

# Citogenetički učinci pčelinjeg otrova na ljudske limfocite

---

**Tomičić, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2011**

*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:217:323009>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Lucija Tomičić**

**CITOGENETIČKI UČINCI PČELINJEG OTROVA NA  
LJUDSKE LIMFOCITE**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2011.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za mutagenezu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Vere Garaj-Vrhovac, dipl. ing. biol., predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva diplomirani inženjer biologije, smjer molekularna biologija.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Veri Garaj-Vrhovac i Goranu Gajskom na stručnoj pomoći i beskrajnom strpljenju koje su mi pružili prilikom izrade ovoga rada. Također zahvaljujem autorima stručne literature koji su svoj znanstveni rad posvetili temi koju sam u ovom diplomskom radu tek ovlaš dotaknula.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### CITOGENETIČKI UČINCI PČELINJEG OTROVA NA LJUDSKE LIMFOCITE

Lucija Tomičić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Posljednjih godina zapadna medicina sve se više okreće proizvodima iz prirode kao potencijalnim riješenjima za zdravstvene poteškoće koje se javljaju u današnjoj populaciji. Pčelinji otrov je jedan od tih proizvoda. Ima veliki potencijal za ublažavanje kroničnih bolova i koristi se za liječenje reumatskih bolesti, neuroloških bolesti i različitih dermatoloških stanja, te za liječenje tumora. Cilj ovog istraživanja je bio procijeniti učinak visoke koncentracije pčelinjeg otrova (100 µg/ml) na ljudske limfocite periferne krvi u uvjetima *in vitro* tijekom različitih vremenskih perioda (od 10 min do 24 h). Parametri komet-testa ukazuju na genotoksični učinak pčelinjeg otrova na ljudske limfocite periferne krvi u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak i to u vremenskom izlaganju od 30 minuta, 6 i 24 sata za dužinu repa, te od 6 i 24 sata za repni moment i intenzitet repa. Rezultati mikronukleus-testa također ukazuju na genotoksični učinak visoke koncentracije pčelinjeg otrova na ljudske limfocite periferne krvi u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak. Rezultati učestalosti pojavljivanja mikronukleusa, pupova i nukleoplazmatskih mostova pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u svim vremenima tretiranja u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak, dakle utvrđena je ovisnost o vremenu. Rezultati dobiveni ovim radom upućuju na to da visoka koncentracija pčelinjeg otrova uzrokuje staničnu nestabilnost. Buduća istraživanja bilo bi korisno usmjeriti na dublje razumijevanje mehanizma djelovanja pčelinjeg otrova i njegovih sastavnica na ljudske stanice u svrhu primjene ovog prirodnog proizvoda u medicini.

(71 stranica / 12 slika / 5 tablica / 214 literaturnih navoda / jezik izvornika - hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: pčelinji otrov, ljudski limfociti periferne krvi, oštećenje DNA, komet-test, mikronukleus-test

Voditelj: Dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, red. prof.

Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Dr. sc. Mladen Kučinić, red. prof.

Rad prihvaćen: 09.03.2011.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### CYTOGENETIC EFFECTS OF BEE VENOM ON HUMAN LYMPHOCYTES

**Lucija Tomičić**

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Western medicine is turning more and more towards natural products as potential solutions for the health problems that occur in human's population. Bee venom is one of those products. It has great potential for chronic pain relief and it is used for treatment of rheumatic diseases, neurological diseases and various dermatological conditions and also for treatment of tumors. The aim of this study was to assess the effect of high concentration of bee venom (100 µg/ml) on human peripheral blood *in vitro* over a range of time spans (from 10 min to 24 h). Parameters of comet assay showed genotoxic effect of bee venom on human peripheral blood lymphocytes in comparison with control in time period of 30 min, 6 and 24 h for tail length and of 6 and 24 h for tail moment and tail intensity. Results of micronucleus test also showed genotoxic effect of high concentration of bee venom on human peripheral blood lymphocytes in comparison with control. Method parameters (number of micronucleus, nuclear buds and nucleoplasmic bridges) showed statistically significant increase ( $p < 0,05$ ) for all lengths of exposure in comparison with control, therefore time dependence was established. Results obtained by this study indicate that high concentration of bee venom can lead to cellular instability. Future research should be focused on deeper understanding of the mechanism of action of bee venom and its components on human cells and finding the best possible application of this natural product in medicine.

(71 pages / 12 figures / 5 tables / 214 references / original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: bee venom, human peripheral blood lymphocytes, DNA damage, comet assay, micronucleus assay

Supervisor: Dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, prof.

Reviewers: Dr. sc. Vera Garaj-Vrhovac, prof.

Dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Dr. sc. Mladen Kučinić, prof.

Thesis accepted: 09.03.2011.

---

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PČELINJI PROIZVODI .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. Med .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Matična mliječ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Propolis .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4. Pelud .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5. Pčelinji vosak .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. PČELINJI OTROV .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1. Skupljanje .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. Fizikalne osobine .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3. Kemijski sastav .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3.1. Enzimi i peptidi .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.4. Djelovanje .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.4.1. Toksično djelovanje .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.4.2. Protutumorsko djelovanje .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.4.3. Protuupalno djelovanje .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.4.4. Radioprotektivno djelovanje .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. CITOGENETIČKE METODE .....</b>	<b>25</b>

<b>1.3.1. Test vijabilnosti .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2. Komet-test .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.3. Mikronukleus-test .....</b>	<b>28</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Materijal .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.1. Krv .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2. Test-substance .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1. Test vijabilnosti .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2. Komet-test .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3. Mikronukleus-test .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.4. Statistička obrada podataka .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5. Kratak prikaz pokusa .....</b>	<b>35</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Rezultati testa vijabilnosti .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Rezultati komet-testa .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3. Rezultati mikronukleus-testa .....</b>	<b>42</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>45</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>51</b>



# KRATICE

**PLA<sub>2</sub>** - fosfolipaza A<sub>2</sub>

**HIV** - virus ljudske imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)

**ACTH** - adenokortikotropin

**mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina

**MD** - miotonična distrofija

**NO** - dušikov oksid

**NOS** - sintaza dušikova oksida (engl. nitric oxid synthase)

**DNA** - deoksiribonukleinska kiselina

**MSH** - melanotropin

**ROS** - reaktivni spojevi kisika (engl. reactive oxygen species)

**AIF** - faktor indukcije apoptoze (engl. apoptosis inducing factor)

**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandin E<sub>2</sub>

**LPS** - lipopolisaharid

**AET** - 2-aminoetil-izotiuronij bromid hidrobromid

**DAPI** - 4,6-diamidino-2-fenilindol

**FISH** - fluorescencijska hibridizacija *in situ* (engl. fluorescence *in situ* hybridization)

**CBMN** - metoda blokiranja citokineze (engl. cytokinesis block micronucleus assay)

**AO** - akridin-oranž

**EtBr** - etidij-bromid

**NMP** - agarozna normalnog tališta (engl. normal melting point)

**LMP** - agarozna niskog tališta (engl. low melting point)

**DMSO** - dimetil-sulfoksid

**EDTA** - etilen-diamin-tetraoctena kiselina

**MN** - mikronukleus

**NM** - nukleoplazmatski most

# 1. UVOD



**Slika 1.** Prikaz pčele u hramu u Karnaku. (preuzeto od Feliz, 2009)

*„Kad sunce zaplače po drugi put, i kada voda klizne iz njegovih očiju, suze će se pretvoriti u – pčele.“* (iz egipatskih Magičnih tekstova).

Pčele i pčelinji proizvodi inspiriraju čovječanstvo od davnina. Prvi slikovni zapisi na kojima su prizori sakupljanja meda stari su oko 10 000 godina. Egipćani su vjerovali da su pčele sunčevog podrijetla i da su rođene iz suza boga sunca Ra koje su padale na zemlju (Slika 1.). Faraon Donjeg Egipta nosio je titulu Vladar pčela. U antičkoj Grčkoj med se smatrao omiljenom hranom bogova. Prema grčkoj mitologiji, malog Zeusa kojeg je majka sklonila od okrutnog oca Krona, nimfe su hranile isključivo medom i mlijekom. U mnogim kulturama pčela je preuzela ulogu glasnika koji održava vezu između ljudi i bogova. Povezuje se s besmrtnošću i često je smatrana izvorom vječnog života. O zagonetnoj vezi između čovjeka i pčela svjedoči i izjava nobelovca Alberta Einsteina: „Da pčele nestanu s lica zemlje, čovječanstvu bi preostalo još samo 4 godine života. Da nema pčela ne bi bilo oprašivanja, tako ni biljaka, životinja i na kraju ne bi bilo ljudi.“ Pčelinji proizvodi su se kroz povijest koristili prilikom balzamiranja, u medicinske svrhe (apiterapija), u religijske svrhe, u kozmetičke svrhe, kao nutrijent i dr.

Posljednjih nekoliko godina naglasak na istraživanju pčelinjeg otrova i njegove primjene sve je veći. Već Hipokrat, otac medicine, naziva pčelinji otrov misterioznim lijekom (*arcantum*), a spominje se i u Kuranu (“Iz njihovih trbuha nastaje tekućina koja je medicina za ljude”). Pčelinji otrov upotrebljava se u medicinske svrhe: za ublažavanje kronične boli i tretiranje mnogih tegoba uključujući razne reumatske bolesti vezane uz upalu i degeneraciju vezivnog tkiva (npr. nekoliko tipova artritisa), za neurološke bolesti (migrena, periferni neuritis, kronična bol u donjem dijelu leđa), za autoimune bolesti (multipla skleroza, lupus), za dermatološka stanja (egzem, psorijaza, infekcije herpes virusom) i dr. (Kim, 1997; Bauer, 1999; Ransome, 2004).

## **1.1. PČELINJI PROIZVODI**

Pčelinji proizvodi su med, matična mliječ, propolis, pčelinji vosak i pčelinji otrov. Pelud zapravo nije pčelinji proizvod već je riječ o muškim spolnim stanicama biljaka koje pčele koriste za hranu (neovisno o tome spominje se u kontekstu pčelinjih proizvoda). Ljekovita svojstva pčelinjih proizvoda poznata su odavno, a u posljednjih 40 godina značajno je porastao interes za pčelinje proizvode i njihovu upotrebu u prevenciji i liječenju bolesti. Suvremene metode omogućile su istraživanje sastava pčelinjih proizvoda i znanstveno objašnjenje biološke učinkovitosti koju imaju na organizam, a koja je predmet hvalospjeva od samih početaka civilizacije.

### **1.1.1. Med**

Pčelinji med je sladak, gust i viskozan proizvod specifičnog okusa i mirisa nastao iz nektara ili medljike koje medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) sakupljaju i prerađuju u mednom mjevuru. Nektar je slatka tekućina koju luče biljne žlijezde, nektarije. Medljika je slatka tekućina koju izlučuju sitni insekti (lisne uši, lisni savijači) što parazitiraju na biljkama. Pčela pomoću enzima pretvara složeni šećer saharozu iz nektara u dva jednostavna šećera glukozu i fruktozu, a višak vode uklanja se prenošenjem iz stanica saća i prozračivanjem košnice (Taranov, 2006).

Med nije uniforman proizvod. Naime, njegov se kemijski sastav mijenja ovisno o sastavu sirovina od kojih pčela proizvodi med, te ovisno o godišnjem dobu. Med dobre kvalitete sadrži do 80 % glukoze i fruktoze, 1-10 % saharoze, 34-61 % flavonoida, 16-20 %

vode, organske kiseline (mravlja, limunska, octena, maslačna, jantarna, mliječna kiselina i dr.), više alkohole, aminokiseline, proteine, inulin, mineralne tvari i mikroelemente, hlapljive tvari s antimikrobnim učinkom, enzime (invertaze, amilaze, esteraze, fosfataze, peroksidaze, glukooksidaze i dr.), vitamine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> i dr.) i hormone (Ambrose, 2005; Kuštrak, 2005). U medu se nalaze i peludna zrnca. Budući da svaka biljna vrsta ima karakterističnu veličinu, oblik i boju peludnih zrnaca, moguće je mikroskopskom analizom peludnih zrnaca odrediti podrijetlo meda. Dokazano je kako je mineralni sastav meda vrlo blizak mineralnom sastavu ljudske krvi (Taranov, 2006).

Od davnina, med se cijeni kao zdrava namirnica i izvrstan izvor energije. Naime, radi visokog sadržaja šećera svrstava se u visokoenergetske namirnice, te 100 grama meda daje više od 1300 kJ (320 kcal). Posebno se preporuča sportašima, kod kojih je primijećeno da im se uzimanjem 150 - 200 g meda dnevno dinamometrijska snaga poveća za 20 posto. Med ima antimikrobno djelovanje. Smatra se da postoji povezanost između sadržaja vodikova peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u medu i njegove antimikrobne aktivnosti. Vodikov peroksid nastaje kao rezultat djelovanja enzima glukooksidaze koja oksidira glukozu u glukonsku kiselinu uz nastanak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Križanić, 1997). Med također djeluje antioksidativno i uklanja slobodne radikale. Znanstvena istraživanja ustvrdila su da med ima umjereni antitumorski i izraziti antimetastatski učinak. U antitumorskom učinku meda važnu ulogu imaju flavonoidi, koji se vežu na estrogenske receptore i sprečavaju rast stanica tumora. Med se primjenjuje u ginekologiji, kod želučano-crijevnih bolesti, gastritisa, bolesti jetre, kod upale sluznice usne šupljine, kod opstipacije, kod hemeroida i kod bolesti respiratornog sustava. Također je učinkovit u liječenju različitih vrsta rana (dekubitalnih rana, opekotina, rana u dijabetičara i dr.). Pošto održava vlažnost i elastičnost kože te sprečava starenje i nastanak bora, upotrebljava se u kozmetici (Kuštrak, 2005).

### **1.1.2. Matična mliječ**

Medonosna pčela je insekt koji pokazuje izrazit polimorfizam. U pčelinjoj zajednici živi samo jedna matica koja nese jajašca u stanice saća. U jednom danu može snijeti više od 2000 jajašca, a to znači da ukupna težina jajašca prelazi njenu težinu. Matica nese dva tipa jajašca: neoplođena jajašca iz kojih se razvijaju muški članovi pčelinje zajednice (trutovi) i oplođena jajašca iz kojih se razvijaju ženski članovi (matice i radilice). U košnici s 20 000 - 30 000 radilica bit će 200 - 300 trutova (Townsend i Lucas, 1940; Matoničkin, 1999).

Mliječ je izlučevina hipofaringealnih i mandibularnih žlijezda mladih pčela radilica ( „dadilja ili hranilica“) koju koriste za hranjenje matice i ličinki (Kuštrak, 2005). Primijećeno je da razlika u hrani s kojom je hranjena ličinka određuje da li će iz oplodjenog jajašca nastati radilica ili matica. Sve ličinke hrane se sa mliječi tijekom prva 2 - 3 dana. Ako se i nakon trećega dana ličinka hrani samo sa mliječi iz nje će se razviti matica, a ako se hrani mješavinom meda i peluda iz nje će se razviti radilica (Townsend i Lucas, 1940).

Matična mliječ je kremasta, vrlo hranjiva, kisela izlučevina bijele do bijeložućkaste boje što ima karakterističnu aromu i okus. Kemijski sastav matične mliječi čine: voda 65 - 70 %, bjelančevine 14 - 19 % (albumini,  $\alpha$ -globulini,  $\beta$ -globulini,  $\gamma$ -globulini), šećeri 9 - 18 % (glukoza, fruktoza, male količine riboze, izomaltoze, maltoze, trehaloze, neotrehaloze i gentiobioze), lipidi 1,5 - 7 %, mineralne tvari 0,7 - 1,19 % (K, Mg, Na, Ca, Zn, Fe, Cu, Mn) i vitamini (tiamin, riboflavin, piridoksin, niacin, pantotenska kiselina, inozitol, biotin, folna kiselina, vitamin C, A, D, E, K). U mliječi se još nalaze spolni hormoni poput estradiola, progesterona i testosterona, neuroprijenosnici poput acetilkolina i kolina, te enzimi poput invertaze, katalaze, amilaze, kisele fosfataze i dr (Ambrose, 2005; Kuštrak, 2005).

Matična mliječ se danas upotrebljava u velikom broju preparata. Njezin se učinak zasniva na ubrzavanju oksidativnog metabolizma te kataboličkih i anaboličkih reakcija. Ima pozitivno djelovanje na krvožilni sustav i živčani sustav, smanjuje razinu kolesterola, stimulira imunološki sustav, pomaže u regeneraciji stanica i tkiva, povećava otpornost na stres i bolest, održava vitalnost mozga i poboljšava pamćenje (acetilkolin- neuroprijenosnik), pomaže u održavanju i jačanju kose, noktiju i kožnog tonusa, te ima pozitivno djelovanje na artritis, Parkinsonovu bolest i mišićnu distrofiju (Kuštrak, 2005). Matična mliječ i njene komponente poput bjelančevine rojalizina i 10-hidroksidecenske kiseline pokazuju antibakterijska svojstva. Ona također pokazuje antivirusna i antitumorska svojstva (Mizrahi i Lensky, 1997).

### **1.1.3. Propolis**

Propolis ili pčelinje ljepilo (engl. *bee glue*) je smolasti produkt košnice prikupljen od pčela medarica sa pupova lišća i kore različitog drveća, poput topole, breze, bukve, kestena, johe i raznih četinjača. Pčele žvaču tu smolu, djelomice je probavljaju uz pomoć enzima iz sekreta žlijezda slinovnica (primjerice  $\beta$ -glukozidaza ) i onda miješaju s voskom (Pietta i sur., 2002).

Kemijski sastav propolisa je dosta kompliciran i ovisi o specifičnosti lokalne flore na mjestu prikupljanja, te s time o geografskim i klimatskim karakteristikama toga mjesta (Bankova, 2005). Općenito, on sadrži 50 % smola i balzama, 30 % voska, 10 % esencijalnih ulja, 5 % polena i 5 % drugih organskih spojeva (Gómez-Caravaca i sur., 2006). Dosada je identificirano više od 300 spojeva u propolisu (Castro, 2001). Najvažnije biološki aktivne komponente u propolisu su flavonoidi, fenolne kiseline i njihovi esteri (Marcucci, 1995; Pietta i sur., 2002).

Boja pčelinjeg ljepljiva varira ovisno o izvorima skupljanja: od žuto zelene (bor), roze (topola) do crne boje (breza) sa svim njihovim nijansama. Ovisno o prisutnim smolama, mijenjaju se miris i okus (od oporo gorkog do gotovo slatkog). Njegova konzistencija ovisi o temperaturnim uvjetima. On je tvrd i lomljiv na hladnom a kako se temperatura povisuje prema 30 °C postaje rastezljiv i lako se oblikuje. Tali se na 65 - 70°C (Bubalo i Kekez, 2004). Propolis je netopiv u vodi, a otapa se u etanolu (zagrijavanjem u vodenoj kupelji), metanolu, amonijaku i octenoj kiselini (Kuštrak, 2005).

Prema nekim autorima, riječ propolis je složenica dviju grčkih riječi: pro (pred ili za) i polis (grad). Dakle, to je tvar uključena u obranu grada odnosno košnice. Prema drugim autorima, riječ propolis dolazi od latinske riječi propoliso što znači zamazivati, zaglađivati. Pčele primjenjuju propolis u tankom sloju na unutrašnje zidove košnice ili druge šupljine koju nastanjuju. Koristi se za zatvaranje pukotina, popravak saća, pojačavanje tankih granica saća, također ulaz u košnicu čini lakše obranivim i otpornim na različite vremenske uvjete (Ghisalberti, 1979). Ako u košnicu uđu uljezi (kukci ili veće životinje), pčele će ih morati ubiti a strvine izbaciti van. U slučaju da je ubijeni uljez velik i ne može se transportirati iz košnice, doći će do raspadanja. Tada će veći broj pčela oblagati strvinu propolisom i potpuno je izolirati od kontakta sa zrakom tj. balzamirati je (Kuštrak, 2005). Pčele još koriste propolis za termalnu izolaciju košnice i poliranje stanica saća koje služe kao skladišta za med, cvjetni prah i kao ležaj za ličinke (Oršolić, 2001).

Postoji duga povijest korištenja propolisa u narodnoj medicini što datira još od 300 godina prije naše ere (Ghisalberti, 1979). Ustanovljeno je da propolis posjeduje širok spektar bioloških aktivnosti: antibakterijsku, antifungalnu, antivirusnu (Kujumgiev i sur., 1999), antioksidacijsku (Kumazawa i sur., 2004), protuupalnu (Borrelli i sur., 2002), imunomodulatornu (Dimov i sur., 1991), anestetsku (Paintz i Metzner, 1979), antitumorsku (Oršolić i sur., 2003a), antiprotozoalnu (Scheller i sur., 1977) i hepatoprotektivnu (Banskota i

sur., 2001). Djeluje sinergistički s nekim antibioticima i pojačava njihov bakteriostatski učinak i do 100 puta. Sinergističko jačanje antibiotskog učinka u kombinaciji s propolisom, čak i u slučajevima kad antibiotici sami ne djeluju, upućuje na obećavajuću ulogu propolisa u terapiji protiv virusa i bakterija. On također ubrzava osteogenetske procese i ima regenerativan učinak na tkiva (Galović, 2009). Sposoban je inhibirati djelovanje enzima hijaluronidaze i tako dovesti do sporijeg starenja stanica (Kim i sur., 2005). Iz tih razloga propolis je pobudio veliko zanimanje i koristi se u sklopu 'zdrave hrane', kozmetike, farmaceutskih pripravaka i pića sa ciljem održavanja ili poboljšavanja ljudskog zdravlja. Uspješno se koristi u dermatologiji (za tretiranje akni, opekline, psorijaze, neurodermatitisa, ekscema, herplex simplex, herpex genitalisa itd.), otorinolaringologiji (za tretiranje bronhitisa, rinitisa, faringitisa, upale srednjeg uha itd.), gastroenterologiji (kod akutnog kolitisa, kroničnog kolitisa, čira na želucu i dvanaesniku itd.), ginekologiji i stomatologiji (Marcucci, 1995; Križanić, 1997). Viole glasovite taljanske obitelji Amati (i njihovih učenika A.Guarnerija i A.Stradivarija) svoj prekrasan, mekani zvuk duguju pčelama. Naime, lak kojim su premazivane njihove viole izrađen je na bazi propolisa (Strižak, 1996).

#### **1.1.4. Pelud**

Pčelama su osim ugljikohidrata čiji je izvor nektar potrebne i druge tvari - proteini, lipidi, minerali i vitamini. Sve to se dobiva iz peluda što ga skupljaju sa rascvjetanih biljaka. Pelud predstavlja muške spolne stanice biljaka. Svako peludno zrnce obavijeno je sa stijenkom koja se sastoji od dva glavna sloja: unutrašnjeg (intina) i vanjskog (eksina). Unutrašnji sloj je prilično propusan i nije naručito otporan, a sastoji od pektina i nešto celuloze. Vanjski sloj se sastoji od sporopolenina, nepropusne i kemijski vrlo otporne tvari. Eksin štiti peludno zrnce i njegov sadržaj od opasnosti iz okoline prilikom njegova prijenosa od peludnica do ženskih dijelova cvijeta.

Oprašivanje (polinacija) je prijenos peludnih zrnca iz peludnica do njuške tučka. Do oprašivanja može doći između cvjetova različitih jedinki neke vrste (stranooprašivanje) odnosno unutar jednog cvijeta ili između raznih cvjetova iste jedinke (samooprašivanje). Stranooprašivanje je znatno češći način oprašivanja u prirodi pošto daje veću genetsku raznolikost. Biljke se oprašuju uz pomoć vjetra (anemofilija), životinja (zoofilija) i vode (hidrofilija). Anemofilne biljke proizvode velike količine vrlo sitnih, suhih, lakih i prhkih peludnih zrnaca koje vjetar raznosi na udaljenosti od više stotina kilometara i podiže na visinu od 1000 do 1500 metara. Imaju sitne i neugledne cvjetove zelene ili svjetlozelene boje.

Izgledi za uspješnu anemofiliju sačuvani su time što se anemofilne vrste pojavljuju na slobodnim i vjetru izloženim staništima, njihovim dovoljnim uzrastom i pojavom u gustim populacijama (s malim udaljenostima između jedinki). U biljke koje se oprašuju vjetrom spadaju trave i razno drveće poput lješnjaka, breze, hrasta, johe, topole itd. (Strasburger, 1997; Taranov, 2006). Između biljaka i njihovih životinjskih posjetioca (oprašivača) razvio se odnos od kojeg oboje imaju korist - životinjski posjetioc koristi biljku kao izvor hrane, a biljka koristi životinjskog posjetioca da osigura oprašivanje. Oprašivači su najčešće kukci (pčele, leptiri, ose i dr.) te kralježnjaci poput ptica i šišmiša (Mader, 1996). Biljke koje se oprašuju uz pomoć kukaca (entomofilija) proizvode pelud u puno manjim količinama od anemofilnih biljaka, jer se kod njih pelud kukcima prenosi puno preciznije a time i učinkovitije. One sadrže krupnija peludna zrnca raznih boja i oblika, što na svojoj površini imaju mikroskopski vidljive brazde, pore, bodlje, iglice, češljice i druge izraštaje. Ovi izraštaji omogućuju da se peludna zrnca pričvrste za dlačice kukaca, a njihova ljepljiva površina kukcima olakšava sakupljanje peludi. Pelud entomofilnih biljnih vrsta bogatija je bjelančevinama i mastima u odnosu na pelud anemofilnih biljnih vrsta.

Pčele sa cvjetova sakupljaju nektar i pelud kojima prehranjuju sebe i svoje ličinke u razvoju, a usput oprašuju biljke. Pri posjetu cvjetova, površina tijela pčela što je obrasla gustim dlačicama biva prekrivena peludom. Za vrijeme letenja sa jednog na drugi cvijet, pčela prenosi pelud pomoću prednjeg i srednjeg para nogu u košarice stražnjeg para nogu. Kad dođe natrag u košnicu, pčela skida grudicu peludi u praznu voštanu stanicu pomoću mamuza na srednjem paru nogu, a onda je druge pčele rasprostiru i sabijaju. Pčele nikada ne pune stanice sa peludi do vrha (u prosjeku pune do 57 % volumena stanice), jer moraju imati siguran oslonac u stanici za rasprostiranje i nabijanje grudica. Gornji sloj peludi pčele natapaju medom i tako pripremaju za dugotrajno čuvanje. U stanici, deponirana grudica peludi mijenja svoj kemijski sastav i hranidbena svojstva (Taranov, 2006). Pelud sadrži ugljikohidrate, masti, bjelančevine, slobodne aminokiseline, minerale (među kojima su najzastupljeniji kalij, fosfor, kalcij i magnezij), različite pigmente, enzime (invertazu, amilazu, katalazu, fosfatazu i dr.) i vitamine (vitamine B kompleksa, provitamin A, vitamine D, E, K, C i rutin) i hormone.

Dokaza o učinkovitosti peludi ima sve više. Pelud povećava plodnost, ima antibakterijsko djelovanje na gram-negativne bakterije u crijevima (npr. *E.coli*, *Salmonella* i dr.), povećava broj bijelih i crvenih krvnih zrnaca, pozitivno utječe na rast i razvoj, poboljšava cirkulaciju krvi, ima biostimulativna i regenerativna svojstva (jetra), regulira probavu i apetit, djeluje na metabolizam lipida (smanjuje razinu triglicerida), usporava starenje, povećava



otpornost na bolesti, jača koronarne arterije i mišićno tkivo srca, poboljšava vid i ima pozitivan učinak kod iscrpljenosti (Križanić, 1997; Fanuko, 2009). Također, primjenjuje se u kozmetici u sklopu preparata koji sprečavaju opadanje kose i maska za njegu kože lica (Kuštrak, 2005).

### **1.1.5. Pčelinji vosak**

Pčelinji vosak je kompleksna mješavina ugljikovodika, alkohola, slobodnih masnih kiselina, estera i drugih materijala. Više od 300 spojeva je identificirano u pčelinjem vosku (Tulloch, 1980; Garnier, 2002). Na lučenje voska i izgradnju saća u pčelinjoj zajednici utječu sljedeći faktori: unos meda (što je unos meda veći, više saća je potrebno za prihvatanje), polaganje jaja (što se više jaja položi, više stanica saća je potrebno), prisustvo matice (samo pčelinje zajednice sa maticom izgrađuju saće) i temperatura (temperatura iznad 15 °C pospješuju izgradnju saća).

Vosak je neophodan za izgradnju saća. Proizvode ga pčele, iz četiri para specijaliziranih žlijezda zvanih voštane žlijezde, što se nalaze na ventralnoj strani abdomena. Voštane žlijezde se u potpunosti razvijaju kod radilica starosti između 12 i 18 dana. Starenjem pčela smanjuje se aktivnost voštanih žlijezda, ali u izvanrednim situacijama ona može biti ponovno pokrenuta. Tekući vosak ispušta se iz voštanih žlijezda i hladeći se odmah formira fine bijele ljuskice koje pčele prihvaćaju zadnjim nogicama i prenose do usta gdje ih onda gnječe u grudice. Te grudice tiskaju jednu do druge dok ne nastanu stanice i saće. Jedna voštana ljuskica je teška oko 1 mg, tako da je potrebno oko milijun ljuskica za 1 kg voska. Tijekom razvojne faze pčelinje zajednice proizvedu se najveće količine voska; u umjerenim klimatskim uvjetima riječ je o periodu od travnja do lipnja. Glavna sirovina za stvaranje voska su ugljikohidrati koji se nalaze u medu (fruktoza, glukoza, saharoza). Pčelinji vosak ima karakterističan miris koji potječe od pčela, meda, propolisa i polena. Boja svježeg izlučenog voska je bijela, a s vremenom (i korištenjem) se promijeni u žutu, tamnožutu i smeđkastu. Žuta boja potječe od propolisa i polena. Tamna boja starog saća potječe od izmeta larvi, košuljica lutki i propolisa. Točka taljenja pčelinjeg voska je od 61 - 65 °C (Bogdanov, 2008).

Glavna upotreba pčelinjeg voska je za izradu osnova saća tj. voštanog lista koji pčelama služi kao šablona za novo saće. Osim toga koristi se u kozmetici (u mastima, kremama, losionima itd.), farmaceutskoj industriji, drvenoj industriji (impregnacija drvenih površina i parketa), za bojenje hrane i tableta, u žvakačim gumama, za izradu svijeća, te u kiparstvu i slikarstvu (Križanić, 1997; Bogdanov, 2008).

## 1.2. PČELINJI OTROV

Rijetki kukci mogu ubosti žalcem i ubrizgati otrov neprijatelju. Oni kukci koji to mogu pripadaju redu *Hymenoptera*. U taj red spadaju mravi, ose, bumbari, pčele i stršljeni. U porodicu *Apidae* ubrajamo pčele i bumbare, u porodicu *Vespidae* ose i stršljene, a u porodicu *Formicidae* mrave (Plavšić i Žuntar, 2006).

Pčelinji otrov sintetiziraju pčele radilice i matica u dvije otrovne žlijezde, skladište ga u otrovnom mjehuru i ubrizgavaju ga kroz žalčani aparat za vrijeme ubadanja. Radilice u žalčanom aparatu imaju oko 100 - 150 µg otrova, a matice oko 700 µg otrova (Schmidt i Buchmann, 2005). Otrovnne žlijezde počinju funkcionirati nakon izlaska radilice iz stanice. Kod dva dana starih pčela u otrovnim žlijezdama možemo naći 0.04 mg otrova, a kod 15 dana starih pčela oko 0.3 mg. Količina otrova ovisi o količini i kvaliteti pčelinje paše, a time i o godišnjem dobu. Kod matice proizvodnja otrova se ne povećava postepeno, već ona nakon izlaska iz matičnjaka postigne maksimalnu proizvodnju otrova. Razlog toj različitosti u odnosu na radilice je taj što se ona koristi žalcem u borbi sa suparnicama.

Nakon uboda pčela nije u stanju izvući svoj žalac iz kože sisavca, te ga izgubi zajedno s cijelim žalčanim aparatom i otrovnim mjehurom, mišićima i središnjim živcima. Navedeni živci i mišići podržavaju ubrizgavanje otrova iz otrovnog mjehura dok se on ne isprazni.

Osnovna biološka namjena pčelinjeg otrova je obrana pčelinje zajednice od neprijatelja. Pčelinji otrov izaziva bol, otok i crvenilo na mjestu uboda. On također izaziva alarmnu reakciju kako bi mobilizirao aktivnost pčela radilica i kako bi one došle u pomoć pri iskrslj opasnosti. To se postiže isparavanjem lako hlapljivih tvari iz otrova koje brzo dolaze do mirisnih stanica pčela i izazivaju agresiju pčelinje zajednice.

### 1.2.1. Skupljanje

Proširivanje ispitivanja pčelinjeg otrova i njegovo korištenje kao sirovine u farmaceutskoj industriji u direktnoj su vezi sa učinkovitošću metoda njegova dobivanja. Poteškoće da se dobije u odgovarajućoj čistoći i dostatnim količinama dovele su do kašnjenja u proučavanju i korištenju pčelinjeg otrova.

U prošlosti se otrov dobivao neefikasnim metodama i uz veliki utrošak rada: izvlačenjem žalčanog aparata iz omamljenih pčela i ekstrahiranjem otrova; ubodom životinjske membrane razapete preko čaše i skupljanjem otrova u otopini kojom je čaša

napunjena; izbacivanjem otrova na zidove bubnja napunjenog pčelama dok se bubanj okreće itd. Od 1960-tih godina počela se koristiti nova metoda koja se nastavila poboljšavati te je danas standardna metoda - metoda dobivanja pčelinjeg otrova podraživanjem pčela električnom strujom. Uređaj za skupljanje pčelinjeg otrova se u pravilu postavlja na ulazu u košnicu. Pod utjecajem strujnog udara, pčele luče otrov u vidu sitnih kapljica na staklenu pločicu i pritom ostaju neozlijeđene. Nakon sušenja, otrov se žiletom ili nožem sastruže sa staklene pločice (Škenderov i Ivanov, 1986).

### **1.2.2. Fizikalne osobine**

Pčelinji otrov je gusta bezbojna opalescirajuća tekućina specifična mirisa, gorkog okusa i kisele reakcije (pH 4,5 - 5,5). Topljiv je u vodi i kiselinama, ali ne i u alkoholu. Količina suhe tvari varira između 30 i 45 %. Osim vode, u hlapljivoj frakciji dokazani su n-amilov, izoamilov i etil acetat. Pretpostavlja se da ovi hlapljivi esteri izazivaju alarmnu reakciju u pčelinjoj zajednici.

Na tržištu postoji nekoliko vrsta pčelinjeg otrova: čist i osušen, osušen i liofilizirani otrov. Čist i osušen otrov je najčišća vrsta otrova. Bijele je boje i nije onečišćen stranim tvarima, a bezbojan je kad se koristi kao otopina. Osušeni otrov može biti kontaminiran ostalim pčelinjim proizvodima ili prašinom. Njegova boja varira od žute do smeđežute, ovisno o oksidaciji sastojaka. Liofilizirani otrov je pročišćen otrov.

Ako se pčelinji otrov zaštititi od svjetla i vlage, njegova toksičnost može se sačuvati pet i više godina. Njegova ljekovitost se smanjuje dugotrajnim čuvanjem. Pčelinji otrov je jako otporan na temperaturu i ne gubi toksičnost smrzavanjem (Laktić i Šekulja, 2008).

### **1.2.3. Kemijski sastav**

Kemijski sastav pčelinjeg otrova još nije u potpunosti poznat. Glavni dio suhe tvari otrova čine enzimi (fosfolipaza A<sub>2</sub>, hijaluronidaza, kiselna fosfomonoesteraza, lizofosfolipaza, α-glukozidaza) i peptidi (melitin, apamin, MCD peptid, sekapin, prokamin, adolapin, inhibitori proteaza, terciapin). Od fiziološki aktivnih amina utvrđeni su histamin, dopamin i noradrenalin. Razina histamina povećava se sa starošću, a maksimum je zabilježen kod pčela starih otprilike 40 dana. Uzrokuje dilataciju i povećanu propusnost kapilara te povećava bol. Kao i histamin, dopamin i noradrenalin pojavljuju se u drugom dijelu života radilice u najvišoj koncentraciji. Djeluju kao neurotransmiteri. Pčelinji otrov također sadrži

aminokiseline i lipide. Većina autora navodi prisutnost šećera u pčelinjem otrovu, ali čisti pčelinji otrov dobiven pomoću kolektora snabdjevenog najlonskom tkaninom, koja čuva otrov od zagađenja prahom, nektarom i djelovima pčelinjeg tijela, ne sadrži šećer. U pčelinjem otrovu pronađeno je više od 20 hlapljivih tvari. Tablica 1. prikazuje sastav pčelinjeg otrova dobiven iz podataka dva odvojena istraživanja (Shipolini, 1984; Dotimas i Hider, 1987).

**Tablica 1.** Sastav pčelinjeg otrova.

VRSTA MOLEKULE	SASTOJAK	POSTOTAK U SUHOM OTROVU <sup>a</sup>	POSTOTAK U SUHOM OTROVU <sup>b</sup>
<b>Enzimi</b>	Fosfolipaza A <sub>2</sub>	10 -12	10 -12
	Hijaluronidaza	1,5 - 2,0	1 - 3
	Kisela fosfomonoesteraza	1,0	
	Lizofosfolipaza	1,0	
	$\alpha$ -glukozidaza	0,6	
<b>Ostali proteini i peptidi</b>	Melitin	40 - 50	50
	Apamin	3,0	1-3
	MCD peptid	2,0	1 - 2
	Sekapin	0,5	0,5 - 2,0
	Prokamin	1,4	1 - 2
	Adolapin	1,0	
	Inhibitori proteaza	0,8	
	Terciapin	0,1	0,1
	Mali peptidi (s manje od 5 aminokiselina)		13 - 15
<b>Fiziološki i 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>	$\gamma$ -aminomaslačna kiselina	0,4	0,5
	$\alpha$ -aminokiseline		1
<b>Šećeri</b>	Glukoza i fruktoza		2
<b>Fosfolipidi</b>			5
<b>Hlapljive tvari</b>			4 - 8

<sup>a</sup> Podaci preuzeti od Shipolinija (1984)

<sup>b</sup> Podaci preuzeti od Dotimasa i Hidera (1987)

### 1.2.3.1. Enzimi i peptidi

#### Hijaluronidaza

Hijaluronidaze su enzimi što hidroliziraju hijaluronsku kiselinu, nesulfatirani glikozaminoglikan sastavljen od ponavljajućih disaharidnih jedinica D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukoamina.

Hijaluronska kiselina je važan sastojak izvanstaničnog matriksa vertebrata, te se nalazi u gotovo svim tkivima i tjelesnim tekućinama (pogotovo u sinovijalnoj tekućini, koži i staklastom dijelu oka). Također se nalazi u kapsulama što okružuju određene, obično patogene bakterije (Voet i Voet, 1995; Lodish, 2004). Uključena je u mnoge biološke procese poput oplodnje, embrionalnog razvoja, stanične migracije i diferencijacije, zacjeljivanja rana i upala te rasta i metastaze tumorskih stanica.

Hijaluronidaze se nalaze u mikroorganizmima, pijavicama, testisima sisavca, lizosomima sisavca, otrovu zmija, pčela, škorpiona i osa (Kreil, 1995). Prisutnost hijaluronidaze u pčelinjem otrovu prvi put je zamijećena od Neumanna i Habermanna te je opisana kao faktor prodiranja (engl. *spreading factor*). Hijaluronidaza pčelinjeg otrova razgrađuje hijaluronsku kiselinu te povećava propusnost tkiva i stanica za ulazak ostalih sastojaka otrova (Neumann i Habermann, 1954; Habermann, 1972).

Nativna hijaluronidaza izolirana iz pčelinjeg otrova je jednolančani sekretirani protein sastavljen od 350 aminokiselina sa molekularnom masom 43 000. Zreli enzim sadrži četiri potencijalna mjesta glikozilacije (ugljikovodični sadržaj 7%) i dva disulfidna mosta (Marković-Housley i Schirmer, 2002) (Slika 2.). Optimalnu aktivnost pokazuje u slabo kiseloj sredini pH 4 -5 (Habermann, 1957). Krvna plazma i heparin inhibiraju njegovu aktivnost (Mio i sur. 2000; Strong i Wadsworth, 2000). Od dosad poznatih enzima iz te grupe, on je najaktivniji. Razina tog enzima u otrovu matice niža je od one u otrovu pčela radilica. Smatra se da je to zbog toga što pčele radilice, za razliku od matice, češće dolaze u kontakt sa sisavcima. Hijaluronidaza djeluje kao alergen u stvaranju preosjetljivosti na pčelinji otrov (Laktić i Šekulja, 2008).



**Slika 2.** Prikaz kristalne strukture enzima hijaluronidaze upotrebom modela vrpce. Pogled na molekulu iz dvije različite perspektive: (a) sa strane (b) nakon rotacije za 90° oko horizontalne osi. (preuzeto od Marković-Housley i sur., 2000)

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

Enzimi iz superobitelji fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) mogu se razvrstati u 15 grupa i mnogo podgrupa te pet glavnih tipova/kategorija: sekrecijske PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), citosolne PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), o kalciju neovisne PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>), PAF acetilhidrolaze (PAF - engl. *platelet derived factor* ili čimbenik aktivacije trombocita) i lizosomalne PLA<sub>2</sub>. Nalaze se u tkivima, sekretima i tekućinama sisavca, otrovima (npr. otrov pčela, škorpiona, zmija itd.), biljkama i mikroorganizmima. Fosfolipaze A<sub>2</sub> specifično kataliziraju hidrolizu sn-2 esterske veze fosfolipida stvarajući tako slobodnu masnu kiselinu i lizofosfolipid. Otpuštene masne kiseline (npr. arahidonska kiselina) mogu biti važan izvor energije, te također mogu služiti kao drugi glasnici i kao preteče za sintezu upalnih medijatora eikozanoida (Six i Dennis, 2000).

Fosfolipaza A<sub>2</sub> je jedan od glavnih sastojaka otrova medonosne pčele, te spada u sekrecijske PLA<sub>2</sub>. Nalazi se u znatno nižoj količini u otrovu matice nego u otrovu pčela radilica. To je glikoprotein molekularne mase od približno 15800 koji sadrži 134

aminokiselina s pet disulfidnih mostova i jednim glikozilacijskim mjestom na Asn 13 (Kuchler i sur., 1989; Strong i Wadsworth, 2000). Ustanovljeno je da se oligosaharid vezan na Asn 13 sastoji od manoze, N-acetilglukozamina i fukoze koja je  $\alpha$  1-6 i /ili  $\alpha$  1-3 vezana na unutrašnji N-acetilglukozamin (Staudacher i sur., 1991; Kubelka i sur., 1993). Njegova aktivnost i toksičnost se povećavaju u prisutnosti melitina. Djeluje kao alergen i surađuje s drugim sastojcima pčelinjeg otrova te brani koloniju od predatora i uljeza. Fosfolipaza A<sub>2</sub> iz pčelinjeg otrova razgrađuje krvne i tkivne strukture, uzrokuje kontrakciju glatkih mišića, sniženje krvnog tlaka, povećanu kapilarnu propusnost, te smanjuje zgrušavanje krvi (Habermann, 1972). Također pokazuje anti-HIV aktivnost, neurotoksičnost i miotoksičnost, te potiče rast neurita (Nicolas i sur., 1997; Ownby i sur., 1997; Fenard i sur., 1999; 2001; Nakashima i sur., 2003).

### **Lizofosfolipaza (fosfolipaza B)**

Lizofosfolipidi su izvrsni surfaktanti koji liziraju biološke membrane i moraju biti katabolizirani da bi se spriječilo daljnje oštećenje stanice. Lipofosfolipaze (fosfolipaza B) su enzimi koji to postižu hidrolizom lizofosfolipida (Barbour i Dennis, 1995; Fuchs, 1999). Imaju molekularnu masu od  $22\ 000 \pm 2\ 000$  (Banks i Shipolini, 1986).

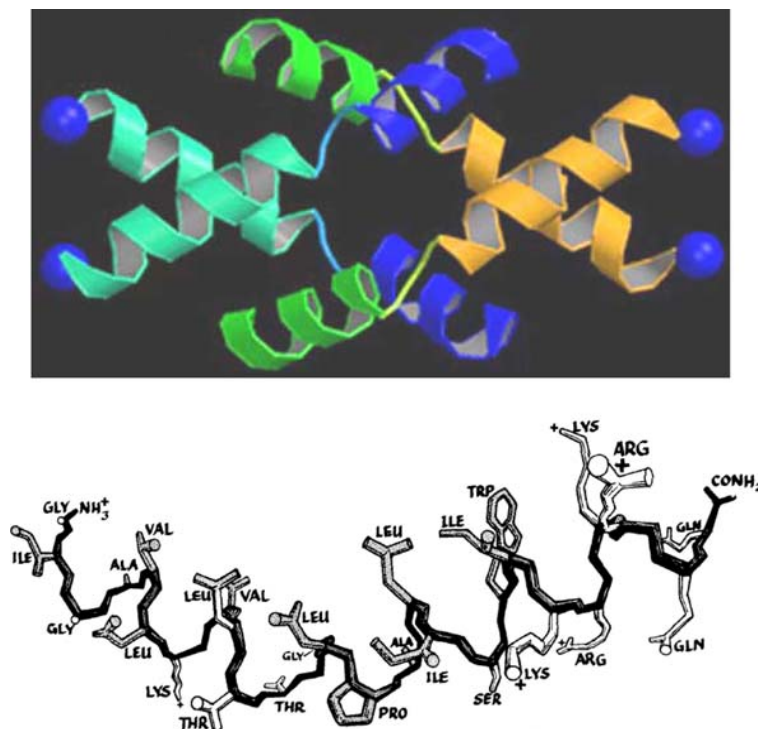
### **Kisela fosfomonoesteraza**

Kisela fosfomonoesteraza je glikoprotein koji se nalazi u pčelinjem otrovu u dva oblika različite molekularne težine - kao monomer (45 000) i kao homodimer (96 000). Snažan je antigen i vjeruje se da sudjeluje u stvaranju preosjetljivosti na pčelinji otrov (Barboni i sur., 1987).

### **Melitin**

Melitin je glavni sastojak otrova medonosne pčele, te čini 50 % njegove suhe težine. On je mali, bazični peptid sastavljen od 26 aminokiselina. Njegov aminokiselinski sastav su odredili Habermann i Jentsch 1967. godine, a glasi: H<sub>2</sub>N-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-CONH<sub>2</sub>. Na N-terminalnom kraju su pretežno hidrofobne aminokiseline (položaji 1 - 20), a na C-terminalnom kraju hidrofilne aminokiseline (položaji 21 - 26). Ovakav raspored aminokiselina melitinu daje amfipatska svojstva. Iako melitin sadrži visok udio nepolarnih aminokiselina, on je jako topljiv u vodi (>250 mg/ml) i umjereno topljiv u metanolu (do 20 mg/ml) (Habermann, 1971; Raghuraman i Chattopadhyay, 2007).

Melitin se sintetizira iz prekurzorske molekule (prepromelitin) od 70 aminokiselina. Signalna sekvenca prepromelitina se sastoji od 21 aminokiseline. Uklanjanje N-terminalne signalne sekvence daje promelitin koji se sekretira u otrovni mjehur prije nego što bude do kraja prerađen, tako štiteći pčelu od litičkog djelovanja zrelog peptida. Zadnji Gly ostatak (Gly 70) na C-terminalnom kraju cijepa se ostavljajući terminalni glutamin amid. Enzim dipeptidilpeptidaza IV cijepa pro regiju (22 aminokiseline) promelitina u više koraka, uklanjajući po dvije aminokiseline od N-terminusa, te daje zreli peptid tj. melitin (Suchanek i sur., 1978; Kreil i sur., 1980; Strong i Wadsworth, 2000). Oko 10 % melitina u pčelinjem otrovu je formilirano na N-terminalnom Gly ostatku. Pčelinji otrov također sadrži melitin F, djelomično degradiran fragment peptida melitina kojem nedostaju prvih sedam N-terminalnih ostataka. On čini manje od 1% proteina u pčelinjem otrovu (Gauldie i sur., 1978; Strong i Wadsworth, 2000). U vodenoj otopini melitin može zauzeti različite konformacije i agregacijska stanja ovisno o koncentraciji, ionskoj jakosti i pH. Ovisno o tim faktorima melitin može postojati u dva oblika, kao monomer i kao tetramer (Slika 3.). U vodenim otopinama visoke ionske jakosti, visoke koncentracije peptida ili visokog pH, melitin prelazi iz monomera u tetramer (Wilcox i Eisenberg, 1992).



**Slika 3.** Krystalna struktura melitinskog tetramera u otopini pri rezoluciji od 2 Å (gornja slika). Konformacija jednog melitinskog lanca iz tetramera prikazana je na slici dolje. (preuzeto od Raghuraman i Chattopadhyay, 2007)



Kad se ubrizga u kožu izaziva bol, crvenilo i otok na mjestu injekcije. On se veže sa bjelančevinama, lipidima i mukopolisaharidima kože i vezivnog tkiva. Utvrđeno je da serumski albumin štiti stanice koštane srži od citotoksičnog djelovanja melitina (Shipman i Cole, 1972). Slab je antigen. Ima protuupalno djelovanje. Stimulira kortikotropne stanice adenohipofize na lučenje adenokortikotropina (ACTH), hormona koji djeluje na koru nadbubrežne žlijezde i potiče lučenje kortizola (Vick i sur., 1972; Knepel i Gerhards, 1987). Njegova sposobnost da uzrokuje lizu prokariotskih i eukariotskih stanica dobro je dokumentirana (Hristova i sur., 2001). Pokazuje snažnije protubakterijsko djelovanje na gram pozitivne bakterije nego na gram negativne bakterije (Dorman i Markey, 1971). Također je ustanovljeno radioprotektivno (Shipman i Cole, 1967) i protutumorsko (Liu i sur., 2008) djelovanje melitina.

### **Adolapin**

Adolapin je bazični polipeptid izoliran iz pčelinjeg otrova molekularne mase od približno 11 500. Ima protuupalno, antipiretičko i analgetičko djelovanje. Inhibira biosintezu prostaglandina tako da inhibira aktivnost ciklooksigenaze. Građen je od 103 aminokiselina. Prvi aminokiselinski ostatak je glicin, a aminokiseline cistein, metionin i triptofan ne nalaze se u polipeptidu (Shkenderov i Koburova, 1982; Koburova i sur., 1985).

### **Apamin**

Apamin je neurotoksin što blokira kalijeve kanale ovisne o kalciju. Ima molekularnu masu od približno 2 000. Redoslijed aminokiselina otkrile su istovremeno dvije skupine znanstvenika, te glasi: H-Cys-Asn-Cys-Lys-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Cys-Ala-Arg-Arg-Cys-Gln-Gln-His-NH<sub>2</sub> (Haux i sur., 1967; Shipolini i sur., 1967). On je bazični peptid koji sadrži jedan lizin, jedan histidin i dva arginina. Istraživanja su pokazala da su za njegovu aktivnost važna dva arginina na položajima 13 i 14. Struktura apamina pokazuje izuzetno visok stupanj stabilnosti preko širokog raspona pH, što je posljedica prisutnosti dva disulfidna mosta i sedam intralančanih vodikovih veza (Habermann, 1972; Palma, 2006). Sintetizira se iz prekurzorskog peptida (preproapamin) od 46 aminokiselina. Preproapamin se sastoji od signalne sekvence (19 aminokiselina), proregije (8 aminokiselina), te sekvence za apamin (18 aminokiselina), a završava sa glicinskim ostatkom potrebnim za formiranje C-terminalnog amida (Gmachl i Kreil, 1995).

Od svih komponenta pčelinjeg otrova apamin je najtoksičniji za sisavce (Habermann i Reiz, 1965). Pokazuje specifičnu aktivnost na središnji živčani sustav (Habermann i Cheng-Raude, 1975). U središnjem živčanom sustavu kalijevi kanali ovisni o kalciju koji vežu apamin uključeni su u brojne važne fiziološke procese. Subletalne doze apamina uzrokuju: 1. ometanje cirkadijskog ciklusa i modifikaciju normalnog obrasca spavanja i 2. poboljšano učenje i pamćenje naučenih zadataka u miševa i štakora vezano uz povećanje razina *c-fos* i *c-jun* mRNA u hipokampusu. Apaminski receptori također postoje u perifernim tkivima. Normalni skeletalni mišić odrasle osobe ne sadrži apaminske receptore, dok se na denerviranim skeletalnim mišićima ili na mišićima pacijenta koji boluju od miotonične distrofije (MD) nalaze mjesta na koja se veže apamin. Hiperekscitabilnost vezana uz ta dva stanja može se ublažiti direktnom aplikacijom apamina (Borsotto, 2001). Apamin također inhibira aktivnost komplementa (Singh, 2004). Kao i melitin, djeluje na hipofizno-nadbubrežni sistem, te povećava proizvodnju hormona nadbubrežne žlijezde sa snažnim protuupalnim djelovanjem - kortizola (Vick i Shipman, 1972).

### **MCD peptid**

Primarna struktura MCD (engl. *mast cell degranulating*) peptida prvi put je određena od Hauxa (1969), a potvrđena od Vernona i suradnika (1969) koji su također ustanovili položaj dva disulfidna mosta u peptidu. Redoslijed aminokiselina glasi: Ile-Lys-Cys-Asn-Cys-Lys-Arg-His-Val-Ile-Lys-Pro-His-Ile-Cys-Arg-Lys-Ile-Cys-Gly-Lys-Asn-NH<sub>2</sub>. To je bazični peptid molekularne mase od približno 2600 koji sadrži 22 aminokiseline. Sedam od tih aminokiselina su ili arginin ili lizin. MCD peptid se također naziva i peptid 401 (Strong i Wadsworth, 2000). Sintetizira se iz prekurzorskog peptida od 50 aminokiselina. Prekurzorski peptid se sastoji od signalne sekvence (19 aminokiselina), proregije (8 aminokiselina), te sekvence za MCD, a završava sa glicinskim ostatkom potrebnim za formiranje C-terminalnog amida (Gmachl i Kreil, 1995). On uzrokuje degranulaciju mastocita i oslobađanje histamina pri nižim koncentracijama, a ima protuupalno djelovanje pri višim koncentracijama. Poput apamina, blokira kalijeve kanale ovisne o kalciju (Sewald i Jakubke, 2009).

### **Terciapin**

Terciapin je izoliran iz pčelinjeg otrova i prvi put opisan od Gauldie i sur. (1978). To je peptid od 21 aminokiseline s dva disulfidna mosta. Njegova sekundarna struktura pokazuje dosta sličnosti sa onom od apamina i MCD peptida. Sadrži šest pozitivno nabijena aminokiselinska ostatka, a četiri od njih nalaze se na C-terminalnom dijelu peptidnog lanca.

Iako se vrlo malo zna o njegovim biološkim, farmakološkim i toksikološkim svojstvima, ubraja se u neurotoksine zbog dokaza koji sugeriraju da ima presinaptičko djelovanje (Kitamura i sur., 2000; Strong i Wadsworth, 2000).

### **Sekapin**

Sekapin je peptid molekularne mase od približno 2900 koji sadrži jedan disulfidni most i pokazuje malu strukturalnu sličnost sa ostalim bazičnim peptidima iz pčelinjeg otrova. C-terminalna karboksilna skupina nije amidirana (Gauldie i sur., 1978). Sintetizira se iz prekursorškog peptida (preprosekapin) od 77 aminokiselina. Preprosekapin se sastoji od signalne sekvence (32 aminokiseline), proregije (20 aminokiselina), te sekvence za sekapin (25 aminokiselina). Za sekapin se pretpostavlja da ima djelovanje na središnji živčani sustav, pošto u miševa kod visokih doza uzrokuje sedaciju i izraženu hipotermiju. Njegova razina u otrovu matice značajno je viša nego u otrovu pčela radilica (Strong i Wadsworth, 2000).

### **Prokamini**

Prokamini su homologni peptidi sa histaminom na C-terminalnom kraju. Izolirani su iz otrova kanadske pčele od O'Connora i Nelsona (1968). Njihovo biološko djelovanje vezano je s radioprotektivnim svojstvima pčelinjeg otrova (Peck i sur., 1978).

## **1.2.4. Djelovanje**

### **1.2.4.1. Toksično djelovanje**

Rađeni su pokusi na životinjama i utvrđeno je da intravensko ubrizgavanje doza od 5 mg/kg kod psa i od 2,5 mg/kg kod majmuna izaziva smrt zbog narušavanja rada kardiovaskularnog sistema. Toksične doze su mnogo više ako se otrov ubrizgava potkožno. Do smrti kod psa može doći ako mu se potkožno ubrizga 200 mg/kg otrova, a kod majmuna ako mu se potkožno ubrizga 50 mg/kg otrova. Toksične doze kod životinja izazivaju hemolizu crvenih krvnih stanica, smanjuju sposobnost zgrušavanja krvi, povećavaju propusnost krvnih žila, što se manifestira otokom i krvarenjem u unutrašnjim organima (Škenderov i Ivanov, 1986).

Srednja letalna ili smrtna doza ( $LD_{50}$ ) za odraslog čovjeka iznosi 2,8 mg otrova po kilogramu tjelesne težine tj. osoba teška 60 kilograma ima 50 % vjerovatnost za

preživljavanje unosa od 168 mg otrova u organizam. Do smrti odrasle osobe može doći ako u organizam dobije količinu otrova koja odgovara 600 uboda pčela. Za dijete teško 10 kg, otprilike 90 uboda može biti smrtonosno (Laktić i Šekulja, 2008).

Glavna toksična sastavnica pčelinjeg otrova je peptid koji se naziva melitin. Smanjenjem površinske napetosti, melitin razara krvne i druge stanice te stanične organele. Brzo se veže na crvene krvne stanice i dovodi do otpuštanja hemoglobina u ekstracelularni medij. Pošto postoji otprilike  $1.8 \cdot 10^7$  vezivnih mjesta za melitin po eritrocitu, primarna mjesta interakcije su membranski lipidi, a ne specifični receptori. Hemoliza se događa koloidno osmotskim mehanizmom. Kao posljedica razaranja crvenih krvnih stanica smanjuje se opskrba tkiva kisikom. Melitin također oštećuje mastocitne i bazofilne stanice čime se oslobađaju biogeni amini, histamin i serotonin koji uzrokuju upalnu reakciju. Melitin inaktivira tromboplastin te tako sprječava zgrušavanje krvi (Habermann, 1972; Raghuraman i Chattopadhyay, 2007). Toksična doza melitina za laboratorijske životinje ( $LD_{50}$ ) primijenjena intravenozno je 2,5-5 mg/kg (Habermann, 1971).

Melitin djeluje sinergistički sa fosfolipazom  $A_2$ , te povećava njezinu toksičnost. On stimulira  $PLA_2$  aktivnost povećavajući dostupnost substrata tj. membranskih fosfolipida (Cajal i Jain, 1997). Fosfolipaza  $A_2$  razgrađuje krvne i tkivne strukture, smanjuje zgrušavanje krvi, snizuje krvni tlak i povećava kapilarnu propusnost (Habermann, 1972). Veže se na receptore N-tipa koji su posebice zastupljeni u mozgu, te djeluje neurotoksično (Nicolas i sur., 1997). Osim toga, ima i miotoksično djelovanje (Lomonte i sur., 1999). Uočeno je da tek kod visokih doza fosfolipaze  $A_2$  (6-7 mg/kg kod miševa) dolazi do smrti pokusnih životinja uslijed hemolize i mikroemboličnih krvnih promjena (Habermann i Krusche, 1962).

Apamin je neurotoksin izoliran iz pčelinjeg otrova koji inhibira kalijeve kanale ovisne o kalciju u središnjem živčanom sustavu i perifernim tkivima. Vezivna mjesta za apamin identificirana su na različitim tkivima i stanicama korištenjem radioaktivno obilježenog ( $^{125}I$ ) derivata apamina. Utvrđena je njihova prisutnost na sinaptičkim membranama, neuronima, PC12 stanicama, stanicama neuroblastoma, hepatocitima, glatkim mišićima, skeletalnim mišićima, srcu, jetri i dr. (Strong i Wadsworth, 2000). Toksična doza za laboratorijske životinje ( $LD_{50}$ ) primijenjena intravenozno je 4 mg/kg. Toksičnost ovisi o putu unosa apamina. Naime, apamin mikroinjeciran u leđnu moždinu ili ubrizgan intraventricularno je 1000-10000 puta toksičniji nego kad je ubrizgan intravenozno ili subkutano. Kada se ubrizga nesmrtosna doza apamina (1-2 mg/kg) u venu miševa, nakon 15 minuta javljaju se

nekoordinirani pokreti udova koji prelaze u stalne grčeve i zahvaćaju sve mišiće u tijelu (Habermann, 1972; Habermann i Fischer, 1979).

#### 1.2.4.2. Protutumorsko djelovanje

Laboratorijska istraživanja na kulturama animalnih stanica, kao i na životinjama, dokazala su da pčelinji otrov ima protutumorsko djelovanje, što se pripisuje bazičnom polipeptidu melitinu. On specifično selektira protiv stanica u kulturi koje ekspresiraju visoke razine ras onkogeno kroz hiperaktivaciju fosfolipaze A<sub>2</sub>, povećano ulaženje Ca<sup>2+</sup> iona i destrukciju ras transformiranih stanica. Poprimanje otpornosti na melitin popraćeno je smanjenjem razine ekspresije ras onkoproteina, smanjenjem broja kopija ras gena, te pretvorbom transformiranih stanica natrag u normalnu morfologiju na način strogo ovisan o dozi (Sharma, 1992; 1993).

Melitin je snažan inhibitor aktivnosti kalmodulina, te jak inhibitor rasta stanica i klonogenosti (Hait i sur., 1985). Kalmodulin je termostabilan protein uključen u mnoge procese bitne za normalnu staničnu funkciju. Posjeduje četiri vezna mjesta za kalcij. Ioni kalcija se vežu za kalmodulin, a kompleks kalcija i kalmodulina između ostalog aktivira enzime poput: protein kinaza i fosfataza, Ca<sup>2+</sup> ATPaze, cikličkih nukleotid fosfodiesteraza, proteaza, NO sintaza (NOS) i dr. (Means, 2000). Koncentracija kalmodulina je povećana u transformiranim fibroblastima (Watterson i sur., 1976; Chafouleas i sur., 1981), hepatomima (MacManus i sur., 1981) i leukemijskim stanicama L1210 i L5178Y (Hait i Weiss, 1977). Točan mehanizam inhibicije nije posve razjašnjen. Smatra se da dolazi do formiranja kalcij ovisnog kompleksa između kalmodulina i melitina što onemogućuje vezanje kalmodulina i ciljnih enzima te dovodi do inhibicije njihove enzimske aktivnosti (Comte i sur., 1983; Schulz i sur., 2004).

Postoje dokazi koji sugeriraju da su kalmodulinski inhibitori citotoksični za maligne stanice i *in vitro* (Wei i sur., 1983) i *in vivo* (Ito i Hidaka, 1983; Oršolić i sur., 2003b). Primijećeno je da su leukemijske stanice L1210 dva do četiri puta osjetljivije na citolitički efekt melitina, membranski-aktivnog toksina pčelinjeg otrova, u odnosu na normalne stanice slezene i koštane srži miševa DBA/2. Različiti citolitički učinak melitina na stanice slezene, koštane srži i mišje leukemije Killion i Dunn (1986) su objasnili s različitom topografijom membrane normalnih i tumorskih stanica. Lijekovi koji inhibiraju aktivnost kalmodulina

pokazuju sposobnost inhibicije sinteze DNA u staničnoj liniji glioblastoma (Okumara i sur., 1982), blokiraju kretanja kromosoma tijekom metafaze (Means i sur., 1982), inhibiraju rast jajnih stanica kineskog hrčka (Chafouleas i sur., 1982) te pojačavaju citotoksičnost vinkristina, doksorubicina i bleomicina (Tsuru i sur., 1982; Ganapathi i Grabowski, 1983). Uočeno je da se letalni učinak citostatika bleomicina može pojačati dodatkom neletalne doze pčelinjeg otrova. Naime, pčelinji otrov onemogućava oporavak stanica nakon oštećenja nastalih bleomicinom, sprečavanjem popravka DNA (Oršolić, 2009).

Melitin također inhibira funkciju melanotropnog receptora i adenilat ciklazu u staničnim membranama mišjeg melanoma M2R. Općenito, vezanje melanotropina (MSH) na melanotropni receptor i aktivacija adenilat ciklaze u staničnoj liniji mišjeg melanoma M2R koja slijedi nakon njega, strogo su ovisni o koncentraciji slobodnog vanstaničnog kalcija (Gerst i Salomon, 1987; Gerst i sur., 1987).

Protutumorski i protumetastatski učinak pčelinjeg otrova ovisi o načinu davanja pčelinjeg otrova. Intravensko ubrizgavanje otrova značajno smanjuje broj metastaza u plućima u odnosu na potkožno ubrizgavanje. Apoptoza, nekroza i liza tumorskih stanica mogući su mehanizam kojim pčelinji otrov inhibira rast tumora (Oršolić i sur., 2003b). Tu i suradnici (2008) demonstrirali su da pčelinji otrov inducira apoptozu neovisnu o kaspazama ali ovisnu o kalciju u ljudskim stanicama melanoma A2058, a ne u normalnim kožnim fibroblastima Detroit 551. Istraživanje provedeno od Ipa i suradnika (2008a) pokazalo je da pčelinji otrov inducira zastoj staničnog ciklusa i apoptozu u ljudskim cervikalnim epidermoidnim stanicama karcinoma Ca Ski. Apoptoza se zbiva preko puta posredovanog Fas receptorom, uključuje mitohondrijske putove, a u vezi je sa razinom  $Ca^{2+}$  iona u citoplazmi Ca Ski stanica. Protočnom citometrijom autori su ustanovili da pčelinji otrov potiče proizvodnju reaktivnih spojeva kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*), povećava razinu citoplazmatskih  $Ca^{2+}$  iona i reducira membranski potencijal mitohondrija što rezultira oslobađanjem citokroma c, te potiče aktivaciju kaspaze-3 što onda dovodi do apoptoze. Također, pčelinji otrov povećava razinu Fas, p35, p21 i Bax, a smanjuje razinu Bcl-2. Djelovanjem pčelinjeg otrova povećane su aktivnosti kaspaze-8 i kaspaze-9, što potiče aktivaciju kaspaze-3 i dovodi do DNA fragmentacije. Osim puta apoptoze koji ovisi o kaspazama, autori su zaključili da pčelinji otrov inducira apoptozu preko mitohondrijskog puta. Naime, on potiče ekspresiju proteina AIF (engl. *apoptosis inducing factor*) i endonukleaze G koji se oslobađaju iz mitohondrija i dovode do apoptoze koja se ne zbiva preko aktivacije kaspaza. Sličan mehanizam potvrđen je u ljudskim stanicama raka dojke

MCF7 (Ip i sur., 2008b), ljudskim stanicama leukemije U937 (Moon i sur., 2008) i ljudskim stanicama osteosarkoma MG63 (Chu i sur., 2007). Pčelinji otrov inhibira proliferaciju stanica mišjeg melanoma K1735M2 *in vitro* na način ovisan o koncentraciji i vremenu. Iz eksperimenta *in vivo*, ustanovljeno je da on inhibira rast solidnog tumora (melanoma B16) u C57BL/6 miševima (Liu i sur., 2002). Jang i suradnici (2003) zapazili su da pčelinji otrov djeluje na ljudsku staničnu liniju karcinoma pluća NCI-H1299 tako da: 1) inducira apoptozu i 2) inhibira ekspresiju COX-2 mRNA. Melitin inhibira proliferaciju i dovodi do apoptoze malignih ljudskih staničnih linija glioma *in vitro* (Yang i sur., 2007). Također, smatra se da melitin inhibira rast i angiogenezu ksenografta ljudskih stanica hepatocelularnog karcinoma BEL-7402 u atimičnim miševima (Song i sur., 2007). Wang i suradnici (2009) utvrdili su da melitin može senzitivirati ljudske stanice hepatocelularnog karcinoma (HCC) na TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) induciranu apoptozu aktiviranjem CAMKII-TAK1-JNK/p38 puta i inhibiranjem IKK-NFκB puta. Kombinacija melitina i TRAIL predstavlja obećavajući terapijski pristup kod tretmana TRAIL-rezistentnog raka u ljudi.

#### **1.2.4.3. Protuupalno djelovanje**

Mehanizam koji stoji iza protuupalnog djelovanja pčelinjeg otrova nije još u potpunosti razjašnjen. Obzirom da pčelinji otrov sadrži velik broj sastavnica, od kojih su mnoge vjerojatno uključene u navedeno djelovanje, ovo je dosta zahtjevno područje za istraživanje.

Neki autori smatraju da protuupalni učinak pčelinjeg otrova i njegovih sastavnica vjerovatno proizlazi iz aktivacije hipofizno-nadbubrežnog sistema i otpuštanja kortikosteroida (Vick i Shipman, 1972; Vick i sur., 1972; Dunn i Killion, 1988). Naime, ubrizgavanje melitina ili apamina kod psa dovodi do povišenja razine kortizola u plazmi (obično unutar jednog sata) koje traje od 24 do 48 sata (Vick i Shipman, 1972). Primijećeno je da štakori kojima je intraperitonealno ubrizgan melitin imaju višu razinu kortikosterona u plazmi nego štakori kojima je ubrizgana otopina soli, 4, 24 i 48 sata nakon injekcije. Upotrebom druge injekcije melitina četvrti dan nakon prve, trajanje perioda tijekom kojeg je povišena razina kortikosterona u plazmi povećava se na čak 8 dana (Dunn i Killion, 1988). Drugi mogući mehanizam protuupalnog djelovanja pčelinjeg otrova uključuje spinalne M(2) receptore, aktivaciju simpatičkih preganglijskih neurona te otpuštanje katekolamina iz srži nadbubrežne žlijezde (Kwon i sur., 2003; Yoon i sur., 2005).

Saini i sur. (1997) pretpostavili su da melitin, glavna sastavnica pčelinjeg otrova, veže sekretornu fosfolipazu A<sub>2</sub> i inhibira njezinu enzimsku aktivnost. Pošto je fosfolipaza A<sub>2</sub> glavni upalni enzim uključen u otpuštanje arahidonske kiseline, moguće je da formiranje melitin-PLA<sub>2</sub> kompleksa nakon ubrizgavanja pčelinjeg otrova injekcijom može suprimirati razvoj upalnog procesa. S druge strane, ubrizgavanje melitina u šapicu miša dovodi do nastanka edema nakon 60 minuta (Hartman i sur., 1991). Također, subkutano ubrizgavanje pčelinjeg otrova u šapicu štakora dovodi do nastanka lokalne upale i edema što može trajati više od 48 sati (Lariviere i Melzack, 1996). Uz navedeno djelovanje na fosfolipazu A<sub>2</sub>, uočeno je da melitin inhibira proizvodnju superoksidnih iona od strane neutrofila (Sommerfield i sur., 1986).

Istraživana je sposobnost pčelinjeg otrova i melitina da inhibiraju lipopolisaharid (LPS)-induciranu ekspresiju upalnih medijatora u kulturama mišjih makrofaga, mikroglija stanica i sinoviocitima od pacijenta koji boluju od reumatoidnog artritisa u svrhu boljeg razumijevanja njihovog protuupalnog djelovanja. Ustanovljeno je da pčelinji otrov i melitin smanjuju LPS-induciranu proizvodnju prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), dušikovog oksida (NO) te ekspresiju COX-2, inducibilne NO sintaze (iNOS) i citosolne fosfolipaze (cPLA<sub>2</sub>) (Park i sur., 2004; Jang i sur., 2005; Han i sur., 2007; Moon i sur., 2007). Neki autori primijetili su da će COX-2 aktivnost i proizvodnja upalnih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) biti inhibirane *in vitro* od strane subfrakcija pčelinjeg otrova topivih u vodi i *in vivo* nakon opetovanog ubrizgavanja pčelinjeg otrova u akupunkturnu točku (Nam i sur., 2003; Lee i sur., 2004). Općenito, upalna reakcija uzrokuje aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B koji dovodi do aktivacije gena za proupalne citokine i druge medijatore upale (Andreis i sur., 2004). Postoje dokazi koji upućuju na inaktivaciju NF- $\kappa$ B izravnim vezanjem na p50 podjedinicu kao mogući mehanizam protuupalnog djelovanja pčelinjeg otrova i melitina. Naime, pčelinji otrov i melitin inhibiraju lipopolisaharid (LPS)-inducirano vezanje DNA i transkripcijsku aktivnost NF- $\kappa$ B inhibicijom otpuštanja I $\kappa$ B podjedinice i nuklearne translokacije p50 podjedinice (Park i sur., 2004).

Da bi dalje istražili protuupalnu aktivnost pčelinjeg otrova i mehanizme vezane uz tu aktivnost, znanstvenici su proveli analizu genske ekspresije na stanicama hondrosarkoma i makrofazima (Yin i sur., 2005; Jang i sur., 2009). U eksperimentu provedenom od Yina i sur. (2005) humane stanice hondrosarkoma HTB-94 obrađene su sa pčelinjim otrovom, lipopolisaharidom (LPS) ili s oboje. Mikročip analizom ustanovljeno je da pčelinji otrov smanjuje ekspresiju gena čija je ekspresija bila pojačana zbog prisutnosti lipopolisaharida (LPS). Riječ je o genima za interleukin-6 (IL-6) receptor, matriks metaloproteinazu 15



(MMP-15), faktor nekroze tumora (ligand) superfamilije-10, kaspaze-10 i tkivni inhibitor metaloproteinaze-1 (TIMP-1). Jang i sur. (2009) napravili su mikročip analizu da odrede gene koji su diferencijalno eksprimirani u lipopolisaharid (LPS)-aktiviranim RAW 264.7 makrofazima nakon tretmana pčelinjim otrovom. Utvrđeno je da pčelinji otrov inhibira ekspresiju upalnih gena čija je ekspresija bila pojačana od strane NF-κB u prisutnosti lipopolisaharida (LPS), dakle gena MAP3K8, TNF, TNFAIP3, SOCS3, TRAF1, JUN, CBP i dr. Dakle, autori su zaključili da pčelinji otrov smanjuje učinke lipopolisaharida (LPS) preko promjene genske ekspresije meta u NF-κB/MAPK putevima.

#### **1.2.4.4. Radioprotektivno djelovanje**

Radioprotektivno djelovanje pčelinjeg otrova potvrdili su američki znanstvenici Shipman i Cole (1967). Ubrizgali su pčelinji otrov u miševu subkutano ili intraperitonealno 24 sata prije izlaganja X-zračenju. Ustanovljeno je da, nakon što su podvrgnuti letalnoj dozi X-zračenja (800-850 R), miševi u koje je ubrizgan pčelinji otrov pokazuju veći broj preživjelih u odnosu na kontrolu, a miševi u koje je ubrizgan pčelinji otrov subkutano pokazuju veći broj preživjelih nego miševi u koje je ubrizgan pčelinji otrov intraperitonealno. Zaštita od zračenja je dobivena kad je pčelinji otrov ubrizgan 24 sata prije izlaganja X-zračenju, što ga svrstava u različitu kategoriju od cisteina, AET i srodnih spojeva koji moraju biti ubrizgani nešto prije izlaganja zračenju (oko 30 minuta) da bi bili efikasni.

U istraživanju provedenom od Kanno i suradnika (1970), miševima je subkutano ubrizgan pčelinji otrov (2,8 ili 5,6 μg/g) prije izlaganja gama zračenju kobalta-60 (937 R). Zabilježena je 100 % smrtnost 15 dana nakon izlaganja zračenju kod ozračenih miševa kojima nije ubrizgan pčelinji otrov. Oko 60-tog dana, preživljavanje je bilo 10 % za miševu kojima je ubrizgano 2,8 μg/g pčelinjeg otrova, a 18 % za miševu kojima je ubrizgano 5,6 μg/g otrova. Patološke promjene u jetri i koštanoj srži prouzročene izlaganjem zračenju smanjene su kod životinja kojima je ubrizgan pčelinji otrov.

Shipman i Cole (1967) predložili su tri moguća mehanizma radioprotektivnog djelovanja pčelinjeg otrova. Naime, otrov može proizvesti određen stupanj fiziološkog stresa u životinjama i izazvati neuroendokrini odgovor tzv. adaptacijski sindrom koji bi povećao otpornost na zračenje. On može preko antibakterijskog djelovanja reducirati učinak zračenja ili može poticati promjene u hematopoetskom sustavu. Treći mehanizam koji uključuje promjene u hematopoetskom sustavu, Varanda i sur. (1992) smatraju točnim pošto su

eksperimenti provedeni od Hyre i Smitha (1986) pokazali da pčelinji otrov dovodi do promjena u funkcijama T i B limfocita u BALB/c miševima.

Varanda i suradnici istraživali su učinak pčelinjeg otrova i gama zračenja na stanice koštane srži štakora soja Wistar tretiranih *in vivo* (1992). Provedeno je pet različitih eksperimenata. Životinje su intraperitonealno primile različite koncentracije pčelinjeg otrova (1 ili 0,5 µl/100 g) 1 sat ili 24 sata prije ili 30 minuta nakon izlaganja gama zračenju (3 ili 4 Gy). Žrtvovane su 24 sata nakon izlaganja zračenju. U svakom eksperimentu, osim skupine koja prima kombinaciju otrova i zračenja, postoji također skupina koja je obrađena samo s otrovom, skupina obrađena samo sa zračenjem i netretirana kontrolna skupina. Samo životinje koje su primile otrov 24 sata prije izlaganja zračenju pokazivale su značajno smanjenje broja stanica sa kromosomskim aberacijama, smanjenje frekvencije kromosomskih aberacija i fragmenta u usporedbi sa životinjama koje su bile podvrgnute samo zračenju. Ovaj učinak pčelinjeg otrova ovisi o njegovoj dozi. Radioprotektivni učinak pčelinjeg otrova također je primijećen od Varande i Takahashi (1993) u *in vitro* istraživanju sa ljudskim limfocitima periferne krvi izloženim gama zračenju (2,0 Gy).

Osim radioprotektivnog djelovanja pčelinjeg otrova kao cjeline, istraživano je i radioprotektivno djelovanje nekih njegovih sastavnica. Ginsberg i suradnici (1968) izveli su niz eksperimenata u kojima je miševima subkutano ubrizgan melitin 24 sata prije izlaganja zračenju. Životinje su preživjele do 30 dana nakon ubrizgavanja doze od 60 mg/kg, a dobra zaštita je postignuta i sa dozama od približno 5 mg/kg. Histamin je još jedna sastavnica pčelinjeg otrova čije je djelovanje proučavano. Dva peptida sa histaminom na C-terminusu nađena u pčelinjem otrovu, ala-gly-pro-gln-histamin i ala-gly-gln-gly-histamin, otpuštaju histamin *in vivo* tako da se polako hidroliziraju te se pretpostavlja da oboje otpuštaju kelate Cu<sup>2+</sup> iona. Smatra se da navedeni spojevi također pridonose radioprotektivnom djelovanju pčelinjeg otrova (Peck i O'Connor, 1974).

## **1.3. CITOGENETIČKE METODE**

### **1.3.1. Test vijabilnosti**

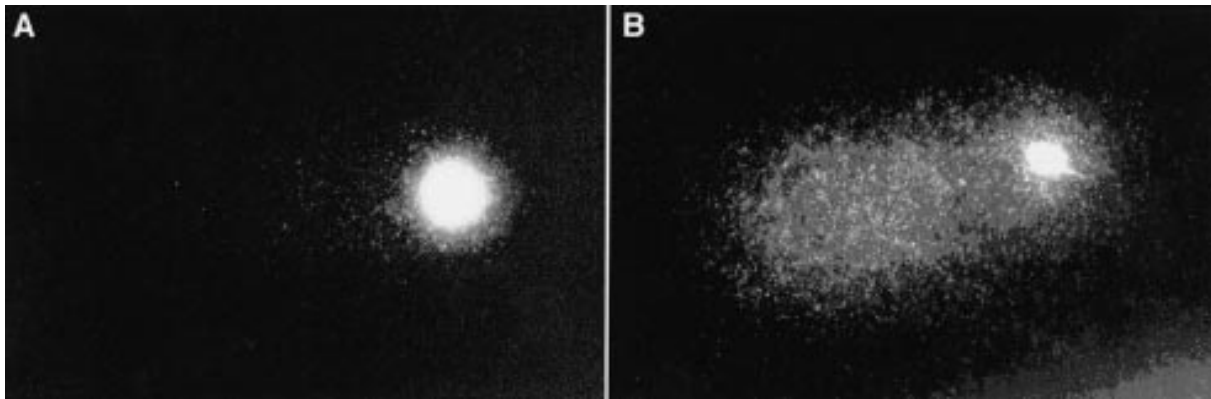
Stanica se smatra vijabilnom ako ima sposobnost rasti i razvijati se. Testovi vijabilnosti zasnivaju se ili na fizičkim svojstvima vijabilnih stanica poput membranskog integriteta ili citoplazmatskog strujanja, ili na njihovoj metaboličkoj aktivnosti poput

redukcije tetrazolijevih soli ili hidrolize fluorogenih substrata (Castro-Concha i sur., 2006). Brz, jednostavan i jeftin test vijabilnosti upotrebljen za ovaj rad naziva se test dvojnog bojenja akridin oranžem i etidij bromidom. Diferencijalno bojanje sa ove dvije boje, uz korištenje fluorescencijskog mikroskopa, omogućuje identifikaciju vijabilnih i nevijabilnih stanica. Akridin oranž prolazi kroz plazma membranu vijabilnih stanica i boji jezgre zeleno. Etidij bromid biva uzet od stanica samo kad se izgubi membranski integritet te tada boji jezgru crveno (Braun i sur., 2001; Hay i sur., 2002).

### **1.3.2. Komet-test**

Komet-test ili mikrogel elektroforeza je relativno nova metoda za analizu i kvantificiranje oštećenja DNA te popravka DNA na razini jedne stanice (Collins, 2004). Mikrogel elektroforezu u svrhu procjene oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama prvi su proveli Östling i Johanson 1984. god.

Osnovni princip testa je jednostavan. Prvo se stanična suspenzija uklapa u agarozni gel na brušenom predmetnom stakalcu. Tako pripremljeni preparati uranjaju se u pufer za lizu visoke koncentracije soli i detergenta, što rezultira liziranjem stanica i oslobađanjem ukupne stanične DNA. Potom se DNA denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu te podvrgava elektroforezi. U električnom polju fragmenti DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima putovat će kroz pore gela prema anodi dok će glavina DNA zbog svoje velike molekularne mase ostati na mjestu. Nakon bojanja preparata fluorescencijskom bojom stanice sa oštećenjem DNA će pokazivati pojavu kometa s jasnom fluorescentnom glavom i repom (Slika 4.). Za bojanje se koriste etidij-bromid, propidij jodid, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), SYBR Green I i dr. Za mjerenje i analizu najčešće se rabe računalni program za analizu slike i epifluorescencijski mikroskop. Na temelju parametra poput dužine repa, postotka DNA u repu i repnog momenta procjenjuje se oštećenje DNA. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali DNA fragmenti, mjereno ili od ruba glave ili od sredine glave kometa (Albertini i sur., 2000; Tice i sur., 2000; Castaño i sur., 2003). Dužina repa se izražava u mikrometrima i proporcionalna je količini DNA oštećenja. Repni moment se definira kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu (Singh i sur., 1988; Olive i sur., 1990).



**Slika 4.** Slike kometa stanice s neoštećenom DNA (A) i stanice s oštećenom DNA (B).

(preuzeto od Aitken i sur., 1998)

Danas postoji nekoliko modifikacija ove metode, no najviše se koriste komet-metoda pri neutralnim uvjetima (Olive i sur., 1990) i komet metoda pri alkalnim uvjetima (Singh i sur., 1988). Neutralna verzija metode omogućuje detektiranje dvolančanih lomova DNA. Alkalna verzija metode smatra se optimalnom za istraživanje učinaka različitih genotoksičnih agensa, te omogućuje detekciju jednolančanih lomova, dvolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteina (Albertini i sur., 2000).

Komet-test ima brojne prednosti u odnosu na ostale citogenetičke metode: osjetljivost, brzina izvođenja, jednostavnost, niski troškovi i primjenjivost na malom broju stanica (<10 000). Analiza se može provesti na bilo kojoj vrsti stanica biljnog, životinjskog ili ljudskog podrijetla, neovisno o tome da li su izolirane neposredno iz živog organizma ili uzgojene u kulturi (Collins i sur., 1996; Leroy i sur., 1996; Lee i Steinert, 2003). Do sada je korišten za detektiranje raznih oblika oštećenja molekule DNA u biljkama (Gichner i Plewa, 1998), gujavicama (Verschaeve i Gilles, 1995), žarnjacima (Mitchelmore i Hyatt, 2004), kvascima (Lah i sur., 2004), školjkašima (Siu i sur., 2004), vodozemcima, ribama (Lee i Steinert, 2003), kukcima (Mukhopadhyay i sur., 2004), pticama (Pastor i sur., 2001), sisavcima, posebice ljudima (Garaj-Vrhovac i Kopjar, 2003) te u mnogim staničnim linijama (Kammann i sur., 2001). Za detekciju oštećenja DNA komet-testom stanice ne moraju biti mitotski aktivne, što predstavlja prednost pred mikronukleus-testom (Belpaeme i sur., 1996).

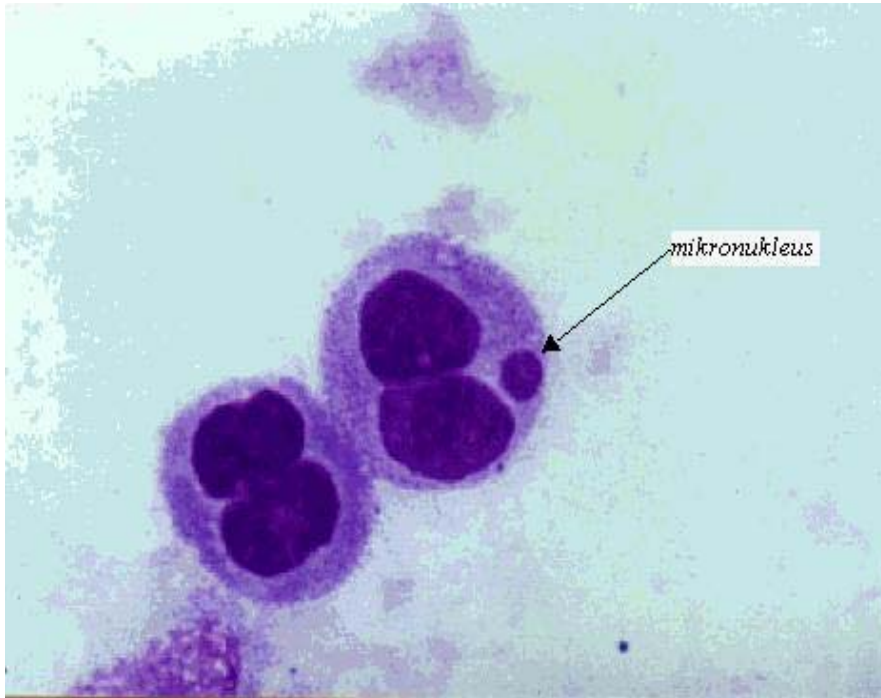
Komet-test koristi se u istraživanjima genotoksičnosti (Fairbairn i sur., 1995; Marzin, 1999), ekotoksikologiji (Belpaeme i sur., 1998), istraživanjima DNA popravka (Speit i Hartmann, 1995), biomonitoringu (Moller i sur., 2000), te u kliničkoj radiobiologiji (Olive,

1999). Također može se koristiti za detekciju stanica u apoptozi te nekrotičnih stanica. Kometi navedenih stanica obično imaju male ili nepostojeće glave i velike difuzne repove (Olive i sur., 1993; Fairbairn i sur., 1996).

### 1.3.3. Mikronukleus-test

Mikronukleusi (MN) su okrugle ili ovalne kromatinske strukture smještene unutar interfazne citoplazme, koje svojim izgledom i optičkom gustoćom nalikuju jezgri, no manje su veličine od jezgre (njihov promjer je do 1/3 promjera jezgre) (Slika 5.). Nisu povezani sa jezgrom. Mogu se dodirivati s jezgrom, ali u tom slučaju granica mikronukleusa i granica jezgre mora biti jasno vidljiva. Mikronukleusi nisu refraktilni, stoga ih se može lako razlikovati od artefakata poput čestica boje (Fenech i sur., 2003). Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi, koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri (Schmid, 1975; Fenech, 2000). Učestalost mikronukleusa može se koristiti kao kvantitativni pokazatelj strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma nastalih u stanicama, u uvjetima *in vitro* ili *in vivo*, pod utjecajem različitih genotoksičnih agensa (Heddle i sur., 1978; Nüsse i sur., 1996).

Mikronukleusi koji sadrže kromosomske fragmente nastaju kao rezultat: A) direktnog oštećenja, primjerice zbog loma molekule DNA B) replikacije na osnovu oštećenog DNA kalupa C) inhibicije sinteze DNA. Mikronukleusi koji sadrže čitave kromosome primarno nastaju zbog oštećenja diobenog vretena, kinetohora ili drugih dijelova mitotskog aparata ili zbog oštećenja kromosomskih podstruktura, promjena u fiziologiji stanice i mehaničkih oštećenja (Albertini i sur., 2000). Dokazano je da oko 50 % spontano nastalih mikronukleusa sadrži čitave kromosome, a ostali nastaju od acentričnih fragmenata (Fenech i Morley, 1989). Mikronukleusi koji sadrže čitave kromosome češće se nalaze u starijih (>65 godina) nego u mlađih (20 do 35 godina) ispitanika (Norppa i sur., 1993).



**Slika 5.** Slika binuklearne stanice s mikronukleusom (desno) i binuklearne stanice bez mikronukleusa (lijevo). (preuzeto od CRIOS, 2008)

Korištenjem standardnog mikronukleus-testa ne mogu se razlikovati mikronukleusi koji potječu od acentričnih fragmenta od mikronukleusa koji potječu od čitavih kromosoma. Pokušaji da se prevlada navedeno ograničenje uključuju mjerenje veličine mikronukleusa (Hashimoto i sur., 2010), C-pruganje (Banduhn i Obe, 1985), mjerenje DNA sadržaja (Heddle i Carrano, 1977; Grawé i sur., 1994), upotrebu tehnike s antikinetoformnim protutijelima (CREST) i fluorescencijske *in situ* hibridizacije sa DNA sondama koje specifično otkrivaju centromerna ili telomerna područja kromosoma (Eastmond i Tucker, 1989; Miller i Nüsse, 1993). Mikronukleusi nastali od zaostalih kromosoma mogu se identificirati prema prisutnosti kinetohora korištenjem antikinetoformnih protutijela ili prema prisutnosti centromernih DNA sekvenca upotrebom FISH metode. Mikronukleusi koji ne sadrže kinetohor ili centromerne DNA sekvence obično sadrže acentrične kromosomske fragmente (Albertini i sur., 2000).

Evans i sur. (1959) prvi su predložili brojanje stanica sa mikronukleusom kao metodu procjenjivanja citogenetičkog oštećenja. Prvobitno je mikronukleus-test razvijen kao test na stanicama koštane srži i eritrocitima sisavaca, a kasnije je njegova primjena proširena na različite vrste stanica. Mikronukleusi u eritrocitima često se nazivaju Howell-Jollyjeva tjelešca prema znanstvenicima koji su ih prvi otkrili i opisali. Glavni nedostatak metode analize mikronukleusa u eritrocitima je da u zdravih osoba slezena uklanja eritrocite s mikronukleusima iz krvotoka pa bi se možda korištenje metode trebalo ograničiti samo na

splenektomirane osobe (MacGregor i sur., 1997). Trenutačno najpouzdanija mikronukleus metoda je metoda blokiranja citokineze (CBMN test, engl. *Cytokinesis Block Micronucleus Assay*) uvedena od Fenecha i Morleya (1985). Kod navedene tehnike uzorak pune krvi dodaje se u hranjiv medij koji sadrži mitogeni aktivator fitohemaglutinin i inkubira na 37 °C u trajanju od 72 sata. Nakon 44 sata kultiviranja dodaje se citohalazin B koji djeluje na citoskelet blokirajući citokinezu (koja se obično događa u telofazi), dok kariokineza nije narušena. On se dodaje u staničnu kulturu da bi se ograničila analiza na stanice koje su se podijelile samo jednom *in vitro*. U nastalim binuklearnim limfocitima očitavaju se mikronukleusi (Albertini i sur., 2000; Fenech, 2000). Nedostatak tehnike je što može pokazati samo nedavnu izloženost zračenju jer se udio stanica s mikronukleusom u perifernoj krvi, ubrzo nakon njihove pojave, počinje smanjivati (Brumen i sur., 2002).

Mikronukleus-test je brži i jednostavniji od analize strukturnih aberacija kromosoma, a podjednako osjetljiv u detekciji oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma. Uključen je u standardnu bateriju testova citotoksičnosti (Norppa i sur., 1993; Kirsch-Volders i sur., 1997).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Pošto zapadna medicina nije uspjela riješiti sve zdravstvene poteškoće koje se javljaju u današnjoj populaciji, posljednjih nekoliko godina sve se više okreće prirodnim proizvodima kao potencijalnim rješenjima za neka oboljenja. Pčelinji otrov je jedan od tih proizvoda. Ima veliki potencijal za ublažavanje kroničnih bolova i koristi se za liječenje reumatskih bolesti, neuroloških bolesti i različitih dermatoloških stanja, te za liječenje tumora.

Obzirom da nema dovoljno literaturnih podataka koji govore o djelovanju pčelinjeg otrova na ljudske stanice, cilj ovog istraživanja je bio procijeniti učinak pčelinjeg otrova na razini molekule DNA i na razini stanice u eksperimentalnim uvjetima.

U ovom su radu u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima, uz pomoć citogenetičkih i molekularno-bioloških metoda, limfociti izlagani djelovanju pčelinjeg otrova u različitim vremenskim periodima. Primjenom testa vijabilnosti i komet-testa istraživao je učinak pčelinjeg otrova u koncentraciji od 100 µg/ml u kulturi ljudskih limfocita periferne krvi u vremenskom periodu od 10 min, 30 min, 1, 6 i 24 sati. Primjenom mikronukleus-testa istraživao je učinak pčelinjeg otrova u koncentraciji od 100 µg/ml u kulturi ljudskih limfocita periferne krvi u vremenskom periodu od 1, 6 i 24 sati.



## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijal**

#### **3.1.1. Krv**

Istraživanja su provedena na uzorku limfocita periferne krvi zdrave osobe muškog spola (26 godina). Tijekom posljednjih godinu dana davatelj krvi nije bio izložen ionizirajućem ili neionizirajućem zračenju, niti kemijskim mutagenima. Krv je izvađena u sterilni heparinizirani spremnik (BD vacutainer, Becton Dickinson) volumena 10 ml. Ukupno je izvađeno 10 ml venske krvi koja je potom podijeljena na više uzoraka i korištena u pokusima. Svi pokusi izvedeni su na punoj krvi u uvjetima *in vitro*.

#### **3.1.2. Test-substance**

Kao test substancia u ovim istraživanjima korišten je pčelinji otrov (BV, Sigma) koji je u obliku praha pohranjen na - 20 °C. Za potrebe pokusa, BV je otopljen u destiliranoj vodi i centrifugiran na 12000 okretaja 10 minuta.

### **3.2. Metode**

#### **3.2.1. Test vijabilnosti**

U epruvetu je stavljeno 200 µl fikola (Histopaque), te je na fikol dodano 200 µl krvi pritom pazeći da se ta dva sloja ne miješaju. Uzorak je centrifugiran 3 minute na 4500 okretaja. Nakon centrifugiranja sloj limfocita je pokupljen mikropipetom. Na njega je dodano 1 ml medija da bi se isprao fikol. Uzorak je ponovno centrifugiran 3 minute na 4500 okretaja. Nakon centrifugiranja gornji sloj je uklonjen pipetom, a ostatak je resuspendiran, nakapan na stakalce na koje je prethodno dodana otopina AO/EtBr (1:1 - akridin-oranž 100 µg/ml / etidij-bromid 100 µg/ml ) i pokriven pokrovnicom. Preparati su gledani pod mikroskopom. Brojano je 100 stanica po preparatu i gledalo se njihovo preživljenje.

#### **3.2.2. Komet-test**

Pripremljene su otopine 1%-tne agaroze normalne temperature taljenja (NMP), 0,6 %-tne agaroze normalne temperature taljenja (NMP) i 0,5 %-tne agaroze niske temperature taljenja (LMP). Na brušeno predmetno stakalce kapalicom je nanescena 1 %-tna otopina NMP

agaroze te ostavljena stajati na sobnoj temperaturi. Nakon što se agarozna ohladila, pomoću pokrovnice je uklonjena sa stakla. Mikropipetom je na predmetnicu nanoseno 300  $\mu$ l 0,6 %-tne NMP agaroze, koja je zatim pažljivo pokrivena pokrovnicom i ostavljena na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnice, nanosena je novi sloj od 100  $\mu$ l 0,5 % LMP agaroze pomiješana sa 5  $\mu$ l kontrolnog uzorka krvi ili uzorka krvi tretiranih pčelinjim otrovom u različitim vremenskim periodima u trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata. Nakon 10 minuta polimeriziranja na ledu skinuta je pokrovica i nanosena je 100  $\mu$ l 0,5 % LMP agaroze. Preparati su zatim ostavljeni 10 minuta na ledu. Poslije polimerizacije, uklonjene su pokrovnice i preparati su uronjeni u otopinu za lizu. Pripremljena je svježa otopina za lizu (pH 10) iz matične otopine za lizu (natrijev sarkozinat, NaCl, Na<sub>2</sub>EDTA, Tris-HCl), 10 %-tne otopine DMSO i Tritona X-100, te ohlađena na 4°C. Preparati su držani u otopini za lizu najmanje 24 sata na 4°C. Zbog osjetljivosti tehnike, preparati su tijekom lize bili zaštićeni od svjetlosti.

Preparati su zatim uronjeni u pufer za denaturaciju i držani u njemu zaštićeni od svjetlosti 20 minuta na 4°C. Pufer za denaturaciju (pH 12) pripremljen je neposredno prije upotrebe iz matične otopine NaOH, matične otopine Na<sub>2</sub>EDTA i redestilirane vode.

Preparati su preneseni u kadu za horizontalnu elektroforezu koja je provedena u puferu za denaturaciju strujom jakosti 300 mA u trajanju 20 minuta. Nakon elektroforeze preparati su ispirani u Tris-HCl puferu (pH 7,5) i to tri puta u trajanju od pet minuta. Zatim su preparati obojeni sa 0,5 ml otopine etidij-bromida (20  $\mu$ g/ml), pokriveni pokrovnicama i nakon 10 minuta isprani u 0,4 Tris-HCl puferu (pH 7,5). Nakon ispiranja preparati su pokriveni pokrovnicama i pohranjeni u vlažnu komoricu na 4 °C. Zbog stabilizacije boje, preparati su prije početka analize držani u mraku najmanje 15 minuta.

Preparati su analizirani epifluorescentnim mikroskopom, pod povećanjem imerzijskog objektiva (40x) uz korištenje pobudne svjetlosti valne dužine 510-560 nm. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike Comet assay II, proizvođača Perceptive Instruments Ltd. Za svaki uzorak analizirano je 100 kometa, određujući pri tom dužinu repa u nm, intenzitet fluorescencije repa, te računajući repni moment za svaki pojedini komet.

### 3.2.3. Mikronukleus-test

Uzorci pune krvi ( $V = 0,5\text{ml}$ ) nasadeni su u staklene bočice sa hranjivom podlogom Euroclone koja sadrži sve potrebne sastojke za rast stanica u kulturi. Krv je stavljena u termostat na  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon što je prošlo 44 sata od početka kultivacije, citohalazin-B (Sigma) je dodan u svaku kulturu u konačnoj koncentraciji od  $6\ \mu\text{g/ml}$ . Po isteku 72 sata, kultura pune krvi centrifugirana je 10 minuta na 600 okretaja u minuti. Supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5 ml fiziološke otopine te ponovno centrifugiran 10 minuta na 600 okretaja u minuti. Supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5 ml ohlađene ( $4^{\circ}\text{C}$ ) otopine fiksira (3:1, metanol /octena kiselina). Suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 600 okretaja u minuti. Supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u ohlađenoj otopini fiksira.

Postupak pročišćavanja taloga se po potrebi ponavlja. Nakon posljednjeg centrifugiranja uklonjen je supernatant, a talog resuspendiran uz dodatak 1 ml fiksira. Suspenzija je nanosena na očišćena, suha predmetna stakla i preparati su ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi. Preparati su bojani 5%-tnom otopinom Giemsa-e u trajanju od 10 minuta i osušeni na sobnoj temperaturi. Upotrebom svjetlosnog mikroskopa (Olympus CX41) pregledano je 1000 binuklearnih limfocita po preparatu.

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

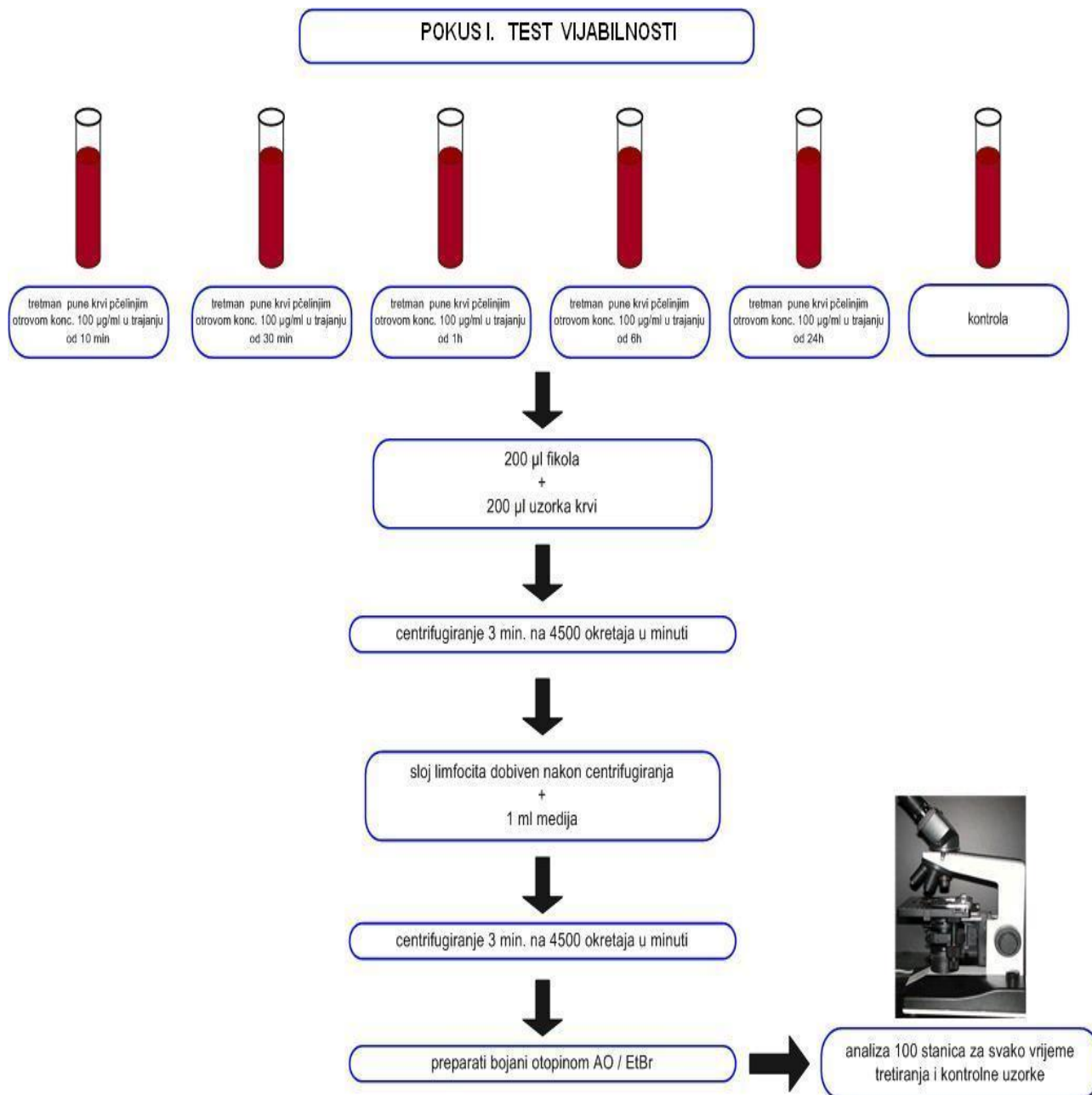
Statistička značajnost rezultata dobivenih komet-testom, testirana je pomoću računalnog programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Tulsa, USA) primjenom testa analize varijance (ANOVA), na logaritamski transformiranim podacima dobivenim mjerenjem. Analiza varijance (ANOVA) je statistički parametrijski postupak kojim se utvrđuje postoji li statistički značajna razlika između više skupina rezultata, točnije između većeg broja aritmetičkih sredina (Petz, 1997). Za svaki uzorak parametara komet-testa (dužina repa, repni moment i intenzitet repa) izračunata je srednja vrijednost ( $\pm$  standardna pogreška). Rezultati dobiveni mikronukleus-testom statistički su obrađeni upotrebom hi-kvadrat testa. Razina statističke značajnosti bila je postavljena na  $p < 0,05$ .

### 3.2.5. Kratak prikaz pokusa

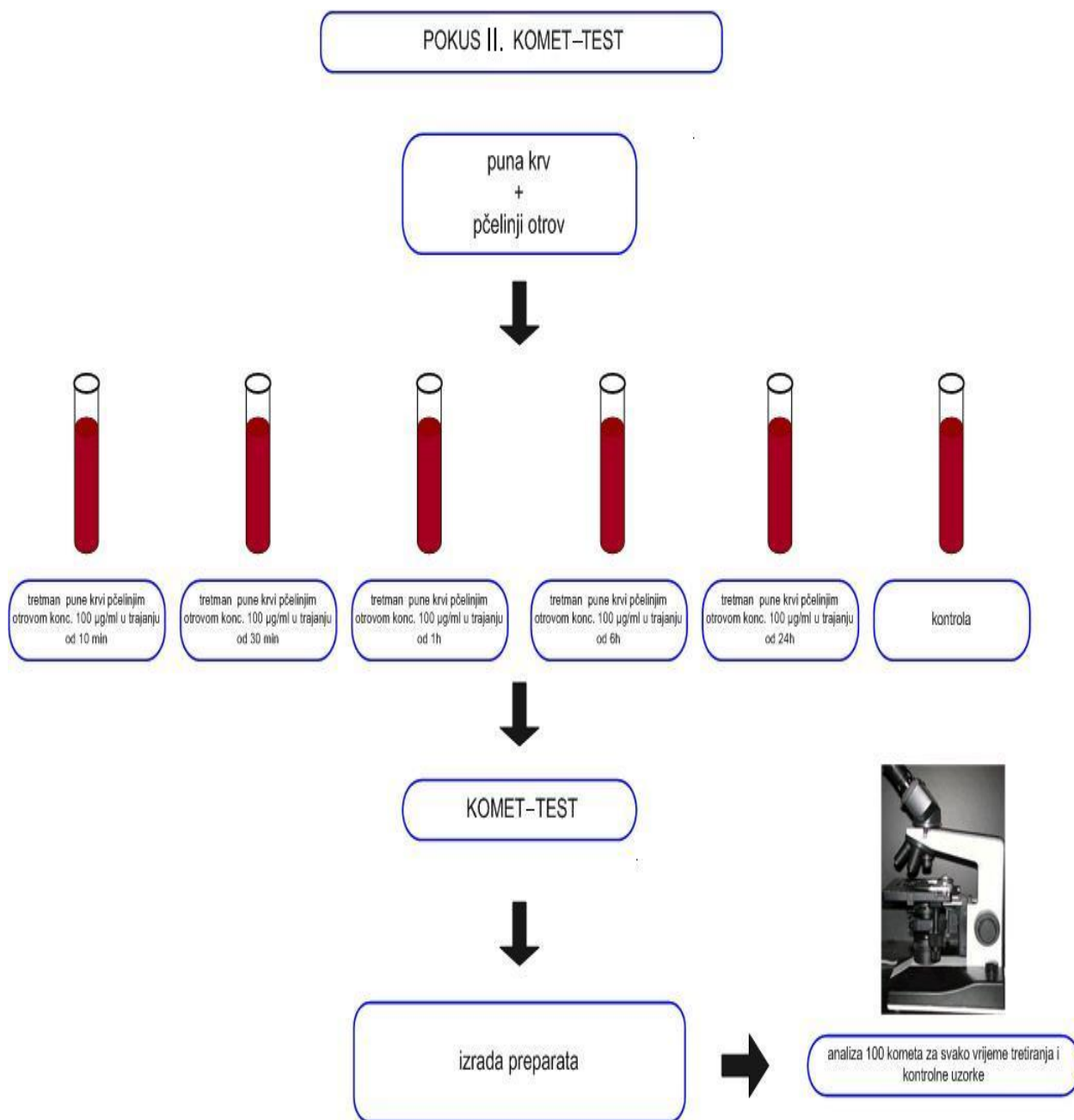
Nakon vađenja krvi je podijeljena na više uzorka i korištena u pokusima. Kao kontrola, korišten je jedan uzorak pune krvi, a ostali su uzorci bili tretirani s pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u različitim vremenskim periodima (Tablica 2.). U pokusima su primijenjeni laboratorijski protokoli za test vijabilnosti, komet-test i mikronukleus-test, Jedinice za mutagenazu, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada ( Slike 6., 7. i 8.).

**Tablica 2.** Prikaz izvođenih pokusa nakon tretmana pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u različitim vremenskim periodima.

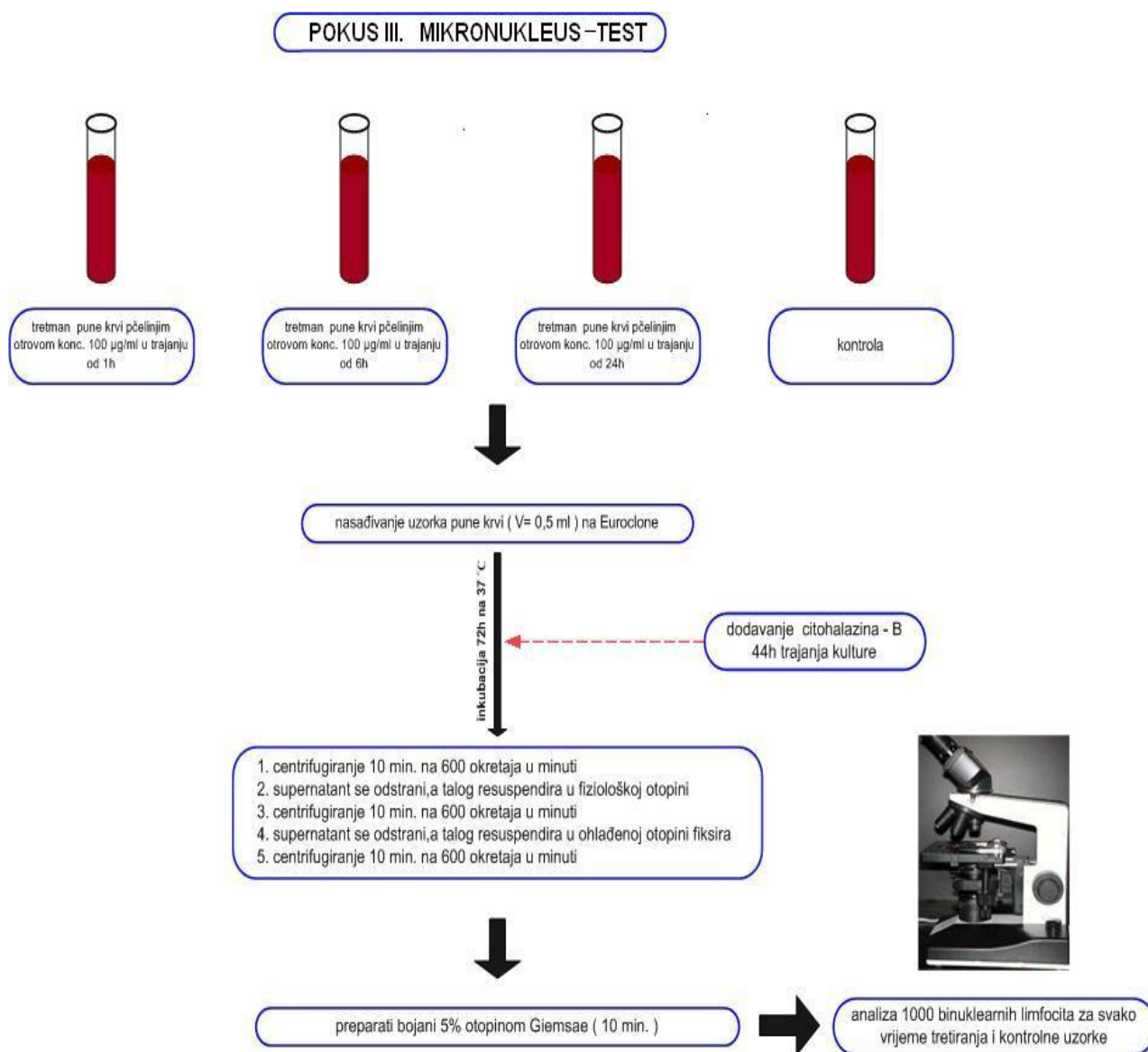
vrsta testa korištenog u pokusu	vrijeme izlaganja krvi pčelinjem otrovu				
	10 min	30 min	1h	6h	24h
test vijabilnosti	10 min	30 min	1h	6h	24h
komet-test	10 min	30 min	1h	6h	24h
mikronukleus-test			1h	6h	24h



**Slika 6.** Shema istraživanja učinka pčelinjeg otrova koncentracije od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  na ljudske limfocite periferne krvi korištenjem testa vijabilnosti.



**Slika 7.** Shema istraživanja učinka pčelinjeg otrova koncentracije od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  na ljudske limfocite periferne krvi korištenjem komet-testa.



**Slika 8.** Shema istraživanja učinka pčelinjeg otrova koncentracije od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  na ljudske limfocite periferne krvi korištenjem mikronukleus-testa.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati testa vijabilnosti

Vijabilnost stanica određena pomoću bojenja akridin-oranžem i etidij-bromidom, te uz korištenje fluorescencijskog mikroskopa bila je iznad 79 % u uzorcima periferne krvi tretiranim pčelinjim otrovom u različitom vremenskom trajanju (od 10 min do 24 sata), a 95 % u kontrolnim uzorcima (Tablica 3.). Ovo se smatra prihvatljivim rasponom za provođenje komet-testa (Tice i sur., 2000).

**Tablica 3.** Postotak živih i mrtvih stanica nakon tretiranja uzoraka periferne krvi pčelinjim otrovom ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata (N= 100 stanica).

uzorak	žive stanice (%)	mrtve stanice (%)
kontrola	95	5
10 min	91	9
30 min	84	16
1 h	87	13
6 h	79	21
24 h	80	20

### 4.2. Rezultati komet-testa

Rezultati dobiveni za parametre komet-testa s ciljem utvrđivanja osnovne razine oštećenja DNA u ovisnosti o vremenskom izlaganju uzoraka pčelinjem otrovu u koncentraciji od  $100 \mu\text{g/ml}$  prikazani su u tablici 4. Da bi procijenili DNA oštećenje korištena su tri parametra: dužina repa, intenzitet repa i repni moment uzoraka koji su bili izloženi pčelinjem otrovu u trajanju od ukupno 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata.

U kontrolnom netretiranom uzorku limfocita srednja vrijednost dužine repa kometa iznosi  $12,76 \pm 0,09 \mu\text{m}$ , repnog momenta  $0,12 \pm 0,01$ , a intenziteta repa  $1,02 \pm 0,13 \%$ . U uzorku limfocita izloženom pčelinjem otrovu u trajanju od 10 minuta srednja vrijednost dužine repa kometa iznosi  $12,76 \pm 0,12 \mu\text{m}$ , repnog momenta  $0,11 \pm 0,02$ , a intenziteta repa

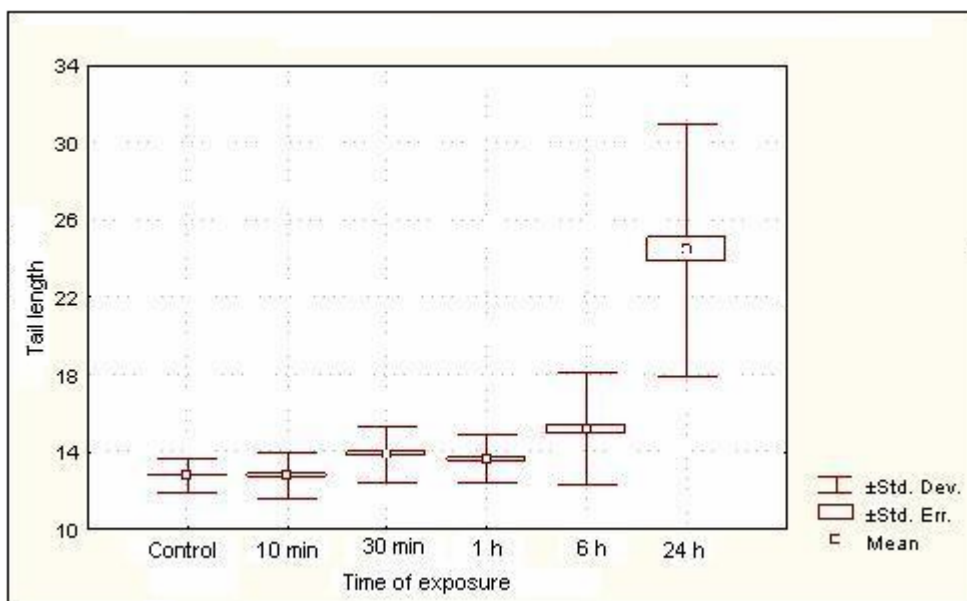


0,97 ± 0,20 %. U uzorku limfocita izloženom pčelinjem otrovu u trajanju od 30 minuta srednja vrijednost dužine repa iznosi 13,87 ± 0,15 µm, repnog momenta 0,18 ± 0,05, a intenziteta repa 1,45 ± 0,38 %. U uzorku limfocita izloženom pčelinjem otrovu u trajanju od 1 sata srednja vrijednost dužine repa iznosi 13,60 ± 0,13 µm, repnog momenta 0,11 ± 0,02, a intenziteta repa 0,93 ± 0,13 %. U uzorku limfocita izloženom pčelinjem otrovu u trajanju od 6 sati srednja vrijednost dužine repa iznosi 15,16 ± 0,29 µm, repnog momenta 0,43 ± 0,06, a intenziteta repa 3,40 ± 0,45 %. U uzorku limfocita izloženom pčelinjem otrovu u trajanju od 24 sata srednja vrijednost dužine repa iznosi 24,46 ± 0,65 µm, repnog momenta 2,55 ± 0,16, a intenziteta repa 17,35 ± 1,01 %. Grafički prikaz raspodjele izmjerenih vrijednosti dužine repa, repnog momenta i intenziteta repa prikazuje vrijednosti dobivene za sva tri parametra komet-testa uzoraka koji su bili izloženi pčelinjem otrovu u trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata (slika 9., 10. i 11.). U uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost (p<0,05) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za repni moment. U uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost (p<0,05) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za intenzitet repa. Također u uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 30 minuta, 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost (p<0,05) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za dužinu repa.

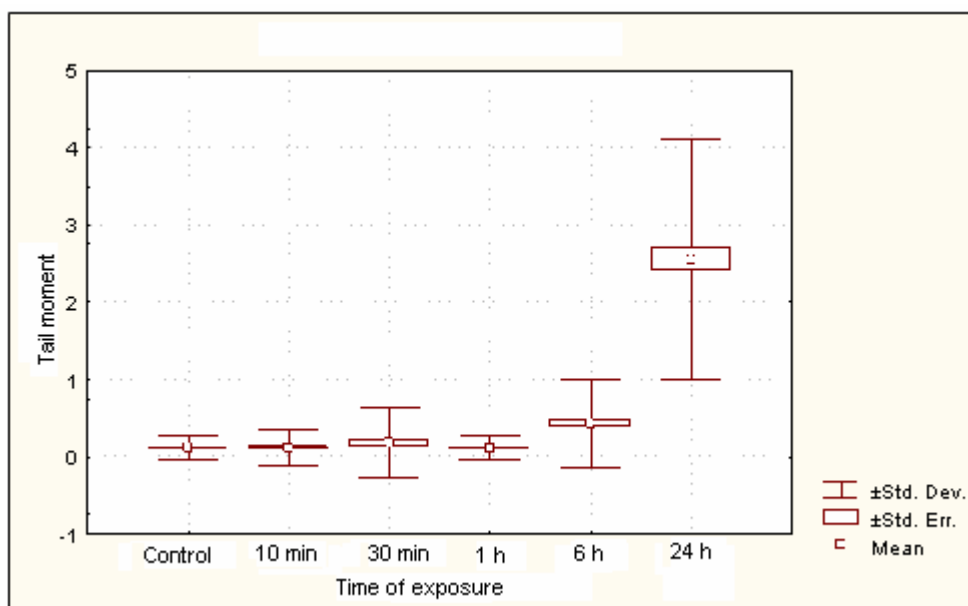
**Tablica 4.** Rezultati parametra komet-testa na uzorcima periferne krvi tretirane pčelinjim otrovom (100 µg mL<sup>-1</sup>) u trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata (N= 100 stanica).

uzorak	dužina repa (µm)	repni moment	intenzitet repa (%)
10 min	12,76 ± 0,12	0,11 ± 0,02	0,97 ± 0,20
30 min	13,87 ± 0,15*	0,18 ± 0,05	1,45 ± 0,38
1 h	13,60 ± 0,13	0,11 ± 0,02	0,93 ± 0,13
6 h	15,16 ± 0,29*	0,43 ± 0,06*	3,40 ± 0,45*
24 h	24,46 ± 0,65*	2,55 ± 0,16*	17,35 ± 1,01*
kontrola	12,76 ± 0,09	0,12 ± 0,01	1,02 ± 0,13

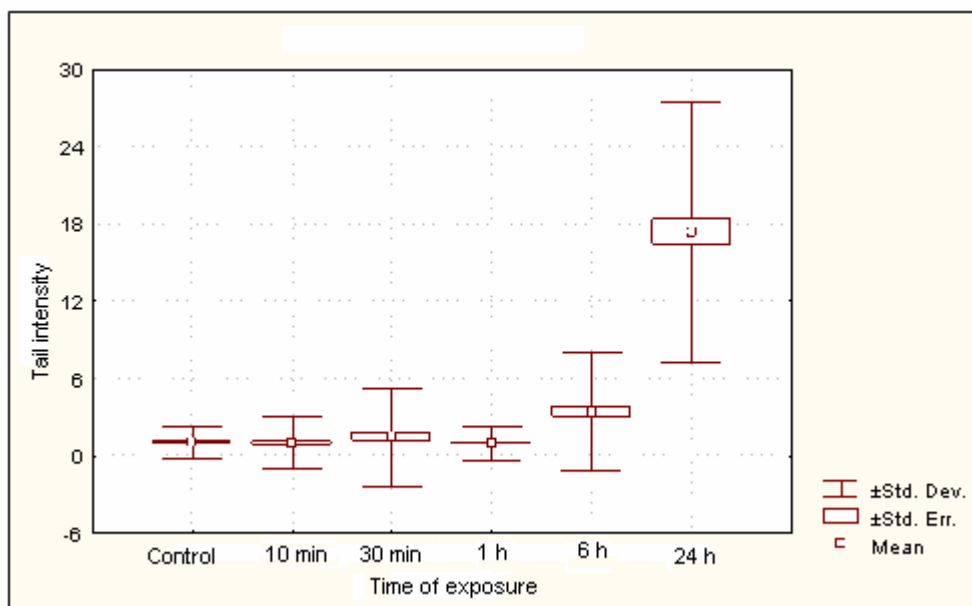
\*statistički značajno povišeno u odnosu na kontrolni uzorak (p<0,05)



**Slika 9.** Grafički prikaz raspodjele izmjerenih vrijednosti dužine repa kometa u uzorcima periferne krvi tretirane pčelinjim otrovom koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u vremenskom trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata (N= 100 stanica).



**Slika 10.** Grafički prikaz raspodjele izmjerenih vrijednosti repnog momenta u uzorcima periferne krvi tretirane pčelinjim otrovom koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u vremenskom trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata (N= 100 stanica).



**Slika 11.** Grafički prikaz raspodjele izmjerenih vrijednosti intenziteta repa u uzorcima periferne krvi tretirane pčelinjim otrovom koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u vremenskom trajanju od 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata ( $N=100$  stanica).

### 4.3. Rezultati mikronukleus-testa

Rezultati dobiveni tretiranjem humanih limfocita pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 1, 6 i 24 sata prikazani su u tablici 5. U svrhu procjene genotoksičnosti pčelinjeg otrova određen je ukupan broj i raspodjela mikronukleusa (MN), nukleoplazmatskih mostova (NM) i pupova na 1000 binuklearnih stanica.

U kontrolnim netretiranim uzorcima limfocita uočene su 2 binuklearne stanice sa po jednim mikronukleusom. Pupovi i nukleoplazmatski mostovi nisu primjećeni. U uzorku izlaganom pčelinjem otrovu u trajanju od 1 sata uočeno je 24 mikronukleusa, 13 nukleoplazmatskih mostova i 10 pupova. Nakon 6-satnog izlaganja limfocita pronađeno je 33 mikronukleusa, 18 nukleoplazmatskih mostova i 13 pupova. Pri vremenu izloženosti od 24 sata uočeni broj mikronukleusa iznosio je 22, pupova 28, a nukleoplazmatskih mostova 14. Slika 12. prikazuje rezultate udjela pojedinih parametara mikronukleus-testa u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 1 sat, 6 sati i 24 sata. Dakle, pri spomenutoj koncentraciji pčelinjeg otrova ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) utvrđena je statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) rezultata u učestalosti pojavljivanja mikronukleusa,

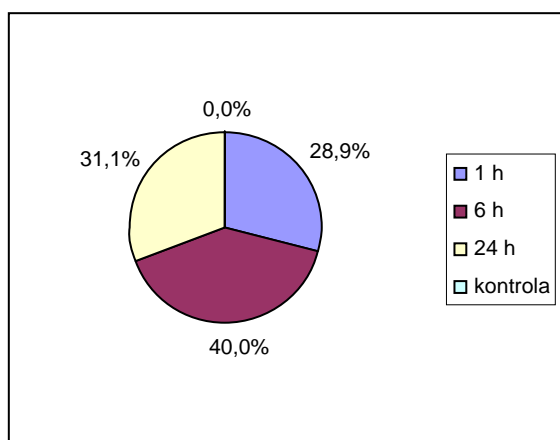
pupova i nukleoplazmatskih mostova u vremenima izloženosti od 1, 6 i 24 sata u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak.

**Tablica 5.** Totalni broj i distribucija mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i pupova na uzorcima periferne krvi tretirane pčelinjim otrovom ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u trajanju od 1 sat, 6 sati i 24 sata (N= 1000 binuklearnih stanica).

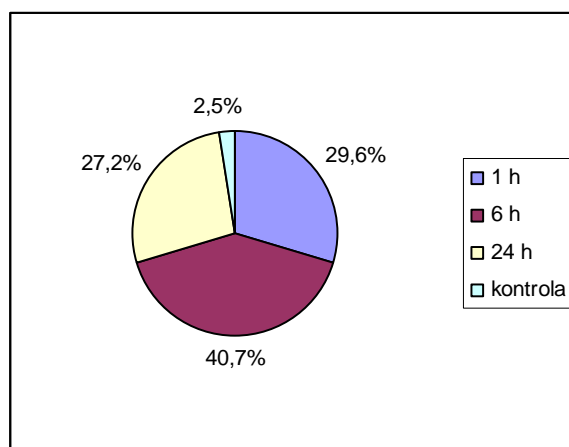
uzorak	bez oštećenja	1 MN	2 MN	totalni broj MN	1 most	2 mosta	1 pup	2 pupa
1 h	979	18*	3	24*	13*	-	6*	2
6 h	974	19*	7*	33*	16*	1	11*	1
24 h	978	22*	-	22*	12*	1	18*	5
kontrola	998	2	-	2	-	-	-	-

\*statistički značajno povišeno u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,05$ )

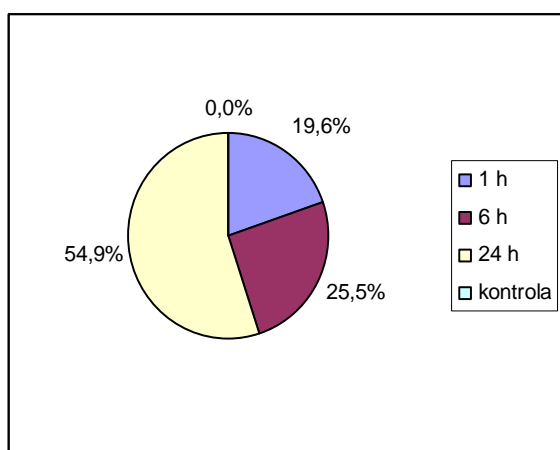
**Broj nukleoplazmatskih mostova**



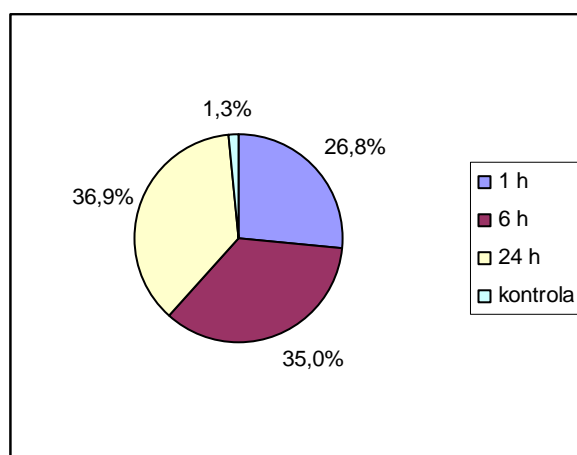
**Broj mikronukleusa**



**Broj pupova**



**Ukupan broj stanica sa MN, pupom i NM**



**Slika 12.** Rezultati udjela pojedinih parametara mikronukleus-testa u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim pčelinjim otrovom u koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 1 sat, 6 sati i 24 sata; MN= mikronukleus; NM= nukleoplazmatski most

## 5. RASPRAVA

Korištenje otrova porijeklom iz različitih organizama ima dugu povijest u tradicionalnoj i alternativnoj medicini. Uz nekoliko izuzetaka, terapije koje se zasnivaju na otrovima iz životinja do danas nisu bile korištene niti prihvaćene od moderne medicine. U novije vrijeme, objavljen je niz članaka koji opisuju povoljne učinke pčelinjeg otrova (Fenard i sur., 2001; Moreira i sur., 2002; Lee i sur. 2004; Jang i sur., 2005).

Povoljni učinci pčelinjeg otrova na širok raspon oboljenja poznati su stoljećima. S povećanjem popularnosti alternativne medicine i prisvajanjem istočnjačke medicine na Zapadu, terapija pčelinjim otrovom dobila je sve veće odobravanje među liječnicima u Europi i Americi. Pčelinji otrov uspješno se koristi za tretiranje oboljenja poput multiple skleroze, astme, polineuritisa, neuralgije, malarije, epilepsije i raznih vrsta reumatizma, te kod zacjeljivanja rana (Krell, 1996). Istraživanja vezana uz različite učinke pčelinjeg otrova uglavnom potječu iz zemalja Azije i istočne Europe, gdje taj oblik terapije, sâm ili u kombinaciji sa drugim oblicima liječenja ima široku primjenu (Lee i sur., 2005).

Kombinacija različitih citogenetičkih metoda može pomoći u procjeni citogenetičkih učinaka proizvoda podrijetlom iz prirode poput pčelinjeg otrova. Te metode omogućuju da se utvrdi razina primarnih oštećenja genetičkog materijala ili dinamika njegovog popravka nakon izlaganja citotoksičnim i/ili genotoksičnim agensima.

U ovom su istraživanju primjenom komet-testa procjenjivane razine oštećenja DNA u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon 10 minuta, 30 minuta, 1 sat, 6 sati i 24 sata izlaganja pčelinjem otrovu u koncentraciji od 100 µg/ml u eksperimentalnim uvjetima *in vitro*. Komet-test ili mikrogel elektroforeza je molekularno-biološka metoda za analizu i kvantificiranje oštećenja DNA te popravka DNA na razini jedne stanice (Collins, 2004). Za detekciju oštećenja DNA komet-testom stanice ne moraju biti mitotski aktivne, što predstavlja prednost pred mikronukleus-testom (Belpaeme i sur., 1996). Zbog svoje brzine, jednostavnosti, osjetljivosti i zahtjeva za malim brojem stanica komet-test je predložen kao jedna od idealnih tehnika za istraživanje učinaka različitih genotoksičnih agensa u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Postoji mnogo modifikacija komet-testa kojima je moguće praćenje popravka stanične DNA, detekcija stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica, te detekcija jednolančanih i dvolančanih lomova DNA, mjesta osjetljivih na lužine i ukriženog povezivanja između

molekula DNA-DNA i DNA-proteina (Olive i sur., 1993; Fairbairn i sur., 1996; Albertini i sur., 2000).

U svrhu utvrđivanja migracije molekule DNA, analizirane su vrijednosti tri parametra komet-testa koji pokazuju razinu oštećenja DNA - dužina repa, repni moment i intenzitet repa. U uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za repni moment. U uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za intenzitet repa. Također u uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u trajanju od 30 minuta, 6 i 24 sata uočena je statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za dužinu repa. Rezultati parametara komet-testa ukazuju na određenu genotoksičnost pčelinjeg otrova u koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$ . Malo je literaturnih podataka vezanih uz genotoksični učinak pčelinjeg otrova na normalne ljudske stanice. Jedno od takvih istraživanja je provedeno od Gajski i Garaj-Vrhovac (2008), te ono potvrđuje rezultate dobivene ovim radom. U navedenom istraživanju ljudski limfociti periferne krvi dobiveni iz zdravog donora izloženi su *in vitro* različitim koncentracijama pčelinjeg otrova (od 5  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom različitih vremenskih perioda (1, 6 i 24 sata). Uočeno je statistički značajno povećanje za dužinu repa i repni moment u uzorcima izloženim pčelinjem otrovu u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak. Rezultati dobiveni komet-testom pokazali su da pčelinji otrov inducira DNA oštećenje i ima genotoksični potencijal na ljudske limfocite periferne krvi *in vitro*. Pčelinji otrov inducira jednolančane i dvolančane lomove DNA u ljudskim limfocitima. Doseg DNA oštećenja ovisi o vremenu izlaganja pčelinjem otrovu i dozi pčelinjeg otrova. Istraživanje provedeno od Lee i sur. (2007) pokazalo je da izlaganje nižim koncentracijama pčelinjeg otrova dovodi do nastanka jednolančanih lomova DNA u ljudskim limfocitima.

Mikronukleus-test je jednostavna, brza i praktična citogenetička metoda koja podjednako uspješno detektira djelovanje i klastogena i aneugena. Mikronukleus je samostalna kromatinska struktura u citoplazmi, potpuno odvojena od jezgre. Nastaje kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi, koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri (Schmid, 1975; Fenech, 2000). Mikronukleusi mogu nastati samo u stanicama koje su prošle diobu. Dodavanje citohalazina B u stanične kulture inhibira citokinezu i omogućuje prepoznavanje stanica koje su prošle jednu diobu jezgre prema njihovom binuklearnom izgledu. Metoda blokiranja citokineze je preciznija i osjetljivija od konvencionalnih metoda pošto na podatke koji su dobiveni njome

ne utječe promijenjena kinetika stanične diobe uzrokovana sa citotoksičnosti testiranih agensa ili suboptimalnim uvjetima u staničnoj kulturi. Može se između ostalog koristiti za mjerenje mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova, nuklearnih pupova, stanične smrti (apoptoze ili nekroze) te indeksa diobe jezgara. Nukleoplazmatski mostovi potječu od dicentričnih kromosoma kod kojih su centromere odvučene prema suprotnim polovima stanice u anafazi te su stoga indikativni za pogrešni popravak DNA, kromosomalni rearanžman ili fuzije krajeva telomera. Širina nukleoplazmatskog mosta može znatno varirati, no obično ne prelazi  $\frac{1}{4}$  dijametra jezgara u stanici. Rijetko se mogu zamijetiti dicentrični anafazni mostovi prije nego što se formira nuklearna membrana, jer stanice brzo nastave kroz anafazu i telofazu, završe citokinezu i napokon dođe do pucanja nukleoplazmatskih mostova kad se stanice kćeri razdvoje. Međutim, kod metode blokiranja citokineze mogu se akumulirati binuklearne stanice sa nukleoplazmatskim mostovima jer je citokineza inhibirana i nuklearna membrana se naposljetku formira oko kromosoma omogućujući da nukleoplazmatski most bude opažen. Nuklearni pupovi predstavljaju mehanizam s kojim stanice uklanjaju amplificiranu DNA te se stoga smatraju pokazateljem moguće amplifikacije gena (Fenech, 2007).

U ovom su istraživanju primjenom mikronukleus-testa procjenjivane razine oštećenja DNA u ljudskim limfocitima periferne krvi nakon 1-satnog, 6-satnog i 24-satnog izlaganja pčelinjem otrovu u koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$  u eksperimentalnim uvjetima *in vitro*. Rezultati učestalosti pojavljivanja mikronukleusa, pupova i nukleoplazmatskih mostova, kao zajedničkog parametra oštećenja genoma stanice, pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u svim vremenima tretiranja u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak, dakle utvrđena je ovisnost o vremenu. To nije bio slučaj kod istraživanja provedenog od Lee i sur. (2007). Naime, oni su uočili tek neznatno povećanje učestalosti pojavljivanja mikronukleusa, što se može objasniti upotrebom puno nižih koncentracija pčelinjeg otrova u njihovom istraživanju u odnosu na ovo istraživanje. U ovom istraživanju uočeno je povećanje broja stanica koje nemaju dobro očuvanu citoplazmu sa povećanjem vremena izlaganja pčelinjem otrovu. Također pri izolaciji limfocita, Histopaque je promijenio boju. Smatra se da je za ovaj i ostale navedene učinke pčelinjeg otrova uvelike odgovoran peptid koji čini 50 % suhe težine pčelinjeg otrova, melitin. Njegova sposobnost da uzrokuje lizu eritrocita i ostalih tipova stanica dobro je dokumentirana. Naime, melitin snažno interaktira sa lipidnim dvoslojima i disruptira ih (Hristova i sur., 2001; Raghuraman i Chattopadhyay, 2007). Također, pčelinji otrov i melitin inhibiraju proliferaciju i dovode do apoptoze malignih staničnih linija što ukazuje na njihovu moguću upotrebu u razvoju antitumorskih lijekova. Protutumorski i



protumetastatski učinak pčelinjeg otrova i melitina uočen je na leukemijskim stanicama L1210 (Killion i Dunn, 1986), ljudskim stanicama melanoma A2058 (Tu i sur., 2008), ljudskim cervikalnim epidermoidnim stanicama karcinoma Ca Ski (Ip i sur., 2008a), ljudskim stanicama raka dojke MCF7 (Ip i sur., 2008b), ljudskim stanicama leukemije U937 (Moon i sur., 2008) i ljudskim stanicama osteosarkoma MG63 (Chu i sur., 2007), ljudskoj staničnoj liniji karcinoma pluća NCI-H1299 (Jang i sur., 2003), malignim ljudskim staničnim linijama glioma (Yang i sur., 2007) i dr.

Rezultati dobiveni ovim radom upućuju na to da visoka koncentracija pčelinjeg otrova (100 µg/ml) uzrokuje staničnu nestabilnost. Buduća istraživanja bilo bi korisno usmjeriti na dublje razumijevanje mehanizma djelovanja pčelinjeg otrova i njegovih sastavnica na ljudske stanice u svrhu primjene u medicini.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Kultura stanica ljudskih limfocita periferne krvi pokazala se osjetljivom na djelovanje visoke koncentracije pčelinjeg otrova (100 µg/ml) u ovisnosti o duljini vremenskog izlaganja.
2. Uzorci izloženi pčelinjem otrovu u vremenskom trajanju od 6 i 24 sata pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za repni moment.
3. Uzorci izloženi pčelinjem otrovu u vremenskom trajanju od 6 i 24 sata pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za intenzitet repa.
4. Uzorci izloženi pčelinjem otrovu u vremenskom trajanju od 30 minuta, 6 i 24 sata pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni netretirani uzorak za dužinu repa.
5. Rezultati komet-testa ukazuju na genotoksični učinak visoke koncentracije pčelinjeg otrova (100 µg/ml) na ljudske limfocite periferne krvi u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak.
6. Rezultati učestalosti pojavljivanja mikronukleusa, pupova i nukleoplazmatskih mostova pokazali su statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) u svim vremenima tretiranja u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak.
7. Rezultati mikronukleus-testa ukazuju na genotoksični učinak visoke koncentracije pčelinjeg otrova (100 µg/ml) na ljudske limfocite periferne krvi u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak.

8. Rezultati upućuju na to da visoka koncentracija pčelinjeg otrova (100 µg/ml) uzrokuje staničnu nestabilnost, te ukazuju na potrebu da se buduća istraživanja usmjere na dublje razumijevanje mehanizma djelovanja pčelinjeg otrova i njegovih sastavnica na ljudske stanice u svrhu primjene u medicini.

## 7. LITERATURA

- Aitken R. J., Gordon E., Harkiss D., Twigg J. P., Milne P., Jennings Z., Irvine D. S. (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of reproduction* **59**: 1037-1046.
- Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E. G., Tice R., Waters M. D., Aitio A. (2000): IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research* **463**: 111-172.
- Ambrose J. T., Atkins E. L., Avitabile A., Ayers G. S., Blum M. S. (2005): The hive and the honey bee. Dadant and sons, Hamilton.
- Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Marušić M., Taradi M., Višnjic D. (2004): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Banduhn N., Obe G. (1985): Mutagenicity of methyl-2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mutation Research* **156**: 199–218.
- Bankova V. (2005): Review: Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM* **2**: 29-32.
- Banks B. E. C., Shipolini A. A. (1986): Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. U: Piek T. (ur.) *Venoms of Hymenoptera*. Academic Press, London, 329-416.
- Banskota A H., Tezuka Y., Adnyana I. K., Midorikawa K., Matsushige K., Kadota S. (2001): Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* **8**: 16–23.
- Barboni E., Kemeny D. M., Campos S., Vernon C. A. (1987): The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*). *Toxicon* **25**: 1097-1103.
- Barbour S. E., Dennis E. A. (1995): Phospholipases. U: Meyers R. A. (ur.) *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*. VCH Publishers, Weinheim-New York, 680-682.

- Bauer L. (1999): Med: pčelarenje i običaji. Pučko otvoreno učilište, Zagreb.
- Belpaeme K., Delbeke K., Zhu L., Kirsch-Volders M. (1996): Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* **11**: 485-492.
- Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M. (1998): Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research* **415**: 167–184.
- Bogdanov S. (2008): Kvalitet voska. *Pčelarski žurnal* **1**: 8-13.
- Boroša Pecigoš T. (2008): Oprašivanje biljaka. *Drvo znanja* **12**: 32-37.
- Borrelli F., Maffia P., Pinto L., Ianaro A., Russo A., Capasso F., Ialenti A. (2002): Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* **73**: 53-63.
- Borsotto M. (2001): Small Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Rat Brain. U: Lopatin A.N., Nichols C.G. (ur.) *Ion Channel Localization: Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa-New Jersey, 75-91.
- Braun J. S., Novak R., Murray P. J., Eischen C. M., Susin S. A., Kroemer G., Halle A., Weber J. R., Tuomanen E. I., Cleveland J. L. (2001): Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by *Pneumococcus*. *The journal of infectious diseases* **184**: 1300-1309.
- Brumen V., Franić Z., Garaj-Vrhovac V. (2002): Ionizirajuće zračenje. U: Šarić M., Žuškin E. (ur.) *Medicina rada i okoliša*. Medicinska naklada, Zagreb, 297-313.
- Bubalo D., Kekez D. (2004): Propolis-sastav i terapijske osobine. *Hrvatska pčela* **123**: 245-247.
- Cajal Y. and Jain M. K. (1997): Synergism between mellitin and phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom: apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. *Biochemistry* **36**: 3882–3893.

- Castaño A., Becerril C., Llorente M. T. (2003): Fish cells used to detect aquatic carcinogens and genotoxic agents. U: Mothersill C., Austin B. (ur.) *In vitro* methods in aquatic toxicology. Springer-Praxis, Chichester, 241-278.
- Castro S. L. (2001): Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee product. *Annual Review in Biochemical Sciences* **3**: 49-83.
- Castro-Concha L. A., Escobedo R. M., de Miranda-Ham M. L. (2006): Measurement of Cell Viability in *In Vitro* Cultures. *Methods in Molecular Biology* **318**: 71-76.
- Chafouleas J. G., Pardue R. L., Brinkley B. R., Dedman J. R., Means A. R. (1981): Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 996–1000.
- Chafouleas J. A., Bolton W. E., Hidaka H., Boyd A. E., Means A. R. (1982): Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell cycle progression. *Cell* **28**: 41-50.
- Chu S. T., Cheng H. H., Huang C. J., Chang H. C., Chi C. C., Su H. H., Hsu S. S., Wang J. L., Chen I. S., Liu S. I., Lu Y. C., Huang J. K., Ho C. M., Jan C. R. (2007): Phospholipase A2-independent  $Ca^{2+}$  entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Sciences* **80**: 364-369.
- Collins A. R., Dusinská M., Gedik C.M., Stětina R. (1996): Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental health perspectives* **104**: 465-469.
- Collins A. R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* **26**: 249-61.
- Comte M., Maulet Y., Cox A. J. (1983):  $Ca^{2+}$ -dependent high-affinity complex formation between calmodulin and melittin *Biochemical Journal* **209**: 269-272.
- CRIOS (2008): Genotoxicity: the micronucleus test. CRIOS-Carcinogenic Risk in Occupational Settings, [http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus\\_test.htm](http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm); pristupljeno 20.12.2010.
- Dimov V., Ivanovska N., Manolova N., Bankova V., Nikolov N., Popov S. (1991): Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie* **22**: 155-162.

- Dorman L. C., Markey L. D. (1971): Solid phase synthesis and antibacterial activity of N-terminal sequences of melittin. *Journal of Medical Chemistry* **14**: 5-9.
- Dotimas E. M., Hider R. C. (1987): Honeybee venom. *Bee world* **68**: 51-70.
- Dunn J. D., Killion J. J. (1988): Melittin-evoked increase in plasma corticosterone levels. *Life Sciences* **43**: 335–343.
- Eastmond D. A., Tucker J. D. (1989): Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutation research* **224**: 517-525.
- Evans H. J., Neary G. J., Williamson F. S. (1959): The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International journal of radiation biology* **1**: 216-229.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* **339**: 37-59.
- Fairbairn D. W., Walburger D. K., Fairbairn J. J., O'Neill K. L. (1996): Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* **18**: 407-416.
- Fanuko M. (2009): Čudesna riznica zdravlja 2. Vaše zdravlje **11**: 68-69.
- Feliz C. (2009): Luxor, postavljeno: listopad 2009., [http://www.travelpod.com/travel-blog-entries/feliz\\_carolina/7/1263738821/tpod.html](http://www.travelpod.com/travel-blog-entries/feliz_carolina/7/1263738821/tpod.html); pristupljeno 20.12.2010.
- Fenard D., Lambeau G., Valentin E., Lefebvre J. C., Lazdunski M., Doglio A. (1999): Secreted phospholipases A<sub>2</sub>, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *The Journal of Clinical Investigation* **104**: 611-618.
- Fenard D., Lambeau G., Maurin T., Lefebvre J.C., Doglio A. (2001): A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A<sub>2</sub> inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with CXCR4 chemokine receptor. *Molecular pharmacology* **60**: 341-347.
- Fenech M., Morley A. A. (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation research* **147**: 29-36.

- Fenech M., Morley A. A. (1989): Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* **4**: 98-104.
- Fenech M. (2000): The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* **455**: 81-95.
- Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* **534**: 65-75.
- Fenech M. (2007): Cytokinesis-block micronucleus cytome assay: a comprehensive „cytome“ approach for measuring chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death simultaneously in one assay. U: Obe G., Vijayalaxmi (ur.) *Chromosomal alterations: methods, results, and importance in human health*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 241-256.
- Fuchs G. (1999): Oxidation of Organic Compounds. U: Lengeler J., Drews G., Schlegel H.(ur.) *Biology of prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 187-232.
- 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. *Journal of Environmental Science and Health* **43**: 1279-1287.
- Galović P. (2009): Zaštitna snaga propolisa. *Vaše zdravlje* **12**: 18-19.
- Ganapathi R., Grabowski D. (1983): Enhancement of sensitivity to adriamycin in resistant P388 leukemia by the calmodulin inhibitor, trifluoperazine. *Cancer Research* **43**: 3696-3699.
- Garaj-Vrhovac V., Kopjar N. (2003): The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis* **18**: 265-271.
- Garnier N., Cren-Olivé C., Rolando C., Regert M. (2002): Characterization of Archaeological Beeswax by Electron Ionization and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**: 4868-4877.
- Gauldie J., Hanson J. M., Shipolini R. A., Vernon C. A. (1978): The structures of some peptides from bee venom. *European Journal of Biochemistry* **83**: 405-410.



- Gerst J. E., Salomon Y. (1987): Inhibition by melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology* **121**: 1766-1772.
- Gerst J. E., Sole J., Salomon Y. (1987): Dual regulation of  $\beta$ -melanotropin receptor function and adenylate cyclase by calcium and guanosine nucleotides in the M2R melanoma cell line. *Molecular Pharmacology* **31**:81–88.
- Ghisalberti E (1979): Propolis: a review. *Bee World* **60**: 59-84.
- Gichner T., Plewa M. J. (1998): Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation research* **401**: 143-152.
- Ginsberg N. J., Dauer M., Slotta K. H. (1968): Melittin used as a protective agent against X-irradiation. *Nature* **220**: 1334.
- Gmachl M., Kreil G. (1995): The precursors of the bee venom constituents apamin and MCD peptide are encoded by 2 genes in tandem which share the same 3'-exon. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 12704–12708.
- Gómez-Caravaca A. M, Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006): Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1220-34.
- Grawé J., Abramsson-Zetterberg L., Eriksson L., Zetterberg G. (1994): The relationship between DNA content and centromere content in micronucleated mouse bone marrow erythrocytes analysed by flow cytometry and fluorescent *in situ* hybridization. *Mutagenesis* **9**: 31–38.
- Habermann E. (1957): Eigenschaften und Anreicherung der Hyaluronidase von Bienengift. *Biochemische Zeitschrift* **329**:1.
- Habermann E., Krusche B. (1962): Action of phospholipases A and C on plasma lipids and erythrocytes *in vivo*. *Biochemical pharmacology* **11**: 400-401.
- Habermann E., Reiz K. G. (1965): Zur Biochemie der Bienengiftpeptide Melittin und Apamin. *Biochemische Zeitschrift* **343**: 192–203.

- Habermann, E., Zeuner, G. (1971): Comparative studies of native and synthetic melittins. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **270**: 1–9.
- Habermann E. (1972): Bee and wasp venoms. Science **177**: 314-322.
- Habermann E., Cheng-Raude D. (1975): Central neurotoxicity of apamin, crotamin, phospholipase A and alpha-amanitin. Toxicon **13**: 465-473.
- Habermann E, Fischer K. (1979): Bee venom neurotoxin (apamin): iodine labeling and characterization of binding sites. European Journal of Biochemistry **94**: 355–364.
- Hait W. N., Weiss B. (1977): Characteristics of the cyclic nucleotide phosphodiesterases of normal and leukemic lymphocytes. Biochimica et Biophysica Acta **497**: 86-100.
- Hait W. N., Grais L., Benz C., Cadman E. C. (1985): Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phenothiazines and melittin. Cancer Chemotherapy Pharmacology **14**: 202-205.
- Han S., Lee K., Yeo J., Kweon H., Woo S., Lee M., Baek H., Kim S., Park K. (2007): Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production stimulated by LPS. Journal of Ethnopharmacology **111**: 176–181.
- Hartman D. A., Tomchek L. A., Lugay J. R., Lewin A. C., Chau T. T., Carlson R. P. (1991): Comparison of antiinflammatory and antiallergic drugs in the melittin- and D49 PLA2-induced mouse paw edema models. Agents and Actions **34**: 84-88.
- Hashimoto K., Nakajima Y., Matsumura S., Chatani F. (2010 ): An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. Toxicology *in vitro* **24**: 208-216.
- Haux P., Sawerthal H., Habermann E. (1967): Sequenzanalyse des Bienengift-Neurotoxins (Apamin) aus seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücken. Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie **348**: 737–738.
- Haux P. (1969): Die Aminosäuresequenz von MCD Peptid, einem spezifisch Mastzellendegranulierenden Peptid aus Bienengift. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie **350**: 536-546.

- Hay F. C., Westwood O. M. R., Nelson P. N., Hudson L. (2002): Practical immunology. Blackwell Publishing Company, Cornwall.
- Heddle J. A., Carrano A V. (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by  $\gamma$ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research* **44**: 63-69.
- Heddle J. A., Benz R. D., Countryman P. I. (1978): Measurement of chromosome breakage in cultured cells by the micronucleus technique. U: Evans H. J., Lloyd D.C. (ur.) *Mutagen-induced Chromosome Damage*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 191-200.
- Hristova K., Dempsey C. E., White S. H. (2001): Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophysical journal* **80**: 801-11.
- Hyre H. M., Smith R. A. (1986): Immunological effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom using BALB/c mice. *Toxicon* **24**: 435-440.
- Ip S. W., Wei H. C., Lin J. P., Kuo H. M., Liu K. C., Hsu S. C., Yang J. S., Mei-Dueyang, Chiu T. H., Han S. M., Chung J. G. (2008a): Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer research* **28**: 833-842.
- Ip S. W., Liao S. S., Lin S. Y., Lin J. P., Yang J. S., Lin M. L., Chen G. W., Lu H. F., Lin M. W., Han S. M., Chung J. G. (2008b): The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* **22**: 237-245.
- Ito H., Hidaka H. (1983): Antitumor effect of a calmodulin antagonist on the growth of solid sarcoma-180. *Cancer Letters* **19**: 215-219.
- Jang M. H., Shin M. C., Lim S., Han S. M., Park H. J., Shin I., Lee J. S., Kim K. A., Kim E. H., Kim C. J. (2003): Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *Journal of pharmacological sciences* **91**: 95-104.
- Jang H. S., Kim S. K., Han J. B., Ahn H. J., Bae H., Min B. I. (2005): Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cell line. *Journal of Ethnopharmacology* **99**: 157-160.

- Jang H. S., Chung H. S., Ko E., Shin J.S., Shin M. K., Hong M. C., Kim Y., Min B. I., Bae H. (2009): Microarray analysis of gene expression profiles in response to treatment with bee venom in lipopolysaccharide activated RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* **121**: 213–220.
- Kammann U., Bunke M., Steinhart H., Theobald N. (2001): A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation research* **498**: 67-77.
- Kanno I., Ito Y., Okuyama S. (1970): Radioprotection by bee venom. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* **29**: 1494-500.
- Killion J. J., Dunn J. D. (1986): Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **139**: 222-227.
- Kim C. M-H. (1997): Apitherapy (bee venom therapy). U: Mizrahi A., Fulder S., Sheinman N.(ur.) *Potentiating Health and Crisis of Immune System*. Plenum Press, New York, 243-270.
- Kim, K. T., Yeo, E. J., Han, Y. S., Nah, S. Y., Paik, H. D. (2005): Antimicrobial, antiinflammatory and anti-oxidative effects of water- and ethanol-extracted Brazilian propolis. *Food Science and Biotechnology* **14**: 474–478.
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., Vanhummelen P. (1997): The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research* **392**: 19-30.
- Kitamura H., Yokoyama M., Akita H., Matsushita K., Kurachi Y., Yamada M. (2000): Tertiapin Potently and Selectively Blocks Muscarinic K<sup>+</sup> Channels in Rabbit Cardiac Myocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **293**: 196-205.
- Knepel W., Gerhards C. (1987): Stimulation by melittin of adrenocorticotropin and beta-endorphin release from rat adenohipophysis *in vitro*. *Prostaglandins* **33**: 479-490.

- Koburova K. L., Michailova S. G., Shkenderov S. V. (1985): Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin- bee venom polypeptide. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica* **11**: 50-55.
- Kreil G., Haiml L., Suchanek G.(1980): Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. *European Journal of Biochemistry* **111**: 49–58.
- Kreil G. (1995): Hyaluronidases- a group of neglected enzymes. *Protein Science* **4**: 1666-1669.
- Krell R. (1996): Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* 124.
- Križanić J. (1997): *I hrana je lijek*. Vlastita naklada, Koprivnica.
- Kubelka V., Altmann F., Staudacher E., Treiter V., Marz L, Hard K., Kamerling J. P., Vliegthart J.F.G. (1993): Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A<sub>2</sub>. *European Journal of Biochemistry* **213**: 1193-1204.
- Kuchler K., Gmachl M., Sippl M. J., Kreil G. (1989): Analysis of the cDNA for phospholipase A<sub>2</sub> from honeybee venom glands: the deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *European Journal of Biochemistry* **184**: 249-254.
- Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Yu., Bankova V., Christov R., Popov S. (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 235–40.
- Kumazawa Sh., Hamasaka T., Nakayama Ts. (2004): Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* **84**: 329–39.
- Kuštrak D. (2005): *Farmakognozija Fitofarmacija*. Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
- Kwon Y. B., Kim H. W., Ham T. W., Yoon S. Y., Roh D. H., Han H. J., Beitz A.J., Yang I. S., Lee J. H. (2003): The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity. *Journal of Neuroendocrinology* **15**: 93–96.

- Lah B., Gorjanc G., Nekrep F. V., Marinsek-Logar R. (2004): Comet assay assessment of wastewater genotoxicity using yeast cells. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **72**: 607-616.
- Laktić Z., Šekulja D. (2008): *Suvremeno pčelarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
- Lariviere W. R., Melzack R. (1996): The bee venom test: a new tonic-pain test. *Pain* **66**: 271–277.
- Lee R. F., Steinert S. (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* **544**: 43-64.
- Lee J. D., Kim S. Y., Kim T. W., Lee S. H., Yang H. I., Lee D. I., Lee Y. H. (2004): Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *The American journal of Chinese medicine* **32**: 361–367.
- Lee J. D., Park H. J., Chae Y., Lim S. (2005): An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2**: 79–84.
- Lee Y.J., Kang S.J., Kim B.M., Kim Y.J., Woo H.D., Chung H.W. (2007): Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-biological Interactions* **169**: 189-97.
- Leroy T., Van Hummelen P., Anard D., Castelain P., Kirsch-Volders M., Lauwerys R., Lison D. (1996): Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of toxicology and environmental health* **47**: 409-422.
- 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*. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **54**: 1083-1089.
- 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.

- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. (2004): *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Lomonte B., Angulo Y., Rufini S., Cho W., Giglio J. R., Ohno M., Daniele J. J., Geoghegan P., Gutiérrez J. M. (1999): Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* **37**: 145-58.
- MacGregor J. T., Wehr C. M., Hiatt R. A., Peters B., Tucker J. D., Langlois R. G., Jacob R. A., Jensen R. H., Yager J. W., Shigenaga M. K., Frei B., Eynon B. P., Ames B. N. (1997): Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutation Research* **377**: 125–135.
- MacManus J. P., Braceland B. M., Rixon R. H., Whitfield J. F., Morris H. P. (1981): An increase in calmodulin during growth of normal and cancerous liver *in vivo*. *FEBS Letters* **133**: 99–102.
- Mader S. S. (1996): *Biology*. The McGraw-Hill Companies Inc., New York.
- Marcucci M. C. (1995): Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**: 83-99.
- Marković-Housley Z., Miglierini G., Soldatova L., Rizkallah P.J., Müller U., Schirmer T. (2000): Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* **8**: 1025-1035.
- Marković-Housley Z., Schirmer T. (2002): Structural evidence for substrate assisted catalytic mechanism of bee venom hyaluronidase, a major allergen of bee venom. U: Teeri T.T., Svensson B., Gilbert H.J., Feizi T.(ur.) *Carbohydrate bioengineering: interdisciplinary approaches*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 19-27.
- Marzin D. (1999): New approaches to estimating the mutagenic potential of chemicals. *Cell Biology and Toxicology* **15**: 359–365.
- Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B. (1999): *Beskralješnjaci biologija viših avertebrata*. Školska knjiga, Zagreb.

- Means A. R., Chafouleas J. A., Lagace L., Lai E., Stein J.P. (1982): Multiple roles for calmodulin in the regulation of eukaryotic cell metabolism. U: O'Malley B.W. (ur.) Gene regulation. Academic Press, New York, 307-326.
- Means A.R. (2000): Calcium and Calmodulin-Mediated Regulatory Mechanisms. U: Conn P.M., Means A.R. (ur.) Principles of molecular regulation. Humana Press, New Jersey, 187-204.
- Miller B. M., Nüsse M. (1993): Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence *in situ* hybridization with telomeric and centromeric DNA probes, and flow cytometry. *Mutagenesis* **8**: 35-41.
- Mio K., Carrette O., Maibach H. I., Stern R.(2000): Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter- $\alpha$ -inhibitor family. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 32413-32421.
- Mitchelmore C. L, Hyatt S. (2004): Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Marine environmental research* **58**: 707-11.
- Mizrahi A., Lensky Y. (1997): Bee products: Properties, application and apitherapy. Plenum Press, New York.
- Moller P., Knudsen L. E., Loft S., Wallin H. (2000): The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**: 1005–1015.
- Moon D.O., Park S.Y., Lee K.J., Heo M.S., Kim K.C., Kim M.O., Lee J.D., Choi Y.H., Kim G.Y. (2007): Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology* **7**: 1092–1101.
- Moon D. O., Park S. Y., Choi Y. H., Kim N. D., Lee C., Kim G. Y. (2008): Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicol* **51**: 112-120.



- Moreira L.A., Ito J., Ghosh A., Devenport M., Zieler H., Abraham E.G., Crisanti A., Nolan T., Catteruccia F., Jacobs-Lorena M. (2002): Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *The journal of biological chemistry* **277**: 40839-10843.
- Mukhopadhyay I., Chowdhuri D. K., Bajpayee M., Dhawan A. (2004): Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **19**: 85-90.
- Nakashima S., Ikeno Y., Yokoyama T., Kuwana M., Bolchi A., Ottonello S., Kitamoto K., Arioka M. (2003): Secretory phospholipases A<sub>2</sub> induce neurite outgrowth in PC12 cells. *The Biochemical Journal* **376**: 655-666.
- Nam K. W., Je K. H., Lee J. H., Han H. J., Lee H. J., Kang S. K., Mar W. (2003): Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Archives of Pharmacal Research* **26**: 383–388.
- Nelson D. A., O'Connor R. (1968): The venom of the honey bee (*Apis mellifera*): Free amino acids and peptides. *Canadian Journal of Biochemistry* **46**: 1221-1226.
- Neumann W., Habermann E. (1954): Beiträge zur Charakterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes. *Naunyn Schmieberg's Archives of Pharmacology* **222**: 367-387.
- Nicolas J. P., Lin Y., Lambeau G., Ghomashchi F., Lazdunski M., Gelb M. H. (1997): Localization of structural elements of bee venom phospholipase A<sub>2</sub> involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 7173-7181.
- Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H., Roth S., Sorsa M., Renzi L., Lindholm C. (1993): Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environmental Health Perspectives* **101**: 139–143.
- Nüsse M., Miller B. M., Viaggi S., Grawé J. (1996): Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent *in situ* hybridization with a centromeric DNA probe. *Mutagenesis* **11**: 405–413.

- Okumara K., Kato T., Ito J., Tanaka R. (1982): Inhibition by calmodulin antagonists of glioblast DNA synthesis and morphological changes induced by glial maturation factor. *Brain Research* **255**: 662-667.
- Olive P. L., Banáth J. P., Durand R. E. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research* **122**: 86-94.
- Olive P. L., Frazer G., Banáth J.P. (1993): Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiation Research* **136**: 130–136.
- Olive P. L. (1999): DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International journal of radiation biology* **75**: 395–405.
- Oršolić N. (2001): Povijest pčelarstva i apiterapije (I). *Priroda* **91**: 34-38.
- Oršolić N., Šver L., Terzić S., Tadić Z., Bašić I. (2003a): Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastazing ability: A possible mode of antitumor action. *Nutrition and Cancer* **47**: 156-163.
- Oršolić N., Šver L., Verstovšek S., Terzić S., Bašić I. (2003b): Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* **41**: 861-870.
- Oršolić N. (2009): Potentiation of Bleomycin Lethality in HeLa and V79 cells by Bee Venom. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **60**: 317-326.
- Ownby C. L., Powell J. R., Jiang M. S., Fletcher J. E. (1997): Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle *in vivo*. *Toxicon* **35**: 67-80.
- Östling O., Johanson K.J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **123**: 291-298.
- Paintz, M., Metzner, J. (1979): Zur lokalanasthetischen wirkung von propolis und einigen inhatsstoffen. *Pharmazie* **34**: 839–841.

- Palma M. S. (2006): Insect Venom peptides. U: Kastin A.J. (ur.) Handbook of biologically active peptides. Elsevier Academic Press, San Diego, 398-396.
- Park H. J., Lee S. H., Son D. J., Oh K. W., Kim K. H., Song H. S., Kim G. J., Oh G. T., Yoon D. Y., Hong J. T. (2004): Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis and rheumatism* **50**: 3504–3515.
- Pastor N., López-Lázaro M., Tella J. L., Baos R., Hiraldo F., Cortés F. (2001): Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis* **16**: 219-223.
- Peck M. L., O'Connor R. (1974): Procaine and other basic peptides in the venom of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of agricultural and food chemistry* **22**: 51-53.
- Peck M. L., O'Connor R., Johnson T. J., Isbell A. F., Martell A. E., McLendon G., Neff R. D., Wright D. A. (1978): Radioprotective potential and chelating properties of glycylhistamine an analog of histamine terminal peptides found in bee venom. *Toxicol* **16**: 690-694.
- Petz B. (1997): Osnovne statističke metode za nematematičare. Naklada Slap, Jastrebarsko.
- Pietta P. G., Gardana C., Pietta A. M. (2002): Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* **73**: 7-20.
- Plavšić F., Žuntar I. (2006): Uvod u analitičku toksikologiju. Školska knjiga, Zagreb.
- Raghuraman H., Chattopadhyay A. (2007): Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Bioscience Reports* **27**: 189–223.
- Ransome H. M. (2004): The Sacred Bee in Ancient Times and Folklore. Dover Publications, New York.
- Saini S. S., Peterson J. W., Chopra A. K. (1997): Melittin binds to secretory phospholipase A<sub>2</sub> and inhibits its enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **238**: 436-442.
- Schaloske R. H., Dennis E. A. (2006): The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta* **1761**: 1246-1259.

- Scheller S., Szaffarski J., Tustanowski J., Nolewajfca E., Stojko A. (1977): Biological properties and clinical application of propolis. *Arzneimittel-Forschung* **27**: 889-90.
- Schmid W. (1975): The micronucleus test. *Mutation Research* **31**: 9-15.
- Schmidt J. O., Buchmann S. L. (2005): Other products of the hive. U: Graham J.M. (ur.) *The hive and the honey bee*. Dadant and sons, Hamilton, 927-988.
- Schulz D. M., Ihling C., Clore G. M., Sinz, A. (2004): Mapping the Topology and Determination of a Low Resolution Three-Dimensional Structure of the Calmodulin-Melittin Complex by Chemical Cross-Linking and High-Resolution FTICRMS: Direct Demonstration of Multiple Binding Modes. *Biochemistry* **43**: 4703-4715.
- Sewald N., Jakubke H. D. (2009): *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH., Weinheim.
- Sharma S. V. (1992): Melittin resistance: a counterselection for ras transformation. *Oncogene* **7**: 193-201.
- Sharma S. V. (1993): Melittin-induced hyperactivation of phospholipase A2 activity and calcium influx in ras-transformed cells. *Oncogene* **8**: 939-947.
- Shipman W. H., Cole L. J. (1967): Increased radiation resistance of mice injected with bee venom one day prior to exposure. *Nature* **215**: 311-312.
- Shipman W. H., Cole L. J. (1967): Increased resistance of mice to X-irradiation after the injection of bee venom. *Nature* **215**: 311-312.
- Shipman W. H., Cole L. J. (1972): Complex formation between bee venom melittin and extract of mouse skin detected by Sephadex gel filtration. *Experientia* **28**: 171.
- Shipolini R., Bradbury A. F., Callewaert G. L., Vernon C. A. (1967): The structure of apamin. *Chemical Communications* **14**: 679-680.
- Shipolini R.A. (1984): *Biochemistry of Bee Venom*. U: Tu, A.T. (ur.) *Handbook of Natural Toxins, Allergens and Other Invertebrate Venoms*. Marcel Dekker Inc., New York, 58-59.
- Shkenderov S., Koburova K. (1982): Adolapin - a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon* **20**: 317-321.

- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* **175**: 184-191.
- Singh R. (2004): *Elements of Entomology*. Rastogi Publications, Meerut.
- Siu W. H. L., Cao J., Jack R. W., Wu R. S. S., Richardson B. J., Xu L., Lam P. K. S. (2004): Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic toxicology* **66**: 381-392.
- Six D. A., Dennis E. A. (2000): The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterisation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1488**: 1-19.
- Somerfield S. D., Stach J. L., Mraz C., Gervais F., Skamene E. (1986): Bee venom melittin blocks neutrophil O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. *Inflammation* **10**: 175-182.
- Song C. C., Lu X., Cheng B. B., Du J., Li B., Ling C. Q. (2007): Effects of melittin on growth and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cell xenografts in nude mice. *Ai zheng* **26**: 1315-1322.
- Speit G., Hartmann A. (1995): The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* **10**: 555-559.
- Staudacher E., Altmann F., Glossl J., Marz L., Schachter H., Kamerling J. P., Hard K., Vliegenthart J. F. G. (1991): GDP-fucose:  $\beta$ -N-acetylglucosamine (Fuc to (Fuc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  6GlcNAc)-Asn-peptide)  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3-fucosyltransferase activity in honeybee (*Apis mellifica*) venom glands. The difucosylation of asparagine-bound N-acetylglucosamine. *European Journal of Biochemistry* **199**: 745-751.
- Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A. F. W. (1997): *Udžbenik botanike za visoke škole: sistematika, evolucija i geobotanika*. Školska knjiga, Zagreb.
- Strižak N. (1996): *Pčele, pčelinji proizvodi i pčelari*. Pčelarsko društvo Željezničar, Zagreb.
- Strong P. N., Wadsworth J. D. F. (2000): Pharmacologically active peptides and proteins from bee venom. U: Rochat H., Martin-Eauclaire M.F. (ur.) *Animal Toxins. Facts and protocols*. Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 127-151.

- Suchanek G., Kreil G., Hermodson M.A. (1978): Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**: 701–704.
- Škenderov S., Ivanov C.(1986): Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje. Nolit, Beograd.
- Taranov G. F. (2006): Hrana i ishrana pčela. Neron, Bjelovar.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and molecular mutagenesis **35**: 206-221.
- Townsend G. F., Lucas C. C. (1940): The chemical nature of royal jelly. Biochemical Journal **34**: 1155-1162.
- Tsuro T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. (1982): Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Research **42**: 4730-4733.
- Tu W. C., Wu C. C., Hsieh H. L., Chen C. Y., Hsu S. L. (2008): Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. Toxicon **52**: 318-329.
- Tulloch, A.P. (1980): Beeswax-composition and analysis. Bee World **61**: 47-62.
- Varanda E. A., Takahashi C. S., Soares A. E. E., Barreto S. A. J. (1992): Effect of *Apis mellifera* bee venom and gamma radiation on bone marrow cells of Wistar rats treated *in vivo*. Brazilian Journal of Genetics **15**: 807-819.
- Varanda E. A., Takahashi C. S (1993): Effect of pretreatment with venom of *Apis mellifera* bees on the yield of gamma-ray induced chromosome aberrations in human blood lymphocytes. Brazilian Journal of Genetics **16**: 551-559.
- Vernon C. A., Hanson J. M., Brimblecombe R. W. (1969): Peptides. British Patent No. 1314823.

- Verschaeve L., Gilles J. (1995): Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **54**: 112-119.
- Vick J. A., Mehlman B., Brooks R., Phillips S. J., Shipman W. (1972): Effect of the bee venom and melittin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. *Toxicon* **10**: 581-586.
- Vick J. A., Shipman W. H. (1972): Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon* **10**: 377–380.
- Voet D., Voet J.G. (1995): *Biochemistry*. John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore.
- Wang C., Chen T., Zhang N., Yang M., Li B., Lu 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 $\alpha$  Kinase-NF $\kappa$ B. *The journal of biological chemistry* **284**: 3804- 3813.
- Watterson D. M., Van Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C. (1976): Calcium-dependent regulatory protein of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2711–2715.
- Wei J. W., Hickie R. A., Klaassen D. J. (1983): Inhibition of human breast cancer colony formation by anticalmodulin agents, trifluoperazine, W-7 and W-13. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **11**: 86-90.
- Wilcox W., Eisenberg D.(1992): Thermodynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Science* **1**: 641–653.
- Yang Z. L., Ke Y. Q., Xu R. X., Peng P. (2007): Melittin inhibits proliferation and induces apoptosis of malignant human glioma cells. *Nan fang yi ke da xue xue bao* **27**: 1775-1777.
- Yin C. S., Lee H. J., Hong S. J., Chung J. H., Koh H. G. (2005): Microarray analysis of gene expression in chondrosarcoma cells treated with bee venom. *Toxicon* **45**: 81–91.

Yoon S. Y., Kim H. W., Roh D. H., Kwon Y. B., Jeong T. O., Han H. J., Lee H. J., Choi S. M., Ryu Y. H., Beitz A. J., Lee J. H. (2005): The anti-inflammatory effect of peripheral bee venom stimulation is mediated by central muscarinic type 2 receptors and activation of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Research* **1049**: 210–216.