

# Učinci pčelinjega otrova i melitina na stanični odgovor tumorskih i ne-tumorskih stanica in vitro

---

Gajski, Goran

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:485424>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Goran Gajski

**UČINCI PČELINJEGA OTROVA I MELITINA  
NA STANIČNI ODGOVOR TUMORSKIH I  
NE-TUMORSKIH STANICA *IN VITRO***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.





UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Goran Gajski

**EFFECTS OF BEE VENOM AND MELITTIN  
ON CELL RESPONSE OF TUMOR AND  
NON-TUMOR CELLS *IN VITRO***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.



Ovaj je doktorski rad izrađen u Jedinici za mutagenezu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom prof. dr. sc. Vere Garaj-Vrhovac, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



## ZAHVALE

*Zahvaljujem svima onima koji su na bilo koji način pomogli i doprinijeli izradi ovog rada...*

*Ponajprije zahvaljujem svojoj mentorici Veri Garaj-Vrhovac jer mi je dala priliku za rad na Institutu te na ideji, pomoći, savjetima i prijateljstvu koje mi je pružila prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem i svim sadašnjim i bivšim članovima svoga laboratorija Nevenki, Mirti, Ružici, Vileni, Maji, Mariji, Martini, Snježani, Davoru, Marinu, Marku i Goranu na pomoći i savjetima koje su mi pružili.*

*Hvala Maji Osmak što mi je omogućila da veliki dio rada izradim u njezinom laboratoriju i na svim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade doktorata.*

*Velika hvala Tamari Čimbori-Zovko i Sanjici Rak bez čije pomoći sve ovo ne bi bilo moguće, na svim savjetima i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružile. Hvala i ostalim članicama Laboratorija za genotoksične agense; Anamariji, Andreji, Dragomiri, Lidiji, Tihani, Nikolini, Ljiljani i Ani koje su uvijek imale razumijevanja za mene. Bile ste sjajno društvo!*

*Velika hvala i Ana-Mariji Domijan na neiscrpoj pomoći u eksperimentalnom djelu i svim savjetima koje mi je dala, u bilo koje doba dana i noći!*

*Hvala Vedrani Vičić i Ivanu Pavičiću pri mikroskopskoj analizi i fotografiranju preparata te Domagoju Dinteru pri pomoći oko uređivanja doktorata.*

*Na kraju najveća hvala mojim roditeljima, mojoj cijeloj obitelji, prijateljima i onima koji me istinski vole... hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i razumijevanju koje ste mi pružili tijekom izrade ovoga doktorata bez čega sve ovo ne bi imalo smisla...*

*Ovaj doktorat posvećen je upravo vama!*





## UČINCI PČELINJEGA OTROVA I MELITINA NA STANIČNI ODGOVOR TUMORSKIH I NE-TUMORSKIH STANICA *IN VITRO*

GORAN GAJSKI

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Jedinica za mutagenezu,  
10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu je istražen potencijalni protutumorski učinak pčelinjega otrova i njegove glavne sastavnice melitina prema različitim tipovima tumorskih stanica i njihovim sublinijama otpornima na citostatike kao i njihov učinak prema normalnim ne-tumorskim stanicama. Nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom sve stanične linije pokazale su citotoksični učinak koji je bio ovisan o dozi. Nadalje, obrada pčelinjim otrovom i melitinom uzrokovala je značajne morfološke promjene i staničnu smrt uzrokovanu dominantno nekrozom. Nakon zajedničke obrade sa kemoterapeutikom cisplatinom, pčelinji otrov je pokazao aditivan učinak koji bi mogao biti koristan u vidu smanjivanja doze cisplatine za vrijeme kemoterapije. Također, pčelinji otrov i melitin uzrokovali su citotoksičnost i kod normalnih stanica uzrokujući smanjenje stanične vijabilnosti, morfološke promjene i oštećenja molekule DNA. Smanjenje glutationa i porast koncentracije malondialdehida, uz oksidativna oštećenja molekule DNA i porast aktivnosti fosfolipaze C, ukazuju da pčelinji otrov i melitin djeluju putem lipidne peroksidacije te da je oksidativni stres barem djelomično uključen u mehanizam djelovanja ovih spojeva. Iako toksičan kod svih ispitanih staničnih tipova, toksičnost pčelinjega otrova i melitina ovisna je o tipu stanica čineći tumorske stanice osjetljivijima na oba spoja naspram ne-tumorskih stanica. Ovisno o podrijetlu, stanice otporne na citostatike mogle bi biti osjetljivije na pčelinji otrov i melitin od svojih roditeljskih linija. Iako su se pokazali toksičnim kod svih ispitanih stanica, ovi rezultati idu u prilog upotrebe pčelinjega otrova i melitina u terapiji protiv tumora.

(173 stranice, 64 slike, 8 tablica, 345 literaturnih navoda, jezik izvornika-hrvatski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: pčelinji otrov, melitin, cisplatina, citogenotoksičnost, oksidativni stres, tumorske stanice, ne-tumorske stanice

Mentor: Prof. dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, znanstveni savjetnik

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, redovni profesor  
Prof. dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, znanstveni savjetnik  
Dr. sc. Maja Osmak, znanstveni savjetnik

Rad prihvaćen: 12.12.2012.



**EFFECTS OF BEE VENOM AND MELITTIN ON CELL RESPONSE OF  
TUMOR AND NON-TUMOR CELLS *IN VITRO***

GORAN GAJSKI

Institute for Medical Research and Occupational Health, Mutagenesis Unit,  
10000 Zagreb, Croatia

Possible anticancer ability of bee venom and its major component melittin towards different types of tumour cells and their drug resistant sublines as well as their impact on normal non-tumour cells was investigated. After the treatment with whole bee venom or melittin all the cell lines tested displayed dose dependent cytotoxicity. In addition, treatment with bee venom and melittin caused significant morphological changes and induced dominantly necrotic type of cell death. Following a combined treatment with chemotherapeutic drug cisplatin, bee venom exhibited additive effect what could be useful from the point of minimizing cisplatin concentration during chemotherapy. Bee venom and melittin were toxic to normal cells as well; causing lower cell viability, morphological cell alterations and DNA damage. Depletion of glutathione and increment in malondialdehyde concentration parallel with oxidative DNA damage and induction of phospholipase C activity, suggest that both bee venom and melittin act through lipid peroxidation and that oxidative stress is at least partly involved in their mode of action. Although toxic to all cell types tested, toxicity of bee venom and melittin was cell type dependent making tumour cells more sensitive to both, as compared to the non-tumour cells. Depending on the origin, drug resistant cells could be more sensitive to bee venom and melittin than parental cells. Although toxic to all the cell lines tested, our results speak in favour of application of bee venom and melittin in anticancer therapy.

(173 pages, 64 figures, 8 tables, 345 references, original in Croatian)

Thesis deposited in National and University Library, 10000 Zagreb, Croatia

Keywords: bee venom, melittin, cisplatin, cytogenotoxicity, oxidative stress, tumour cells, non-tumour cells

Supervisor: Prof. Dr. Sc. Vera Garaj-Vrhovac, scientific advisor

Reviewers: Prof. Dr. Sc. Nada Oršolić, profesor  
Prof. Dr. Sc. Vera Garaj-Vrhovac, scientific advisor  
Dr. Sc. Maja Osmak, scientific advisor

Thesis accepted: 12.12.2012.



<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Cilj istraživanja .....	3
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	5
2.1. Pčelinji otrov .....	5
2.2. Sastav pčelinjega otrova.....	7
2.2.1. Melitin .....	9
2.2.2. Apamin .....	11
2.2.3. Peptid koji degranulira mastocite.....	12
2.2.4. Ostali peptidi pčelinjega otrova .....	12
2.2.5. Fosfolipaza A <sub>2</sub> .....	12
2.2.6. Ostali enzimi pčelinjega otrova.....	13
2.3. Terapijska svojstva pčelinjega otrova .....	13
2.4. Protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova i njegovih sastavnica .....	16
2.4.1. Protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova.....	16
2.4.2. Protutumorsko djelovanje melitina .....	16
2.4.3. Protutumorsko djelovanje fosfolipaze A <sub>2</sub> .....	17
2.5. Mehanizmi protutumorskog djelovanja .....	18
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
3.1. Stanični modeli.....	21
3.1.1. Tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi.....	21
3.1.2. Ljudski limfociti periferne krvi .....	22
3.2. Pčelinji otrov i melitin.....	23
3.3. Ostale kemikalije i antitijela.....	23
3.4. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi. 24	
3.4.1. Određivanje preživljenja stanica u kulturi MTT testom .....	24
3.4.2. Određivanje morfoloških promjena stanica u kulturi i tipa stanične smrti .....	25
3.4.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina .....	25
3.4.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradford-u.....	26
3.4.5. Razdvajanje proteina SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu .....	26

3.4.6. Western blot metoda .....	27
3.5. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na ljudske limfocite iz periferne krvi.....	28
3.5.1. Određivanje preživljena limfocita fluorescencijskom mikroskopijom .....	28
3.5.2. Određivanje morfoloških promjena limfocita fazno-kontrastnom mikroskopijom	28
3.5.3. Određivanje tipa stanične smrti limfocita testom stanične difuzije .....	29
3.5.4. Određivanje kromosomskih oštećenja u limfocitima mikronukleus testom .....	30
3.5.5. Mjerenje količine oštećenja molekule DNA u limfocitima pomoću komet testa ..	31
3.5.5.1. Alkalni komet test .....	32
3.5.5.2. Fpg-modificirani komet test .....	32
3.5.5.3. Analiza preparata.....	33
3.5.6. Mjerenje oksidativnog stresa u limfocitima nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom .....	34
3.5.6.1. Određivanje koncentracije proteina prema Bradford-u.....	34
3.5.6.2. Određivanje koncentracije glutationa (GSH) .....	35
3.5.6.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA).....	37
3.5.7. Mjerenje aktivnosti enzima fosfolipaze C (PLC).....	39
3.6. Statistička obrada podataka .....	41
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>43</b>
4.1. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi.	43
4.1.1. Učinak pčelinjega otrova i melitina na preživljenje stanica.....	43
4.1.2. Učinak pčelinjega otrova i melitina na morfologiju stanica .....	50
4.1.3. Određivanje tipa stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom.....	51
4.1.4. Učinak pčelinjega otrova na djelovanje citostatika.....	65
4.1.4.1. Osjetljivost stanica na pčelinji otrov i njegovo djelovanje sa cisplatinom .....	65
4.2. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na ljudske limfocite iz periferne krvi.....	68
4.2.1. Učinak pčelinjega otrova i melitina na preživljenje limfocita .....	68
4.2.2. Učinak pčelinjega otrova i melitina na morfologiju stanica .....	71
4.2.3. Određivanje tipa stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom .....	72
4.2.4. Indukcija mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova .....	76
4.2.5. Učinak pčelinjega otrova i melitina na ukupna i oksidativna oštećenja molekule DNA .....	82

4.2.6. Učinak pčelinjega otrova i melitina na razinu glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA) kao pokazatelje oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije.....	91
4.2.7. Učinak melitina na aktivnosti enzima fosfolipaze C (PLC).....	103
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>105</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>123</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>125</b>
<b>8. POPIS KRATICA I NAZIVA</b> .....	<b>161</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>163</b>





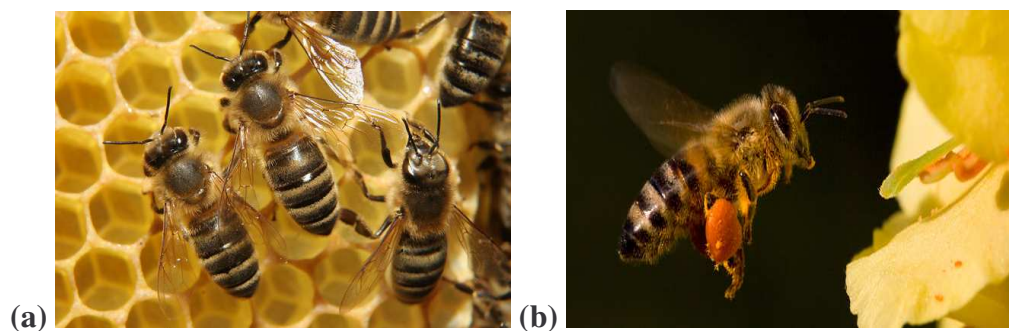
## 1. UVOD

Unatoč znatnom napretku moderne medicine, ljekoviti pripravci iz biljnih i životinjskih vrsta i dalje čine veliki doprinos zdravstvu u smislu prevencije i liječenja brojnih oboljenja (Harvey, 1988, 2000). Mnogi načini liječenja koji se posljednjih godina često primjenjuju u zapadnim zemljama dolaze iz Azije, a njihova popularnost sve više raste (Parekh i sur., 2009; Graziose i sur., 2010). Otrovi životinja, posebice kukaca, odavno se koriste u znanstvenim istraživanjima, a danas i kao osnova mnogih preparata i lijekova koji su od velike koristi u medicini (Da Rocha i sur., 2001; Lewis i Garcia, 2003; Amin i sur., 2009; Nobili i sur., 2009). Od brojnih prirodnih spojeva koji se koriste u orijentalnoj i alternativnoj medicini, otrovi izolirani iz mnogih organizama svoju primjenu imaju već dugi niz godina, a među njima najznačajniji je otrov iz pčela roda *Apis mellifera* (Chang i Bliven, 1979; Eiseman i sur., 1982; Lee i sur., 2005; Son i sur., 2007; Oršolić i sur., 2010; Oršolić, 2012). Veliki broj istraživanja govori o pozitivnim svojstvima pčelinjega otrova koja uključuju njegova radioprotektivna (Varanda and Tavares, 1998; Gajski i Garaj-Vrhovac, 2009), protumutagena (Varanda i sur., 1999) i protuupalna svojstva (Nam i sur., 2003; Lee i sur., 2001), a poznato je i njegovo blagotvorno djelovanje na bol (Kwon i sur., 2001a,b; Lee i sur., 2004; Baek i sur., 2006).

U posljednjih nekoliko desetljeća sve je više oboljelih od raka te njihova smrtnost postiže sve veće razmjere stvarajući na taj način golemi zdravstveni, ali i ekonomski problem. Sve veća pojavnost tumorskih oboljenja dovodi do potrebe stvaranja novih lijekova te novih strategija u liječenju ove bolesti. Upravo zbog toga, proučavanje tumora i istraživanje različitih mogućnosti njegova liječenja jedna je od glavnih zadaća suvremene znanosti (Stewart i Kleihues, 2003; Gotay, 2010). Nastojanja suvremene medicine i znanosti u pronalasku lijeka protiv ovakvih oboljenja nisu uspjela u potpunosti u svom naumu jer, iako danas propisane terapije u vidu kirurškog zahvata, radioterapije i kemoterapije pomažu bolesnicima u suzbijanju ove bolesti, rezultat je još uvijek poguban za mnoge oboljele. Upravo zbog toga u posljednjih nekoliko godina sve je veća upotreba alternativnih načina liječenja ovakvih oboljenja, a ona se većinom temelje na korištenju prirodnih spojeva biljnog i životinjskog porijekla u terapiji protiv tumora (Mehta i Pezzuto, 2002; Guilford i Pezzuto, 2008; Mehta i sur., 2010; Cherniack, 2011).

Otrovi iz različitih životinja, poput onih izoliranih iz zmija (Borkow i sur., 1992; Feofanov i sur., 2005; Yang i sur., 2005; Debnath i sur., 2007), pauka (Van Den Berg i sur., 2002; Nagaraju i sur., 2006; Gao i sur., 2007), škorpiona (Soroceanu i sur., 1998; Wang i Ji, 2005; Das Gupta i sur., 2007), morskih ježeva (Pettit i sur., 1981; Nishioka i sur., 2003) i koralja (Schweitz i sur., 1985; Meunier i sur., 2000; Soletti i sur., 2008), posjeduju mogućnost ubijanja tumorskih stanica. Suvremena medicinska znanost posljednjih godina pridaje sve veće značenje i pčelinjim proizvodima, a posebice pčelinjem otrovu koji se koristi u različite medicinske svrhe (Son i sur., 2007; Cherniack, 2010; Oršolić, 2012). Upotreba pčelinjih proizvoda u sprječavanju nastanka bolesti i njihova liječenja, iskazana je pojmom apiterapija. Upotreba prirodnih proizvoda i njihovih aktivnih sastavnica u prevenciji i obradi kroničnih bolesti zasnovana je na iskustvu prvenstveno tradicionalnog sustava medicinske prakse u različitim etničkim zajednicama kao i epidemiološkim opažanjima odnosa između načina prehrane i bolesti (Radić, 2005; Oršolić, 2009a; Cherniack, 2010).

Interes za ljekovita svojstva pčelinjih proizvoda kao i protutumorski učinak istih, porastao je u zadnjih 30 godina gdje se suvremenim metodama istražuje sastav pčelinjih proizvoda zbog biološke učinkovitosti na organizam, koja je poznata već tisućljećima. Danas je poznato više od 20000 vrsta pčela u svijetu (Slika 1), a interes ljudi uvelike je vezan za medicinska svojstva pčelinjih proizvoda poput meda, pčelinjega voska, propolisa, peludi, matične mliječi te samog pčelinjega otrova (Radić, 2005; Salcido, 2008). U posljednjih nekoliko godina sve je više istraživanja koje govore o protutumorskim svojstvima pčelinjega otrova i njegovih sastavnica. Uza sve to, novija istraživanja upućuju i na nekoliko mehanizama toksičnosti ovoga prirodnog spoja na mnogim tumorskim staničnim linijama koji uključuju promjene u staničnom ciklusu, učinak na staničnu proliferaciju i preživljenje te na indukciju stanične smrti u vidu apoptoze i nekroze (Liu i sur., 2002; Jang i sur., 2003; Nam i sur., 2003; Oršolić i Bašić, 2003; Oršolić i sur., 2003; Chen i sur., 2004; Hu i sur., 2006; Moon i sur., 2006; Putz i sur., 2006; Chu i sur., 2007; Lee i sur., 2007; Ip i sur., 2008a, b; Liu i sur., 2008; Moon i sur., 2008; Tu i sur., 2008; Oršolić, 2009b; Oršolić i sur., 2009; Wang i sur., 2009; Cho i sur., 2010; Huh i sur., 2010; Park i sur., 2010, 2011; Ip i sur., 2012; Jo i sur., 2012; Oršolić, 2012).



**Slika 1.** Europska pčela *Apis mellifera*. Pčele na prirodno izgrađenom saču (a) i pčela u trenutku sakupljanja cvjetnog nektara (b) (slike preuzete sa internetske stranice <http://www.naturephoto-cz.eu>).

### 1.1. Cilj istraživanja

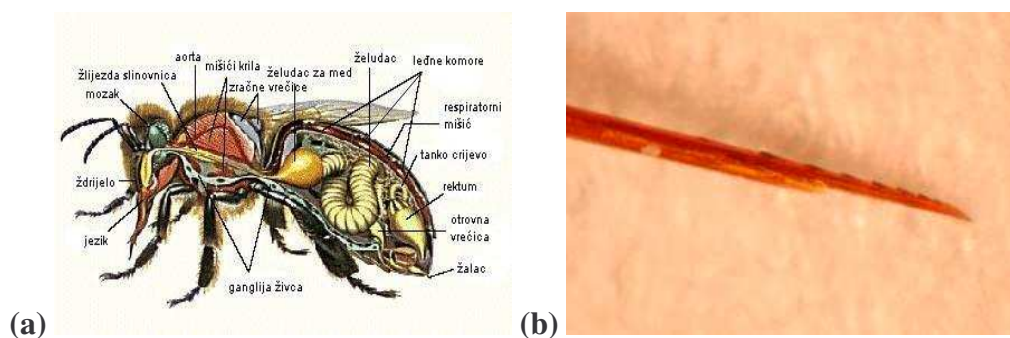
Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalno protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova i njegove glavne sastavnice melitina na nizu tumorskih staničnih linija i njihovim sublinijama otpornima na citostatike u svrhu određivanja djelovanja pčelinjega otrova u kombinaciji sa citostaticima te određene mehanizme kojima ovaj kompleksan spoj djeluje na stanice. Osim djelovanja pčelinjega otrova i melitina na tumorskim staničnim linijama, ispitan je i njegov učinak kod normalnih ne-tumorskih stanica u svrhu određivanja potencijalno štetnog djelovanja ovoga spoja na normalne stanice. U pokusima će se koristiti roditeljske stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEp-2 te njihove sublinije stabilno otporne na cisplatinu HeLa CK i CK2, zatim stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620, adenokarcinoma dojke MCF-7 te ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef. Osim staničnih linija u kulturi, u pokusima će se koristiti i ljudski limfociti iz periferne krvi kao vrlo osjetljivi biomarkeri oštećenja. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na staničnoj razini ispitivat će se citogenetičkim i molekularno biološkim metodama u svrhu dobivanja podataka vezanih za citotoksičnost i genotoksičnost ovih spojeva te u svrhu dobivanja podataka o tipu stanične smrti koju uzrokuju. Dobiveni odgovori poslužit će za bolje razumijevanje mehanizama uključenih u stanični odgovor uzrokovan obradom pčelinjim otrovom i melitinom te razjasniti potencijalnu mogućnost upotrebe ovog kompleksnog spoja u terapijske svrhe.



## 2. LITERATURNI PREGLED

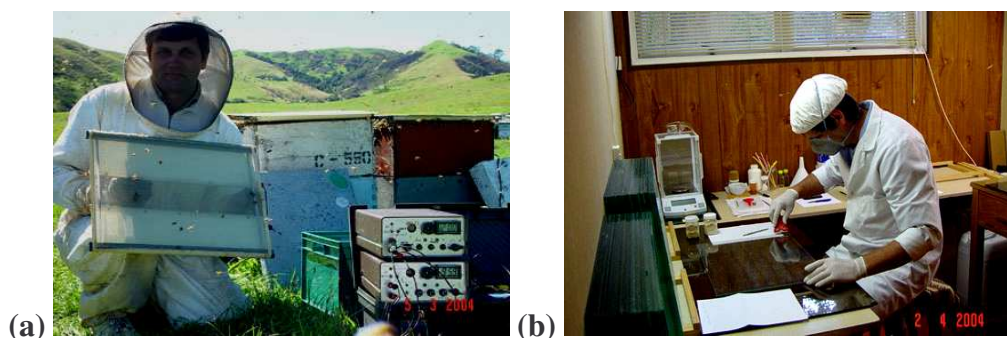
### 2.1. Pčelinji otrov

Pčelinji otrov je izlučevina žalčanog sustava pčela radilica koji pčelama služi za obranu pčelinje zajednice od neprijatelja te kao upozorenje na opasnost od napasnika. Pretpostavlja se da pri pčelinjem ubodu lako hlapljivi dio otrova koji ispari, služi kao svojevrsni alarm ostalim pčelama na prisutnost neprijatelja. Žalčani sustav pčela radilica, u kojem se nalazi sam otrov, smješten je u zatku pčela koji je sa jedne strane povezan sa otrovnom žlijezdom koja izlučuje otrov, dok je sa druge strane povezan malim kanalom koji vodi do žalca (Slika 2). Otrovnost žlijezda proizvodi otrov koji se ulijeva u spremnik. Nekoliko tjedana nakon metamorfoze pčela nosi najviše otrova u spremniku. Dok leti i sakuplja nektar količina otrova se postupno smanjuje. Pri ubodu pčele iniciraju 50  $\mu\text{g}$  do 140  $\mu\text{g}$  otrova. Žalac pčela se sastoji od dvije paralelne iglice koje imaju kukice za dublji prodor i dobro zahvaćanje. Kroz taj prostor se kroz kanal ispušta otrov. Sam žalac smješten je u abdomenu i kukac ga ispušta kad namjerava ubosti. Nakon uboda, zbog građe žalca, pčele nisu u mogućnosti izvaditi ga te žalac zajedno s žalčanim sustavom i otrovnom žlijezdom ostaje u koži kralješnjaka. Mišići koji tu strukturu drže tada pucaju i pčela ugiba (Mebs, 2002; Srebočan i Srebočan, 2002; Radić, 2005; Schmidt i Buchmann, 2005; Plavšić i Žuntar, 2006; Chen i Lariviere, 2010).



**Slika 2.** Građa pčele *Apis mellifera* (a) i žalac pčele iz kojeg ispušta otrov (b). Pčelinji žalac je lagano nazubljen. Trut nema žalac za razliku od matice i radilice. Žalac pčelama služi za obranu od prirodnih neprijatelja. Žalac se nalazi u stražnjem dijelu pčelinjega tijela (slike preuzete sa internetskih stranica <http://www.opg-cegrlj.hr> i <http://gorazdemedina.com>).

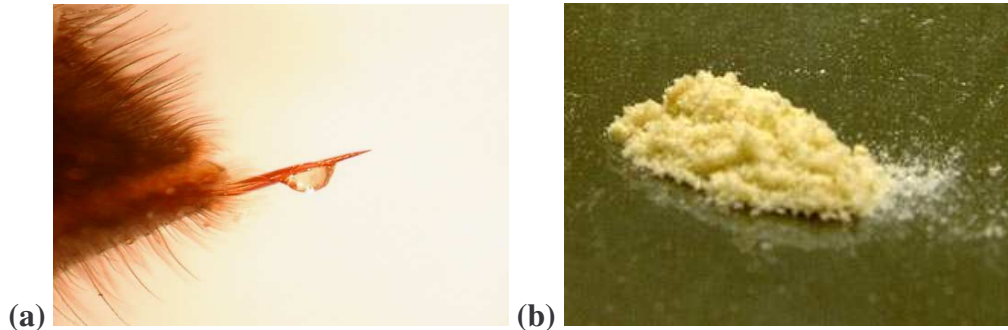
Pčelinji otrov kod sisavaca izaziva toksične učinke u cijelom organizmu, a posebno na srčano-žilnom i živčanom sustavu. Zbog svojeg raznovrsnog sastava otrov ima vrlo raznoliko djelovanje na više organa. Po svom učinku pčelinji otrov vrlo je sličan otrovu zmija, no količina otrova koja se ispušta pri ubodu pčela mnogo je manja od one prilikom ugriza zmija. Ubod pčelinjega otrova kod životinja izaziva raspadanje krvnih stanica, smanjuje sposobnost zgrušavanja krvi te povećava propusnost krvnih žila što se očituje otokom i krvarenjem u unutarnjim organima. Kod ljudi pčelinji otrov izaziva upalnu reakciju koja se očituje pojavom otoka, crvenilom i boli na mjestu uboda. Najopasniji su ubodi u usnu šupljinu, jezik ili očnu jabučicu. Velika količina pčelinjega otrova može djelovati i smrtonosno, a smrt nastaje uslijed bronhijalnog grča kao posljedica paralize centra mozga zaslužnog za disanje. Pčelinji otrov u organizmu izaziva reakciju imunološkog sustava koja kod preosjetljivih osoba može izazvati i alergijske reakcije koje mogu biti vrlo opasne te također izazvati smrt (Srebočan i Srebočan, 2002; Radić, 2005; Przybilla i Ruëff, 2010; Brown i Tankersley, 2011; Rajendiran i sur., 2012).



**Slika 3.** Sakupljanje pčelinjega otrova uz pomoć uređaja koji je sastavljen od staklene ploče ispod koje se nalaze žice pod naponom struje. Uređaj se postavlja na ulazu u košnicu. Pod utjecajem strujnog napona, pčele luče otrov ubodom na stakalce s kojega se nakon sušenja otrov struže (slike preuzete sa internetske stranice <https://secure.entertainz.co.nz>).

U znanstvene svrhe pčelinji otrov se sakuplja sa posebnim uređajem koji je sastavljen od staklene ploče ispod koje se nalaze žice pod niskim naponom struje od 18 V do 22 V (Slika 3). Taj se uređaj postavlja na ulazu u košnicu. Pod utjecajem strujnog napona, iziritirane pčele luče svoj otrov ubodom na stakalce s kojega se nakon sušenja otrov struže. Pčelinji otrov gusta je tekućina karakterističnog mirisa nalik na med i gorko kiselog okusa. Liofilizirani otrov, odnosno otrov koji je osušen bez tekuće faze, je lako hlapljivi, svijetlosivi do sivkasto žuti prah (Slika 4). Kao takav, pčelinji otrov čuva se u hermetički zatvorenim

posudama na – 20 °C prema preporuci proizvođača (Eskridge i sur., 1981; Škenderov i Ivanov, 1986; Srebočan i Srebočan, 2002; Radić, 2005).

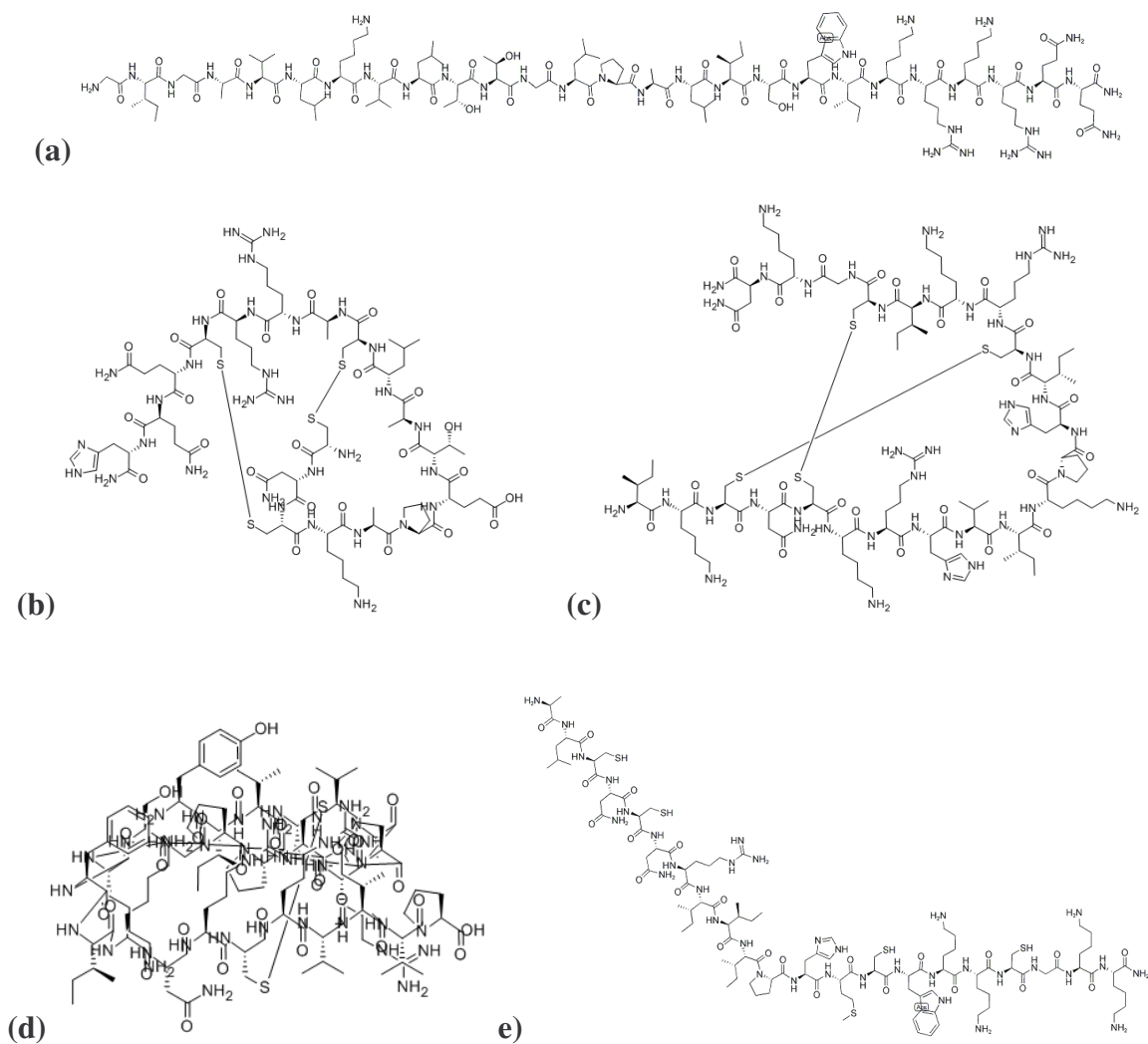


**Slika 4.** Pčelinji otrov u tekućem obliku (a) i liofilizirani pčelinji otrov (b) (slike preuzete sa internetskih stranica <http://www.leominsterbeeman.com> i <http://www.supplierlist.com>)

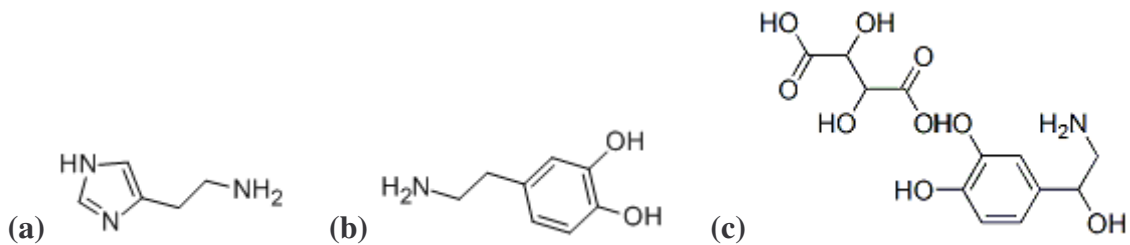
## 2.2. Sastav pčelinjega otrova

Glavna sastavnica pčelinjega otrova je voda koja čini oko 88% otrova u cjelini. Ostali suhi dio pčelinjega otrova sačinjavaju peptidi melitin, apamin, sekapin, prokamin A i B, adolapin, terciapin te peptid koji degranulira mastocite (Slika 5). Dominantni enzimi u pčelinjem otrovu su fosfolipaza A<sub>2</sub> te u manjem omjeru fosfolipaza B, hijaluronidaza, kisela fosfomonoesteraza, lizofosfolipaza te  $\alpha$ -glukozidaza. Pčelinji otrov također se sastoji od nekoliko fiziološki aktivnih amina i neuroprijenosnika (histamin, dopamin, noradrenalin; Slika 6), šećera glukoze i fruktoze, fosfolipida, aminokiselina (aminomaslačne kiseline i aminoizomaslačne kiseline) te veće količine mineralnih tvari (Tablica 1). Gotovo sve ove sastavnice, koje su sadržane u pčelinjem otrovu u određenoj mjeri, imaju učinke na brojne stanične sustave. Tri najzastupljenije peptidne komponente pčelinjega otrova su melitin, apamin i peptid koji degranulira mastocite (Neuman i Haberman, 1954; Haberman, 1971, 1972; Gauldie i sur., 1976, 1978; Shipolini, 1984; Banks i Shipolini, 1986; Hider, 1988; Palma, 2006; Son i sur., 2007; Chen i Lariviere, 2010).





**Slika 5.** Strukture nekih od glavnih peptidnih sastavnica iz pčelinjega otrova: melitin (a), apamin (b), peptid koji degranulira mastocite (c), sekapin (d) i terciapin (e) (slike preuzete sa internetske stranice <http://www.chemicalbook.com>).



**Slika 6.** Struktura fiziološki aktivnih amina iz pčelinjega otrova: histamin (a), dopamin (b) i noradrenalin (c) (slike preuzete sa internetske stranice <http://www.chemicalbook.com>).

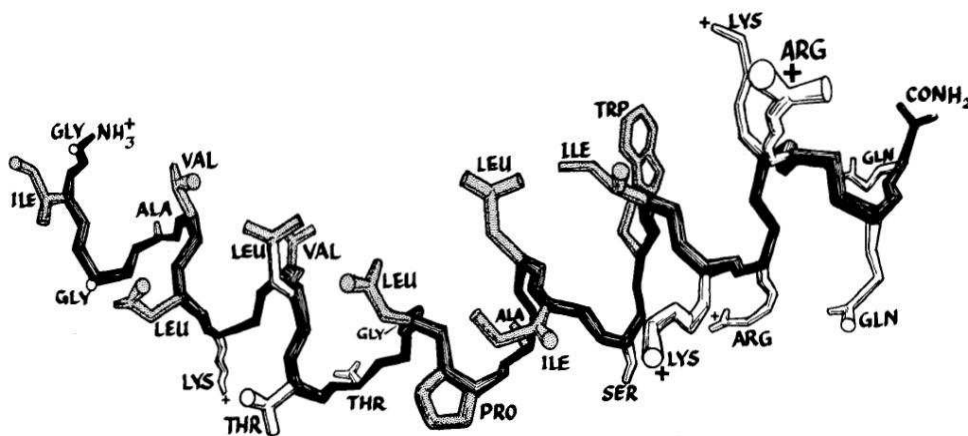
**Tablica 1.** Analiza sastava pčelinjega otrova izražena kao postotak suhe tvari pčelinjega otrova nakon sušenja u kojem voda čini 88% od ukupnog sastava izoliranog pčelinjega otrova (Shipolini, 1984\*; Dotimas i Hider, 1987\*\*).

Vrsta molekula	Sastavnica	Suha tvar pčelinjega otrova (%)*	Suha tvar pčelinjega otrova (%)**
<b>Enzimi</b>	Fosfolipaza A <sub>2</sub>	10,0 – 12,0	10,0 – 12,0
	Hijaluronidaza	1,5 – 2,0	1,0 – 3,0
	Kisela fosfomonoesteraza	1,0	
	Lizofosfolipaza	1,0	
	α-glukozidaza	0,6	
<b>Ostali proteini i peptidi</b>	Melitin	40,0 – 50,0	50,0
	Apamin	3,0	1,0 – 3,0
	MCD peptid	2,0	1,0 – 2,0
	Sekapin	0,5	0,5 – 2,0
	Prokamin	1,4	1,0 – 2,0
	Adolapin	1,0	
	Inhibitori proteaza	0,8	
	Terciapin	0,1	0,1
	Mali peptidi (< od 5 amino kiselina)		13,0 – 15,0
<b>Fiziološki aktivni amini</b>	Histamin	0,6 – 1,6	0,5 – 2,0
	Dopamin	0,13 – 1,0	0,2 – 1,0
	Noradrenalin	0,1 – 0,7	0,1 – 0,5
<b>Aminokiseline</b>	t-aminobutrična kiselina	0,4	0,5
	α-aminokiseline		1,0
<b>Šećeri</b>	Glukoza i fruktoza		2,0
<b>Fosfolipidi</b>			5,0
<b>Hlapljive komponente</b>			4,0 – 8,0

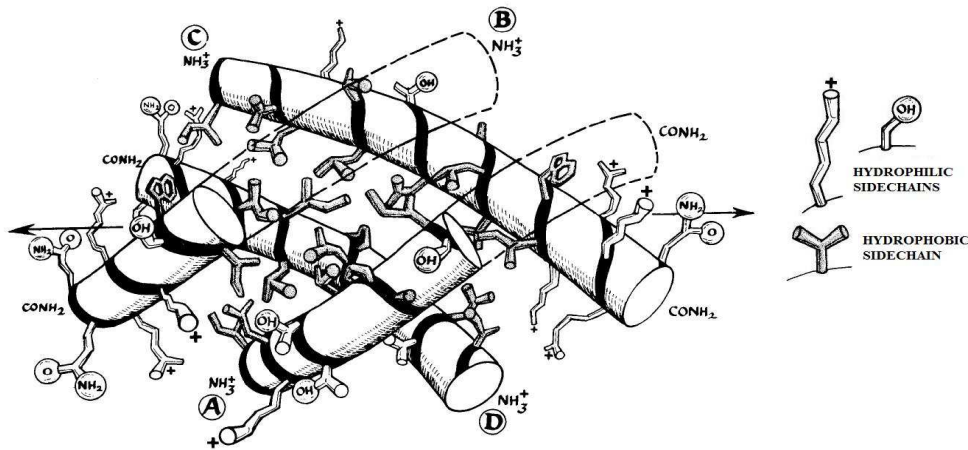
### 2.2.1. Melitin

Melitin je glavna sastavnica pčelinjega otrova te glavni toksin koji sačinjava oko 50% suhe tvari samoga otrova. Melitin je bazični peptid formule C<sub>131</sub>H<sub>228</sub>N<sub>38</sub>O<sub>32</sub> koji se sastoji od 26 aminokiselina poznatog slijeda, a težina mu iznosi 2847,5 Da. Njegov aminokiselinski slijed je Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln (Terwilliger i Eisenberg, 1982a,b; Terwilliger i sur., 1982). Taj peptid je amfoterna molekula zbog specifičnog rasporeda aminokiselina u lancu. Na

N-terminalnom kraju (položaji od 1 do 20) nalaze se nepolarne, hidrofobne i neutralne aminokiseline, dok se na C-terminalnom kraju (položaji od 21 do 26) nalaze hidrofilne i bazične aminokiseline (Slika 7). Ovakav raspored aminokiselina melitinu daje amfipatska svojstva. Melitin je prirodni detergent, visoke površinske i membranske napetosti. Iako se kao monomer ili tetramer otapa u vodi, ovaj peptid se lako ugrađuje u membrane tvoreći tetramerne agregate kao pore za ione te na taj način dovodi do poremećaja u strukturi fosfolipidnog dvosloja. Melitinski tetrameri uzrokuju depolarizaciju živčanih završetaka te na taj način uzrokuju bol (Lauterwein i sur., 1979; Brown i sur., 1980; Lauterwein i sur., 1980; Lavielle i sur., 1980; Gevod i Birdi, 1984; Bechinger i Lohner, 2006). Melitin također pojačava djelovanje fosfolipaze  $A_2$  te i na taj način također djeluje na stanice (Lad i Shier, 1979; Shier, 1979). Svaki melitinski lanac sastoji se od dvije  $\alpha$ -zavojnice te u konačnici ima oblik savijenog štapa (Slika 8). Melitin je tetramer u koncentraciji u kojoj se nalazi u vrećici s otrovom kod pčela, dok se kao monomer javlja u minimalnoj koncentraciji potrebnoj za lizu stanice (Terwilliger i Eisenberg, 1982a,b; Terwilliger i sur., 1982; Ladokhin i White, 1999). Ove strukturne karakteristike melitina bi mogle imati važnu ulogu u njegovoj citotoksičnosti.



**Slika 7.** Konformacija jednog melitinskog lanca iz tetramera. Svaki lanac melitina sastoji se od dvije  $\alpha$ -zavojnice koje sadrže 26 aminokiselinskih ostataka (slika preuzeta iz rada Terwilliger i Eisenberg, 1982.)



**Slika 8.** Trodimenzionalna struktura tetramernog melitina (slika preuzeta iz rada Terwilliger i Eisenberg, 1982.)

Do danas je pokazano da je melitin toksičan za stanice hematopoetskog sustava koji uključuje limfocite, timocite te eritrocite, a uočena je i njegova toksičnost prema crijevnim stanicama (Tosteson i sur., 1985; Watala i Kowalczyk, 1990; Shaposhnikova i sur., 1997; Pratt i sur., 2005; Maher i McClean, 2006; Lee i sur., 2007). Nadalje, melitin reagira i sa brojnim metaboličkim funkcijama stanice na način da remeti plazmatsku membranu te uzrokuje promjene u enzimskom sustavu, dok se njegova litička aktivnost dovodi u vezu sa mogućnošću ugradnje u fosfolipidni dvosloj staničnih membrana (Vogel, 1981; Fletcher i Jiang, 1993; Raghuraman i Chattopadhyay, 2007).

### 2.2.2. Apamin

Apamin kao najmanji neurotoksin pčelinjega otrova bazični je peptid formule  $C_{79}H_{131}N_{31}O_{24}S_4$  koji se sastoji od 18 aminokiselina s dva disulfidna mosta što čini strukturu vrlo čvrstom, a težina mu iznosi 2027,3 Da. Njegov aminokiselinski slijed je Cys-Asn-Cys-Lys-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Cys-Ala-Arg-Arg-Cys-Gln-Gln-His (Haux i sur., 1967; Hartter, 1980; Hider i Ragnarsson, 1980; Wemmer i Kallembach, 1982; Habermann, 1984). Ovaj peptid uzrokuje neurotoksični učinak u leđnoj moždini sisavaca te dovodi do hiperaktivnosti i grčenja mišića. Također, apamin je specifičan blokator kalijevih kanala ovisnih o kalciju (Habermann, 1977; Banks i sur., 1979; Strong, 1990).

### 2.2.3. Peptid koji degranulira mastocite

Peptid koji degranulira mastocite bazični je peptid od 22 aminokiseline formule  $C_{110}H_{192}N_{40}O_{24}S_4$  koji sadrži dva disulfidna mosta, a težina mu iznosi 2587,22 Da. Njegov aminokiselinski slijed je Ile-Lys-Cys-Asn-Cys-Lys-Arg-His-Val-Ile-Lys-Pro-His-Ile-Cys-Arg-Lys-Ile-Cys-Gly-Lys-Asn (Haux i sur., 1969; Hartter i Weber, 1975; Hartter, 1976, 1977; Dotimas i sur., 1987; Buku i sur., 2004). Osnovna uloga mu je oslobađanje histamina iz mastocita te inhibicija kalijevih kanala. Također, upravo ovaj peptid zaslužan je za oticanje i bol nakon uboda te za alergijsku reakciju (Martin i Hartter, 1980; Ziai i sur., 1990; Sutton i Gould, 1993; Buku, 1999; Buku i sur., 2001).

### 2.2.4. Ostali peptidi pčelinjega otrova

Ostali peptidi koje nalazimo u pčelinjem otrovu sadržani su u malom postotku i njihova funkcija nije nam toliko poznata (Chen i Lariviere, 2010). Adolapin čini oko 1% ukupnog pčelinjega otrova te je zabilježen njegov protuupalni i analgetski učinak (Shkenderov i Koburova, 1982; Koburova i sur., 1985). Sekapin čini oko 0,5% ukupnog pčelinjega otrova i sastoji se od 21 aminokiseline visokog prolinskog sastava sa jednim disulfidnim mostom (Dotimas i sur., 1987; Palma, 2006). Terciapin čini oko 0,1% ukupnog otrova i sastoji se također od 21 aminokiseline sa jednim disulfidnim mostom (Miroshnikov i sur., 1983; Palma, 2006).

### 2.2.5. Fosfolipaza A<sub>2</sub>

Fosfolipaza A<sub>2</sub> je najvažniji enzim u pčelinjem otrovu koji sačinjava oko 10% suhe tvari samoga otrova. Ovaj enzim katalizira hidrolizu fosfolipida, oslobađajući na taj način nezasićene masne kiseline te katalizira nastanak lipofosfoglicerida. Fosfolipaza A<sub>2</sub>, kao i njezini proizvodi hidrolize, lipofosfogliceridi (lizolecitin), djeluju također na biološke membrane. Taj enzim u kombinaciji sa melitinom uzrokuje lizu stanične membrane (hemoliza eritrocita). Nezasićene masne kiseline, proizvodi hidrolize tog enzima, preteča su za sintezu upalnih medijatora (leukotriena i prostaglandina). Osim toga, ovaj je enzim najvažniji alergen otrova pčela (Shipolini i sur., 1971; Denis i sur., 1992; Holander i sur., 1993; Dennis, 1994; Ashagbley i sur., 1996; Nicolas i sur., 1997; Six i Dennis, 2000; Valentin i Lambeau, 2000; Valencia Zavalla i sur., 2007).

### 2.2.6. Ostali enzimi pčelinjega otrova

U manjem postotku u pčelinjem otrovu nalazimo još i fosfolipazu B koja hidrolizira lipofosfogliceride (Doery i Pearson, 1964; Haberman, 1972). Enzim hijaluronidaza depolimerizira mukopolisaharide hijaluronske kiseline koji su važni sastojci vezivnog tkiva, a na taj se način ujedno stvaraju i otvori za ulazak otrova (Hider, 1988; Kreil, 1995; King i Spangfort, 2000; Chen i Lariviere, 2010).

### 2.3. Terapijska svojstva pčelinjega otrova

Korijeni apiterapije postavljeni su prije 6000 godina u staro egipatskoj medicini (Slika 9). Stari Grci i Rimljani također su se služili brojnim pčelinjim proizvodima u medicinske svrhe. Prvi pisani zapisi o korištenju pčelinjega otrova kao ljekovitog sredstva nađeni su u starim zapisima Hipokrata, Aristotela, Plinija i Galena. U 19. stoljeću u ruskim i austrijskim medicinskim časopisima opisuje se liječenje bolnih zglobova, reumatizma, neuralgija i srčanih bolova ubodima pčela (Karpozilos i Pavlidis, 2004; Radić, 2005; Hellner i sur., 2008; Salcido, 2008). U narodnoj medicini, a posebice u orijentalnoj medicini, pčelinji otrov se koristi kao reumatik, za ublažavanje bolova, sniženje krvnog tlaka i kolesterola u krvi. Nadalje, pčelinji otrov koristio se protiv zaraznih bolesti, u liječenju raznih upala živaca i akutnih upala krvnih žila, za poboljšavanje općeg tonusa, a nerijetko i za opću otpornost organizma (Mizrahi i Lensky, 1997; Yoish, 2001). Najstariji, odnosno u pučkoj medicini i jedini mogući postupak liječenja pčelinjim otrovom, odnosio se na ubode pčela u oboljela mjesta. Orijentalna medicina, osim direktnog uboda pčela, koristila je i metodu liječenja upalnih bolesti te kroničnih bolnih stanja ubodima pčela u akupunkturne točke koja se naziva apipunktura. Nakon razvijanja postupka dobivanja izoliranog pčelinjega otrova, terapijski postupak se provodi potkožnim ubrizgavanjem otrova injekcijom u oboljela mjesta ili u akupunkturne točke (Radić, 2005; Son i sur., 2007; Hellner i sur., 2008).



**Slika 9.** Prikaz pčele u hramu u Karnaku. „Kad sunce zaplače po drugi put, i kada voda klizne iz njegovih očiju, suze će se pretvoriti u pčele“ (iz egipatskih Magičnih tekstova). Egipćani su vjerovali da su pčele sunčevog podrijetla i da su rođene iz suza boga sunca Ra koje su padale na zemlju. Faraon Donjeg Egipta nosio je titulu Vladar pčela. (slika preuzeta sa internetske stranice <http://www.flickr.com>).

Veliki broj radova opisuje brojne primjene pčelinjega otrova u terapijske svrhe od kojih njegove razne sastavnice pokazuju široki spektar različitih djelovanja. Do danas su zabilježena različita svojstva pčelinjega otrova poput onog da pčelinji otrov posjeduje mogućnost mijenjanja funkcije imunološkog sustava te povećavanja proizvodnje kortizola (Vick i sur., 1972). Pčelinji otrov u organizmu izaziva reakciju imunološkog sustava. Kod preosjetljivih osoba ubodi pčela izazivaju alergijske reakcije koje mogu biti opasne po zdravlje te na kraju završiti i smrću. Tada organizam reagira stvaranjem antitijela imunoglobulina E (IgE) praćenog jakom alergijskom reakcijom. Nasuprot, mnogi pčelari postaju otporni na ubode pčela, a što je njihovo izlaganje ubodima duže, bol, otoci i crvenilo na mjestu uboda znatno su manje izraženi. Otpornost pčelara temelji se na stvaranju antitijela imunoglobulina G (IgG) koji sprečava toksično djelovanje pčelinjega otrova. Zadržavanje takvog imuniteta postiže se opetovanim unosom otrova u organizam (Radić, 2005). Sposobnost pčelinjega otrova da djeluje blagotvorno u liječenju artritisa i reume zasniva se upravo na stimulaciji i povećanju proizvodnje kortizola u tijelu koje za pojavu ima i

protuupalni učinak (Vick i Shipman, 1972). Brojna istraživanja potvrdila su mehanizme kojima pčelinji otrov i njegove sastavnice djeluju protuupalno i blagotvorno na artritis. Snižavanje ekspresije ciklooksigenaze 2 (COX-2) i fosfolipaze A<sub>2</sub> te snižavanje razine faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), dušikovog oksida i slobodnih kisikovih radikala (ROS) jedni su od mehanizama kojima melitin, kao glavna sastavnica pčelinjega otrova, djeluje blagotvorno na artritis (Murakami i sur., 1997; Pelletier i sur., 1998; Amin i sur., 1999; Yang i sur., 1999; Cernanec i sur., 2002). Adolapin također posjeduje protuupalno svojstvo koje se ispoljava njegovom sposobnošću inhibicije sinteze prostaglandina preko inhibicije ciklooksigenaze (Skhenderov i Koburova, 1982; Koburova i sur., 1985). Apamin, kao specifičan blokator kalijevih kanala ovisnih o kalciju, posjeduje mogućnost sprečavanja upale dišnih putova uslijed alergijske reakcije (Ichinose i sur., 1995). Peptid koji degranulira mastocite također posjeduje i antialergijsko djelovanje inhibicijom oslobađanja histamina iz mastocita koje je ovisno o njegovoj dozi (Buku i sur., 2001). Nedavno je otkriveno da melitin inhibira DNA vezujuću aktivnost NF- $\kappa$ B, koji je kritični transkripcijski faktor u regulaciji upalne genske ekspresije, inhibirajući na taj način i fosforilaciju I $\kappa$ B što je ključna uloga za razumijevanje mehanizma protuupalnog i blagotvornog djelovanja pčelinjega otrova i njegove glavne sastavnice melitina u borbi protiv artritisa (Park i sur., 2004, 2007). Nadalje, poznato je da pčelinji otrov djeluje i na ublažavanje boli te se kao takav također koristi u tradicionalnoj medicini. Pčelinji otrov sastoji se od nekoliko biogenih amina kao što su histamin, serotonin i epinefrin koji olakšavaju živčani prijenos i cijeljenje kod brojnih živčanih poremećaja. To daje mogućnost pčelinjem otrovu da putuje uzduž živčanih putova do oštećenih dijelova na koje djeluje blagotvorno i pomaže u njihovom popravku (Banks i sur., 1979; Shuba i Vladimirova, 1980). Stimulacija akupunkturnih točaka također ima veliku ulogu u liječenju brojnih tegoba i bolova pomoću pčelinjega otrova. Na taj način liječe se problemi poput bolova u unutarnjim organima te bolova nastalih uslijed hiperplazije i degenerativnog artritisa. Brojni mehanizmi su uključeni u ublažavanje bolova pčelinjim otrovom poput aktivacije opioidnih receptora i  $\alpha$ 2-adrenergičnih receptora te aktivacije serotoninских putova. Inhibicija c-Fos ekspresije u leđnoj moždini putem akupunkture pčelinjim otrovom također je jedan od predloženih mehanizama za ublažavanje bolova pčelinjim otrovom (Kwon i sur., 2001b; ; Lee i sur., 2001; Kim i sur., 2003, 2005; Kwon i sur., 2005; Baek i sur., 2006; Roh i sur., 2006).



## 2.4. Protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova i njegovih sastavnica

### 2.4.1. Protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova

Danas se sve više istražuje i protutumorski učinak pčelinjega otrova. Protutumorski učinak se pripisuje melitinu, bazičnom polipeptidu koji čini oko 50% suhe tvari pčelinjega otrova. Među prvima koji je zabilježio učinak pčelinjega otrova na tumorskim stanicama bio je Havas (1950). Nakon njega, Mufson i suradnici (1979) zabilježili su da melitin može proći kroz fosfolipidni dvosloj te na taj način ispoliti svoju aktivnost. Veza između melitina i stanične membrane rezultirala je poremećajem acilnih grupa fosfolipida, povećanjem osjetljivosti fosfolipida na hidrolizu fosfolipazom te povećanjem sinteze prostaglandina iz arahidonične kiseline koja se otpušta iz fosfolipida. McDonalds i suradnici (1979) također su ispitivali protutumorsko svojstvo pčelinjega otrova u istraživanju o smrtnosti u kojem je sudjelovalo 580 pčelara. Pčelari su identificirani prema osmrtnicama koje su bile publicirane u tri različita časopisa američke pčelarske industrije u razdoblju između 1949. i 1978. godine. Putem osmrtnica je ustanovljen uzrok smrti među pčelarima te je odnos uzroka smrti uspoređen sa uzrocima smrti tadašnje opće populacije Amerikanaca. Istraživanje je pokazalo da je učestalost smrtnosti od tumora u pčelara, koji su profesionalno bili izloženi pčelinjem otrovu tijekom svog radnog vijeka, nešto manja nego kod ostatka populacije, dok je smrtnost od raka pluća bila značajno niža naprama ostatku ne izložene populacije. Smrtnost od ostalih bolesti bila je jednaka ostatku opće populacije. Ovi rezultati bili su među prvima koji su ukazivali na moguće protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova. Nakon toga veliki broj istraživanja je pokazao protutumorsko svojstvo pčelinjega otrova, a posebice njegove glavne sastavnice melitina.

### 2.4.2. Protutumorsko djelovanje melitina

Hait i suradnici (1985) prvi su pokazali inhibirajući učinak melitina u uvjetima *in vitro*. Pokazali su da melitin, kao inhibitor kalmodulina, može inhibirati rast i klonogenu sposobnost ljudskih stanica leukemije. Lee i Hait (1985) također su uočili inhibitorski učinak melitina na rast stanica astrocitoma C6. Lazo i suradnici (1985) uočili su sličan mehanizam djelovanja melitina kao inhibitora kalmodulina na stanicama leukemije L1210. Također su uočili da melitin pojačava toksičnost bleomicina u ljudskim granulocitnim makrofagima i matičnim eritroidnim staničnim kolonijama (Lazo i sur., 1986). Hait i Lee (1985) su uočili da

je citotoksični učinak melitina proporcionalan antagonističkom učinku kalmodulina. Ova istraživanja podupiru farmakološku ulogu kalmodulina kao potencijalni unutarstanični cilj antiproliferacijskog djelovanja melitina.

Nadalje, Killion i Dunn (1986) pokazali su da su stanice leukemije 1210 osjetljivije na djelovanje melitina od normalnih mišjih stanica slezene DBA/2 i stanica koštane srži. Razlog tomu je što stanice koštane srži imaju brojna vezujuća mjesta na membrani za ugljikohidrate, a ta mjesta nestaju u odraslim stanicama slezene, dok ih gotovo i nema nakon neoplastične promjene što bi moglo učiniti stanice tumora osjetljivijima na melitin. Zhu i suradnici (1991) su uočili da melitin ne sprečava rast normalnih stanica u koncentraciji u kojoj sprečava proliferaciju tumorskih stanica kao što su stanice plućnog tumora. Ovakve razlike u staničnom odgovoru ukazuju na različite aktivacije signalnih putova između normalnih i tumorskih stanica. Melitin se pokazao posebno djelotvoran kod onih stanica u kulturi koje eksprimiraju visoku razinu ras onkogen (Sharma, 1992). Melitin također pojačava aktivaciju fosfolipaze  $A_2$  u ras onkogen transformiranim stanicama što rezultira njegovim selektivnim uništavanjem takvih stanica. Ovi rezultati ukazuju da bi pojačana aktivacija fosfolipaze  $A_2$  melitinom mogla biti cilj u citotoksičnosti melitina protiv tumorskih stanica (Son i sur., 2007).

#### 2.4.3. Protutumorsko djelovanje fosfolipaze $A_2$

Melitin uzrokuje pojačanu aktivaciju fosfolipazne  $A_2$  aktivnosti te unos kalcija kod ras transformiranih stanica što bi mogla biti osnova protutumorskog djelovanja ovog spoja (Sharma, 1993). Nakon ovih saznanja veliki je broj istraživanja doveo u vezu aktivnost fosfolipaze  $A_2$  sa citotoksičnim učinkom kojeg inducira melitin na cijelom nizu tumorskih stanica (Hanada i sur., 1995; Arora i sur., 1996; Wu i sur., 1998; Saini i sur., 1999). Aktivacija fosfolipaze  $A_2$  mogla bi imati ulogu u citotoksičnosti tumorskih stanica kroz nekoliko različitih staničnih promjena kao što su sinergističko djelovanje fosfolipaze  $A_2$  i fosfatidilinozitol (3,4)-difosfata u indukciji stanične smrti (Putz i sur., 2006). Smrt uzrokovana fosfolipazom  $A_2$  i fosfatidilinozitol (3,4)-difosfatom dovodi se u vezu sa narušavanjem membranske cjelovitosti stanice, ukidanjem signalne transdukcije te stvaranjem citotoksičnog lizo-fosfatidilinozitol (3,4)-difosfata. Također je pokazano da njihovo zajedničko djelovanje dovodi do stvaranja tumorskog lizata koji pojačava dozrijevanje ljudskih imunostimulatornih monocitno-dobivenih dendritičkih stanica. Takav tumorski lizat, koji predstavlja složenu smjesu tumorskih antigena sa potencijalnom aktivnošću, ima sve što je potrebno potencijalnom tumorskom cjepivu (Putz i sur., 2007).

## 2.5. Mehanizmi protutumorskog djelovanja

Glavni problem u terapiji protiv tumora vezan je uz koncentraciju tvari koja se koristi, a koja može uzrokovati i ozbiljne nuspojave. Unos samog lijeka trebao bi stoga biti što bolji, ali i specifičniji. Velika većina litičkih peptida koje proizvode kukci, a među njima i peptidi izolirani iz pčelinjega otrova, imaju amfipatsku strukturu koja se veže i ulaže u negativno nabijenu staničnu membranu. Nasuprot normalnim stanicama koje imaju nizak membranski potencijal, membrana tumorskih stanica ima visoki membranski potencijal (Holle i sur., 2003; Moon i sur., 2006; Son i sur., 2007) stoga mnogi litički peptidi selektivno remete membransku strukturu tumorskih stanica u većoj mjeri nego membranu normalnih stanica. Melitin bi na taj način mogao imati korisnu ulogu u terapiji protiv tumora (Son i sur., 2007). Gawronska i suradnici (2002) su na taj način uočili da je melitin toksičan za tumorske stanice jajnika OVCAR-3 te da je njegova toksičnost ovisna o primijenjenoj dozi.

Apoptoza izazvana pčelinjim otrovom uočena je u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Liu i suradnici (2002) uočili su da pčelinji otrov inhibira proliferaciju tumorskih stanica melanoma K1735M2 u uvjetima *in vitro* te stanica melanoma B16 u *in vivo* uvjetima. Apoptoza uočena kod K1735M2 stanica predstavljena je kao mogući mehanizam djelovanja kojim pčelinji otrov inhibira proliferaciju stanica te inducira diferencijaciju istih stanica u uvjetima *in vitro*. Također je uočena apoptoza kod tumorskih stanica pluća NCI-H1229 inhibicijom ciklooksigenaze 2 (COX-2) (Jang i sur., 2003) te kod stanica osteosarkoma U2 OS povećanjem Fas ekspresije nakon obrade pčelinjim otrovom (Chen i sur., 2004). Holle i suradnici (2003) uočili su da konjugat melitina i avidina ima jako citolitičko djelovanje kod stanica sa visokom metaloproteinaznom aktivnošću, kao što su stanice tumora prostate DU 145 i stanice tumora jajnika SK-OV-3. Nasuprot tome, citolitička aktivnost istog konjugata kod normalnih stanica koje imaju sniženu metaloproteinaznu aktivnost u uvjetima *in vitro*, bila je vrlo mala. U uvjetima *in vivo*, uočeno je značajno smanjenje tumora nakon obrade konjugatom melitina i avidina u usporedbi sa neobrađenim tumorom. Ova istraživanja također ukazuju na moguću primjenu konjugata melitina i avidina u terapijske svrhe. Moon i suradnici (2006) predložili su molekularni mehanizam kojim pčelinji otrov uzrokuje apoptozu u stanicama leukemije U937. Apoptoza je bila uzrokovana sniženom regulacijom ERK i Akt signalnog puta. Nadalje, apoptoza inducirana pčelinjim otrovom bila je praćena smanjenom regulacijom Bcl-2, aktivacijom kaspaze-3 te cijepanjem poli(ADP-riboza)polimeraze (PARP). Uz to, indukcija apoptoze bila je praćena i sniženom regulacijom inhibitornih proteina

apoptoze (IAP proteini). Pčelinji otrov također je aktivirao p38, MAPK i JNK te snizio regulaciju ERK i Akt (Son i sur., 2007).

Ovi rezultati ukazuju da bi indukcija apoptoze mogla imati jednu od uloga u protutumorskoj aktivnosti pčelinjega otrova i melitina, iako mehanizam koji stoji iza te indukcije nije u potpunosti istražen. Također je pokazana indukcija apoptoze u tumorskim stanicama uz pomoć genske terapije sa melitinom (Li i sur., 2004). Kako mogućnost korištenja peptida iz pčelinjega otrova u protutumorskoj terapiji privlači sve veću pozornost posljednjih godina, Hu i suradnici (2006) su također uočili da ti peptidi vrlo uspješno mogu ubiti stanice karcinoma jetre SMMC-7721 u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Kao glavni mehanizam inhibicije tumorskog rasta ovih peptida i u ovom slučaju se navodi stanična smrt uzrokovana apoptozom. Oršolić i suradnici (2003) su uočili da intravenozna aplikacija pčelinjega otrova značajno smanjuje broj plućnih metastaza. Međutim, subkutani unos pčelinjega otrova nije pokazao toliko dobar učinak na metastaze ukazujući i na ovisnost puta unosa, ali i na blizinu djelovanja samoga otrova kod korištenja u protutumorske svrhe.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da pčelinji otrov i njegova glavna sastavnica melitin uzrokuju snažan toksičan učinak kod različitih tipova tumorskih stanica kao što su stanice bubrega, pluća, jetre, prostate, mjehura, dojke i leukemijskih stanica, dok je taj učinak kod normalnih stanica manje izražen (Son i sur., 2007; Oršolić, 2012). Predloženi mehanizmi djelovanja pčelinjega otrova i njegovih peptidnih sastavnica vezani su uz aktivaciju fosfolipaze A<sub>2</sub>, kaspaza i metaloproteinaza koje uništavaju stanice tumora (Holle i sur., 2003, Moon i sur., 2006). Konjugacija melitina sa hormonskim receptorima te genska terapija sa melitinom mogli bi biti korisni u budućoj terapiji nekih od tumora kao što su tumori prostate i dojke (Li i sur., 2003, 2004; Ling i sur., 2004; Russell i sur., 2004). Sukladno tome, melitin kao amfipatski protein mogao bi imati željenu ulogu u terapijske svrhe. Taj je peptid posebno aktivan protiv stanica u kulturi koje eksprimiraju visoki nivo ras onkogeni (Sharma, 1992). Nadalje, melitin povećava aktivnost fosfolipaze A<sub>2</sub> u ras onkogen-trasformiranim stanicama što rezultira njihovim selektivnim uništenjem, ukazujući da bi takva hiperaktivacija fosfolipaze A<sub>2</sub> melitinom mogla biti jedan od ciljeva citotoksičnosti ovog peptida protiv tumorskih stanica (Son i sur., 2007). Rezultati istraživanja prezentirani u ovom literaturnom pregledu ukazuju na mogućnost primjene pčelinjega otrova i njegovih glavnih sastavnica (melitina i fosfolipaze A<sub>2</sub>) u razvoju protutumorskih lijekova. Međutim, prije njihove moguće kliničke primjene trebalo bi odrediti mehanizme njihovog djelovanja, način unošenja, njihovu točnu dozu te moguće nuspojave koje ovi spojevi mogu izazvati u normalnim stanicama.

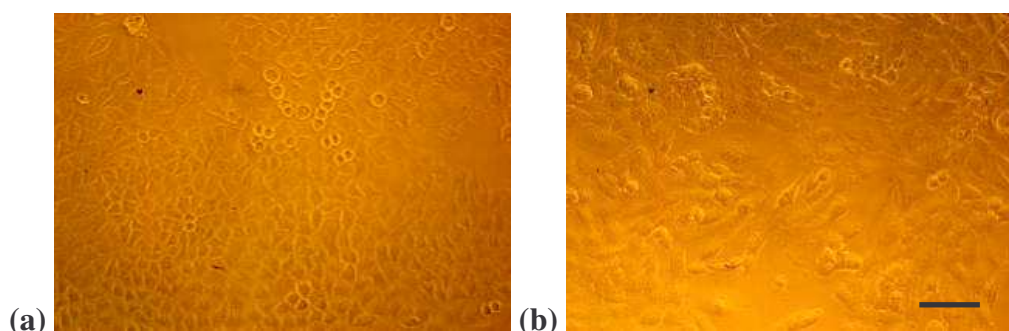


### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Stanični modeli

##### 3.1.1. Tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi

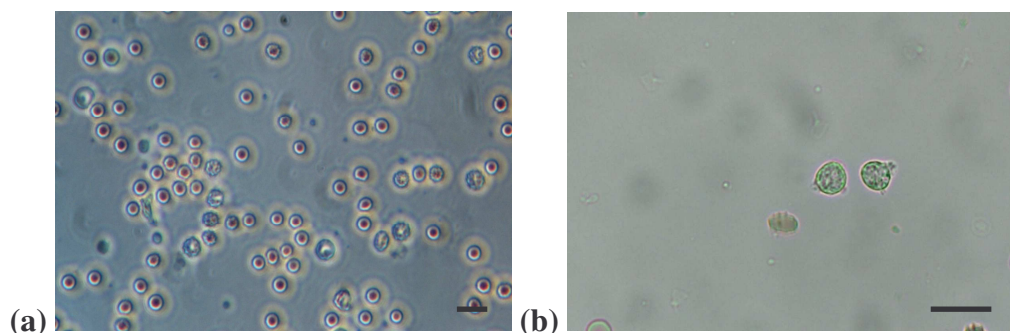
U radu su korištene stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEp-2 i njihove sublinije stabilno otporne na citostatike HeLa CK i CK2, zatim stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620, adenokarcinoma dojke MCF-7 te ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef (Slika 10). Sublinija HeLa CK otporna na cisplatinu, dobivena je obradom HeLa stanica rastućom koncentracijom cisplatine tijekom 24 h (početna koncentracija je bila 0,3  $\mu\text{M}$ , a konačna koncentracija 2,4  $\mu\text{M}$ ) (Osmak i Eljuga, 1993). Sublinija CK2 dobivena je obradom stanica HEp-2 rastućom koncentracijom cisplatine tijekom 24 h (početna koncentracija je bila 0,3  $\mu\text{M}$ , dok je konačna koncentracija bila 2,4  $\mu\text{M}$ ) (Osmak i sur., 1993). Sve stanične linije su rasle kao jednoslojna kultura u Dulbeccovom minimalnom Eaglovom mediju (DMEM, GIBCO, Invitrogen Ltd., Paisley, Velika Britanija) uz dodatak 10% telećeg seruma (HeLa, HeLa CK, HEp-2, CK2) ili uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (A1235, MCF-7, SW620, HEK-293, Hef) te uz antibiotik (penicilin i streptomycin) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Prilikom rasađivanja stanica korišten je 0,25%-tni tripsin (GIBCO).



**Slika 10.** Mikrofotografije staničnih linija ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa (a) i ljudskog glioblastoma A1235 (b). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .

## 3.1.2. Ljudski limfociti periferne krvi

Istraživanja su provedena na uzorcima ljudskih limfocita periferne krvi zdravog muškarca (Slika 11) kao osjetljivim pokazateljima stupnja izloženosti (Bender i sur., 1988; Carrano i Natarajan, 1988). Unazad šest mjeseci davatelj krvi nije bio izložen ionizirajućem ili ne-ionizirajućem zračenju u dijagnostičke svrhe. Također, davatelj krvi nije bio cijepljen, primao antibiotike i ostale lijekove u terapijske svrhe niti je bio izložen kemijskim mutagenima. Venska krv je izvađena u heparinizirane spremnike (BD vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, SAD) volumena 10 ml nakon čega su uzorci venske krvi podijeljeni i korišteni u daljnjim pokusima. Davatelj krvi bio je upoznat sa svrhom istraživanja te su mu bila objašnjena načela primjenjivanih metoda. Cjelokupna organizacija istraživanja, komunikacija sa davateljem krvi, uzorkovanje krvi, postupci pri rukovanju uzorcima u laboratorijskim uvjetima te objavljivanje rezultata provedeno je u skladu sa etičkim načelima i smjernicama. Puna krv je obrađena i nasadena na hranjive podloge (Chromosome kit P, Euroclone, Milano, Italija) te su ljudski limfociti periferne krvi kultivirani na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> u atmosferi (Heraeus Heracell 240 incubator, Langensfeld, Njemačka).



**Slika 11.** Mikrofotografije ljudskih limfocita periferne krvi u krvnom razmazu (a) i izoliranih ljudskih limfocita periferne krvi (b). Stanice su slikane pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Nikon Eclipse E400 POL, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40×. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20 μm.

### 3.2. Pčelinji otrov i melitin

U radu je korišten liofilizirani pčelinji otrov (Sigma, St Louis, MO, SAD). Prije svakog pokusa pčelinji otrov je otopljen u sterilnoj destiliranoj vodi (Alkaloid, Skopje, Makedonija) na temperaturi od 25 °C. Otopljeni pčelinji otrov centrifugiran je na 12000 rpm u trajanju od 10 min da bi se izdvojile netopljive komponente (Oršolić i sur., 2003). Otopljeni pčelinji otrov je steriliziran provlačenjem kroz filter za sterilizaciju (Filter units, Sigma). Tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi obrađene su pčelinjim otrovom u finalnim koncentracijama od 0,4 µg/ml do 200 µg/ml u različitim vremenskim periodima. Otopina pčelinjega otrova dodavana je u punu krv u finalnim koncentracijama od 0,1 µg/ml do 20 µg/ml, također u različitim vremenskim periodima. U radu je korišten i melitin (Sigma), glavna sastavnica pčelinjega otrova. Liofilizirani melitin je otopljen prema uputama proizvođača i čuvan na – 20 °C. Tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi obrađene su melitinom u finalnim koncentracijama od 0,1 µg/ml do 50 µg/ml u različitim vremenskim periodima. Otopina melitina dodavana je u punu krv u finalnim koncentracijama od 0,1 µg/ml do 10 µg/ml, također u različitim vremenskim periodima.

### 3.3. Ostale kemikalije i antitijela

U svrhu izvođenja pokusa korištene su, između ostalog, sljedeće kemikalije: 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP; Sigma St Louis, MO, SAD), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid (MTT; Sigma), 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB; Sigma), akridin-oranž (Serva, Sigma), akrilamid (Serva), amonijev acetat (Kemika), amonijev persulfat (APS; Serva), autoradiografski film (Fotokemika), bisakrilamid (Serva), citohalazin-B (Sigma), cisplatina (cDDP; Sigma), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), destilirana voda (Alkaloid, HZTM), dimetil-sulfoksid (DMSO; Kemika), EnzChek<sup>®</sup> Direct Phospholipase C Assay Kit (Invitrogen), etanol (Kemika), etidij-bromid (Serva, Sigma), etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA; Kemika, Sigma), Euroclone medij (Chromosome kit P), fiksir (Fotokemika), fiziološka otopina (HZTM), Fpg FLARE<sup>™</sup> Assay Kit (Trevigen), Giemsa (Merck, Sigma), glicerol (Merck), glicin (Serva), HEPES (GIBCO; Sigma), Histopaque (Sigma), HR agaroz (Sigma), imerziona ulje za mikroskopiju (Kemika), kalij dihidrogen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Merk), LMP agaroz (Sigma, Trevigen), merkaptotanol (Serva), metafosforna kiselina (Sigma), metanol (Kemika), metanol HPLC čistoće (Kemika), N-acetil-L-cistein (NAC; Sigma), natrij dodecil sulfat (SDS; Serva), natrij sarkozinat (Sigma),



NaHPO<sub>4</sub> (Kemika), NMP agaroza (Sigma), nemasno mlijeko u prahu (Sirela), octena kiselina (Kemika), ortofosforna kiselina (Sigma), penicilin (Sigma), PMSF (Sigma), Ponceau S (Sigma), razvijač (Fotokemika), RPMI 1640 medij (Invitrogen), Serva Blue G (Serva), spermin (Fluka), streptomycin (Sigma), TEMED (Serva), tiobarbituratna kiselina (TBA; Sigma), Tris baza (Sigma), Tris-HCl (Serva), Triton X-100 (Sigma) Tween 20 (Fluka), voda HPLC čistoće (Kemika), Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences). Standarde kemikalije za pripremu pufera bile su Kemikine. Kemikalije su nakon pripreme čuvane prema uputama proizvođača. Također su korištena i antitijela: ERK2 (C-14), zečje poliklonalno antitijelo (Santa Cruz, CA, SAD; PARP (556362)), mišje monoklonalno antitijelo (BD Pharmingen, NJ, SAD).

### **3.4. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi**

#### **3.4.1. Određivanje preživljenja stanica u kulturi MTT testom**

Preživljenje stanica nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom te cisplatinom određeno je MTT testom, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na svojstvu staničnih dehidrogenaza da reduciraju žuti 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT; Sigma) u ljubičasti formazan (Mickisch i sur., 1990). Stanice su nasadene na mikrotitarske pločice s 96 bunarića (Falcon, Becton Dickinson) u koncentracijama  $5 \times 10^3$  stanica za stanične linije ljudskog glioblastoma A1235 te  $2,5 \times 10^3$  stanica za sve ostale linije u 180  $\mu$ l medija/bunariću. Sljedeći dan medij je uklonjen te je zamijenjen svježim medijem u kojem je otopljena odgovarajuća koncentracija pčelinjega otrova ili melitina (da bi se izbjegao kontaktni učinak pčelinjega otrova i melitina), pri čemu je svaka koncentracija ispitana u triplicatu. Stanice su kontinuirano izlagane pčelinjem otrovu ili melitinu u različitim vremenskim periodima na 37 °C. Nakon obrade uklonjen je medij iz bunarića te je u svaki bunarić dodano 20  $\mu$ g MTT boje/40  $\mu$ l medija. Važno je ukloniti sav medij jer se kod mrtvih stanica, uslijed oštećenja plazmatske membrane, otpušta laktat-dehidrogenaza koja također može reducirati MTT boju i time pridonijeti ljubičastom obojenju. Nakon inkubacije od 3 h na 37 °C, nastali kristali formazana otopljeni su u dimetil sulfoksidu (170  $\mu$ l/bunariću) uz protresanje pločica 5 min na Vibromix 301EVT tresilici (Tehtnica, Železniki, Slovenija) pri 600 rpm. Nakon toga je izmjerena apsorbancija pri 600 nm na spektrofotometrijskom čitaču

pločica StatFax 2100 (Awareness Technology Inc, Palm City, FL, SAD). Izmjerena apsorbanacija proporcionalna je broju vijabilnih stanica. Relativno preživljenje stanica nakon obrade izračunato je u odnosu na neizložene kontrolne stanice, pri čemu je od dobivenih apsorbanacija prethodno oduzeta apsorbanacija „slijepa probe“ (bunarić bez stanica).

### 3.4.2. Određivanje morfoloških promjena stanica u kulturi i tipa stanične smrti

U svrhu određivanja morfoloških promjena stanice su nakon obrade gledane pod svjetlosnim mikroskopom, a za određivanje tipa stanične smrti stanice su istovremeno bojane fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom. Kondenzirani kromatin obojan etidij-bromidom te prisustvo apoptotskih tjelešaca, ukazuju na staničnu smrt apoptozom, dok ravnomjerno bojanje jezgre u crveno, bez vidljivih mjesta kondenzacije kromatina i apoptotskih tjelešaca, ukazuje na staničnu smrt putem nekroze. Stanice su nasadene u koncentracijama  $2,5 \times 10^3$  za stanične linije karcinoma vrata grlića maternice HeLa i HeLa CK i  $5 \times 10^3$  za stanične linije ljudskog glioblastoma A1235 u pločice sa 24 bunarića (Falcon). Sljedeći dan medij je uklonjen te je zamijenjen svježim medijem u kojem je otopljena odgovarajuća koncentracija pčelinjega otrova ili melitina. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom ili melitinom u različitim koncentracijama kroz period od 1 h na 37 °C. Stanice su nakon obrade pregledane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka) koristeći objektiv povećanja 40× da bi se utvrdile morfološke promjene te su stanice zatim tripsinizirane i centrifugirane 10 min na 1500 rpm u centrifugi (Labofuge 400, Heraeus, Langensfeld, Njemačka). Supernatant je odliven i stanice su stavljene na led. Na predmetnicu je stavljeno 10 µl stanične suspenzije u koju je pomiješano 4 µl otopine akridin-oranža (15 µg/ml u PBS-u) i 4 µl otopine etidij-bromida (50 µg/ml u PBS-u). Nakon stavljanja pokrovnice, uzorci su analizirani pod epifluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka) koristeći objektiv povećanja 100× s ekscitacijskim filterom (Acridin) od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Slike su slikane kamerom (Pixera Pro150ES, San Jose, CA, SAD).

### 3.4.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina

Stanice su nakon obrade tripsinizirane i centrifugirane 10 min na 1500 rpm u centrifugi (Labofuge 400, Heraeus, Langensfeld, Njemačka). Supernatant je odliven i stanični talozi su jednokratno isprani hladnim PBS-om, nakon čega je dodano 50 µl

lizirajućeg pufera (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2% glicerol) s 1 mM PMSF-om dodanim neposredno prije upotrebe. Stanice su ostavljene na ledu 15 min uz povremeno kratko miješanje na „vorteksu“, nakon čega je stanični lizat centrifugiran 5 min na 13000 g pri 4 °C u centrifugi (Mikro-242, Tehnica, Železniki, Slovenija). Supernatanti sa ukupnim staničnim proteinima odvojeni su u nove „Eppendorf“ epruvete. Nakon određivanja koncentracije proteina Bradfordovom metodom, dodan je 6× koncentrirani pufer za uzorke (0,375 M Tris-HCl, pH 6,8, 12% SDS, 30% (v/v) glicerol, 12% (v/v) 2-merkptoetanol, 0,2% bromfenol plavo). Ovako pripremljeni uzorci čuvani su na – 20 °C.

#### 3.4.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradford-u

Metoda za određivanje proteina temelji se na pomaku maksimuma apsorpcije s 465 nm na 595 nm prilikom vezanja boje Coomasie brilijant plavo (CBB) na proteine u kiselj otolini (Bradford, 1976). Za određivanje koncentracije proteina ovom metodom, stanični lizati su razrijeđeni 10× u destiliranoj vodi (4 µl lizata + 36 µl H<sub>2</sub>O). Nakon toga je na razrijeđene lizate dodano po 200 µl Bradfordovog reagensa (100 mg CBB G-250, 50 ml 95% EtOH, 100 ml 85% fosforne kiseline) te je unutar 10 min izmjerena apsorpcija pri 600 nm na spektrofotometrijskom čitaču pločica (StatFax 2100, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, SAD). Koncentracije proteina u pojedinim uzorcima izračunate su prema baždarnoj krivulji dobivenoj mjerenjem apsorpcije albumina iz telećeg seruma (BSA, 1 mg/ml u re-H<sub>2</sub>O) u rasponu koncentracija 0,5 µg/ml do 5,0 µg/ml.

#### 3.4.5. Razdvajanje proteina SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

SDS elektroforezom (engl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) proteini se u poliakrilamidnom gelu razdvajaju na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi (Laemmli, 1970). Za izradu poliakrilamidnog gela korišten je vertikalni sustav za izlijevanje gela (Hofer Mighty Small dual gel caster, Hofer Scientific Instruments, Holliston, MA, SAD). Gel za sabijanje uvijek je bio jednake gustoće (5% mješavine akrilamida i bisakrilamida (30%) 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,05% amonijev persulfat, 0,0625% TEMED, u re-H<sub>2</sub>O), dok je za razdvajanje proteina korišten 12,5 %-tni gel (12,5% mješavine akrilamida i bisakrilamida (30%), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,035% amonijev persulfat, 0,5% TEMED, u re-H<sub>2</sub>O), ovisno o veličini analiziranog proteina. Prije nanošenja

na gel uzorci su denaturirani zagrijavanjem u termobloku (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 95 °C tijekom 5 min te potom kratko centrifugirani. Elektroforeza je rađena u puferu za elektroforezu (0,025 M Tris, pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS), na vertikalnom sustavu (Mighty Small II SE 250/SE 260, Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, SAD), pri konstantnoj struji od 30 mA. Kao standard za određivanje molekularnih masa razdvojenih proteina korišten je Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Vilnius, Litva).

#### 3.4.6. Western blot metoda

Razdvojeni proteini preneseni su na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Schleicher & Schuell, Dassel, Njemačka) u Towbin puferu (25 mM, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,3) pomoću aparata za prijenos proteina u električnom polju (Mighty Small Transpher, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) pri konstantnoj struji od 400 mA u vremenu od 1 h. Nakon prijenosa proteina, gel je obojan sa Coomassie Brilliant Blue G-250 (50% metanol, 10% Hac, 0,1% CBB), a membrana je obojana s Ponceau S (0,2% Ponceau S, 3% trikloroctena kiselina) kako bi se provjerila učinkovitost prijenosa. Membrana je potom odbojana u de- $\text{H}_2\text{O}$  te je „blokirana“ na 4 °C preko noći u 5% nemasnom mlijeku u PBS-T puferu (80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20). Membrana je kratko isprana PBS-T puferom i nakon toga inkubirana s primarnim antitijelom razrijeđenim u 0,5% nemasnom mlijeku u TBS-T puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3,8 mM HCl, 0,1% Tween 20) 1 h na sobnoj temperaturi uz miješanje. Ponovljeno je ispiranje PBS-T puferom (2 $\times$  kratko, 1 $\times$ 15 min, 2 $\times$ 5 min), te je membrana inkubirana s odgovarajućim sekundarnim antitijelom razrijeđenim u 0,5% nemasnom mlijeku u TBS-T puferu u trajanju 1 h na sobnoj temperaturi uz miješanje. Nakon toga, membrana je isprana PBS-T puferom (2 $\times$  kratko, 1 $\times$ 15 min, 4 $\times$ 5 min), a signal specifičnog proteina određen je pomoću kita za kemiluminiscenciju (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, SAD). Prema uputama proizvođača, s membrane je uklonjen suvišak PBS-T pufera, a membrana je potom 1 min inkubirana s reagensom, zamotana u celofan i stavljena u kazetu za razvijanje filma. U tamnoj komori na membranu je položen autoradiografski film (RF4, Fotokemika-Kodak, Samobor, Hrvatska). Nakon ekspozicije, film je uronjen u razvijlač, ispran u vodi nakon pojave signala i potom prebačen u fiksir te ponovno ispran u vodi i osušen.

### 3.5. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na ljudske limfocite iz periferne krvi

#### 3.5.1. Određivanje preživljena limfocita fluorescencijskom mikroskopijom

Preživljenje limfocita nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom određeno je istovremenim bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom. Etidij-bromid je polarna molekula koja ne prolazi kroz plazmatsku membranu živih stanica pa se na taj način može interkalirati samo u DNA molekulu mrtvih stanica uslijed čega daje crvenu fluorescenciju. Akridin-oranž ulazi i u žive i u mrtve stanice te nakon interkalacije u DNA molekulu daje zelenu fluorescenciju. Nakon obrade pune krvi različitim koncentracijama pčelinjega otrova u različitim vremenskim trajanjima, limfociti su izolirani iz pune krvi koristeći modificiranu Ficoll-Histopaque metodu centrifugiranja (Singh, 2000a). Ljudski limfociti periferne krvi centrifugirani su u gradijentu gustoće uz pomoć Histopaque (Sigma) na 4500 rpm u trajanju od 3 min (Heraeus Biofuge Pico, Heraeus Instruments, DJB Labcare Ltd., Newport Pagnell, UK). Nakon centrifugiranja odvojen je bijeli prsten u kojem se nalaze limfociti te su isprani sa RPMI 1640 medijem (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i centrifugirani na 4500 rpm u trajanju od 3 min. Talog u kojem se nalaze limfociti korišten je za određivanje preživljenja stanica. Postotak preživljenja određen je diferencijalnim bojanjem limfocita uz pomoć etidij-bromida i akridin-oranža (Duke i Cohen, 1992). Ukupno 100 stanica izbrojano je u pojedinom vidnom polju, a za svaki uzorak obrađeno je po nekoliko vidnih polja. Uzorci su analizirani pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus AX-70, Tokyo, Japan) koristeći objektiv povećanja 40× s ekscitacijskim filterom (Acridin) od 490 nm, emisije od 530 nm i 605 nm. Stanice su klasificirane prema sljedećim obilježjima: žive stanice sa funkcionalnom membranom i ravnomjernim zelenim obojenjem te mrtve stanice sa ravnomjernim crvenim obojenjem jezgre.

#### 3.5.2. Određivanje morfoloških promjena limfocita fazno-kontrastnom mikroskopijom

Morfološke promjene na limfocitima, nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, utvrđene su promatranjem stanica fazno-kontrastnim mikroskopom. Nakon obrade pune krvi različitim koncentracijama pčelinjega otrova i melitina u različitim vremenskim trajanjima, limfociti su izolirani iz pune krvi koristeći modificiranu Ficoll-Histopaque metodu centrifugiranja (Singh, 2000a). Ljudski limfociti periferne krvi centrifugirani su u gradijentu

gustoće uz pomoć Histopaque (Sigma) na 4500 rpm u trajanju od 3 min (Heraeus Biofuge Pico). Nakon centrifugiranja, odvojen je bijeli prsten u kojem se nalaze limfociti te su isprani sa RPMI 1640 medijem (Invitrogen) i centrifugirani na 4500 rpm u trajanju od 3 min. Talog u kojem se nalaze limfociti korišten je za utvrđivanje morfoloških promjena na stanicama. Stanice su promatrane na predmetnim stakalcima (Biognost, Zagreb, Hrvatska) pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Nikon Eclipse E400 POL, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40×.

### 3.5.3. Određivanje tipa stanične smrti limfocita testom stanične difuzije

U svrhu određivanja tipa stanične smrti u vidu apoptoze i nekroze te za utvrđivanje njihovog udjela nakon obrade pčelinjim otrovom, ljudski limfociti periferne krvi podvrgnuti su testu stanične difuzije. Ova metoda koristi se za procjenu stupnja apoptoze i nekroze po principu da stanice imaju brojna mjesta osjetljiva na lužine te da ta mjesta, jednom izložena alkalnim uvjetima, otpuštaju fragmente molekule DNA male molekularne mase. Metoda se temelji na morfološkim promjenama koje se uočavaju pod fluorescencijskim mikroskopom nakon bojanja preparata fluorescentnim interkalirajućim agensom etidij-bromidom. Jezgra živih stanica ravnomjerno fluorescira i okruglog je oblika, a za razliku od nje jezgre stanica u apoptozi vrlo intenzivno fluoresciraju u samoj sredini, lateralno je obojenje slabije, dok se nekroza očituje u povećanju jezgre koja nalikuje na oblak te je slabije ograničena. Test stanične difuzije proveden je prema protokolu Singh (2005). Na brušena predmetna stakalca (Surgipath, Richmond, IL, SAD) stavljena je 1%-tna NMP agarozna (Sigma) koja je nakon 10 min hlađenja sastrugana sa predmetnih stakalaca. Zatim su predmetna stakalca presvučena sa 0,6%-tnom NMP agarozom (Sigma). Nakon hlađenja, novi sloj 0,5%-tne HR agaroze visoke rezolucije (Sigma) sa 5 µl pune krvi postavljen je na predmetna stakalca. Nakon 10 min hlađenja na ledu nanesen je posljednji sloj 2%-tne HR agaroze koji je prekriven pokrovnim stakalcem i ohlađen. Uzorci su nakon toga uronjeni u svježe pripremljenu i ohlađenu otopinu za lizu u trajanju od 1 h (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% natrij sarkonizat sa svježe dodanim 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% DMSO (Kemika), pH 10) za lizu stanica i odmatanje molekule DNA. Nakon postupka lize, preparati su uronjeni u pufer za denaturaciju koji se sastoji od tri različite otopine. Preparati se denaturiraju u periodu od 10 min (0,3 M NaOH, 0,2% DMSO) zatim u periodu od 15 min (10 mM amonij-acetat, 96% EtOH) te na kraju u periodu od 30 min (5 mM spermin (Fluka, St Louis, MO, SAD), 75% EtOH) na sobnoj temperaturi. Nakon postupka denaturacije,

preparati su bojani etidij-bromidom, isprani pomoću Tris-HCl i prekriveni pokrovnim stakalcem (Biognost, Zagreb, Hrvatska). Ukupno 1000 stanica je pregledano po pojedinom uzorku. Stanice su promatrane na predmetnim stakalcima pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25× s ekscitacijskim filterom (EtBr) od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm. Žive stanice su, od stanica u apoptozi i nekrozi, razlikovane prema kriterijima preuzetih iz Singh (2000b, 2003).

#### 3.5.4. Određivanje kromosomskih oštećenja u limfocitima mikronukleus testom

Mikronukleus test jedan je od standardnih testova koji se koristi za procjenu genotoksičnosti i citotoksičnosti na staničnoj razini, a podjednako je osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i kromosomskih aberacija. Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su u potpunosti odvojene od jezgre i posjeduju vlastitu membranu. Oni potječu od acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi. Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija nastalih u prethodnoj diobi stanice te se oni koriste kao mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma izazvanih u stanicama (Fenech, 2000, Kirsch-Volders i sur., 2003; Fenech, 2007; Samanta i Dey, 2012). Osim mikronukleusa, ovom metodom moguće je otkriti i učestalost pojavljivanja nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova. Nukleoplazmatski mostovi nastaju kao posljedica nastanka dicentričnih kromosoma, u kojima su centromere povučene na suprotne polove stanice, dok jezgrini pupovi nastaju kao posljedica amplifikacije gena, koja rezultira izbacivanjem amplificirane regije u jezgri pup (Umegaki i Fenech, 2000; Fenech i sur., 2003; Fenech, 2006). Za određivanje kromosomskih oštećenja, nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, primijenjen je standardni protokol za izvedbu mikronukleus testa na uzorcima pune krvi u kojem su stanične kulture uzgajane u uvjetima *in vitro* tijekom 72 h, a radi sprečavanja diobe citoplazme 44 h dodan je citohalazin-B (Sigma) u koncentraciji od 6 µg/ml (Fenech i Morley, 1985; Fenech, 2007). Limfociti su rasli na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus Hera Cell 240 inkubator, Langensfeld, Njemačka) u mediju (Euroclone, Chromosome kit P, Milano, Italija). Nakon završetka kultiviranja, pristupilo se izradi mikroskopskih preparata u skladu sa standardnim protokolom uz manje prilagodbe. Postupak je uključivao višekratno centrifugiranje (8 do 10 min na 800 rpm; Hettich Rotofix 32A Zentrifugen, DJB Labcare Ltd., Newport Pagnell, UK), ispiranje i obradu taloga te njegovo fiksiranje smjesom 3:1 (v/v) metanola i ledene octene kiseline (Kemika). Pročišćeni talog limfocita resuspendiran je u svježem fiksativu te nakapan na predmetna

stakalca (Biognost). Dobiveni su preparati osušeni na zraku i obojeni 10%-tnom vodenom otopinom citološke boje Giemsa (Merck, Darmstadt, Njemačka). Preparati su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX41, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40×. U uzorcima obrađenima pčelinjim otrovom pregledano je po 500 binuklearnih limfocita, dok je u uzorcima obrađenima melitinom pregledano po 1000 binuklearnih limfocita u kojima je utvrđena raspodjela i ukupni broj mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova. Parametri mikronukleus testa su determinirani u skladu s propisanim kriterijima HUMN projekta (Fenech i sur., 2003; Fenech, 2010).

### 3.5.5. Mjerenje količine oštećenja molekule DNA u limfocitima pomoću komet testa

Komet test ili mikrogel elektroforeza vrlo je djelotvorna tehnika za procjenu oštećenja i popravka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica. U ovoj tehnici pojedinačne se stanice najprije uklapaju u agarozni „sendvič“ gel te se zatim liziraju citoplazma i membranske strukture, pri čemu se oslobađa ukupna stanična DNA. Ta se DNA denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu za detekciju jednolančanih i dvolančanih lomova i podvrgava elektroforezi. Zbog velike molekularne mase najveći dio molekule DNA ne može putovati kroz pore gela. Putovati mogu samo fragmenti DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima te se na taj način fragmenti, nastali lomovima u molekuli DNA, razdvajaju prema veličini. Nakon bojanja fluorescencijskim interkalirajućim agensima, pod mikroskopom su vidljivi obrasci putovanja fragmenata u gelu koji nalikuju na komete (Klaude i sur., 1996; Collins i sur., 1997a,b; Singh, 2000; Kumaravel i sur., 2009). Danas se koriste brojne izvedbe komet testa: komet test u neutralnim ili alkalnim uvjetima za detekciju jednolančanih i dvolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteini, komet-FISH metoda te brojne enzimске modifikacije komet testa koje uključuju enzime kao što su Fpg, ENDO III i hOGG1 za detekciju oksidativnih oštećenja molekule DNA (Collins i sur., 1997a,b; Merk i sur., 2000; Speit i sur., 2003; Collins, 2009; Glej i sur., 2009; Shaposhnikov i sur., 2009). Analiza kometa vrši se pod fluorescencijskim mikroskopom. Svakom pojedinačnom kometu mjeri se dužina repa, postotak DNA u repu i izračunava repni moment. Dužina repa predstavlja udaljenost na koju su fragmenti molekule DNA otputovali iz jezgre te je proporcionalna oštećenju DNA i dužini odlomljenih fragmenata. Postotak DNA mjeri se pomoću posebnog računalnog programa za analizu slike, dok se repni moment izračunava na osnovu podataka o dužini repa i postotku DNA u repu (Singh i sur., 1988; Fairbairn i sur., 1995; Kumaravel i sur., 2009).



### 3.5.5.1. Alkalni komet test

Za mjerenje stupnja ukupnih oštećenja molekule DNA, nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, koristili smo alkalnu verziju komet testa (Singh i sur., 1988). Na brušena predmetna stakalca (Surgipath) nanošena je 1%-tna NMP agaroz (Sigma) koja je nakon polimerizacije uklonjena sa stakalca. Mikropipetom je na stakalce nanesen sloj 0,6% NMP agaroze (Sigma), koja je zatim prekrivena pokrovnicom (Biognost) i ostavljena na ledu 10 min. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnica, stavljen je novi sloj 0,5% LMP agaroze (Sigma) pomiješane sa 5 µl uzorka pune krvi. Nakon 10 min polimeriziranja na ledu, sloj je prekriven sa novim slojem 0,5% LMP agaroze (Sigma) i opet držan na ledu 10 min. Nakon polimerizacije skinuta je pokrovnica, a preparati su uronjeni u svježe pripremljenu i ohlađenu otopinu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% natrij sarkonizat (Sigma), pH 10. Neposredno prije same lize u pufer se dodaju 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% DMSO (Kemika)) koji omogućavaju liziranje stanica. Preparati su u puferu za lizu držani preko noći te su zbog osjetljivosti tehnike bili zaštićeni od svjetla. Nakon lize, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13) koji je također bio pripremljen neposredno prije i ohlađen. Proces denaturacije trajao je 20 min, također zaštićen od svjetla u kojem dolazi do odmatanja molekule DNA. Nakon denaturacije, preparati su preseljeni u kadicu za horizontalnu elektroforezu (Horizon 11-14 Agarose Gel Electrophoresis Apparatus, Life technologies, Gibco BRL, Carlsbad, CA, SAD). Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V (Electrophoresis Power Supply, Life technologies, Gibco BRL, Carlsbad, CA, SAD), a trajala je 20 min. Nakon elektroforeze, preparati su ispirani tri puta po 5 min u neutralizacijskom puferu. Nakon zadnjeg ispiranja, preparati su obojani s etidij-bromidom (20 µg/ml) u trajanju od 10 min. Obojani gelovi kratko su ispirani u Tris-HCl puferu (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) i pokriveni pokrovnicom. Radi stabilizacije boje preparati su prije početka analize držani u mraku najmanje 15 min.

### 3.5.5.2. Fpg-modificirani komet test

Za mjerenje stupnja oksidiranih oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom koristili smo Fpg (formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza)-modificiranu verziju komet testa koja je izvedena pomoću „Fpg FLARE™ Assay Kit“ (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, SAD) uz određene modifikacije. Postupak pripreme stakalaca za

modificirani komet jednak je kao i priprema stakalaca za alkani komet test, no za uklapanje stanica korištena je LMP agarozna iz navedenog kita (koja je gušća od klasične LMP agaroze te na taj način omogućava bolje odvajanje fragmenata molekule DNA nastalih djelovanjem Fpg enzima). Nakon 10 min polimeriziranja na ledu, sloj je prekriven sa novim slojem 0,5% LMP agaroze (Trevigen) i opet držan na ledu 10 min. Nakon polimerizacije skinuta je pokrovnica, a preparati su uronjeni u ohlađenu otopinu za lizu (Trevigen) koja omogućava liziranje stanice. Preparati su u puferu za lizu držani preko noći te su zbog osjetljivosti tehnike bili zaštićeni od svijetla. Nakon lize preparati se uranjaju u FLARE™ pufer za ispiranje, tri puta po 15 min nakon čega se preparati obrađuju 30 min u posudi sa vlažnom atmosferom na 37 °C sa Fpg enzimom (1:500 u REC puferu za razrjeđivanje (Trevigen). Kontrolna stakalca obrađuju se samo sa REC puferom za razrjeđivanje enzima (Trevigen). Fpg enzim prepoznaje sljedeća oštećenja u molekuli DNA: 1. forma otvorenog prstena 7-metilgvanin, uključujući i 2,6-diamino-4-hidroksi-5-N-metilformamidopirimidin i 4,6-diamino-5-formamidopirimidin, koji su letalne lezije, 2. 8-oksogvanin, izrazito mutageno oštećenje i najvažniji biološki supstrat Fpg enzima, 3. 5-hidroksicitozin i 5-hidroksiuracil, 4. aflatoxin-vezani imidazol otvoreni prsten gvanina te 5. imidazolni prsten otvoren na N-2-aminofluorescentnom-C<sup>8</sup>-gvaninu. Nakon lize, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 12,1) koji je bio pripremljen neposredno prije i ohlađen. Proces denaturacije trajao je 40 min, također zaštićen od svijetla u kojem dolazi do odmatanja molekule DNA. Nakon denaturacije, preparati su preseljeni u kadicu za horizontalnu elektroforezu (Horizon 11-14 Agarose Gel Electrophoresis Apparatus). Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V (Electrophoresis Power Supply), a trajala je 20 min. Nakon elektroforeze, preparati su ispirani tri puta po 5 min u neutralizacijskom puferu. Nakon zadnjeg ispiranja, preparati su obojani sa etidij-bromidom (20 µg/ml) u trajanju od 10 min. Obojani gelovi kratko su ispirani u Tris-HCl puferu (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) i pokriveni pokrovnicom. Radi stabilizacije boje preparati su prije početka analize držani u mraku najmanje 15 min.

### 3.5.5.3. Analiza preparata

Analiza preparata provedena je pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25× s ekscitacijskim filterom (EtBr) od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm koji je kamerom (COHU CCD Camera, San Diego, CA, SAD) povezan sa sistemom za analizu slike (Comet Assay II, Perceptive Instruments

Ltd., Haverhill, Suffolk, UK). Za svaki uzorak izmjereno je po 100 nasumično izabranih kometa. Automatizirani sistem za analizu slike korišten je za snimanje slika sa mikroskopa, računanje integriranog profila intenziteta za svaku stanicu, procjenu komponenata staničnih kometa i evaluaciju dosega deriviranih parametara. Kometi su snimani na konstantnoj dubini gela, izbjegavajući pritom rubove gela, mrtve stanice i komete bez jasno definirane glave. Za kvantifikaciju količine oštećenja molekule DNA uzet je parametar postotka DNA u repu kometa (intenzitet repa).

### 3.5.6. Mjerenje oksidativnog stresa u limfocitima nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom

Oksidacijski stres je posljedica neravnoteže nastajanja i uklanjanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS engl. reactive oxygen species). ROS-ovi su visoko reaktivni spojevi kisika koji djeluju na okolne molekule kao jaki oksidansi. Oni se dijele na radikale i neradikale. Oksidativni radikali su kratkoživi spojevi koji sadrže jedan nesparesni elektron u vanjskoj elektronskoj ljusci atoma, što ih čini izuzetno reaktivnim prema ostalim spojevima kako bi sparili taj elektron. Stvaranje ROS-ova, bilo iz endogenih ili egzogenih izvora, dovodi do oksidativnih oštećenja makromolekula u stanici od kojih su najosjetljiviji proteini, membranski lipidi i molekula DNA. Do koje vrste oštećenja će doći ovisi o vrsti ROS-ova, njihovoj reaktivnosti, vremenu trajanja, te mjestu njihova nastanka (Kohen i Nyska, 2002; Čepelak i Dodig, 2003). ROS-ovi mogu oštetiti DNA na bazama i šećeru što dovodi do degradacije dušičnih baza, lomova i mutacija. Peroksidacija baza odvija se najčešće na timinu i guaninu, dok su adenin i citozin manje osjetljivi na oksidacijski stres. Oksidacijski stres proteina dovodi do modifikacije aminokiselina, fragmentacije peptidnog lanca, povećane osjetljivosti na proteolitičke enzime i formiranje novih reaktivnih grupa. To dovodi do gubitka fluidnosti staničnih membrana, inaktivacije membranskih enzima, ubrzane proteolize, starenja, poremećaja prijenosa signala u stanici, malignih procesa i smrti stanice (Halliwell i Gutteridge, 1989; Dean i sur., 1997; Čepelak i Dodig, 2003; Dotan i sur., 2004; Waris i Ahsan, 2006; Circu i Aw, 2010; Kryston i sur., 2011).

#### 3.5.6.1. Određivanje koncentracije proteina prema Bradford-u

Određivanje ukupnih proteina temelji se na vezanju boje Coomassie briljant plavo (CBB) na proteine što dovodi do povećanja maksimuma apsorpcije (Bradford, 1976).

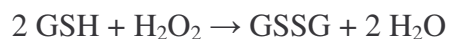
Reakcija se odvija pri kiselom pH pri čemu se boja u otopini protonira te ima crvenu boju, a vezanjem na proteine postaje anion, mijenja boju u plavu te dolazi do metakromatskog odgovora. Nakon obrade limfocita pčelinjim otrovom i melitinom, uzorak pune krvi prethodno je hidroliziran kako bi došlo do pucanja staničnih membrana tako da je u 800  $\mu$ l pune krvi dodano 3,1 ml destilirane vode nakon čega su uzorci kratko promiješani. Nakon toga, 20  $\mu$ l hidrolizata pune krvi razrijeđeno je s 2 ml fiziološke otopine (Natrii chloridi infundibile, HZTM). U daljnji postupak uzeto je 40  $\mu$ l tako razrijeđenog uzorka u koji je potom dodano 40  $\mu$ l mravlje kiseline i 2 ml boje. Svaki uzorak napravljen je u triplicatu. Epruvete s uzorcima su promiješane i ostavljene 10 min kako bi došlo do reakcije vezanja boje na proteine. Intenzitet nastale boje (apsorbancija) izmjeren je na UV/Vis spektrofotometru (Cecil 9000, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, UK) pri 595 nm i 22 °C prema slijepoj probi koja je umjesto uzorka sadržavala 40  $\mu$ l de- $H_2O$ . Koncentracije proteina u pojedinim uzorcima izračunate su prema baždarnoj krivulji dobivenoj mjerenjem apsorbancije standarda poznate koncentracije koji su pripremljeni razrjeđivanjem albumina iz telećeg seruma (BSA, 1 mg/ml u re- $H_2O$ ).

#### 3.5.6.2. Određivanje koncentracije glutationa (GSH)

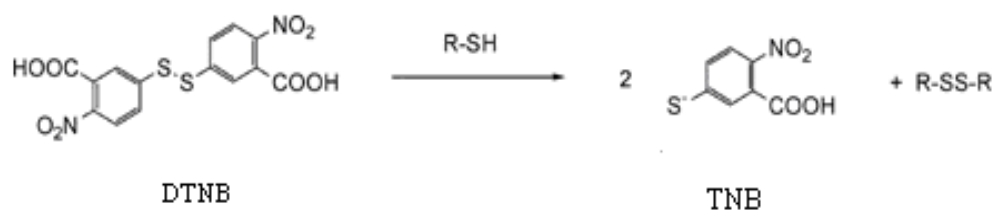
Glutation (GSH) je najzastupljeniji unutarstanični tiol kojeg nalazimo u gotovo svakoj eukariotskoj stanici. Veći dio staničnog GSH prisutan je u citosolu, dok se ostatak nalazi u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. GSH se sintetizira iz glutamata, cisteina i glicina djelovanjem citosolnih enzima i energije iz ATP-a u  $\gamma$ -glutamil ciklusu u stanicama svih organa. U organizmu GSH djeluje kao reducens i antioksidans u različitim biokemijskim reakcijama, služi kao izvor cisteina, štiti stanice od lipidne peroksidacije (LPO engl. lipid peroxidation), vrši detoksikaciju endogenih i egzogenih tvari te sudjeluje u staničnoj proliferaciji i razvoju, a njegova se koncentracija smanjuje izlaganjem oksidativnom stresu. Također, GSH je neophodan za sintezu proteina i nukleinskih kiselina, održavanje enzima u njihovoj aktivnoj formi te za održavanje stanične membrane (Swiergosz-Kowalewska i sur., 2006; Ballatori i sur., 2009). GSH je također bitna komponenta enzimatskih sustava koja sadrži oksidaze i reduktaze. Visoki redoks potencijal GSH pripisuje se  $-SH$  skupini cisteina. U reduciranom obliku tiolna skupina cisteina donira elektron ROS-ovima te sama postaje reaktivna, a u reakciji s drugom reaktivnom molekulom GSH stvara glutation disulfid (GSSG). Glutation-reduktaza omogućuje regeneraciju GSH iz nastalog GSSG gdje se kao izvor elektrona koristi NADPH.



GSH-peroksidaza koristi se oksidacijom GSH za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u citosolu djelovanjem superoksid dismutaze (SOD) (Valencia i sur., 2001a,b).



Postupak određivanja koncentracije GSH temelji se na reakciji –SH skupine GSH i 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoata (DTNB). DTNB poznat je i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih (–SH) skupina u biološkim uzorcima. DTNB uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (TNB) i male količine glutation disulfida (Slika 12). TNB je žuto obojani proizvod koji se mjeri spektrofotometrijski, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur., 2003).



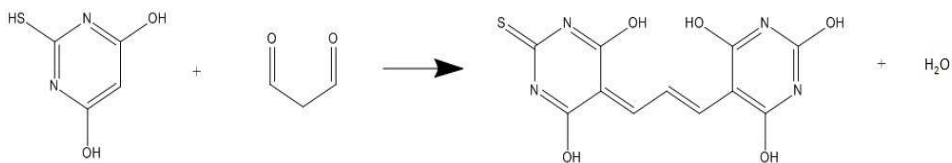
**Slika 12.** Reakcija 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoata (DTNB) s tiolnom skupinom spoja.

Nakon obrade limfocita pčelinjim otrovom i melitinom, uzorak pune krvi je hidroliziran tako da je u 800  $\mu\text{l}$  pune krvi dodano 3,1 ml destilirane vode nakon čega su uzorci kratko promiješani. U daljnji postupak uzeto je 3,5 ml hidrolizata kojemu je dodan jednak volumen 1% metafosforne kiseline (MPA). Dodatkom MPA došlo je do taloženja proteina čime su uklonjeni svi proteini, uključujući i one proteine koji imaju tiolnu skupinu, a koji bi reagirali sa DTNB-om i tako ometali reakciju dajući lažno pozitivne rezultate. Epruvete sa uzorcima su kratko promiješane i centrifugirane 10 min na 3500 g kako bi se talog bolje odvojio (MPW 223e, MPW Medical Instruments, Varšava, Poljska). U 500  $\mu\text{l}$  supernatanta uzorka dodano je 300  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera (pH 7,4) i 50  $\mu\text{l}$  DTNB-a (1 mM). Uzorci su rađeni u triplikatu. Epruvete su kratko promiješane, a intenzitet nastale boje (apsorbancija) izmjeren je pri 412 nm na 25 °C prema slijepoj probi na spektrofotometru (Cecil 9000, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, UK). Koncentracija GSH u nepoznatom uzorku određena je pomoću ekstincijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) koji je za GSH re-evaluiran i utvrđen da pri 412 nm i

25 °C iznosi  $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Eyer i sur., 2003). U račun su uzeta u obzir razrjeđenja uzorka pri hidrolizi pune krvi i u reakciji s kiselinom. Rezultati su potom izraženi u  $\mu\text{mol/g}$  proteina.

### 3.5.6.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Malondialdehid (MDA) nastaje kao proizvod lipidne peroksidacije. MDA je reaktivan spoj i može nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja te se stoga koristi kao biomarker u mjerenju razine oksidacijskog stresa u organizmu (Esterbauer, 1990; Esterbauer i sur., 1991; Esterbauer, 1993; Del Rio i sur., 2005). MDA je organski spoj kemijske formule  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$  i u organizmu prevladava njegova enolna forma. Kao reaktivni elektrofil, MDA stvara kovalentne adukte s proteinima i molekulom DNA te se zbog toga smatra mutagenim. LPO je najviše proučavani proces oksidacijskog stresa. Stanični fosfolipidi nalaze se na mjestima gdje se stvaraju ROS-ovi što ih čini lakim endogenim ciljevima. LPO dovodi do lančane reakcije u kojoj se stvaraju lipidni peroksidi. Lipidni peroksidi ulaze u jezgru gdje stupaju u reakciju sa željezo (II) ionima ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pri čemu nastaje alkoksilni radikal koji napada molekulu DNA. Kao rezultat oksidacijskog oštećenja membrana, u stanicama se povećava koncentracija kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) koji također ulaze u jezgru gdje mogu aktivirati nukleaze koje uzrokuju lomove lanaca molekule DNA (Fraga i Tapple, 1988; McConkey i sur., 1989; Marnett, 2002; Dotan i sur., 2004; Nair i sur., 2007). Proizvodi LPO djeluju kao drugi glasnici slobodnih radikala. Za razliku od ROS-ova, aldehidi imaju duže vrijeme poluživota pa se putem krvi mogu proširiti s mjesta svog nastanka i napadati ciljeve koji su prilično udaljeni od mjesta početnog događaja u kojem su nastali slobodni radikali (Martínez-Blasco i sur., 1998).



**Slika 13.** Reakcija tiobarbituratne kiseline (TBA) s malondialdehidom (MDA) i stvaranje MDA-TBA<sub>2</sub> kompleksa.

Metoda koja se koristi za određivanje MDA zasniva se na reakciji tiobarbituratne kiseline (TBA) i MDA (Slika 13). MDA u kiselim uvjetima reagira sa TBA u omjeru 1:2 (v/v) pri čemu nastaje crveni pigment čija se apsorbancija mjeri pri 532 nm. Metoda je jednostavna ali nije specifična jer i druge tvari poput ugljikohidrata i aminokiselina reagiraju sa TBA. Specifičnost metode postiže se upotrebom tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC engl. high-performance liquid chromatography) koji omogućava odvajanje kompleksa MDA-(TBA)<sub>2</sub> od ostalih komponenti u smjesi koje također apsorbiraju svjetlost pri 532 nm (Esterbauer, 1996).

Koncentracija MDA u uzorcima krvi, nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, mjerena je prema metodi Drury i suradnika (1997). Puna krv je također, kao i za GSH, prethodno hidrolizirana, potom su proteini istaloženi s 1% MPA te je uzorak centrifugiran. U 50 µl supernatanta pune krvi dodano je 400 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.1%) i 100 µl TBA (0.6%). Uzorci su promiješani i stavljeni 30 min u termo-block prethodno zagrijan na 90 °C. Uzorci su rađeni u duplikatu. Uz svaku seriju uzoraka napravljena je slijepa proba i serija standarda u koncentraciji 30,35 µM, 15,175 µM, 6,07 µM, 3,035 µM, 1,5175 µM, 0,6070 µM, 0,3035 µM, (standardi su priređeni razrjeđivanjem otopine matične otopine MDA koncentracije 6,07×10<sup>-3</sup> mol/ml u destiliranoj vodi). Nakon zagrijavanja epruvete su stavljene na led kako bi se reakcija prekinula. Koncentracija MDA-(TBA)<sub>2</sub> kompleksa određena je pomoću HPLC s fluorescentnim detektorom (fluorescentni detektor u odnosu na UV/Vis detektor dodatno povećava specifičnost i osjetljivost metode; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Valne duljine fluorescentnog detektora bile su podešene na λ<sub>ex</sub>= 527 nm i λ<sub>em</sub>=551 nm, a komponente su razdvojene na analitičkoj koloni dimenzija 125,0×4,0 mm s predkolonom 4,0×4,0 mm i veličinom punila 5 µm (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka). Kao mobilna faza korišten je 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pripremljen u vodi HPLC čistoće) i pomiješan s metanolom HPLC čistoće u omjeru 60:40. Tako pripremljenoj mobilnoj fazi pH je podešen na 6,8. Otopina je profiltrirana i stavljena u ultrazvučnu kupelj (Sonis 4, Iskra Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija) kako bi se uklonio višak otopljenog zraka koji bi oštetio kolonu. Protok mobilne faze je podešen na 1 ml/min. Ukupna analiza je trajala 10 min za svaki uzorak, a vrijeme zadržavanja MDA na analitičkoj koloni bilo je 2,5 min. Koncentracija MDA u nepoznatom uzorku izračunata je pomoću baždarnog dijagrama standarda poznate koncentracije i izražena je u µmol/dm<sup>3</sup>. Rezultati su potom izraženi u nmol/g proteina.

### 3.5.7. Mjerenje aktivnosti enzima fosfolipaze C (PLC)

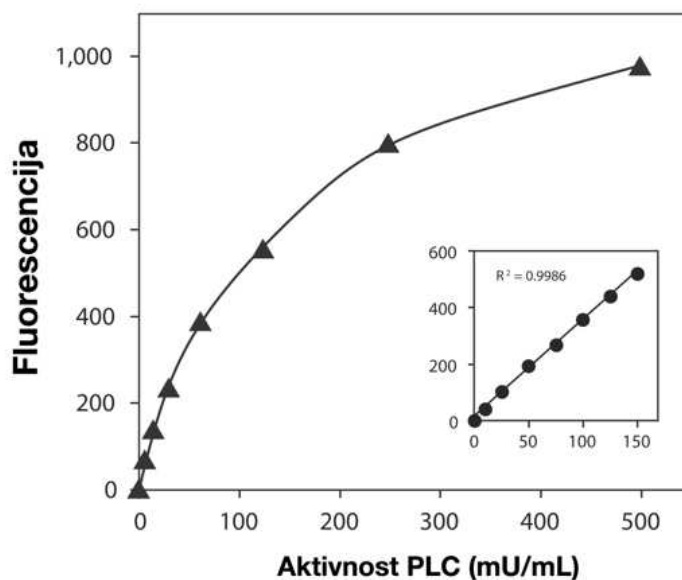
Fosfolipaza C (PLC) je klasa enzima koji cijepaju fosfolipide neposredno ispred fosfatne grupe. Ovaj enzim ima važnu ulogu u staničnoj fiziologiji te u mnogim signalnim putovima vezanima za apoptozu i stanično preživljenje. PLC katalizira reakciju cijepanja fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP<sub>2</sub>) u diacil glicerol (DAG) i inozitol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>). U tom procesu DAG ostaje vezan za membranu, dok se IP<sub>3</sub> otpušta u citosol. IP<sub>3</sub> se na membrani endoplazmatskog retikuluma veže za specifične kalcijске kanale i otvara ih te dolazi do izlaska Ca<sup>++</sup> iz endoplazmatskog retikuluma u citoplazmu, tj. do porasta citoplazmatske koncentracije Ca<sup>++</sup> što uzrokuje kaskadu intracelularnih reakcija. DAG zajedno s Ca<sup>++</sup> aktivira protein kinazu C koja fosforilira stanične proteine i na taj način dovodi do promjena u staničnoj aktivnosti (Wahl i Carpenter, 1991; Heinz i sur., 1998; Carpenter i Ji, 1999; Rebecchi i Pentyala, 2000; Zhao i sur., 2004, Ochocka i sur., 2008).

Za mjerenje aktivnosti PLC nakon obrade melitinom koristili smo EnzChek<sup>®</sup> Direct Phospholipase C Assay Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) uz određene modifikacije koji omogućuje jednostavno određivanje aktivnosti fosfatidilkolin-specifične PLC. Navedeni test koristi kao supstrat glicerofosfoetanolamin s bojom označenim *sn*-2 acil lancem. Cijepanje molekule supstrata pomoću PLC oslobađa bojom označen diacilglicerol koji proizvodi pozitivni fluorescencijski signal, a koji se može kontinuirano mjeriti pomoću fluorescencijskog čitača mikrotitarskih pločica te na taj način daje indirektan podatak o koncentraciji PLC. Proizvod reakcije ima ekscitacijski ( $\lambda_{ex}$ ) i emisijski ( $\lambda_{em}$ ) maksimum na valnoj duljini 509 nm, odnosno 516 nm. Nepoznata aktivnost PLC u uzorcima određuje se pomoću standardne krivulje dobivene mjerenjem fluorescencije otopina standarda s poznatim aktivnostima PLC dobivene iz vrste *Bacillus cereus*.

Za potrebe određivanja PLC pripremili smo otopinu PLC supstrata dodavanjem 100  $\mu$ l DMSO-a u PLC supstrat, koji je osigurao proizvođač kita. Dobivena žuto-narančasta otopina supstrata pohranjena je na sobnoj temperaturi i zaštićena od svjetla. Radna otopina PLC supstrata pripremljena je dodavanjem 40  $\mu$ l lecitina i 100  $\mu$ l otopine PLC supstrata u 9,86 ml razrijeđenog reakcijskog pufera. Matična otopina standarda PLC iz vrste *Bacillus cereus* pripremljena je dodavanjem 200  $\mu$ l razrijeđenog reakcijskog pufera u standardnu otopinu PLC koja se nalazila u kitu. Pripremljena otopina imala je aktivnosti 40 U/ml te je razrijeđena još 40 $\times$  reakcijskim puferom do konačne aktivnosti 1 U/ml. Razrijeđenjem standardne otopine PLC katalitičke aktivnosti 1 U/ml pripremljeni su standardi u rasponu aktivnosti PLC od 0,008 U/ml do 1 U/ml, a koje smo koristili prilikom mjerenja.



Na početku su u zatamnjene pločice sa 96 bunarića uneseni standardi i to u triplikatu. Također je uključena i slijepa proba (sadržavala je samo reagense i supstrat, aktivnost PLC= 0 U/ml) koja je također nanošena u triplikatu. U preostale bunariće dodano je po 100  $\mu$ l prethodno hemolizirane pune krvi s de- H<sub>2</sub>O (1:1) te potom razrijeđene 100 $\times$  s razrijeđenim reakcijskim puferom, pri čemu su svi uzorci nanošeni u mikrotitarsku pločicu u triplikatu. U bunariće sa standardnim otopinama, odnosno uzorcima razrijeđene krvi, dodano je 100  $\mu$ l radne otopine PLC supstrata te je ukupni volumen u bunarićima bio 200  $\mu$ l. Nakon toga, mikrotitarska pločica zaštićena je od svjetla te inkubirana tijekom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je fluorescencija uzoraka i standardnih otopina na valnoj duljini ekscitacije 490 nm i emisije 520 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan Infinite M200 PRO, Tecan Group Ltd., Männedorf, Švicarska). Na temelju dobivenih vrijednosti intenziteta fluorescencije standardnih otopina PLC iz vrste *Bacillus cereus*, izrađena je standardna krivulja ovisnosti intenziteta fluorescencije otopina o aktivnosti PLC (Slika 14). Pomoću dobivene jednadžbe baždarnog pravca za početni linearni dio standardne krivulje izračunate su aktivnosti PLC u ispitivanim uzorcima te izražene u U/ml.



**Slika 14.** Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o aktivnosti fosfolipaze C (PLC).

### 3.6. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili standardna pogreška (SE). Statistička značajnost rezultata staničnog preživljenja, dobivenih MTT testom i istovremenim bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom, nakon obrade tumorskih i ne-tumorskih staničnih linija u kulturi i ljudskih limfocita pčelinjim otrovom i melitinom izračunata je pomoću Student *t*-testa. Za analizu postotka DNA u repu kao parametra komet testa korišten je program Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD). Za svaki pojedini uzorak izračunata je srednja vrijednost, a usporedbe između uzoraka napravljene su na logaritamski pretvorenim podacima pomoću ANOVA programa. Post-hoc analiza razlika napravljena je pomoću Scheffé testa. Parametri mikronukleus testa (broj mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova) obrađeni su  $\chi^2$ -testom. Statistička značajnost rezultata koncentracija glutaciona, malondialdehida i aktivnosti fosfolipaze C uspoređena je također Student *t*-testom. U svim navedenim analizama razina statističke značajnosti postavljena je na  $P < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

Utjecaj pčelinjega otrova i melitina ispitan je na različitim tumorskim staničnim linijama u kulturi da bi se utvrdilo potencijalno protutumorsko svojstvo pčelinjega otrova u cjelini, ali i njegove glavne proteinske sastavnice melitina. U radu su korištene stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEp-2 i njihove sublinije stabilno otporne na citostatike HeLa CK i CK2, zatim stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620 i adenokarcinoma dojke MCF-7. Sublinije HeLa CK i CK2 otporne na cisplatinu, dobivene su obradom HeLa i HEp-2 stanica rastućom koncentracijom cisplatine (Osmak, 1992; Osmak i Eljuga, 1993; Osmak i sur., 1993). Osim na tumorskim staničnim linijama, učinak pčelinjega otrova i melitina ispitan je i na ne-tumorskim stanicama u svrhu dobivanja podataka vezanih za toksičnost ovih spojeva na normalnim stanicama. U radu su paralelno korištene ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef te ljudski limfociti periferne krvi kao osjetljivi pokazatelji stupnja izloženosti različitim fizikalnim i kemijskim toksikantima.

### 4.1. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na tumorske i ne-tumorske stanične linije u kulturi

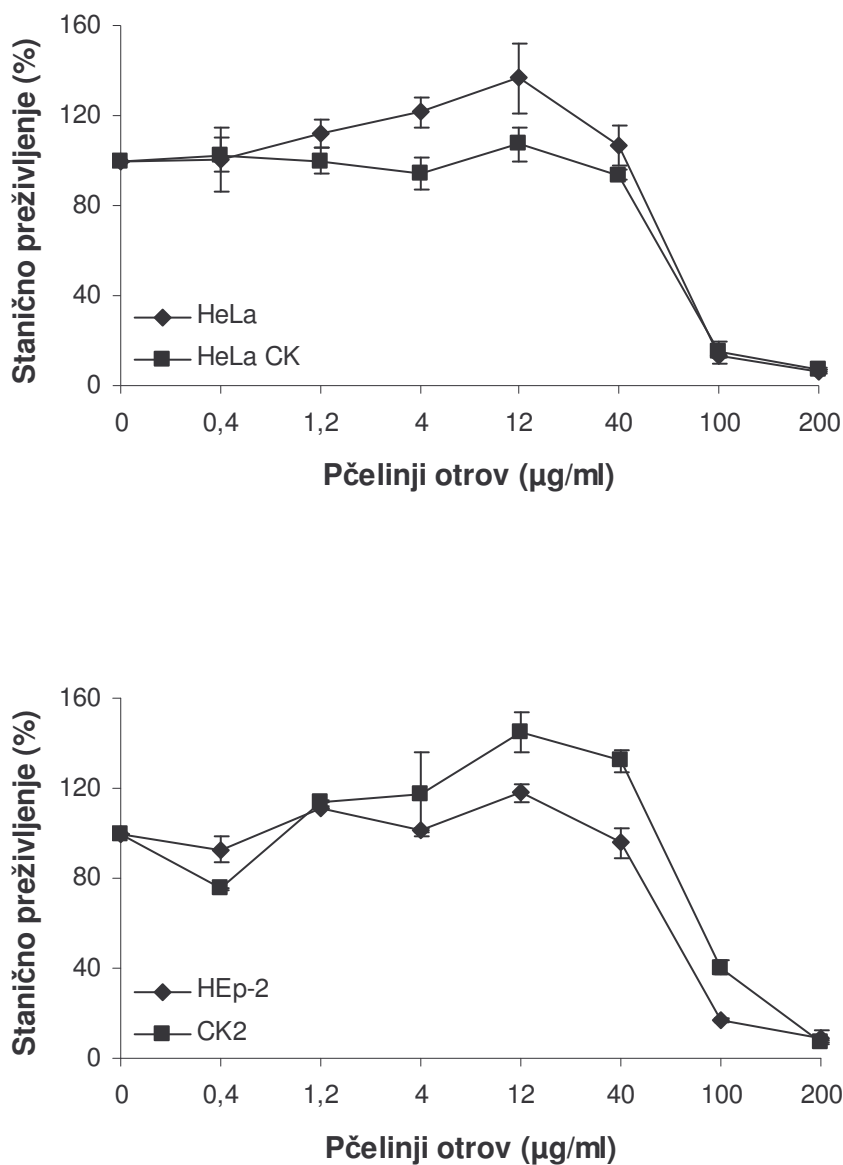
#### 4.1.1. Učinak pčelinjega otrova i melitina na preživljenje stanica

Rezultati MTT testa na različitim tumorskim i ne-tumorskim staničnim linijama ukazuju na citotoksičnost ovog spoja. Pčelinji otrov pokazao se toksičnim za sve stanične linije i njegova je citotoksičnost bila ovisna o dozi (Slika 15 i 16). Citotoksičnost pčelinjega otrova također je ovisna i o tipu stanica, no iako se prema rezultatima MTT testa na pojedinim staničnim linijama čini da je dio staničnih linija osjetljiviji na pčelinji otrov, to opažanje vrijedi samo za stanične linije koje su rasle u istom mediju (ili uz dodatak 10% telećeg seruma ili uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma). Ispitivanjem toksičnosti pčelinjega otrova na istom tipu stanica (HeLa i Hep-2) koje su nasadene u različitom mediju, opazilo se da toksičnost pčelinjega otrova ovisi o vrsti seruma. Stanice koje su rasle u mediju sa dodatkom 10% telećeg seruma pokazale su veći stupanj citotoksičnosti na pčelinji otrov od istih stanica koje su rasle u mediju sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (Slika 17).

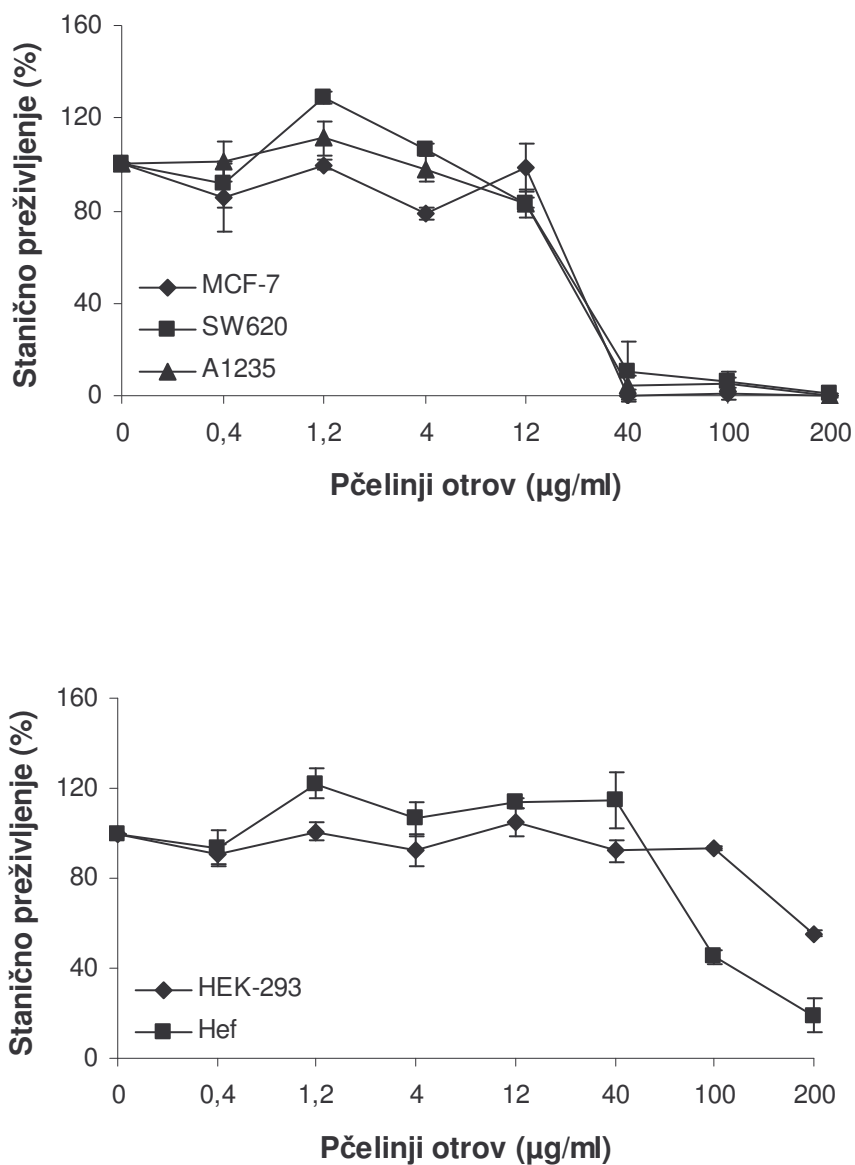
Ako gledamo ovisnost djelovanja pčelinjega otrova između stanica koje su rasle u mediju sa dodatkom 10% telećeg seruma, Hef i HEK-293 ne-tumorske stanice pokazale su najveću rezistenciju prema pčelinjem otrovu. Također, niže koncentracije pčelinjega otrova djelovale su stimulatивно na pojedine stanične linije (HeLa, CK2, SW620, Hef).

Melitin se također pokazao toksičnim za sve tipove staničnih linija te je i njegova citotoksičnost bila ovisna o dozi (Slike 18 i 19). Citotoksičnost melitina također je ovisna i o tipu stanica, no iako se prema rezultatima MTT testa na pojedinim staničnim linijama čini da je dio staničnih linija osjetljiviji na melitin kao što je bio slučaj sa pčelinjim otrovom, to opažanje opet vrijedi samo za stanične linije koje su rasle u istom mediju (ili uz dodatak 10% telećeg seruma ili uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma). I u slučaju sa melitinom, Hef i HEK-293 ne-tumorske stanične linije pokazale su najveću rezistenciju prema melitinu te je ona bila jednaka u oba tipa staničnih linija.

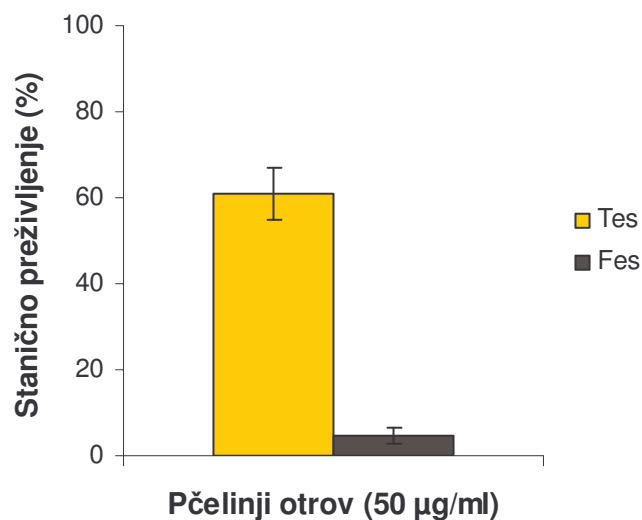
Kada se usporedi citotoksičnost pčelinjega otrova i melitina, razlika u  $IC_{50}$  vrijednosti nakon obrade melitinom između najosjetljivijih te najrezistentnijih staničnih linija je mnogo manja nego ona uočena nakon obrade pčelinjim otrovom te iznosi oko 10× za pčelinji otrov naprama 4× nakon obrade melitinom (Tablica 2). U oba slučaja, A1235 stanice pokazuju najveću osjetljivost, dok su najrezistentnije stanice HEK-293. Nadalje, razlike u osjetljivosti između ne-tumorskih staničnih linija (HEK-293 i Hef) prema pčelinjem otrovu gotovo nestaju nakon obrade tih stanica melitinom. Ovi rezultati ukazuju da postoje razlike u osjetljivosti na pčelinji otrov i melitin kod različitih staničnih linija.



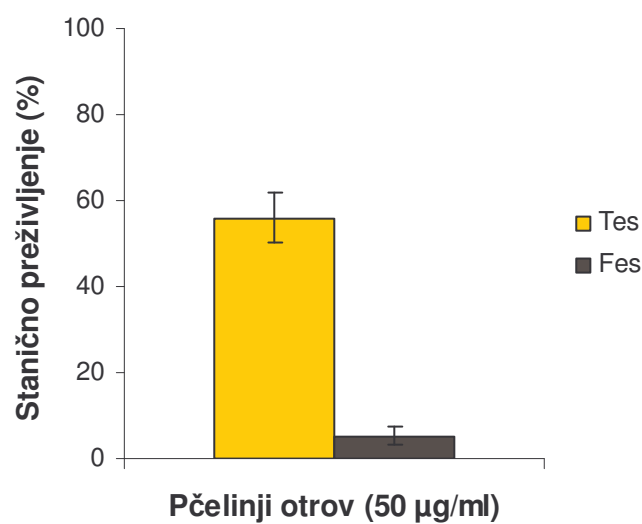
**Slika 15.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u stanicama u kulturi nakon obrade pčelinjim otrovom (stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEP-2 i njihove sublinije stabilno otporne na cisplatinu HeLa CK i CK2). Stanice su nasadene u pločice sa 96 bunarića te je nakon 24 h u kulturu dodan pčelinji otrov u različitim koncentracijama (0,4 µg/ml do 200 µg/ml). Citotoksičnost je određena pomoću spektrofotometrijskog MTT testa nakon 72 h obrade pčelinjim otrovom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.



**Slika 16.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u stanicama u kulturi nakon obrade pčelinjim otrovom (stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620, adenokarcinoma dojke MCF-7 te ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef). Stanice su nasađene u pločice sa 96 bunarića te je nakon 24 h u kulturu dodan pčelinji otrov u različitim koncentracijama (0,4 µg/ml do 200 µg/ml). Citotoksičnost je određena pomoću spektrofotometrijskog MTT testa nakon 72 h obrade pčelinjim otrovom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.



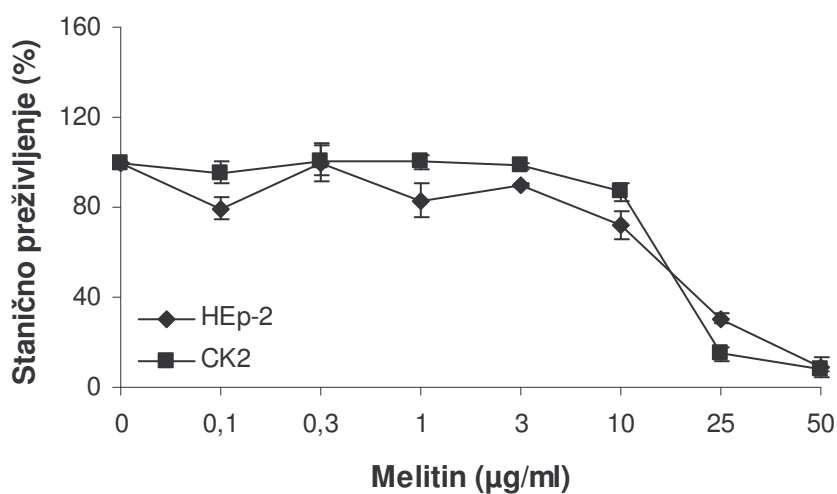
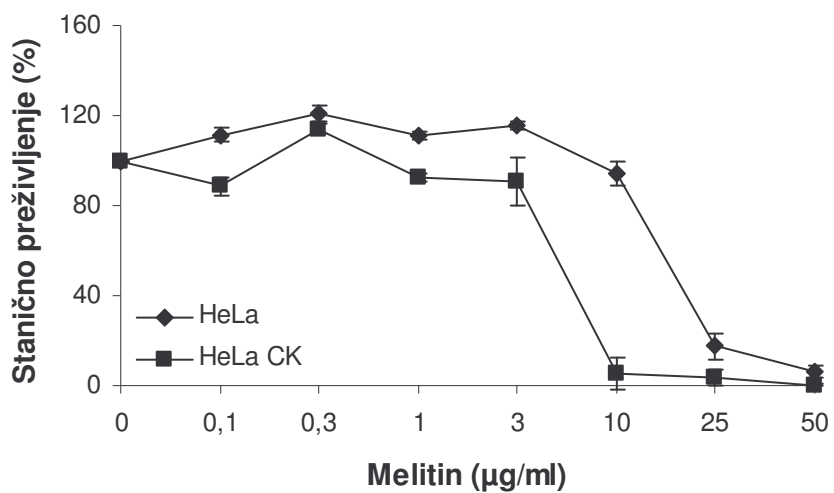
(a)



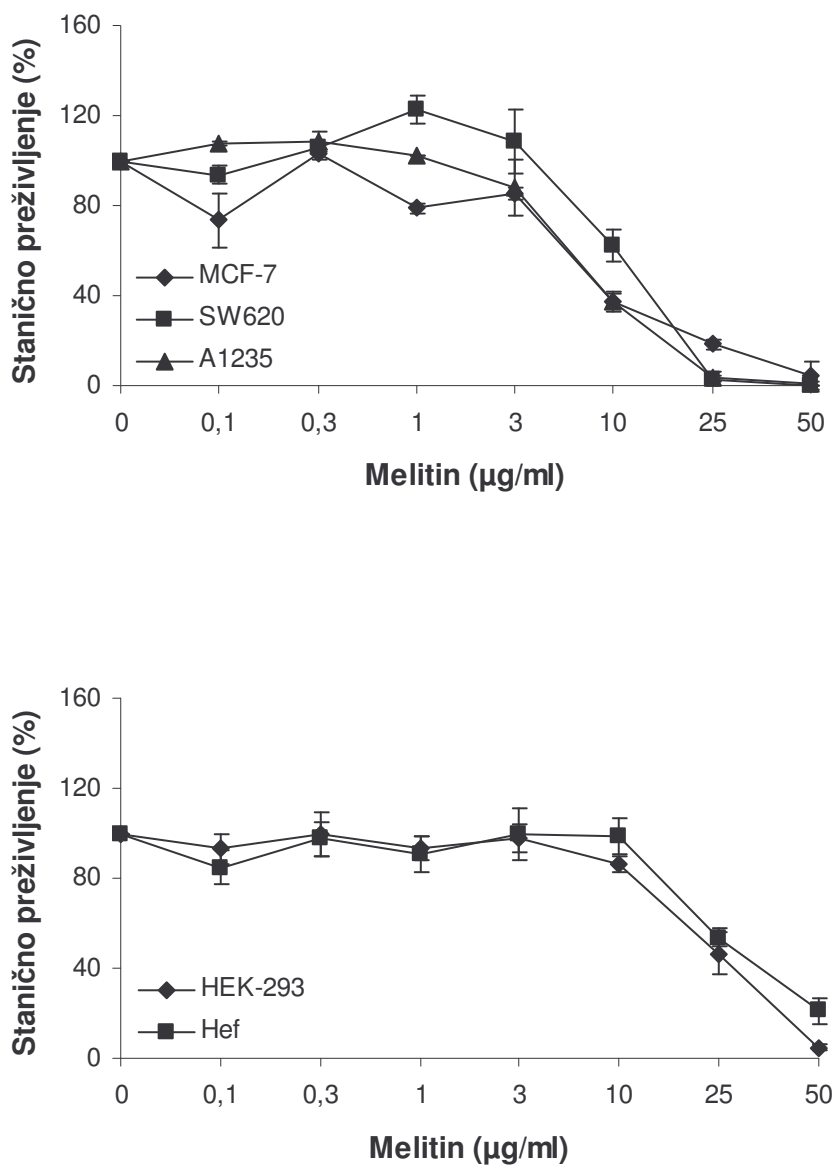
(b)

**Slika 17.** Razlika u osjetljivosti HeLa (a) i HEp-2 (b) stanica obrađenih pčelinjim otrovom s obzirom na vrstu seruma. Stanice su nasađene u pločice sa 96 bunarića u mediju uz dodatak 10% telećeg seruma (Tes) i uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (Fes) te je nakon 24 h u kulturu dodan pčelinji otrov u koncentraciji od 50 µg/ml. Citotoksičnost je određena pomoću spektrofotometrijskog MTT testa nakon 1 h obrade pčelinjim otrovom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.





**Slika 18.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u stanicama u kulturi nakon obrade melitinom (stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEP-2 i njihove sublinije stabilno otporne na cisplatinu HeLa CK i CK2). Stanice su nasade u pločice sa 96 bunarića te je nakon 24 h u kulturu dodan melitin u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 50 µg/ml). Citotoksičnost je određena pomoću spektrofotometrijskog MTT testa nakon 72 h obrade melitinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.



**Slika 19.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u stanicama u kulturi nakon obrade melitinom (stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620, adenokarcinoma dojke MCF-7 te ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef). Stanice su nasadene u pločice sa 96 bunarića te je nakon 24 h u kulturu dodan melitin u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 50 µg/ml). Citotoksičnost je određena pomoću spektrofotometrijskog MTT testa nakon 72 h obrade melitinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

**Tablica 2.** Preživljenje stanica obrađenih sa pčelinjim otrovom i melitinom izraženo kao vrijednost  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  vrijednost je ona koncentracija koja smanjuje preživljenje izloženih stanica za 50%).

Tip stanica	$IC_{50}$ vrijednost ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Pčelinji otrov	Melitin
HeLa	76,40	18,61
HeLa CK	73,20	6,34
HEp-2	74,76	17,97
CK2	93,70	17,67
MCF-7	25,50	8,15
SW620	24,85	13,07
A1235	23,84	8,28
HEK-293	>200,00	23,68
Hef	95,94	27,84

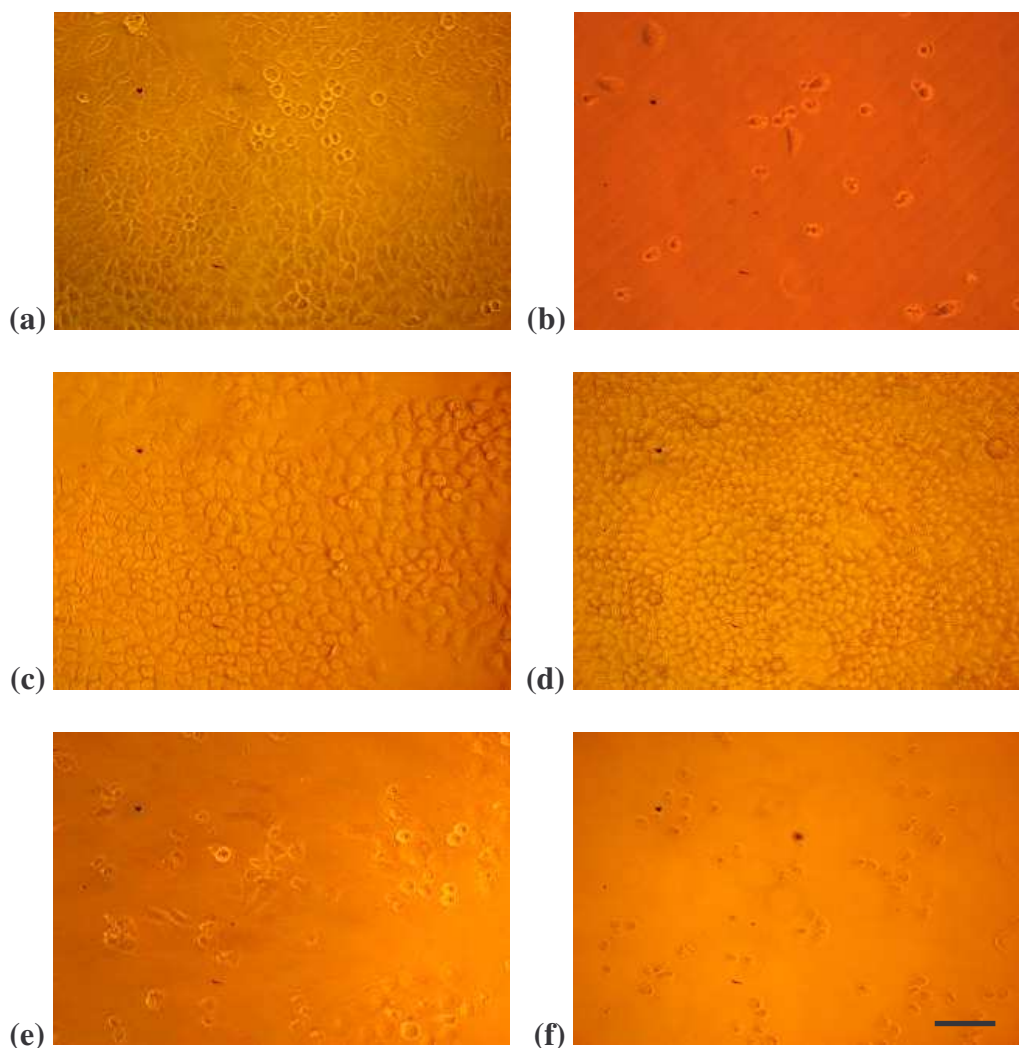
Stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEp-2 i njihove sublinije stabilno otporne na citostatike HeLa CK i CK2, stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620, adenokarcinoma dojke MCF-7 te ne-tumorske ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef.

#### 4.1.2. Učinak pčelinjega otrova i melitina na morfologiju stanica

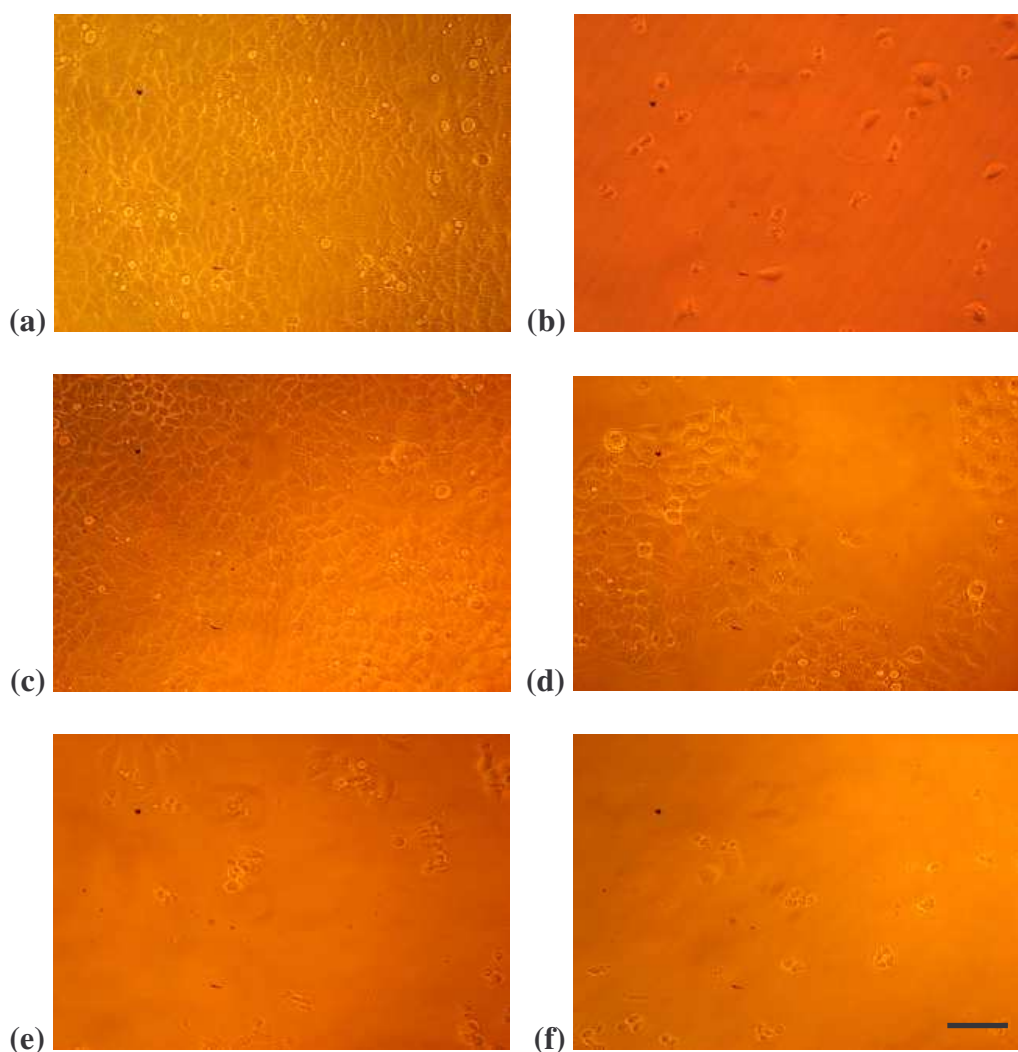
Za procjenu učinka pčelinjega otrova i melitina na tumorskim stanicama izabrane su tri stanične linije; HeLa i njezina sublinija otporna na cisplatinu HeLa CK te A1235 stanice. Sve tri stanične linije pokazale su sličan uzorak u morfologiji nakon obrade pčelinjim otrovom (Slike 20, 21 i 22). Stanice su bile zaokružene i granulirane, a kod većih koncentracija pčelinjega otrova došlo je do njihovog smanjivanja te na kraju do odljepljivanja od podloge. Nasuprot tome, ovakve odlike nisu primijećene u kontrolnim stanicama. Zabilježene promjene inducirane su ubrzo nakon dodavanja pčelinjega otrova (unutar jednog sata). Kada su stanice obrađene melitinom, zabilježen je jednak učinak kod sva tri tipa staničnih linija kao i nakon obrade pčelinjim otrovom, no doza melitina koja je potrebna da bi se postigao isti učinak je bila mnogo manja (Slike 23, 24 i 25). Zabilježene promjene također su inducirane ubrzo nakon dodavanja melitina (unutar jednog sata).

#### 4.1.3 Određivanje tipa stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom

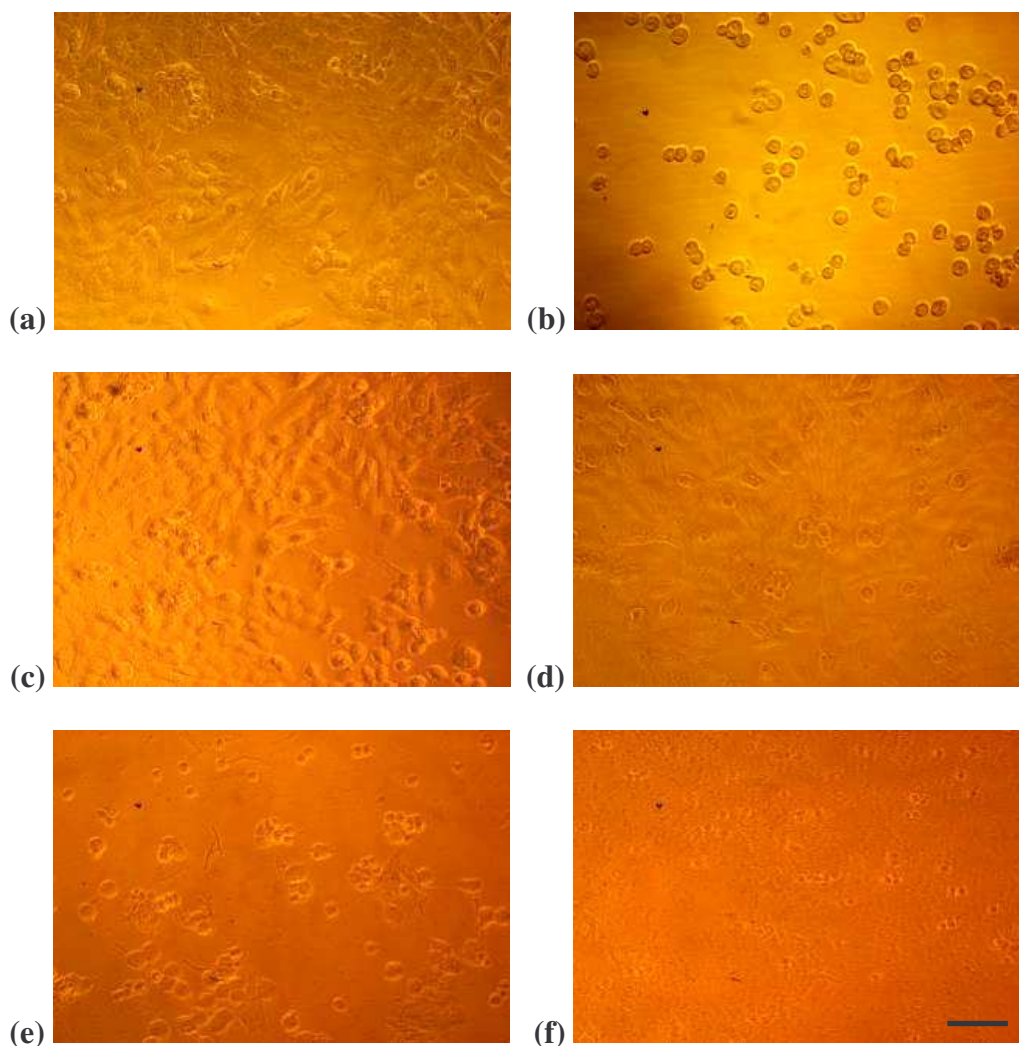
Rezultati preživljenja stanica dobiveni MTT testom mogu odražavati zastoj u staničnom ciklusu (citostatični učinak) ili pojavu stanične smrti (citotoksični učinak). Za određivanje stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom izabrane su također tri stanične linije, HeLa i njezina sublinija otporna na cisplatinu HeLa CK te A1235 stanice. S obzirom da su promjene u morfologiji stanica pod svjetlosnim mikroskopom bile inducirane vrlo brzo nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom te su upućivale na tip stanične smrti nekrozom, u sljedećem su koraku stanice nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom obojane etidij-bromidom i akridin-oranžom kako bi se prema morfologiji jezgre utvrdilo o kojem tipu stanične smrti se radi. Stanice su vrlo brzo nakon obrade pčelinjim otrovom ukazivale na morfologiju karakterističnu za tip stanične smrti nekrozom (Slike 26, 27 i 28). Jezgre obrađenih stanica su zbog propusnosti plazmatske membrane te ulaska etidij-bromida u stanicu i njegove interkalacije u molekulu DNA, bile ravnomjerno crveno obojane što ukazuje na izostanak kondenzacije kromatina tipičan za apoptozu. Jednak rezultat dobiven je i nakon obrade staničnih linija melitinom (Slike 29, 30 i 31), no kao i kod ispitivanja promjena u morfologiji stanica, mnogo manja koncentracija melitina je bila potrebna da bi se postigao isti učinak kao i nakon obrade pčelinjim otrovom.



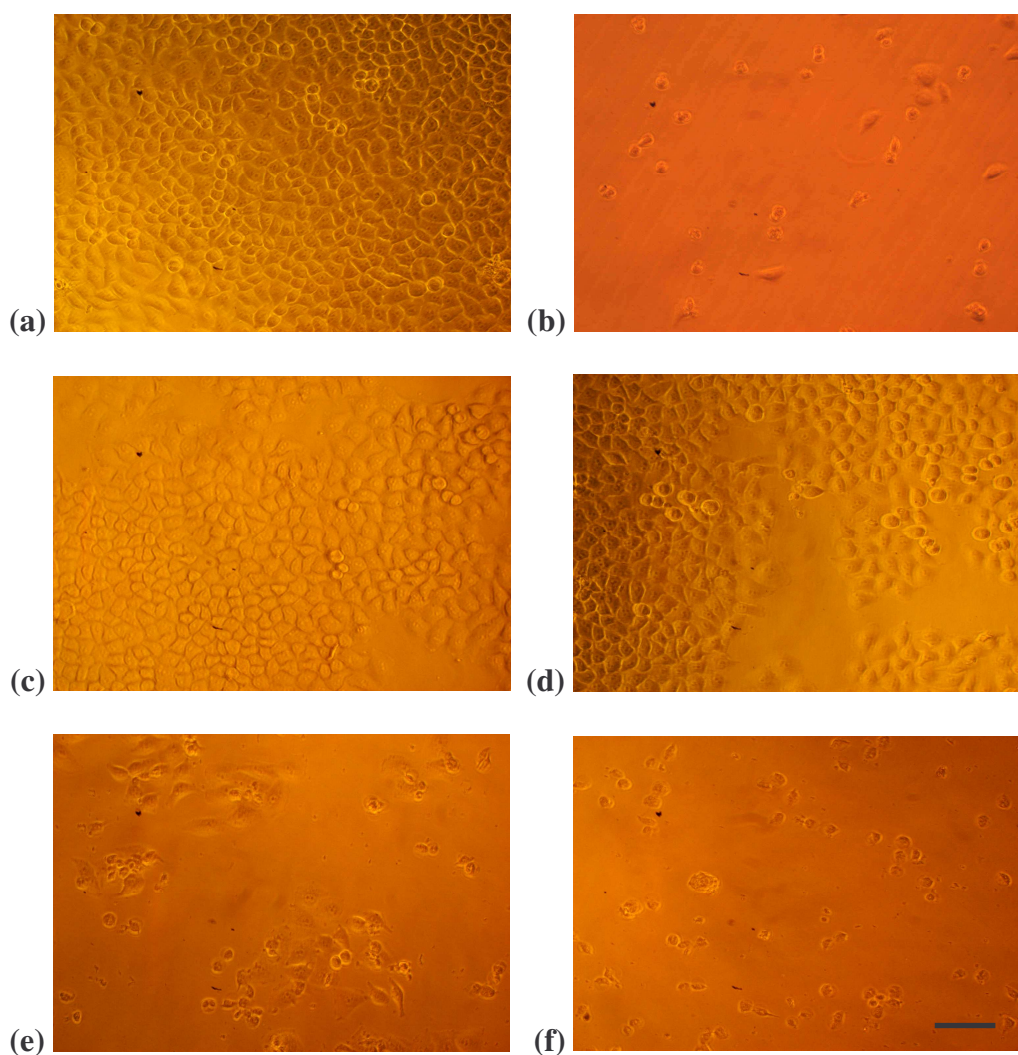
**Slika 20.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa nakon obrade pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 50 µg/ml (c), 60 µg/ml (d), 70 µg/ml (e) i 80 µg/ml (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40×. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20 µm.



**Slika 21.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod sublinije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice otporne na cisplatinu (cDDP) HeLa CK nakon obrade pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cDDP (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 50  $\mu\text{g/ml}$  (c), 60  $\mu\text{g/ml}$  (d), 70  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 80  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .

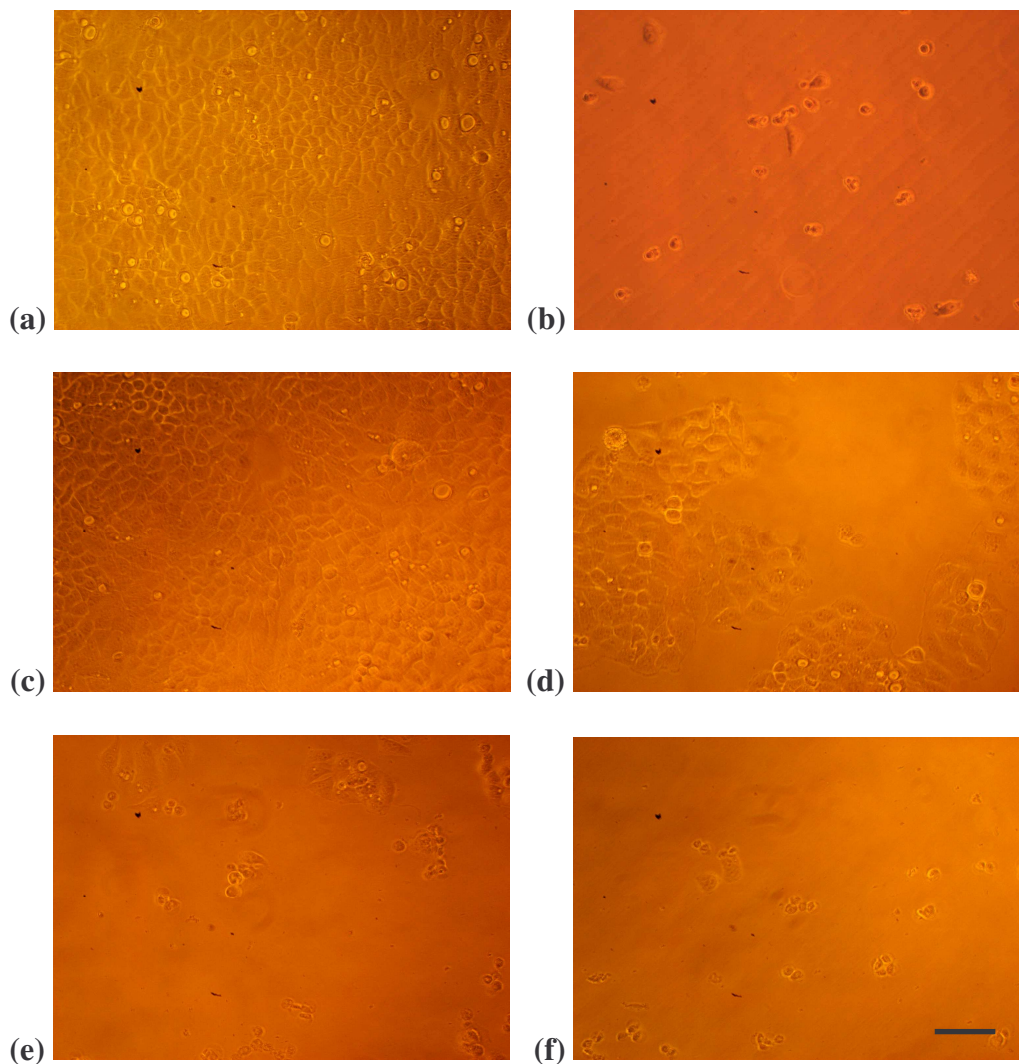


**Slika 22.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod linije ljudskog glioblastoma A1235 nakon obrade pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 20 µg/ml (c), 30 µg/ml (d), 40 µg/ml (e) i 50 µg/ml (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40×. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20 µm.

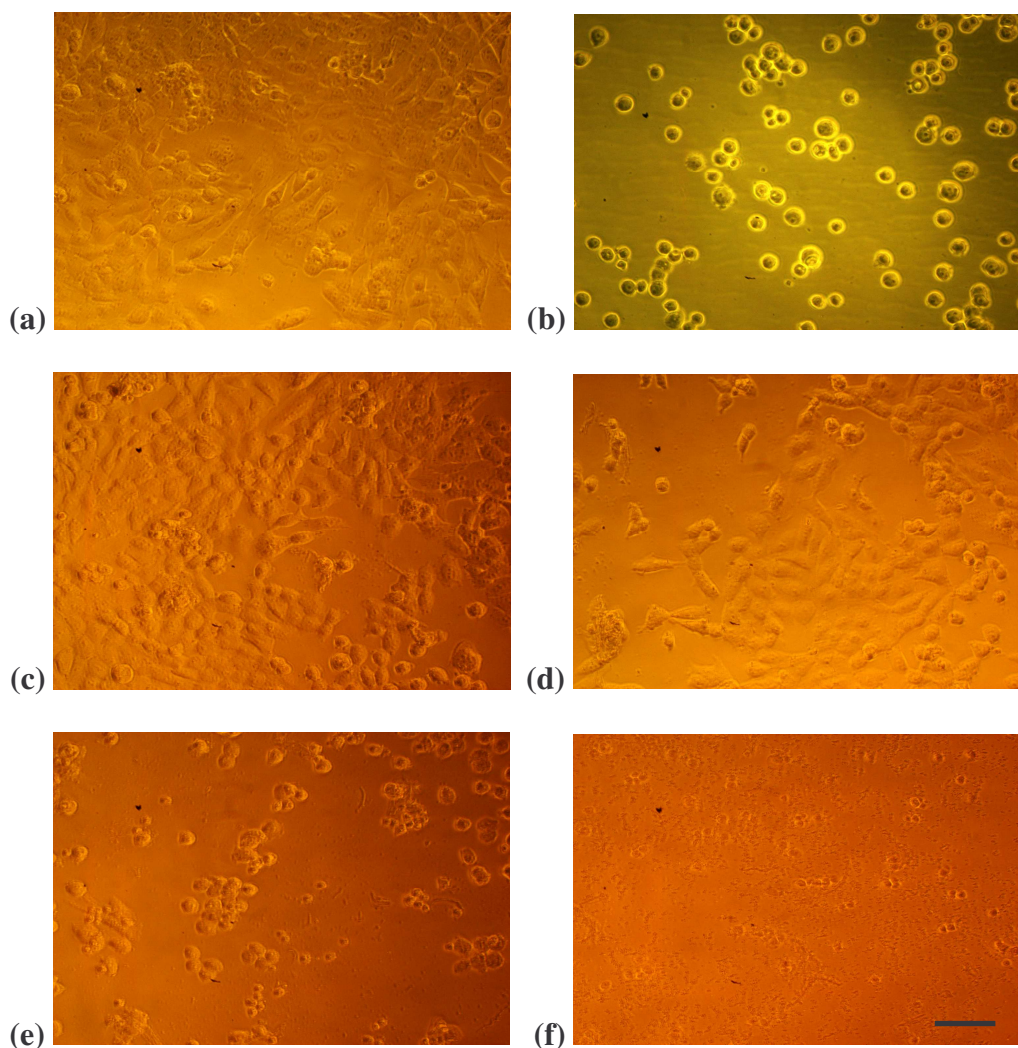


**Slika 23.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa nakon obrade melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 10 µg/ml (c), 15 µg/ml (d), 20 µg/ml (e) i 25 µg/ml (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40×. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20 µm.

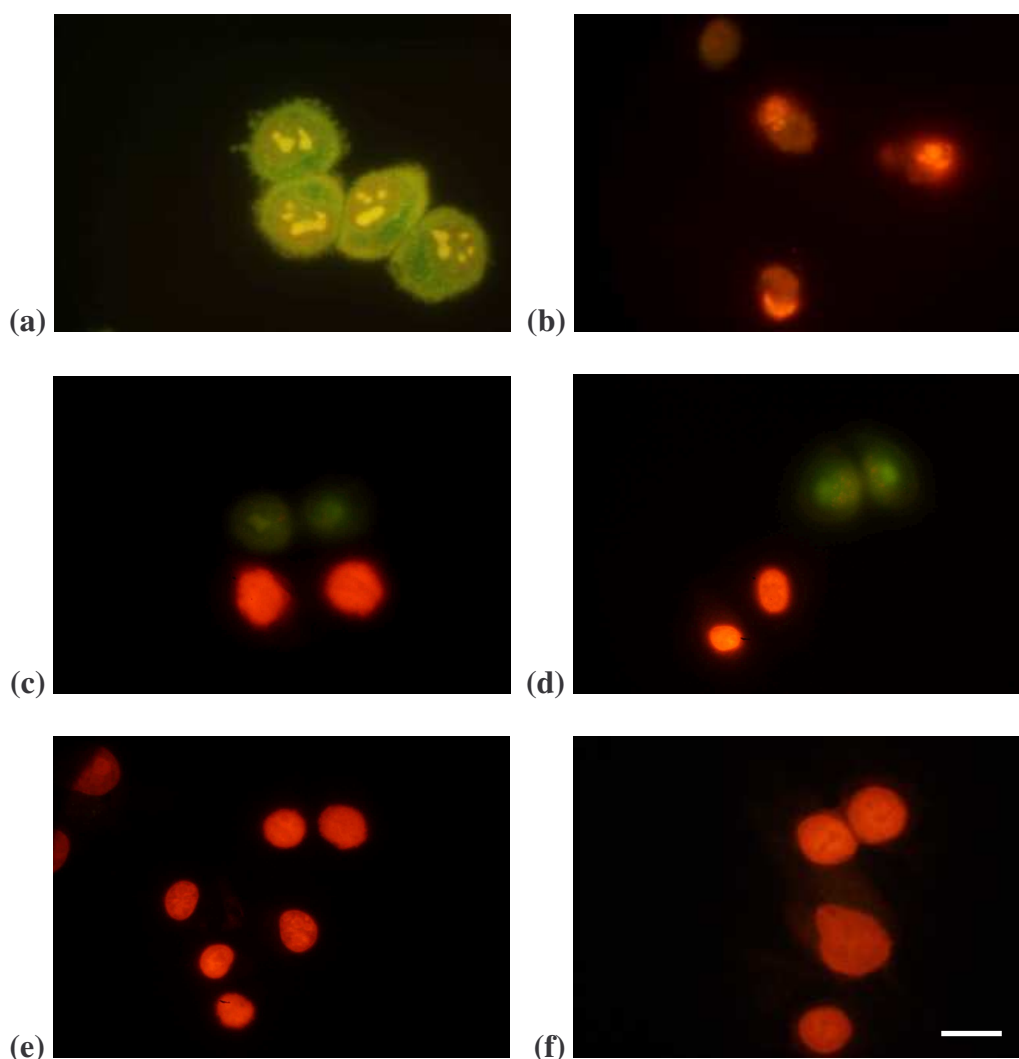




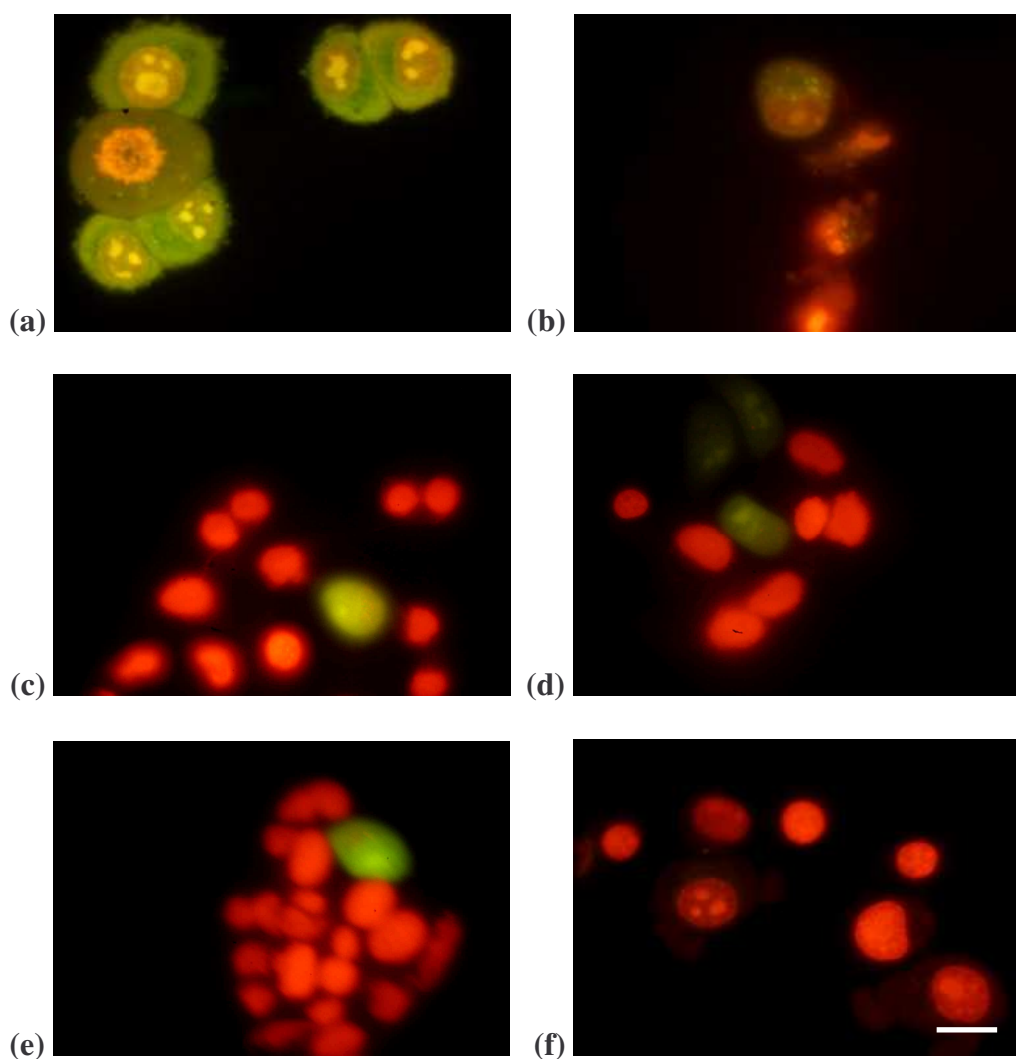
**Slika 24.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod sublinije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice otporne na cisplatinu (cDDP) HeLa CK nakon obrade melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cDDP (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 10 µg/ml (c), 15 µg/ml (d), 20 µg/ml (e) i 25 µg/ml (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40×. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20 µm.



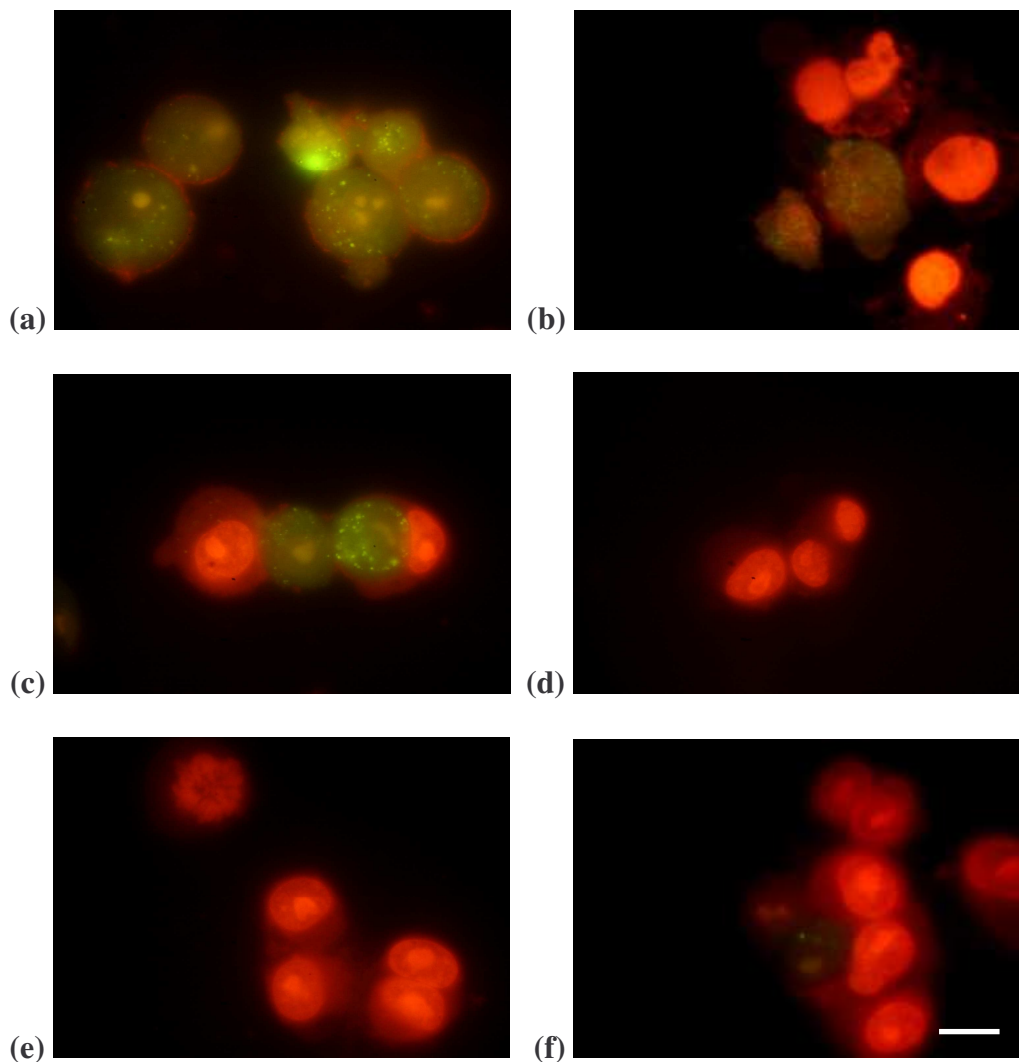
**Slika 25.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji kod linije ljudskog glioblastoma A1235 nakon obrade melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane intaktne stanice iz kontrolnog uzorka (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao morfološke promjene u stanicama u koncentracijama od 7,5  $\mu\text{g/ml}$  (c), 12,5  $\mu\text{g/ml}$  (d), 15  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 20  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .



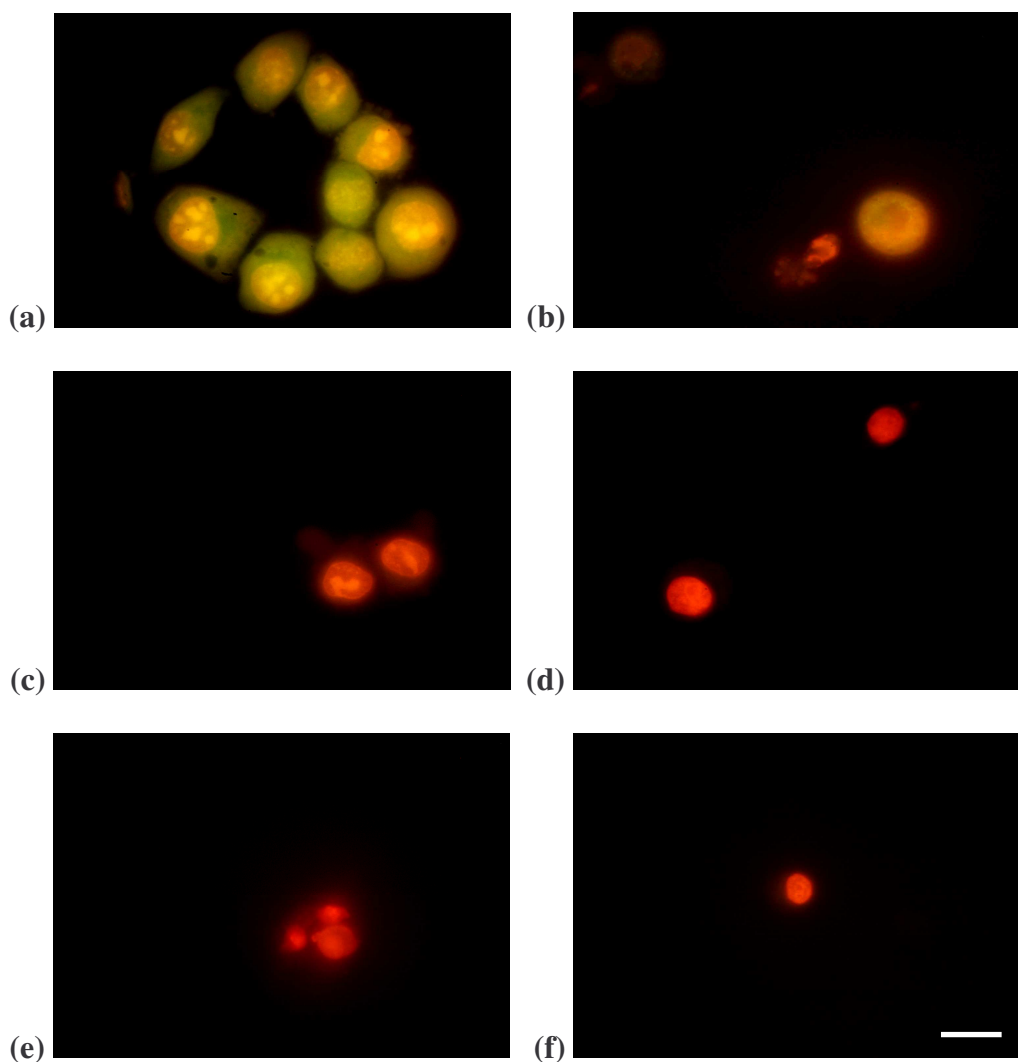
**Slika 26.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je nekrozu u stanicama u koncentracijama od 50  $\mu\text{g/ml}$  (c), 60  $\mu\text{g/ml}$  (d), 70  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 80  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



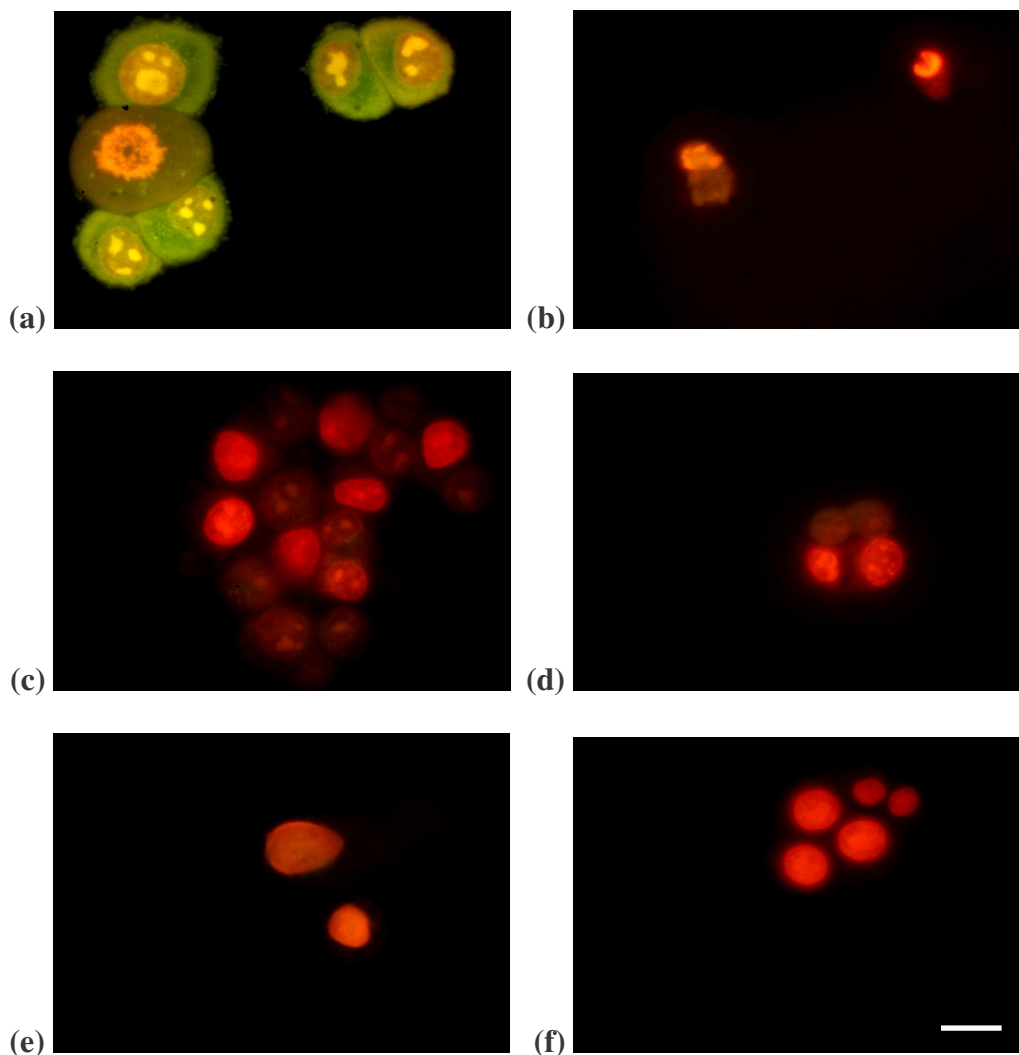
**Slika 27.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične sublinije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice otporne na cisplatinu (cDDP) HeLa CK pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cDDP (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je nekrozu u stanicama u koncentracijama od 50  $\mu\text{g/ml}$  (c), 60  $\mu\text{g/ml}$  (d), 70  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 80  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



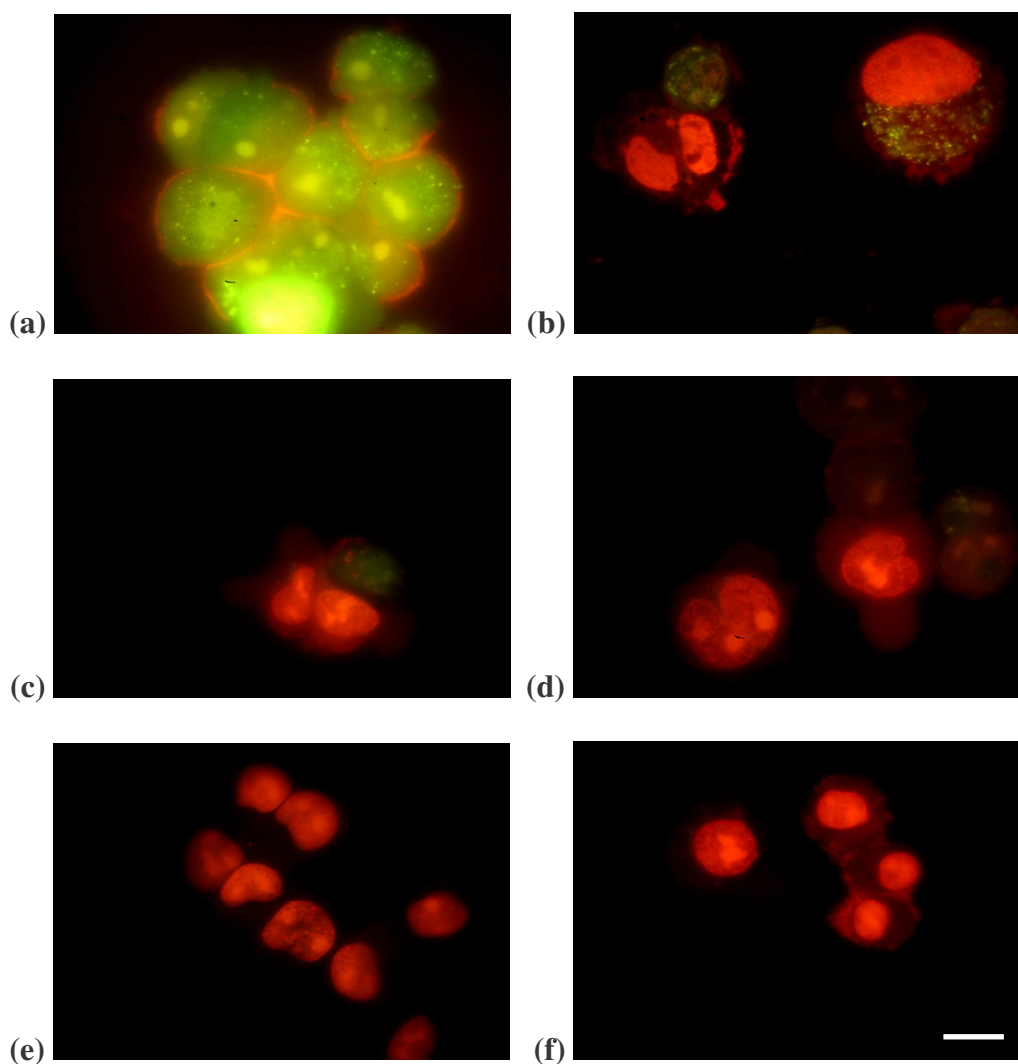
**Slika 28.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične linije ljudskog glioblastoma A1235 pčelinjim otrovom. Stanice su obrađene pčelinjim otrovom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Pčelinji otrov uzrokovao je nekrozu u stanicama nakon obrade u koncentracijama od 20  $\mu\text{g/ml}$  (c), 30  $\mu\text{g/ml}$  (d), 40  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 50  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



**Slika 29.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične sublinije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao nekrozu u stanicama u koncentracijama od 10  $\mu\text{g/ml}$  (c), 15  $\mu\text{g/ml}$  (d), 20  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 25  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



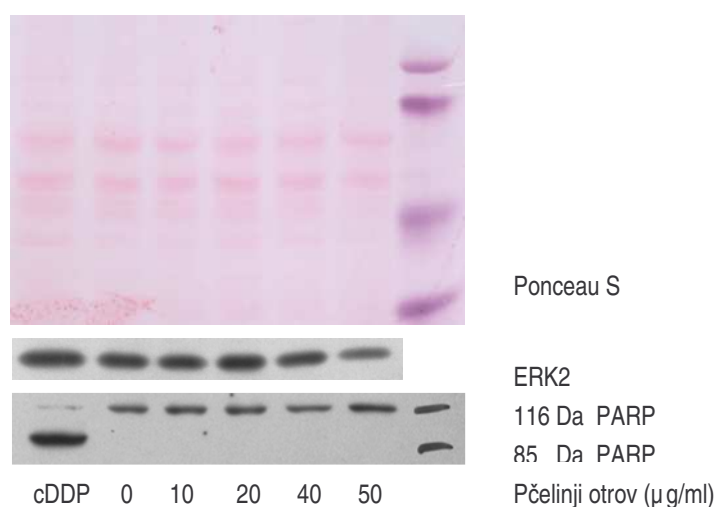
**Slika 30.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične sublinije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice otporne na cisplatinu (cDDP) HeLa CK melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cDDP (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao nekrozu u stanicama u koncentracijama od 10  $\mu\text{g/ml}$  (c), 15  $\mu\text{g/ml}$  (d), 20  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 25  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



**Slika 31.** Mikrofotografije određivanja tipa stanične smrti nakon obrade stanične linije ljudskog glioblastoma A1235 melitinom. Stanice su obrađene melitinom u trajanju od 1 h. Na slikama su prikazane kontrolne stanice (a) i stanice obrađene cisplatinom (cDDP) (b). Obrada cDDP predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Melitin je uzrokovao nekrozu u stanicama u koncentracijama od 7,5  $\mu\text{g/ml}$  (c), 12,5  $\mu\text{g/ml}$  (d), 15  $\mu\text{g/ml}$  (e) i 20  $\mu\text{g/ml}$  (f). Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Axiovert 35, Opton, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 100 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 526 nm i 595 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



U skladu sa rezultatima uočenima pod svjetlosnim i fluorescencijskim mikroskopom, analiza cijepanja proteina poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) Western blot metodom, kao tipične karakteristike apoptoze, pokazala je da kod HeLa stanične linije nakon obrade stanica pčelinjim otrovom ne dolazi do cijepanja PARP proteina (Slika 32). Nasuprot tome, obrada cisplatinom, koja je korištena kao kontrola apoptotske smrti, mikroskopski je ukazivala na tip stanične smrti apoptozom kod sva tri tipa ispitanih stanica, a nakon obrada HeLa stanica cisplatinom došlo je i do cijepanja PARP proteina.



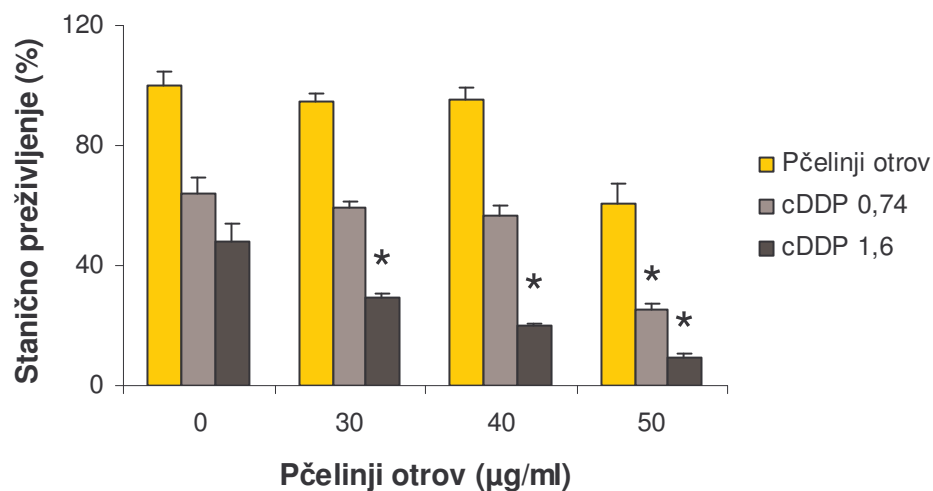
**Slika 32.** Određivanje tipa stanične smrti nakon obrade stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa pčelinjim otrovom. Stanice su rasle u kulturi u vremenskom periodu od 24 h nakon čega su obrađene različitim koncentracijama pčelinjega otrova od 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  i 50  $\mu\text{g/ml}$  u vremenskom periodu od 1 h. Nakon obrade pčelinjim otrovom ispitano je cijepanje poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP-a). Izolirani su ukupni stanični proteini koji su razdvojeni pomoću SDS-PAGE te su analizirani Western blot metodom s odgovarajućim antitijelima. Membrana obojana s Ponceau S i ekspresija ERK2 proteina predstavljaju kontrolu jednakog nanošenja uzorka. Obrada cisplatinom (cDDP) koncentracije 20  $\mu\text{M}$  tijekom 24 h predstavlja kontrolu apoptotske smrti. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri neovisna pokusa.

#### 4.1.4. Učinak pčelinjega otrova na djelovanje citostatika

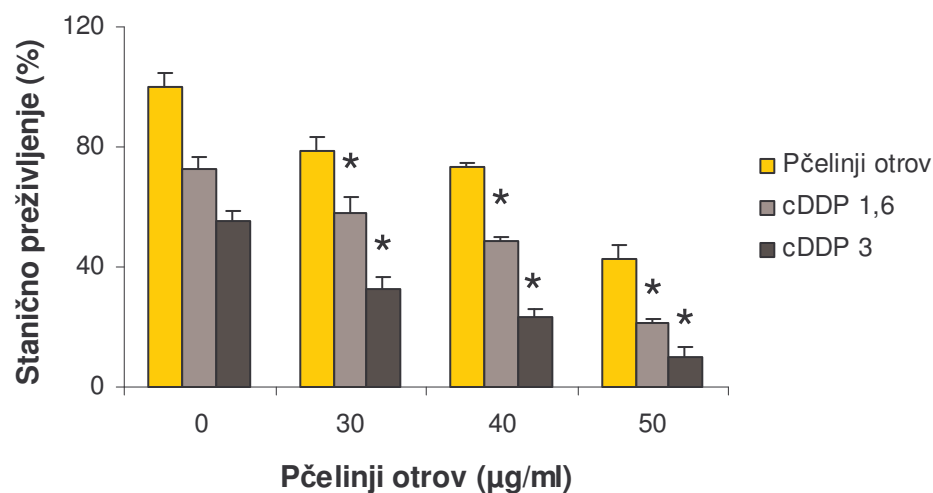
Da bi se ispitao učinak pčelinjega otrova na djelovanje cisplatine, stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i ljudskog karcinoma grkljana Hep-2 obrađene su cisplatinom prema postupku opisanom u odlomku 3.1.1. ove doktorske disertacije, nakon čega su izolirane njihove sublinije HeLa CK i CK2 otporne na cisplatinu. HeLa CK i CK2 linije pokazuju značajnu otpornost na cisplatinu u odnosu na njihove roditeljske linije.

##### 4.1.4.1 Osjetljivost stanica na pčelinji otrov i njegovo djelovanje sa cisplatinom

Odabrane stanične linije pokazale su se osjetljivima na djelovanje pčelinjega otrova u visokim koncentracijama. Pčelinji otrov djelovao je citotoksično na stanice već nakon 1 h izlaganja što ukazuje na njegovo brzo djelovanje oštećivanjem staničnih membrana vodeći stanice u smrt nekrozom. Da bi smo ispitali utjecaj pčelinjega otrova na citotoksičnost cisplatine, stanice su obrađene pčelinjim otrovom u vremenu od 1 h nakon čega je dodana cisplatina uz daljnje prisustvo pčelinjega otrova. Obrada pčelinjim otrovom djelovala je aditivno na postojeću citotoksičnost cisplatine (Slike 33 i 34). Obje stanične linije te njihove sublinije otporne na cisplatinu pokazale su jednak učinak obrade pčelinjim otrovom na citotoksičnost cisplatine ukazujući na aditivan učinak. Također, razlika u otpornosti HeLa i HeLa CK te Hep-2 i CK2 stanica na cisplatinu nije se promijenila uslijed obrade pčelinjim otrovom.

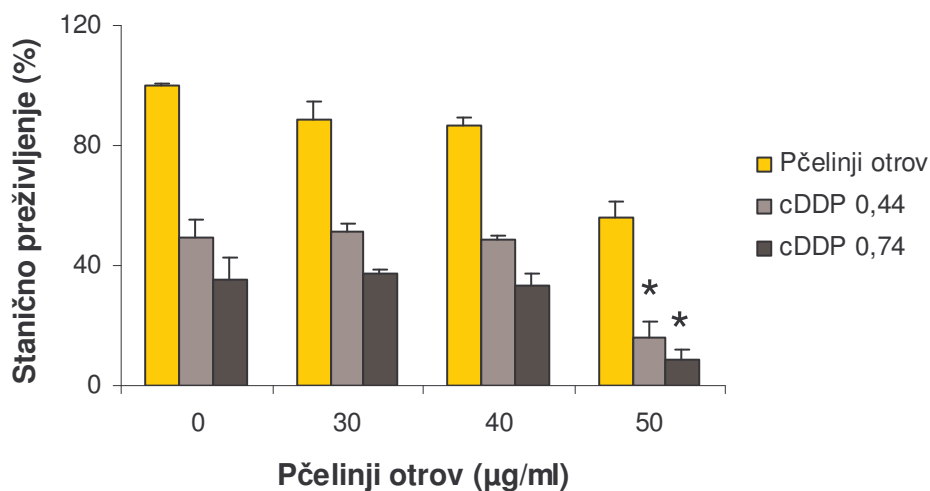


(a)

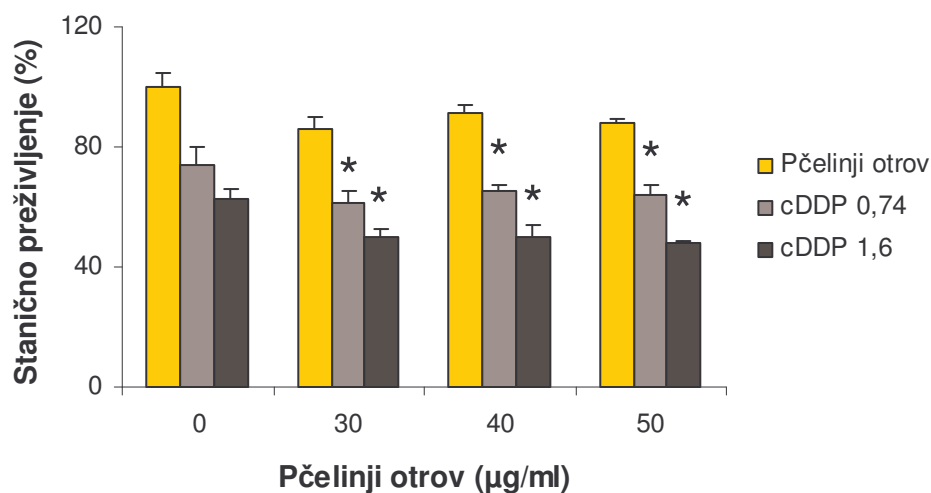


(b)

**Slika 33.** Osjetljivost HeLa (a) i HeLa CK (b) stanica na obradu pčelinjim otrovom te na cisplatinu (cDDP) uz obradu pčelinjim otrovom. Stanice su izložene pčelinjem otrovom u različitim koncentracijama (30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, i 60 µg/ml) u trajanju od 1 h nakon čega je dodana ekvitoksična koncentracija cisplatinine (0,74 µg/ml i 1,6 µg/ml za HeLa te 1,6 µg/ml i 3 µg/ml za HeLa CK). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno u odnosu na pripadajuću obradu cDDP ( $P < 0.05$ ).



a)



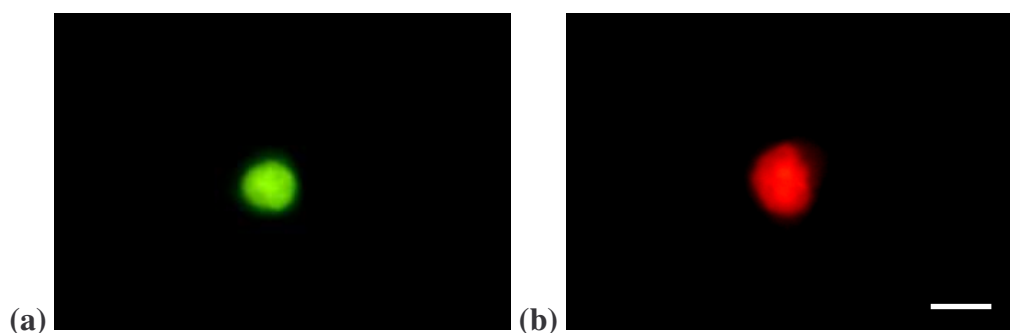
(b)

**Slika 34.** Osjetljivost HEP-2 (a) i CK2 (b) stanica na obradu pčelinjim otrovom te na cisplatinu (cDDP) uz obradu pčelinjim otrovom. Stanice su izložene pčelinjem otrovom u različitim koncentracijama (30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, i 60 µg/ml) u trajanju od 1 h nakon čega je dodana ekvivalentna koncentracija cisplatine (0,44 µg/ml i 0,74 µg/ml za HEP-2 te 0,74 µg/ml i 1,6 µg/ml za CK2). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno u odnosu na pripadajuću obradu cDDP ( $P < 0.05$ ).

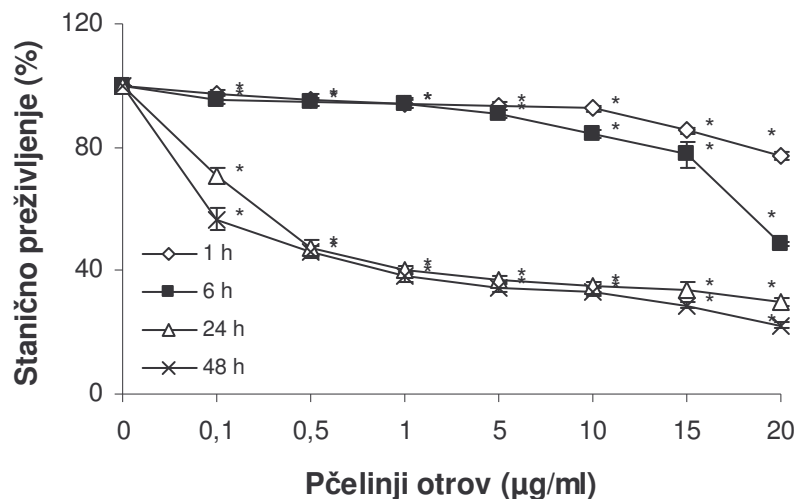
## 4.2. Utjecaj pčelinjega otrova i melitina na ljudske limfocite iz periferne krvi

### 4.2.1. Učinak pčelinjega otrova i melitina na preživljenje limfocita

Preživljenje limfocita nakon obrade pčelinjim otrovom određeno je na osnovu različitog bojanja. Žive stanice sa funkcionalnom membranom su ravnomjerno zeleno obojene, dok mrtve stanice imaju ravnomjerno crveno obojenu jezgru (Slika 35). Rezultati preživljenja limfocita ukazuju na izrazito visok stupanj stanične smrti uzrokovan obradom pčelinjim otrovom u uvjetima *in vitro*. Stanično preživljenje kod najviše koncentracije pčelinjega otrova smanjeno je za  $22,86 \pm 1,14\%$  nakon 1 h, za  $51,21 \pm 0,58\%$  nakon 6 h, za  $70,00 \pm 1,14\%$  nakon 24 h te je nakon 48 h zabilježen najveći pad preživljena za  $77,80 \pm 0,84\%$  (Slika 36). Rezultati također ukazuju da je stanična smrt ovisna o koncentraciji otrova i vremenu izlaganja sa najvišim postotkom stanične smrti zabilježenim nakon 48 h kod koncentracije od  $20 \mu\text{g/ml}$ .

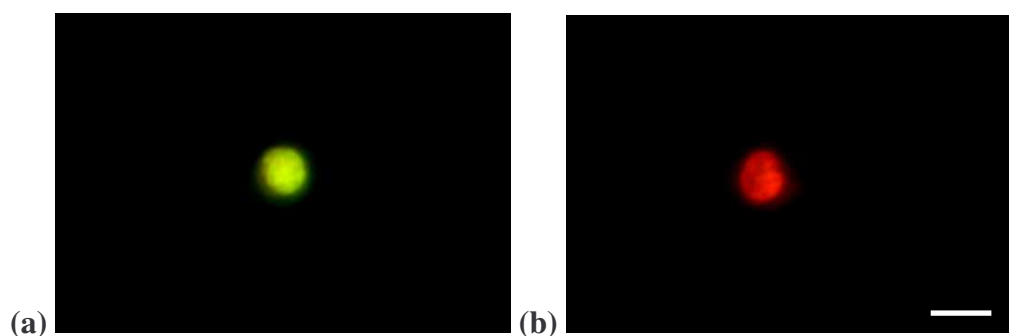


**Slika 35.** Mikrofotografije staničnog preživljenja u kontrolnim ljudskim limfocitima periferne krvi (a) i nakon obrade ljudskih limfocita periferne krvi pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $10 \mu\text{g/ml}$  u vremenskom trajanju od 24 h (b) u uvjetima *in vitro*. Stanice su istovremeno bojane fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom. Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus AX-70, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja  $40\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 530 nm i 605 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od  $10 \mu\text{m}$ .

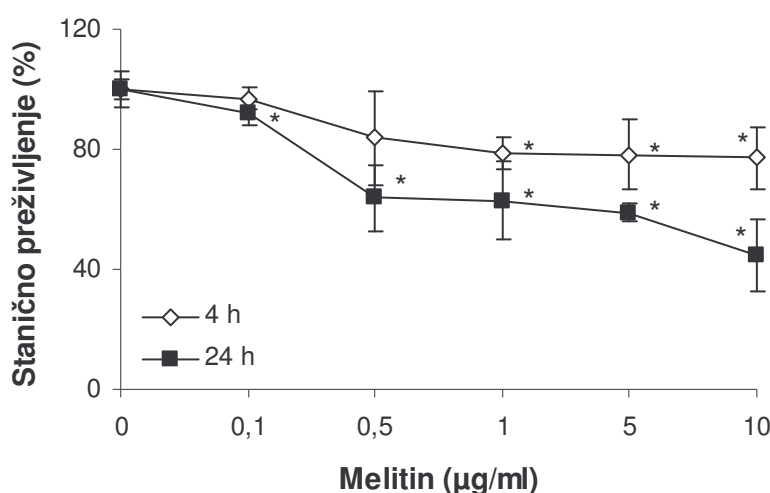


**Slika 36.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u uvjetima *in vitro* u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h, 6 h, 24 h i 48 h. Preživljenje stanica je određeno istovremenim bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus AX-70, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40× s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 530 nm i 605 nm. U pojedinom vidnom polju izbrojano je 100 stanica, a za svaki uzorak obrađeno je po nekoliko vidnih polja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. \* Statistički značajno u odnosu na pripadajuću kontrolu ( $P < 0,05$ ).

Slični rezultati dobiveni su i nakon obrade melitinom, ali je i ovdje koncentracija potrebna za isti učinak bila znatno manja (Slika 37). Stanično preživljenje kod najviše koncentracije melitina smanjeno je za  $22,98 \pm 10,17\%$  nakon 4 h, dok je nakon 24 h zabilježen najveći pad preživljenja za  $55,43 \pm 11,83\%$  (Slika 38). Rezultati također ukazuju da je stanična smrt ovisna o koncentraciji melitina i vremenu izlaganja sa najvišim postotkom stanične smrti zabilježenim nakon 24 h kod koncentracije od 10 µg/ml. Visoki postotak stanične smrti koja nastupa već nakon kratkog vremena ukazuje na degradaciju stanične membrane nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom.



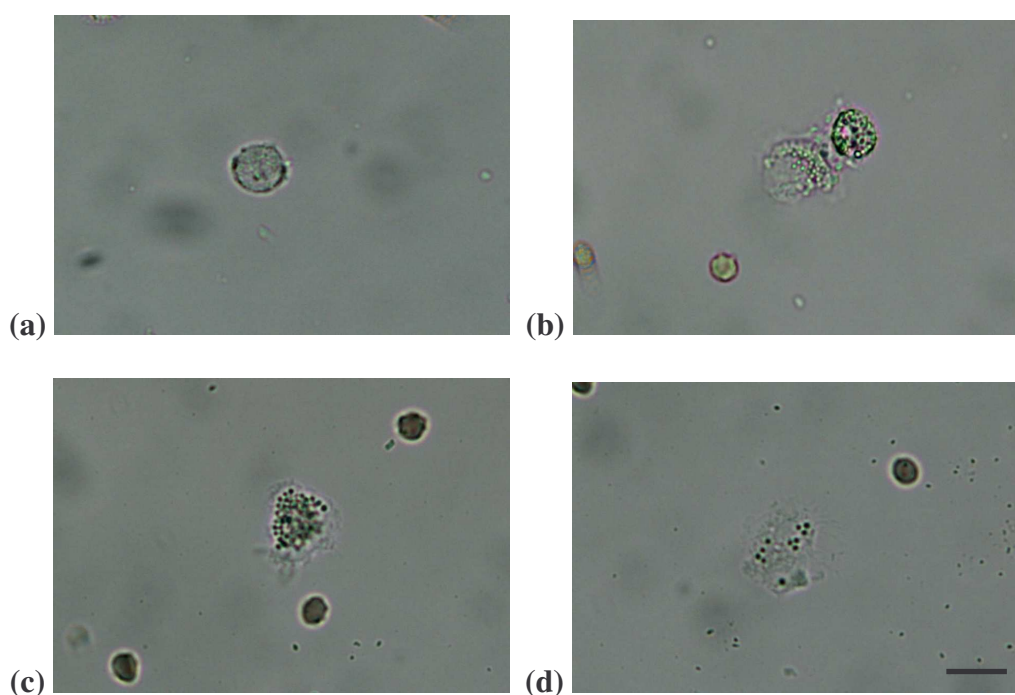
**Slika 37.** Mikrofotografije staničnog preživljenja u kontrolnim ljudskim limfocitima periferne krvi (a) i nakon obrade ljudskih limfocita periferne krvi melitinom u koncentraciji od 5  $\mu\text{g/ml}$  u vremenskom trajanju od 24 h (b) u uvjetima *in vitro*. Stanice su istovremeno bojane fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom. Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus AX-70, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 530 nm i 605 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .



**Slika 38.** Grafički prikaz staničnog preživljenja u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade melitinom u uvjetima *in vitro* u različitim koncentracijama (0,1  $\mu\text{g/ml}$  do 10  $\mu\text{g/ml}$ ) i vremenskim periodima od 4 h i 24 h. Preživljenje stanica je određeno istovremenim bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensima etidij-bromidom i akridin-oranžom pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus AX-70, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 490 nm, emisije od 530 nm i 605 nm. U pojedinom vidnom polju izbrojano je 100 stanica, a za svaki uzorak obrađeno je po nekoliko vidnih polja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SE. \* Statistički značajno u odnosu na pripadajuću kontrolu ( $P < 0,05$ ).

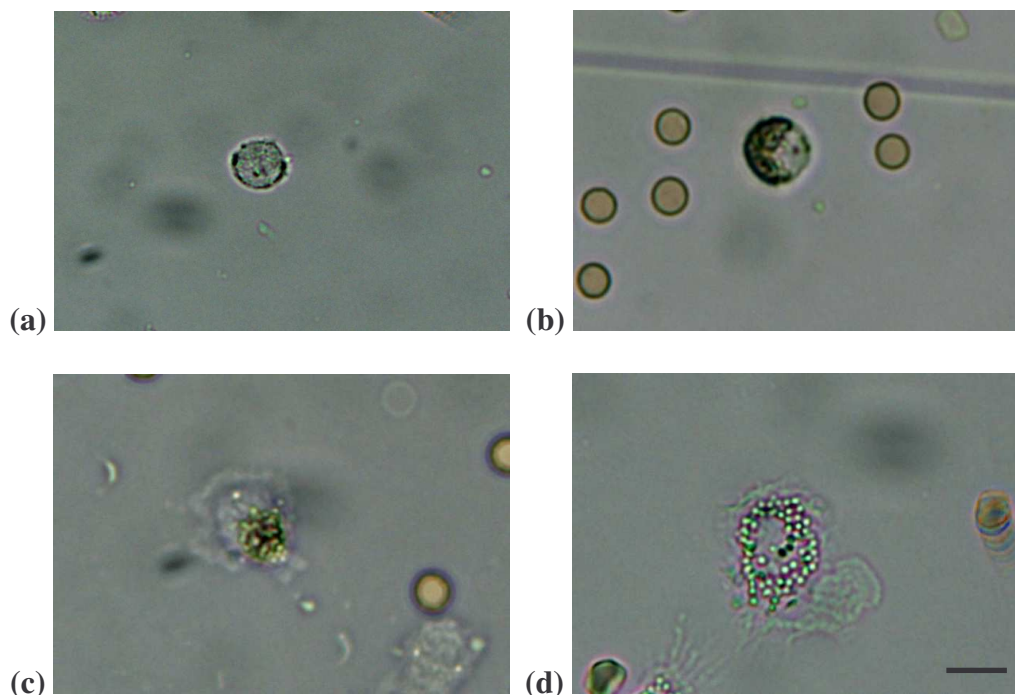
## 4.2.2. Učinak pčelinjega otrova i melitina na morfologiju stanica

Pčelinji otrov i melitin uzrokovali su morfološke promjene na limfocitima koje se očituju u promjenama na membranama koje nastupaju ubrzo nakon izlaganja (Slike 39 i 40). Također, kod duže izloženosti, nastupila je granulacija cijelih stanica koja završava konačnom lizom stanica koja je nastupila kod većih koncentracija pčelinjega otrova i melitina te dužih vremenskih izlaganja.



**Slika 39.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom. Ljudski limfociti periferne krvi izloženi su pčelinjem otrovu u vremenskom periodu od 1 h i 24 h u koncentracijama od 1  $\mu\text{g/ml}$  i 10  $\mu\text{g/ml}$ . Na slikama je prikazana intaktna stanica iz kontrolnog uzorka (a). Pčelinji otrov je uzrokovao promjene na membrani (b) i granulaciju stanica (c) nakon čega je došlo i do liziranja stanica (d). Stanice su slikane pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Nikon Eclipse E400 POL, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .

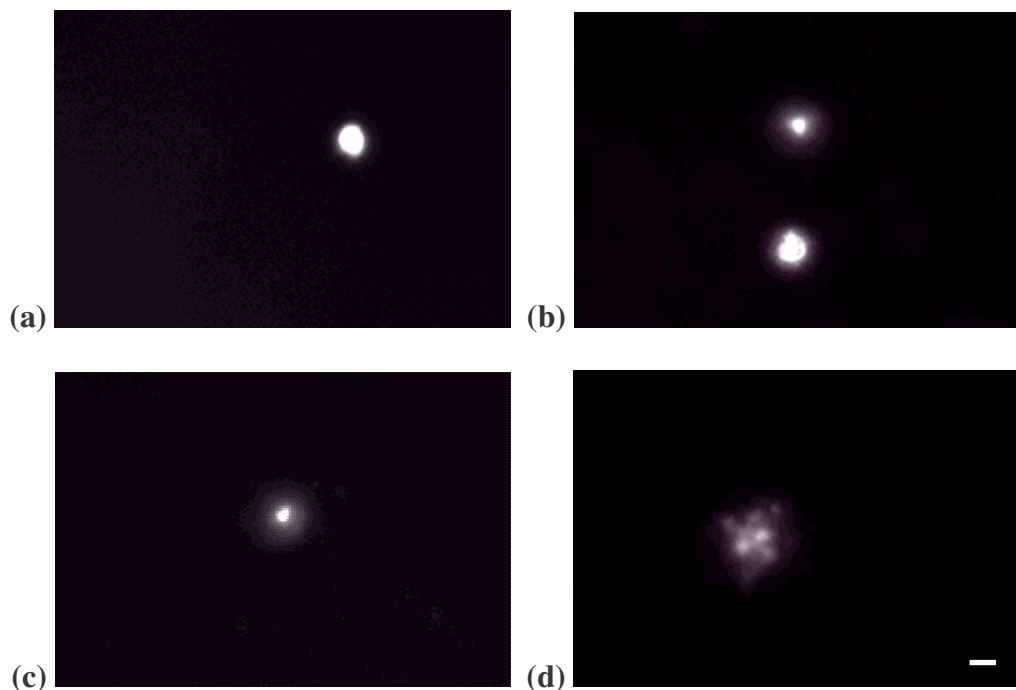




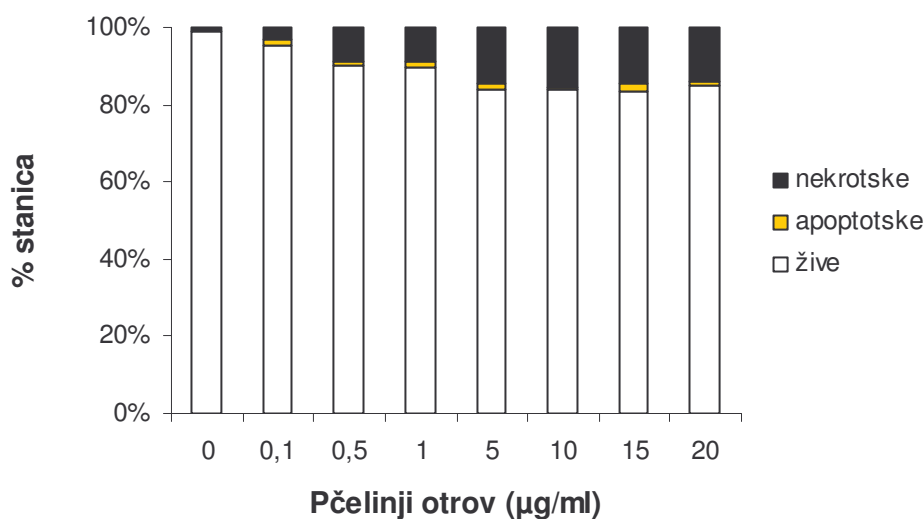
**Slika 40.** Mikrofotografije promjena u staničnoj morfologiji u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade melitinom. Ljudski limfociti periferne krvi izloženi su melitinu u vremenskom periodu od 4 h i 24 h u koncentracijama od 1  $\mu\text{g/ml}$  i 5  $\mu\text{g/ml}$ . Na slikama je prikazana intaktna stanica iz kontrolnog uzorka (a). Melitin je uzrokovao promjene na membrani (b) i granulaciju stanica (c) nakon čega je došlo i do liziranja stanica (d). Stanice su slikane pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Nikon Eclipse E400 POL, Tokyo, Japan), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3. Određivanje tipa stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom

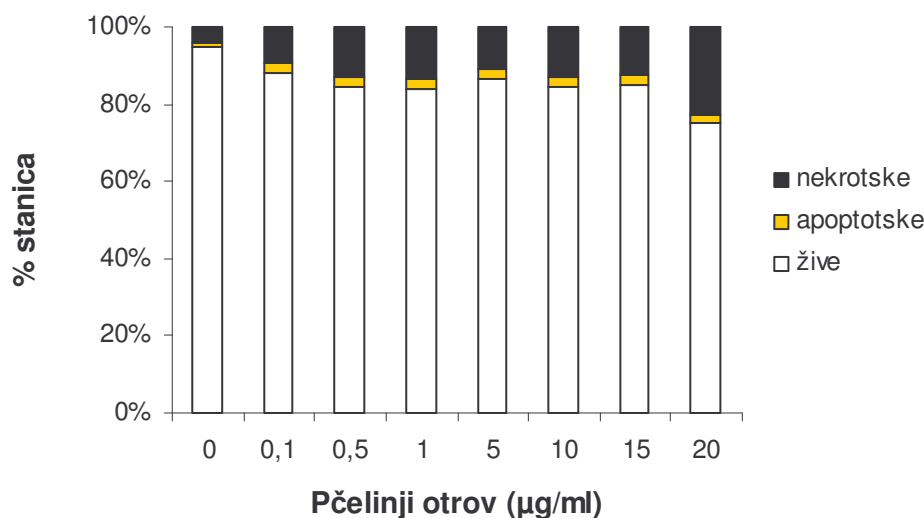
Nakon obrade pčelinjim otrovom, u rasponu koncentracija od 0,1  $\mu\text{g/ml}$  do 20  $\mu\text{g/ml}$  u različitim vremenskim periodima, pomoću testa stanične difuzije na osnovu razlike u morfologiji stanica utvrđen je tip stanične smrti u vidu apoptoze i nekroze (Slika 41). Obrada pčelinjim otrovom dovela je do povećanja oba tipa stanične smrti u odnosu na neizloženu kontrolu te je postotak apoptoze i nekroze bio ovisan i o koncentraciji pčelinjega otrova i o vremenu izloženosti (Slike 42 i 43). Većina pregledanih stanica imala je izgled karakterističan za nekrozu te je taj tip stanične smrti bio povišen i u odnosu na tip stanične smrti putem apoptoze. Uspoređujući oba tipa stanične smrti zaključak je da je stanična smrt uzrokovana nekrozom osnovni tip stanične smrti nakon obrade pčelinjim otrovom.



**Slika 41.** Mikrofotografije tipa stanične smrti u ljudskim limfocitima periferne krvi u agaroznom gelu prilikom izvedbe testa stanične difuzije nakon obrade pčelinjim otrovom u uvjetima *in vitro*. Slike prikazuju živi limfocit iz neizloženog kontrolnog uzorka (a) te limfocite iz uzoraka ozloženih pčelinjem otrovu gdje je pčelinji otrov uzrokovao staničnu smrt u vidu apoptoze (b,c) i nekroze u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/ml}$  u vremenskom periodu od 24 h (d). Stanice su bojane interkalirajućim agensom etidij-bromidom. Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 10  $\mu\text{m}$ .

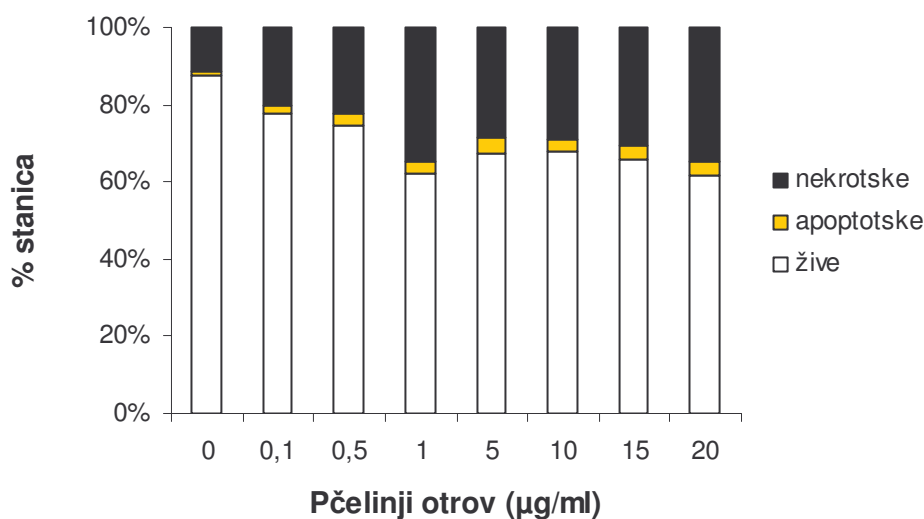


(a)

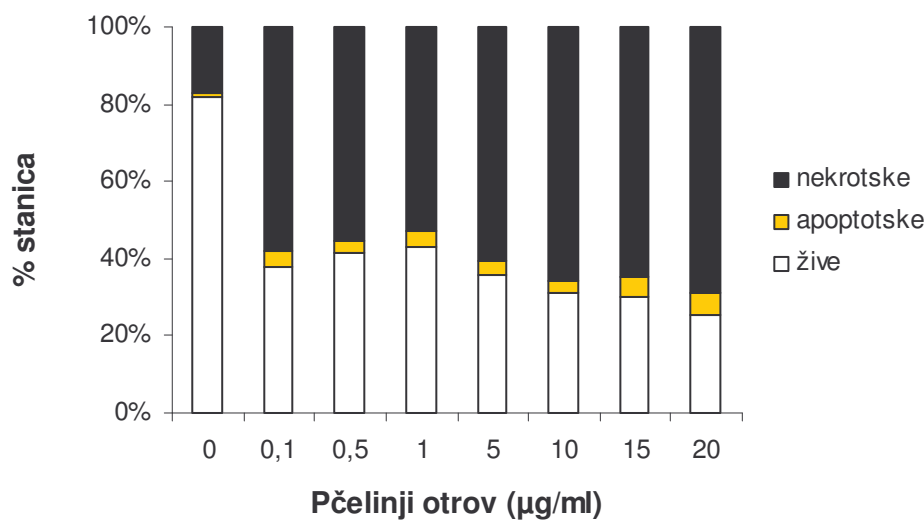


(b)

**Slika 42.** Grafički prikaz udjela apoptoze i nekroze kao tipa stanične smrti određen testom stanične difuzije u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u uvjetima *in vitro* u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h (a) i 6 h (b). Udio stanične smrti određen je bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensom etidij-bromidom pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25× s ekscitacijskim filterom od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm.



(a)

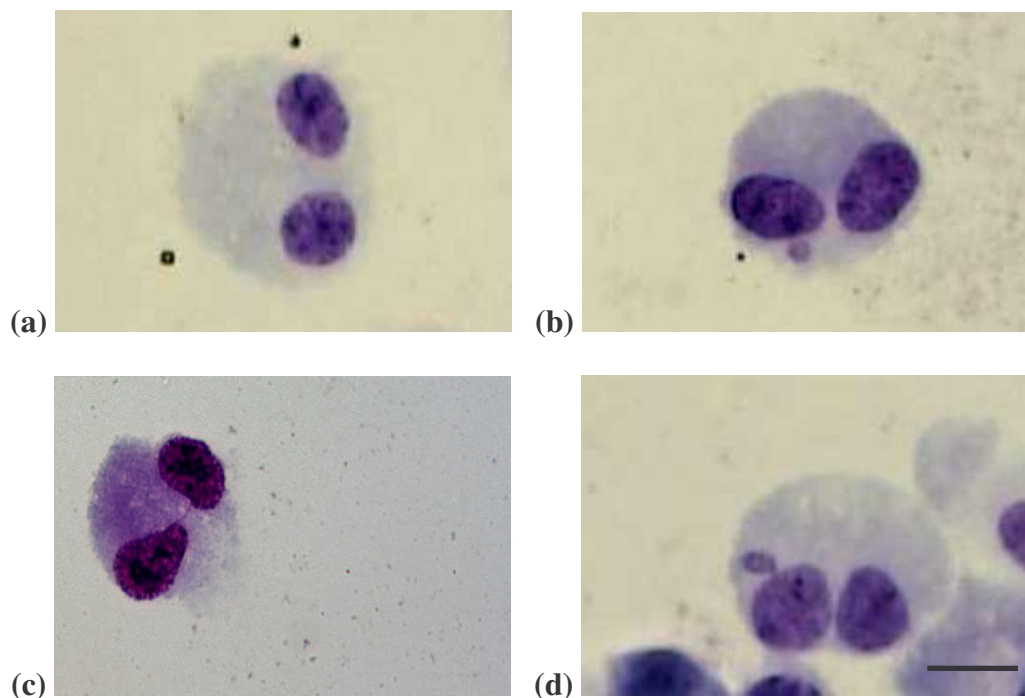


(b)

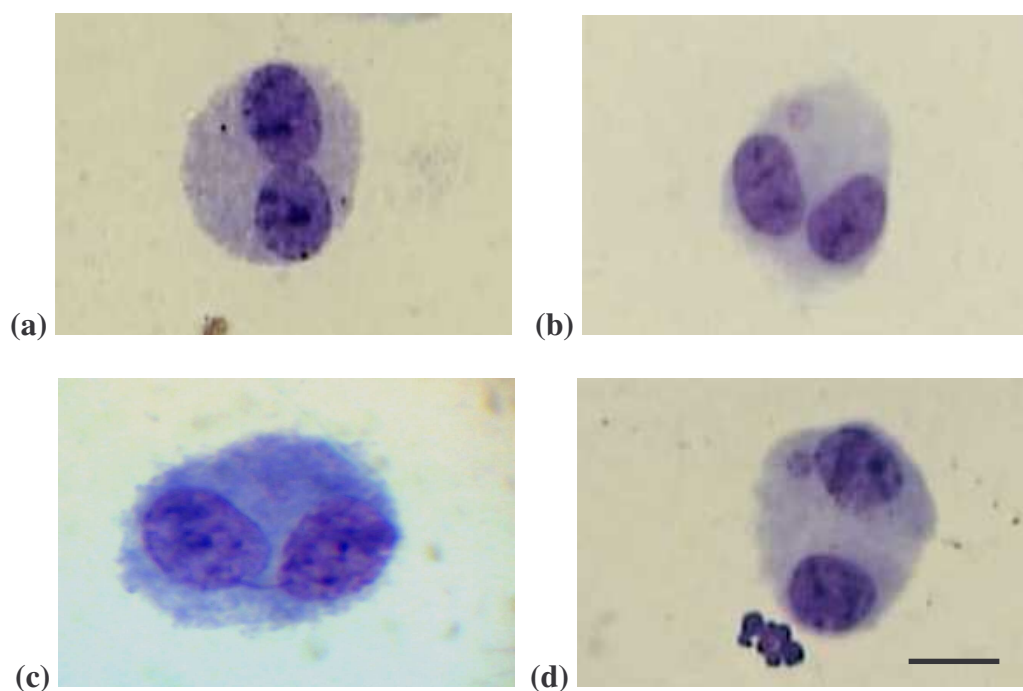
**Slika 43.** Grafički prikaz udjela apoptoze i nekroze kao tipa stanične smrti određen testom stanične difuzije u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u uvjetima *in vitro* u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 24 h (a) i 48 h (b). Udio stanične smrti određen je bojanjem fluorescentnim interkalirajućim agensom etidij-bromidom pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25× s ekscitacijskim filterom od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm.

4.2.4. Indukcija mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova

Nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, ispitali smo njihov utjecaj na citogenetička oštećenja stanica mikronukleus testom. U tu svrhu mjereni su različiti parametri mikronukleus testa poput samih mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova kao pokazatelja kromosomskih oštećenja i malformacija diobenog vretena (Slike 44 i 45). Sva tri parametra pokazala su značajan porast u odnosu na kontrolne uzorke i taj je porast bio ovisan o koncentraciji pčelinjega otrova (Tablice 3, 4 i 5) i melitina (Tablice 6, 7 i 8) te vremenu izlaganja. Od tri mjerena parametra, nameće se zaključak da su ukupan broj mikronukleusa i jezgrinih pupova najbolji pokazatelji izloženosti pčelinjem otrovu i melitinu.



**Slika 44.** Mikrofotografije preparata dobivenih mikronukleus (CBMN) testom. Binuklearni ljudski limfocit periferne krvi u kontrolnom uzorku (a), binuklearni limfocit sa mikronukleusom (b), binuklearni limfocit sa nukleoplazmatskim mostom (c) i binuklearni limfocit sa jezgrinim pupom (d) iz uzoraka izloženih pčelinjem otrovu u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/ml}$  i vremenskom periodu od 24 h u uvjetima *in vitro*. Dobiveni su preparati osušeni na zraku i obojani 10%-tnom vodenom otopinom citološke boje Giemsa. Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 200M, Göttingen, Germany) koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 45.** Mikrofotografije preparata dobivenih mikronukleus (CBMN) testom. Binuklearni ljudski limfocit periferne krvi u kontrolnom uzorku (a), binuklearni limfocit sa mikronukleusom (b), binuklearni limfocit sa nukleoplazmatskim mostom (c) i binuklearni limfocit sa jezgrinim pupom (d) iz uzoraka izloženih melitinu u koncentraciji od 5  $\mu\text{g/ml}$  i vremenskom periodu od 24 h u uvjetima *in vitro*. Dobiveni su preparati osušeni na zraku i obojani 10%-tnom vodenom otopinom citološke boje Giemsa. Stanice su slikane pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 200M, Göttingen, Germany), koristeći objektiv povećanja 40 $\times$ . Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .

**Tablica 3.** Učestalost mikronukleusa (MNI) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim binuklearnim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h, 6 h, 24 h i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 MNI	2 MNI	3 MNI	4 MNI	∑ MNI
	0	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,33
	0,1	4,00±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,00±1,15
	0,5	4,33±0,33	0,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	6,00±1,00*
1	1	3,67±0,67	0,67±0,33	0,33±0,33	0,33±0,33	7,33±2,60*
	5	6,67±1,20*	1,67±0,33	1,33±0,33	0,00±0,00	14,00±2,52*
	10	6,67±0,67*	1,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	10,33±1,45*
	15	11,33±0,33*	3,33±0,88*	1,67±0,33	0,67±0,67	25,67±2,85*
	20	15,33±1,45*	4,67±0,33*	3,33±0,33*	2,33±0,33*	44,00±2,65*
	0	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,33
	0,1	8,33±1,45*	1,33±0,88	0,00±0,00	0,33±0,33	12,33±1,45*
	0,5	8,67±0,33*	2,33±0,33*	3,33±0,33*	0,33±0,33	24,67±2,33*
6	1	7,33±3,18*	1,33±0,33	0,33±0,33	3,67±0,33*	25,33±2,60*
	5	10,33±0,88*	3,67±1,20*	2,33±0,67*	0,67±0,67	27,00±7,02*
	10	12,33±0,88*	3,67±1,20*	2,33±0,67*	2,33±0,33*	36,00±2,08*
	15	9,67±1,20*	3,33±0,33*	1,33±0,33	2,67±0,67*	31,00±3,21*
	20	18,33±0,88*	5,67±1,20*	4,33±0,33*	1,67±0,67	49,33±3,18*
	0	3,33±0,88	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±0,88
	0,1	12,33±0,33*	3,67±0,33*	3,33±0,33*	1,33±0,33	35,00±2,08*
	0,5	13,67±0,67*	4,33±1,45*	1,33±0,33	0,67±0,67	29,00±7,09*
24	1	13,33±0,88*	2,67±1,20*	3,33±0,33*	0,00±0,00	28,67±2,67*
	5	12,33±0,88*	6,67±0,33*	1,67±0,33	0,67±0,33	33,33±3,28*
	10	14,33±0,88*	6,33±2,03*	2,33±0,33*	1,67±0,33	40,67±4,67*
	15	11,67±0,67*	3,67±0,67*	0,67±0,67	0,00±0,00	21,00±2,00*
	20	12,67±0,67*	3,33±0,33*	0,67±0,67	0,67±0,67	24,00±3,06*
	0	1,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±0,67
	0,1	12,33±1,45*	2,67±0,67*	1,33±0,33	0,33±0,33	23,00±5,03*
	0,5	13,67±1,20*	3,33±0,88*	2,33±0,67*	0,33±0,33	28,67±6,89*
48	1	15,67±1,20*	6,33±0,33*	1,33±0,33	0,33±0,33	33,67±4,18*
	5	16,67±0,33*	3,67±0,33*	0,00±0,00	0,67±0,67	26,67±3,28*
	10	14,33±1,45*	1,67±1,20	0,33±0,33	0,00±0,00	18,67±4,81*
	15	13,67±0,67*	5,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	24,33±1,33*
	20	12,67±0,67*	2,67±0,67*	1,33±0,33	0,67±0,33	24,67±3,84*

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ ).

**Tablica 4.** Učestalost nukleoplazmatskih mostova (NPBs) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim binuklearnim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h, 6 h, 24 h i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 NPB	2 NPBs	3 NPBs	4 NPBs	∑ NPBs
	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,5	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,33
1	1	1,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±0,67
	5	1,67±1,20	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±1,20
	10	2,33±0,88*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,33±0,88*
	15	1,67±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±0,33
	20	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,33
	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,1	3,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±0,33*
	0,5	2,67±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,67±0,33*
6	1	4,33±0,88*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,33±0,88*
	5	4,67±1,20*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	5,33±0,88*
	10	2,33±0,33*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	3,00±1,00*
	15	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,33
	20	2,33±0,88*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,33±0,88*
	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,1	3,67±0,67*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,67±0,67*
	0,5	2,67±0,67*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,67±0,67*
24	1	2,67±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,67±0,33*
	5	3,67±0,67*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,67±0,67*
	10	2,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,33±0,33*
	15	3,67±0,67*	0,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	5,00±2,00*
	20	4,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,33±0,33*
	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,1	3,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±0,33*
	0,5	1,33±0,88	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,88
48	1	1,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±0,67
	5	3,33±0,33*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	4,00±1,00*
	10	3,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±0,33*
	15	4,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,33±0,33*
	20	3,67±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,67±0,33*

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ ).



**Tablica 5.** Učestalost jezgrinih pupova (NBUDs) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim binuklearnim limfocitima periferne krvi nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h, 6 h, 24 h i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 NBUD	2 NBUDs	3 NBUDs	4 NBUDs	∑ NBUDs
	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	0,1	2,67±0,67*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±0,67*
	0,5	5,67±1,20*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,67±1,20*
1	1	5,33±0,88*	0,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	6,67±2,19*
	5	6,33±0,33*	0,67±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	7,67±0,88*
	10	6,33±0,33*	0,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	8,00±1,53*
	15	4,67±0,67*	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	7,33±1,33*
	20	3,67±1,76*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	4,33±1,33*
	0	0,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,67±0,67
	0,1	5,67±0,67*	0,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	6,33±1,33*
	0,5	7,67±0,67*	0,67±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	8,33±0,67*
6	1	9,67±1,76*	1,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	13,33±3,38*
	5	8,33±0,33*	0,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	10,00±1,00*
	10	9,33±0,33*	1,33±0,33	0,33±0,33	0,00±0,00	13,00±2,00*
	15	13,33±0,88*	1,67±0,67	0,67±0,67	0,00±0,00	18,67±2,33*
	20	7,67±2,33*	2,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	12,33±1,86*
	0	1,67±0,67	0,33±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,33±1,33
	0,1	15,33±0,33*	3,33±0,33*	0,33±0,33	0,00±0,00	23,33±1,00*
	0,5	14,33±0,33*	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	17,00±1,00*
24	1	13,33±1,45*	6,33±0,88*	0,33±0,33	0,00±0,00	27,00±1,15*
	5	11,33±0,33*	1,67±0,67*	0,33±0,33	0,00±0,00	19,67±2,67*
	10	13,33±0,33*	5,33±0,88*	1,67±0,67	0,00±0,00	29,00±1,53*
	15	13,33±0,33*	7,67±0,33*	1,67±0,67	0,00±0,00	33,67±2,73*
	20	14,33±0,33*	6,33±0,88*	1,33±0,33	0,00±0,00	31,00±2,52*
	0	1,33±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,33
	0,1	10,67±0,67*	3,67±0,67*	0,67±0,33	0,00±0,00	20,00±2,08*
	0,5	9,67±1,20*	4,33±0,33*	0,00±0,00	0,00±0,00	18,33±0,88*
48	1	13,67±0,33*	5,33±0,33*	0,67±0,67	0,00±0,00	26,33±2,03*
	5	17,33±0,88*	4,67±0,67*	0,33±0,33	0,00±0,00	28,00±3,51*
	10	16,33±1,45*	2,67±0,67*	1,67±0,33	0,00±0,00	26,33±3,38*
	15	11,67±0,67*	3,33±0,33*	1,33±0,33	0,00±0,00	22,67±1,45*
	20	12,67±1,20*	6,67±0,33*	0,33±0,33	0,00±0,00	21,00±1,53*

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ ).

**Tablica 6.** Učestalost mikronukleusa (MNI) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim binuklearnim limfocitima periferne krvi nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h i 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 MN	2 MNI	3 MNI	4 MNI	∑ MNI
	0	4,50±0,50	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	5,50±0,50
4	0,1	7,00±1,00	2,00±1,00	0,50±0,50	0,00±0,00	12,50±0,50*
	0,5	7,50±2,50	3,00±2,00	1,00±0,00	0,00±0,00	16,50±6,50*
	1	6,00±1,00	4,00±2,00*	2,00±0,00	0,00±0,00	20,00±3,00*
	5	6,50±0,50	3,50±1,50	3,00±0,00*	0,00±0,00	22,50±3,50*
	10	8,00±2,00	3,00±0,00	1,50±0,50	0,00±0,00	18,50±3,50*
24	0	2,00±0,00	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	3,00±1,00
	0,1	5,00±0,00	4,50±2,50*	0,50±0,50	0,00±0,00	15,50±6,50*
	0,5	7,00±3,00*	2,50±0,50	1,00±1,00	0,00±0,00	15,00±7,00*
	1	10,00±1,00*	3,00±1,00	2,00±0,00	0,00±0,00	22,00±1,00*
	5	1,00±3,00*	5,00±0,00*	4,00±1,00*	0,00±0,00	32,00±6,00*
	10	11,50±3,50*	3,00±1,00	2,00±2,00	0,00±0,00	23,50±11,50*

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ )

**Tablica 7.** Učestalost nukleoplazmatskih mostova (NPBs) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h i 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 NPB	2 NPBs	3 NPBs	4 NPBs	∑ NPBs
	0	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
4	0,1	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
	0,5	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
	1	1,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,00±1,00
	5	0,50±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
	10	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
24	0	0,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±0,50
	0,1	1,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,00±1,00
	0,5	2,00±2,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,00±2,00
	1	2,00±2,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,00±2,00
	5	2,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,50±0,50
	10	1,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,00±1,00

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ )

**Tablica 8.** Učestalost jezgrinih pupova (NBUDs) kao parametar mikronukleus (CBMN) testa u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h i 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE.

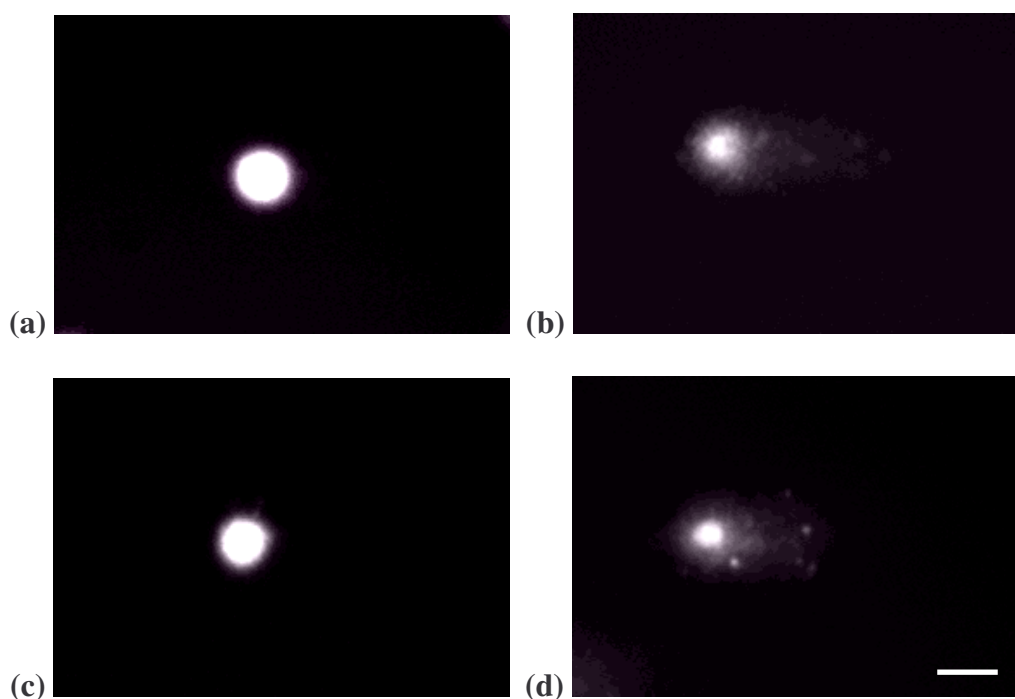
Vrijeme izlaganja (h)	Koncentracija (µg/ml)	1 NBUD	2 NBUDs	3 NBUDs	4 NBUDs	∑ NBUDs
	0	3,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,50±0,50
	0,1	4,50±2,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,50±2,50
4	0,5	6,50±1,50	1,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,50±1,50
	1	7,00±2,00	1,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	9,00±2,00*
	5	8,50±0,50	1,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	11,50±1,50*
	10	6,00±0,00	1,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,00±0,00
	0	4,50±2,50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,50±2,50
24	0,1	6,00±2,00	2,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	10,00±2,00
	0,5	7,50±0,50	1,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00	9,50±2,50
	1	6,50±1,50	1,50±0,50	0,00±0,00	0,00±0,00	9,50±0,50
	5	5,50±0,50	3,00±0,00*	0,00±0,00	0,00±0,00	11,50±0,50*
	10	9,00±2,00	1,50±1,50	0,00±0,00	0,00±0,00	12,00±5,00*

\* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P<0,05$ )

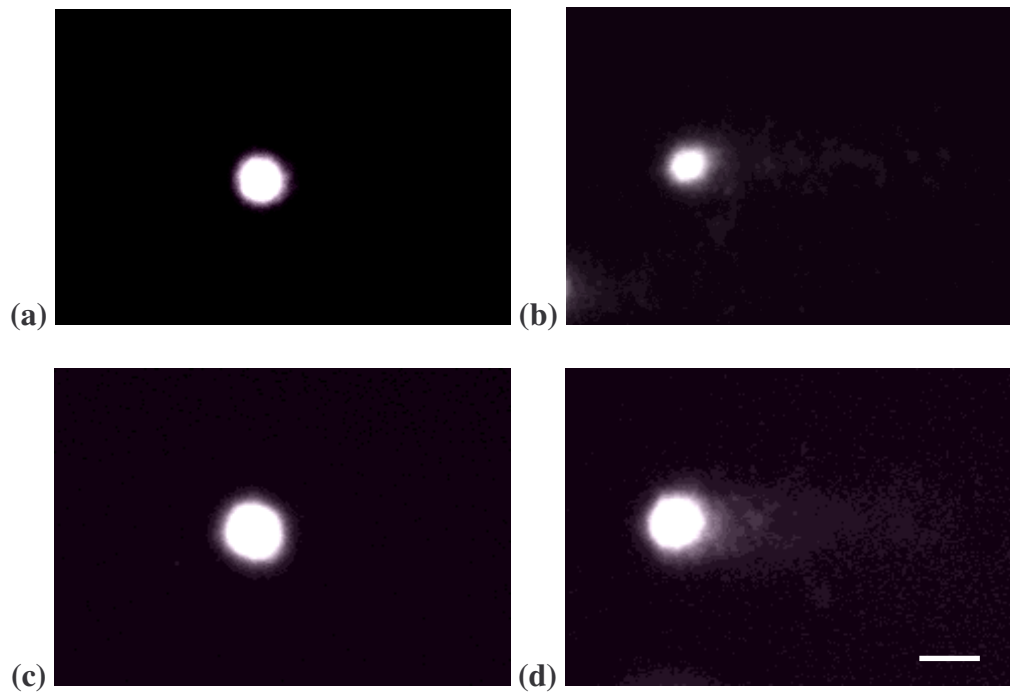
#### 4.2.5. Učinak pčelinjega otrova i melitina na ukupna i oksidativna oštećenja molekule DNA

Nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, ispitali smo nastanak oštećenja u molekuli DNA u vidu jednolančanih i dvolančanih lomova te nastanak oksidativnih oštećenja u molekuli DNA koristeći enzimsku modifikaciju standardnog komet testa upotrebom Fpg enzima koji ovu tehniku čini još osjetljivijom posebice za detekciju oksidativnih oštećenja nastalih uslijed izlaganja kemijskim ili fizikalnim agensima. Metoda se bazira na obradi stanica s Fpg enzimom koji prepoznaje razna oksidativna oštećenja te na mjestima takvih oštećenja cijepa molekulu DNA pri čemu nastaju fragmenti koji za vrijeme elektroforeze putuju brže od nepocijepane molekule DNA te na taj način stvaraju strukture nalik „kometima“ (Slike 46 i 47). Parametar koji karakterizira komete, a koji je prikazan i u ovom radu je % DNA u repu koji je proporcionalan oštećenju uzrokovanom u molekuli DNA. Nakon statističke obrade podataka, uočeno je da već nakon 1 h izlaganja limfocita pčelinjem otrovu dolazi do značajnih oštećenja u molekuli DNA koja su uočena standardnom alkalnom verzijom ovog testa te da su ona ovisna o koncentraciji pčelinjega otrova te o vremenskom izlaganju (Slike 48 i 49). Nakon primjene Fpg enzimske modifikacije komet testa za detekciju oksidativnih oštećenja molekule DNA, također je uočen značajan porast % DNA u repu kometa koji ukazuje da je nakon obrade pčelinjim otrovom došlo uz ukupna oštećenja

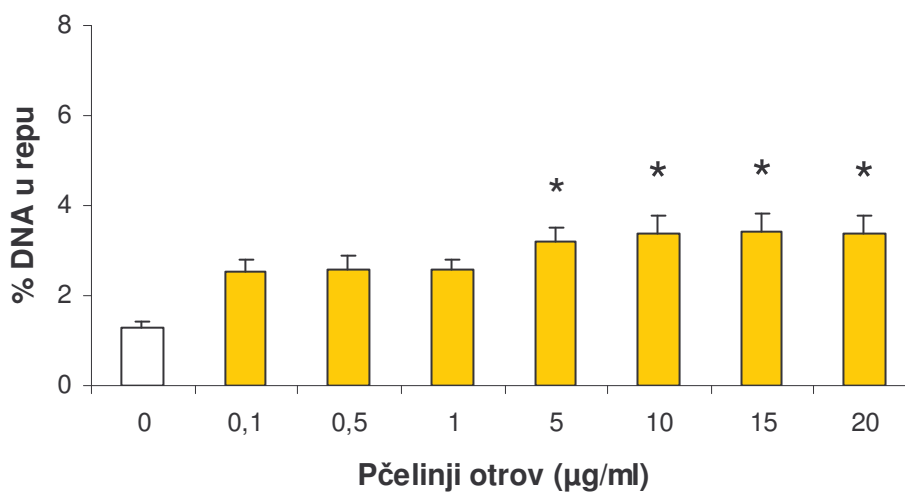
molekule DNA uočenih alkalnom verzijom ovog testa, i do oksidativnih oštećenja molekule DNA (Slike 50 i 51). Nakon obrade melitinom, također je pokazano da dolazi do ukupnih i oksidativnih oštećenja molekule DNA te da su oštećenja ovisna i o koncentraciji melitina i o vremenskom izlaganju (Slike 52 i 53). Ovi rezultati također su pokazali ovisnost o dozi pčelinjega otrova i melitina i vremenu izlaganja. Značajnost rezultata dobivenih Fpg-modificiranim komet testom veća je nego ona uočena primjenom standardnog alkalnog komet testa ukazujući da oštećenja u molekuli DNA nastaju zbog oksidacijskog stresa.



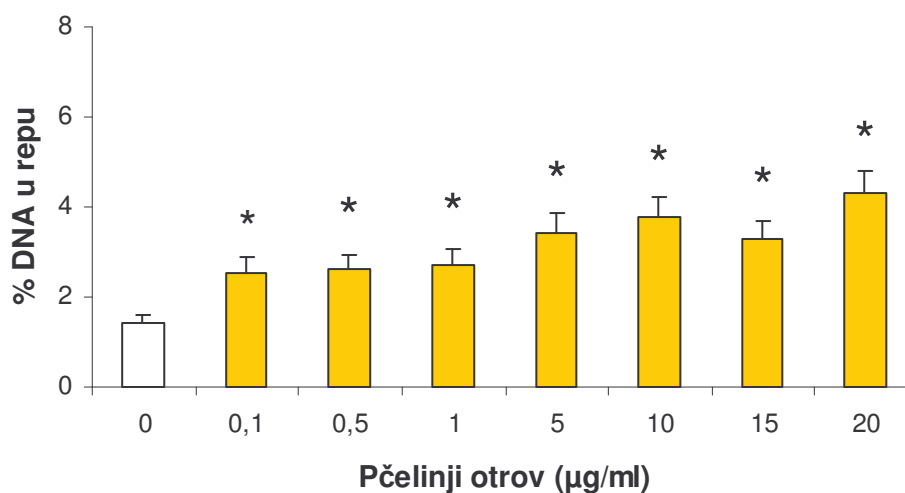
**Slika 46.** Mikrofotografije alkalnog i Fpg-modificiranog komet testa u kontrolnim ljudskim limfocitima periferne krvi u agaroznom gelu (a,c) i nakon obrade ljudskih limfocita periferne krvi pčelinjim otrovom u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/ml}$  u vremenskom periodu od 24 h (b,d) u uvjetima *in vitro*. Stanice su bojane interkalirajućim agensom etidij-bromidom. Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 47.** Mikrofotografije alkalnog i Fpg-modificiranog komet testa u kontrolnim ljudskim limfocitima periferne krvi u agaroznom gelu (a,c) i nakon obrade ljudskih limfocita periferne krvi melitinom u koncentraciji od 5  $\mu\text{g/ml}$  u vremenskom periodu od 24 h (b,d) u uvjetima *in vitro*. Stanice su bojane interkalirajućim agensom etidij-bromidom. Stanice su slikane pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), koristeći objektiv povećanja 25 $\times$  s ekscitacijskim filterom od 515 nm do 560 nm, emisije od 600 nm. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 20  $\mu\text{m}$ .

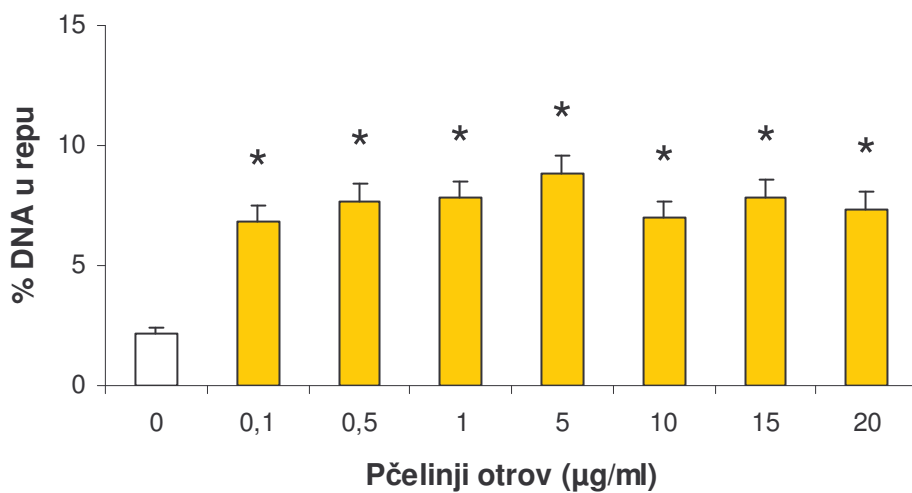


(a)

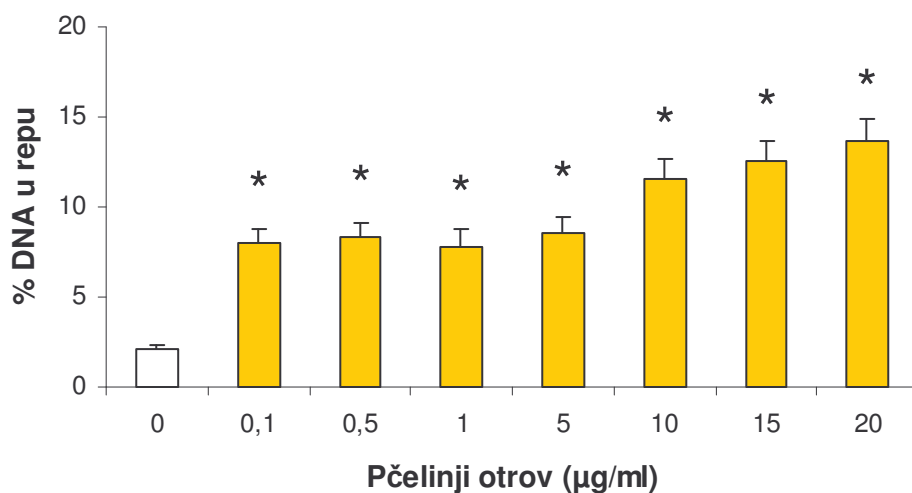


(b)

**Slika 48.** Rezultati alkalnog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji ukupnih oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h (a) i 6 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).

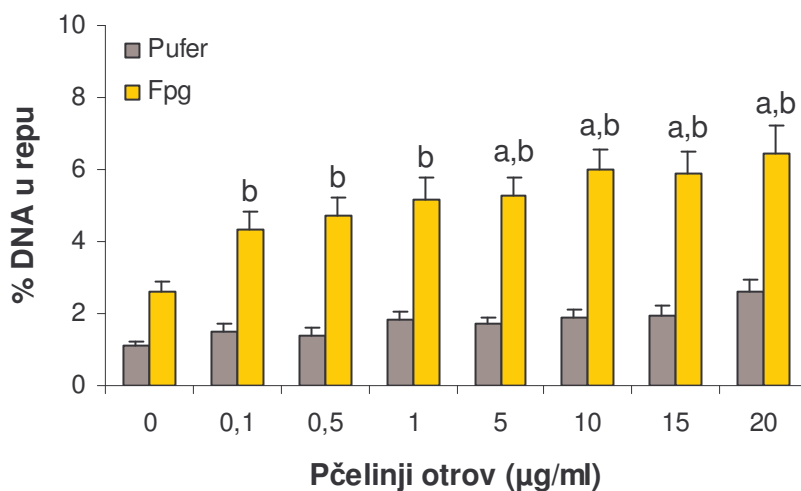


(a)

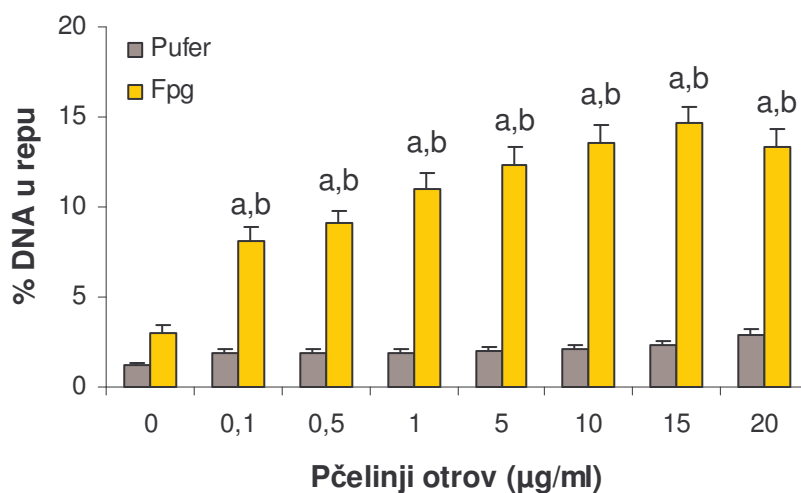


(b)

**Slika 49.** Rezultati alkalnog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji ukupnih oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 24 h (a) i 48 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).



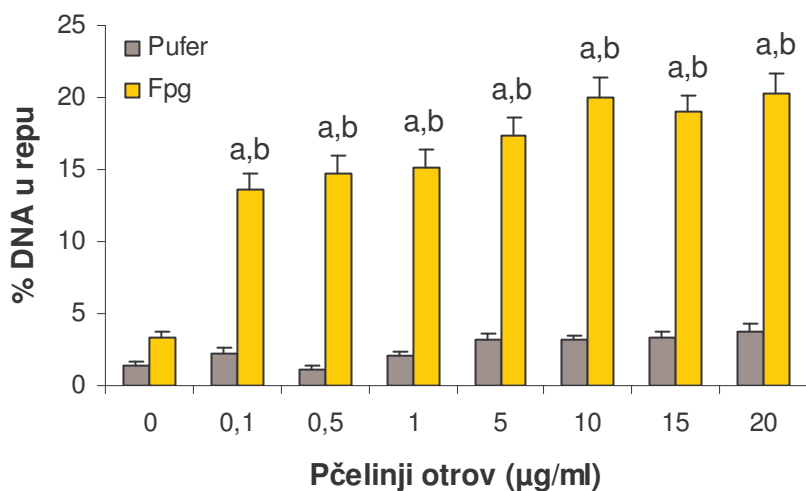
(a)



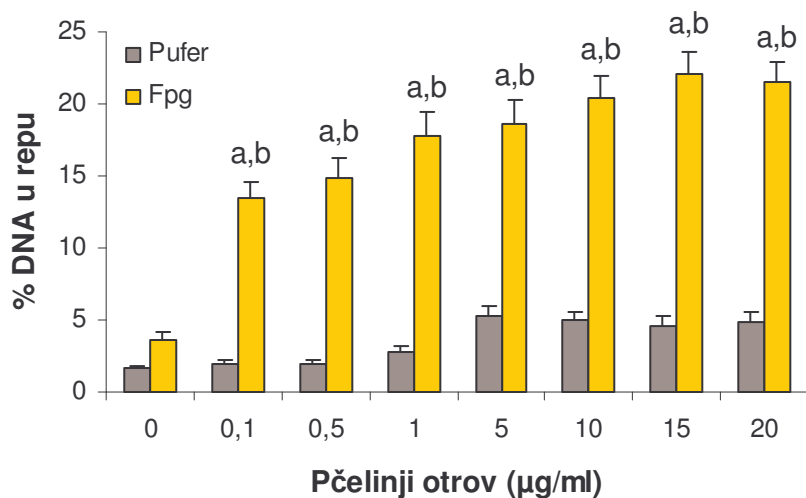
(b)

**Slika 50.** Rezultati Fpg-modificiranog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji oksidativnih oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h (a) i 6 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na pufersku kontrolu ( $P < 0,05$ ).



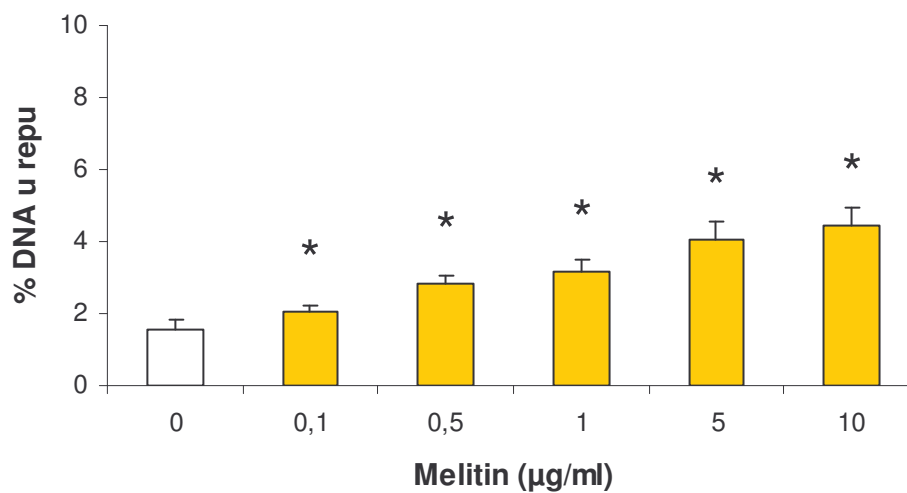


(a)

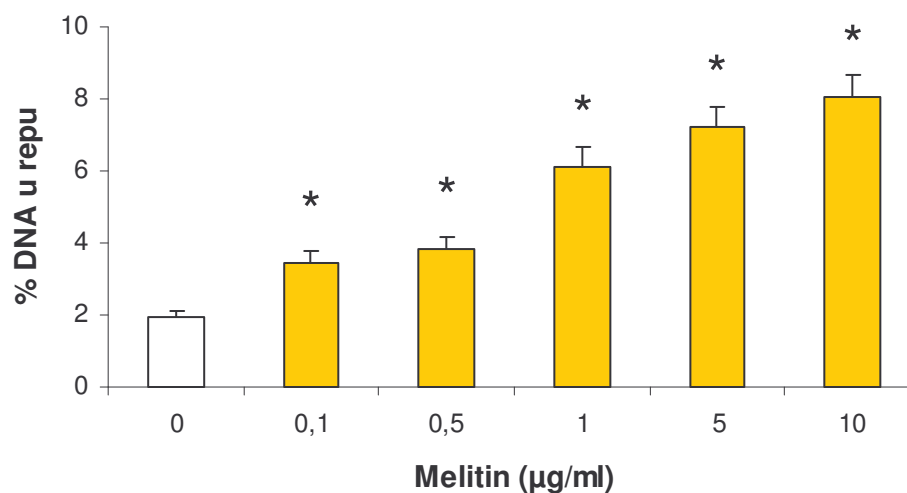


(b)

**Slika 51.** Rezultati Fpg-modificiranog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji oksidativnih oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0.1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 24 h i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na pufersku kontrolu ( $P < 0,05$ ).

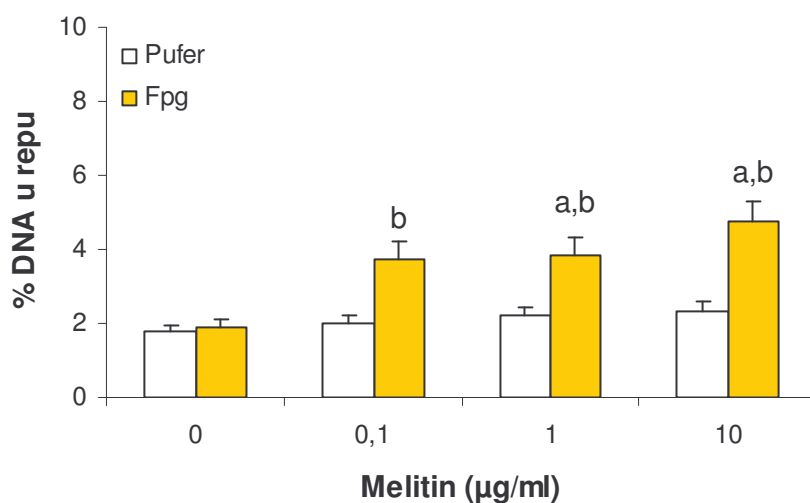


(a)

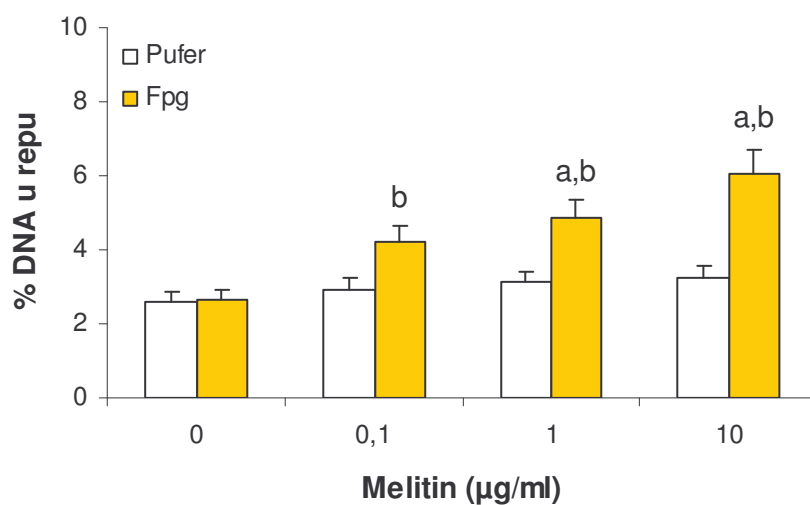


(b)

**Slika 52.** Rezultati alkalnog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji ukupnih oštećenja molekule DNA nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 4 h (a) i 24 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).



(a)



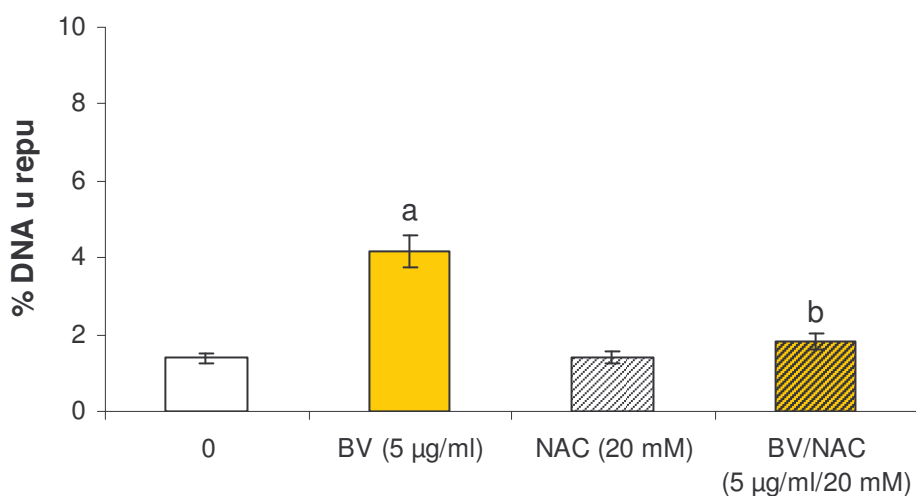
(b)

**Slika 53.** Rezultati Fpg-modificiranog komet testa (% DNA u repu) kao pokazatelji oksidativnih oštećenja molekule DNA nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 4 h (a) i 24 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na pufersku kontrolu ( $P < 0,05$ ).

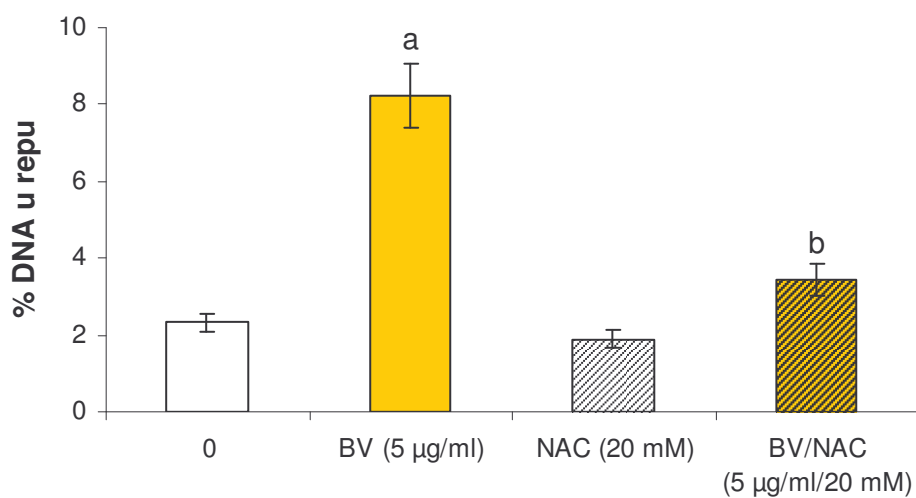
Da bi se potvrdila uloga oksidativnog stresa u oštećenju molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom, uzorci pune krvi su prije obrade pčelinjim otrovom obrađeni sa antioksidansom N-acetil-L-cisteinom (NAC) kao izvorom cisteina za sintezu glutaciona. Učinak NAC-a na oštećenje molekule DNA uzrokovano pčelinjim otrovom ispitan je alkalnim komet testom, dok je isti učinak na oksidativna oštećenja molekule DNA ispitan Fpg-modificiranom verzijom komet testa. Rezultati su pokazali da obrada NAC-om nije uzrokovala oštećenja molekule DNA, što je i potvrđeno sa oba testa, dok je obrada sa pčelinjim otrovom uzrokovala promjene u molekuli DNA, što je potvrđeno već i ranije. Međutim, obrada stanica NAC-om prije obrade pčelinjim otrovom uspjela je sačuvati molekulu DNA od oštećenja uzrokovanih pčelinjim otrovom što je pokazano alkalnim i Fpg-modificiranim komet testom (Slike 54 i 55). Rezultati ukazuju da je NAC uspješno zaštitio ljudske limfocite od ukupnih, ali i oksidativnih oštećenja molekule DNA.

#### 4.2.6. Učinak pčelinjega otrova i melitina na razinu glutaciona (GSH) i malondialdehida (MDA) kao pokazatelje oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije

Kako je Fpg-modificirana verzija komet testa pokazala da su oštećenja molekule DNA i oksidativnog tipa, dalje je istražena uključenost oksidativnog stresa u procese kojima pčelinji otrov i melitin djeluju na stanice. Stanice se od oksidativnog stresa brane različitim mehanizmima, a jedan od tih mehanizama je i ne-enzimatska obrana koja uključuje spojeve koji direktno vežu radikale poput glutaciona (GSH). Obrada pčelinjim otrovom i melitinom promijenila je razinu GSH u izloženim uzorcima (Slike 56, 57 i 58). Iako niže koncentracije pčelinjega otrova i melitina nisu promijenile koncentraciju GSH u uzorcima, više koncentracije dovele su do značajnog smanjivanja koncentracije GSH koja je, uz koncentracijsku ovisnost, bila ovisna i o vremenu izlaganja pčelinjem otrovu i melitinu.

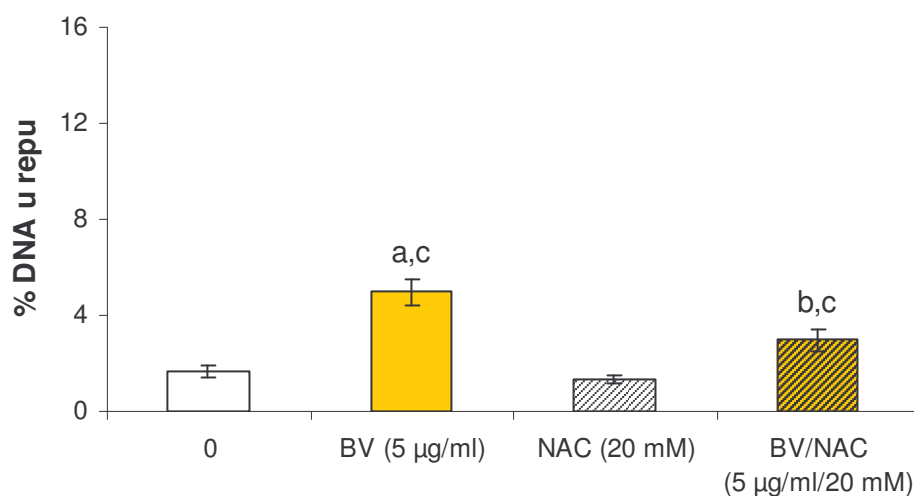


(a)

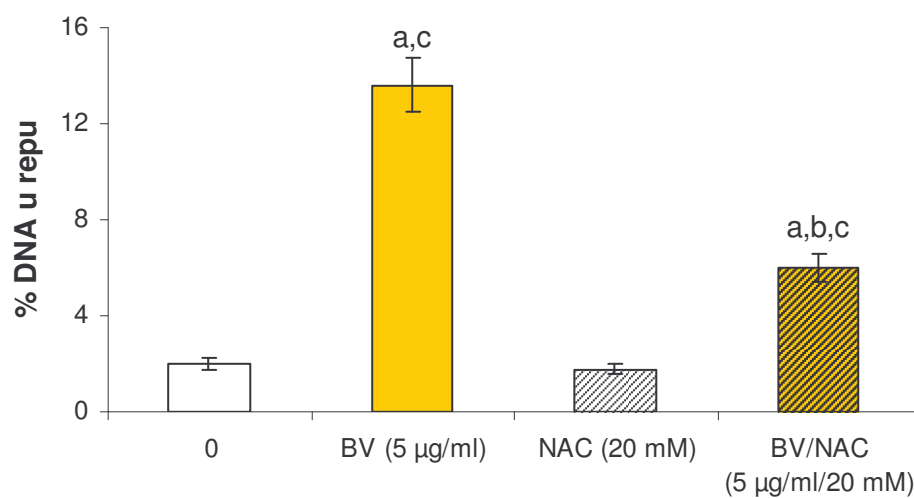


(b)

**Slika 54.** Učinak N-acetil-L-cisteina (NAC) na oštećenje molekule DNA uzrokovano pčelinjim otrovom. Puna krv je obrađena NAC-om (20 mM) 1 h nakon čega je dodan pčelinji otrov (5 µg/ml) u vremenu od 1 h (a) i 24 h (b). Oštećenje molekule DNA mjereno je alkalnim komet testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno smanjenje u odnosu na izloženost pčelinjem otrovu ( $P < 0,05$ ).



(a)



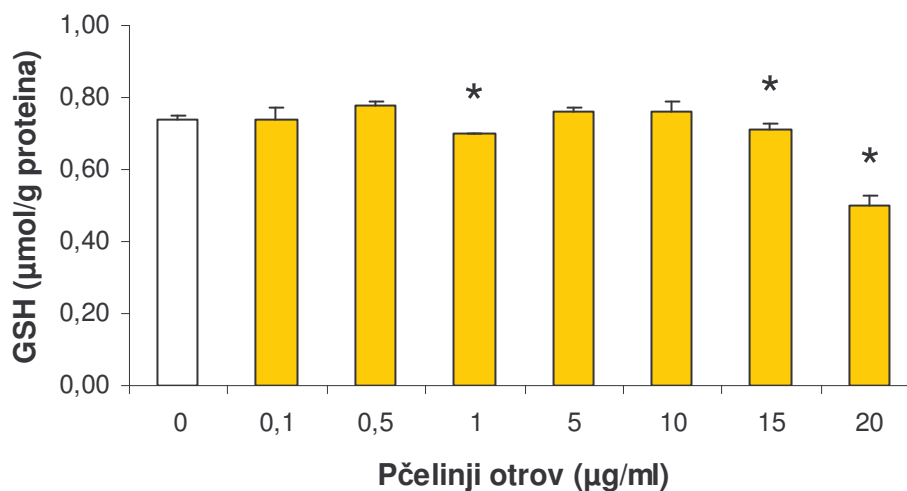
(b)

**Slika 55.** Učinak N-acetil-L-cisteina (NAC) na oštećenje molekule DNA uzrokovano pčelinjim otrovom. Puna krv je obrađena NAC-om (20 mM) 1 h nakon čega je dodan pčelinji otrov (5 µg/ml) u vremenu od 1 h (a) i 24 h (b). Oštećenje molekule DNA mjereno je Fpg-modificiranim komet testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno smanjenje u odnosu na izloženost pčelinjem otrovu ( $P < 0,05$ ), <sup>c</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na pufersku kontrolu ( $P < 0,05$ ).

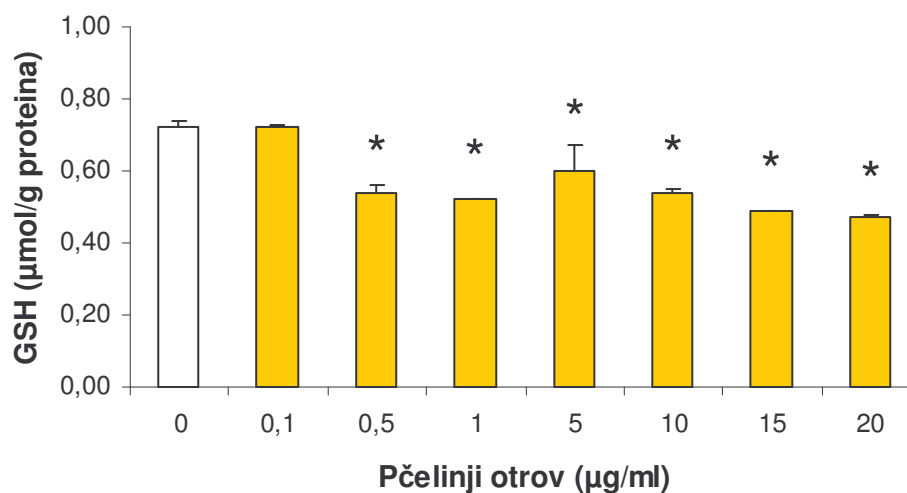
Inducirani ROS često izaziva i lipidnu peroksidaciju membrana i stvaranje produkata kao što su malondialdehid (MDA), koji nastaje u reakciji ROS-ova s višestruko nezasićenim masnim kiselinama. Rezultati su pokazali da razina MDA nakon obrade limfocita pčelinjim otrovom i melitinom raste te je ovisna o koncentraciji pčelinjega otrova i melitina te o vremenu izlaganja (Slike 59, 60 i 61). Stvaranje MDA već nakon 1 h i 4 h izloženosti pčelinjem otrovu i melitinu ukazuje da je ono posljedica djelovanja ROS-a, a ne zbog mogućeg kasnijeg nastanka MDA u procesima stanične smrti.

Da bi se potvrdila uloga oksidativnog stresa u pogledu razine GSH i MDA nakon obrade pčelinjim otrovom, uzorci pune krvi su također obrađeni sa antioksidansom NAC-om. Obrada NAC-om povisila je razinu GSH u izloženim uzorcima, dok je pčelinji otrov snizio razinu GSH nakon dužeg vremenskog izlaganja. Zajednička obrada NCA-om i pčelinjim otrovom također je povisila razinu GSH u uzorcima pune krvi, ali očekivano taj je porast bio manji nego onaj prilikom obrade uzoraka samo NAC-om (Slika 62). Kao što je već i ranije utvrđeno, obrada pčelinjim otrovom povisila je razinu MDA u izloženim uzorcima, dok obrada NAC-om nije imala učinka na razinu MDA. Obrada NAC-om, prije obrade pčelinjim otrovom, pokazala je protektivni učinak NAC-a što je potvrđeno smanjivanjem koncentracije MDA u odnosu na obradu samo pčelinjim otrovom (Slika 63).

Rezultati dobiveni alkalnim i Fpg-modificiranim komet testom nakon obrade pčelinjim otrovom korelirani su sa rezultatima dobivenima za GSH i MDA. Linearna regresijska analiza % DNA u repu alkalnog komet testa pokazala je signifikantnu pozitivnu korelaciju sa rezultatima dobivenima za MDA ( $r = 0,545$ ,  $P < 0,05$ ) i značajnu negativnu korelaciju sa rezultatima dobivenima za GSH ( $r = -0,787$ ,  $P < 0,05$ ). Linearna regresijska analiza pokazala je također značajnu pozitivnu korelaciju između % DNA u repu Fpg-modificiranog komet testa i rezultata dobivenih za razinu MDA ( $r = 0,584$ ,  $P < 0,05$ ), dok je značajna negativna korelacija uočena za % DNA u repu i rezultate dobivene mjerenjem koncentracije GSH ( $r = -0,712$ ,  $P < 0,05$ ). Ovi rezultati dodatno ukazuju na ulogu oksidativnog stresa u oštećenjima uzrokovanim pčelinjim otrovom.



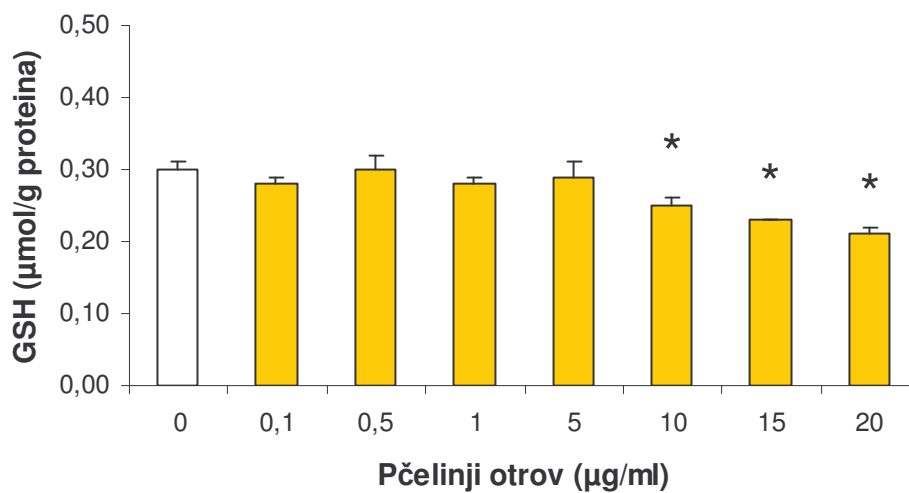
(a)



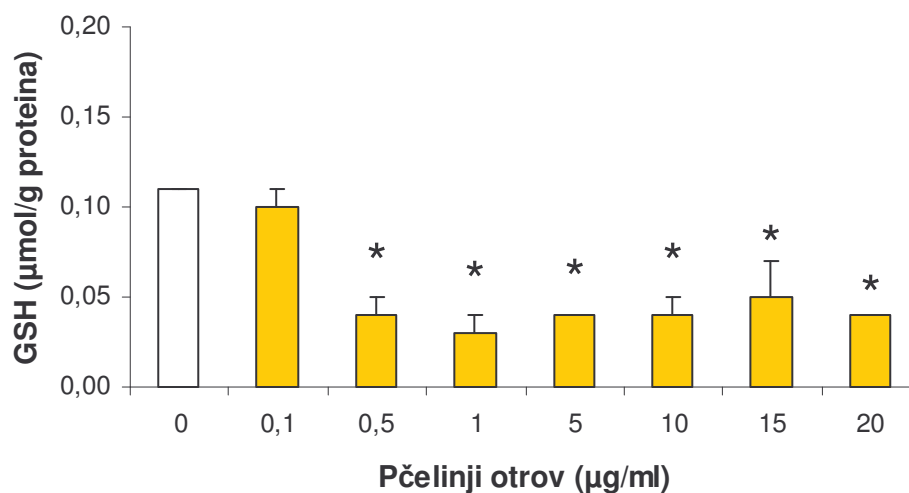
(b)

**Slika 56.** Koncentracija glutationa (GSH) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja oksidativnog stresa nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h (a) i 6 h (b). Koncentracija GSH je određena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno smanjenje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).



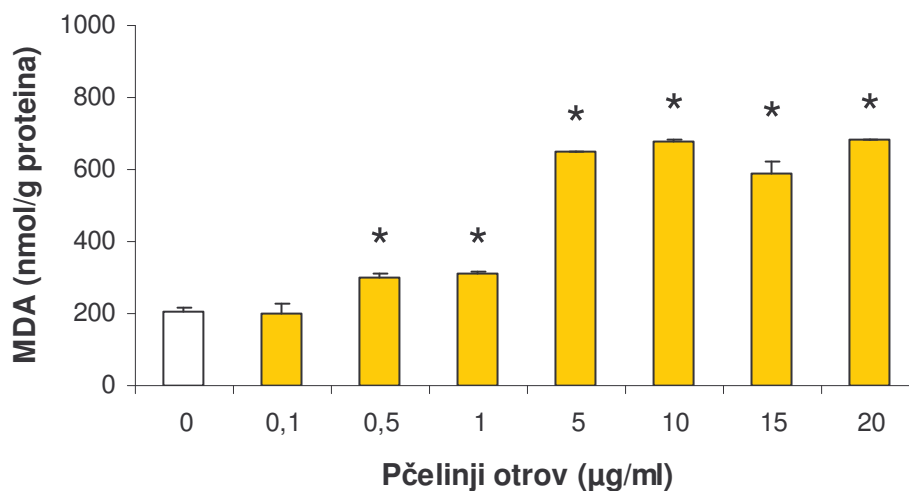


(a)

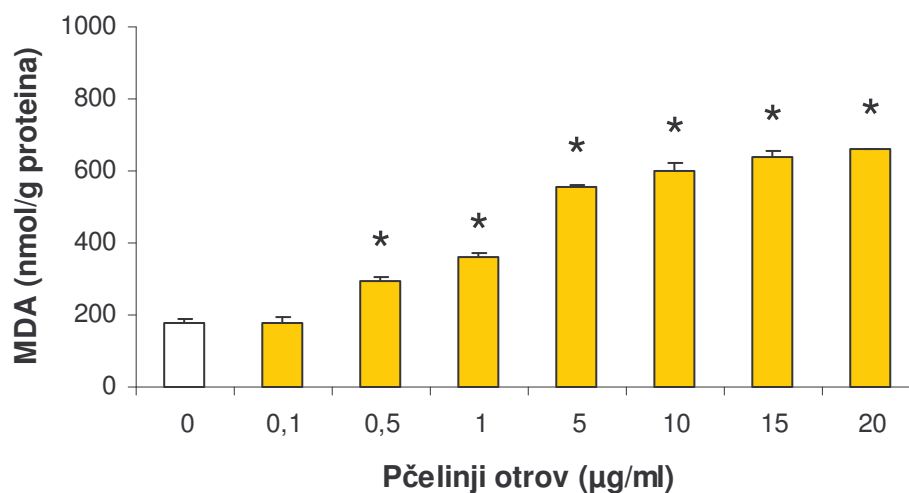


(b)

**Slika 57.** Koncentracija glutationa (GSH) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja oksidativnog stresa nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 24 h (a) i 48 h (b). Koncentracija GSH je određena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno smanjenje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).

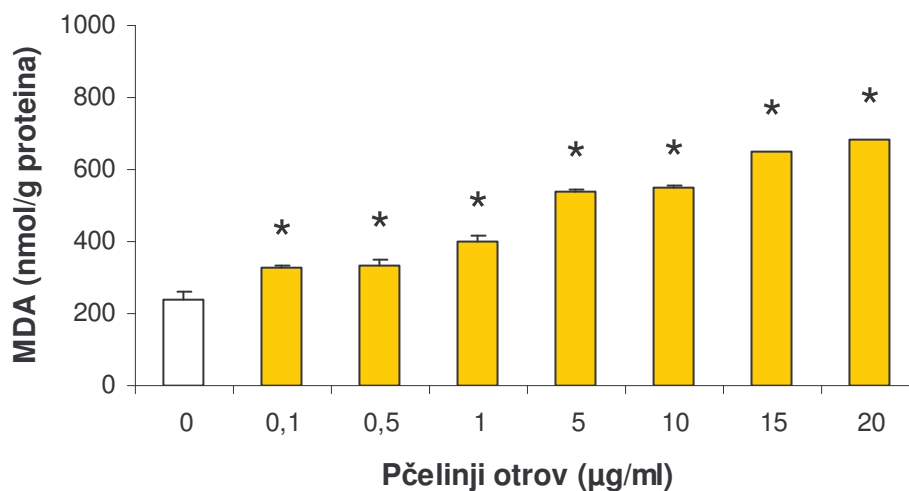


(a)

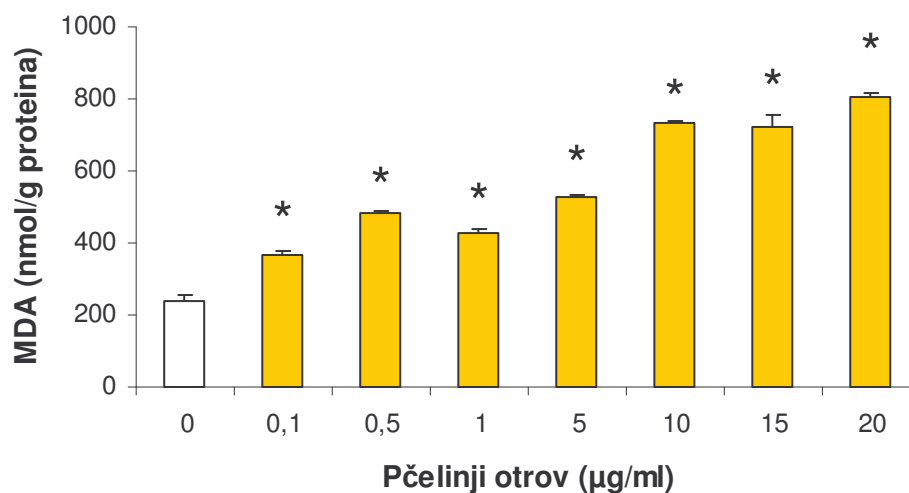


(b)

**Slika 58.** Koncentracija malondialdehida (MDA) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja lipidne peroksidacije nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 1 h (a) i 6 h (b). Koncentracija MDA je određena pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).

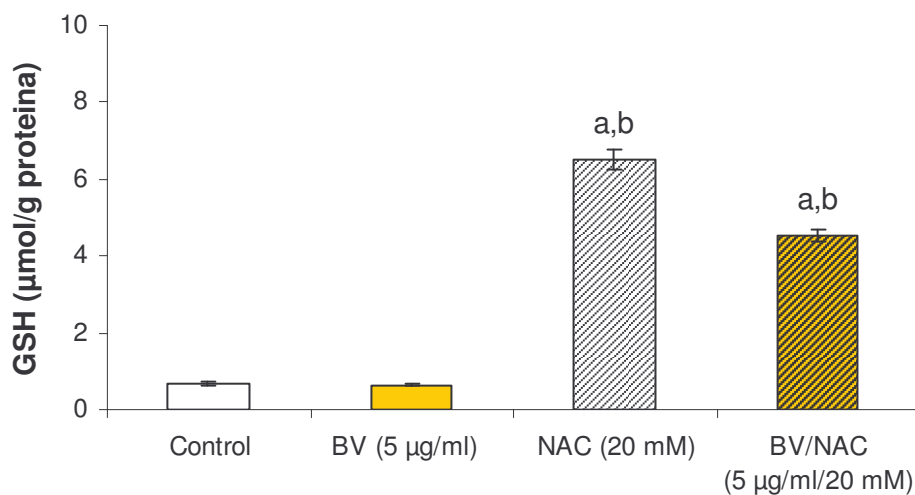


(a)

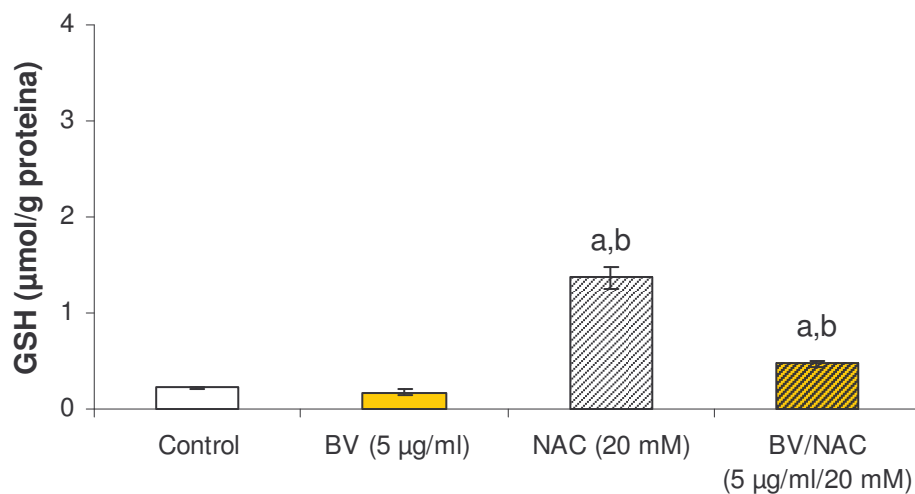


(b)

**Slika 59.** Koncentracija malondialdehida (MDA) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja lipidne peroksidacije nakon obrade pčelinjim otrovom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 24h (a) i 48 h (b). Koncentracija MDA je određena pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).

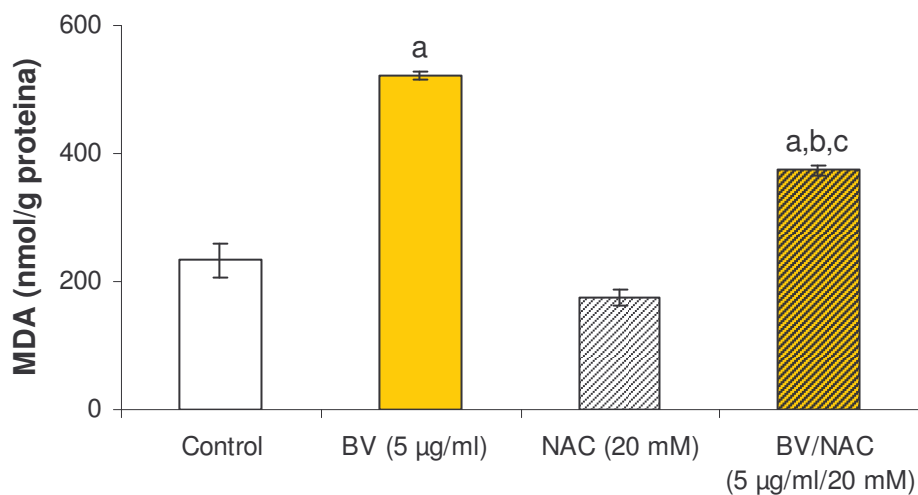


(a)

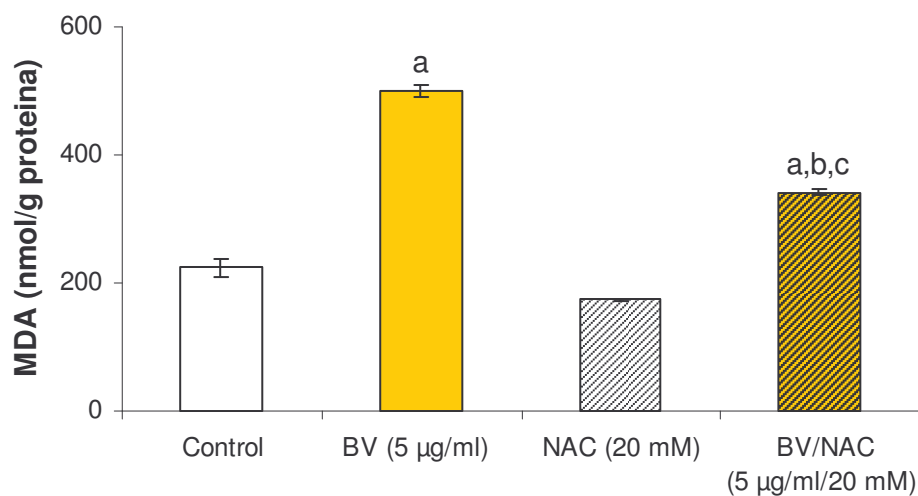


(b)

**Slika 60.** Učinak N-acetil-L-cisteina (NAC) na koncentraciju glutationa (GSH) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja oksidativnog stresa nakon obrade pčelinjim otrovom. Puna krv je obrađena NAC-om (20 mM) 1 h nakon čega je dodan pčelinji otrov (5 µg/ml) u vremenu od 1 h (a) i 24 h (b). Koncentracija GSH je određena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na izloženost pčelinjem otrovu ( $P < 0,05$ ).

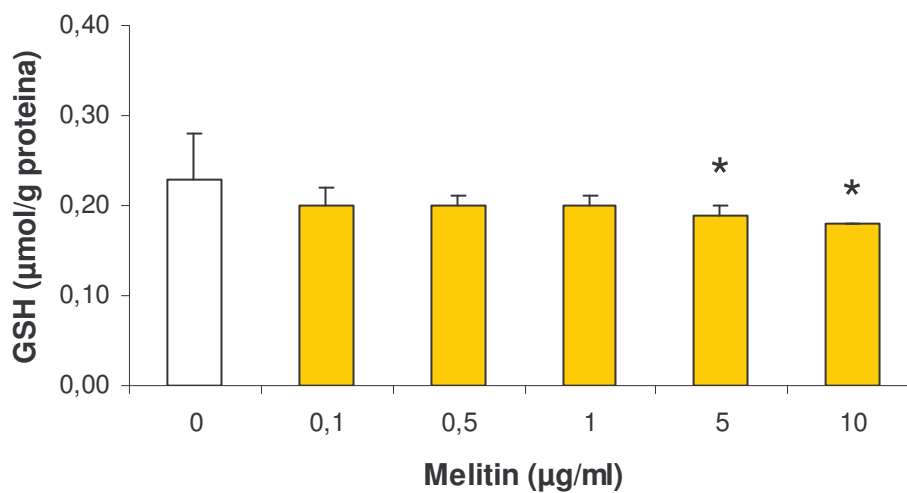


(a)

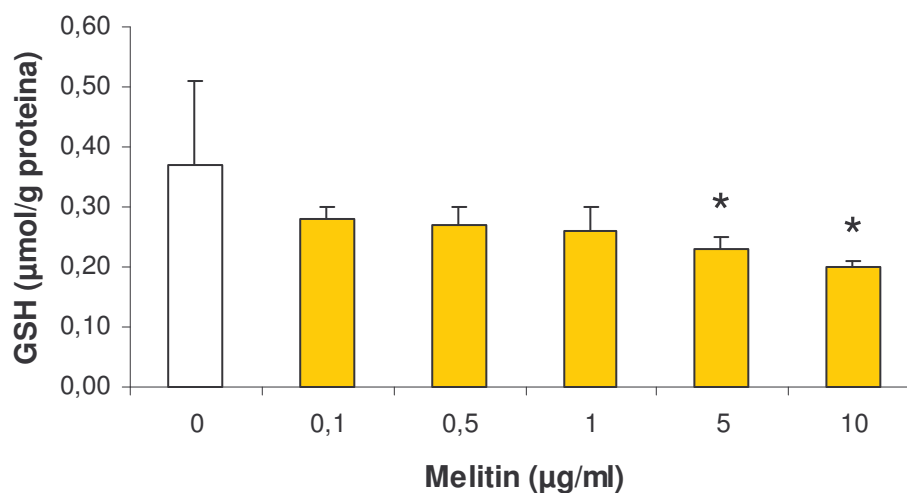


(b)

**Slika 61.** Učinak N-acetil-L-cisteina (NAC) na koncentraciju malondialdehida (MDA) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja lipidne peroksidacije nakon obrade pčelinjim otrovom. Puna krv je obrađena NAC-om (20 mM) 1 h nakon čega je dodan pčelinji otrov (5 µg/ml) u vremenu od 1 h (a) i 24 h (b). Koncentracija MDA je određena pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. <sup>a</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ), <sup>b</sup> Statistički značajno povećanje u odnosu na obradu NAC-om ( $P < 0,05$ ), <sup>c</sup> Statistički značajno smanjenje u odnosu na izloženost pčelinjem otrovu ( $P < 0,05$ ).

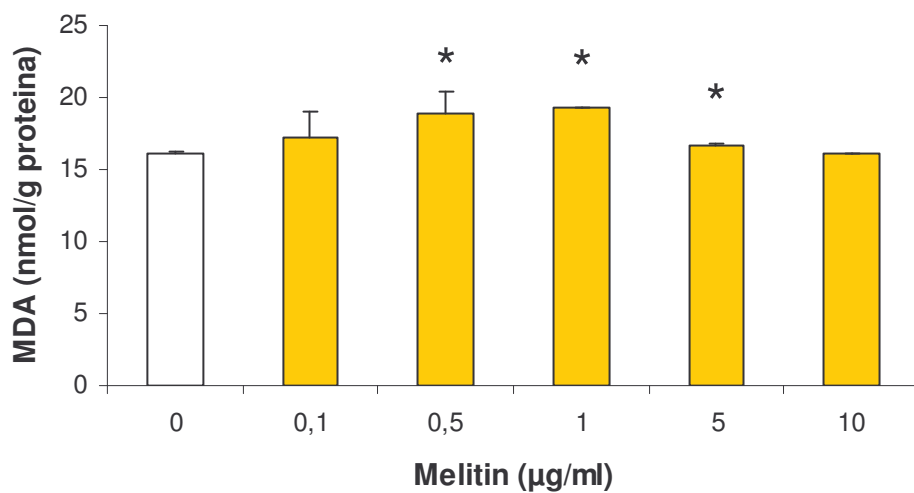


(a)

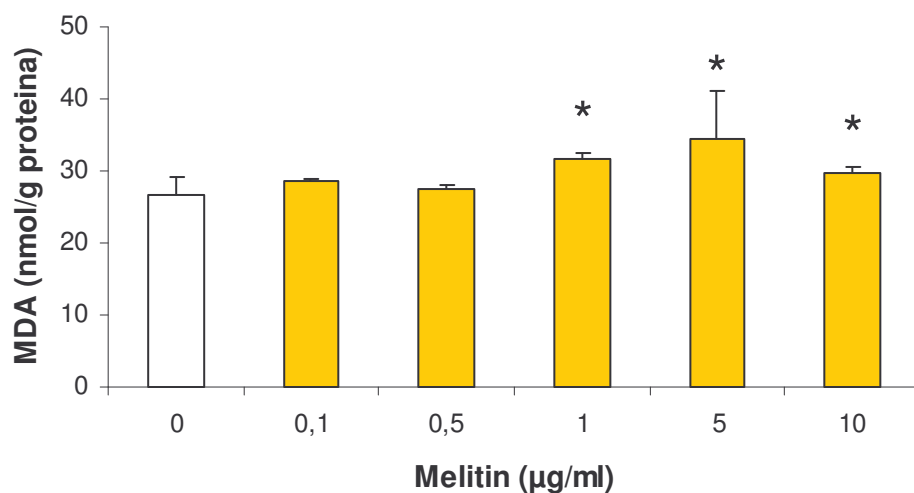


(b)

**Slika 62.** Koncentracija glutationa (GSH) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja oksidativnog stresa nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 10 µg/ml) i vremenskim periodima od 4 h i 24 h. Koncentracija GSH je određena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno smanjenje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).



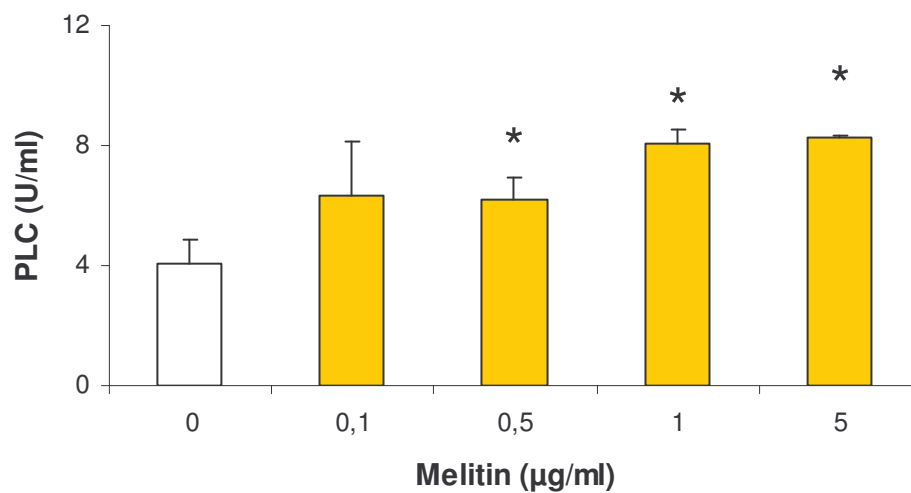
(a)



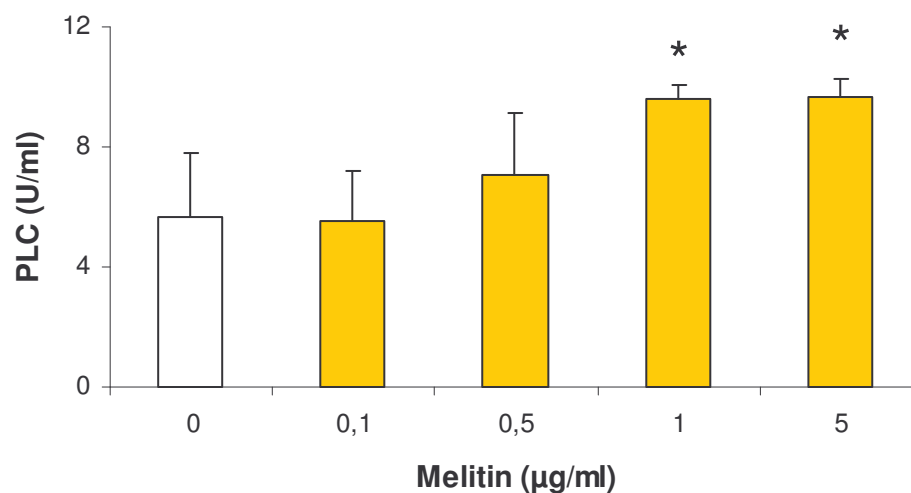
(b)

**Slika 63.** Koncentracija malondialdehida (MDA) u uzorcima pune krvi kao pokazatelja lipidne peroksidacije nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 20 µg/ml) i vremenskim periodima od 4 h i 24 h. Koncentracija MDA je određena pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).

4.2.7. Učinak melitina na aktivnosti enzima fosfolipaze C (PLC)



(a)



(b)

**Slika 64.** Aktivnost enzima fosfolipaze C (PLC) u ljudskim limfocitima nakon obrade melitinom u različitim koncentracijama (0,1 µg/ml do 5 µg/ml) i vremenskim periodima od 4 h i 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. \* Statistički značajno povećanje u odnosu na neizloženu kontrolu ( $P < 0,05$ ).



Fosfolipaza C (PLC) je klasa enzima koji cijepaju fosfolipide neposredno ispred fosfatne grupe. Ovaj enzim ima važnu ulogu u staničnoj fiziologiji te u mnogim signalnim putovima vezanima za apoptozu i stanično preživljenje. Da bi se ispitala mogućnost direktne aktivacije PLC melitinom, uzorci pune krvi su obrađeni melitinom u koncentracijama od 0,1 µg/ml do 5 µg/ml u vremenskom trajanju od 4 h i 24 h. Rezultati su ukazali na povećanu aktivnost enzima nakon obrade melitinom koja je bila ovisna o koncentraciji melitina (Slika 64).

## 5. RASPRAVA

Od davnina je poznato da mnogi prirodni spojevi, ljekovite trave pa čak i začini posjeduju različita blagotvorna svojstva te su se koristili za liječenje mnogih bolesti, uključujući i tumorska oboljenja (Mehta i Pezzuto, 2002; Guilford i Pezzuto, 2008). Termin kemoprevencija razvio se kasnih 1970. godina te je uključivao prevenciju tumora kemijskim spojevima najčešće dobivenima iz biljaka. Područje kemoprevencije bavi se istraživanjima takvih spojeva u svrhu pronalaska njihove potencijalne djelotvornosti (Wattenberg, 1985). Upotreba prirodnih spojeva kao kemopreventivnih agensa drastično je porasla u posljednjih nekoliko godina te je velik broj takvih spojeva ispitan na različitim modelnim sustavima. Veliki broj takvih kemikalija i spojeva, koji su pružili obećavajuće rezultate u eksperimentalnim sustavima, danas se već nalazi u pretkliničkim istraživanjima, dok se za veliki broj kemikalija još uvijek traži točan mehanizam djelovanja. Nadalje, brojna istraživanja su pokazala da takve kemikalije korištene same ne pokazuju željene rezultate, ali da se njihovom kombinacijom sa postojećim kemoterapeutcima može doći do obećavajućih rezultata te je ovo područje postalo posebice zanimljivo znanstvenoj zajednici (Young, 2006; Dennis i sur., 2009; Mehta i sur., 2010).

Kukci i proizvodi koji se dobivaju iz njih koriste se od davnina u narodnoj medicini za liječenje. Brojna istraživanja dokazuju da bi upotreba proizvoda izoliranih iz kukaca, uz konvencionalne načine liječenja, mogla dati veliku korist kod suzbijanja brojnih teško izlječivih bolesti. Neki od obećavajućih načina liječenja su se djelomično ispitali i eksperimentalno (Pemberton, 1999; Cherniack, 2010). Proizvodi koji se dobivaju od pčela, poput meda, koristili su se za liječenje kroničnih i post-operacijskih rana te za liječenje opekline, a u brojnim slučajevima pokazali su se jednako djelotvornima kao i neki standardni medicinski pripravci. Med se u kombinaciji sa pčelinjim voskom uspješno koristi za liječenje nekolicine dermatoloških poremećaja, uključujući psorijazu, dermatitis, brojna gljivična kožna oboljenja te za diskoloraciju kože. Matična mliječ koristi se za liječenje postmenopauzalnih simptoma, dok se propolis koristi u liječenju želučanih čireva (Khalil, 2006; Viuda-Martos i sur., 2008; Oršolić, 2009a; Cherniack, 2010). Uza sve to, svoju primjenu u tradicionalnoj medicini ima i pčelinji otrov koji se koristi kao reumatik, za ublažavanje bolova, sniženje krvnog tlaka i kolesterola u krvi. Nadalje, pčelinji otrov koristi se protiv zaraznih bolesti, u liječenju raznih upala živaca i akutnih upala krvnih žila, za poboljšavanje općeg tonusa, nerijetko i za opću otpornost organizma (Kim, 1997; Cerrato, 1998; Liu i Tong, 2003; Ransome, 2004; Radić, 2005). Osim tradicionalne primjene

pčelinjega otrova, suvremena znanost počela se baviti i istraživanjima s ciljem ispitivanja potencijalnog protutumorskog djelovanja pčelinjega otrova, ali i njegovih sastavnica. Sastavnice pčelinjega otrova koje se najviše koriste u istraživanjima protutumorskih svojstava su glavni protein pčelinjega otrova melitin, enzim fosfolipaza A<sub>2</sub> i mali peptid apamin (Son i sur., 2007, Heinen i de Veiga, 2011; Oršolić, 2012).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da pčelinji otrov i njegove sastavnice uzrokuju toksičan učinak kod različitih tipova tumorskih stanica kao što su stanice bubrega, pluća, jetre, prostate, mjehura, dojke i leukemijskih stanica iako detaljni mehanizmi njihova djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni (Liu i sur., 2002; Jang i sur., 2003; Oršolić i Bašić, 2003; Oršolić i sur., 2003; Chen i sur., 2004; Hu i sur., 2006; Liu i sur., 2006; Moon i sur., 2006; Putz i sur., 2006; Chu i sur., 2007; Lee i sur., 2007; Ip i sur., 2008a,b; Moon i sur., 2008; Tu i sur., 2008; Oršolić, 2009b; Oršolić i sur., 2009; Wang i sur., 2009; Park i sur., 2010, 2011; Oršolić, 2012). Također, literaturni podaci vezani uz djelovanje pčelinjega otrova i njegovih sastavnica na staničnoj razini ukazuju na različite i nerijetko kontradiktorne mehanizme djelovanja ovog spoja.

Upravo zbog toga, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalno protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova i njegove glavne sastavnice melitina na nizu tumorskih staničnih linija te određene mehanizme kojima ovaj kompleksan spoj djeluje na stanice. Istraživanja su također provedena na sublinijama koje su otporne na citostatike u svrhu određivanja djelovanja pčelinjega otrova u kombinaciji sa citostaticima. Osim djelovanja pčelinjega otrova i melitina na tumorskim staničnim linijama, ispitan je i njihov učinak kod normalnih ne-tumorskih stanica u svrhu određivanja potencijalno štetnog djelovanja ovih spojeva na normalne stanice. Rezultati istraživanja u konačnici će poslužiti boljem razumijevanju mehanizama uključenih u stanični odgovor uzrokovan tretmanom pčelinjim otrovom i melitinom te razjasniti potencijalnu mogućnost upotrebe ovog kompleksnog spoja i njegove glavne sastavnice u terapijske svrhe.

U istraživanju se koristilo nekoliko tumorskih i ne-tumorskih staničnih linija. Od tumorskih staničnih linija korištene su roditeljske stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i ljudskog karcinoma grkljana HEP-2, zatim stanične linije ljudskog glioblastoma A1235, adenokarcinoma kolona SW620 i adenokarcinoma dojke MCF-7. Osim roditeljskih staničnih linija ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i grkljana HEP-2, također su korištene i njihove sublinije stabilno otporne na citostatike HeLa CK i CK2. Ove dvije linije razvijene su u Zavodu za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković u Laboratoriju za genotoksične agense, a dobivene su obradom HeLa i HEP-2 stanica rastućom

koncentracijom cisplatine (Osmak, 1992; Osmak i Eljuga, 1993; Osmak i sur., 1993). Sublinija HeLa CK dobivena je iz stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice, dok je sublinija CK2 dobivena obradom stanične linije ljudskog karcinoma grkljana. Obje stanične linije otporne su na cisplatinu, pri čemu pokazuju klinički relevantnu razinu otpornosti (Boulikas i Vougiouka, 2003). Osim tumorskih staničnih linija u istraživanje su uključene i dvije ne-tumorske stanične linije, ljudske embrionske stanične linije bubrega HEK-293 i normalni fibroblasti Hef. Osim navedenih staničnih linija koje rastu u kulturi, istraživanja su provedena i na ljudskim limfocitima iz periferne krvi kao vrlo osjetljivim biomarkerima oštećenja da bi se paralelno utvrdio učinak pčelinjega otrova i melitina kod tumorskih i normalnih ne-tumorskih stanica.

U svrhu utvrđivanja citotoksičnog učinka pčelinjega otrova i melitina na stanice prvo je određena vijabilnost stanica nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom. U tu svrhu korištene su navedene tumorske stanične linije. Stanice su izložene 72 sata pčelinjem otrovu u rasponu koncentracija od 0,4 µg/ml do 200 µg/ml te je vijabilnost stanica određena kolorimetrijskim MTT testom (Mickisch i sur., 1990). Rezultati su ukazali na citotoksičnost ovog spoja u uvjetima *in vitro* za sve stanične linije te je uočena ovisnost o dozi pčelinjega otrova. Također je uočena razlika u osjetljivosti stanica na obradu pčelinjim otrovom, no iako se prema rezultatima na pojedinim staničnim linijama čini da je dio staničnih linija osjetljiviji na pčelinji otrov, to opažanje vrijedi samo za stanične linije koje su rasle u mediju sa dodatkom istog seruma (uz dodatak telećeg seruma ili uz dodatak fetalnog telećeg seruma). Ovisnost toksičnosti pčelinjega otrova ovisno o mediju, utvrdilo se obradom HeLa i Hep-2 stanica koje su rasle u mediju uz dodatak telećeg seruma ili uz dodatak fetalnog telećeg seruma. Stanice koje su rasle u mediju sa dodatkom telećeg seruma pokazale su veći stupanj citotoksičnosti na pčelinji otrov od istih stanica koje su rasle u mediju sa dodatkom fetalnog telećeg seruma. Ova razlika u citotoksičnosti ovisno o tipu seruma ukazuje na mogućnost interakcije sastavnica pčelinjega otrova sa proteinima iz seruma koji mogu dovesti ili do aktivacije ili deaktivacije sastavnica prisutnih u pčelinjem otrovu.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da dodatak seruma u stanični medij može dovesti do aktivacije ili deaktivacije pojedinih spojeva te na taj način uzrokovati povećanu ili smanjenu citotoksičnost određenog spoja prema stanicama koje rastu u kulturi sa dodatkom seruma. U ovom istraživanju uočeno je da dodatak fetalnog telećeg seruma umanjuje citotoksičnost pčelinjega otrova ukazujući na inhibitorni učinak proteina iz seruma na sastavnice pčelinjega otrova. Primjerice, inhibitorni učinak seruma na antitumorsku aktivnost metotreksata uočen je tako kod ljudskih stanica leukemije K-562 (Kojima i sur., 2009). Autori

su zaključili da je antitumorska aktivnost metotreksata smanjena dodatkom fetalnog telećeg seruma u odnosu na medij bez dodatka seruma te je ona bila ovisna i o „lotu“ seruma. Nakon provedenih analiza zaključeno je da albumin koji se nalazi u serumu veže na sebe metotreksat tvoreći komplekse sa njim i umanjujući na taj način njegovu citotoksičnost (Kojima i sur., 2009). Smanjenje citotoksičnosti ovisno o dodatku seruma zabilježeno je također za azaserin (Kojima i sur., 2009), amfotericin-B (Assem i sur., 1994), živin-klorid (Bohets i sur., 1994) i karbonske nanočestice (Zhua i sur., 2009) kod različitih tipova staničnih linija. Ova istraživanja ukazuju da se treba uzeti u obzir koncentracija seruma kod uspoređivanja citotoksičnosti pojedinih spojeva iz različitih istraživanja.

Ako gledamo ovisnost djelovanja pčelinjega otrova između stanica koje su rasle u mediju sa dodatkom telećeg seruma, Hef i HEK-293 ne-tumorske stanice pokazale su najveću rezistenciju prema pčelinjem otrovu. Također, niže koncentracije pčelinjega otrova djelovale su stimulatивно na pojedine stanične linije (HeLa, CK2, SW620, Hef). Ako gledamo ovisnost djelovanja pčelinjega otrova kod roditeljskih HeLa i HEp-2 stanica i njihovih sublinija otpornih na cisplatinu, uočavamo da roditeljske linije pokazuju gotovo istu osjetljivost na obradu pčelinjim otrovom. Nasuprot tome, kod njihovih rezistentnih linija opažamo drugačiju osjetljivost prema obradi pčelinjim otrovom. HeLa CK stanice pokazale su jaču osjetljivost u odnosu na roditeljske stanice, dok CK2 stanice pokazuju veću rezistentnost prema pčelinjem otrovu. Ovakve se razlike mogu objasniti biološkim i genetičkim varijacijama između istraživanih stanica. Obrada limfocita periferne krvi također je pokazala toksičnost ovog spoja u uvjetima *in vitro*. Ovdje je korišten raspon koncentracija od 0,1 µg/ml do 20 µg/ml i to u različitim vremenskim periodima. Osim ovisnosti o koncentraciji, pčelinji otrov pokazao je i ovisnost o vremenu izlaganja te je najveći pad vijabilnosti kod ljudskih limfocita zabilježen kod koncentracije pčelinjega otrova od 20 µg/ml i to u vremenu od 48 sati.

Citotoksični učinak pčelinjega otrova temelji se na učincima melitina kao njegove glavne sastavnice. Ovaj spoj dijeli mnoga amfipatska svojstva sa serijom sličnih peptida koji su karakterizirani mogućnošću da narušavaju cjelovitost staničnih membrana na način da stvaraju lomove ili pore u membranskim strukturama. Rezultirajući lomovi u lipidnom dvosloju na taj način dovode do kolapsa transmembranskog elektrokemijskog gradijenta (Bechinger, 1997; Bechinger i Lohner, 2006). U suprotnosti sa normalnim stanicama koje imaju nizak membranski potencijal, membrane tumorskih stanica karakterizira visok membranski potencijal što omogućava mnogim litičkim peptidima, poput melitina, da selektivno uništavaju membrane tumorskih stanica za razliku od membrana normalnih stanica što bi mogao biti jedan od osnovnih mehanizama antitumorske aktivnosti pčelinjega otrova i

melitina (Holle i sur., 2003; Moon i sur., 2006; Son i sur., 2007). Kolaps membranske cjelovitosti potvrđen je u ovom radu bojanjem stanica sa etidij-bromidom, bojom koja ulazi samo u stanice koje imaju oštećenu membranu.

Vrlo brzo djelovanje pčelinjega otrova i melitina upućivalo je da do njegovog učinka dolazi ubrzo nakon obrade stanica te su stanice nakon obrade od samo 1 sata promatrane pod svjetlosnim mikroskopom. U tu svrhu obrađene su HeLa i HeLa CK stanice te A1235 stanice različitim koncentracijama pčelinjega otrova i melitina te su nakon 1 sata izloženosti gledane morfološke promjene. Sve tri stanične linije pokazale su sličan uzorak u morfologiji nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom. Stanice su bile zaokružene i granulirane, kod većih koncentracija pčelinjega otrova i melitina došlo je do njihovog smanjivanja te na kraju do odljepljivanja od podloge. Ovako brze promjene nakon obrade upućivale su da se radi o nekrozi kao tipu stanične smrti. Nasuprot tome, ovakve odlike nisu primijećene u kontrolnim stanicama. Slične promjene nakon obrade pčelinjim otrovom zapazili su Lee i sur. (2007). U njihovom komparativnom istraživanju kod normalnih ljudskih limfocita također su uočene promjene na membrani stanica, dok je kod stanica leukemije došlo do lize stanica nakon izloženosti u koncentracijama od 1  $\mu\text{g/ml}$  i 5  $\mu\text{g/ml}$  u trajanju od 24 sata. Autori su također zaključili da nije došlo do aktivacije apoptotske mašinerije. Osim pčelinjim otrovom stanice su obrađene i cisplatinom kao pozitivnom kontrolom u smislu određivanja morfoloških promjena. Razlika u morfologiji između stanica obrađenih pčelinjim otrovom i cisplatinom upućivala je na potencijalno različit tip stanične smrti. Mikroskopskom analizom stanica koštane srži miša nakon *in vivo* izloženosti melitinu također je jasno uočena nekroza (Ownby i sur., 1997). Ove promjene bile su uočene već 30 minuta nakon obrade melitinom. Nakon 24 sata većina stanica ukazivala je na tip stanične smrti nekrozom. Iz literature je vidljivo da i pčelinji otrov i melitin uzrokuju jake morfološke promjene na tumorskim, ali i na normalnim ne-tumorskim stanicama što je zabilježeno na stanicama karcinoma dojke, pluća i jetre, stanicama leukemije i melanoma, ljudskim limfocitima te gastrointestinalnim stanicama (Jang i sur., 2003; Hu i sur., 2006; Moon i sur., 2006; Lee i sur., 2007; Ip i sur., 2008a,b; Maher i McClean, 2008; Tu i sur., 2008).

S obzirom da su promjene u morfologiji stanica pod svjetlosnim mikroskopom bile inducirane vrlo brzo nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom te su upućivale na tip stanične smrti nekrozom, stanice su nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom u različitim koncentracijama diferencijalno obojane etidij-bromidom i akridin-oranžom kako bi se prema morfologiji jezgre utvrdilo o kojem tipu stanične smrti se točno radi. Stanice su vrlo brzo nakon obrade ukazivale na morfologiju karakterističnu za tip stanične smrti nekrozom. Jezgre

izloženih stanica su, zbog propusnosti plazmatske membrane te ulaska etidij-bromida u stanicu i njegove interkalacije u molekulu DNA, bile ravnomjerno crveno obojane što ukazuje na izostanak kondenzacije kromatina tipičan za apoptozu. Ovdje su također stanice obrađene cisplatinom kao pozitivnom kontrolom apoptotske smrti. Razlika u morfologiji između stanica obrađenih pčelinjim otrovom i cisplatinom upućivala je da pčelinji otrov uzrokuje nekrozu, dok je obrada cisplatinom morfološki jasno pokazivala apoptotski tip stanične smrti. Sukladno ovim zapažanjima, melitin je uzrokovao nekrozu u gastrointestinalnim stanicama, što je također bilo jasno vidljivo pod mikroskopom u istraživanju Maher i McClean (2008), dok je obrada vinkristinom u jednakim mikroskopskim uvjetima jasno pokazala apoptozu kao tip stanične smrti.

U skladu sa rezultatima uočenima pod svjetlosnim i fluorescentnim mikroskopom, analiza cijepanja proteina poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) Western blot metodom, kao tipične karakteristike apoptoze, pokazala je da kod HeLa stanične linije, nakon obrade stanica pčelinjim otrovom, ne dolazi do cijepanja PARP proteina. Nasuprot tome, obrada cisplatinom, koja je korištena kao kontrola apoptotske smrti, mikroskopski je ukazivala na tip stanične smrti apoptozom kod sva tri tipa ispitanih stanica, a nakon obrade HeLa stanica cisplatinom došlo je i do cijepanja PARP proteina. Kod limfocita periferne krvi učinak je bio vrlo sličan. Pčelinji otrov i melitin i ovdje su uzrokovali morfološke promjene koje se očituju u promjenama na membranama koje nastupaju ubrzo nakon obrade. Također, kod duže izloženosti nastupila je granulacija cijelih stanica koja završava konačnom lizom stanica koja je nastupila kod većih koncentracija pčelinjega otrova i melitina te dužih vremenskih izlaganja. Tijekom mikroizolacije limfocita uočena je promjena u boji separacijskog medija što upućuje na hemolizu eritrocita pod utjecajem pčelinjega otrova i melitina. Watala i Kowalczyk (1990) također su uočili potpunu lizu eritrocita nakon obrade pčelinjim otrovom i to u koncentracijama od 2  $\mu\text{g/ml}$  i 3  $\mu\text{g/ml}$ . Slične promjene na eritrocitima uočili su Tosteson i suradnici (1985) nakon obrade eritrocita sa melitinom. Melitin je uzrokovao lizu eritrocita koja je zabilježena u prvih nekoliko minuta nakon obrade stanica. Kod limfocita pčelinji je otrov doveo do povećanja oba tipa stanične smrti, mjereno testom stanične difuzije (Singh, 2005) u odnosu na kontrolne neizložene stanice te je postotak apoptoze i nekroze bio ovisan i o koncentraciji pčelinjega otrova i o vremenu izloženosti. Većina stanica imala je izgled karakterističan za nekrozu te je taj tip stanične smrti bio povišen i u odnosu na tip stanične smrti putem apoptoze. Uspoređujući oba tipa stanične smrti, zaključak je da je stanična smrt uzrokovana nekrozom osnovni tip stanične smrti uzrokovan obradom pčelinjim otrovom. Nekrozu uzrokovanu melitinom također su uočili Shaposhnikova i suradnici (1997) u

istraživanju na timocitima iz štakora. Uočeno je da koncentracije melitina ispod 5  $\mu\text{g/ml}$  djeluju stimulirajuće na timocite, dok veće koncentracije uzrokuju lizu stanica te staničnu smrt putem primarne nekroze. Nadalje, niti jedna koncentracija melitina u timocitima štakora nije uzrokovala apoptozu.

U literaturi postoje oprečni podaci vezani uz tip stanične smrti koju uzrokuju pčelinji otrov i melitin. Pčelinji otrov uzrokovao je apoptosku smrt u stanicama karcinoma dojke, stanicama karcinoma pluća, stanicama karcinoma jetre, stanicama leukemije, stanicama crijevnog karcinoma, fibroblastima, stanicama karcinoma prostate, stanicama karcinoma mokraćnog mjehura, mišičinim vaskularnim stanicama te u stanicama melanoma (Jang i sur., 2003; Oršolić i sur., 2003; Hong i sur., 2005; Hu i sur., 2006; Moon i sur., 2006; Son i sur., 2006; Ip i sur., 2008a,b; Tu i sur., 2008, Park i sur., 2011; Ip i sur., 2012). Istraživanja također pokazuju da, osim apoptotske smrti, pčelinji otrov može uzrokovati i nekrozu što je pokazano na stanicama karcinoma dojke, stanicama karcinoma vrata grlića maternice, stanicama glioblastoma i fibroblastima sličnim sinoviocitima (Oršolić i Bašić, 2003; Oršolić, 2009b; Stuhlmeier i sur., 2007). Melitin kao glavna sastavnica također uzrokuje oba tipa stanične smrti. Apoptozom uzrokovana stanična smrt uočena je kod mišičinih stanica, stanica leukemije, stanica karcinoma jetre i stanica osteosarkoma (Chen i sur., 2004; Li i sur., 2006; Son i sur., 2006; Chu i sur., 2007; Moon i sur., 2008; Wang i sur., 2009). Nasuprot tome, nekrozom izazvana stanična smrt uočena je u timocitima štakora, stanicama koštane srži, gastrointestinalnim stanicama, stanicama karcinoma dojke, stanicama vrata grlića maternice i stanicama glioblastoma, dok je smrt nalik nekrozi zabilježena u eritrocitima, limfoblastoidnim stanicama, limfocitima te alveolarnim stanicama štakora (Tosteson i sur., 1985; Duke i sur., 1994; Findlay i sur., 1995; Sakamoto i sur., 1996; Ownby i sur., 1997; Shaposhnikova i sur., 1997; Weston i sur., 1998; Pratt i sur., 2005; Maher i McClean, 2008). Iako je i u ovom istraživanju pčelinji otrov u limfocitima nakon obrade uzrokovao apoptozu, što se moglo vidjeti na promijenjenoj morfologiji stanica u DNA difuzijskom testu, nekroza kao tip stanične smrti je dominirala. Slične rezultate zabilježio je Stuhlmeier (2007) nakon obrade stanica pčelinjim otrovom gdje je također dominantno uočen tip stanične smrti u vidu nekroze. Nadalje, Lee i suradnici (2007) također nisu uočili cijepanje kaspaze-9, kaspaze-3 niti proteina poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) koji bi išli u prilog tome da pčelinji otrov uzrokuje apoptozu.

U literaturi je poznato da je melitin glavna sastavnica pčelinjega otrova koja sadržava preko 50% suhe tvari pčelinjega otrova. Također, smatra se da je upravo ovaj peptid zaslužan za glavninu toksičnost samog otrova (Neuman i Haberman, 1954; Haberman, 1971, 1972).



Da bi se potvrdila ova tvrdnja stanice su obrađene melitinom te je ispitana njegova toksičnost. Melitin se pokazao toksičnim za sve tipove staničnih linija te je i njegova citotoksičnost bila ovisna o dozi. Kako je doza kojom se postigao isti učinak bila manja nego ona potrebna za citotoksičnost pčelinjega otrova, može se ustvrditi da je melitin glavna sastavnica pčelinjega otrova koja je, između ostalog, zaslužna i za toksičnost samoga otrova. Citotoksičnost melitina također je ovisna i o tipu stanica, no iako se prema rezultatima na pojedinim staničnim linijama čini da je dio staničnih linija osjetljiviji na melitin, kao što je bio slučaj sa pčelinjim otrovom, to opažanje opet vrijedi samo za stanične linije koje su rasle u mediju sa dodatkom istog seruma. I u slučaju sa melitinom, Hef i HEK-293 ne-tumorske stanične linije pokazale su najveću rezistenciju prema melitinu te je ona bila jednaka u oba tipa staničnih linija. Uspoređujući citotoksičnost pčelinjega otrova i melitina, razlika u  $IC_{50}$  nakon obrade melitinom između najosjetljivijih te najrezistentnijih staničnih linija je mnogo manja nego ona uočena nakon obrade pčelinjim otrovom. U oba slučaja, A1235 stanice pokazuju najveću osjetljivost, dok su najrezistentnije HEK-293. Nadalje, razlike u osjetljivosti između ne-tumorskih staničnih linija (HEK-293 i Hef) prema pčelinjem otrovu gotovo nestaju nakon obrade istih stanica melitinom. Ovi rezultati ukazuju da postoje razlike u osjetljivosti na pčelinji otrov i melitin kod različitih staničnih linija. Nakon obrade melitinom također je zabilježen jednak učinak na morfologiju stanica, ali i na tip stanične smrti i to kod sva tri tipa staničnih linija kao i nakon obrade pčelinjim otrovom, no doza melitina koja je potrebna da bi se postigao isti učinak je bila mnogo manja. Slična situacija uočena je i nakon obrade perifernih limfocita melitinom. Citotoksičnost melitina prema perifernim limfocitima također je ovisila o dozi i duljini obrade. Iz navedenih rezultata može se utvrditi da pčelinji otrov, ali i melitin posjeduju citotoksični učinak prema tumorskim, ali i ne-tumorskim staničnim linijama.

Protutumorsko djelovanje pčelinjega otrova ovisno je o njegovoj glavnoj sastavnici melitinu. Taj maleni peptid dijeli svoja amfipatska svojstva sa nizom peptida čija je osnovna karakteristika mogućnost da mijenjaju svojstvo membrane i narušavanju cjelovitost membranskog lipidnog dvosloja na način da stvaraju defekte ili pore u samom dvosloju. Ovakve promjene uočene su i u ovom istraživanju gledajući stanice pod svjetlosnim i fazno-kontrastnim mikroskopom gdje je uočeno pucanje stanične membrane te granulacija samih stanica. Takve promjene u membranskom dvosloju dovode do kolapsa transmembranskog elektrokemijskog gradijenta (Dawson i sur., 1978; Drake i Hider, 1979; Dempsey, 1990; Bechinger, 1997; Bechinger i Lohner, 2006). U usporedbi sa normalnim stanicama koje imaju nizak membranski potencijal, stanična membrana tumorskih stanica ima

visok membranski potencijal što omogućava mnogim litičkim peptidima poput melitina da selektivno narušavaju membrane tumorskih stanica u većoj mjeri nego membrane normalnih stanica. Ovaj mehanizam mogao bi biti jedna od osnova protutumorskog djelovanja melitina, ali i samog pčelinjega otrova (Holle i sur., 2003; Moon i sur., 2006; Son i sur., 2007).

Stanični odgovor na djelovanje pčelinjega otrova i njegovih sastavnica ovisan je i o staničnom tipu. Melitin pri jednakim koncentracijama djeluje toksičnije na stanice što ide u prilog tome da je osnovna toksična komponenta pčelinjega otrova upravo taj mali bazični polipeptid. Također, osjetljivost stanica prema pčelinjem otrovu i melitinu je različita. To bi se moglo objasniti činjenicom da iako je melitin glavna sastavnica samoga otrova, otrov u sebi sadrži i cijeli niz drugih malih peptida i enzima koji sudjeluju u toksičnosti na staničnoj razini te da sinergizam svih sastavnica određuje osjetljivost pojedinih stanica na ovaj kompleksan spoj (Neumann i Haberman, 1954; Haberman, 1971, 1972; Gauldie, 1976, 1978; Hider, 1988; Stuhlmeier, 2007).

U ovom istraživanju pokazano je da pčelinji otrov i melitin uzrokuju nekrozu kao osnovni tip stanične smrti što je potvrđeno diferencijalnim bojanjem etidij-bromidom i akridin-oranžom pod fluorescencijskim mikroskopom, DNA difuzijskim testom te Western blot metodom. Već desetljećima brojna istraživanja pokušavaju razjasniti stanične putove koji reguliraju apoptozu omogućavajući na taj način razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih načina u liječenju tumora i tek je nedavno nekroza kao tip stanične smrti postala zanimljiva u pogledu moguće terapije tumora (Amaravadi i Thompson, 2007). Nekroza je nereverzibilni upalni tip stanične smrti koji također može imati svoju ulogu u terapiji protiv tumora. Nekroza se često spominje kao nepredvidivi oblik stanične smrti koji se smatra nereguliranim procesom unutar višestaničnog organizma. Poremećaji u staničnoj membrani, koji su jedna od glavnih karakteristika nekroze, dovode do izlivanja unutarstaničnih proteina koji na taj način mogu aktivirati stanični odgovor imunološkog sustava na određena oštećenja stanice (Zeh i Lotze, 2005; Amaravadi i Thompson, 2007). Brzi upalni proces i aktivacija imunološkog sustava kao odgovor na oštećenje u suprotnosti su sa apoptotskim tipom stanične smrti u kojem se stanice polagano uklanjaju uz pomoć tkivnih makrofaga. Upravo zbog toga nekroza se smatrala kao patološko stanje stanične smrti koje nije fiziološki programirani proces. Unatoč tome veliki broj novijih eksperimentalnih podataka ukazuju da kao i u slučaju apoptoze, mnogi specifični geni mogu regulirati procese vezane uz nekrozu, ukazujući da bi nekroza kao i apoptoza mogla biti regulirani proces koji se aktivira različitim specifičnim fiziološkim i patološkim podražajima (Festjens i sur., 2006; Amaravadi i Thompson, 2007; Goldstein i Kroemer, 2007; Proskuryakov i Gabai, 2010). Navedena

istraživanja govore u prilog uključivanju nekroze kao jednog od mogućih načina smrti tumorskih stanica koji bi svoju ulogu mogao imati i u terapijske svrhe.

Jedna od najvećih prepreka u uspješnom liječenju tumora klasičnom kemoterapijom povezana je sa razvijanjem rezistencije tumorskih stanica na postojeće kemoterapeutike za vrijeme same kemoterapije. Upravo zbog toga je, osim samostalnog djelovanja pčelinjega otrova na tumorske stanice, ispitano i njegovo djelovanje u kombinaciji sa cisplatinom. Jedan od novijih trendova u liječenju tumora je i kombinacija postojećih citostatika sa tradicionalnim ljekovitim pripravcima poput pčelinjega otrova. Cisplatina je danas jedan od najznačajnijih i najučinkovitijih agenasa koji se koristi u liječenju širokog spektra tumorskih oboljenja (Highley i Calvert, 2000). Citotoksičnost cisplatine temelji se na stvaranju DNA platinskih adukata. Jedna od posljedica stvaranja takvih adukata je zastoj u staničnom ciklusu da bi se stanici omogućio popravak nastalih oštećenja. U slučaju neuspješnog popravka dolazi do apoptoze koja se aktivira različitim signalnim putovima u samoj stanici (Fink i Howell, 2000; Fuertes i sur., 2003). Rezistencija koja se može javiti na obradu cisplatinom uvelike može smanjiti željeni rezultat terapije kod pacijenata oboljelih od tumora. Rezistencija na cisplatinu posljedica je različitih događaja. Nekoliko različitih mehanizama rezistentnosti na cisplatinu mogu se pojaviti unutar samo jedne stanične populacije. Mehanizmi uključeni u rezistenciju na cisplatinu mogu biti smanjena akumulacija cisplatine, povećana detoksikacija cisplatine, pojačano odstranjenje DNA platinskih adukata, mogućnost replikacije mimo adukata te inhibicija apoptoze (Akiyama i sur., 1999; Jordan i Carmo-Fonseca, 2000; Siddik, 2003; Brozović i sur., 2004). Jedan od najznačajnijih faktora koji utječu na platinaciju molekule DNA je promjena u unutarstaničnoj koncentraciji cisplatine. Smanjena akumulacija cisplatine u stanicama rezistentnima na taj spoj najčešće je zamijećena, no mehanizmi koji stoje iza toga još uvijek nisu razjašnjeni. Smanjenje akumulacije moglo bi biti posljedica smanjenog unosa cisplatine u stanicu, povećanog istjecanja cisplatine iz stanice ili oboje (Zisowsky i sur., 2007).

Da bi se ispitaio zajednički učinak pčelinjega otrova i cisplatine, stanične linije ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i ljudskog karcinoma grkljana HEp-2 te njihove sublinije stabilno otporne na cisplatinu, HeLa CK i CK2 obrađene su pčelinjim otrovom u trajanju od jednog sata nakon čega je dodana cisplatina uz daljnje prisustvo pčelinjega otrova. Obrada pčelinjim otrovom djelovala je aditivno na postojeću citotoksičnost cisplatine koja je bila jače izražena u staničnim linijama rezistentnima na cisplatinu. Obje stanične linije te njihove sublinije otporne na cisplatinu pokazale su jednak učinak obrade pčelinjim otrovom na citotoksičnost cisplatine ukazujući na aditivan učinak. Također, razlika

u otpornosti HeLa i HeLa CK te HEP-2 i CK2 stanica na ciplatinu nije se promijenila uslijed obrade pčelinjim otrovom. Unatoč tome što nije pokazan značajniji sinergistički učinak pčelinjega otrova i cisplatine, zabilježeni aditivni učinak ova dva spoja mogao bi biti koristan sa stanovišta smanjivanja doze cisplatine koja je potrebna za antitumorski učinak, a sa sobom donosi određene negativne nuspojave. Mogući mehanizam ovog djelovanja mogao bi biti povećan unos cisplatine u stanicu i njezina pojačana akumulacija do koje dolazi zbog stvaranja pora u membrani stanica koje uzrokuje melitin kao glavna sastavnica pčelinjega otrova, posebice u staničnim linijama rezistentnima na cisplatinu. Iako detalji oko mehanizma djelovanja pčelinjega otrova na cisplatinu još nisu u potpunosti razjašnjeni, inhibitorski učinak na tumorske stanice je očit. Kako je citotoksičnost cisplatine povećana uz dodatak novog spoja, u ovom slučaju pčelinjega otrova, kombinirana terapija ovakvog tipa mogla bi nadvladati rezistenciju koja se javlja prema standardnoj kemoterapiji. Učinak pčelinjega otrova i melitina na citostatike već je ranije zabilježen na stanicama leukemije L1210 i stanicama karcinoma vrata grlića maternice HeLa te V79 stanicama kineskog hrčka (Lazo i sur., 1985; Oršolić, 2009b). Uočeno je da se letalni učinak bleomicina može pojačati dodatkom neletalne doze melitina i pčelinjega otrova. Također je pokazano da melitin i pčelinji otrov inhibiraju popravak nastalih oštećenja te sprečavaju oporavak molekule DNA u stanicama obrađenim bleomicinom. Nadalje, kao ostali mogući mehanizmi inhibicije rasta navode se apoptoza, nekroza i liza stanica (Oršolić, 2009b).

Nakon što je utvrđeno da pčelinji otrov, ali i njegova glavna sastavnica melitin djeluju citotoksično na tumorske, ali i na ne-tumorske stanice ispitan je i odgovor normalnih stanica na djelovanje pčelinjega otrova i melitina. U tu svrhu za daljnja istraživanja korišteni su ljudski limfociti iz periferne krvi kao vrlo osjetljivi biomarkeri oštećenja uzrokovanih različitim toksikantima. I pčelinji otrov i melitin djelovali su citotoksično na periferne limfocite te je citotoksičnost bila ovisna o vremenu izlaganja i dozi pčelinjega otrova i melitina. Kao i kod tumorskih stanica, morfološke promjene na limfocitima su uključivale promjene na membranama koje nastupaju ubrzo nakon obrade. Također, kod duže izloženosti nastupila je granulacija cijelih stanica koja završava konačnom lizom. Stanična smrt je dominantno bila uzrokovana nekrozom iako je nakon obrade pčelinjim otrovom uočen određen postotak stanica u apoptozi.

U sljedećem koraku ispitan je utjecaj pčelinjega otrova i melitina na genom stanica odnosno njihov utjecaj na oštećenje molekule DNA. U tu svrhu korišten je alkalni komet test koji služi za detekciju jednolančanih i dvolančanih lomova u molekuli DNA (Collins, 2002, 2004; Collins i sur., 2008; McArt i sur., 2009). Pčelinji otrov i melitin značajno su povisili

postotak DNA u repu kometa (ali i ostale mjerene parametre alkalnog komet testa duljinu repa i repni moment; ovi podaci nisu prikazani u rezultatima). Rezultati dobiveni ovom tehnikom ukazivali su na oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom, ali i melitinom. Također je uočeno da su oštećenja bila ovisna o dozi, ali i o vremenu izlaganja. Oštećenje molekule DNA zabilježeno je i na tumorskim stanicama karcinoma dojke u rasponu koncentracija od 2,5 µg/ml do 10,5 µg/ml, što odgovara koncentracijskom rasponu korištenom i u ovom radu. Oštećenje molekule DNA u stanicama karcinoma dojke također je bilo ovisno o dozi pčelinjega otrova (Ip i sur., 2008a). Komparativno istraživanje na stanicama leukemije HL-60 i normalnim ljudskim limfocitima ukazivalo je na oštećenje genoma u koncentracijskom rasponu od 1 µg/ml do 10 µg/ml u oba tipa stanica, no to oštećenje bilo je jače izraženo u stanicama leukemije što ide u prilog različitom djelovanju pčelinjega otrova na različite tipove stanica (Lee i sur., 2007).

Oksidativni stres je citotoksično stanje koje se javlja uslijed povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) ili smanjenja kapaciteta antioksidativnog sustava, a koje rezultira oštećenjem molekule DNA, proteina, ugljikohidrata i lipidnom peroksidacijom (Sohal i Weindruch, 1996; Marlin i sur., 2004). U posljednjih nekoliko godina postalo je jasno da visoke koncentracije ROS-ova mogu oštetiti osjetljive stanične strukture poput molekule DNA (Circu i Aw, 2010; Kryston i sur., 2011). Oštećenja vidljiva alkalnim komet testom mogu biti i posljedica početka popravka oksidativnih oštećenja u molekuli DNA u vidu apurinskih i apirimidinskih mjesta koja su u alkalnim uvjetima podložna lomovima (Collins, 2004). Uz alkalnu verziju komet testa istovremeno je napravljena i modificirana verzija komet test u kojem se uz pomoć specifičnog enzima formamido-pirimidin-DNA-glikozilazom (Fpg) mogu uočiti oksidativna oštećenja na molekuli DNA (Møller, 2006; Collins, 2009). Parametri Fpg-modificiranog komet testa također su bili značajno povišeni u odnosu na kontrolu, ali i na obradu puferom u odnosu na obradu enzimom, čime je pokazano da je nakon izlaganja pčelinjem otrovu i melitinu došlo i do oksidativnih oštećenja molekule DNA te da ROS-ovi mogu imati udjela u oštećenju molekule DNA, ali i samih stanica uslijed izloženosti pčelinjem otrovu i melitinu

Daljnja genomska oštećenja ispitana su i uz pomoć mikronukleus testa, tehnike koja pokazuje široki spektar kromosomskih malformacija nakon izlaganja stanica određenom agensu (Fenech, 1993, 2000; Kirsch-Volders i sur., 2003; Fenech, 2006, 2007; Samanta i Dey, 2012). Pčelinji otrov, ali i melitin uzrokovali su niz genomskih oštećenja koja su također bila ovisna o dozi i vremenu izlaganja. Rezultati su pokazali značajno povećanje svih parametara

mikronukleus testa (mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i jezgrinih pupova) nakon obrade pčelinjim otrovom, dok je melitin uzrokovao značajno povećanje u broju mikronukleusa i jezgrenih pupova. Nukleoplazmatski mostovi mogu se koristiti kao mjera dicentričnih kromosoma (čije su centromere povučene na suprotne polove tijekom stanične diobe) jer jednolančani i dvolančani lomovi, kao i njihov pogrešni popravak koji može biti induciran ROS-om, često rezultiraju stvaranjem acentričnih i dicentričnih kromosoma. Nadalje, acentrični kromosomi (koji dovode do stvaranja mikronukleusa) nastaju kao nusproizvod stvaranja dicentričnih kromosoma (IAEA, 1986; Fenech i sur., 2003, 2011). Upravo pojava nukleoplazmatskih mostova uočena nakon obrade pčelinjim otrovom može se povezati sa oksidativnim stresom (Umegaki i Fenech, 2000) čija oštećenja su već ranije uočena primjenom Fpg-modificiranog komet testa. U komparativnom istraživanju na stanicama leukemije HL-60 i normalnim ljudskim limfocitima nakon 72 sata izloženosti pčelinjem otrovu uočeno je značajno povećanje mikronukleusa ovisno o dozi kod HL-60 leukemijskih stanica, ali taj je učinak izostao kod normalnih ljudskim limfocita iako je učestalost mikronukleusa i ovdje bila nešto viša nego u kontrolnom uzorku (Lee i sur., 2007). Doze pčelinjega otrova korištene u ovom slučaju bile su nešto niže od doza korištenih u ovom istraživanju te je mjerena samo učestalost nastanka mikronukleusa, a ne i nukleoplazmatskih mostova i pupova kao što je to bio slučaj u ovom radu.

U staničnom odgovoru na oksidacijski stres sudjeluje nekoliko unutarstaničnih mehanizama inaktivacije ROS-ova (Kaur i Geetha, 2006). U ne-enzimatskom mehanizmu, u kojem sudjeluju spojevi koji direktno na sebe vežu ROS, sudjeluje i glutathion (Meister i Anderson, 1983; Meister, 1994). Da bi se ispitaio mehanizam oksidativnih oštećenja uzrokovanih pčelinjim otrovom i melitinom u uzorcima pune krvi su nakon obrade mjerene koncentracije glutathiona i malondialdehida čije se promjene smatraju biomarkerom oksidacijskog stresa. Nakon obrade spektrofotometrijski je mjerena razina glutathiona u uzorcima pune krvi. Sam glutathion je jedan od najznačajnijih unutarstaničnih tiola koji je prisutan u gotovoj svakoj eukariotskoj stanici. On se u stanicama nalazi u reduciranom obliku, oksidiranom obliku ili vezan za proteine. U organizmu glutathion djeluje kao antioksidans te štiti stanice od lipidne peroksidacije, djeluje kao detoksikant te sudjeluje u staničnoj proliferaciji i razvoju (Swiergosz-Kowalewska i sur., 2006; Ballatori i sur., 2009). Njegova koncentracija smanjuje se izlaganjem vanjskim uzročnicima stresa što je bio slučaj i nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom gdje je zabilježen pad koncentracije glutathiona ovisno o dozi pčelinjega otrova ili melitina te dužini trajanja izloženosti. Već ranije je dokazano da pad koncentracije glutathiona dovodi do fragmentacije molekule DNA koja kasnije dovodi do

stanične smrti putem apoptoze ili nekroze (Higuchi, 2004) što je bio slučaj i u ovom radu nakon obrade pčelinjim otrovom ili melitinom.

Paralelno uz koncentraciju glutaciona mjerena je i koncentracija malondialdehida kao jednog od prvih nusprodukata lipidne peroksidacije (Esterbauer, 1990, 1993; Esterbauer i sur., 1991; Del Rio i sur., 2005). Nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom, u uzorcima je uočen porast koncentracije malondialdehida koji je bio ovisan o dozi, ali i vremenu izlaganja pčelinjem otrovu ili melitinu. Porast u koncentraciji malondialdehida zabilježen je i u serumu miševa kojima je iniciran pčelinji otrov (Prado i sur., 2010). Nastali malondialdehid vrlo je reaktivan spoj koji sudjeluje u reakciji oksidativnog oštećenja te je u ovom slučaju poslužio kao marker za mjerenje razine lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa nakon obrade pčelinjim otrovom. Lipidna peroksidacija uzrokovana pčelinjim otrovom i melitinom također je zabilježena u proksimalnim stanicama kanalića bubrega zeca PTC (Han i sur., 2002a,b). Povećanje koncentracije malondialdehida, zabilježeno i u ovim pokusima, ide u prilog da pčelinji otrov i melitin uzrokuju lipidnu peroksidaciju koja dovodi do oksidativnih oštećenja koja su uočena mjerenjem oštećenja molekule DNA Fpg-modificiranim komet testom. Slična zapažanja zabilježio je Stuhlmeier (2007) na mononuklearnim i polimorfonuklearnim stanicama leukocita gdje je uočeno stvaranje kisikovih radikala kao odgovor na obradu pčelinjim otrovom. Tu i suradnici (2008) su također uočili porast ROS-ova u vidu hidroksilnog radikala i vodikovog peroksida nakon obrade stanica ljudskog melanoma A2058 pčelinjim otrovom. Oslobođanje velike količine kisikovih radikala moglo bi na taj način pridonijeti daljnjem oštećenju tkiva i stanica. Nadalje, velike količine kisikovih radikala oslobođene kao odgovor na pčelinji otrov mogu dodatno pojačati negativan učinak pčelinjega otrova povećanim stvaranjem interleukina-8 (IL-8) ili aktivacijom kolagenaze (Weiss i sur., 1985; Weiss, 1989; DeForge i sur., 1992; Hampton i sur., 1998). Ovi rezultati također su u skladu sa ostalim rezultatima u kojima je pčelinji otrov doveo do stvaranja ROS-ova što je zabilježeno na ljudskim stanicama karcinoma dojke MCF-7 (Ip i sur., 2008a), ljudskim stanicama karcinoma vrata grlića maternice Ca Ski (Ip i sur., 2008b) i stanicama karcinoma mokraćnog mjehura TSGH-8301 (Ip i sur., 2012). Također je predloženo da određene sastavnice pčelinjega otrova, kao i sam pčelinji otrov, koje dovode do stvaranja ROS-ova kasnije mogu aktivirati obitelj gena p53 te na taj način dovesti do zastoja u staničnom ciklusu i apoptoze (Oršolić, 2012).

Poznato je da je glutation glavni unutarstanični antioksidans koji ima različite biološke funkcije. Jedna od osnovnih funkcija mu je zaštita stanice od oksidativnih oštećenja uzrokovanih ROS-om uz pomoć različitih enzimatskih i ne-enzimatskih reakcija (Meister i

Anderson, 1983; Meister, 1994; Zhang i sur., 1999). Da bi se potvrdio utjecaj oksidativnog stresa na oštećenje molekule DNA, uzorci pune krvi su obrađeni sa N-acetil-L-cisteinom (NAC), spojem koji potiče endogenu količinu glutaciona. NAC kao izmijenjeni oblik aminokiseline cisteina ima ulogu u obrani od oksidativnog stresa. Osim što djeluje kao prekursor u sintezi glutaciona, poznato je da ovaj spoj može direktno vezati slobodne radikale (Aruoma i sur., 1989; Cotgreave, 1997). Obrada NAC-om zaštitila je stanice od oksidativnih oštećenja što je uočeno mjerenjem oštećenja molekule DNA alkalnim i Fpg-modificiranim komet testom. Ovi rezultati u skladu su sa istraživanjima koja su također uočila protektivnu ulogu NAC-a od oštećenja molekule DNA na različitim tipovima stanica i sa različitim genotoksičnim spojevima (Žegura i sur., 2006; Hu i sur., 2008; Kalariya i sur., 2009).

Nadalje obrada NAC-om prije obrade pčelinjim otrovom spriječila je promjene u koncentraciji glutaciona i malondialdehida koje su bile uzrokovane pčelinjim otrovom ukazujući još jednom da oksidativni stres ima ulogu u toksičnosti pčelinjega otrova. Sličan učinak zabilježen je na stanicama proksimalnih kanalića bubrega zeca i na stanicama melanoma A2058 gdje je obrada antioksidansom NAC-om, ali i nekim drugim antioksidansima poput vitamina C i vitamina E značajno zaštitila stanice od lipidne peroksidacije i smrti što također ide u prilog da je stvaranje ROS-ova jedan od mogućih mehanizama djelovanja pčelinjega otrova (Han i sur., 2002a; Tu i sur., 2008). U ovom istraživanju NAC je uspio povećati koncentraciju glutaciona i smanjiti oksidativna oštećenja lipida i molekule DNA ukazujući da glutation i malondialdehid igraju važnu ulogu u toksičnosti uzrokovanj pčelinjim otrovom. Nadalje, inhibitorni učinak NAC-a na ukupna i oksidativna oštećenja molekule DNA ukazuju da glutation igra važnu ulogu u očuvanju molekule DNA od genotoksičnosti pčelinjega otrova.

Rezultati su također pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između postotka DNA u repu alkalnog i Fpg-modificiranog komet testa sa količinom izmjerenog malondialdehida i značajnu negativnu korelaciju sa količinom izmjerenog glutaciona. Korelacija između oštećenja molekule DNA i koncentracije malondialdehida nije toliko iznenađujuća jer je malondialdehid jedan od najvažnijih aldehydskih produkata lipidne peroksidacije. Ovaj reaktivan spoj može oštetiti molekulu DNA stvarajući sa njom DNA adukate te blokirajući sparivanje baza unutar molekule DNA (Esterbauer i sur., 1990; Del Rio i sur., 2005). Ovi rezultati slažu se sa poznatom pretpostavkom da proizvodi lipidne peroksidacije uzrokuju oksidativna oštećenja molekule DNA (Marnett, 2002, Winczura i sur., 2012). Na osnovu korelacije između povećanja koncentracije malondialdehida, smanjenja koncentracije glutaciona, ukupnih oštećenja i oksidativnih oštećenja molekule DNA može se tvrditi da je za



barem dio oštećenja uzrokovanih pčelinjim otrovom, ali i melitinom odgovaran oksidativni stres.

Različiti kemijski i fizikalni agensi dovode do stvaranja ROS-ova koji stanice mogu dovesti u stanje oksidativnog stresa. Kada je razina oksidativnog stresa visoka, stanično preživljenje ovisi o mogućnosti same stanice da se prilagodi na stres i pruži mu otpor. Druga varijanta je odlazak stanica u staničnu smrt uzrokovanu apoptozom (Finkel i Holbrook, 2000). Jedan od mehanizama djelovanja pčelinjega otrova i melitina mogao bi biti preko oksidativnog stresa što je dokazano u ovom radu porastom lipidne peroksidacije, smanjenjem antioksidativne aktivnosti te povećanjem oksidativnih oštećenja molekule DNA, no mehanizam koji stoji iza te indukcije još uvijek nije razjašnjen. Jedan od pretpostavljenih mehanizama uključuje aktivaciju fosfolipaze C, membranskog enzima koji katalizira hidrolizu inozitol-fosfolipida za kojeg je dokazano da sudjeluje u modulaciji preživljenja i smrti stanica (Heinz i sur., 1998; Rebecchi i Pentyala, 2000) stoga je cilj bio utvrditi postoji li povezanost lipidne peroksidacije, kao posljedice oksidativnog stresa, i aktivnosti fosfolipaze C. Dobiveni rezultati ukazuju na povezanost lipidne peroksidacije i pojačanje aktivnosti enzima fosfolipaze C nakon obrade melitinom te se može zaključiti kako melitin utječe na aktivnost fosfolipaze C. Sukladno rezultatima dobivenima u ovom radu obrada melitinom uzrokovala je aktivaciju fosfolipaze C u ljudskim keratinocitima HaCaT (Haase i sur., 1996) i u stanicama jetre štakora (Haber i sur., 1991). Osim fosfolipaze C, melitin može aktivirati i druge enzime poput G-proteina (Mahady i sur., 1998), protein kinaze C (Mau i Vilhardt, 1997), adenilat ciklaze (Knowles i Farndale, 1988) i fosfolipaze D (Lee i sur., 1998; Liu i sur., 1998; Saini i sur., 1999). Pretpostavlja se da se pojačana aktivnost fosfolipaze C javlja kao obrana stanice od oksidativnog stresa uzrokovanog obradom melitinom. Uloga fosfolipaze C u staničnoj obrani od oksidacijskog stresa potvrđena je i ranije (Wang i sur., 2001; Bai i sur., 2002). Također je utvrđeno da fosfolipaza C igra ulogu u programiranoj staničnoj smrti putem apoptoze (Müller-Decker, 1989; Schütze i sur., 1992; Halstead i sur., 1995; Machleidt i sur., 1996; Bjørkøy i sur., 1997; Li i sur., 1998). Apoptoza uzrokovana zmijskim otrovom nakon obrade endotelnih stanica bila je uzrokovana pojačanom aktivacijom fosfolipaze C (Miao i sur., 1997; Zhao i sur., 2004). Kako je nakon obrade pčelinjim otrovom uočen određen postotak stanica u apoptozi, ovaj tip stanične smrti mogao bi biti povezan sa aktivacijom fosfolipaze C, no zbog izrazitog litičkog djelovanja sastavnica pčelinjega otrova, a posebice melitina, većina stanične smrti karakterizirana je nekrozom.

Rezultati dobiveni na ljudskim limfocitima periferne krvi ukazuju da su pčelinji otrov i melitin toksični i za normalne stanice. Do sada je već pokazano da pčelinji otrov ispoljava

svoju toksičnost u *in vitro* uvjetima te izaziva bol što je pokazano u *in vivo* istraživanjima (Lee i sur., 2007). Toksičnost pčelinjega otrova ovisna je o njegovim sastavnicama kao što su melitin kojeg u pčelinjem otrovu ima oko 50%, zatim o fosfolipazi A<sub>2</sub> čija aktivnost se pojačava melitinom te o cijelom nizu drugih malih peptida poput apamina koju su zaslužni za učinke dobivene i u ovom radu. Ispitivanja medicinske primjene prirodnih spojeva koji se dobivaju iz biljaka i životinja sve su češća ne samo u orijentalnoj već i u zapadnoj medicini. Veliki broj tih istraživanja bavi se upravo djelovanjem otrova, a posebno pčelinjega otrova na različitim tumorskim stanicama. Veliki broj danas dostupnih istraživanja ukazuje da bi ovaj otrov mogao imati primjenu u liječenju različitih tumora, ali točan mehanizam protumorskog djelovanja ovoga kompleksnog spoja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Neki od mehanizama pčelinjega otrova i melitina vezani su za aktivaciju fosfolipaze A<sub>2</sub>, kaspaza i metaloproteinaza koje mogu uništiti stanice tumora (Holle i sur., 2003; Moon i sur., 2006). Konjugacija melitina sa hormonskim receptorima i genska terapija sa melitinom mogle bi biti korisne u daljnjem razvoju terapija pojedinih tumora (Li i sur., 2003, 2004; Ling i sur., 2004; Russell i sur., 2004). Do sada je također zabilježen i inhibitorni učinak rekombinantnih virusa koji nose gen za melitin prema tumorskim stanicama (Ling i sur., 2005) što bi također mogao biti jedan od načina suzbijanja tumora.

Melitin je posebno zanimljiv kandidat u terapiji tumora zbog svoje litičke aktivnosti (Leuschner i Hansel, 2004; Papo i Shai, 2005; Giuliani i sur., 2007). No osim toksičnog djelovanja pčelinjega otrova i melitina na tumorske stanice, zabilježeno je i njegovo toksično djelovanje na normalne stanice, iako je podataka o djelovanju pčelinjega otrova i melitina na normalnim ne-tumorskim stanicama jako malo. Ovo istraživanje pokazalo je da pčelinji otrov i melitin djeluju citotoksično na stanice tumora, ali i da je njihovo citotoksično djelovanje prema normalnim i ne-tumorskim stanicama također vrlo izraženo što ga s druge strane ne čini toliko pogodnim kandidatom za razvijanje novih kemoterapeutskih lijekova. Ono što bi moglo pomoći u ovom slučaju je pronalazak specifičnog načina unosa melitina u željene stanice. Ugradnja melitina u nanočestice koje posjeduju mogućnost unosa željenih koncentracija melitina u određene stanice bio bi povoljan način za suzbijanje tumora. (Soman i sur., 2009; Pan i sur., 2011). Još jedna mogućnost koja je prikazana i o ovom radu bila bi kombinacijska terapija u kojoj se koristi neki od postojećih citostatika u kombinaciji sa pčelinjim otrovom ili melitinom, gdje bi sinergistički ili aditivni učinak dva agensa mogao dati željene rezultate u suzbijanju tumora, ali i dovesti do smanjivanja koncentracije postojećih citostatika u terapiji što bi smanjilo neželjene posljedice koje uzrokuje kemoterapija kod brojnih pacijenata. Kako je kombinacijska terapija jedno od

najprihvatljivijih rješenja, uzevši u obzir rezultate dobivene ovim istraživanjem, treba također uzeti u obzir i toksičnost koju ovakva kombinacija može izazvati kod normalnih stanica u kojima su pčelinji otrov i melitin također pokazali visoki stupanj toksičnosti. Zbog navedenih razloga važna su daljnja ispitivanja vezana uz mehanizme djelovanja pčelinjega otrova, ali i njegovih sastavnica na različitim tipovima stanica kako bi se utvrdilo njihovo povoljno djelovanje koje bi se potencijalno moglo iskoristiti u antitumorske svrhe. Nadalje, potrebno je utvrditi i točan način unosa i dozu pčelinjega otrova i melitina za potencijalnu terapijsku primjenu, ali i nuspojave koje ovaj kompleksan spoj i njegove sastavnice mogu imati da bi se istodobno izbjegao njihov negativan učinak kod normalnih stanica.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog doktorskog rada izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Pčelinji otrov i melitin pokazali su se toksičnima za sve navedene tumorske stanične linije te je njihova toksičnost bila ovisna o koncentraciji oba navedena spoja. Toksičnost je bila ovisna i o tipu ispitanih stanica, ali to vrijedi samo za stanične linije koje su rasle u istom mediju što ukazuje na mogućnost interakcije sastavnica pčelinjega otrova sa proteinima iz seruma koji mogu dovesti ili do aktivacije ili deaktivacije sastavnica prisutnih u pčelinjem otrovu.
2. Ne-tumorske stanične linije pokazale su najveću rezistenciju prema pčelinjem otrovu i melitinu ukazujući da pčelinji otrov i melitin djeluju jače na tumorske nego na ne-tumorske stanične linije.
3. Stanična linija ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa CK stabilno otporna na cisplatinu pokazala se osjetljivijom na obradu pčelinjim otrovom i melitinom u odnosu na roditeljsku staničnu liniju, dok taj učinak nije zabilježen kod stanične linije ljudskog karcinoma grkljana HEP-2 i njegove sublinije stabilno otporne na cisplatinu CK2.
4. Obrada pčelinjim otrovom i melitinom uzrokovala je staničnu smrt putem nekroze kod tumorskih staničnih linija ljudskog karcinoma vrata grlića maternice HeLa i njihove sublinije stabilno otporne na cisplatinu HeLa CK te kod stanične linije ljudskog glioblastoma A1235.
5. Nakon zajedničke obrade HeLa i HeLa CK te HEP-2 i CK2 stanica sa pčelinjim otrovom i kemoterapeutikom cisplatinom, pčelinji otrov je pokazao aditivan učinak koji bi mogao biti koristan u vidu smanjivanja doze cisplatine za vrijeme kemoterapije. Također, razlika u otpornosti HeLa i HeLa CK te HEP-2 i CK2 stanica na cisplatinu nije se promijenila uslijed obrade pčelinjim otrovom.
6. Pčelinji otrov i melitin djelovali su citotoksično i na ljudske limfocite iz periferne krvi te je citotoksičnost bila ovisna o koncentraciji i vremenu trajanja izloženosti.

7. Obrada ljudskih limfocita pčelinjim otrovom uzrokovala je dominantno staničnu smrt putem nekroze iako je zabilježen i udio stanica u apoptozi.
8. Pčelinji otrov i melitin djelovali su genotoksično na ljudske limfocite iz periferne krvi te je genotoksičnost bila ovisna o koncentraciji i vremenu trajanja izloženosti. Osim ukupnih genomskih oštećenja, zabilježena su i oksidativna oštećenja molekule DNA nakon obrade pčelinjim otrovom i melitinom.
9. Smanjenje koncentracije glutationa i porast koncentracije malondialdehida uz oštećenja molekule DNA, oksidativna oštećenja molekule DNA i porast aktivnosti fosfolipaze C ukazuju da pčelinji otrov i melitin djeluju putem lipidne peroksidacije te da je oksidativni stres barem djelomično uključen u mehanizam djelovanja ovih spojeva.
10. Iako su se pčelinji otrov i melitin pokazali toksičnim kod svih ispitanih stanica ovi rezultati idu u prilog upotrebe pčelinjega otrova i melitina u terapiji protiv tumora.

## 7. LITERATURA

Akiyama S, Chen ZS, Sumizawa T, Furukawa T (1999) Resistance to cisplatin. *Anticancer Drug Des* 14: 143-151.

Amaravadi RK, Thompson CB (2007) The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 13: 7271-7279.

Amin AR, Attur M, Abramson SB (1999) Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11: 202-209.

Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM (2009) Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol* 27: 2712-2725.

Arora AS, de Groen PC, Croall DE, Emori Y, Gores GJ (1996) Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation. *J Cell Physiol* 167: 434-442.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6: 593-597.

Ashagbley A, Samadder P, Bittman R, Erukulla RK, Byun HS, Arthur G (1996) Synthesis of ether-linked analogues of lysophosphatidate and their effect on the proliferation of human epithelial cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 16: 1813-1918.

Assem M, Bonvalot S, Beltramo JL, Garrido C, Dimanche-Boitrel MT, Genne P, Rebibou JM, Caillot D, Chauffert B (1994) Deleterious effect of serum proteins on the amphotericin B-induced potentiation of cisplatin in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 70: 631-635.

Baek YH, Huh JE, Lee JD, Choi do Y, Park DS (2006) Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by alpha2-Adrenoceptors. *Brain Res* 1073-1074: 305-310.

Bai XC, Deng F, Liu AL, Zou ZP, Wang Y, Ke ZY, Ji QS, Luo SQ (2002) Phospholipase C- $\gamma$ 1 is required for cell survival in oxidative stress by protein kinase C. *Biochem J* 363: 395-401.

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390: 191-214.

Banks BE, Brown C, Burgess GM, Burnstock G, Claret M, Cocks TM, Jenkinson DH (1979) Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature* 282: 415-417.

Banks BEC, Shipolini RA (1986) Chemistry and pharmacology of honeybee venoms. U: Piek T (ed.) *Venoms of Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioral Aspects*. London, Academic Press, 329-416.

Bechinger B (1997) Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol* 156: 197-211.

Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1529-1539.

Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PG, Littlefield LG, Pereira C, Preston RJ, Wachholz BW (1988) Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat Res* 196: 103-159.

Bjørkøy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T (1997) Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C lambda is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *J Biol Chem* 272: 11557-11565.

Bohets HH, Nouwen EJ, De Broe ME, Dierickx PJ (1994) Effects of foetal calf serum on cell viability, cytotoxicity and detoxification in the two kidney-derived cell lines LLC-PK1 and MDCK. *Toxicol In Vitro* 8: 559-561.

Borkow G, Chaim-Matyas A, Ovadia M (1992) Binding of cytotoxin P4 from *Naja nigricollis nigricollis* to B16F10 melanoma and WEHI-3B leukemia cells. *FEMS Microbiol Immunol* 5: 139-145.

Boulikas T, Vougiouka M (2003) Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* 10: 1663-1682.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brown LR, Lauterwein J, Wüthrich K (1980) High-resolution  $^1\text{H-NMR}$  studies of self-aggregation of melittin in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 622: 231-244.

Brown TC, Tankersley MS (2011). The sting of the honeybee: an allergic perspective. *Ann Allergy Asthma Immunol* 107: 463-470.

Brozović A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, Kaina B (2004) Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer* 112: 974-985.

Buku A (1999) Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides* 20: 415-420.

Buku A, Price JA, Mendlowitz M, Masur S (2001) Mast cell degranulating peptide binds to RBL-2H3 mast cell receptors and inhibits IgE binding. *Peptides* 22: 1993-1998.

Buku A, Mendlowitz M, Condie BA, Price JA (2004) Partial alanine scan of mast cell degranulating peptide (MCD): importance of the histidine- and arginine residues. *J Pept Sci* 10: 313-317.

Carpenter G, Ji Q (1999) Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res* 253: 15-24.



Carrano AV, Natarajan AT (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204: 379-406.

Cernanec J, Guilak F, Weinberg JB, Pisetsky DS, Fermor B (2002) Influence of hypoxia and reoxygenation on cytokine-induced production of proinflammatory mediators in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 46: 968-975.

Cerrato PL (1998) A therapeutic bee sting? *RN* 61: 57-58.

Chang YH, Bliven ML (1979) Anti-arthritic effect of bee venom. *Agents Actions* 9: 205-211.

Chen J, Lariviere WR (2010) The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. *Prog Neurobiol* 92: 151-183.

Chen YQ, Zhu ZA, Hao YQ, Dai KR, Zhang C (2004) Effect of melittin on apoptosis and necrosis of U2 OS cells. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2: 208-209.

Cherniack EP (2010) Bugs as drugs, Part 1: insects: the "new" alternative medicine for the 21st century? *Altern Med Rev* 15: 124-135.

Cherniack EP (2011) Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Altern Med Rev* 16: 50-58.

Cho HJ, Jeong YJ, Park KK, Park YY, Chung IK, Lee KG, Yeo JH, Han SM, Bae YS, Chang YC (2010) Bee venom suppresses PMA-mediated MMP-9 gene activation via JNK/p38 and NF-kappaB-dependent mechanisms. *J Ethnopharmacol* 127: 662-668.

Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH, Hsu SS, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Huang JK, Ho CM, Jan CR (2007) Phospholipase A2-independent Ca<sup>2+</sup> entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Sci* 80: 364-369.

Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-762.

Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R (1997a) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375: 183-193.

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N (1997b) Comet Assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30: 139-146.

Collins AR (2002) The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol* 203: 163-177.

Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151.

Collins AR (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 681: 24-32.

Cotgreave IA (1997) N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 38: 205-227.

Čepelak I, Dodig S (2003) Glutathione and oxidative stress. *Biochem Med* 3-4: 93-100.

Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartsmann G (2001) Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1: 364-369.

Das Gupta S, Debnath A, Saha A, Giri B, Tripathi G, Vedasiromoni JR, Gomes A, Gomes A (2007) Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leuk Res* 31: 817-825.

Dawson CR, Drake AF, Helliwell J, Hider RC (1978) The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 510: 75-86.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324: 1-18.

Debnath A, Chatterjee U, Das M, Vedasiromoni JR, Gomes A (2007) Venom of Indian monocellate cobra and Russell's viper show anticancer activity in experimental models. *J Ethnopharmacol* 111: 681-684.

DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG (1992) Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 90: 2123-2139.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328.

Dempsey CE (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1031: 143-161.

Dennis EA, Deems RA, Yu L (1992) Extracellular phospholipase A<sub>2</sub>. *Adv Exp Med Biol* 318: 35-39.

Dennis EA (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 269: 13057-13060.

Dennis T, Fanous M, Mousa S (2009) Natural products for chemopreventive and adjunctive therapy in oncologic disease. *Nutr Cancer* 61: 587-597.

Doery HM, Pearson JE (1964) Phospholipase B in snake venoms and bee venom. *Biochem J* 92: 599-602.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43: 200-227.

Dotimas EM, Hamid KR, Hider RC, Ragnarsson U (1987) Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. *Biochim Biophys Acta* 911: 285-293.

Dotimas EM, Hider RC (1987) Honey bee venom. *Bee World* 68: 51-70.

Drake AF, Hider RC (1979) The structure of melittin in lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 555: 371-373.

Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI (1997) Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta* 263: 177-185.

Duke RC, Cohen JJ (1992) Morphological and biochemical assays of apoptosis. U: Coligan JE, Kruisbeal AM (eds.) *Current Protocols in Immunology*. New York, John Willey & Sons, 1-3.

Duke RC, Witter RZ, Nash PB, Young JD, Ojcius DM (1994) Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J* 8: 237-246.

Eiseman JL, von Bredow J, Alvares AP (1982) Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 31: 1139-1146.

Eskridge EM, Elliott WB, Elliott AH, Eskridge PB, Doerr JC, Schneller N, Reisman RE (1981) Adaptation of the electrical stimulation procedure for the collection of vespid venoms. *Toxicon* 19: 893-897.

Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238: 223-233.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128.

Esterbauer H (1993) Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 57: 779-786.

Esterbauer H (1996) Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Path Biol* 44: 25-28.

Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Šinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem* 312: 224-227.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.

Fenech M, Morley AA (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.

Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285: 35-44.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534: 65-75.

Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600: 58-66.

Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2: 1084-1104.

Fenech M (2010) The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys* 98: 234-243.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26: 125-132.

Feofanov AV, Sharonov GV, Astapova MV, Rodionov DI, Utkin YN, Arseniev AS (2005) Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. *Biochem J* 390: 11-18.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1371-1387.

Findlay RD, Taesch HW, David-Cu R, Walther FJ (1995) Lysis of red blood cells and alveolar epithelial toxicity by therapeutic pulmonary surfactants. *Pediatr Res* 37: 26-30.

Fink D, Howell SB (2000) How does cisplatin kill cells? U: Kelland LR, Farrell N (eds.) *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy* 7. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 149-167.

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.

Fletcher JE, Jiang MS (1993) Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon* 31: 669-695.

Fraga CG, Tapple AL (1988) Damage to DNA concurrently with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem J* 252: 893-896.

Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2003) Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103: 645-662.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Radioprotective effects of honeybee venom (*Apis mellifera*) against 915-MHz microwave radiation-induced DNA damage in Wistar rat lymphocytes: in vitro study. *Int J Toxicol* 28: 88-98.

Gao L, Yu S, Wu Y, Shan B (2007) Effect of spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF-7 cells. *DNA Cell Biol* 26: 485-489.

Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA (1976) The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem* 61: 369-376.

Gauldie J, Hanson JM, Shipolini RA, Vernon CA (1978) The structures of some peptides from bee venom. *Eur J Biochem* 83: 405-410.

Gawronska B, Leuschner C, Enright FM, Hansel W (2002) Effects of a lytic peptide conjugated to beta HCG on ovarian cancer: studies in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 85: 45-52.

Gevod VS, Birdi KS (1984) Melittin and the 8-26 fragment. Differences in ionophoric properties as measured by monolayer method. *Biophys J* 45: 1079-1083.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2: 1-33.

Glei M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel BL (2009) Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review. *Mutat Res* 681: 33-43.

Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37-43.

Gotay CC (2010) Cancer prevention: major initiatives and looking into the future. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 10: 143-154.

Graziose R, Lila MA, Raskin I (2010) Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods. *Curr Drug Discov Technol* 7: 2-12.

Guilford JM, Pezzuto JM (2008) Natural products as inhibitors of carcinogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 1341-1352.

Haase I, Czarnetzki BM, Rosenbach T (1996) Thrombin and melittin activate phospholipase C in human HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 5: 84-88.

Haber MT, Fukui T, Lebowitz MS, Lowenstein JM (1991) Activation of phosphoinositide-specific phospholipase C delta from rat liver by polyamines and basic proteins. *Arch Biochem Biophys* 288: 243-249.

Habermann E (1971) Chemistry, pharmacology, and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. U: Bucherl W, Buckley EE (eds.) *Venomous Animals and Their Venoms* Vol. 3. New York, Academic Press, 61-93.

Habermann E (1972) Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* 177: 314-322.

Habermann E (1977) Neurotoxicity of apamin and MCD peptide upon central application. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 300: 189-191.

Habermann E (1984) Apamin. *Pharmacol Ther* 25: 255-270.

Hait WN, Grais L, Benz C, Cadman EC (1985) Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phenothiazines and melittin. *Cancer Chemother Pharmacol* 14: 202-205.



Hait WN, Lee GL (1985) Characteristics of the cytotoxic effects of the phenothiazine class of calmodulin antagonists. *Biochem Pharmacol* 34: 3973-3978.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.

Halstead J, Kemp K, Ignatz RA (1995) Evidence for involvement of phosphatidylcholine-phospholipase C and protein kinase C in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 270: 13600-13603.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017.

Han HJ, Park SH, Lee JH, Yoon BC, Park KM, Mar WC, Lee HJ, Kang SK (2002a) Involvement of oxidative stress in bee venom-induced inhibition of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter in renal proximal tubule cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 564-568.

Han HJ, Yoon BC, Oh YJ, Park SH, Lee JH, Mar WC (2002b) The water-soluble fraction (<10 kD) of bee venom (*Apis mellifera*) produces inhibitory effect on apical transporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Blood Press Res* 25: 375-383.

Hanada K, Kinoshita E, Itoh M, Hirata M, Kajiyama G, Sugiyama M (1995) Human pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. *FEBS Lett* 373: 85-87.

Hartter P, Weber U (1975) Basic peptides from bee venom, I: isolation, reduction and reoxidation of apamin and MCD-peptide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356: 693-699.

Hartter P (1976) Basic peptides in bee venom, II. Synthesis of two pentapeptides from the sequence of the mast-cell-degrading peptide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357: 1683-1693.

Hartter P (1977) Basic peptides in bee venom, III. Synthesis of peptide fragments from the sequence of the mast-cell-degranulating peptide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 358: 331-337.

Hartter P (1980) Basic peptides in been venom, V. Synthesis of four fragments from the sequence of apamin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361: 515-524.

Harvey A (1998) From demons to darlings: drugs from venoms. *Drug Discov Today* 3: 531-532.

Harvey A (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today* 5: 294-300.

Haux P, Sawerthal H, Habermann E (1967) Sequence analysis of bee venom neurotoxin (apamine) from its tryptic and chymotryptic cleavage products. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 348: 737-738.

Haux P (1969) Amino acid sequence of MCD-peptide, a specific mast cell-degranulating peptide from bee venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 350: 536-546.

Havas LJ (1950) Effect of bee venom on colchicine-induced tumours. *Nature* 166: 567-568.

Heinen TE, da Veiga AB (2011) Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 57: 497-511.

Heinz DW, Essen LO, Williams RL (1998) Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J Mol Biol* 275: 635-650.

Hellner M, Winter D, von Georgi R, Münstedt K (2008) Apitherapy: usage and experience in german beekeepers. *Evid Based Complement Alternat Med* 5: 475-479.

Hider RC, Ragnarsson U (1980) A proposal for the structure of apamin. *FEBS Lett* 111: 189-193.

Hider RC (1988) Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour* 12: 60-65.

Highley MS, Calvert AH (2000) Clinical experience with cisplatin and carboplatin. U: Kelland LR, Farrell N (ed.) *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy 7*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 171-194.

Higuchi Y (2004) Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med* 8: 455-464.

Hollander T, Aeed PA, Elhammer AP (1993) Characterization of the oligosaccharide structures on bee venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Carbohydr Res* 247: 291-297.

Holle L, Song W, Holle E, Wei Y, Wagner T, Yu X (2003) A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 22: 93-98.

Hong SJ, Rim GS, Yang HI, Yin CS, Koh HG, Jang MH, Kim CJ, Choe BK, Chung JH (2005) Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon* 46: 39-45.

Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X (2006) Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 58: 83-89.

Hu C, Jiang L, Geng C, Zhang X, Cao J, Zhong L (2008) Possible involvement of oxidative stress in trichloroethylene-induced genotoxicity in human HepG2 cells. *Mutat Res* 652: 88-94.

Huh JE, Baek YH, Lee MH, Choi DY, Park DS, Lee JD (2010) Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice. *Cancer Lett* 292: 98-110.

IAEA (1986) Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Reports Series no. 260. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 13-27.

Ichinose M, Miura M, Takahashi T, Yamauchi H, Kageyama N, Tomaki M, Endoh N, Sakurai E, Watanabe T, Shirato K (1995) Allergic airway response and potassium channels: histamine release and airway inflammation. *Methods Find Exp Clin Pharmacol Suppl C*: 36-39.

Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, Chen GW, Lu HF, Lin MW, Han SM, Chung JG (2008a) The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* 22: 237-245.

Ip SW, Wei HC, Lin JP, Kuo HM, Liu KC, Hsu SC, Yang JS, Mei-Dueyang, Chiu TH, Han SM, Chung JG (2008b) Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer Res* 28: 833-842.

Ip SW, Chu YL, Yu CS, Chen PY, Ho HC, Yang JS, Huang HY, Chueh FS, Lai TY, Chung JG (2012) Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> -modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells. *Int J Urol* 19: 61-70.

Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I (2003) Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *J Pharmacol Sci* 91: 95-104.

Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, Kim JH, Song MJ, Hong JT (2012) Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 258: 72-81.

Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity, *Cell Mol Life Sci* 57: 1229-1235.

Kalariya NM, Ramana KV, Srivastava SK, van Kuijk FJ (2009) Genotoxic effects of carotenoid breakdown products in human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 34: 737-747.

Karpozilos A, Pavlidis N (2004) The treatment of cancer in Greek antiquity. *Eur J Cancer* 40: 2033-2040.

Kaur IP, Geetha T (2006) Screening methods for antioxidants-a review. *Mini Rev Med Chem* 6: 305-312.

Khalil ML (2006) Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.

Killion JJ, Dunn JD (1986) Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochem Biophys Res Commun* 139: 222-227.

Kim CMH (1997) Apitherapy (bee venom therapy). U: Mizrahi A, Fulder S, Sheinman N (eds.) *Potentiating Health and Crisis of Immune System*. New York, Plenum Press, 243-270.

Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J Vet Med Sci* 65: 349-355.

Kim HW, Kwon YB, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH (2005) Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involvement of descending adrenergic and serotonergic pathways. *Pharmacol Res* 51: 183-188.

King TP, Spangfort MD (2000) Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 123: 99-106.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540: 153-163.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363: 89-96.

Knowles BH, Farndale RW (1988) Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. *Biochem J* 253: 235-241.

Koburova KL, Michailova SG, Shkenderov SV (1985) Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin - bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 11: 50-55.

Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30: 620-650.

Kojima T, Hashimoto Y, Inamura Y, Koide T, Nagata H, Ito N, Suzumura K (2009) Serum factors that suppress cytotoxic effect of methotrexate. *Exp Oncol* 31: 209-213.

Kreil G (1995) Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. *Protein Sci* 4: 1666-1669.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711: 193-201.

Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64.

Kwon YB, Kang MS, Kim HW, Ham TW, Yim YK, Jeong SH, Park DS, Choi DY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH (2001a) Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation. *Acupunct Electrother Res* 26: 59-68.

Kwon YB, Kim JH, Yoon JH, Lee JD, Han HJ, Mar WC, Beitz AJ, Lee JH (2001b) The analgesic efficacy of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis: a comparative study with needle acupuncture. *Am J Chin Med* 29: 187-199.

Kwon YB, Ham TW, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Yang IS, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH (2005) Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha 2-adrenergic activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 181-187.

Lad PJ, Shier WT (1979) Activation of microsomal guanylate cyclase by a cytotoxic polypeptide: melittin. *Biochem Biophys Res Commun* 89: 315-321.

Ladokhin AS, White SH (1999) Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J Mol Biol* 285: 1363-1369.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lauterwein J, Bösch C, Brown LR, Wüthrich K (1979) Physicochemical studies of the protein-lipid interactions in melittin-containing micelles. *Biochim Biophys Acta* 556: 244-264.

Lauterwein J, Brown LR, Wüthrich K (1980) High-resolution <sup>1</sup>H-NMR studies of monomeric melittin in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 622: 219-230.

Lavialle F, Levin IW, Mollay C (1980) Interaction of melittin with dimyristoyl phosphatidylcholine liposomes: evidence for boundary lipid by Raman spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 600: 62-71.

Lazo JS, Hait WN, Kennedy KA, Braun ID, Meandzija B (1985) Enhanced bleomycin-induced DNA damage and cytotoxicity with calmodulin antagonists. *Mol Pharmacol* 27: 387-393.

Lazo JS, Chen DL, Gallicchio VS, Hait WN (1986) Increased lethality of calmodulin antagonists and bleomycin to human bone marrow and bleomycin-resistant malignant cells. *Cancer Res* 46: 2236-2240.

Lee GL, Hait WN (1985) Inhibition of growth of C6 astrocytoma cells by inhibitors of calmodulin. *Life Sci* 36: 347-354.

Lee JD, Kim SY, Kim TW, Lee SH, Yang HI, Lee DI, Lee YH (2004) Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *Am J Chin Med* 32: 361-367.

Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S (2005) An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 79-84.

Lee JH, Kwon YB, Han HJ, Mar WC, Lee HJ, Yang IS, Beitz AJ, Kang SK (2001) Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. *J Vet Med Sci* 63: 251-259.

Lee SY, Yeo EJ, Choi MU (1998) Phospholipase D activity in L1210 cells: a model for oleate-activated phospholipase D in intact mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 825-831.

Lee YJ, Kang SJ, Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Chung HW (2007) Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chem Biol Interact* 169: 189-197.

Leuschner C, Hansel W (2004) Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. *Curr Pharm Des* 10: 2299-2310.

Lewis RJ, Garcia ML (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2: 790-802.

Li B, Ling CQ, Zhang C, Gu W, Li SX, Huang XQ, Zhang YN, Yu CQ (2004) The induced apoptosis of recombinant adenovirus carrying melittin gene for hepatocellular carcinoma cell. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12: 453-455.

Li B, Gu W, Zhang C, Huang XQ, Han KQ, Ling CQ (2006) Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. *Onkologie* 29: 367-371.



Li SX, Ling CQ, Liu XY (2003) Impact of infection with recombinant adenovirus carrying melittin gene on CD54 expression in HepG2 cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23: 300-305.

Li Y, Maher P, Schubert D (1998) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7748-7753.

Ling CQ, Li B, Zhang C, Gu W, Li SX, Huang XQ, Zhang YN (2004) Anti-hepatocarcinoma effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12: 741-744.

Ling CQ, Li B, Zhang C, Zhu DZ, Huang XQ, Gu W, Li SX (2005) Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 16: 109-115.

Liu H, Tong F (2003) Advances in the study of bee venom and its clinical uses. *Zhong Yao Cai* 26: 456-458.

Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, Sun S, Ling C, Xu Z (2008) Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology* 47: 1964-1973.

Liu SY, Tappia PS, Dai J, Williams SA, Panagia V (1998) Phospholipase A2-mediated activation of phospholipase D in rat heart sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1203-1214.

Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R (2002) Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 54: 1083-1089.

Machleidt T, Krämer B, Adam D, Neumann B, Schütze S, Wiegmann K, Krönke M (1996) Function of the p55 tumor necrosis factor receptor "death domain" mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Exp Med* 184: 725-733.

Mahady GB, Liu C, Beecher CW (1998) Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 48: 93-102.

Maher S, McClean S (2006) Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 71: 1289-1298.

Maher S, McClean S (2008) Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. *Biochem Pharmacol* 75: 1104-1114.

Marlin DJ, Johnson L, Kingston DA, Smith NC, Deaton CM, Mann S, Heaton P, Van Vugt F, Saunders K, Kydd J, Harris PA (2004) Application of the comet assay for investigation of oxidative DNA damage in equine peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 134: 2133-2140.

Marnett LJ (2002) Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182: 219-222.

Martin W, Hartter P (1980) Basic peptides in bee venom, VI. Structure-activity studies on the anti-inflammatory effects of derivatives and fragments of the MCD-peptide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361: 525-535.

Martínez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ (1998) Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors* 8: 41-43.

Mau SE, Vilhardt H (1997) Cross talk between substance P and melittin-activated cellular signaling pathways in rat lactotroph-enriched cell cultures. *J Neurochem* 69: 762-772.

McArt DG, McKerr G, Howard CV, Saetzler K, Wasson GR (2009) Modelling the comet assay. *Biochem Soc Trans* 37: 914-917.

McConkey DJ, Hartzell P, Jondal M, Orrenius, S (1989) Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem* 264: 13399-13402.

McDonald JA, Li FP, Mehta CR (1979) Cancer mortality among beekeepers. *J Occup Med* 21: 811-813.

Mebs D (2002) Bees, bumble bees, wasps, hornets. U: Mebs D (ed.) *Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists*. Stuttgart, Medpharm Scientific Publ., CRC Press, 209-224.

Mehta RG, Pezzuto JM (2002) Discovery of cancer preventive agents from natural products: from plants to prevention. *Curr Oncol Rep* 4: 478-486.

Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X (2010) Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm Res* 27: 950-961.

Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.

Meister A (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269: 9397-9400.

Merk O, Reiser K, Speit G (2000) Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutat Res* 471: 71-80.

Meunier F.A., Frangež R., Benoit E., Ouanounou G., Rouzair-Dubois B, Šuput D, Jordi Molgó (2000)  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$  contribute to the swelling of differentiated neuroblastoma cells induced by equinatoxin-II. *Toxicon* 38: 1547-1560.

Miao JY, Kaji K, Hayashi H, Araki S (1997) Suppression of apoptosis by inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in vascular endothelial cells. *Endothelium* 5: 231-239.

Mickisch G, Fajta S, Keilhauer G, Schlick E, Tschada R, Alken P (1990) Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT). *Urol Res* 18: 131-136.

Miroshnikov AI, Boikov AV, Snezhkova LG, Severin SE, Shvets VI, Dudkin SM (1983) Interactions between tertiapin, a neurotoxin from bee venom, and calmodulin. *Bioorg Khim* 9: 26-32.

Mizrahi A, Lensky Y (1997) *Bee products: properties, applications and apitherapy*. 1st edn. Springer, New York.

Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS, Choi YH, Kim GY (2006) Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int Immunopharmacol* 6: 1796-1807.

Moon DO, Park SY, Choi YH, Kim ND, Lee C, Kim GY (2008) Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicol* 51: 112-120.

Møller P (2006) Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 612: 84-104.

Mufson RA, Laskin JD, Fisher PB, Weinstein IB (1979) Melittin shares certain cellular effects with phorbol ester tumour promoters. *Nature* 280: 72-74.

Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I (1997) Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 17: 225-283.

Müller-Decker K (1989) Interruption of TPA-induced signals by an antiviral and antitumoral xanthate compound: inhibition of a phospholipase C-type reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 198-205.

Nagaraju S, Mahadeswaraswamy YH, Girish KS, Kemparaju K (2006) Venom from spiders of the genus *Hippasa*: biochemical and pharmacological studies. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144: 1-9.

Nair U, Bartsch H, Nair J (2007) Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic Biol Med* 43: 1109-1120.

Nam KW, Je KH, Lee JH, Han HJ, Lee HJ, Kang SK, Mar W (2003) Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1beta) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arc Pharm Res* 26: 383-388.

Neuman W, Habermann E (1954) Characterization of the substances of the bee venom. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 222: 267-287.

Nicolas JP, Lin Y, Lambeau G, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MH (1997) Localization of structural elements of bee venom phospholipase A<sub>2</sub> involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 272: 7173-7181.

Nishioka D, Marcell V, Cunningham M, Khan M, Von Hoff DD, Izbicka E (2003) The use of early sea urchin embryos in anticancer drug testing. *Methods Mol Med* 85: 265-276.

Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59: 365-378.

Ochocka AM, Grden M, Sakowicz-Burkiewicz M, Szutowicz A, Pawelczyk T (2008) Regulation of phospholipase C-delta1 by ARGHAP6, a GTPase-activating protein for RhoA: possible role for enhanced activity of phospholipase C in hypertension. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2264-2273.

Oršolić N, Bašić I (2003) Apoptosis and necrosis as possible mechanisms for antitumor activity of bee venom. *Mellifera* 3: 34-42.

Oršolić N, Šver L, Verstovšek S, Terzić S, Bašić I (2003) Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* 41: 861-870.

Oršolić N (2009a) Bee honey and cancer. *JAAS* 1: 93-103.

Oršolić N (2009b) Potentiation of bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 317-326.

Oršolić N, Josipović P, Bašić I (2009) Direct antitumor activity of honey bee venom in vivo and in vitro. *Egy J Nat Toxins* 6: 1-16.

Oršolić N, Sirovina D, Kosalec I, Bašić I (2010) Honey bee products: immunomodulation and antitumor activity. U: Gupta VK (ed.) *Comprehensive Bioactive Natural Products*. India, Studium Press LLC, 45-48.

Oršolić N (2012) Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 31: 173-194.

Osmak M (1992) Collateral resistance or sensitivity of human larynx carcinoma HEp2 cells resistant to cis-dichlorodiammineplatinum (II) or vincristine sulfate. *Neoplasma* 39: 197-202.

Osmak M, Beketić-Orešković L, Matulić M, Sorić J (1993) Resistance of human larynx carcinoma cells to cisplatin, gamma-irradiation and methotrexate does not involve overexpression of c-myc or c-Ki-ras oncogenes. *Mutat Res* 303: 113-120.

Osmak M, Eljuga D (1993) The characterization of two human cervical carcinoma HeLa sublines resistant to cisplatin. *Res Exp Med (Berl)* 193: 389-396.

Ownby CL, Powell JR, Jiang MS, Fletcher JE (1997) Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon* 35: 67-80.

Palma MS (2006) Insect venom peptides. U: Kastin AJ (ed.) *Handbook of Biologically Active Peptides*. New York, Academic Press, 409-416.

Pan H, Soman NR, Schlesinger PH, Lanza GM, Wickline SA (2011) Cytolytic peptide nanoparticles ('NanoBees') for cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3: 318-327.

Papo N, Shai Y (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 62: 784-790.

Parekh HS, Liu G, Wei MQ (2009) A new dawn for the use of traditional Chinese medicine in cancer therapy. *Mol Cancer* 8: 21.

Park HJ, Son DJ, Lee CW, Choi MS, Lee US, Song HS, Lee JM, Hong JT (2007) Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with I $\kappa$ B kinase. *Biochem Pharmacol* 73: 237-247.

Park JH, Jeong YJ, Park KK, Cho HJ, Chung IK, Min KS, Kim M, Lee KG, Yeo JH, Park KK, Chang YC (2010) Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1-dependent MMP-9 expression. *Mol Cells* 29: 209-215.

Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, Kim GJ, Oh GT, Yoon DY, Hong JT (2004) Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF- $\kappa$ B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum* 50: 3504-3515.

Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon do Y, Han SB, Song HS, Song MJ, Hong JT (2011) Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- $\kappa$ B. *Prostate* 71: 801-812.

Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J (1998) Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 41: 1275-1286.

Pemberton RW (1999) Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 65: 207-216.

Pettit GR, Hasler JA, Paull KD, Herald CL (1981) Antineoplastic agents. 76. The sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *J Nat Prod* 44: 701-704.

Plavšić F, Žuntar I (2006) Otrovi živih organizama. U: Plavšić F, Žuntar I (eds.) Uvod u Analitičku Toksikologiju. Zagreb, Školska knjiga, 181-222.

Prado M, Solano-Trejos G, Lomonte B (2010) Acute physiopathological effects of honeybee (*Apis mellifera*) envenoming by subcutaneous route in a mouse model. *Toxicon* 56: 1007-1017.

Pratt JP, Ravnic DJ, Huss HT, Jiang X, Orozco BS, Mentzer SJ (2005) Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41: 349-355.

Proskuryakov SY, Gabai VL (2010) Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* 16: 56-68.

Przybilla B, Ruëff F (2010) Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges* 8: 114-127.

Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Thurnher M (2006) Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A<sub>2</sub> and phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1374-1383.

Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Bernardo K, Ramsay S, Thurnher M (2007) Bee venom secretory phospholipase A<sub>2</sub> and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 56: 627-640.

Radić S (2005) Pčelinji otrov: prirodni antireumatik i anelgetik. 1st edn. Graf Form, Split.

Raghuraman H, Chattopadhyay A (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 27: 189-223.

Rajendiran C, Puvanalingam A, Thangam D, Ragunathanan S, Ramesh D, Venkatesan S, Sundar C (2012) Stroke after multiple bee sting. *J Assoc Physicians India* 60: 122-124.

Ransome HM (2004) The sacred bee in ancient times and folklore. 1st edn. Dover Publications, New York.



Rebecchi MJ, Pentyala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80: 1291-1335.

Roh DH, Kim HW, Yoon SY, Kang SY, Kwon YB, Cho KH, Han HJ, Ryu YH, Choi SM, Lee HJ, Beitz AJ, Lee JH (2006) Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents. *J Pain* 7: 500-512.

Russell PJ, Hewish D, Carter T, Sterling-Levis K, Ow K, Hattarki M, Doughty L, Guthrie R, Shapira D, Molloy PL, Werkmeister JA, Kortt AA (2004) Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro and in vivo studies. *Cancer Immunol Immunother* 53: 411-421.

Saini SS, Chopra AK, Peterson JW (1999) Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells. *Toxicon* 37: 1605-1619.

Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K, Hirata A, Hirata F (1996) Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 643-647.

Salcido RS (2008) Honey: is apitherapy an emergency? *Adv Skin Wound Care* 21: 552.

Samanta S, Dey P (2012) Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol* 40: 84-90.

Schmidt JO, Buchmann SL (2005) Other products of the hive. U: Graham JM (ed.) *The Hive and the Honey Bee*. Hamilton, Dadant and Sons, 927-988.

Schütze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krönke M (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71: 765-776.

Schweitz H, Bidard JN, Frelin C, Pauron D, Vijverberg HP, Mahasneh DM, Lazdunski M, Vilbois F, Tsugita A (1985) Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry* 24: 3554-3561.

Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR (2009) Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization - a review. *Mutagenesis* 24(5): 383-389.

Shaposhnikova VV, Egorova MV, Kudryavtsev AA, Levitman MKh, Korystov YuN (1997) The effect of melittin on proliferation and death of thymocytes. *FEBS Lett* 410: 285-288.

Sharma SV (1992) Melittin resistance: a counterselection for ras transformation. *Oncogene* 7: 193-201.

Sharma SV (1993) Melittin-induced hyperactivation of phospholipase A<sub>2</sub> activity and calcium influx in ras-transformed cells. *Oncogene* 8: 939-947.

Shier WT (1979) Activation of high levels of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 195-199.

Shipolini RA, Callewaert GL, Cottrell RS, Doonan S, Vernon CA, Banks BEC (1971) Phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom. *Eur J Biochem* 20: 459-468.

Shipolini RA (1984) Biochemistry of bee venom. U: Tu TA (ed.) *Handbook of Natural Toxins Vol. 2. Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*. New York and Basel, Marcel Dekker Inc., 49-85.

Shkenderov S, Koburova K (1982) Adolapin - a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon* 20: 317-321.

Shuba MF, Vladimirova IA (1980) Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to adenosine 5'-triphosphate and to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation. *Neuroscience* 5: 853-859.

Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22: 7265-7279.

Singh NP (2000a) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 455: 111-127.

Singh NP (2000b) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256: 328-337.

Singh NP (2003) Apoptosis by DNA diffusion assay. U: Blumenthal R (ed.) *Methods in Molecular Medicine-Chemosensitivity*. New York, Humana Press, 78-94.

Singh NP (2005) Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay. *Methods Mol Med* 111: 55-67.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.

Six DA, Dennis EA (2000) The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488: 1-19.

Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.

Soletti RC, de Faria GP, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, Moura-Neto V, Gabilan NH (2008) Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs* 19: 517-525.

Soman NR, Baldwin SL, Hu G, Marsh JN, Lanza GM, Heuser JE, Arbeit JM, Wickline SA, Schlesinger PH (2009) Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *J Clin Invest* 119: 2830-2842.

Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, Moon DC, Park YH, Park BS, Song MJ, Hong JT (2006) Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 627-634.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 115: 246-270.

Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H (1998) Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res* 58: 4871-4879.

Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffman H (2003) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 146: 151-158.

Srebočan V, Srebočan E (2002) Životinjski otrovi. U: Duraković Z (ed.) *Klinička Toksikologija*. Zagreb, Grafos, 421-435.

Stewart BW, Kleihues P (2003) *World cancer report*. 2nd edn. IARC Press, Lyon.

Strong PN (1990) Potassium channel toxins. *Pharmacol Ther* 46: 137-162.

Stuhlmeier KM (2007) *Apis mellifera* venom and melittin block neither NF-kappa B-p50-DNA interactions nor the activation of NF-kappa B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. *J Immunol* 179: 655-664.

Sutton BJ, Gould HJ (1993) The human IgE network. *Nature* 366: 421-428.

Swiergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A (2006) Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere* 65: 963-974.

Škenderov S, Ivanov C (1986) *Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje*. 1st edn. Nolit, Beograd.

Terwilliger TC, Eisenberg D (1982a) The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem* 257: 6010-6015.

Terwilliger TC, Eisenberg D (1982b) The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 257: 6016-6022.

Terwilliger TC, Weissman L, Eisenberg D (1982) The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophys J* 37: 353-361.

Tosteson MT, Holmes SJ, Razin M, Tosteson DC (1985) Melittin lysis of red cells. *J Membr Biol* 87: 35-44.

Tu WC, Wu CC, Hsieh HL, Chen CY, Hsu SL (2008) Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon* 52: 318-329.

Umegaki K, Fenech M (2000) Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15: 261-269.

Valencia E, Marin A, Hardy G (2001a) Glutathione--nutritional and pharmacological viewpoints: part II. *Nutrition* 17: 485-486.

Valencia E, Marin A, Hardy G (2001b) Glutathione--nutritional and pharmacological viewpoints: Part III. *Nutrition* 17: 696-697.

Valencia Zavala MP, Sánchez Olivas JA, Sánchez Olivas MA, Montes Montes J, Duarte Díaz RJ, León Oviedo C (2007) Allergy and neurotoxicity induced by bee sting. Case report and literature review. *Rev Alerg Mex* 54: 177-185.

Valentin E, Lambeau G (2000) What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>? *Biochimie* 82: 815-831.

Van Den Berg CW, De Andrade RM, Magnoli FC, Marchbank KJ, Tambourgi DV (2002) *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHC I and induces protection against C-mediated lysis. *Immunology* 107: 102-110.

Varanda EA, Monti R, Tavares DC (1999) Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct- and indirect-acting mutagens. *Teratog Carcinog Mutagen* 19: 403-413.

Varanda EA, Tavares DC (1998) Radioprotection: Mechanism and radioprotective agents including honey bee venom. *Venom Anim Toxins* 4: 5-21.

Vick JA, Mehlman B, Brooks R, Phillips SJ, Shipman W (1972) Effect of the bee venom and melittin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. *Toxicon* 10: 581-586.

Vick JA, Shipman WH (1972) Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon* 10: 377-380.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 73: 117-124.

Vogel H (1981) Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers. Study of binding and conformational changes. *FEBS Lett* 134: 37-42.

Wahl M, Carpenter G (1991) Selective phospholipase C activation. *Bioessays* 13: 107-113.

Wang X, McCullough KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ (2001) Oxidative stress-induced phospholipase C-g1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem* 276: 28364-28371.

Wang WX, Ji YH (2005) Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *J Neurooncol* 73: 1-7.

Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, Cao X, Ling C (2009) Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I $\kappa$ B kinase-NF $\kappa$ B. *J Biol Chem* 284: 3804-3813.

Waris G, Ahsan H (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 11: 5-14.

Watala C, Kowalczyk JK (1990) Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. *Comp Biochem Physiol C* 97: 187-194.

Wattenberg LW (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45: 1-8.

Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376.

Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST (1985) Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227: 747-749.

Wemmer D, Kallembach NR (1982) Assignments and structure of apamin and related peptides in bee venom. *Biochemistry* 22: 191-196.

Weston KM, Raison RL (1998) Interaction of melittin with a human lymphoblastoid cell line, HMy2. *J Cell Biochem* 68: 164-173.

Winczura A, Zdzalik D, Tudek B (2012) Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res* 46: 442-459.

Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey SM (1998) Failure to activate cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> causes TNF resistance in human leukemic cells. *J Immunol* 160: 5929-5935.

Yang Y, Hutchinson P, Morand EF (1999) Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 42: 1538-1544.

Yang RS, Tang CH, Chuang WJ, Huang TH, Peng HC, Huang TF, Fu WM (2005) Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon* 45: 661-669.

Yoirish N (2001) Curative properties of honey and bee venom. 2nd edn. University Press of the Pacific, Honolulu.

Young D (2006) Natural agents examined as sources for chemopreventive therapies. *Am J Health Syst Pharm.* 63: 1681-1682.

Zeh HJ3rd, Lotze MT (2005) Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 28: 1-9.

Zhang Z, Shen HM, Zhang QF, Ong CN (1999) Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in alveolar macrophages. *Am J Physiol* 277: 743-748.

Zhao Q, Araki S, Zhang S, Miao J (2004) Rattlesnake venom induces apoptosis by stimulating PC-PLC and upregulating the expression of integrin beta4, P53 in vascular endothelial cells. *Toxicon* 44: 161-168.

Zhu HG, Tayeh I, Israel L, Castagna M (1991) Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. *J Biol Regul Homeost Agents* 5: 52-58.

Zhua Y, Lia W, Lia Q, Lia Y, Lia Y, Zhang X, Huanga Q (2009) Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon* 47: 1351-1358.

Ziai MR, Russek S, Wang HC, Beer B, Blume AJ (1990) Mast cell degranulating peptide: a multi-functional neurotoxin. *J Pharm Pharmacol* 42: 457-461.

Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U (2007) Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 73: 298-307.

Žegura B, Lah TT, Filipič M (2006) Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat Res* 611: 25-33.





## 8. POPIS KRATICA I NAZIVA

Kratika	Puni naziv
A1235	stanice ljudskog glioblastoma
BV	engl. <i>bee venom</i> , pčelinji otrov
CCB	engl. <i>Coomasie brilliant blue</i> , Coomasie brilijant plavo
cDDP	cis-diaminodikloroplatina (II), cisplatina
COX-2	engl. <i>cyclooxygenase 2</i> , ciklooksigenaza 2
DAG	engl. <i>diacyl glycerol</i> , diacil glicerol
DMEM	Dulbeccov minimalni Eaglov medij
DMSO	dimetil sulfoksid
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoat
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina
ERK	engl. <i>extracellular signal regulated kinase</i> , receptor za epidermalni faktor rasta
FISH	engl. <i>fluorescence in situ hybridization</i> , fluorescentna in situ hibridizacija
FPG	engl. <i>formamidopyrimidine DNA glycosylase</i> , enzim formamidopirimidin DNA glikozilaza
GSH	engl. <i>glutathione</i> , glutation
GSSG	engl. <i>glutathione disulfide</i> , glutation disulfid
Hef	normalni fibroblasti
HEK-293	embrionske stanične linije bubrega
HeLa	stanice ljudskog karcinom vrata grlića maternice
HEp-2	stanice ljudskog karcinoma grkljana
hOGG1	engl. <i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i> , ljudska 8-oksogvanin glikozilaza
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> , tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti
HR	engl. <i>high resolution agarose</i> , agarozna visoke rezolucije
IP <sub>3</sub>	engl. <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i> , inozitol 1,4,5-trifosfat
LMP	engl. <i>low melting point agarose</i> , agarozna niskog tališta
LPO	engl. <i>lipid peroxidation</i> , lipidna peroksidacija
MCD	engl. <i>mast cell degranulating peptide</i> , peptid koji degranulira mastocite
MCF-7	stanice adenokarcinoma dojke
MDA	engl. <i>malondialdehyde</i> , malondialdehid
MEL	engl. <i>melittin</i> , melitin
MN	engl. <i>micronuclei</i> , mikronukleus
MNi	engl. <i>micronucleus</i> , mikronukleusi
MPA	metafosforna kiselina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NAC	engl. <i>N-acetylcysteine</i> , N-acetil-L-cistein
NBUD	engl. <i>nuclear bud</i> , jezgreni pup
NF-κB	engl. <i>nuclear factor κB</i> , nuklearni faktor κB
NMP	engl. <i>normal melting point agarose</i> , agarozna normalnog tališta
NPB	engl. <i>nucleoplasmic bridge</i> , nukleoplazmatski most
PARP	engl. <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i> , poli (ADP-riboza) polimeraza
PBS	engl. <i>phosphate saline buffer</i> , fosfatni pufer
PHA	engl. <i>phytohaemagglutinin</i> , fitohemaglutinin
PIP <sub>2</sub>	engl. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> , fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
PLA <sub>2</sub>	engl. <i>phospholipase A<sub>2</sub></i> , fosfolipaza A <sub>2</sub>
PLC	engl. <i>phospholipase C</i> , fosfolipaza C

Kratika	Puni naziv
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktivni kisikovi spojevi
SD	engl. <i>standard deviation</i> , standardna devijacija
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , natrij-dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza
SE	engl. <i>standard error</i> , standardna pogreška
SW620	stanice adenokarcinoma kolona
SOD	superoskid dismutaza
TBA	tiobarbituratna kiselina
TMP	1,1,3,3-tetrametoksiopropan

## 9. ŽIVOTOPIS

Goran Gajski rođen je 31.08.1980. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio je 1994. godine, a Opću VII. Gimnaziju 1999. godine u Zagrebu. Iste godine upisao je Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer Molekularna biologija. Diplomirao je 2006. godine sa diplomskim radom pod naslovom „Procjena citogenetičkog učinka atorvastatina na ljudskim limfocitima u uvjetima *in vitro*“. Diplomski rad je izradio u Jedinici za mutagenezu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom prof. dr. sc. Vere Garaj-Vrhovac. Od 2007. godine zaposlen je u Jedinici za mutagenezu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom prof. dr. sc. Vere Garaj-Vrhovac na projektu „Mutageni i antimutageni u ekogenetičkim istraživanjima“. Također je uključen u rad na bilateralnom projektu „*In vitro* istraživanja citotoksičnog i genotoksičnog učinka cijanobakterijskih toksina“ te u rad na Europskom FP7 projektu „CytoThreat - Fate and effects of cytostatic pharmaceuticals in the environment and the identification of biomarkers for and improved risk assessment on environmental exposure“. 2007. godine upisuje poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom dosadašnjeg rada proveo je nekoliko tjedana na studijskom boravku u laboratoriju dr. sc. Metke Filipič Odjela za Genetičku toksikologiju i biologiju raka na Nacionalnom institutu za biologiju u Ljubljani, Slovenija te u laboratoriju dr. sc. Ákos Horváth Odjela za akvakulturu na „Szent István“ fakultetu u Gödöllő, Mađarska. Do sada je objavio 28 znanstvenih radova u CC časopisima, 4 znanstvena rada u SCI časopisima i 3 znanstvena rada u drugim časopisima. Također je objavio 5 kongresnih priopćenja u CC časopisu, 2 kongresna priopćenja u SCI časopisima, 9 znanstvenih radova u zbornicima skupova, 38 sažetka u zbornicima skupova te 6 poglavlja u knjigama. Sudjelovao je na nekoliko međunarodnih i domaćih skupova i radionica sa 3 oralne i 11 posterskih prezentacija te kao član organizacijskog odbora. Član je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih društava te dobitnik nekoliko nagrada za znanstvena dostignuća.

**Poglavlja u knjigama:**

Domijan AM, Gajski G, Peraica M, Garaj-Vrhovac V (2012) Evaluation of oxidative status and baseline DNA damage frequency in healthy female volunteers. U: Reyes AM, Contreras CD (eds.) Handbook on Oxidative Stress: New Research. New York, Nova Publisher, 363-380.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Milković Đ, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Beck N, Knežević Ž, Gerić M (2012) Radiation exposure and protection in conventional pediatric radiology of thorax. U: Balenović D, Štimac E (eds.) Radiation Exposure: Sources, Impacts and Reduction Strategies. New York, Nova Publisher, 43-74.

Gajski G, Gerić M, Ravlić S, Capuder Ž, Garaj-Vrhovac V (2011) Presence of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Croatia and evaluation of its genotoxicity. U: Perveen F (ed.) Insecticides - Pest Engineering. Rijeka-Wien, InTech, 117-150.

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2011) Bee venom and melittin are cytotoxic against different types of tumor and non-tumor cell lines in vitro. U: Viktorsson K (ed.) Advancements in Cancer Research. New York, Nova Publisher, 163-178.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2011) Comet assay in human biomonitoring as reasonably reliable cancer predictor in epidemiology. U: Kristoff HC (ed.) Cancer Biomarkers. New York, Nova Publisher, 165-188.

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2010) Bee venom and melittin from *Apis mellifera* display cytotoxicity towards different types of tumor and non-tumor cell lines. U: Gjersoe J, Hundstad S (eds.) Venoms: Sources, Toxicity and Therapeutic Uses. New York, Nova Publisher, 113-133.

**Znanstveni radovi u CC časopisima:**

Gajski G, Gerić M, Oreščanin V, Garaj-Vrhovac V (2012) Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Mutat Res doi:p11: S1383-5718(12)00298-7. 10.1016/j.mrgentox.2012.09.011.

Rak S, Cimbor-Zovko T, Gajski G, Dubravčić K, Domijan AM, Delaš I, Garaj-Vrhovac V, Batinić D, Sorić J, Osmak M (2012) Carboplatin resistant human laryngeal carcinoma cells are cross resistant to curcumin due to reduced curcumin accumulation. Toxicol In Vitro doi:p11: S0887-2333(12)00312-8. 10.1016/j.tiv.2012.11.003.

Gajski G, Domijan AM, Garaj-Vrhovac V (2012) Alterations of GSH and MDA levels and their association with bee venom-induced DNA damage in human peripheral blood leukocytes. Environ Mol Mutagen 53: 469-477.

Gerić M, Gajski G, Oreščanin V, Kollar R, Garaj-Vrhovac V (2012) Chemical and toxicological characterization of the bricks produced from clay/sewage sludge mixture. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 47: 1521-1527.

Gerić M, Ceraj-Cerić N, Gajski G, Vasilić Z, Capuder Z, Garaj-Vrhovac V (2012) Cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to low concentrations of p,p'-DDT, and its metabolites (p,p'-DDE, and p,p'-DDD) in vitro. *Chemosphere* 87: 1288-1294.

Gavella M, Lipovac V, Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2012) Protective effect of gangliosides on DNA in human spermatozoa exposed to cryopreservation. *J Androl* 33: 1016-1024.

Gajski G, Oreščanin V, Garaj-Vrhovac V (2012) Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. *Ecotoxicol Environ Saf* 78: 253-259.

Vidić Štrac I, Pušić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2012) Presence of phthalate esters in intravenous solution evaluated using gas chromatography-mass spectrometry method. *J Appl Toxicol* doi: 10.1002/jat.1741.

Dinter D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2012) An alkaline comet assay study on the antimalarial drug atovaquone in human peripheral blood lymphocytes: a study based on clinically relevant concentrations. *J Appl Toxicol* doi: 10.1002/jat.1711.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V, Filipič M (2011) Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 726: 116-122.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V (2011) Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicol* 58: 471-479.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2011) Bee venom induced cytogenetic damage and decreased cell viability in human white blood cells after treatment in vitro: a multi-biomarker approach. *Environ Toxicol Pharmacol* 32: 201-211.

Gajski G, Oreščanin V, Garaj-Vrhovac V (2011) Cytogenotoxicity of sewage sludge leachate before and after calcium oxide-based solidification in human lymphocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 1408-1415.

Oršolić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Đikić D, Špacir Prskalo Z, Sirovina D (2011) DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 656: 110-118.

Gajski G, Milković Đ, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Garaj-Vrhovaca V (2011) Application of dosimetry systems and cytogenetic status of the child population exposed to diagnostic X-rays by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *J Appl Toxicol* 31: 608-617.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Pažanin S, Sarolić A, Domijan AM, Flažs D, Peraica M (2011) Assessment of cytogenetic damage and oxidative stress in personnel occupationally exposed to the pulsed microwave radiation of marine radar equipment. *Int J Hyg Environ Health* 1: 59-65.

Gajski G, Dinter D, Garaj-Vrhovac V (2010) In vitro effect of the antimalarial drug proguanil hydrochloride on viability and DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* 30: 257-263.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2010) Increased frequency of sister chromatid exchanges and decrease in cell viability and proliferation kinetics in human peripheral blood lymphocytes after in vitro exposure to whole bee venom. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 45: 1654-1659.

Gavella M, Garaj-Vrhovac V, Lipovac V, Antica M, Gajski G, Car N (2010) Ganglioside GT1b protects human spermatozoa from hydrogen peroxide-induced DNA and membrane damage. *Int J Androl* 33: 536-544.

Milković Đ, Garaj-Vrhovac V, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Gajski G, Knežević Z, Beck N (2009) Primary DNA damage assessed with the comet assay and comparison to the absorbed dose of diagnostic X-rays in children. *Int J Toxicol* 28: 405-416.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Radioprotective effects of honeybee venom (*Apis mellifera*) against 915-MHz microwave radiation-induced DNA damage in wistar rat lymphocytes: in vitro study. *Int J Toxicol* 28: 88-98.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Trošić I, Pavičić I (2009) Evaluation of basal DNA damage and oxidative stress in Wistar rat leukocytes after exposure to microwave radiation. *Toxicology* 259: 107-112.

Garaj-Vrhovac V, Oreščanin V, Ruk D, Gajski G (2009) In vitro assessment of genotoxic effects of electric arc furnace dust on human lymphocytes using the alkaline comet assay. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 44: 279-287.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2008) Genotoxic potential of bee venom (*Apis mellifera*) on human peripheral blood lymphocytes in vitro using single cell gel electrophoresis assay. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43: 1279-1287.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Ravlić S (2008) Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT. *Braz J Med Biol Res* 41: 473-476.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Oreščanin V (2008) Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: standard and Fpg-modified comet assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 231: 85-93.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2008) Application of cytogenetic endpoints and comet assay on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43: 78-85.

Gajski G, Ravlić S, Capuder Ž, Garaj-Vrhovac V (2007) Use of sensitive methods for detection of DNA damage on human lymphocytes exposed to p,p'-DDT: comet assay and new criteria for scoring micronucleus test. *J Environ Sci Health B* 42: 607-613.

**Znanstveni radovi u SCI-Expanded časopisima:**

Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Želježić D, Gajski G, Mladinić M, Garaj-Vrhovac V (2010) Normal and cut-off values of the cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes in the Croatian general population. *Arh Hig Rada Toksikol* 61: 219-234.

Mikloš M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiol Oncol* 43: 97-107.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Brumen V (2009) Alkaline comet assay as a biomarker of DNA-damage encountered in workers engaged in cigarette manufacturing. *Period Biol* 111: 85-90.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2009) Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 27-34.

**Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2011) Bee venom and melittin are cytotoxic against different types of tumor and non-tumor cell lines in vitro. *Canc Res J* 4: 159-174.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2010) Single cell gel electrophoresis assay in human biomonitoring as reasonably reliable cancer predictor after exposure to physical agents. *Int J Canc Prev* 3: 243-256.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2010) Atorvastatin therapy safety from the aspect of genotoxicity. *Med Jad* 4: 11-17.

**Znanstveni radovi u zbornicima skupova:**

Gajski G, Milković Đ, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Knežević Ž, Beck N, Gerić M, Garaj-Vrhovac V (2011) Alkaline comet assay and micronucleus test parameters in children exposed to diagnostic X-ray examination. 8<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Krk, Croatia: 129-133.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2011) Radioprotection of Wistar rat lymphocytes against microwave radiation mediated by bee venom. 8<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Krk, Croatia: 524-528.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Miljanić S (2010) Sensitivity of standard and Fpg-modified comet assay for estimation of DNA damage in peripheral blood lymphocytes after exposure to gamma rays. 3<sup>rd</sup> European International Radiation Protection Association Congress, Helsinki, Finska: 1-8.



Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2009) Radioprotective effect of bee venom against oxidative DNA damage induced by microwave radiation. XXV Simpozijum Društva za Zaštitu od Zračenja Srbije i Crne Gore, Kopaonik, Srbija: 317-320.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Pažanin S, Brumen V (2008) Evaluation of cytogenetic damage in workers exposed to microwave radiation of GEM radar using new criteria in scoring micronucleus. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 1-7.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Pažanin S, Brumen V (2008) Cytogenetic monitoring of personnel occupationally exposed to microwave radiation of GEM radar. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 1-6.

Milković Đ, Ranogajec-Komor M, Garaj-Vrhovac V, Miljanić S, Kovač K, Gajski G, Knežević Ž, Beck N (2008) Biological effects of radiation and dosimetry in X-ray diagnostics of children. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 1-5.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2008) Cytogenetic status of workers occupationally exposed to microwave radiation of GEM radar. 7<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Opatija, Hrvatska: 118-124.

Milković Đ, Garaj-Vrhovac V, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Beck N, Gajski G, Knežević Ž (2008) Dose determination and DNA damage in X-ray diagnostic of children. 7<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Opatija, Hrvatska: 111-117.

### **Kongresna priopćenja u CC časopisu:**

Gavella M, Lipovac V, Šiftar Z, Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2011) Do exogenous gangliosides protect from cryopreservation-induced DNA damage of human spermatozoa? 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology, Stochlom, Švedska, Human Reproduction 26: 250-251.

Dinter D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2010) Role of sister chromatid exchange analysis in assessment of proguanil genotoxicity in cultured human lymphocytes. 16<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Copenhagen, Danska, Basic Clin Pharmacol Toxicol 107: 258-258.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2008) Genotoxicity of honey bee venom in human lymphocytes using comet assay. 45<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodes, Grčka, Toxicol Lett 180S: S104-S104.

Peraica M, Marijanović A, Flajs D, Domijan AM, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2008) Oxidative stress in workers occupationally exposed to microwave radiation. 45<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodes, Grčka, Toxicol Lett 180S: S246-S246.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2007) Application of comet assay on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. 44<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, Nizozemska, Toxicol Lett 172S: S169-S169.

**Kongresna priopćenja u SCI-Expanded časopisima:**

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2012) Comet assay as reasonably reliable cancer predictor in human biomonitoring. HDIR-2 Second Meeting with International Participation, Zagreb, Hrvatska, Period Biol 114S: S50-S50.

Domijan AM, Gajski G, Novak I, Gerić M, Garaj-Vrhovac V (2012) Prevention of genotoxic potential of mycotoxins ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> by chlorophyllin. HDIR-2 Second Meeting with International Participation, Zagreb, Hrvatska, Period Biol 114S: S48-S48.

**Kongresna priopćenja:**

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2012) Cytotoxic effect of melittin on human glioblastoma A1235 cells *in vitro*. 24<sup>th</sup> Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations, Bali, Indonezija: 42-42.

Dinter D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2012) Safety of antimalarial drug atovaquone from the aspect of genotoxicity: an alkaline comet assay study on human lymphocytes. 24<sup>th</sup> Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations, Bali, Indonezija: 293-293.

Gajski G, Domijan AM, Garaj-Vrhovac V (2012) Cell response to whole bee venom in regard to possible therapeutic application. 3<sup>rd</sup> Congress of Croatian Geneticist with international participation, Krk, Hrvatska: 76-76.

Ruk D, Gajski G, Gerić M, Kollar R, Oreščanin V, Garaj-Vrhovac V (2012) In vitro assessment of genotoxicity of landfill leachate on human lymphocytes using multi-biomarker approach. 3<sup>rd</sup> Congress of Croatian Geneticist with international participation, Krk, Hrvatska: 111-111.

Gerić M, Gajski G, Ceraj-Cerić N, Vasilić Ž, Capuder Ž, Garaj-Vrhovac V (2012) DDT-, DDE-, and DDD-induced cytogenotoxicity in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. 3<sup>rd</sup> Congress of Croatian Geneticist with international participation, Krk, Hrvatska: 29-29.

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Rak S, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2011) Application of bee venom in anticancer therapy: study on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. 71<sup>st</sup> International Congress of FIP, Hyderabad, India: [www.fip.org/abstracts2011](http://www.fip.org/abstracts2011).

Gajski G, Domijan AM, Garaj-Vrhovac V (2011) The role of oxidative stress in bee venom induced DNA damage. Cost Workshop CM0603 Free Radicals in Chemical Biology, Zagreb, Hrvatska: 59-59.

Gerić M, Ceraj-Cerić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2011) Oxidative status of human peripheral blood lymphocytes after organochlorine pesticide exposure. Cost Workshop CM0603 Free Radicals in Chemical Biology, Zagreb, Hrvatska: 60-60.

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Rak S, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2010) Human cervical carcinoma cell response to whole bee venom treatment *in vitro*. HDIR-1 First Meeting with International Participation, Zagreb, Hrvatska: 69-69.

Rak S, Čimbor-Zovko T, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Dubravčić K, Batinić D, Domijan AM, Sorić J, Osmak M (2010) Cell response to curcumin and causes of curcumin-resistance. HDIR-1 First Meeting with International Participation, Zagreb, Hrvatska: 47-47.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V, Filipič M (2010) Microcystin-LR induces DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. The 8<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria. Istanbul, Turska: 36-36.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Miljanić S (2010) Sensitivity of standard and Fpg-modified comet assay for estimation of DNA damage in peripheral blood lymphocytes after exposure to gamma rays. 3<sup>rd</sup> European International Radiation Protection Association Congress, Helsinki, Finska: 208-208.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Radioprotection of bee venom against microwave radiation induced DNA damage and oxidative stress in Wistar rat lymphocytes. ASCEPT 43<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting, Sydney, New South Wales, Australia: 66-66

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2009) Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to tobacco dust in cigarette manufacturing. ASCEPT 43<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting, Sydney, New South Wales, Australia: 67-67

Dinter D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Effect of proguanil hydrochloride on DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. ASCEPT 43<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting, Sydney, New South Wales, Australia: 64-64

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2009) Radioprotective effect of bee venom against oxidative DNA damage induced by microwave radiation. XXV Simpozijum Društva za Zaštitu od Zračenja Srbije i Crne Gore, Kopaonik, Srbija: 320-320.

Žegura B, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Filipič M (2009) Microcystin-LR induced DNA damage in human hepatoma cell line (HepG2) and human peripheral blood lymphocytes. Joint Congress of the Slovenian Biochemical Society and the Genetic Society of Slovenia, Otočec, Slovenia: 157-157.

Žegura B, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Filipič M (2009) DNA damage in human hepatoma cell line (HepG2) and peripheral blood lymphocytes after microcystin-LR exposure. 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Firenze, Italija: 136-136.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2009) Genotoxic properties of electric arc furnace dust on human lymphocytes: in vitro study. IV. Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, Srbija: 49-49.

Gajski G, Čimbor-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2009) Bee venom and melittin display cytotoxicity and alters morphological appearance of different types of tumor and non-tumor cell lines. EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Hrvatska: 20-20.

Oršolić N, Gajski G, Josipović P, Garaj-Vrhovac V, Sirovina D (2009) DNA-protective effects of EGCG and propolis in alloxan-induced diabetic mice. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, Hrvatska: 29-29

Oršolić N, Gajski G, Josipović P, Garaj-Vrhovac V, Sirovina D (2009) Protective effect of dietary phytochemicals on blood cell in alloxan-induced diabetic mice. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, Hrvatska: 49-49.

Oršolić N, Sirovina D, Benković V, Josipović P, Horvat-Knežević A, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009). Flavonoids supplementation in alloxan-induced diabetic mice. 10<sup>th</sup> Croatian Biological Congress, Osijek, Hrvatska: 193-194.

Oršolić N, Sirovina D, Josipović P, Jurčić Ž, Novak S, Ivić I, Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2009) Propolis vs EGCG on alloxan-induced DNA damage in mice blood cells. 10<sup>th</sup> Croatian Biological Congress, Osijek, Hrvatska: 195-196.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Pažanin S, Brumen V (2008) Evaluation of cytogenetic damage in workers exposed to microwave radiation of GEM radar using new criteria in scoring micronucleus. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 325-325.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Pažanin S, Brumen V (2008) Cytogenetic monitoring of personnel occupationally exposed to microwave radiation of GEM radar. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 326-327.

Milković Đ, Ranogajec-Komor M, Garaj-Vrhovac V, Miljanić S, Kovač K, Gajski G, Knežević Ž, Beck N (2008) Biological effects of radiation and dosimetry in X-ray diagnostics of children. 12<sup>th</sup> International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, Argentina: 83-83.

Gajski G, Čimbora-Zovko T, Osmak M, Garaj-Vrhovac V (2008) Evaluation of cytotoxicity of bee venom and melittin towards tumour cells. Scientific Symposium "50 Years of Molecular Biology in Croatia", Zagreb, Hrvatska: 113-113.

Jakopec S, Čimbora-Zovko T, Dubravčić K, Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Sorić J, Majhen D, Ambriović-Ristov A, Osmak M (2008) Cell response to curcumin and causes of curcumin-resistance. Scientific Symposium "50 Years of Molecular Biology in Croatia", Zagreb, Hrvatska: 89-89.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2008) Procjena citogenetičkog statatusa u ljudskim limfocitima nakon izloženosti visokim koncentracijama pčelinjeg otrova u uvjetima in vitro. Znanstveni skup Aktualna istraživanja u zaštiti zdravlja radnika i zdravstvenoj ekologiji, Zagreb, Hrvatska: 6-6.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2008) Standard versus Fpg-modified comet assay revealing mechanism of DNA damage induced by atorvastatin. EEMS 38<sup>th</sup> Annual Meeting, Cavtat, Hrvatska: 185-185.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2008) Genotoxicity testing of therapeutical concentration of atorvastatin using the micronucleus test according to new scoring criteria. EEMS 38<sup>th</sup> Annual Meeting, Cavtat, Hrvatska: 271-271.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2008) Cytogenetic status of workers occupationally exposed to microwave radiation of GEM radar. 7<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Opatija, Hrvatska: 124-124.

Milković Đ, Garaj-Vrhovac V, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Beck N, Gajski G, Knežević Ž (2008) Dose determination and DNA damage in X-ray diagnostic of children. 7<sup>th</sup> Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Opatija, Hrvatska: 117-117.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2007) Use of sensitive methods for detection of DNA damage on human lymphocytes exposed to p,p'-DDT: comet assay and micronucleus test. The 6<sup>th</sup> Princess Chulabhorn International Science Congress, Bangkok, Tajland: 104-104.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2007) Assesment of atorvastatin genotoxicity on human lymphocytes using sister-chromatid exchange analysis, The 6<sup>th</sup> Princess Chulabhorn International Science Congress, Bangkok, Tajland: 105-105.

Garaj-Vrhovac V, Gajski G (2007) Application of cytogenetic endpoints on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. EEMS 37<sup>th</sup> Annual Meeting, Basel, Švicarska: 187-187.

Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2007) Application of cytogenetic endpoints on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. Second Congress of Croatian Scientists from the Homeland and Abroad, Split, Hrvatska: <http://www.kongres-znanstvenika.hr/public/sudioniciPosteri.aspx>.

#### **Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:**

HDIR-2 Second Meeting with International Participation, "From Bench to Clinic", Zagreb, Hrvatska, 2012.

24th Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA), Bali, Indonezija, 2012.

3rd Congress of Croatian Geneticist with international participation, Krk, Hrvatska, 2012.

71st International Congress of FIP, Hyderabad, Indija, 2011.

8th Symposium of the Croatian Radiation Protection Association, Krk, Hrvatska, 2011.

HDIR-1 First Meeting with International Participation "From Bench to Clinic", Zagreb, Hrvatska, 2010.

EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Hrvatska, 2009.

ASCEPT (Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologist) 43rd Annual Scientific Meeting "The right of Medicines", Sydney, New South Wales, Australija, 2009.

EEMS (European Environmental Mutagen Society) 38th Annual Meeting "Environmental Mutagens and Human Health", Cavtat, Hrvatska, 2008.

12th International Congress of the International Radiation Protection Association “Strengthening Radiation Protection Worldwide”, Buenos Aires, Argentina, 2008.

Znanstveni skup “Aktualna istraživanja u zaštiti zdravlja radnika i zdravstvenoj ekologiji“, Zagreb, Hrvatska, 2008.

Scientific Symposium “50 Years of Molecular Biology in Croatia”, Zagreb, Hrvatska, 2008.

The 6th Princess Chulabhorn International Science Congress “The interface of chemistry and biology in the „OMICS“ era“, Bangkok, Tajland, 2007.

Second Congress of Croatian Scientists from the Homeland and Abroad, Split, Hrvatska, 2007.

### **Usavršavanje:**

1st Cytothreat Workshop on The Effects of Residues of Cytostatics and Other Pharmaceuticals on Non-Target Organisms, Napulj, Italija, 2012.

Eurotox Basic Toxicology Course, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Srbija, (2011).

Authorized STATISTICA Course, Systemcom, Zagreb, Hrvatska, (2011).

Cost Workshop CM0603 “Free Radicals in Chemical Biology”, Ruđer Bošković Institute Zagreb, Hrvatska, (2011)

School of Conservation Biology of the Croatian Biological Society, Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, Rovinj, Hrvatska, (2008).

Collegium Ramazzini Satellite Workshop “Occupational and Environmental Health in the Asia/Pacific Region”, Chullabhorn Research Institute, Bangkok, Tajland, (2007).

### **Nagrade:**

Godišnja nagrada Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu mladim znanstvenicima i umjetnicima u 2011. godini za znanstveni doprinos iz područja biomedicinskih znanosti.

Nagrada Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada mladom znanstveniku s najvećim brojem znanstvenih radova objavljenih u 2011. godini u znanstvenim časopisima koji se indeksiraju u CC, SCI-Expanded i/ili SSCI.

Nagrada Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada za originalni znanstveni rad objavljen u 2010. godini u časopisu koji je najbolje svrstan u znanstvena područja iz baza Science Edition i Social Science Edition JRC.

Nagrada Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada mladom znanstveniku s najvećim brojem znanstvenih radova objavljenih u 2009. godini u znanstvenim časopisima koji se indeksiraju u CC, SCI-Expanded i/ili SSCI.