

## СОДЕРЖАЩИЕСЯ В МАТОЧНОМ МОЛОЧКЕ БЕЛКИ КАК СРЕДСТВО РАЗРАБОТКИ НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ СРЕДСТВ

Я. ШИМУТ<sup>1</sup>, Катарина БИЛИКОВА<sup>1</sup>, Елена КОВАЧОВА<sup>2</sup>, СЛОВАКИЯ

J. ŠIMÚTH<sup>1</sup>, Katarína BÍLIKOVÁ<sup>1</sup>, Elena KOVÁČOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Chemistry, SK-84538 Bratislava, SLOVAK REPUBLIC, <sup>2</sup>Institute of Virology Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, SLOVAK REPUBLIC  
E-mail: chemsim@savba.sk

### Аннотация

*Качество продуктов медоносной пчелы (Apis mellifera L.) оценено на основе статических свойств, определяемых химическими, физическими и инструментальными анализами. Ныне вообще принято, что качество продуктов пчеловодства хорошо определять на основе динамических функций каждой составной части. Маточное молочко принято как вещество с благоприятным влиянием на здоровье и часто применяется как таковое. С каждым днем растет количество научных документов, поддерживающих концепт, что самыми привлекательными биоактивными составными частями продуктов пчеловодства являются белки, содержащиеся в маточном молочке. Недавнее открытие, что белки из маточного молочка могут выполнять физиологические функции как иммуномодуляторы, остановителей аллергических реакций, а также их свойства стимулирования организма открыли новую эпоху в применении маточного молочка и меда. Наше систематическое молекулярно-биологическое исследование индивидуальных белков и пептидов маточного молочка показали, что их многофункциональные свойства могут быть использованы в качестве маркеров для стандардизации доз применения маточного молочка, которые можно использовать в ежедневной диете и которые, после поглощения, регулируют тот или иной физиологический процесс. Медицинские и фармакологические эффекты продуктов пчеловодства будут оценены более точно и квантифицированы на основе индивидуального количества белков маточного молочка из принимаемой диеты. Будут представлены свойства индивидуальных белков маточного молочка и их физиологические функции во время личиночного развития и как добавки функциональных продуктов.*

**Ключевые слова:** маточное молочко медоносной пчелы/белок/пептиды/очищение/физиологические свойства

### Введение

Пчелиная семья как сверхорганизм, состоящий из индивидуальных клеток (сами пчелы) отражается в механизмах с помощью которых сборщицы собирают, складывают, сохраняют нектар и пыльцу и обеспечивают корм расплода. Протеины и пептиды, синтезированные медоносными пчелами в головных железах играют важную роль в процессах кормления расплода и его защиты против патогенных агентов.

Маточное молочко выделяется головными железами пчел кормилиц и используется как корм для личинок медоносных пчел. Через профилактическое поведение оно распределяется между особями семьи (КРАЙЛШАЙМ, 1992). Маточное молочко – система веществ, состоящая из белков (12-15%), воды (60-70%), общих сахаров (10-12%), жиров (3-7%), минеральных веществ, аминокислот и витаминов (ТАКЕНАКА, 1982; ШИМУТ, 2001). Маточное молочко считается уникальным кормом, вырабатываемым в природе в течение эволюции животных.

Содержание и кормление вылупившихся личинок обеспечиваются молодыми медоносными пчелами, которые, благодаря выделениям их головных желез кормят личинку будущей матки маточным молочком, личинку будущей рабочей особи молочком рабочей пчелы и личинку будущего трутня молочком трутневым. Эти типы молочка не отличаются между собой с точки зрения химического состава основных составных частей, как белки, жиры и углеводы. Существенное различие состоит в том, что маточное молочко, в отличие от молочка рабочих пчел, содержит составную часть, которая определяет, что станет равно диплоидное яйцо с генетической точки зрения: маткой, или в отсутствии этой составной части, рабочей пчелой. Но эта составная часть пока еще не идентифицирована. Ключ данного механизма регулирования кодирована специальными генами медоносной пчелы, которые активируют его в начальной стадии личиночного развития будущей матки и подавляет у личинки будущей рабочей пчелы. Речь идет о так называемом дифференцированном проявлении генов, что регулируется на гормональной основе и включена и в регулирование проявлений других генов, ответственных за различные фенотипические сигналы, различающие матку от рабочей особи. Так как рабочие пчелы кормят матку маточным молочком всю

жизнь матка долго живет (до 4-5 лет, а рабочие пчелы – лишь 3-4 недели). Данное явление придало идею, что маточное молочко могло бы быть средством продолжительности жизни человека. Несмотря на то, что это только экспериментально не основанная гипотеза, последние научные открытия подсказывают, что в первую очередь белки из маточного молочка могли бы быть фактором переживания в питании человека. Выделяемые пчелами белки выполняют разные функции в создании оптимальных условий развития пчелиной семьи. Гипофарингеальные, мандибулярные и слюнные железы являются источником самых важных для медоносных пчел белков. В этих железах синтезированы сотни разных белков и пептидов с незаменимой ролью в кормлении расплода и его дифференцировании, в образовании пыльцевых обножек и перги и в уникальном процессе образования меда из нектара. Данные белки, как экзогенное выделение медоносных пчел облегают непосредственный контакт с источником корма и процесс защиты против патогенных агентов.

### Экзогенные белки медоносных пчел

*Классифицирование белков, выделяемых медоносными пчелами в маточном молочке и полученных из него продуктах*

Белки составляют около 50% сухой массы маточного молочка (ШИМУТ, 2001). Главные белки образуют 90% из общего количества белков с молекулярной массой 49-87 kDa (ХАНЕШ и ШИМУТ, 1992; ШМИЦОВА с сотр., 1998; МАПЕЦОВА с сотр., 2003). Минорные белки маточного молочка состоят из белков и пептидов с различными функциями, в том числе с противомикробными и противогрибковыми свойствами (ФУЖИВАРА с сотр., 1990; БИЛИКОВА с сотр., 2001; БИЛИКОВА с сотр., 2002; БАХАНОВА с сотр., 2002).

На основе их функций, белки и пептиды медоносных пчел можно классифицировать следующим образом:

Технологические энзимы – включены в процесс переработки нектара в мед:  $\alpha$ -глюкозидаза, глюкооксидаза, каталаза и амилаза.

Питательные белки – выделяются в корме личинок как основной белковый источник личинок медоносных пчел.

Защитные белки и пептиды – выделяются медоносными пчелами в их продуктах и защищают расплод против патогенных агентов.

Физиологически активные белки и пептиды – выполняют ряд функций в пчелиной семье и влияют на процессы, происходящие в культурах тканей ячеек в условиях *in vitro*.

### Структуральные свойства маточного молочка

Вообще, маточное молочко определено как эмульсия. Изучение свежего маточного молочка электронным микроскопом со сканированием (SEM) показало его уникальные структуральные свойства (ШИМУТ, 2001).

Исследование под SEM показало, что в некоторых зонах слой маточного молочка содержит относительно крупные шаровидные частицы (рис. 1). Их размер варьировал от 20 до 80  $\mu\text{m}$ . Данные сферы связаны между собой системой каналов волокон. Диаметр волокон составляет около 2  $\mu\text{m}$ , а длина их переменна. Есть мнение, что тонкая структура маточного молочка генерирована гипофарингеальными железами медоносной пчелы.

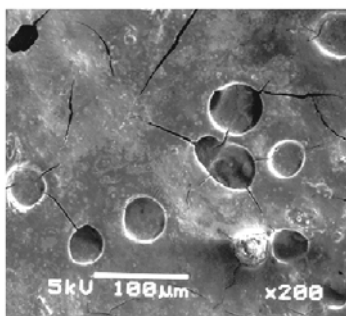


Рис. 1 – Показ SEM типичных шаровидных частиц из натурального маточного молочка. Ячейка матки с личинкой 2-дневного возраста *Apis mellifera carnica* L.) отрезана от сота пасеки автора. Личинка удалена, а маточное молочко заморожено при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  для исследования структуральных свойств маточного молочка с помощью SEM. Для предупреждения разрушения начальной структуры маточного молочка были отменены процедуры фиксирования. Пробы маточного молочка были взяты из замороженных проб. Они оставлены при комнатной температуре в течение 72 ч. и были способны образовать тонкий слой на алюминиевых дисках диаметром 1,2 см. Затем пробы негативно окрашены с Cu в камере с видом при  $10^{-3}$  Паскаля и изучены SEM (Джеол, модель JSM, Япония).

### Подготовка белков маточного молочка в натуральной форме

Для изолирования белков в возможно более натуральной стадии нами разработан метод фракционирования маточного молочка ультрацентрифугированием (ШИМУТ, 2001). Получены таким образом три слоя, разные с физической точки зрения. Сверхнатантная фракция – зелено-желтоватая

жидкость, названная плазмой и которая представляла 61% из маточного молочка. Средний слой – желтовато-коричневая вязкая масса, названная молочко. Данная фракция составляла 32% из количества маточного молочка. Белый осадок на дне (7% из общего количества маточного молочка) казался быть почки твердым веществом. Фракции с меньшим содержанием воды содержали значительные количества жирных кислот. При ультрацентрифугировании получен полусолидный гель золотисто желтого цвета, наподобие янтаря. Биохимические анализы показали, что это важный белок маточного молочка (названный раньше MRJP1) типа альбумина и поэтому получил название *апальбумин-α*. По этой причине нам кажется нормальным подсказывать, что из взаимодействия *апальбумина-α* с жирными кислотами получена нерастворимая в воде белковая фракция маточного молочка. Интересно, что другие белки маточного молочка, локализованные в сверхнатантной фракции, например *апальбумин-β* (названная раньше MRJP2) и *апальбумин-γ* (названный раньше MRJP3) не могут образовывать гель, несмотря на то, что у них много сходного с *апальбумином-α* ШМИЦОВА с сотр., 1998).

#### *Физические и химические свойства апальбумина-α*

Доказано, что *апальбумин-α* образовал подунитарную структуру (ШИМУТ, 2001). Основная поединица составляет около 420 kDa и образовалась из основного мономера в 55 kDa. Исследования под микроскопом показали, что *апальбумин-α* в водных растворах образует структуры, подобные структурам, встречаемым в маточном молочке. В зависимости от концентрации *апальбумина-α*, генерированы разные структуры с регулярной повторностью (рис. 2). Речь идет о самоасамблированной структуре белка, результат олигомеризации его поединиц. Интересно отметить, что другие белки маточного молочка не имеют способность олигомеризации, несмотря на то, что у них многое общее с *апальбумином-α*.

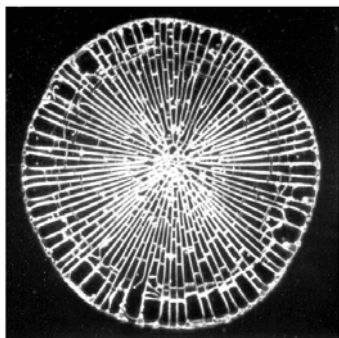


Рис. 2 – Самоасамблирование нитьевых структур *апальбумина-α*. Исследование микроскопом осуществлено спустя 20 мин после накапывания одной капли (3  $\mu$ л) *апальбумина-α* (80 мг/1 мл воды) на покрывательное стекло.

Какова функция автосозидательных структур *апальбумина-α* в семье медоносных пчел? Многие белки намного стабильнее в надклеточных структурах, чем в мономерических формах. Если учитывать высокое содержание белков в маточном молочке, то с теоретической точки зрения невозможно предполагать, что все питательные белки маточного молочка немедленно метаболизированы. Высокая концентрация аминокислот может индуцировать высокое осмотическое давление в пищеварительном тракте личинки. Нами отмечено также, что *апальбумин-α* встречается также в меде и пыльце. Медоносная пчела может использовать структуральные свойства *апальбумина-α* в превращении цветочной пыльцы в пыльцевую обножку. По всей вероятности пчелы заворачивают пыльцу *апальбумином-α* как сэндвича, и что он выполняет и другие функции кроме питательных.

#### *Физиологические свойства белков маточного молочка*

Приведем несколько общих данных о физиологических свойствах мажорных белков маточного молочка. Пока еще нами непосредственно не установлено играют ли мажорные белки маточного молочка одинаковую роль в ранней и поздней стадии развития личинок. Изучение расщепления белка и средней кишке личинки (ЦАО и ШУЭЛЬ, 1968) показало, что ряд белков маточного молочка могут переходить через эпителий кишки без изменений. Высокое содержание существенных аминокислот придал им питательную роль в рамках пчелиной семьи.

Белковая фракция маточного молочка содержит много ценных компонентов и биологически активных веществ. Кроме мажорных белков маточное молочко содержит и невысокие количества ряда минорных белков, в том числе антибиотических пептидов (ФУЖИВАРА с сотр., 1990; БИЛИКОВА с сотр., 2001; БИЛИКОВА с сотр., 2002). Особый интерес представляют биоактивные белки и пептиды, присутствующие в фракцию аминокислоты белков из корма. Эти пептиды могут быть

освобождены энзиматическим протеолизом, например, в рамках желудочно-кишечного пищеварения или во время переработки корма. После освобождения в теле биоактивные пептиды могут действовать как регулирующие компоненты, с активностью, как и у гормонов. Структуры биологически активных частей пока еще не идентифицированы; для этого необходимо продолжать направленное исследование энзиматического пищеварения *in vitro* и/или желудочно-кишечного пищеварения данных белков *in vivo*.

Биоактивные компоненты маточного молочка не полностью пока оценены, но недавно проведенное *in vitro* исследование доказывает, что ряд мажорных белков маточного молочка влияют на очень важные физиологические процессы. Биоактивные пептиды из маточного молочка и из его мажорных белков следует иметь в виду как возможных модуляторов ряда регулирующих процессов в организме. Отношение между активностью и структурой и механизмом, через который мажорные белки маточного молочка оказывают иммуномодуляторные эффекты пока еще не определено. Однако, результаты, полученные с 350 kDa и 55 kDa пептидами из маточного молочка показали, что его мажорные белки могут влиять на важные клеточные процессы. Белки 350 kDa как апальбумин- $\alpha$  (ШМИЦОВА с сотр., 1998) стимулируют размножение моноцитов человека (линия клеток U 937) и гибридомы человек-человек (линия клеток НВ4С5) (КИМУРА с сотр., 1995). Данные авторы открыли тот факт, что структуры цепей сахара со связью N белка 350 kDa являются фактически типичной структурой маноза (Man9-GlcNAc2), часто обнаруженного на животных, растениях и насекомых. Белок 55 kDa маточного молочка, идентичен со вторым важным белком маточного молочка (апальбумин- $\alpha$ ) (ШМИЦОВА с сотр., 1998; БИЛИКОВА с сотр., 1999) поддерживает высокую жизнеспособность первичной культуры клеток крысы, но не стимулирует размножение человеческих моноцитов (КИМУРА с сотр., 1996). Оценка химических структур мажорных биоактивных белков маточного молочка – первый шаг к открытию молекулярного механизма их физиологической активности наряду с другими биоактивными компонентами маточного молочка.

С точки зрения физиологической активности доминирующую позицию занимают избыточные белки маточного молочка: кислый апальбумин- $\alpha$  (ШИМУТ, 2001) и основной апальбумин- $\alpha$  (БИЛИКОВА с сотр., 1999), которые обнаружены и в мозге медоносной пчелы (КИМУРА с сотр., 1995; КУХАРСКИ и МАЛЕШКА, 2002). Данные открытия, а также сходства иммунной системы насекомых и млекопитающих (ДУШАЙ с сотр., 1966; ИМЛЕР и ГОФФМАНН, 2001; БОД и КАРИН, 2001) показали, что белки маточного молочка могли бы быть фактором, включенным в регулирование важных физиологических процессов. Этот факт косвенно подтвержден обнаружением, что раствор 1% чистого меда индуцирует освобождение TNF $\alpha$  в 6 клетках *unprimed monocytes*, а искусственный мед не делает это (ТОНКС с сотр., 2001).

Данные о физиологических свойствах белков маточного молочка, как стимулирование размножения человеческих моноцитов (КИМУРА с сотр., 1995) или иммуномодулирующие свойства продукта (ШВЕР с сотр., 1996), активность в защите против аллергии к маточному молочку (ОКА с сотр., 2001) или противогипертензивная активность биоактивных пептидов продукта (МАЦУИ с сотр., 2002) расширяют возможность применения его в фармацевтике и указывают их природную функцию в процессе эволюции медоносной пчелы, в случае которой могут индуцировать механизм защиты в период личиночного развития. Если это правильно, белки маточного молочка могли бы индуцировать выработку биорегуляторов типа цитокина, с важной функцией в иммунитарной системе. В наших экспериментах нами установлено индуцирование цитокинов в муриных макрофагах белками маточного молочка. Нами установлено, что белки маточного молочка отвечают за стимулирование *in vitro* выработки TNF- $\alpha$  в моноцитах человека водным раствором меда 1% (ТОНКС с сотр., 2001).

Как и другие насекомые, медоносная пчела отвечает на бактериальные инфекции повышенным индуцированием генов для противомикробных пептидов, которые затем выделяются гемолимфой. Такой "иммунный ответ" очень быстро появляется (за несколько часов), но часто он не является специфичным (КАСТЕЛС, 1997; ЗАСЛОФФ, 2002). Определенные противомикробные пептиды (апидецин, абецин) специфично индуцированы и выделены в гемолимфе только после появления бактериальной инфекции, в то время как дефенсин-роялин (ФУЖИВАРА с сотр., 1990) и аписимин (БИЛИКОВА с сотр., 2002), вероятно, синтезированы всю жизнь медоносной пчелы. Белки и пептиды маточного молочка могут влиять на защитный механизм медоносной пчелы против патогенных агентов непосредственным инактивированием микроорганизмов из продуктов медоносной пчелы, а также индуцированием цитокинов.

Данные, полученные на основе биохимических и биологических свойств маточного молочка будут служить основой для функциональных геномов защитной системы пчел против болезней, а также для лучшего понимания физиологических свойств продуктов пчеловодства как составных частей функционального корма. Пока еще трудно определять клинически эффективность маточного молочка, но есть надежды, что исследования обнаружат условия активности маточного молочка, механизм действия или подходящие дозы и период их применения. Наша работа – попытка определять биоактивность белков и пептидов из маточного молочка как важных веществ процесса питания.

ЛИТЕРАТУРА

- Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J., Šimúth J. (2002) Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33, 259-269
- Baud V., Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11, 372-377
- Bílíková K., Klaudiny J., Šimúth J. (1999) Characterization of the basic major royal jelly protein MRJP2 of honeybee (*Apis mellifera* L.) and its preparation by heterologous expression in *E. coli*. *Biologija*, Bratislava 54, 733-739
- Bílíková K., Wu G., Šimúth J. (2001) Isolation of peptide fraction from honeybee royal jelly as antifaulbrood factor. *Apidologie* 32, 275-283
- Bílíková K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klaudiny J., Šimúth J. (2002) Apisimin, a new serine valin-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters* 528, 125-129
- Casteels P. (1997) Immune response in Hymenoptera, in: Molecular mechanisms of immune responses in insects. Breay, P. T., 24. Hultmark, D. (ed), Chapman and Hall, London, 92-110
- Crailsheim K. (1992) The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B.* 162, 681-689
- Dushay M. S., Asling B., Hultmark D. (1966) Origin of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1034-1047
- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara J., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265, 11333-11337
- Hanes J., Šimúth J. (1992) Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apic. Res.* 31, 22 - 26
- Imler J. L., Hoffmann J. A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11, 304-310
- Kimura Y., Washino N., Yonekura M. (1995) N-linked sugar chains of 350 kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 507-509
- Kimura Y., Kajiyama S., Kanaeda J., Izukawa T., Yonekura M. (1996) N-linked sugar chain of 55 kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 12, 2099-2102
- Kucharski R., Maleszka R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biology* 3, research 0007.1-0007.9.
- Malecová B., Ramser J., O'Brien J. K., Janitz M., Júdová J., Lehrach H., Šimúth J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene* 303, 165-175
- Matsui T., Ykiyoshi A., Doi S., Sugimoto H., Yamada H., Matsumoto K. (2002) Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive activity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 80-86
- Oka H., Emori Y., Kobayashi N., Hayashi Y., Nomoto K. (2001) Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and improvement of Th1/Th2 cells responses. *International Immunopharmacology* 1, 521-532
- Schmitzová J., Klaudiny J., Albert Š., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Šimúth J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol. Life. Sci.* 54, 1020-1030
- Šimúth J. (2001) Some properties of the main protein honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly. *Apidologie* 32, 69-80
- Šver L., Oršolič N., Tadič Z., Njari I. B., Vaplotič I., Bašič I. (1996) A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 31-38
- Takenaka T. (1982) Chemical composition of royal jelly. *Honeybee Sci.* 3, 69-74
- Tonks A., Cooper R. A., Price P. C., Molan P. C., Jones K. P. (2001) Stimulation of TNF $\alpha$ -release in monocytes by honey. *Cytokine* 14, 240-242
- Tsao W., Shuel R. W. (1968) Breakdown of royal jelly protein in the midgut of the larval honeybee. *J. Apic. Res.* 7 119-128
- Zaslöf M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395