEM) tenyésztjük 10% főtális borjúszerummal, 1-1% nem esszenciális aminosav és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészítve, a leukémia sejtvonalat RPMI médiumban 10% főtális borjúszerummal, 1-1% L-glutamin és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészítve 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében. A használt sejtvonalakat a European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) cégtől szereztük be.

### 2.2. Citotoxicitás meghatározás MTT-assay és sejszámlálás módszerével

A tesztanyagok sejtekre kifejtett antiproliferatív hatását 96-os mikrotitráló lemezen határoztuk meg kolorimetriásan MTT-assay segítségével az adherens sejtek esetében. A mérés elve azon alapszik, hogy az élő sejtek képesek a sárga színű tetrazólium sötét kék színű, rosszul oldódó formazánná konvertálni mitokondriális dehidrogenáz enzimük segítségével. A folyamat során keletkezett kristályok kék színének intenzitása arányos az élő sejtek számával. A sejteket 96-os lemezre telepítettük ki 5000 sejt/üreg denzitással. Huszonnégy órás inkubációt követően, melynek során a sejtek kitapadnak a lemez aljára, a médiumot eltávolítottuk és a sejtekre felvittük a tesztanyagokat megfelelő koncentrációban tartalmazó médiumot és további 72 h át inkubáltuk 37 °C-on. A kontroll sejteket továbbra is csak médiumban inkubáltuk. A tesztanyagok 10 mM-os törzsoldatait dimetil-szulfoxiddal (DMSO) készítettük. A 72 órás inkubáció letelte után 22  $\mu$ l MTT (5 mg/ml, PBS) oldatot adtunk a sejtekhez és folytattuk az inkubációt további 4 órán át 37 °C-on, a kék színű formazán kristályok kialakulásáig. Az inkubációt követően a médiumot óvatosan eltávolítottuk és a kialakult formazán kristályokat 100  $\mu$ l DMSO-ban feloldottuk, az abszorbancia értékeket 545 nm-en határoztuk meg ELISA olvasó segítségével (Mosmann, 1983). Elő kísérleteink szerint a legnagyobb DMSO koncentráció (0,3%) sem fejt ki jelentős hatást a sejtek proliferációjára. A

szeszkviterpének dózis-hatás görbéiből meghatároztuk azok  $IC_{50}$  értékeit. A görbe illesztését GraphPad Prism 4 programmal végeztük.

Az antiproliferatív hatás meghatározásához HL-60 leukémia sejtvonalon a sejtszámlálás módszerét alkalmaztuk. A méréshez a sejteket flaskába telepítettük ki 150.000 sejt/ml sűrűségben, 5 ml RPMI médiumban. A sejteket a tesztanyagok növekvő koncentrációival kezeltük (10, 20, 40  $\mu$ M), a kontroll mintához csak DMSO-t adtunk. A minták sejttartalmát 24, 48 és 72 óra után mértük (Minorics *et al.*, 2011). A szeszkviterpének dózis-hatás görbéiből meghatároztuk azok  $IC_{50}$  értékeit. A görbe illesztését GraphPad Prism 4 programmal végeztük.

### **2.3. Sejtciklus analízis**

---

A sejtek DNS tartalmát a DNS-hez kötődő propídium-jodid (PI) segítségével, áramlási citometriás analízis során vizsgáltuk. A sejteket 6-os üregű lemezre telepítettük a tesztanyagok különböző koncentrációival kezeltük be és inkubáltuk 24 és 48 órán át. A kezelés végén a sejtsuszpenziót lecentrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk. A második centrifugálást követően  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os 70 %-os etanolt adtunk a sejtekhez cseppenként. Ezután a sejteket  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a DNS festés napjáig. A festés előtt a mintákat PBS-sel mostuk és a sejteket PI és ribonukleáz-A-t tartalmazó FBS oldatban inkubáltuk (mindkettő végkoncentrációja – 50  $\mu$ g/ml.). Fénytól védve, szobahőmérsékleten végrehajtott 1 órás inkubációt követően a mintákat FACStar segítségével vizsgáltuk (Vermes *et al.*, 2000). Minden egyes mérésnél 20.000 sejtet vizsgáltunk, a sejtek százalékos megoszlását a sejtciklus különböző fázisaiban Modfit programmal határoztuk meg.

### **2.4. Hoechst 33258/PI kettős festés**

---

Ezzel a módszerrel meghatározhatók az élő, korai apoptotikus, késői apoptotikus és nekrotikus sejtek. Az apoptotikus sejtek könnyen detektálhatók a morfológiai változások révén. A kromatin állomány kondenzálódik és a sejtmag szélére tömörül. Az élő sejtek membránja intakt és azon áthatol a Hoechst 33258 festék és megjelöli a sejtek DNS-ét. A normál sejtekkel ellentétben az apoptotikus sejtek intenzívebb kék festődéssel fluoreszkálnak és a sejtmagjuk fragmentáltabb, mint a nem apoptotikus sejté. Az elpusztult, nekrotikus és késői apoptotikus sejtek a megnövekedett PI felvétel kapcsán detektálhatók. A PI a DNS-hez interkalálódó molekula, mely képes megfesteni a sejtmagot a megnövekedett sejtmembrán permeabilitású sejtek esetében. A sejteket flaskába telepítettük és a tesztanyagok különböző koncentrációival inkubáltuk 24 órán át. A kezelt mintákból 96-os mikrotitráló lemezre 100  $\mu$ l-t mértünk és 10  $\mu$ l festékoldatot adtunk a sejtekhez. A Hoechst 33258 végkoncentrációja 5  $\mu$ g/ml, a propídium jodidé 3  $\mu$ g/ml volt. Egy órás inkubációt követően ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a sejteket megfelelő filterrel ellátott digitális kamera rendszerrel felszerelt Nikon fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Minorics *et al.*, 2011).

### **2.5. Kaszpáz-3-assay**

---

Az apoptózis során megnövekedett kaszpáz-3 aktivitást egy fluorimetriás assay kit segítségével határoztuk meg. A vizsgálat során egy peptid szubsztrátot, Ac-DEVD-AMC-t hasítja a kaszpáz-3 enzim AMC felszabadulást eredményezve, aminek mennyiségét mikrotitráló lemezen határoztunk meg 360 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszak mellett. A kaszpáz-3 aktivitást a kaszpázra szelektív inhibitor jelenlétében határoztuk meg. A sejteket a tesztanyagok különböző koncentrációival kezeltük 24 órán át, a kezeletlen sejtek kontroll sejteknek feleltek meg. A sejteket a sejtszám függvényében meghatározott mennyiségű sejtlízis pufferrel inkubáltuk jégen 15 percen keresztül. A sejtlizátumot 17.000 g-n centrifugáltuk 15 percig. A felülúszót összegyűjtöttük és 96-os lemezen vizsgáltuk mikroplate olvasó segítségével. Az enzim

aktivitásának mértékét a kontrollhoz viszonyítva caspase-3 aktivitás növekedésben adtuk meg.

Az apoptózis intrinsic vagy extrinsic útvonalon való lezajlásának meghatározásához kaszpáz-9 aktivitást mértünk egy kolorimetriás assay kit segítségével, mely a folyamat intrinsic módon való aktivációjára utal az enzim aktivitás fokozódása esetén. A vizsgálat során egy peptid szubsztrátot, LEHD-pNA-t hasítja a kaszpáz-9 enzim pNA felszabadulást eredményezve, aminek mennyiségét 405 nm-en határoztuk meg. Az eredményeket, az enzim aktivitásának mértékét a kontrollhoz viszonyítva szintén kaszpáz-9 aktivitás növekedésben adtuk meg.

### 3. Eredmények

#### 3.1. Antiproliferatív assay

A szeszkviterpének antiproliferatív hatását három humán eredetű adherens és egy szuszpenziós sejtvonalon vizsgáltuk MTT-assay és sejtszámlálás módszerével. Az eredmények az 1. táblázatban vannak feltüntetve a testanyagok sejtvonalakon mért IC<sub>50</sub> értékeivel. A szeszkviterpéneket először HeLa, A431 és MCF7 sejtvonalakon teszteltük. A négy szeszkviterpén az adherens sejtvonalak közül az MCF7 sejtek osztódását gátolta leginkább. A négy leghatásosabbnak bizonyuló testanyagot HL-60 sejtvonalon teszteltük tovább. A két leghatásosabb szeszkviterpén a HL-60 sejteken 4,50 és 3,60 µM-os IC<sub>50</sub>-értékek mellett gátolta a sejtek osztódását.

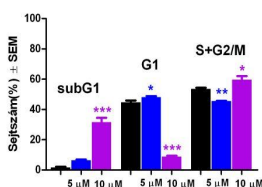
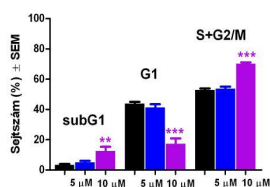
Vegyület	Számított IC <sub>50</sub> értékek (µM)			
	HeLa	A431	MCF7	HL-60
1	22,89	19,85	9,27	<b>12,20</b>
2	12,28	11,82	13,95	<b>13,50</b>
3	11,98	6,51	9,86	<b>4,50</b>
4	<b>12,97</b>	<b>5,87</b>	<b>3,70</b>	<b>3,60</b>

1. táblázat A vizsgált szeszkviterpének antiproliferatív hatása tumoros sejtvonalakon

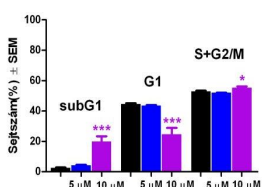
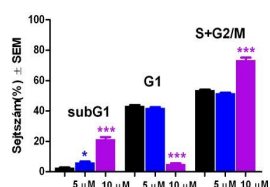
#### 3.2. Sejtciklus analízis

Azért, hogy meghatározzuk a sejteloszlást a testanyagokkal történt kezelést követően, a HL-60 sejteket áramlási citometriás vizsgálatnak vetettük alá. A HL-60 sejteket a négy szeszkviterpén növekvő koncentrációival (5 és 10 µM) kezeltük be 24 és 48 h át. Az expozíciós idő lejárta után a testanyagok hatására változás következett be a sejtciklusban, a kontroll sejtekhez képest csökkent a G1 fázis miközben megnövekedett a subG1 populáció. A sejtciklus analízis során kapott hisztogramok értékelésekor a sejtciklus S és G2/M fázisának elkülönítése nem volt lehetséges, ezért ezt a két fázist összevontuk és S+G2/M fázisként értékeltük, mely az inkubációs idő lejárta után növekedést mutatott a kontroll sejtekhez viszonyítva. Az inkubációs idő növelésével, 48 óra után szintén csökkent a G1 fázis, az S+G2/M fázisban megrekedt sejtek százalékos aránya alig változott, a subG1 populáció viszont tovább növekedett a koncentráció és idő függvényében. (2. ábra)

### 1-es tesztanyag



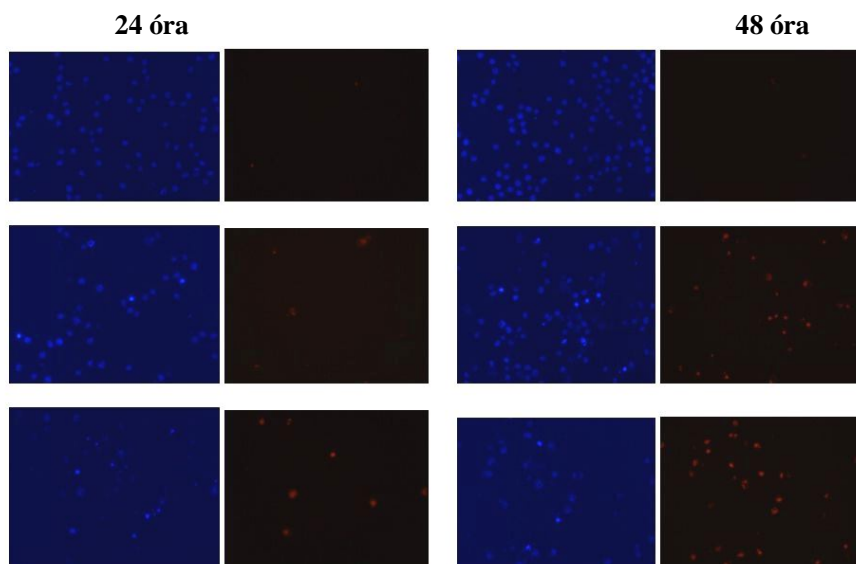
### 2-es tesztanyag



**2. ábra** HL-60 sejteken végrehajtott sejt ciklus analízis az 1-es és 2-es tesztanyaggal 24 (bal oldal) és 48 órás (jobb oldal) kezelést követően (■) kontroll sejtekhez viszonyítva. \*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ . A 3, 4 vegyületek esetében hasonló eredményeket kaptunk.

### 3.3. Morfológiai vizsgálat

A négy szeszkviterpén apoptózist indukáló hatását morfológiailag is jellemezni kívántuk Hoechst 33258-PI kettős festéssel. A HL-60 sejteket 24 és 48 órás 5 és 10  $\mu\text{M}$ -os kezelést követően Hoechst 33258-PI kettős festésnek vetettük alá, hogy megbecsüljük az apoptózist és nekrozist kiváltó hatásukat. Az apoptózisra jellemző morfológiai változások, mint az erősen kondenzálódott kromatin, ami a sejtmag szélén félhold formát vesz föl, a sejtmagban és citoplazmában előforduló kondenzáció, apoptotikus testek megjelenése volt detektálható a kezelést követően. A koncentráció és inkubációs idő növekedésének függvényében fokozódott a Hoechst-festéssel kimutatható apoptotikus sejtek és a megnövekedett sejtmembrán permeabilitású nekrotikus, késői apoptotikus sejtek száma, amik könnyen detektálhatók a megnövekedett PI felvétel kapcsán. (3.ábra)

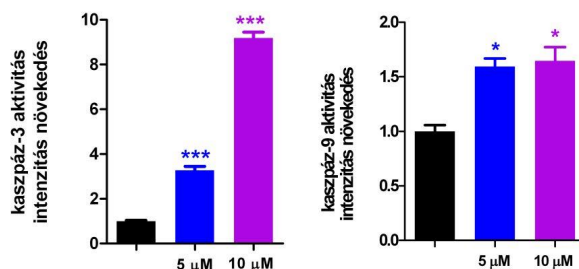


**3. ábra** Fluoreszcens mikroszkóppal készített fotók Hoechst 33258 – propídium jodid kettős festést követően. Ugyanarról a látótérről két fotó készült a két markert külön szemléltetve (bal: Hoechst 33258, jobb: PI).Első sor: kontroll, második sor: 1-es tesztanyag 5  $\mu\text{M}$ , harmadik sor: 1-es tesztanyag 10  $\mu\text{M}$ .

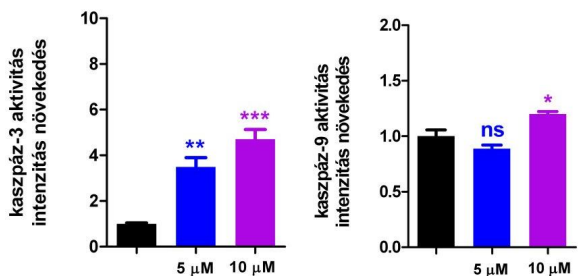
### 3.4. Kaszpáz-3 és kaszpáz-9 enzim aktivitás mérés

Az apoptózis elindításának kulcs enzime az effektor kaszpázok csoportjába tartozó kaszpáz-3 enzim, aminek apoptózist indukáló hatását sikerült bizonyítani egy szintetikus tetrapeptid (ac-DEVD-AMC) szubsztrát hasításának a kiváltásával és ezáltal proteáz aktivitásának kimutatásával. Az *in vitro* elvégzett fluorimetriás assay során a peptid szubsztrátból felszabaduló AMC lehetővé teszi a teljes DEVD-specifikus proteáz aktivitás kimutatását. A peptid hasító hatást HL-60 sejtekből preparált mintákból határoztuk meg 5 és 10  $\mu\text{M}$ -os kezelést követően 24 h-ás inkubáció után. Szerény DEVD hasító hatás volt detektálható a kontroll sejtek esetében, de a kaszpáz-3 aktivitás szignifikáns módon növekedett a kezeletlen sejtekhez képest, az 1-es vegyület esetében 3.27-szeres és 9.19-szeres, a 2-es vegyülettel való kezelést követően, pedig 3.48-szoros és 4.71-szeres aktivitás növekedés volt mérhető a koncentráció függvényében (5 és 10  $\mu\text{M}$ ). A 3-as és 4-es tesztanyag esetében gyengébb hatás volt észlelhető, a kontrollhoz képest az előbbi tesztanyag esetében 3.88-szoros és 3.32-szeres, az utóbbi vegyület esetén pedig 2.64-szeres és 1.81-szeres enzimaktivitás növekedés volt mérhető. Nagyobb koncentrációban az enzim aktivitás csökkent, ami arra utalhat, hogy ilyen körülmények között az apoptózis háttérbe szorul, a nekrozis határozza meg a sejthalál lefolyását. E két vegyület esetében 5  $\mu\text{M}$  alatti  $\text{IC}_{50}$  értékeket mértünk, de a kaszpáz enzim vizsgálat rámutatott arra, hogy a vegyület hatásosságát nem az apoptózis, hanem a nekrozis válthatja ki. A kaszpáz-9 enzim vizsgálatával igazoltuk az apoptózis intrinszik útvonalon történő lezajlását. Az 1-es és 2-es tesztanyag esetében a kaszpáz-9 enzim aktivitás szignifikáns módon növekedett, előbbi esetén 1.59-szeres és 1.65-szörös, az utóbbi esetében 0.89-szeres és 1.2-szeres enzimaktivitás növekedés volt tapasztalható, a 3-as vegyület esetében 1.61-szeres és 2.41-szeres, a 4-es vegyület esetében pedig 1.71-szeres és 3.17-szeres enzimaktivitás növekedést lehetett mérni. (4. ábra)

#### 1-es tesztanyag



#### 2-es tesztanyag



4. ábra Kaszpáz-3 aktivitás és kaszpáz-9 aktivitás mérés az 1-es és 2-es tesztanyaggal történt 24 órás kezelést követően kontroll sejtekhez (■) viszonyítva. \*, \*\*\*:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ .



---

## Összefoglalás

---

A klinikumban napjainkban használt tumorelles szerek meghatározó része növényi eredetű, melyeket nagy etnofarmakológiai (népgyógyászati) adatokkal erősített szűrővizsgálatok során fedeztek fel. A rendelkezésünkre álló gyógyszerek döntő része természetes eredetű, mely vegyületeket kémiai úton módosítva, azok megtartották eredeti farmakológiai tulajdonságukat, a származékok legtöbbször farmakokinetikai paramétereikben múlják felül a természetes vegyületet. Széles körben elvégzett analízis szerint az általunk használt hatóanyagok csupán 6 %-a módosítatlan természetes vegyület, 27 % félszintetikus és 30 % szintetikus származék, mely valamilyen természetes farmakofor csoportot tartalmaz a molekula magjaként. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a jelenleg használt gyógyszerek kétharmada természetes eredetű. Jelen kísérletsorozatban a négy szeszkviterpének HL-60 eredetű tumoros sejtvonalakon vizsgáltuk antiproliferatív és apoptózist indukáló hatásukat.

Két szeszkviterpén, a 3-as és a 4-es jelentős mértékben gátolta a HL-60-as sejtek proliferációját, viszont a kaszpáz enzim aktivitás mérések arra világítottak rá, hogy az apoptózis mellett a nekrozis nagyobb szerepet játszik a két vegyület antiproliferatív hatásában. Ezzel ellentétben - valamivel csekélyebb IC<sub>50</sub> értékek mellett - az 1-es és 2-es tesztanyagok jelentős kaszpáz-3 aktivitással rendelkeznek, ami arra enged következtetni, hogy ezek a vegyületek apoptózis indukció útján károsítják ezeket a sejteket. Kaszpáz-9 enzim aktivitás méréssel igazoltuk, hogy az apoptózis intrinszik úton következik be. A sejtciklus analízis során megnövekedett subG1 sejtpopuláció volt detektálható 24 és 48 h inkubációs idő után. A szeszkviterpének apoptózist indukáló hatását bizonyítja még a továbbiakban a Hoechst 33258-PI kettős festés. Az intenzív kromatin kondenzáció, apoptotikus testek megjelenése, a membrán lézió valamint a membrán integritásának nekrotikus károsodása a Hoechst és PI festékekkel dózis-dependens módon detektálható volt.

Összességében elmondható, hogy a négy szeszkviterpén gátolta a HL-60 sejtek osztódását apoptózis indukció révén. Az apoptózis mellett két tesztanyag esetében a nekrozis vált dominánssá. Eredményeink jelentőségét alátámasztja, hogy az FDA 2012-ben törzskönyvezte az ingenol-mebutátot, egy természetes eredetű terpenoidot aktinikus keratózis kezelésére (Berman, 2012). Az indikációt képező kórkép a bőr premalignus elváltozása, a kezelés célja a daganatos elváltozás kialakulásának megelőzése. A négy szeszkviterpén in vitro körülmények között meghatározott eredményeiből kiindulva, szerkezetüket felhasználva, olyan vegyületek célzott szintézise valósulhat meg, melyek optimális esetben vezérmolekulaként is alkalmasak további fejlesztésre.

**A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.**

---

## Irodalomjegyzék

---

- Berman B: New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenol mebutate gel. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **5**: 111-22 (2012)
- Cragg G, Newman D: Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev* **8**: 313-31 (2009)

- Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann J: Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytother Res* **23**: 1109-15 (2009)
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69-90 (2011)
- Minorics R, Szekeres T, Krupitza G, Saiko P, Giessrigl B, Wölfling J, Frank É, Zupkó I: Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro. *Steroids* **76**: 156-62 (2011)
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63 (1983)
- Réthy B, Csupor-Löffler B, Zupkó I, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, Rédei T, Falkay G: Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytother Res* **21**: 1200-8 (2007)
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**: 167-90 (2000)

Szénási Tibor<sup>1,2</sup>, Zvara Ágnes<sup>1</sup>, Deák Ferenc<sup>2</sup>, Puskás László<sup>1</sup>, Kiss Ibolya<sup>2</sup>  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai<sup>1</sup> és Biokémiai Intézet<sup>2</sup>

## **1- Bevezetés**

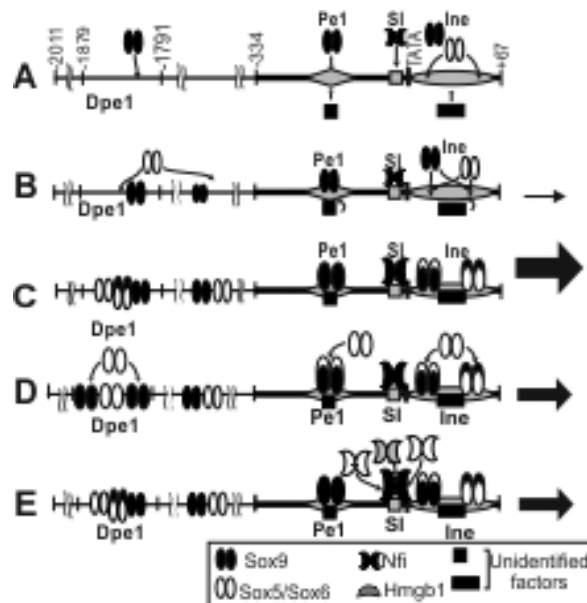
Matrilin-1 (Matn1) extracelluláris fonalas hálózatot képezve a porc szövet sejtközötti állományának szerveződésében vesz részt. A matrilin-1 gén (*Matn1*) sajátossága, hogy a chondrogen csontosodás során a többi porcfehérje génnél később kapcsol be és kifejeződése a növekedési korongban csak az oszlopos proliferatív és prehipertróf zónákra korlátozódik. A gén transzkripció szabályozásában amniotákban konzervált disztális (Dpe1 és Dpe2) és proximális DNS-elemek (Pe1) és az iniciátor elem (Ine) vesznek részt [13], melyek porc-specifikus Sox faktorokat kötnek *in vitro* [12, 13]. Így Sox9-et, a chondrogén differenciálódás fő transzkripció faktorát, valamint L-Sox5 és Sox6 faktorokat, melyek szintén nélkülözhetetlenek a gén bekapcsolásához. A rövid promóteren található SI és SII silencer elemek Nfi fehérjékkel hatnak kölcsön [14], de megtalálhatók más általános faktorok kötőhelyei is. A Sox fehérjék HMG box doménjük révén specifikus szekvenciát ismernek fel a DNS kis árkában, ellentétben a DNS nagy árkában szekvencia-specifikusan kötődő klasszikus transzkripció faktorokkal (pl. Nfi).

Hmgb1, a kromatin abundáns fehérjeje, szintén HMG box doménje révén, de nem szekvencia-specifikusan kötődik a DNS-hez és ez által fellazítja a kromatin szerkezetet [2]. Bár Hmgb1 sokoldalúan befolyásolja a sejtek működését szerepét a porcdifferenciálódásban nem vizsgálták. Funkcióját a vázrendszer fejlődésében az endochondralis csontosodás késői szakaszában írták le, a hipertróf porcsejtek, mint kemoatraktáns termelik, ami elindítja az osteoclast és osteoblast sejtek invázióját [16].

A tanulmány szorosan kapcsolódik azokhoz az előzetes eredményekhez, melyek a gén egyedi transzkripció szabályozásának vizsgálata során az utóbbi években születtek a csoportban. Az irányító DNS-elemek és transzkripció faktorok azonosítása alapján egy hipotézist állítottunk fel a gén szűkített, porcfejlődési stádiumtól függő kifejeződésének magyarázatára [12].

A térben és időben szűkített porcspecifikus kifejeződés szabályozásában domináns szerepe van a rövid promóternek és a konzervált DNS-elemek különleges elrendeződésének a TATA motívum körül [12]. A rövid promóter önmagában alacsony aktivitású mind transzgenikus egerekben, mind pedig tranziens expressziós kísérletekben. Magas aktivitásához szükség van távoli DNS-elemekre. A rövid promóter, együttműködve akár a homológ távoli DNS-elemekkel vagy a minden porcsejtben aktív heterológ *Col2a1* enhanszer elemekkel a génextpressziót egyaránt disztális vázelemekbe és a növekedési korong meghatározott zónáiba irányítja [9,12]. Más porcfehérje génekhez hasonlóan, a Sox faktorok szinergista kölcsönhatása fontos szerepet játszik a *Matn1* génkifejeződés regulációjában. Azonban a kulcsfontosságú Pe1 elemhez kötődő Sox9 transzaktíváló hatását az Ine elemhez kötődő L-Sox5/Sox6, más porcfehérje génektől eltérően, dóziszfüggő módon befolyásolja. Alacsony dózisznál (korai fejlődési stádiumban) növeli, míg magas dózisznál (késői fejlődési stádiumban) csökkenti azt [11]. Ezenkívül Nfi faktorok is dóziszfüggő módon befolyásolják a SOX9 transzaktíváló hatását. Így L-Sox5/Sox6 mellett az Nfi faktorok is fontos szerepet játszanak a *Matn1* a porcfejlődési stádium-függő kifejeződésének szabályozásában [11].

A csoport előzetes eredményei alapján egy modellt állítottunk fel a *Matn1* zónális kifejeződését irányító különleges transzkripció szabályozási mechanizmusára (1. ábra).



**1. ábra: Modell a promóter aktivitás Sox trió és Nfi faktorok általi finom hangolására.** Ábrázoltuk faktorkrok DNS-elemekhez kötődését a *Matn1* aktivációt a porcfejlődés kezdetén (A), a korai szakaszában (B), késői proliferatív porcsejtekben optimális arányok esetén (C), Sox5/Sox6 felhalmozódása esetén (D) és Nfi faktorok felhalmozódása esetén (E).

Hipotézisünk szerint a Sox és Nfi fehérjék kötődése elősegíti a gén bekapcsolását. Mivel az Nfi fehérjék képesek a hisztonokhoz kapcsolódni [1,7], valószínű, hogy a nukleoszóma struktúra fellazításában is szerepet játszanak (1.A. ábra). A porcfejlődés kezdeti szakaszában még a kötőhelyek lefedettsége alacsony és Sox9 viszonylag nagy moláris feleslegben van L-Sox5/Sox6-hoz képest. L-Sox5/Sox6 kötődése az Ine elemhez elősegíti Sox9 kötődését a kulcsfontosságú Pe1 elemhez (1.B. ábra). Sox faktorok kötődése a TATA környékére meghajlítja a DNS-t, elősegítheti TBP és RNS-polimeráz II kötődését. A DNS meghajlítása elősegítheti más, nem azonosított faktorok kötődését Pe1-hez és Ine-hez. Az SI elemhez kötő Nfi fehérjék szintén modulálják a Sox9 aktiváló hatását és hozzájárulnak a promóter aktiválásához azáltal, hogy közvetlen kölcsönhatásba lépnek általános transzkripciós faktorokkal, különböző koaktivátorokkal és represzorokkal. Az Nfi jelenléte elősegítheti a transzkripciós preiniciációs komplex és az enhanszoszóma képződését. A promóter aktivitása a késői proliferatív stádiumú chondroblastokban a legmagasabb, amikor a Sox9 és más faktorok kötődése optimális a Pe1 és a Dpe1 elemen (1.C. ábra). Későbbi stádiumokban (pl. hipertróf porcsejtekben) vagy amikor Sox trió szintje magas, L-Sox5/Sox6 vetélkedik a Sox9-cel a Pe1 Sox kötőhelyéért, ezáltal gátolhatja a Sox9 kötődését (1.D. ábra), így csökken a Sox9 transzaktiváló hatása. A Sox helyek nagy telítettsége az Ine elemen interferálhat a preiniciációs komplex képződésével a TATA motívumon. Az Nfi felhalmozódása szintén csökkentheti a promóter aktivitását, kompetíció léphet fel különböző aktivátor és represzor Nfi izoformák között és ez blokkolhatja TBP kötődését a TATA-hoz (1.E. ábra).

## 2- Célkitűzés

A *Matn1* kifejeződése és *Matn1* promóter működése transzgénikus egerekben eltér más porcfehérje génekétől, jellegzetes zónális mintázatot mutat a növekedési korongban. Csoportunk célja, hogy megismerjük a gén sajátos transzkripciós szabályozási folyamatait, és más porcfehérje génekkel azonos és azoktól eltérő regulációs lépéseit. A csoport korábbi eredményei kromatin szintű szabályozásra is

utaltak, ezért e tanulmány célja a Sox-faktorokkal rokon Hmgb1 hatásának és szerepének tisztázása a *Matn1* génextpresszió transzkripció szabályozásában.

Ebből a célból a jelen tanulmány keretében **vizsgálni kívánjuk:**

1. a porcdifferenciációban szerepet játszó marker gének expresszióját QRT-PCR analízissel;
2. a *Matn1* regulációjában fontos konzervált DNS-elemek Sox és Hmgb1 faktorkötő-képességét tisztított GST-fúziós fehérjékkel EMSA kísérletekben;
3. a Hmgb1 hatását kotranszfekciós kísérletekben a *Matn1* hosszú promóterére és Sox fehérjék szinergista kölcsönhatására;
4. a Hmgb1 csendesítés hatását állandósult chondrogen kultúrákban a porcspecifikus génextpresszióra.

---

### 3- Anyagok és módszerek

---

#### 3.1 Sejtkultúrák

---

Csirke embrió fibroblaszt (CEF), csirke embrió porcsejt (CEC) és mesenchyma kultúrák készítését előzőleg leírtuk [12]. A kis sejtsűrűségű (LDM) és nagy sejtsűrűségű mesenchyma kultúrákból (HDM)  $1 \times 10^6$  sejtet és  $5 \times 10^6$  sejtet lemezelünk 35 mm átmérőjű Petri csészére 10% fetal borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékban [12]. COS-7 sejt vonalat standard körülmények között tartottuk,  $5 \times 10^5$  sejtet lemezelünk 35 mm átmérőjű Petri csészére. A HDM sejtkultúra korai proliferatív (Ia stádiumú) porcjektből áll, míg a CEC kultúrát késői proliferatív (Ib stádiumú) porcsejtek alkotják. Előbbire alacsony, utóbbira magas *Matn1* expresszió jellemző. Az LDM, CEF és COS-7 sejteket *Matn1*-et nem expresszáló kontrollként használtuk.

#### 3.2 Kvantitatív reverz transzkripció-PCR (QRT-PCR)

---

Totál RNS-t preparáltunk CEC, CEF és differenciálódó HDM kultúrából RNS izoláló kit (Macherey-Nagel) segítségével. QRT-PCR-t génspecifikus primerekkel RotorGene 3000 készüléken a SyberGreen protokoll szerint végeztük: 15 perc  $95^\circ\text{C}$ , 45 ciklus  $95^\circ\text{C}$  15 másodperc,  $60^\circ\text{C}$  25 másodperc és  $72^\circ\text{C}$  25 másodperc [12,15]. Az egyedi  $C_T$  értékeket normalizáltuk három belső kontrol gén (*Gapdh*, 18S rRNS, és 28S rRNS).  $C_T$  értékének átlagára

#### 3.3 In vitro DNS-fehérje kölcsönhatási kísérletek (EMSA)

---

A két-szálú oligonukleotidokkal a -1879/-1791 pozíciók közötti Dpe1 elemet, három próbára tagoltuk: 5'-GAG TCC AGT GTT TTC GTT TTT GGA GGC CCG GGG AA-3' (Dpe1A), 5'-GGA AAA ATT ATG TTT CAT ATA TTA AAA ATA AAC A-3' (Dpe1B), 5'-AAA TAA ACA CTA CTT TTA CAG AGG TAT AAA TGC-3' (Dpe1C). A Pe1 és Ine elem szekvenciáját a 3.A. ábra mutatja [12, 13]. A Hmgb1 teljes kódoló régióját [3] pGEX expressziós vektorba klónoztuk. A GST-fúziós L-Sox5, SOX9 és Hmgb1 fehérjéket BL21 codon+RIL sejtekben termeltettük, majd glutation-szefaróz oszlopon tisztítottuk [12, 15]. A kötési kísérletek során 30 fmol jelölt DNS próbát inkubáltunk 0,6-3,2  $\mu\text{g}$  tisztított fehérjével 500 ng nem specifikus poli-(dGdC) kompetitor jelenlétében Sox-specifikus pufferben (100mM TrisHCl pH7,9, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 05 mM EDTA, 11 mM DTT, 0,25% Igepal, 8% ficoll, 250 mg/ml BSA) inkubáltuk [12, 15].

#### 3.4 Kotranszfekciós kísérletek

---

A HDM kultúrát  $5 \times 10^6$  sejtszámnál, míg a LDM kultúrát  $1 \times 10^6$  sejtszámnál transzfektáltuk a Ca-foszfát precipitációs módszerrel [12, 15]. CEF és CEC kultúra esetén ez a sejtszám  $7 \times 10^5$  volt. Az AC8Luc riportter plazmidból, illetve annak mutánsváltozataiból LDM, HDM és COS-7 sejtek esetén 5  $\mu\text{g}$ -t használtunk, míg CEF és

CEC kultúráknál a riporter plazmidok mennyisége 2 µg volt. A kotranszfekció kísérleteinkben a következő expressziós plazmidokat használtuk: pcDNA5'UT-FLAG-L-Sox5 (pFSox5), pcDNA5'UT-FLAG-Sox6 (pFSox6) és pCDNA-SOX9 (pSOX9) vagy pcDNA5'UT-FLAG-SOX9 (pFSOX9) [10] és pHmgb1, [3]. A legtöbb kísérlethez, 125 ng pFSox5, 125 ng pFSox6 és 250 ng pSOX9 vagy 250 ng pFSOX9 plazmidot használtunk 100 ng pHmgb1 jelenlétében, illetve a nélkül. Bizonyos esetekben emelkedő mennyiségű pHmgb1 (0-500 ng) vagy pFSox5 és pFSox6 (0-250 ng) plazmidokat használtunk. Minden mérést 3-10 alkalommal, hármával végeztünk. Az eredmények statisztikai kiértékelése KyPlot version 2.0 beta 15. programmal egy utas variancia analízissel (ANOVA) és Dunnett féle teszttel történt. A szignifikancia mértékét (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) az üres vektorral transzfektált riporterekre vonatkoztatva vagy (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001) a jelölt módon számoltuk.

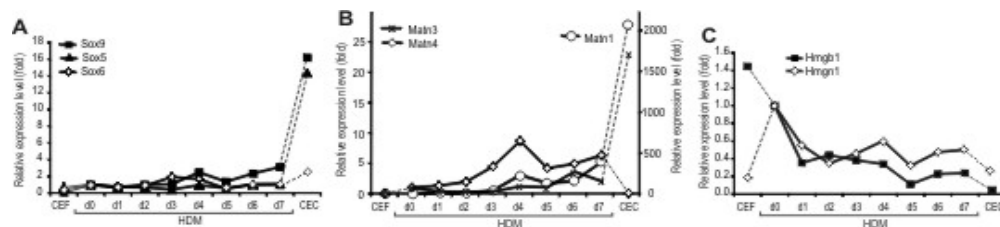
### 3.5. Western analízissel és QRT-PCR-rel kombinált kotranszfekció

A Hmgb1 és Sox fehérjék egyidejű kimutatására előállítottuk a pHmgb1 expressziós plazmidot, a Hmgb1 kódoló régióját beépítve a pcDNA5'-UT-2FLAG vektorba [15]. COS-7 sejteket kotranszfektáltuk 10 µg AC8Luc riporterrel, állandó mennyiségű (1 µg) pFSOX9, pFSox6, pFSox5 és emelkedő mennyiségű pHmgb1 effektor plazmidokkal. A transzfektált sejteket lízáltuk, a felülúszóból a luciferáz mérés után Western analízist végeztünk polikonális nyúl anti-FLAG (Sigma) ellenanyagot az előzőleg leírt módon [12, 15].

Az endogén *Matn1* indukálhatóságának tesztelésére COS-7 sejteket kotranszfektáltunk 2 µl TurboFect (ThermoScientific, R0531) reagens felhasználásával a következő plazmid mennyiségekkel 50 ng pFSOX9, 75 ng pFSox5 és 75 ng pFSox6 800 ng pHmgb1 jelenlétében, illetve a nélkül. A transzfekciót duplikátumban végeztük három alkalommal. A mintákból RNS izoláltunk, majd cDNS-é irtuk át és *Matn1* mRNS szintet QRT-PCR határoztuk meg. A  $C_t$  értékeket Gapdh mRNS szintre normalizáltuk.

### 3.6. Hmgb1 csendesítés

A csendesítési kísérletet két human (C-28/12, SW1353) és egy patkány(RCS) állandósult chondrogen sejtvonalon végeztük, az alábbi siRNS-ek (Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) felhasználásával: human *HMGB1* 5'-caggaggaaucugaacau-3'; patkány *Hmgb1* 5'-cugucaacuucagaguu-3'; human *GAPDH* 5'-gugugaaccaugagaagua-3' és negatív kontroll siRNS 5'-ccuacgccaccauuucgu-3'. 1,2-2,0 x 10<sup>5</sup> sejtet lemezelünk ki 6-lyukú lemezekre, majd 24 órával a kilemezelés után transzfektáltuk 100-400 pmoles siRNS duplexszel X-tremeGENE siRNS transzfekciós reagens (Roche Applied Science) felhasználásával. Az RCS sejteket 30 órával, a C-28/12 és SW1353 42 órával a transzfekció után gyűjtöttük be. RNS tisztítottunk és QRT-PCR analízissel követtük a marker génextpressziót, amit az Rps18 mRNS szintjéhez viszonyítva ábrázoltunk.



2. ábra: A marker génextpresszió összehasonlítása az *in vitro* porcdifferenciálódás során. A markerek mRNS szintjét QRT-PCR-rel követtük HDM kultúrában az *in vitro* chondrogenesis során, a relatív expressziós értékeket HDM 0 napos értékre három belső kontrolra vonatkoztatva adtuk meg. Az értékeket összehasonlítottuk a nem expresszáló CEF és a *Matn1*-t magasan expresszáló kultúrák mRNS szintjeivel.

---

## 4- Eredmények

---

### 4.1. A marker génexpresszió változása *in vitro* differenciálódó porckultúrákban

---

A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Ebből a célból porccá differenciáltattunk nagy sűrűségű mesenchyma (HDM) kultúrát. Pozitív kontrolként a magas *Matn1* expressziójú CEC kultúrát, míg negatív kontrolként a gént nem expresszáló CEF kultúrát használtuk. Minden értéket a HDM 0. napos értékhez viszonyítva adtuk meg.

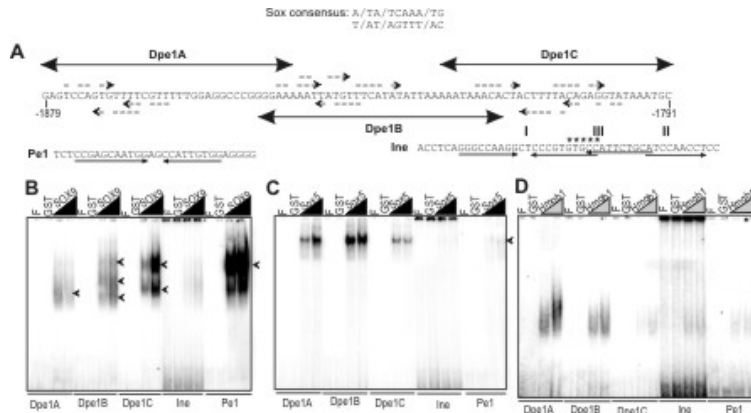
A porcdifferenciálódás korai stádiumát képviselő HDM kultúrában az L-Sox5 mRNS alacsony szintjével szemben a *Sox9* mRNS szintje fokozatosan emelkedett, a 4. napon kisebb csúccsal (2.A. ábra). Legmagasabb értéket azonban mindkét mRNS expressziója a főként késői poliferatív porcsejtekből álló CEC kultúrában ért el. A *Sox6* két csúcst adott, az elsőt a HDM kultúrában 3-4. napon, a másodikat CEC kultúrában. A *Matn1* aktivációját a 4. naptól detektáltuk, párhuzamosan a *Sox9* és a *Sox6* első csúcsával, majd szintje CEC kultúrában 2057-szeresére emelkedett (2.B. ábra). Ez a legmeredekebb mRNS akkumuláció az ECM gének között, szemben a *Col2a1* mRNS 181-szeres relatív emelkedésével. Szemben a *Matn1* és *Matn3* expresszióval, a *Matn4* mRNS szint a csúcst HDM kultúrában éri el, ami jelzi lehetséges szerepét a porcfejlődés korai szakaszában. A *Hmgn1* mRNS expressziója HDM 0. napos kultúrában érte el a maximumát, majd fokozatosan csökkent, alátámasztva a chondrogenesis korai szakaszában betöltött szerepét [4]. A Sox faktorokkal rokon HMGB domént tartalmazó *Hmgb1* mRNS szintje a nem expresszáló CEF-ben volt legmagasabb, majd meredeken és folyamatosan csökkent a porcdifferenciácó előrehaladtával (2C. ábra). A *Hmgb1* expressziós mintázatázata inverz korrelációt mutatott a *Sox9*, *Sox5* és ECM fehérje (*Matn1* és *Matn3*) génekével.

Tehát kimutattuk, hogy míg a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, addig a *Hmgb1*-é csökken, hasonlóan a chondrogenesis kezdeti szakaszában szerepet játszó *Hmgn1* génhez.

### 4.2. *Hmgb1* kötődik a *Matn1* konzervált DNS elemeihez

---

A következő kísérletsorozatban tisztított Sox és *Hmgb1* fehérjék *in vitro* kötődését vizsgáltuk a *Matn1* konzervált DNS elemeihez (3. ábra). SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg a *Sox5* leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel (3.B. ábra). Érdekeség, hogy az *Ine*, amit leginkább a *Sox5* és *Sox6* ismer fel [11], a többi elemhez képest gyenge kötőképességet mutat. Ezek után kíváncsiak voltunk, vajon *Hmgb1* tud-e kötődni a DNS-elemekhez. Az EMSA kísérleteinkből kiderült, hogy a *Hmgb1* a *Sox9*-cel ellentétben a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel leghatékonyabban (3.D. ábra). Azon túl mindhárom fehérjével végzett kötési kísérleteink alapján a *Hmgb1* jelenléte minden elemen befolyásolja a Sox faktorok kötődését [15].



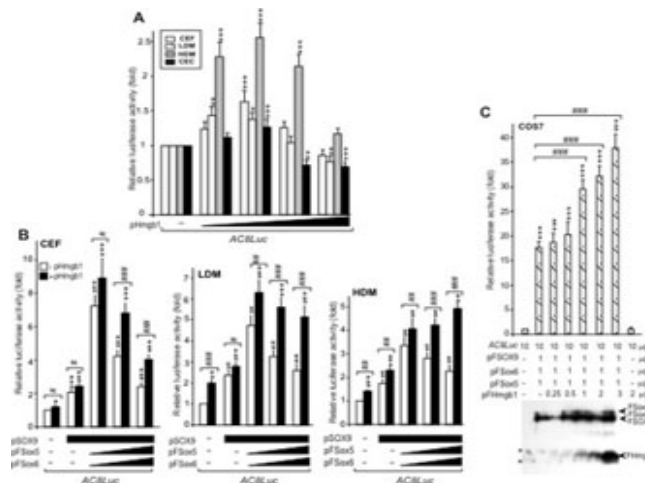
**3. ábra: GST-fúziós Sox és Hmgb1 fehérjék in vitro kötődésének összehasonlítása a *Matn1* konzervált DNS-elemeihez.** A használt oligók szekvenciái és a Sox kötőhelyek (A) GST-fúziós SOX9 (B), L-Sox5 (C) és Hmgb1 (D) in vitro kötődési vizsgálata.

Tehát a Hmgb1 a Sox9-cel ellentétes affinitással kötődik a *Matn1* konzervált DNS elemeihez, ami sugallja a gén szabályozásában betöltött szerepét.

### 4.3. Hmgb1 hatása a *Matn1* hosszú promóterének aktivitására

A következő kísérletsorozatban Hmgb1 hatását vizsgáltuk a *Matn1* promóter aktivitására. Ebből a célból a gén hosszú promóterét tartalmazó, AC8Luc konstrukciót növekvő mennyiségű (50-500 ng) mennyiségű Hmgb1 fehérjét expresszáló plazmiddal kotranszfektáltuk az említett négy mesenchymális sejt kultúrában (4.A. ábra). Az eredmények minden esetben átmeneti emelkedést mutattak 100 ng pHmgb1-nél megfigyelt csúccsal. A Hmgb1 hatása HDM sejt kultúrában volt a legnagyobb (2,57-szeres), míg a többi kultúrában csak 1,3-1,6-szoros aktiválást észleltünk. Ugyanakkor CEC kultúrában a magas Hmgb1 értékek gátló hatásúak voltak.

A Hmgb1 hatása a korai fejlődési stádiumot képviselő HDM kultúrában volt a legnagyobb, míg a késői fejlődési stádiumot képviselő CEC kultúrában jelenléte gátol. Tehát a Hmgb1 koncentrációtól függően aktivál vagy gátol. Mivel a maximális aktiváló hatást 100 ng mennyiségű pHmgb1 esetén lehetett elérni, további kotranszfekciós kísérleteinkben is ezzel a mennyiséggel dolgoztunk.



**4. ábra: A Hmgb1 hatása *Matn1* hosszú promóterére és Sox trió szinergista kölcsönhatására.** A hosszú promóter dózis-függő aktivációja a Hmgb1 hatására (A). Hmgb1 és Sox trió együttes hatása a hosszú promóter aktivitására mesenchyma kultúrákban (B). Növekvő



mennyiségű FLAG-jelölt Hmgb1 és állandó mennyiségű Sox trió kotranszfekciójának hatása kombinált Western analízissel követve (C). A szignifikancia értékeket (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) az üres vektorral transzfektált mintákra vonatkoztatva és (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ) a jelölt módon adtuk meg.

#### ***4.4. A Hmgb1 elősegíti a Sox fehérjék szinergista kölcsönhatását a porcfejlődés korai szakaszában***

Ezek után kíváncsiak voltunk, hogy a Hmgb1 jelenléte hogyan befolyásolja a Sox-trió szinergista kölcsönhatását a chondrogenesis korai stádiumát képviselő kultúrákban. Ebből a célból állandó mennyiségű (250ng pSOX9) és növekvő mennyiségű (50ng, 125ng és 250ng) pL-Sox5 és pSox6 plazmidokat transzfektáltunk Hmgb1 nélkül és Hmgb1 jelenlétében CEF, LDM és HDM sejtekbe (4.B. ábra). A Sox trió dóziszfüggő szinergista aktiváló hatását a Hmgb1 CEF kultúrában másfélszeresére, míg LDM és HDM kultúrában több mint kétszeresére növelte. Sőt HDM kultúrában a Hmgb1 ellensúlyozta a nagy dózisú L-Sox5/Sox6 gátló hatását a SOX9-mediálta promóter aktiválásra.

Tehát a Sox trió a koncentrációfüggő csökkenés HDM kultúrában koncentrációfüggő növekedésbe megy át Hmgb1 jelenlétében. A HDM kultúra a korai poliferatív stádiumot képviseli, ami azt igazolja, hogy a Hmgb1-nek a porcfejlődés korai szakaszában van szerepe, még pedig elősegíti a Sox fehérjék szinergista kölcsönhatását.

Annak megerősítésére, hogy a Hmgb1 elősegíti a Sox trió általi promóter aktivációt, COS-7 sejteket kotranszfektáltunk állandó mennyiségű Sox- és növekvő mennyiségű Hmgb1-expresszálo plazmidokkal és a luciferáz mérést wetern analízissel kombinálva követtük a *Matn1* promóter aktivitást (4.C. ábra).

Míg a Sox trió önmagában 16-szorost a promóter aktiválást mutatott, addig 3:1 Hmgb1:SOX9 moláris aránynál az aktiváció 38-szorosára emelkedett.

Ezekből az adatokból azt következtethetjük, hogy az optimális mennyiségű Hmgb1 jelenléte elősegíti a Sox trió dóziszfüggő szinergista aktivációját a *Matn1* promóteren.

#### ***4.5. A Hmgb1 elősegíti az endogén Matn1 Sox trió általi bekapcsolását a gént nem termelő sejtekben***

**1. táblázat:** Az endogén *Matn1* indukciója a gént nem expresszálo COS-7 sejtekben Sox trió és Hmgb1 hatására

Transzkripció faktor	<i>Matn1</i> expressziós szint	
	2- $\Delta\Delta C_t \pm$ SEM <sup>a</sup>	aktiválás p érték
Üres Vector	1.95E-06 $\pm$ 1.47E-07	1
Hmgb1	2.42E-06 $\pm$ 2.87E-07	1.24 9.90E-01
Sox trió	5.03E-05 $\pm$ 5.64E-06	25.76 7.08E-03
Sox trió + Hmgb1	1.54E-04 $\pm$ 2.65E-05	78.68 2.25E-05

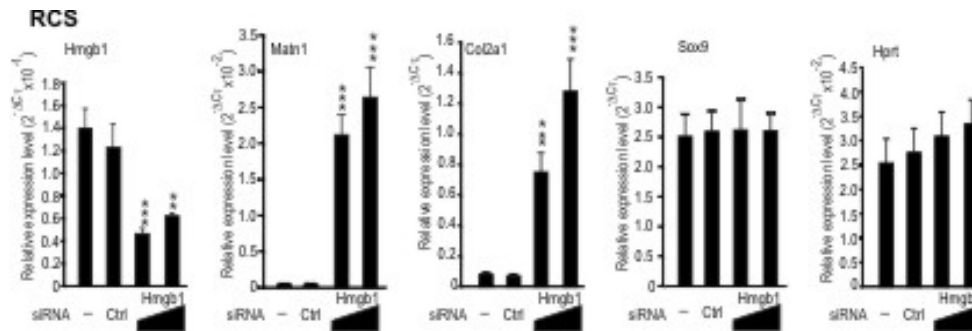
<sup>a</sup>*Matn1* mRNS szintet az állandó Gapdh mRNS szinthez képest adtuk meg.

A következő kísérletsorozatban, azt vizsgáltuk, hogy vajon az optimális mennyiségű Sox trió elegendő-e ektopikus *Matn1* expresszió kiváltásához a fehérjét nem termelő COS-7 sejtekben, illetve Hmgb1 vajon elősegíti-e az indukciót. Az optimális arányú és mennyiségű L-Sox5/Sox6 és Sox9 26-szorosára növelte a COS-7 sejtek a rendkívül alacsony endogén *Matn1* expressziós szintjét (1. táblázat). Ugyanakkor Hmgb1 jelenlétében a Sox trió 79-szeresére növelte az endogén *Matn1* expressziós

szintet az üres vektorral transzfektált kontrolhoz képest, ami háromszorosa a Sox trió egyedüli indukciós hatásának.

Ezek alapján, a Hmgb1 elősegítette Sox trió mediálta *Matn1* promóter aktivációt, sőt elősegítette a endogén *Matn1* Sox trió általi bekapcsolását, tehát az ektopikus génextpressziót.

#### 4.6. A Hmgb1 csendesítés hatása a porcspecifikus génextpresszióra



5. ábra: A Hmgb1 csendesítés hatása a porcspecifikus génextpresszióra RCS sejtekben. Az RCS sejteket növekvő mennyiségű (200 pmol és 400 pmol) patkány Hmgb1 siRNS és negatív kontroll siRNS (Ctrl) duplexszel transzfektáltuk. QRT-PCR analízissel követtük a marker gén expressziót, az állandó Rps18 mRNS szinthez képest adtuk meg. A szignifikancia \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , amit a nem transzfektált mintákra vonatkoztattunk.

Ezek után csendesítési kísérleteket végeztünk állandósult chondrogén sejtvonalakon annak vizsgálatára, hogy a Hmgb1 hogyan hat az endogén *Matn1*-re a késői porcfejlődési stádiumokban. Az immortalizált borda porcsejt (C-28/I2) és chondroszarkóma eredetű (SW1353) sejtvonalak a porcspecifikus géneket alacsony szinten termelik [5, 6]. Az RCS (patkány chondroszarkóma) sejtvonalban a porcspecifikus marker gének expressziója magasabb, de a primer sejt kultúrákban mért értéket nem éri el [11]. Az irodalmi adatokkal összhangban humán sejtvonalakban alacsony *MATN1* ( $3.99 \times 10^{-5}$  C-28/I2-ban és  $9.74 \times 10^{-5}$  SW1353 sejtekben) és *COL2A1* ( $4 \times 10^{-5}$  C-28/I2-ban és  $1 \times 10^{-5}$  SW1353 sejtekben) mRNS szintet mértünk [15]. A *SOX9* mRNS szint rendkívül alacsony ( $7.16 \times 10^{-2}$  C-28/I2-ban és  $4.74 \times 10^{-2}$  SW1353 sejtekben) volt, szemben a magas *HMGB1* mRNS szinttel (1.59 C-28/I2-ban és 1.46 SW1353 sejtekben). RCS sejtek sokkal magasabb relatív *Col2a1* ( $8 \times 10^{-2}$ ), *Sox9* (2.51) és *Matn1* ( $3.56 \times 10^{-4}$ ) mRNS szintet mutattak, míg a *Hmgb1* mRNS expressziója ( $1.39 \times 10^{-1}$ ) sokkal alacsonyabb volt patkány- mint humán-sejtvonalakban (5. ábra).

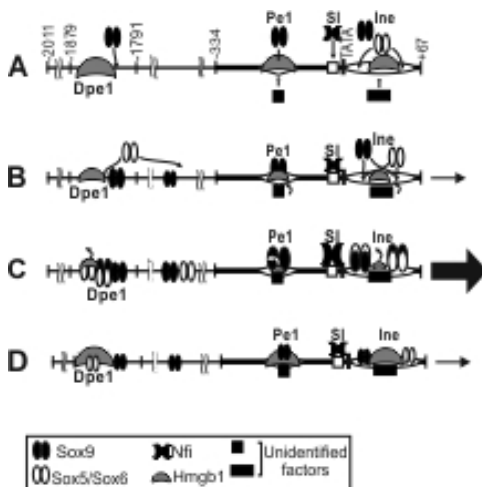
Mivel ezek a sejtvonalakra a primer sejt kultúrákkal ellentétben magas a HMGB1 és alacsony porcspecifikus marker génextpresszió jellemző, ezért igen alkalmasak arra, hogy csendesítési kísérletben teszteljük hipotézisünket, mely szerint a SOX9-hez képest megemelkedett HMGB1 szint gátolhatja a marker expressziót chondrogén sejtekben. A HMGB1 2.5-szeres csendesítésének hatására C-28/I2 sejtekben a *MATN1* és a *COL2A1* expressziója 4-szeres, illetve 5-szörösére emelkedett. SW1353 sejtekben *MATN1* és *COL2A1* expresszió szintjének növekedése 9.6-32-szeres és 10-13-szoros volt. Az aktiváció specifikus volt, mert sem a *GAPDH* sem a *SOX9* mRNS szint nem változott. A legnagyobb expressziós változást RCS sejtekben mértük, ezért e tanulmányban azt ábrázoltuk (5. ábra). Mikor csendesítés hatására RCS sejtekben a *Hmgb1* mRNS szintje 42-57-szer alacsonyabbra csökkent, mint a Sox9 mRNS-é, akkor a *Matn1* és a *Col2a1* mRNS szintje 59-74-szeresére, illetve 9.3-15.9-szeresére emelkedett (5. ábra). A *Hmgb1* csendesítése ebben az esetben sem okozott szignifikáns változást a *Hprt* és a *Sox9* mRNS szintjében, ezért a hatás specifikusnak tekinthető.

Humán és patkány chondrogen sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *MATN1/Matn1* és a *COL2A1/Col2a1* expressziója nagymértékben nőtt. Ez megerősíti azt hipotézisünket, hogy a Hmgb1 nagy mennyiségben interferálhat a Sox-trió által mediált promóter aktivációval a *Matn1* és a *Col2a1* esetében.

## 5- Az eredmények megvitatása

A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Kimutattuk, hogy a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, a *Hmgb1* géné csökken, hasonlóan a chondrogenesis kezdeti szakaszában szerepet játszó *Hmgn1* génhez. Tisztított Hmgb1 fehérjével végzett *in vitro* kötési kísérletekben bizonyítottuk, hogy Hmgb1 kötődik a *Matn1* konzervált DNS elemeihez, leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel és jelenléte befolyásolja L-Sox5 és SOX9 fehérjék kötődését ezekhez az elemekhez. Igazoltuk, hogy a Pe1, Ine és Dpe1 elemek különböző affinitással kötnek SOX9, L-Sox5 és Hmgb1 faktorokat *in vitro*. SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és a Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg Sox5 és Hmgb1 leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel. A Hmgb1 és Sox faktorok kötődését *in vitro* módszerek mellett alátámasztják a debreceni partnerünk által végzett CHIP kísérletek eredményei is [15]. Kotranszfekciós kísérletekben kimutattuk, hogy Hmgb1 ugyancsak dóziszfüggő módon befolyásolja a Sox trió szinergista aktiváló hatását. Mivel ismert, hogy a Hmgb1 képes a hiszton H1 leszorításával fluidizálni tudja a kromatin szerkezetet [2], ezért feltételezzük, hogy a Hmgb1 alacsony dózisonál a kromatin szerkezetet fellazítva segíti elő a Sox trió kötődését a DNS-elemekhez és a promóter aktiválását. Magas dózisonál azonban interferálhat a Sox faktorok kötődésével. További kísérletként a *Matn1*-et nem termelő COS-7 sejteken optimális mennyiségű SOX9, L-Sox5, Sox6 és Hmgb1 expresszáló plazmidokkal transzfektáltuk, melynek hatására ki tudtuk mutatni a endogén *Matn1* indukcióját és a *Matn1* mRNS expresszióját.

Chondrogén sejtvonalakon végzett csendesítési kísérleteinkben igazoltuk, hogy a Hmgb1 nagy dózisban gátolja a porcspecifikus génexpressziót. Human (C-28/12, SW1353) és patkány (RCS) sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *Matn1* és a *Col2a1* génexpressziója nagymértékben nőtt. A Hmgb1 magas expressziója más tumoros sejtekben is ismert [8]



6. ábra: Modell a *Matn1* promóter Hmgb1 és Sox faktorok általi szabályozására. Ábrázoltuk a faktor kötődését a konzervált DNS-elemekhez a porcfejlődés kezdetén (A), a korai szakaszában (B), késői proliferatív porcsejtekben (C), és rákos sejtvonalakban (D).

Ezek az adatok összhangban állnak a *Matn1* transzkripció szabályozását leíró korábbi közleményekkel [12,13,15], megerősítve és továbbfejlesztve a Sox trió dózisfüggő szinergista kölcsönhatását a promóteren. Erdeményeink ugyancsak összhangban állnak a Hmgb1 széles körű hatásával és kiszélesítik azt.

A fenti eredmények alapján a *Matn1* különleges transzkripció szabályozására javasolt modellünket kiegészítettük a Hmgb1 szerepével. Hmgb1 kötődik a Dpe1, Pe1 és Ine elemhez fibroblasztokban és elkötelezett mesenchyma sejtekben (6.A. ábra). A kromatin struktúra felnyitását a konzervált DNS-elemekhez kötődő és a hiszton H1-et leszorító Hmgb1 végzi, valójában még a Sox faktorok bekötődése előtt és ezáltal elősegíti a porc-specifikus Sox faktorok kötődését a TATA közelében a chondrogenesis korai szakaszában (6.B. ábra). A gén transzkripció aktivitása megnő, amikor a Hmgb1 kötődését a Sox9 kötődése váltja fel és L-Sox5/Sox6 dózis-függő módon növeli a Sox9 transzaktiváló hatását a késői proliferatív porcsejtekben (6.C. ábra). A magas Hmgb1 expressziójú hipertróf porcsejtekben vagy Hmgb1 fehérjét nagy mennyiségben termelő rákos sejtekben a Hmgb1 nagy dózisa és kötődése megakadályozza a Sox fehérjék kötődését (6.D. ábra).

A *Matn1* zonális kifejeződését irányító transzkripció szabályozás felderítése elősegítheti a szöveti differenciáció jobb megértését és a növekedési korong fontos zónáira specifikus vektorok előállítását, ami hasznos lehet ízületi betegségek terápiás eljárásainak kidolgozásakor. Hmgb1 expresszió emelkedett szintjét mutatták ki arthritisben szenvedő betegekben [8], ami adataink szerint a porcfehérje gének csökkenéséhez vezethet.

---

## 6- Irodalom

---

- [1] A. Alevizopoulos, Y. Dusserre, M. Tsai-Pflugfelder, T. von der Weid, W. Wahli, N. Mermod, A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3, *Genes Dev*, 9 (1995) 3051-3066.
- [2] M.E. Bianchi, A. Agresti, HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15 (2005) 496-506.
- [3] W. Doppler, M. Windegger, C. Soratroi, J. Tomasi, J. Lechner, S. Rusconi, A.C. Cato, T. Almlöf, J. Liden, S. Okret, J.A. Gustafsson, H. Richard-Foy, D.B. Starr, H. Klocker, D. Edwards, S. Geymayer, Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5, *Mol. Cell. Biol.*, 21 (2001) 3266-3279.
- [4] T. Furusawa, J.H. Lim, F. Catez, Y. Birger, S. Mackem, M. Bustin, Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes, *Mol. Cell. Biol.*, 26 (2006) 592-604.
- [5] M. Gebauer, J. Saas, F. Sohler, J. Haag, S. Soder, M. Pieper, E. Bartnik, J. Beninga, R. Zimmer, T. Aigner, Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1 $\beta$ , *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (2005) 697-708.
- [6] M.B. Goldring, J.R. Birkhead, L.-F. Suen, R. Yamin, S. Mizuno, J. Glowacki, J.L. Arbisser, J.F. Apperley, Interleukin-1 $\beta$ -modulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J. Clin. Invest.*, 94 (1994) 2307-2316.
- [7] R.M. Gronostajski, Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development, *Gene*, 249 (2000) 31-45.
- [8] R. Hock, T. Furusawa, T. Ueda, M. Bustin, HMG chromosomal proteins in development and disease, *Trends Cell Biol.*, 17 (2007) 72-79.

- [9] I. Karcagi, T. Rauch, L. Hiripi, O. Rentsendorj, A. Nagy, Z. Bősze, I. Kiss, Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements, *Matrix Biol.*, 22 (2004) 605-618.
- [10] V. Lefebvre, P. Li, B. de Crombrughe, A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene, *EMBO J.*, 17 (1998) 5718-5733.
- [11] K. Mukhopadhyay, V. Lefebvre, G. Zhou, S. Garofalo, J.H. Kimura, B. de Crombrughe, Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro- $\alpha$ 1(II) collagen gene, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 27711-27719.
- [12] A. Nagy, E. Kénesi, O. Rentsendorj, A. Molnár, T. Szénási, I. Sinkó, A. Zvara, S.T. Oommen, E. Barta, L.G. Puskás, V. Lefebvre, I. Kiss, Evolutionarily conserved, growth plate zone-specific regulation of the matrilin-1 promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi factors bound near TATA finely tune activation by Sox9, *Mol. Cell. Biol.*, 31 (2011) 686-699.
- [13] O. Rentsendorj, A. Nagy, I. Sinkó, A. Daraba, E. Barta, I. Kiss, Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene, *Biochem. J.*, 389 (2005) 705-716.
- [14] P. Szabó, J. Moitra, A. Rencendorj, G. Rákhely, T. Rauch, I. Kiss, Identification of a nuclear factor-I family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 10212-10221.
- [15] T. Szénási, E. Kénesi, A. Nagy, A. Molnár, B.L. Bálint, A. Zvara, Z. Csabai, F. Deák, B. Boros Oláh, L. Mátés, L. Nagy, L.G. Puskás, I. Kiss, Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene promoter by Sox9 and L-Sox5/Sox6 in early steps of chondrogenesis, *Biochim Biophys Acta*, 1829 (2013) 1075-1091.
- [16] N. Taniguchi, K. Yoshida, T. Ito, M. Tsuda, Y. Mishima, T. Furumatsu, L. Ronfani, K. Abeyama, K. Kawahara, S. Komiya, I. Maruyama, M. Lotz, M.E. Bianchi, H. Asahara, Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification, *Mol. Cell. Biol.*, 27 (2007) 5650-5663.

---

### **Bevezetés**

---

Dolgozatom elkészítésének alap motivációja az volt, hogy összefoglaló elemzést készítsék az ENSZ Ciprusi Békefenntartó Missziójában (United Nations Peacekeeping Forces in Cyprus, UNFICYP) előforduló felső-légúti megbetegedésekről.

Az UNFICYP-et az ENSZ Biztonsági Tanácsa 1964 márciusában elfogadott 186-os számú BT határozata alapján hozták létre. 1964 áprilisában kezdhetette meg működését a több nemzetiségű katonai misszió, annak érdekében, hogy a sziget (görög és török) ciprióta lakossága között fennálló vallási és etnikai konfliktust csökkentse. Ezek az erőfeszítések az első tíz évben sikerrel jártak, azonban 1974-ben az ENSZ csapatok jelenléte ellenére véres háború vette kezdetét, minkét oldalon több ezer áldozatot követelve. Az UNFICYP mandátumát megváltoztatva azóta is a tűzszünet fenntartását hivatott őrizni, feladat rendszere azonban egyre inkább politikai szerepvállalás felé tolódik el.

Napjainkban a katonai erőket, egy kisebb létszámú, szintén multinacionális rendőri erő, illetve civil adminisztráció egészíti ki. Az északi törökök, valamint a déli görögök lakta területek között húzódó ENSZ ütköző zónát a világszervezet mintegy 15 ország képviseléből álló katonai erővel, valamint egy kisebb létszámú, szintén többnemzetiségű rendőri erővel felügyeli. A misszióban jelenleg 21 nemzet képviselteti magát. Magyarország katonáival 1996 óta állandó tagja a missziónak.

---

### **Kutatási hipotézis**

---

A ciprusi műveleti területre a katonák nagyobb része Európából (Egyesült Királyság, Szlovákia, Magyarország), kisebb hányada pedig Dél-Amerikából (Argentína, Chile, Paraguay) érkezik.

Kutatásom megkezdése előtt azt feltételeztem, hogy a misszióban a felső-légúti megbetegedések az amerikai kontinensről érkezőket érinti nagyobb arányban. Ennek okát a nagy földrajzi távolságban, az északi-, déli félteke közötti évszabbeli eltérésben, a táplálkozási- és higiénés szokásokban mutatkozó különbségek miatt feltételezhetően eltérő száj- garat mikrobiológiában, valamint mindezek összességében az apatogén/patogén kórokozók kolonizációs képességében mutatkozó különbségben láttam.

A vizsgálatok statisztikai elemzésének adatai azonban a korábban feltételezettől eltérő eredményt hoztak, abban a tekintetben, hogy a különböző egészségügyi mutatókat és diagnózis-gyakoriságot összevetve a felső-légúti megbetegedések - az UNFICYP négy kontingense viszonylatában – nem a dél amerikai kontinensről érkezők, hanem a magyarok körében fordultak elő a legnagyobb arányban.

A kutatás eredményein keresztül szerettem volna választ kapni arra a kérdésre, hogy létezik-e összefüggés a gyermek illetve felnőtt korban elvégzett orr- és garatmandula műtétek, valamint a felnőtt korban előforduló felső-légúti fertőzések előfordulási gyakorisága között.

Ugyancsak választ vártam arra a kérdésre, hogy mi az oka annak, hogy a misszióban a magyar katonák körében magasabb arányban fordulnak elő felső-légúti megbetegedések, mint a vizsgálatba bevont többi három nemzet katonáinál.

Tanulmányomban a fentebb említett tények igazolására keresek egészségügyi és mikrobiológiai vonatkozású összefüggéseket.

---

## **Kutatási módszerek**

---

A kutatás során a nemzetközi világszervezet adatbázisában szereplő specifikus rész-adatállomány, több szempontos elemzését végeztem el azzal a céllal, hogy a misszióban szolgálatot teljesítő katonák körében előforduló felső-légúti megbetegedések gyakoriságáról, ezek vélhető vagy valószínűsíthető okairól reális képet kapjak. Elemzéseimet négy nemzet katonáinak körében végeztem, négy év viszonylatában.

Tekintve, hogy a küldő országok a misszióban résztvevők kiválasztását standardizált módszerek és elvárások szerint végzik, vizsgálataimat - életkort, munka tevékenységet, munkakörülményeket, általános fizikai- és egészségi állapotot tekintve - homogén, egészséges populációban végeztem. A kutatás statisztikai alapjainak egységes rendszerét az ENSZ által standardizált adatfeldolgozási- és jelentési kritérium rendszer biztosította. A kutatás három különböző módszerrel, az alábbi fázisokban zajlott:

### ***1. Retrospektív adatgyűjtés, statisztikai elemzés***

---

Retrospektív adatgyűjtést majd statisztikai elemzést végeztem a misszióban jelentésre került betegségszámokkal kapcsolatosan.

A retrospektív elemzés célja az volt, hogy a kutatói hipotézisekben megfogalmazottakat konkrét, valós számadatokkal támasszam alá illetve, hogy a kutatás ilyen módon keletkező sarok-számait, későbbiekben a műtéti-, és mikrobiológiai adatokkal összevetve, objektív eredményekhez jussak.

Négy nemzet - argentin, brit, szlovák, magyar - katonáinak négy év alatt keletkezett egészségügyi dokumentációját analizáltam. A 2009. január 1. és 2012. december 31. között regisztrálásra került 15,749 eset elsődleges elemzését követően 2,521 felső-légúti megbetegedés eredményeit emeltem ki további statisztikai feldolgozás és tanulmányozás céljából.

### ***2. Kérdőíves felmérés***

---

A kérdőíves felmérés ugyancsak négy kontingens bevonásával zajlott, melynek célja egy real-time állapot elemzéséhez szükséges adatbázis kialakítása volt, ahol megvizsgáltam a misszióban szolgálók demográfiai, antropometriai és egészségügyi paramétereit, majd ezeket összehasonlítottam egymással. A kutatás ezen szakaszában közel 600 fő kérdőíves kikérdezése és fül-orr-gégészeti fizikális vizsgálata történt meg.

### ***3. Mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálat***

---

Mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálatot - garatváladék minták elemzését - végeztem garatmandula eltávolításon átesettek csoportjában illetve ennek kontroll csoportjánál, mintegy 200 esetben. Tettem ezt annak érdekében, hogy a száj-, garat baktériumflóra minőségi és mennyiségi változásait, az esetlegesen fennálló különbségeket a két csoport vonatkozásában kimutassam.

---

## **Kutatási eredmények**

---

### ***1. Felső-légúti megbetegedésekkel kapcsolatos eredmények***

---

Megállapítottam, hogy a misszióban az összes regisztrálásra került betegségcsoporton belül, a felső-légúti megbetegedések éves szinten 17%-21%-os arányban fordulnak elő. A felső-légúti megbetegedések számai 4 év viszonylatában közel egységes képet mutatnak, nagy kiugrás, illetve jelentős csökkenés az évek közötti összehasonlításban nem mutatkozott.

A 2009-ben kezdődött és 2010-ben befejeződött H1N1 influenza világjárvány időszaka alatt a felső-légúti megbetegedések aránya nem változott, a missziót a pandémia

érdemben nem érintette. Jellemző, hogy a szlovák kontingens katonáinál a megbetegedések száma folyamatosan alacsonyabb, míg a magyaroknál folyamatosan magasabb arányt mutat a másik két kontingenshez (argentín, brit) viszonyítva. Négy év viszonylatában a magyar kontingens felső-légúti megbetegedési arányszámai a legmagasabbak.

Felső-légúti megbetegedések aránya 2009-2012 között a misszióban

Vizsgált év	ARG	BRIT	SLOV	HUN
2009	15%	26%	13%	30%
2010	14%	16%	11%	26%
2011	17%	17%	11%	28%
2012	14%	11%	11%	32%

## 2. *Diagnózis-csoportokkal kapcsolatos eredmények*

A kutatás adatainak könnyebb kezelhetősége és egyszerűbb értelmezhetősége okán az eddig vizsgált felső-légúti betegség csoportból további diagnosztikai csoportokat alkottam, két nagy betegség-csoportra koncentrálva:

1.sz. diagnózis-csoport: náthával járó betegségek,

2.sz. diagnózis-csoport: torokfájással járó betegségek.

Az első csoportba a náthával járó megbetegedések - gyűjtő néven: rhinitisek - különböző megjelenési formái kerültek. Ide soroltam a fertőzőes eredetű náthát, a meghűlést vagy megfázást (rhinitis acuta), az allergiás náthát (rhinitis allergica), és valamennyi orrmelléküreg gyulladást, így az arcüreg, a homloküreg, a rostasejt és iköböl gyulladásos megbetegedéseit (rhinosinuszitisek).

A második csoportba a garat-, valamint a mandula különböző gyulladásos megbetegedései (gyűjtő név: torok-gyulladások) kerültek. (pharyngitisek és tonsillitisek).

Megvizsgáltam, hogy a két diagnosztikai csoport milyen arányt képvisel a felső-légúti megbetegedésekben belül. Megállapításra került, hogy mind a misszió egészét tekintve, mind kontingensekre lebontva ezeket az adatokat, valamennyi vizsgált nemzet esetében az 1.sz diagnózis csoport (náthával járó betegségek) betegségei nagyobb arányban fordultak elő, mint a 2.sz diagnózis csoport (torokgyulladások)betegségei.

Diagnózis-csoportok betegségeinek előfordulási aránya 2009-2012 között

Diagnózis-csoportok	2009	2010	2011	2012
Rhinitisek (1.sz)	70%	68%	77%	68%
Torokgyulladások (2.sz)	30%	32%	23%	32%

Az arányszámokban mutatkozó eltérés természetes, a tendencia megegyezik a civil gyakorlatban szerzett tapasztalataimmal, melyen sem a kiválasztott populáció, sem az eltérő környezet, sem a feladatokkal járó speciális megterhelés érdemben nem változtatott.

## 3. *A 100 főre vetített esetszám értékekkel kapcsolatos eredmények*

Eddigi vizsgálataimban az abszolút értéken megjelenített adatokat, a misszió összesített adatait, valamint a kontingensen belül keletkező adatok/arányok összehasonlítását végeztem. Ezen alapadatok alapvető jelentőséggel bírnak, azonban a kontingensek közötti összehasonlításban a statisztikai számításoknak ezen alapuló, egymás mellé tétele, és ilyen módon történő vizsgálata nem elégséges a korrekt következtetések



levonásához, hiszen a misszióban szolgáló, dolgozatomban összehasonlított négy kontingens létszámadatai eltérőek.

Ennek az alapvető ténynek a figyelmen kívül hagyása megnehezítette volna az összegyűjtött adatok korrekt összehasonlítását, ami a végkövetkeztetésekben is eltérést eredményezhetett volna.

Annak érdekében, hogy ezt elkerüljem, illetve hogy a vizsgált számadatok összehasonlíthatóak legyenek, meghatároztam az egy főre eső eset- és diagnózis számokat. Ezt az ún. URT Score / Felső-légúti Megbetegedési Együttható segítségével, az alábbi két lépésben tettem meg.

Számítási módszer:

1.lépés:		
URT Score =	$\frac{\text{összes felső-légúti diagnózis (db)}}{\text{létszám (fő)}}$	
2.lépés:		
100 főre vetítve =	URT score $\times$ 100	

Példa a számítási módszer alkalmazására:

URT Score értéke az ARG kontingens 2009 évi adatai alapján:		
URT Score =	202 diagnózis	= 0,7
	294 fő	
100 főre vetített esetszám:	$0,7 \times 100$	= 70

Az URT Score alkalmazásával mérhetővé vált a kontingenseken belüli, egy főre eső megbetegedések száma, amely a továbbiakban lehetővé tette az adatok összehasonlítását, így reális kép kialakítását arról, hogy a felső-légúti megbetegedések bizonyos formái milyen arányban érintik az egyes kontingensek katonáit.

Az URT Score átlaga a négy kontingens esetében

	ARG	BRIT	SLOV	HUN
<b>URT score átlaga</b>	0,6	0,8	0,5	1,3
<b>100 főre vetített esetszám értéke</b>	60	80	50	130

A táblázatban megjelenített adatok alapján érzékelhető, hogy a magyar kontingens tagjainál jelentkező felső-légúti panaszai gyakoribbak, megjelenésük kedvezőtlenebb arányt mutat, mint a másik három kontingensé. A szlovák kontingens esetében négy év átlagát figyelembe véve 100 katonából 50 esetben, az argentin kontingensnél 100 katonából 60 esetben, míg az angol kontingensnél 100 katonából 80 esetben fordul elő felső-légúti fertőzés. A magyar katonáknál a 100 főre vetített érték 130 eset, ami azt jelenti, hogy minden magyar katona a missziós szolgálati ideje alatt legalább egyszer, de akár többször is átesik felső-légúti betegségen.

A statisztikai elemzések eredményei rávilágítottak, arra a tényre, hogy a különböző egészségügyi mutatókat és diagnózis-gyakoriságot összevetve a felső-légúti megbetegedések mindkét alcsoportja - náthával illetve torokgyulladással járó felső-légúti megbetegedés egyaránt - a magyarok körében fordult elő a legnagyobb arányban a vizsgálat négy éve alatt. Az argentin és brit kontingens esetszámai a misszió átlag számadataival megegyezőek voltak, míg a szlovák kontingens katonáinál ennél is alacsonyabb volt a jelentett megbetegedések száma.

#### 4. Mandula műtétekkel kapcsolatos eredmények

Az eredmények függvényében nem hagyhattam figyelmen kívül, azt a tényt, hogy bizonyos korábbi műtéti beavatkozások, mint például az orrmandula vagy a garatmandula eltávolítása hatással lehetnek az aktuális egészségi állapotra és ez által befolyásolhatják a légúti betegségek előfordulási gyakoriságát is. E feltételezés okán kutatásomat kiterjesztettem a korábban elvégzett műtétek kvalitatív és kvantitatív feldolgozására is. Az adatfeldolgozás során a műtéteket két nagy csoport vonatkozásában elemeztem:

- gégészeti jellegű beavatkozások (orr- és garatmandula műtétek)
- egyéb műtétek (valamennyi műtét, a fenti kettő kivételével)

A felmérés eredménye szerint az argentin kontingens tagjainak 47%-a, a brit kontingens tagjainak 55%-a, a szlovák kontingens 53%-a, míg a magyar kontingens 57%-a számolt be valamilyen korábbi műtéti beavatkozásról. Mindez mutatja, hogy az összes műtéti beavatkozás viszonylatában a legtöbb műtétet a magyar kontingens tagjainál végezték el.

A korábban műtéten átesettek adatainak feldolgozása szerint az argentin kontingens tagjainak 80%-a egyéb, 20%-a mandula műtéten esett át, ugyanez az arány a brit kontingens tagjainál 36% egyéb - 64% mandula műtét, a szlovákoknál 76% egyéb - 24% mandula műtét, míg a magyarok esetében 35% egyéb - 65% mandula műtét. A magyar számadatok valamennyi kontingens műtéti adatait meghaladják.

A kutatómunka következő fázisában a gégészeti jellegű műtéteket részletesebb elemzésnek vettem alá, ahol a mandula műtéteket különböző aspektusból vizsgáltam meg:

- gyermekkorban vagy felnőtt korban elvégzett műtét
- orrmandula vagy garatmandula illetve kombinált, orr- és garatmandula műtét

Megállapítottam, hogy magyar vonatkozásban a jellemző beavatkozás a felnőttkorban elvégzett garatmandula műtét volt,

A feldolgozott adatok rámutattak, hogy a magyaroknál a garatmandula műtétek döntő része felnőtt korban történik meg, míg a többi három kontingens esetében a gyermekkorban elvégzett beavatkozások dominálnak. A felnőtt korban elvégzett műtétek aránya a magyar kontingens körében háromszorososa volt a szlovák vagy a brit értéknek, de az argentin eredményt is több mint kétszeresen meghaladta.

Műtétek aránya a kontingensek körében

Kontingens	Nem volt műtéte korábban	Volt műtéte korábban	Egyéb műtéte volt	Mandula műtéte volt	Gyermekkor i mandula műtét	Felnőttkori mandula műtét
ARG	53 %	47 %	80 %	20 %	87 %	13 %
BRIT	45 %	55 %	36 %	64 %	91 %	9 %
SLOV	47 %	53 %	76 %	24 %	89 %	11 %
HUN	43 %	57 %	35 %	65 %	71 %	29 %

#### 5. Külső számadatok analízise, összehasonlítása

Annak érdekében, hogy a felmérésben szereplő mandula műtétek magas arányát igazoljam, egy független forrás adatbázisát, az EUSTAT-HEIDI programjának adatait vettem igénybe. A HEIDI nevű interaktív alkalmazás az unió tagállamainak statisztikai hivatalaitól beérkező hivatalos egészségügyi adatokat tartalmazza, standardizált,

100 000 lakosra vonatkozó előfordulási gyakoriságban meghatározva.<sup>1</sup> A programon keresztül azon paraméterek külső kontrollját végeztem el, amelyek kutatási anyagomban szerepelnek.

2009-ben az EU tagországaiban átlagosan 120 garatmandula eltávolítást (tonsillectomiát) végeztek 100 000 lakosonként. Ez az adat Cipruson mindössze 31 volt, az Egyesült Királyságban 70, míg Magyarországon ez utóbbinak is több mint kétszeresét, 154 műtétet végeztek el. Tény azonban az is, hogy a tendencia az ezt megelőző 3 év adataihoz képest - 2006-os adatokat alapul véve - abszolút műtét számban csökkenést mutat. Ez utóbbi Magyarország esetében a korábbi 197-es műtéti számról 154-re csökkent. Az adott évben elvégzett tonsillectomiák számának relatív aránya az uniós átlaghoz képest ebben az időszakban ugyanakkor igen jelentős emelkedést mutat, hiszen a magyarországi műtétek száma az uniós átlagot 2006-ban még csak 22%-kal, 2009-ben viszont már 45%-kal haladta meg. Szlovákia sem az ezt megelőző, sem az ezt követő időszakban nem osztott meg adatokat ebben a fejezetben, így műtéti számadataik nem ismertek.

100 000 lakosra	2009 évi adat	
EU átlaga	120	műtét
Ciprus	31	műtét
Egyesült Királyság	70	műtét
Magyarország	154	műtét

Szintén megvizsgáltam a Magyarországgal azonos régióban elhelyezkedő tagországok számadatait is:

100 000 lakosra	2009 évi adat	
EU átlaga	120	műtét
Magyarország	154	műtét
Ausztria	117,7	műtét
Románia	110,6	műtét
Lengyelország:	59,1	műtét
Szlovénia	54,7	műtét

Az unió mindössze egyetlen országában, Németországban végeznek a hazánképtől több mandula műtétet, de a különbség elenyésző: 1,8 műtét / 100 000 lakosonként, évente. Az uniós átlagot - valamennyi tagország eredményeit figyelembe véve - csak Németország és Magyarország haladja meg.<sup>2</sup>

Az eddigi eredményekből kialakított hipotézisem szerint a garatmandulák védő szerepének kiiktatása - mely a szervezet védekező rendszerét, mikrobiológiai integritását, anatómiai és funkcionális állapotát megváltoztató beavatkozás - befolyásoló hatással lehet akut felső-légúti megbetegedések számának alakulásában.

A kutatási anyagomban feldolgozásra került adatok eredménye alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a garatmandulák eltávolítását követően, valamilyen eddig nem ismert okból kifolyólag a felnőttkori felső-légúti infekciók száma megszorodik. Ezt a feltevést indirekt módon már igazolni láttam azzal a ténnyel, hogy kutatási anyagomban a felső-légúti megbetegedések a mandulával rendelkező személyek esetében kisebb számban fordultak elő. Feltételeztem, hogy a mandula műtétek és a felnőttkori felső-légúti infekciók előfordulási gyakorisága között létezik kimutatható összefüggés. Úgy gondoltam, hogy azokban az esetekben, amikor gyermek vagy felnőttkorban a garatmandula eltávolítása megtörtént, valamilyen eddig nem

<sup>1</sup> HEIDI DATA TOOL: 2011. *European community health indicators* [online]<http://www.ec.europa.eu/health/indicators.html> [2012.04.27]

<sup>2</sup> HEIDI DATA TOOL: 2011. *European community health indicators* [online]<http://www.ec.europa.eu/health/indicators.html> [2012.04.27]

ismert okból megváltozik a száj és garatüreg mikrobaflórája, a mandulák kiesett funkciójával együtt csökken a védekező képesség, elősegítve bizonyos kórokozók kolonizációját, ezzel együtt növelve a légúti megbetegedések előfordulási gyakoriságát.

## 6. Mikrobiológiai eredmények

Az elmélet helyessége, mikrobiológia okainak igazolása, illetve direkt összefüggések kimutatása céljából 200 esetben végeztem el a páciensektől levett garatváladék minta mikrobiológiai elemzését. A vizsgálatot mandulával már nem rendelkezők csoportjánál (tonsillectomizáltaknál) és korábban nem operált kontroll csoport tagjainál azonos számban végeztem el.

A szájüregi flórát alkotó, több mint 500 kórokozó közül – melynek kb. 1/3-a patogén - az általam végzett vizsgálat során mindössze 15-20 baktériumtörzsrre koncentráltam. Ezen a csoporton belül prioritási sorrendet alakítottam ki a célbaktériumok vonatkozásában.

Staphylococcus aureus	Streptococcus B csoport	Lactobacillusok
Methicillin Rezisztens Staphylococcus Aureus	Streptococcus C csoport	Serratia
Streptococcusok	Pseudomonas aeruginosa	Acinetobacter
Streptococcus pyogenes	Klebsiella pneumoniae	Pantoea agglomerans
Streptococcus pneumoniae	Escherichia coli	ESBL
Streptococcus A csoport	Enterobacter cloacae	Candida albicans

A 200, mikrobiológiai tenyésztésre elküldött minta 68 esetben mutatott pozitív eredményt (10 törzs, 5 szubtípusa, 1 gomba faj került kimutatásra), ami az összes minta vonatkozásában 34%-os pozitivitást jelentett. Ugyanolyan esetszám mellett, több mint kétszer annyi (+28) humán patogén került kimutatásra a mandulával nem rendelkezők esetében, mint a mandulával rendelkező kontroll csoport tagjainál. A kimutatott kórokozók közül valamennyi jelentős szereppel bír a felső-légúti megbetegedések általam vizsgált betegségcsoportjainak okozásában.

A mandulaműtéten átesett 100 főnél, illetve a kontroll csoport 100 tagjainál az alábbi arányban és különbséggel kerültek kórokozók kimutatásra:

	Kórokozó neve	Tonsillectomizált csoport	Kontroll csoport	Eltérés
1	Staphylococcus aureus	13	4	+9
2	MRSA	2	0	+2
3	Streptococcus	9	3	+6
4	Pseudomonas aeruginosa	2	0	+2
5	Acinetobacter	2	2	0
6	E.coli	5	2	+3
7	Enterobacter cloacae	4	4	0
8	Lactobacillus	0	3	-3
9	Klebsiella pneumoniae	4	3	+1
10	Serratia	1	0	+1
11	Pantoea agglomerans	0	1	-1
12	ESBL	0	0	0
13	Candida albicans	4	0	+4
	Összesen	46	22	+28

A statisztikai adatállományból jól kivehető az aránytalanság a kórokozók kimutatásában, mely a tonsillectomizáltaknál mutatkozik. Ugyanolyan esetszám mellett, több mint kétszeres mennyiségű humán patogén került kimutatásra a mandulával már nem rendelkezők (tonsillectomizáltak) esetében, mint a mandulával rendelkezőknél (kontroll csoport).

A kimutatásra került kórokozók közül szinte valamennyi jelentős szerepe van a felső-légúti megbetegedések által vizsgált betegcsoportjaiban. A kimutatott kórokozók nagyobb hányada tagja ugyan a normál száj-, és garatüregi flórának, de a tenyésztés során ezek aránya minden egyes kórokozó esetében jelentősen meghaladta a normál értéként megjelenített csíraszámot.

---

### **Összefoglalás**

---

A korábbi műtéti beavatkozások vizsgálata az elvégzett mandula műtétek vonatkozásában számos figyelmet érdemlő megállapítást hozott.

1. A felső-légúti infekciók aránya, és ezzel együtt a mandula műtétek aránya a magyar kontingens esetében volt a legmagasabb.
2. A feldolgozott statisztikai adatok alapján bizonyítható, hogy ez a vizsgált faktor domináns szereppel bír a kontingens körében nagy gyakorisággal előforduló felső-légúti megbetegedésekben.
3. A garatmandulák védő szerepének kiiktatása befolyásoló hatással lehet bizonyos kórokozók tartós jelenlétére, kolonizációjára a száj- és garatüregben. Kutatásomban ezek a kórokozók lényegesen nagyobb számban kerültek kimutatásra a mandula műtéten átesett katonák mikrobiológiai mintájából, mint a mandulával rendelkezőkéből.
4. Direkt összefüggésként megállapítható, hogy a kórokozók nagyobb arányú jelenléte a száj- és garat üregben okozhatja a gyakrabban előforduló felső-légúti megbetegedéseket
5. Kutatási eredményeimen keresztül kimutathatóvá vált, hogy bizonyos baktériumok – melyek alapvetően a normál torokflóra tagjai – inkább a mandulával már nem rendelkezők, míg mások jellemzően inkább a mandulával rendelkezők száj-, és garatüregében kolonizálódnak. Mindez mikrobiológiai összefüggést is jelenthet a mandula műtéten átesettek és a mandulával rendelkezők eltérő felső-légúti megbetegedési hajlamával kapcsolatban.

---

### **Javaslatok**

---

1. Javasolom egy nagyobb létszámú, akár hosszú idejű utánkövetésre is lehetőséget adó, a jelenlegi kutatás témájával megegyező adatgyűjtési projekt elindítását hazai körülmények között, járóbeteg-szakrendelő intézeti szinten annak érdekében, hogy további összefüggéseket keressünk a felső-légúti megbetegedések gyakorisága valamint a korábban elvégzett mandula műtétek között.
2. Dolgozatom eredményei rávilágítottak arra, hogy a hazánkban elvégzett garatmandula műtétek száma jelentősen meghaladja az Európai Unió hivatalos statisztikaiban közzétett országonkénti-, és összesített uniós eredményeket egyaránt. Ennek ismeretében mind a kivizsgálás mind a gyógyítás folyamatában, illetve a műtéti indikáció felállításában kifejezetten ajánlott a szakmai protokollokon és evidenciákon alapuló eljárási rend jelenleginél szigorúbb alkalmazása.

Tanulmányunk tágabb értelemben a technológiailag fejlett társadalmak egészségmodelljében, az ún. biomedikális modellben kínálkozó antropológusi pozíciók számbavételére, az antropológiai szemléletmód alkalmazási lehetőségeinek feltárására vállalkozik. Gondolatmenetünk kiindulópontját az a kérdés képezi, hogy az antropológiai megismerés fő eszközeként szolgáló megfigyelő módszer milyen teret kaphat az egészség és társadalom találkozási pontjainak pontosabb megértése során. Az idegenség tapasztalatának többféle jelentésrétege fejthető fel az ezredfordulós társadalmak egészségügyi gyakorlatában. A kulturális különbözőségből fakadó idegenség tapasztalata egyaránt lehet a kutatás tárgya, és a kutatói pozíciót meghatározó sajátosság is. A modern egészségügy terében is megjelenő kulturális különbözőség, s az itt kibontakozó konfliktusok, a kulturális határok újratemelődésekének kérdése az orvosi antropológia hangsúlyos kutatási területei. Ugyanakkor a modern medicina gyakorlatát alakító, ám abba be nem avatott antropológus szemszöge eleve magában hordozza az idegen perspektíváját, mely kutatói attitűdjét és tárgyának észlelését egyaránt meghatározza.

Az alábbiakban az idegenség tapasztalatának három színterét fogjuk megkülönböztetni, nem állítva egyúttal azt, hogy ne volna lehetséges más értelemben kiaknázni az antropológiai szemléletmód nyújtotta lehetőségeket, ugyanakkor igényt tartva arra, hogy ezek a későmodern társadalmak jelentős problémáit érintik.

## **I. KI AZ AZ EMBER? AZ ORVOSI ANTROPOLÓGIA ÉS A BIOMEDIKÁLIS MODELL**

A biomedikális vagy medikális modell az iparosodott, nyugati társadalmak egészségmodellje, amely a 19. század első néhány évtizedében alakult ki, ugyanakkor ma is dominánsnak tekinthető. Alapvető szemléletmódja a természettudományos alapokon nyugvó orvoslás, melyben a betegségek diagnosztizálása és kezelése során, ill. a betegek ápolásában a modern tudomány eredményeit és eszközeit felhasználó gyakorlatok válnak uralkodóvá, s ami egyúttal életre hívja a modern egészségügyi ellátórendszert is. Jewson ismert tanulmányában emellett érvel, hogy ez az orvosi kozmológia szemben a korábbi betegágy melletti orvoslással lényegében a kórházi orvoslás koncepciójával jön létre. (Jewson 2009) Itt az – aszepsis-antiszepsis tan felfedezése után – a betegségek okait sajátos ágensek működésében – úm. baktériumok, vírusok, paraziták –, ill. a sejtszintű és molekuláris folyamatok zavaraiiban kell keresni. „A (...) biomedicina ideológiájában háttérbe szorítja, nem fontosnak vagy érdektelennek tekinti a személyes és társadalmi tényezőket, és kizárólag a testre, mint gépezetszerűen működő mechanizmusra koncentrálnak. Az emberi problémák így fokozatosan elveszítik erkölcsi karakterüket, testi folyamatokra redukálódnak, és így egyszerűsödve kontrollálhatóknak, megoldhatóknak tűnnek fel” (Bánfalvy - Kakuk 2007)

Ezzel egy időben rejtve marad az a kérdés: ki is ez az ember, akiről beszélünk? E kérdés viszont, ami visszavezet minket a középkori univerzálé-vitához, valóságos és lényeges: nem úgy áll-e a dolog, hogy az egyes ember létéből fakadó problémák éppúgy, vagy még inkább fontosak a gyógyítás vonatkozásában, mint az emberi nem természetéből adódóak? A későmodern társadalmak pluralizálódásának és a másság percepciójában bekövetkező változásoknak a tapasztalata egyértelműen fogalmazza meg azt az igényt, amely révén a partikuláris, saját történeti és szociokulturális kontextusukba zárt páciensek problémáira adandó adekvát válaszok túlmutatnak a biomedikális szemlélet horizontján. A betegségek univerzalitásának és a betegek partikularitásának e

feszültségterét Foucault „A klinikai orvoslás születése” című tanulmányában részletesen ábrázolta, megnyitva ezzel a fenti problémáról való gondolkodás előtt az utat.

A kulturális antropológia számára kézenfekvő módon adódik egy válasz a fenti kérdésre: a William Halse Rivers munkássága<sup>3</sup> nyomán útjára indult, s mára önálló antropológiai tudománygá intézményesült orvosi antropológia kifejezetten annak a sajátos univerzumnak dedikálja figyelmét, melyben a különböző kultúrákhoz, társadalmi csoportokhoz tartozó emberek a saját egészségi állapotukat, a gyógyítás szerepét és mikéntjét elképzelik. Azok a kérdések és válaszok, amelyek minden egyes alkalommal elhangzanak, ha egy beteg és egy egészségügyi szakember találkozik (interakciók), azok a kifejezések, magyarázatok, eljárások, amelyek a gyógyítás folyamatához kötődnek (definíciók), azok az írott és íratlan szabályok, aláfölérendeltségi viszonyok (struktúra), amelyek az egészségügyet jellemzik, egyaránt egy sajátos keretbe illeszkednek. Ez a keret szisztematikusan meghatározza, hogy szakemberként és laikusként hogyan érzékeljük és ismerjük az egészség és betegség világát. Definiálja, hogyan viszonyulunk az egészséghez és betegséghez, hol húzzuk meg e kettő között a határt. Megszabja azokat a módszereket, amelyekkel azonosíthatók és megszüntethetők a betegségek, megmondja, mit tehet, sőt, mit kell tennie annak, akit beteggé nyilvánítanak.

Eme univerzumok közül csupán egy az, amit a biomedikális szemlélet képvisel, amely tehát ebből fakadóan nem úgy értelmezendő, mint ami a színpadot biztosítja az egészséghez való viszonyulásmódok egzotikus kavalkádjához, s ezzel együtt a siker kizárólagos záloga. Sokkal inkább önmaga is egy meghatározott kontextust képvisel, mely minden erénye és sikere mellett is kénytelen tekintetbe venni viszonylagosságát és kiszolgáltatottságát ama folyamatoknak, melyek létrehozták. Ennek jelei számtalan módon érzékelhetőek a medicinán belül is, úm. a preventív orvoslás előtérbe kerülése, a paramedikális területek jelentőségének felértékelődése, vagy a laikus betegségekben megjelenő új mintázatokra adandó egészségügyi válaszok sürgető igénye.

Ennek a folyamatnak a felismerésében, megismerésében rögzíthető az antropológiai reflexió első szintje, hiszen az említett univerzum feltárásában, annak önmagára ismerésében az antropológus által felmutatott idegenségtapasztalat szolgáltatja az egyik meghatározó kiindulópontot. Úgy tűnik továbbá, hogy azt a feszültséget, mely a testbe akár molekuláris szintig behatoló biomedicina és a társadalomtudományok episztemiológiai horizontja között húzódik, a természettudományok és az orvoslás területére mélyebben behatoló orvosi antropológia hivatott kezelni. Mindezekon túlmenően a biomedikális modell kritikái közül is jó néhány antropológiai perspektívából megfogalmazott aggály.

---

## II. INTERKULTURÁLIS MEGÉRTÉS

---

Egy másik szintjét az antropológiai reflexiónak a konkrét orvos-beteg interakció sajátosságainak és problémáinak körvonalazása jelenti. A beteggel való találkozás gyakorlatának lényeges aspektusa, hogy hogyan zajlik a megértés kultúráközi helyzetekben? Ott ahol e megértés tétje nem valamely elméleti hozadék, pl. egy monográfia sikeres fogadtatása a normáltudomány berkein belül, hanem konkrét egyedi fájdalmak, életveszélyek konkrét intervenciói. A társadalomtudományok felől érkező kritikák jelentős részét a medicina szereplői sokszor éppen azzal vélik elhárítani, hogy az emberi élet védelme olyan erkölcsi imperatívuszt testesít meg, mely súlytalaná teszi a kulturális kondíciókat, nincs szükség megértésükre. Sol omnibus lucet! szól a parancs: a Nap mindenkire süt! Petronius szavaiból könnyen levonható olyan következtetés, mely szerint teljesen lényegtelen ki a páciens, néhány dolog fontos csupán: stabilizálni a keringést, helyreállítani az oxigénellátást, stb. Tény, hogy annak a határnak a

---

<sup>3</sup> Főként a „Medicine, Magic and Religion” című munkája alapján.

megvonása, mely eme életmentő vészhelyzeteket elválasztja azoktól, ahol viszont fontossá válik a kulturális értelmezettséget érintő reflexió, korántsem tekinthető evidens vagy triviális feladatnak. Ám ebből nem következik az, hogy ne létezne ilyen határ. E határról való tudás azonban nehezen tematizálható, mégpedig főként természetéből adódóan: tudniillik sokkal inkább fronézisről, egyfajta gyakorlati jártasságról, bölcsességről beszélhetünk, mintsem objektívizáló elméleti tudásról. Nem nehéz belátni, hogy az orvoslás fentebb vázolt biomedikális modelljében az ilyen fajta tudás nem, vagy nehezen értelmezhető.

Az antropológus pozíciójából fakadó egyik hangsúlyos nehézség az orvos-beteg interakció területén a kultúraközi megértés előmozdításának funkciójával felruházott interkulturális kompetenciák kialakításának kérdésköre. Az 1960-as évektől kezdődően igen tetemes mennyiségű irodalom halmozódott fel, melyek a kulturális különbözőségekből fakadó megértési nehézségekre kínálnak a társadalmi élet legkülönbözőbb területein (de elsősorban is az egészségügyi- és szociális ellátás, az oktatás, az üzleti élet és a hadászat területein) elméleti modelleket és gyakorlati tanácsokat, útmutatókat egyaránt. Az antropológusok képzésének ugyanakkor szerves része, hogy kultúra idegen légkörben értessék meg önmagukat és értelmezzék környezetüket, mely a kulturális relativizmus eszményének gyakorlati előfeltétele is egyúttal. Ez készséggé és egyben alapértelmezéssé kell, hogy váljon, mely nélkül nehezen lenne kivitelezhető a terepmunkán alapuló kutatások jelentős része.

Ezzel szemben a biomedikális modell egyneműsítő atmoszférájában, ahol adott esetben a testi folyamatok determinálják a szubjektum autonómiáját is, nagy nehézségekbe ütközik relativizálni, vagy akár csak pillanatokra felfüggeszteni az egyén referenciatartományát.

A nemzetközi – főként angolszász – szakirodalomban számtalan kísérlet létezik e probléma áthidalására, melyeket itt csak címszavakban tartom szükségesnek megemlíteni: a cultural knowledge, -awareness, -sensitivity, -competence, -intelligence, kiegészítve olyan váltakozó értelmű előtagokkal, mint inter-, cross- és trans-. Vagy újabban a cultural humility, vagy a cultural integrity koncepciói, ill. még újabban a kultúra fogalmát, mint a valós szociális problémák elfedésére is kiválóan alkalmas kategóriát ért kritikák eredményeként a narrative humility koncepciója (Koskinen 2008, Campinha-Bacote 2002, Purnell - Paulanka 2008, Domenig 2007, DasGupta 2008; Tervalon & Murray-Garcia 1998).

---

### III. AZ ERKÖLCSI FELTÉTEL

---

A biomedikális modell dominanciája egyúttal azt is jelenti, hogy úgy mutatja be a természettudományos alapokon nyugvó orvoslást, mint amely kizárólagosan jogosult dönteni arról, mi tartozik a betegség tartományába és mi nem. Ebben a megközelítésben úgy tűnik, mintha kizárólag az orvostudomány birtokolná azt a tudást, ami az emberi test működésével, egészségével és betegségeivel kapcsolatos kérdések megválaszolásához szükséges. Az igazság egyetlen birtokosaként olyan pozícióra és hatalomra tesz szert, amely ellenőrzése alá vonhatja az élet mind több területét, medikalizálhat számtalan olyan jelenséget, viselkedésformát, állapotot, amely korábban természetesnek számított vagy hétköznapi eszközökkel kezelhető volt. (pl. ilyen lehet a szépség, a születés vagy a halál medikalizációja). E dominanciával karöltve jelenik tehát meg a medikalizációnak nevezett folyamat, melyet fogalmi funkcióval Ivan Illich a Limits to Medicine című könyvében lát el.

A medikalizáció egyik jól ismert hatása bizonyos esetekben az erkölcsi horizontok nivellálódása. A korábban társadalmi normák által szabályozott – tehát erkölcsi értékítélet tárgyát képező – jelenségek, cselekedetek gyakran a normális-abnormális



működés tengelyébe transzponálódnak, vagyis az erkölcsiként kezelt problémák medikálissá változnak át. (Conrad- Schneider 1992)

E jelenség jelentősége akkor válik még pontosabban értelmezhetővé, ha mellé tesszük a nyugati orvoslásban csak Georgetown mantrának nevezett bioetikai alapelveket. A híres amerikai Belmont jelentés 1978-ból és a nyomában megjelent Tom Beauchamp – James Childress szerzőpáros által publikált Principles of Biomedical Ethics című nagyhatású mű indította útjára azt a négy bioetikai alapelveket, melyek ma is meghatározzák a bioetikai diskurzusokat. Ezek közül az első és legfontosabb az autonómia tiszteletének az elve – ami tehát egy olyan kor kellős közepén jelenik meg, amikor az egyén sokkal könnyebben válik testi folyamatai, molekulái, vagy genetikai állományának „áldozatává”, de legalább is kiszolgáltatottjává, radikálisan sértve ezzel autonómiáját. Az etikai történetéből már jól ismert jelenségről van itt is szó: természetes, hogy olyan normáink, szabályaink alakuljanak ki, melyekre szükségünk van. A szükség azonban társadalmilag meghatározott kategória, következésképpen nem minden társadalomban ugyanazon etikai elvek alapján válik értelmezhetővé egy adott cselekedet. Az itt kinyíló kérdés így hangzik: a „nyugati” társadalmak biomedikális modelljében született bioetikai elveknek kellene-e érvényesülniük minden egészségügyet érintő erkölcsi dilemmában?

---

#### **IV. ÖSSZEGZÉS: HATÁRTEREMTÉS ÉS A BIOMEDIKÁLIS MODELL**

---

A fentiekben kibontott szempontok nyomán felmerül a kérdés, hogyan konstruálódnak az antropológiai megfigyelés tárgyát képező idegenség különböző formái a biomedikális modell mentén szerveződő modern egészségscénában, milyen módon járul hozzá a modern egészségügy az idegenség-reprezentációk megteremtéséhez, illetve a különbözőség tapasztalatának újratermelődéséhez.

E kérdés abban az elméleti közegben merül fel, amely úgy tekint a modernitásra, mint amely az objektíváló, racionalizáló technikai révén eloldja az ember önmagára (így létére, testére, szenvedéseire, múlandóságára) vonatkozó tapasztalatit a hétköznapi élettől és a szakértői tudás világához köti azokat. A későmodern viszonyai között a racionalitásban gyökerező szakértői tudás szerepe az, hogy tökéletesítse, kiigazítsa, megelőzze azokat a hibákat, amelyek a hétköznapi élethez kötődő tudás korlátozott, tökéletlen voltából adódnak. (Bury 2005) A hétköznapi élet medikalizációjában kifejeződik a hatalomgyakorlás azon új formája, amely a tudás monopolizálása és specializálása révén vonja ellenőrzése alá a modern társadalmi életet. A hatalomgyakorlás fő célpontja a test, melyet az önkontroll belsővé tett szabályozó mechanizmusain keresztül irányít a társadalom, ily módon létrehozva az engedelmes testek sokaságát. (Foucault 1990; Giddens 1991) Mindemellett az egészségesről és betegről folytatott diskurzusok is ezen hatalom befolyása alá tartoznak.

Ugyanakkor a „helyi”, a „saját” viszonyaitól elszakadó tudásra épülő társadalom a keretei között szaporodni látszanak a különféle (etnikai, vallási, lokális) csoportszolidaritásra épülő, a közös érdekek érvényesítését célzó közösségek, amelyek a korábban széttöredezett csoportidentitások rekonstruálására vállalkoznak. Úgy tűnik, hogy az egészség-betegség terepében is megjelenik mindez, többek között olyan betegcsoportok, vagy potenciális betegcsoportok formájában, amelyek nem osztoznak egészség-betegség domináns diskurzusaiban. Ennek forrásai épp úgy lehetnek az életstílusból adódó, és a dominánstól eltérő egészségértékek, mint ahogyan a nyelvi, kulturális különbözőséggel együtt járó nem szokványos egészség-beállítódás. Az idegenség megtapasztalása ezúttal az egészség és betegség mezején bekövetkezett határsértésekhez kötődik. A határsértés következménye épp úgy lehet stigmatizáció (pl. „önhibás”, deviáns betegcsoportok), mint az ellátáshoz való hozzáférés korlátozottsága (pl. bevándorlók, vallási kisebbségek), hiszen az egészségügyi ellátáshoz való hozzáférés határát az elfogadott betegség és betegdefiníciók kijelölésével védik. Az uralkodó egészségparadigma voltaképpen határteremtő és határfenntartó, saját és idegen határát

folytonosan kijelölő hatalommal is bír, mely az intézmények, szolgáltatások hozzáféréseinek ajtóit is működtetik.

Az antropológusi pozíció ezzel a megközelítéssel kitágul: az idegenség tapasztalatának vizsgálatán túl az idegenség létrehozásának módjait és következményeit is megvilágíthatja, hozzájárulva így a biomedikális paradigma sajátosságaiból adódó professzionális és laikus dilemmák feloldásához.

---

#### HIVATKOZÁSOK

---

1. Bánfalvi, A. - Kakuk, P. (2007) *A pszichoanalízis és a pszichiátria "ontológiai bizonytalansága" a posztmodern medicina kulturális hátterével*. OTKA kutatási zárójelentés. from [http://real.mtak.hu/737/1/42677\\_ZJ1.pdf](http://real.mtak.hu/737/1/42677_ZJ1.pdf)
2. Beauchamp, T.L. – Childress, J.F. (2001) *Principles of Biomedical Ethics*. 5th ed. Oxford University Press, New York
3. Bury, M. (2005) Postmodernity and Health. In Scambler G., Higgs P. (eds.). *Modernity, Medicine and Health, Medical Sociology Towards 2000*. London: Routledge
4. Campinha-Bacote, J. (2002) *The Process of Cultural Competence in the Delivery of Healthcare Services*. *Journal of Transcultural Nursing* 13(3): 181-84
5. Conrad, P. and Schneider, J.W. (1992) *Deviance and Medicalization: from badness to sickness*. Temple University Press, Philadelphia
6. DasGupta, S. (2008) *Narrative Humility*. *The Lancet* [online] 371(9617) Available at: <http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736%2808%2960440-7/fulltext> [Accessed 11 July 2013]
7. Domenig, D. (Ed.) (2007) *Transkulturelle kompetenz: lehrbuch für pflege-, gesundheits- und sozialberufe* 2nd ed. Bern: Verlag Hans Huber
8. Foucault, M. (1990) *Felügyelet és büntetés. A börtön története*. Budapest: Gondolat
9. Giddens, A. (1991) *Modernity and Self-Identity*. Cambridge: Polity
10. Illich, I. (1995) *Limits to Medicine*. Marion Boyars Publishers
11. Jewson, N. D. (2009) *The disappearance of the sick-man from medical cosmology, 1770-1870*. *International Journal of Epidemiology* 38:622-633.
12. Purnell, L. and Paulanka, B. (Eds.) (2008) *Transcultural health care: a culturally competent approach* 3rd ed. Philadelphia: F.A. Davis
13. Rivers, W. H. R. (2001) *Medicine, Magic and Religion*. Routledge, London
14. Tervalon, M. and Murray-Garcia, J. (1998) *Cultural humility versus cultural competence: a critical distinction in defining physician training outcomes in multicultural education*. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved* 9(2): 117–25

Az adenosin protektív és reparatív folyamatok elindításában résztvevő nukleozid, amelynek hatásait elsősorban G-protein kapcsolt adenosin receptorok mediálják. Az A1 adenosin receptor (A1 receptor) csaknem minden emlős szövetben expresszálódik, ennek megfelelően A1 receptor agonisták és allosztérikus enhancer-ek többféle diagnosztikus és terápiás indikációban állnak fejlesztés illetve klinikai kipróbálás alatt. Az egyes szövetek A1 receptor agonistákkal szembeni válaszkészsége tehát gyakorlati jelentőséggel bír. Az adenosin receptorok közül a myocardiumon az A1 típusú a legjelentősebb, amely részt vesz az ún. ischaemiás prekondicionálás jelenségének létrehozásában is. A szöveti válaszkészség fő meghatározója az ún. receptor rezerv. Vizsgálatunk célja az A1 receptor rezerv meghatározása volt tengerimalac pitvaron az adenosin direkt (előzetes adenilcikláz-stimuláció nélkül mérhető) negatív inotróp hatására nézve.

Hartley típusú tengerimalacokból izolált, ingerelt (3 Hz, 1 ms, kétszeres küszöb feszültség) bal pitvarok kontrakciós erejének változását mértük karbogénnel szellőztetett, Krebs oldattal feltöltött szervkádakban (36 °C; pH=7.4). A pitvarokon kumulatív koncentráció-hatás görbéket vettünk fel adozinnal vagy CPA-val (relatív stabil, szelektív A1 receptor full agonista), NBTI (szelektív nukleozid transzport gátló; 10 µM), FSCPX (irreverzibilis A1 receptor antagonist; 10 µM 45 percig majd 75 perces kimosás), illetve e két utóbbi együttes hatása alatt.

A receptor rezerv meghatározása során bebizonyosodott, hogy számolnunk kell az NBTI által okozott endogén adenosin felhalmozódás torzító hatásával, de a munkacsoport által korábban kifejlesztett módszer, az RRM (receptorial responsiveness method) segítségével korrigáltunk a torzulásra. Eredményeink szerint a pitvari A1 receptor rezerv az adenosin direkt negatív inotróp hatására nézve igen jelentős.

Az NBTI egyrészt fokozta, másrészt látszólag gyengítette is az exogén adenosin hatását. Az előbbi jelenség oka, hogy az NBTI gátolja az exogén adenosin intracelluláris bontását (az inward adenosin transzport akadályozása révén), utóbbié pedig az, hogy az NBTI gátolja az endogén adenosin bontását is, emiatt az felszaporodik és elfoglalja a receptorok egy részét még a koncentráció-hatás görbe felvétele előtt. A nagy pitvari A1 receptor rezerv arra figyelmeztet, hogy mind az A1 receptor agonisták és enhancer-ek, mind az endogén adenosin-szintet növelő szerek gyengíthetik a pitvarok mechanikai aktivitását, akár milyen indikációban kerülnek alkalmazásra.

Támogatás: OTKA-104017, TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001