

Određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu metodom tekućinske kromatografije

Soldić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:835550>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ana Soldić

**ODREĐIVANJE UDJELA MELITINA U PČELINJEM OTROVU
METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode I
Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 28. rujna 2018.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Blanka Bilić Rajs*

Određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu metodom tekućinske kromatografije

Ana Soldić, 410-DI

Sažetak:

Pčelinji otrov jedan je od tri proizvoda kojeg pčele same sintetiziraju, a njegova glavna sastavnica je peptid melitin (oko 50 % suhe tvari otrova) kojemu se, kao i samom otrovu, pripisuju brojna farmakološka i toksikološka svojstva. Melitin je linearni peptid kojeg čini 26 aminokiselina i odgovoran je za osjet boli prilikom uboda. Određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu u ovom radu provedeno je metodom visokotlačne tekućinske kromatografije uz detektor s nizom dioda. Osim toga provedena je i usporedba dva načina sakupljanja otrova sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu i skupljačima postavljenim unutar košnice. Rezultati istraživanja pokazali su da je srednja vrijednost udjela melitina u analiziranim uzorcima iznosila $61,99 \pm 2,95\%$ te da način sakupljanja nije imao značajan utjecaj na udio melitina u otrovu. Međutim, značajno veća masa otrova po košnici i terminu sakupljanja dobivena je upotrebom skupljača postavljenih unutar košnice.

Ključne riječi: pčelinji otrov, melitin, HPLC, uvjeti sakupljanja

Rad sadrži: 45 stranica
13 slika
5 tablica
0 priloga
44 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita

1.	prof. dr. sc. <i>Ljiljana Primorac</i>	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Zlatko Puškadija</i>	član
4.	prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	zamjena člana

Datum obrane: 25. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Food Quality
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Science and Nutrition

Scientific area: Biotechnical science

Scientific field: Food technology

Course title: Instrumental methods of analysis I

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI. held on September 28, 2018

Mentor: *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Blanka Bilić Rajs*, PhD

Determination of Melittin Content in Honeybee Venom by Liquid Chromatography

Ana Soldić, 410-DI

Summary:

Honeybee venom is one of the three products synthesized by the bees. The main component, peptide melittin (50% of dry weight) is known for its numerous pharmacological and toxicological properties, just like the venom itself. Melittin is a linear peptide consisting of 26 amino acids and is responsible for causing pain sensation during the sting. In this paper assessment of melittin was performed by high pressure liquid chromatography with absorbance detector. Besides, a comparison of two different methods of collecting honeybee venom, one by setting the collector at the entrance of the hive and the other inside the hive was performed. Results showed mean value of melittin content in the analyzed samples was $61,99 \pm 2,95\%$ and that the collecting method had no significant influence on the content of melittin in the honeybee venom. However, significantly higher mass was collected per hive and per date by using collectors inside the hive.

Key words: honeybee venom, melittin, HPLC, collecting conditions

Thesis contains: 45 pages
13 figures
5 tables
0 supplements
44 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|---|--------------|
| 1. | <i>Ljiljana Primorac</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. | <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. | <i>Zlatko Puškadija</i> , PhD, prof. | member |
| 4. | <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: September 25, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Ovaj rad je sufinanciralo Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
projektom UNIOS-ZUP 2018-9*

Velika hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na pomoći, trudu, vremenu, savjetima koje mi je pružila tijekom mojeg fakultetskog obrazovanja, hvala na darovanom povjerenju i znanju koje mi je prenijela.

Hvala svim profesorima, asistentima i suradnicima na pomoći i prenesenom znanju.

Nadam se da ću opravdati Vaše povjerenje!

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju.

*I najljepša hvala mom suprugu Mariu i vječnoj inspiraciji
– kćeri Leori, uz vas je sve moguće!*

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	PČELINJI OTROV	4
2.2.	SAKUPLJANJE PČELINJEG OTROVA.....	6
2.3.	KEMIJSKI SASTAV I KVALITETA OTROVA	8
2.5.	INTERAKCIJA PČELINJEG OTROVA I MELITINA I ORGANIZMA.....	13
2.6.	PREGLED ANALIZA PČELINJEG OTROVA I MELITINA	17
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1.	ZADATAK	21
3.2.	UZORCI PČELINJEG OTROVA	21
3.3.	HPLC METODA.....	21
4.	REZULTATI	24
5.	RASPRAVA	34
6.	ZAKLJUČCI	38
7.	LITERATURA	40

Popis kratica, oznaka i simbola

LC	tekućinska kromatografija (eng. liquid chromatography)
HPLC	visoko tlačna/djelotvorna tekućinska kromatografija (eng. high pressure performance liquid chromatography)
CE	kapilarna elektroforeza (eng. capillary electrophoresis)
SEC	kromatografija isključenjem (eng. size exclusion chromatography)
PLA2	fosfolipaza A2 (eng. phospholipase A2)
MCD peptid	peptid koji degranulira mastocite (eng. mast cell degranulating peptid)
TFA	trifluoroctena kiselina (eng. trifluoroacetic acid)
ACN	acetonitril (eng. acetonitrile)
MRSA	meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
LOX	lipooksigenaza (eng. lipoxygenase)
COX	ciklooksigenaza (eng. cyclooxygenase)

1. UVOD

Apis mellifera je europsko-afrička medonosna pčela koja nastanjuje područje Europe i Afrike, pretpostavlja se da su se današnje podvrste ove pčele razvile prije 10 000 - 15 000 godina, potječe iz Afrike, a u Europu se raširila preko Bliskog Istoka. Tijekom 16. i 17. stoljeća europski osvajači i kolonizatori su je raširili po svijetu. Ova vrsta obuhvaća oko 25 podvrsta, od kojih su najvažnije tamna ili sjeverna pčela (*Apis mellifera mellifera*), talijanska žuta pčela (*Apis mellifera ligustica*) i kranjska siva pčela (*Apis mellifera carnica*). Žive u zajednicama koje mogu obuhvaćati od 60 000 do 80 000 članova, od kojih su većina ženke radilice, nekoliko stotina članova broje mužjaci-trutovi te jedna plodna pčela, odnosno matica (Weiss, 2002).

Uz višestoljetno poznavanje dobrobiti pčelinjih proizvoda posljednjih godina sve češće u fokus istraživanja dolazi pčelinji otrov koji je, uz vosak i matičnu mliječ, jedan od tri sastojaka koje pčele same sintetiziraju, dok su med, propolis i pelud biljni produkti koje pčele modificiraju za vlastitu upotrebu. Najveći udio suhog otrova čini peptid melitin, tu su još i peptid apamin, enzimi fosfolipaza A, hijaluronidaza, zatim ugljikohidrati, fosfolipidi i neke hlapive komponente (Erler i Moritz, 2016). Melitin se sastoji od 26 aminokiselina, odgovoran je za izazivanje boli prilikom uboda, a sve češće se mogu naći istraživanja koja dokazuju njegov pozitivan utjecaj na razne bolesti, među kojima se najvažnijim smatra smanjenje karcinogenih tvorevina (Rady i sur., 2017). Mogući negativan utjecaj melitina na okolna tkiva nastoji se smanjiti pakiranjem melitina u nanočestice, koje omogućuju da se njegovo djelovanje ograniči samo na tkiva od interesa sprječavajući kontakt melitina s membranama zdravih stanica i odgađajući vrijeme njegova djelovanja (Soman i sur., 2009).

Literatura navodi različite tehnike analize sastava pčelinjeg otrova i određivanja udjela melitina, među kojima su kromatografija, spektroskopija i elektroforeza, kao i kombinacije navedenih tehnika. Najvažnija i najčešće korištena metoda određivanja udjela melitina je visoko djelotvorna tekućinska kromatografija s apsorpcijskim detektorom koja se koristi zbog brzine, točnosti i jednostavnosti primjene (Szokan i sur., 1994; Pacakova i sur., 1995; Rybak-Chmielewska i Szczesna, 2004; Kokot i Matysiak, 2009; Matysiak i sur., 2016).

Cilj ovog rada je odrediti udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova HPLC metodom te utvrditi postoje li razlike u udjelu melitina u uzorcima koji su sakupljeni sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu i skupljačima postavljenim unutar košnice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PČELINJI OTROV

Pčelinji otrov ili apitoksin je gusta, bijelo-žućkasta, gotovo prozirna tekućina, koja sušenjem prelazi u praškastu, bijelu krutinu (**Slika 1**). Proizvodnja otrova započinje kada pčela dostigne starost od dva do tri dana, a svoj vrhunac dostiže kod starosti dva do tri tjedna nakon čega lagano opada. Najveći udio svježeg otrova zauzima voda koja čini 55 – 70 %, specifična gustoća iznosi 1,13, a pH vrijednost 4,5 - 5,5. Pri niskim temperaturama je stabilan, a pri izlaganju sunčevoj svjetlosti i visokoj temperaturi dolazi do njegova uništavanja. Kao najbolji način očuvanja otrova navodi se smrzavanje na -20 °C, gdje može biti pohranjen i do pet godina bez gubitka toksičnosti, ali uz gubitke ljekovitih svojstava (Bogdanov, 2017).



Slika 1 Pčelinji otrov (Soldić, 2019)

Otrov nastaje produkcijom u otrovnim žlijezdama medonosnih pčela te im služi kao obrana od neprijatelja, ali i kao signal upozorenja drugim pčelama u blizini zbog hlapljivih komponenata (feromona) koji se oslobađaju njegovim ispuštanjem (Gajski, 2012). Anatomski gledano pčelin abdomen sastoji se od sedam vanjskih segmenata i tri unutarnja koji čine šupljinu i zapravo su nastali smanjenjem i evolucijskim promjenama osmog, devetog i desetog abdominalnog segmenta koji se u izvornom obliku i danas nalazi kod trutova, oni su

presavijani k unutrašnjosti, iako čine dio vanjskog dijela tijela i djeluju poput „ladice“ povezane sa žalčanim aparatom te prilikom uboda dolazi do izlaska žalca iz žalčane šupljine zajedno s tri skrivena segmenta pčelina abdomena. U slučaju opasnosti i potrebe za napadom pčelin žalčani aparat prima signal preko živčanog sustava i dolazi do savijanja abdomena uzrokovanog mišićnim kontrakcijama. Pomicanjem nogu i savijanjem abdomena zupci, na iglicama žalca, okrenuti prema gore stvaraju pritisak koji pomaže prodoru žalca dublje u kožu ili stjenku neprijatelja, pri čemu pčela ispušta otrov pohranjen u otrovnoj žlijezdi. Prilikom uboda pčela povlači svoj žalac nazad, međutim, kod uboda sisavaca njezin žalac zapinje za njihovu elastičnu kožu te dolazi do kidanja žalčanog aparata i zadnjeg dijela abdomena pčele, pri čemu žalac i dalje ispušta otrov u neprijatelja, a pčela u kratkom roku ugiba (Snodgrass, 1910; Wu i sur., 2014; Bogdanov, 2017).

2.2. SAKUPLJANJE PČELINJEG OTROVA

Literaturni podaci pokazuju da se većina istraživanja provodi na skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu, što dovodi do sakupljanja otrova s mnogo nečistoća, na što upućuju rezultati analiza koji pokazuju da udio melitina u pojedinim istraživanjima varira od 27,66 – 70,15 % (Rybak i sur., 2004; Ionete i sur., 2013). Stoga se istražuju i drugi uvjeti i načini sakupljanja kako bi se dobio otrov s manje nečistoća.

Benton i sur. (1963) opisali su različite načine sakupljanja otrova korištenjem električne struje kao inicijatora pčelinog uboda. Pioniri ovakvog načina prikupljanja bili su Marković i Molnar, koji su 1954. godine napravili uređaj koji se sastojao od dva okretna cilindra koji bi uhvatili pčelu na njezinu povratku u košnicu, pri čemu bi bila izložena elektrošokovima i pritisnuta što bi izazvalo ubadanje i ispuštanje otrova kroz gumenu pregradu na filter papir koji se nalazio ispod nje. Filter papir zaštitio bi otrov od kontaminacije tjelesnim tekućinama i organima pčele koja bi na ovaj način bila ubijena. Benton i sur. (1963) modificirali su uređaj Markovića i Molnara na način da se ubod inicirao zatvaranjem strujnog kruga kada bi pčela dotaknula žice na skupljačima, te na taj način nije morala biti ubijena. Na ovaj način bilo je moguće koristiti iste skupljače u više košnica nakon čega bi se otrov sušio i sastrugao sa staklenih ploča.

Fakhim-Zadeh (1990, 1998) napravio je dva uređaja sličnih karakteristika, ali različitih dimenzija, nalik kutijama u kojima su pčele bile zatvorene prilikom sakupljanja. Prvi, manji uređaj napravljen je 1990., a u unutrašnjosti je imao štap koji je pčelama služio kao mjesto odmora. Ovakva izvedba uređaja omogućavala je obradu jedne košnice u zadanom vremenu prikupljanja, što je pored male veličine autor smatrao najvećom manom, stoga je 1998. godine napravio veći uređaj, dimenzija pčelinjeg medišta. Novi uređaj imao je poklopac načinjen od plastične mreže koji nije bio pod naponom, te bi pčele prilikom hodanja po njemu upale u uređaj te je slijedilo sakupljanje otrova u intervalima, nakon čega su pčele ostavljene još 5 minuta u uređaju kako bi se odmorile i jele pogaču pripremljenu na štapu za odmor u središtu uređaja. Glavna prednost ovog uređaja je prikupljanje otrova iz dva ili tri društva.

Brandeburgo (1992) spario je uređaj za mjerenje stupnja obrane pčelinjeg društva s uređajem za prikupljanje otrova nalik onome koji su napravili Benton i sur. (1963). Ovaj se uređaj sastojao od drvene kutije s akrilnim stranicama i poklopcem u koju bi pčele ušle i bile zadržane

unutar kutije do kraja procesa prikupljanja, na taj način osobe zadužene za prikupljanje uzoraka bile su zaštićene od uboda pčela. Uređaji su bili postavljeni na ulazu u košnice te bi pčele na povratku u nju ulazile u uređaj.

Sanad i Mohanny (2013) u svom su radu predstavili podatke prikupljanja otrova na 20 pčelinjih društava, a eksperiment je proveden u periodu od ožujka do studenog 2012. godine u Egiptu. Autori su ispitivali sigurnost uređaja, otrov je sakupljan 4 puta na dan svaka 3 dana, i to u vremenskim intervalima 4 - 6, 9 - 11, 13 - 15, 16 - 18 h, nakon čega je vagan i označavan, a istovremeno su prebrojane i mrtve pčele unutar košnice. Rezultati su pokazali kako postoje značajne razlike u masi otrova u odnosu na vrijeme prikupljanja u danu, u mjesecu u godini, ali i godišnjem dobu, pa su se kao najbolje vrijeme za prikupljanja otrova tijekom dana pokazali poslijepodnevni period 16 - 18 h sa srednjom vrijednošću prikupljenih uzoraka 0,166 g/dan i ranojutarnji 4 - 6 h s 0,118 g/dan. Najbolji mjesec prikupljanja pokazao se kolovoz s 0,185g/dan te ljeto kao godišnje doba s 0,161 g/dan. U periodu prikupljanja od 13 do 15h najmanji broj pčela je uginuo (26,74 uginule pčele/dan), te se navodi kao optimalan po pitanju sigurnosti društva.

Elektrostimulacija je godinama napredovala kao način prikupljanja otrova, te se danas metode nastale modifikacijama Bentonova uređaja koriste gotovo kao standard, jer omogućuju prikupljanje i do 1 g otrova u periodu od 1 do 2 sata rada, na 20 pčelinjih društava. Kao najučinkovitiji interval prikupljanja otrova navode se ciklusi 15-minutne stimulacije tijekom tri dana, svaka 2 do 3 tjedna, jer zbog stimulacije pčele mogu ostati uznemirene i do tjedan dana nakon prikupljanja (Ali, 2012).

2.3. KEMIJSKI SASTAV I KVALITETA OTROVA

Sastav pčelinjeg otrova ovisi o brojnim čimbenicima kao što su starost pčele, vrijeme i metoda prikupljanja te kasnije rukovanje (El-Wahed i sur., 2018).

Tablica 1 Kemijski sastav suhog otrova (Bogdanov, 2017*; Rady, 2017**)

Vrsta molekule	Komponenta	Udio (% s.tv.)*	Udio (% s.tv.)**
Proteini (enzimi)	Fosfolipaza A2	10 - 12	10 - 12
	Fosfolipaza B	1	1
	Hijaluronidaza	1 - 2	1,5 - 2
	Fosfataza	1	1
Peptidi	Melitin	40 - 50	40 - 50
	Apamin	2 - 3	2 - 3
	MCD*** peptid	2 - 3	2 - 3
	Pamin	1 - 3	1 - 3
	Inhibitori proteaza	0,1 - 0,8	<0,8
Aminokiseline	γ-aminomaslačna kiselina	> 1	0,13 - 1
	α-amino kiseline	> 1	0,1 - 0,7
Biogeni amini	Histamin	0,5 - 2	1,5
	Dopamin	0,2 - 1	0,13 - 1
	Noradrenalin	0,1 - 0,5	0,1 - 0,7
Feromoni	Kompleksni eteri	4 - 8	4 - 8
Ugljikohidrati	Glukoza, fruktoza	2 - 4	2 - 4

MCD*** - Peptid koji degranulira mastocite

Pčelinji otrov je smjesa proteina, peptida, enzima, biogenih amina i drugih bioaktivnih tvari, a u **Tablici 1** prikazani su literaturni podaci, među kojima je vidljivo da je peptid melitin najzastupljenija komponenta suhog otrova te čini otprilike 40 – 50 % njegove suhe tvari, iako prema pojedinim istraživanjima udio melitina može iznositi i do 70 % (Rybak-Chmielewska i Szczesna, 2004). Ostale značajnije komponente su enzim fosfolipaza A2 koja čini 10 – 12 % suhe tvari te manje zastupljeni enzimi hijaluronidaza, fosfolipaza B i fosfataza, peptidi apamin

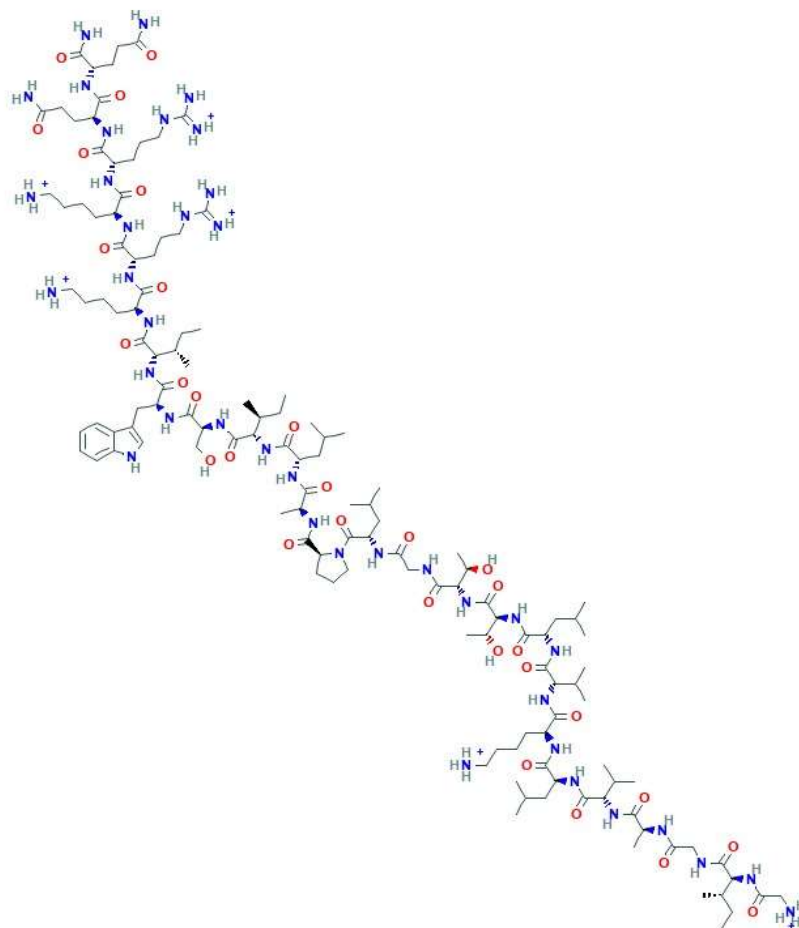
i MCD peptid čiji se udio kreće u rasponu 1 – 3 % suhe tvari otrova, a uz polimere aminokiselina u otrovu se mogu naći i hlapive komponente (feromoni) koji čine 4 – 8 %. Ugljikohidrati, glukoza i fruktoza zauzimaju 2 – 4 % te nisu sastavni dio pčelinjeg otrova, ali se u njemu mogu naći ako se prilikom prikupljanja otrova ne koriste skupljači koji sprječavaju kontaminaciju peludom i nektarom (Bogdanov, 2017).

Mlade pčele proizvode otrov s niskim udjelom melitina i histamina. Udio melitina se s vremenom povećava i dostiže svoj vrhunac u četvrtom tjednu života pčele s otprilike 500 µg po ubodu nakon čega između petog i šestog tjedna života udio melitina opada za 50%, dok se visok udio histamina javlja oko 35. dana života (El-Wahed i sur., 2018). Otrovi mlade pčele imaju nizak udio fosfolipaze A2 (PLA2), čiji se udio svakodnevno povećava i doseže maksimalne vrijednosti između 7 i 10 dana života, nakon čega vrijednost ostaje ista. Razlike u kemijskom sastavu otrova su očite i s obzirom na vrijeme prikupljanja otrova. Najviše vrijednosti udjela melitina u pčelinjem otrovu uočene su tijekom ljeta, pa tako najviše vrijednosti dostiže u kolovozu, a najniže u lipnju. Udio melitina i PLA2 u pčelinjem otrovu općenito je veći tijekom ljeta, a niži zimi. Izomer melitina, melitin-S ima nizak udio u suhom pčelinjem otrovu, svega 1 – 2 %, međutim, autori navode da sastav otrova uvelike ovisi o ishrani pčela, pa udio ovog izomera raste u zimskom periodu i do 10 %. Razlike u kemijskom sastavu otrova uočene su i između podvrsta pčela, ali i između matice i pčele radilice. Afrička pčela za razliku od europske proizvodi manje otrova, koji sadrži manje melitina i hijaluronidaze, no veći udio PLA2. Usporedbom otrova matice, koja svoj otrov koristi za borbu isključivo s drugim maticama i pčele radilice, vidljivo je da otrov matice sadrži više histamina, no manje melitina i apamina (El-Wahed i sur., 2018).

Službenog standarda za kontrolu kvalitete pčelinjeg otrova nema, a razlog leži u tome što pčelinji otrov nije klasificiran niti kao lijek niti kao hrana, no ipak neke zemlje poput Rusije su izdale zahtjeve za kvalitetu koji obuhvaćaju određivanje ogranoleptičkih svojstava, udjela vode, tvari netopljivih u vodi, vrijeme potrebno za hemolizu te aktivnost enzima PLA2 i hijaluronidaze (Krell, 1996; Bogdanov, 2017). Bogdanov (2017) opisuje prijedlog kriterija za kontrolu kvalitete koji koriste farmaceutske tvrtke, koji uključuje određivanje šećera, vode, tvari netopljivih u vodi, melitina, aktivnosti PLA2, hijaluronidaze, inhibitora proteaza i melitina, provođenje radio-imuno testa te određivanje LD₅₀ kao pokazatelja toksičnosti.

2.4. MELITIN

Melitin je linearni polipeptid formule $C_{131}H_{228}N_{38}O_{32}$ kojeg čini 26 aminokiselina, sekvence 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 (**Slika 2**). Po svojoj strukturi je amfoterna molekula čiji N-terminalni kraj čini 20 aminokiselina hidrofobnog karaktera, a C-terminalni kraj čine bazične aminokiseline. U vodenim otopinama niske ionske jakosti i koncentracije melitin se nalazi u obliku monomera. Monomerni lanci mogu povezati u tetramernu strukturu koja zauzima oblik α -uzvojnice u otopinama povišene pH vrijednosti, povišene ionske jakosti i koncentracije više od 4 mM. Svaki melitinski lanac sastoji se od dvije α -uzvojnice, a po izgledu nalikuje na savijeni štap (Terwilliger i Eisenberg, 1982; Gajski, 2012).



Slika 2 Kemijska struktura melitina (PubChem, 2019)

Melitin ima razna biološka, farmakološka i toksikološka djelovanja od kojih su najvažniji antitumorsko, antibakterijsko, antifungalno, protuupalno i hemolizirajuće djelovanje, toksičan je za enterocite, eritrocite, limfocite i timocite. S obzirom na kemijsku strukturu ima snažnu membransku i površinsku napetost te se smatra prirodnim detergentom, koji se zbog svojih amfipatskih sposobnosti lako može ugraditi u staničnu membranu i pri tome stvarati tetramerne nakupine kao pore za ione uzrokujući pri tome deformaciju membrane (Gajski, 2012; Chen i sur., 2016). Njegov dimerni oblik, također, dovodi do destabilizacije umjetnog fosfolipidnog dvosloja te dovodi do pucanja i deformacije takve membrane, dok s druge strane monomerni oblik ne pokazuje ovakva svojstva (El-Wahed i sur., 2018). Melitin aktivira receptore za bol (nociceptore), direktno ili indirektno, aktivacijom PLA2 ili putem pora koje stvara u membranama. On utječe na aktivaciju vaniloidnog (TRPV1) receptora, koji je odgovoran za toplinski podražaj i bol, putem prostaglandina koji nastaju kao međuprodukti metaboličkog puta fosfolipaza A2-lipooksigenaza/ciklooksigenaza (PLA2-LOX/COX). Istovremeno se kroz pore koje melitin tvori u membrani otpuštaju algogeni i proupalni medijatori i dovode do aktivacije nociceptora preko zmijskih (7TM) receptora koji uzrokuju otvaranje prolaznih receptorskih kanala za potencijal (TRP) kanala koji pripadaju istoj skupini receptora kao i TRPV1 receptori. Aktivaciju nociceptora održava povišena koncentracija Na⁺ iona koja utječe na dugotrajno izbijanje akcijskog potencijala uzrokujući plastične promjene u neuronima što rezultira preosjetljivošću na toplinske i mehaničke podražaje (Chen i sur., 2016).

Osim melitina u pčelinjem otrovu se mogu naći i njegovi analozi čiji su sljedovi aminokiselina prikazani na **Slici 3**. Jedan od njih je i melitin-S, izoliran od afričke pčele, a razlikuje se od melitina po tome što umjesto aminokiseline Thr ima Ser na 10. mjestu u aminokiselinskom slijedu. Melitin-F ili fragment melitina ima slijed od 19 aminokiselina, odnosno s N-terminalnog kraja nedostaje mu 7 aminokiselinskih ostataka (El-Wahed, 2018).

Melittin	1	GIGAVLKVLT TGLPALISWIKRKRQQ	26
Melittin-S	1	GIGAVLKV LSTGLPALISWIKRKRQQ	26
Melittin-F	1	----- VLTTGLPALISWIKRKRQQ	19

Slika 3 Aminokiselinski slijed melitina i njegovih analoga (El-Wahed i sur., 2018)

Kemijska sinteza melitina važna je zbog visokog prinosa i mogućnosti promjene nekih svojstava, kao što su izazivanje alergijske reakcije, jače ili slabije djelovanje na različite organizme, ali i zbog utjecaja na pčelinje društvo. Sama sinteza provodi se pomoću dva mehanizma sinteze peptida na čvrstom nosaču, a oba daju visok prinos melitina i melitin visoke čistoće. Sintetizirani su melitin 12-26, melitin 12-25, melitin 12-24 koje karakterizira visoka čistoća (> 95 %), MCF analog koji ne pokazuje snažna antimikrobna svojstva u kontaktu s mikroorganizmima kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, MCFA analog koji daje nešto bolje rezultate u kontaktu s *Bacillus subtilis* te melitin-a, melitin-l, melitin-f i melitin-k koji imaju čistoću i do 98 % (El-Wahed i sur., 2018).

Litička aktivnost melitina je s godinama istraživanja dovela do mogućnosti „pakiranja“ melitina u nanočestice kako bi se izbjegla njegova prerana interakcija s membranama i tkivima te omogućila sporije otpuštanje melitina na željenim mjestima kao što su karcinomi ili žarišta infektivnih bolesti. Soman i sur. (2009) opisuju nakupljanje melitina, nošenog nanočesticama, u stanicama tumora laboratorijskih miševa uz drastično smanjenje tumora, te preporučuju daljnja istraživanja o upotrebi nanočestica kao nosača melitina.

2.5. INTERAKCIJA PČELINJEG OTROVA I MELITINA I ORGANIZMA

Korištenje pčelinjih proizvoda u terapijske svrhe započelo je prije više od 6000 godina u starom Egiptu o čemu svjedoče hijeroglifi u hramu u mjestu Karnak, dok su prvi pisani zapisi o upotrebi pčelinjeg otrova nađeni u staroj Grčkoj među spisima Hipokrata, Aristotela, Galena i Plinija. Upotreba otrova kao lijeka bila je široko rasprostranjena, pa se tako koristio za liječenje neuralgija, reumatizma, upale živaca, za sniženje krvnog tlaka, kolesterola, za ublažavanje boli te za brojna druga stanja. Najčešće se radilo o direktnom ubodu pčele na bolno mjesto, dok se u orijentalnoj medicini koristila apipunktura, odnosno ubodi pčela na akupunkturne točke. Napretkom tehnologije i razvijanjem metoda za prikupljanje otrova terapija se počinje provoditi ubrizgavanjem otrova pomoću injekcije (Gajski, 2012).

Opća populacija ubod pčela najčešće povezuje s alergijskim reakcijama, no istraživanja pokazuju kako tek 1 % svjetske populacije razvija alergijske reakcije na pčelinji otrov. Kao glavne alergene navode se PLA₂, apamin i hijaluronidaza (Bilo i sur., 2005). Reakcije koje se javljaju kao odgovor organizma na ubod mogu se podijeliti na normalne lokalne reakcije, jake lokalne reakcije, sistemske anafilaktičke reakcije, sistemske toksične reakcije i neuobičajene reakcije. Najčešće su jake lokalne reakcije koje se očituju oticanjem na mjestu uboda, promjera više od 10 cm koje traje duže od 24 h. Iako točan mehanizam ovih reakcija još uvijek nije razjašnjen, pretpostavlja se da se radi o IgE i/ili stanično posredovanim alergijskim reakcijama (Bilo i sur, 2005; Ali, 2012). Park i sur. (2015) proveli su veliku meta analizu u kojoj su obuhvatili 145 istraživanja koja prikazuju liječenje raznih oboljenja pčelinjim otrovom te prikazali nuspojave takve terapije, koje uključuju sistemske reakcije organizma, probleme na koži i druge nuspojave. Poseban naglasak treba staviti na edukaciju osoba koje provode terapiju, a nuspojave koje se javljaju trebalo bi detaljnije pratiti i opisati prema smjernicama za pisanje izvješća o kliničkom pokusu (CONSORT smjernice).

Protuupalno djelovanje

Pri visokim koncentracijama melitin djeluje prouupalno uzrokujući bol i svrbež na koži, no pri niskim dozama on djeluje protuupalno zahvaljujući inhibiciji prouupalnih citokina, blokirajući

njihove primarne signalne puteve, što rezultira smanjenom upalom zglobova, kože, jetara i drugih tkiva (Wehbe i sur., 2019). Brojna istraživanja podupiru tezu da melitin olakšava simptome nezaraznih upalnih bolesti poput reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, astme, tako npr. kao način djelovanja melitina na liječenje artritisa razni autori navode blokiranje proupalnih citokina: dušikova monoksida (NO), faktora nekroze tumora- α (TNF- α) te ciklooksigenaze-2 (COX-2) (Son i sur., 2007; Bogdanov, 2017).

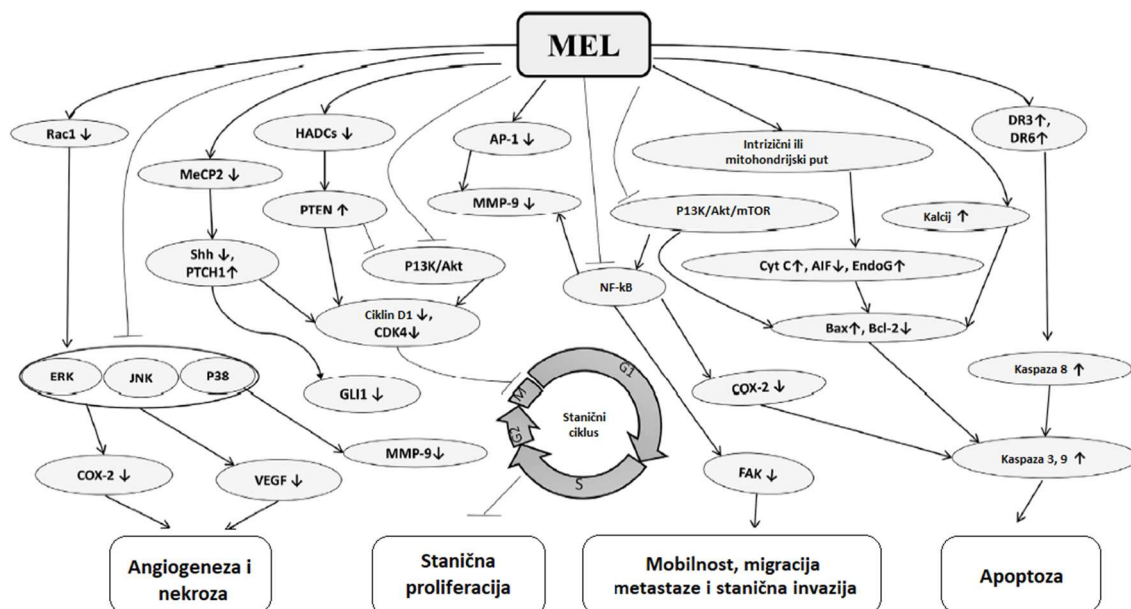
Antimikrobno djelovanje

Pčelinji otrov se od davnina koristio kao antibiotsko sredstvo. Antibiotsko djelovanje su Hegazi i sur. (2015) dokazali na Gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*) i Gram negativnim (*Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*) bakterijama. Memariani i sur. (2019b) opisuju jako antibiotsko djelovanje melitina protiv planktonskih bakterija i biofilmova, ali i sinergističkom djelovanju melitina i antibiotika, te mogućnosti njegove upotrebe kako u veterinarstvu, agrokulturi, tako i u kliničkoj mikrobiologiji. Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) jedna je od najpoznatijih bakterija otpornih na djelovanje antibiotika, stoga su Choi i sur. (2015) ispitali učinak pčelinjeg otrova i izoliranog melitina *in vivo* na MRSA-om zaraženim miševima. Njihovi rezultati pokazali su da, unatoč rezultatima ostvarenim *in vitro* istraživanjima, pčelinji otrov ne dovodi do izlječenja infekcijom MRSA, nego čak povećava smrtnost kod testnih životinja, dok izolirani melitin pokazuje snažno antibiotsko djelovanje te smanjuje smrtnost kod sepse izazvane MRSA infekcijom i potpomaže oporavak kožnih rana nastalih istom.

Pozitivne rezultate melitin pokazuje i u studijama o učinku na *Candida albicans*, gdje je objašnjen mehanizam poticanja apoptoze stvaranjem hidroksi radikala ($\cdot\text{OH}$), izazivanjem poremećaja u membranskom potencijalu, stvaranjem koncentracijskog gradijenta Na^+ iona te aktivacijom citokroma c koji nadalje aktivira metakaspaze (Lee i Lee, 2014).

Antitumorsko djelovanje

Gajski (2012) u svom doktorskom radu ispituje antitumorski učinak pčelinjeg otrova koji je bio primijećen na pčelarima. Naime, u odnosu na opću populaciju imali su znatno nižu stopu smrtnosti od tumora. Istraživao je učinak pčelinjeg otrova i melitina na tumorskim i ne-tumorskim stanicama, a radi lakšeg razumijevanja toksičnosti za ovu vrstu stanica korištene su stanice karcinoma grlića maternice, karcinoma grkljana, glioblastoma, adenokarcinoma kolona i adenokarcinoma dojke. Rezultati doktorske disertacije pokazali su da su pčelinji otrov i melitin toksični za sve ispitivane stanice, ali da njihov učinak ovisi o koncentraciji, uz to ne-tumorske stanice pokazale su veću otpornost na pčelinji otrov i melitin od tumorskih stanica. Istraživanja su pokazala pozitivne rezultate utjecaja pčelinjeg otrova i melitina na stanice karcinoma bubrega, pluća, prostate, jetara i mnogih drugih. Literatura navodi, a kako je i prikazano na **Slici 4**, da se antitumorsko djelovanje melitina temelji na poticanju apoptoze i nekroze, pucanja mitohondrija, inhibicije angiogeneze u tkivima tumora, zaustavljanje staničnog ciklusa (Rady i sur., 2017), a temeljem antitumorskog djelovanja smatra se aktivacija PLA2, kaspaze i enzima matičnih metaloproteaza (MMP) (Son i sur., 2007).



Slika 4 Antikarcinogeno djelovanje melitina na metaboličke puteve organizma (prilagođeno iz Rady i sur., 2017)

Uz sva navedena postoje i brojna istraživanja koja potvrđuju pozitivne učinke pčelinjeg otrova, ali i melitina kao njegove glavne sastavnice na liječenje raznih bolesti ili ublažavanje simptoma istih. Neka od njih upućuju na pozitivne učinke u borbi protiv neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (Ye i sur., 2016), multiple skleroze (Hauser i sur., 2004, Wesselius i sur., 2005), Parkinsonove bolesti (Cho i sur., 2012; Alvarez-Fischer i sur., 2013). Dostupna su istraživanja usmjerena na djelovanje pčelinjeg otrova na virusna oboljenja među kojima su HIV (Hood i sur., 2013), virus gripe, herpes, enterovirus i drugi (Memeriani i sur., 2019a).

2.6. PREGLED ANALIZA PČELINJEG OTROVA I MELITINA

Europsko, ali i svjetsko tržište posljednjih godina nudi sve više proizvoda koji sadrže pčelinji otrov ili melitin, stoga su pouzdane metode za analizu istih i više nego potrebne. Zakonski propisane metode za analizu pčelinjeg otrova i njegovih komponenti još uvijek nema, no s obzirom na sve veću potražnju i visoku cijenu sirovine, izdavanje međunarodnih propisa za kontrolu kvalitete i autentičnost proizvoda trebalo bi biti prioritet kako bi se spriječilo moguće krivotvorenje (Krell, 1996; Kokot i Matysiak, 2009; Bogdanov, 2017).

Szokan i sur. (1994) opisali su postupak izolacije glavnih komponenata pčelinjeg otrova pomoću gel-propusne filtracije (GPC). Za ovu analizu otopljeno je 300 mg otrova i propušteno kroz kolonu nakon čega su hvatane frakcije od 4 ml kojima je mjerena apsorbancija pri 280 nm UV-spektrofotometrom. Nakon izolacije glavnih peptida i enzima iz otrova na istima je provedena HPLC analiza kako bi se provjerila čistoća dobivenih frakcija, a provedena je i HPLC analiza samog otrova. Ispitane su i četiri različite kolone kako bi se vidjelo koja od kolona daje najbolje rezultate prilikom provedbe analize. Dvije kolone imale su C18 čestice stacionarne faze te po jedna C8 i C4, a rezultati su pokazali kako sve navedene kolone daju dobre rezultate odjeljivanja komponenata. Primijenjeno je linearno gradijentno eluiranje mobilne faze postignuto miješanjem otapala A (0,1 % trifluoroacetna kiselina (TFA) u vodi) i otapala B (0,1 % TFA u acetonitril (ACN) : voda (80 : 20)). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je udio melitina u pčelinjem otrovu određen HPLC metodom iznosio 50 – 60%, a čistoća izoliranog melitina viša je od 85 %.

Kao i u drugim studijama razvoj brze i precizne metode za separaciju, identifikaciju i kvalitativnu analizu pčelinjeg otrova bio je cilj rada Rybak-Chmielewska i Szczesna (2004) koje su opisale HPLC metodu koja je kasnije primijenjena i kao temelj za izradu ovog rada. Ispitani su različiti uvjeti analize: kromatografske kolone C18 s različitom veličinom čestica punjenja, različiti protok mobilne faze, radne temperature, uvjeti gradijentnog eluiranja te je zaključeno kako se najbolji rezultati postižu uz sljedeće uvjete rada: kolona C18 s veličinom punjenja 180 Å, pri temperaturi 25°C, protoku 2 ml/min i linearnom gradijentnom eluiranju 0% B - 80% B za 40 min, mobilna faza korištena za analizu ista je kao i u prethodno opisanom radu, a detekcija komponenti provedena na UV detektoru pri 220 nm.

Kokot i Matysiak (2009) razvili su metodu tekućinske kromatografije (LC) s detektorom s nizom dioda za analizu pčelinjeg otrova, pri čemu su detektirali devet različitih komponenti otrova, a četiri su i identificirali i to apamin, MCD peptid, fosfolipazu A2 i melitin. Korišten je Agilent LC sustav uz kolonu C8 i linearno gradijentno eluiranje mobilne faze kao u radu Szokan i sur. (1994). Analiza je provedena pri temperaturi kolone i detektora od 25°C i valnoj duljini detekcije odijeljenih komponenti od 220 nm. Uz sam razvoj metode provedena je i validacija metode uz sve parametre koje ista nalaže, te autori predlažu njezinu automatizaciju i uklapanje u rutinske metode za određivanje pčelinjeg otrova i njegove kontrole.

Pacakova i sur. (1995) usporedili su različite tehnike analize pčelinjeg otrova, i to kromatografiju isključenjem (SEC), reverzno-faznu visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (RP-HPLC) i metodu kapilarne elektroforeze (CE), koja se do tada nije upotrijebila na pčelinjem otrovu. SEC metoda temelji se na razdvajanju komponenata na osnovu njihove veličine, ali i oblika i naboja. U ovom radu korištena je kolona (250 x 8 mm) s punjenjem Separon HEMA-BIO 40 (Tessek, Češka Republika), odnosno hidofiliziranim 2-hidroksietil metakrilatom, veličine čestica punila 10 µm, koji je primjenjiv za odjeljivanje molekula relativne molekulske mase 40 000 - 70 000. Za detekciju je korišten UV-Vis detektor pri 215 nm, te kao mobilna faza 0,1 M fosfatni pufer uz protok od 0,5 ml/min. Prilikom odjeljivanja došlo je do interakcije nepokretne faze s analitima od interesa, pri čemu je došlo do dužeg zadržavanja PLA2, a melitin se nije eluirao s kolone. SEC stoga nije dovoljno dobra za kvantitativne analize, no može poslužiti za grubu karakterizaciju otrova. RP-HPLC metoda je provedena koristeći pretkolonu Separon HEMA-BIO 1000 C18, 10µm (80 x 8 mm), kolonu istih karakteristika (150 x 3,3 mm) pri radnoj temperaturi 37°C, uz protok mobilne faze kroz pretkolonu 1 ml/min, a kroz kolonu 0,5 ml/min. Analiza je provedena uz gradijentno eluiranje mobilne faze, pri čemu je otapalo A bilo 0,22% TFA u vodi, a otapalo B 0,2% TFA u ACN, detekcija komponenata provedena je na UV-Vis detektoru pri valnoj duljini 215 nm. CE je provedena na sustavu Crystal CE Model 310 s UV apsorpcijskim detektorom s monokromatorom (ATI Unicam, Velika Britanija) uz detekciju na valnim duljinama 190 ili 205 nm, ovisno o analiziranom sustavu elektrolita. Silicijeva kapilara duljine je 75 cm, unutarnjeg promjera 75 µm, a udaljena 60 cm od detektora. Analizirana su tri sustava A - 20 mM fosforni pufer, B - 20 mM tris pufer - 50 mM natrijev dodecil-sulfat i C - 150 mM fosforna kiselina, najbolji rezultati postignuti su uz sustav C uz koji je detekcija vršena pri 190 nm. Usporedbom dobivenih podataka CE se

pokazala kao bolji izbor za analizu pčelinjeg otrova, a kao glavne prednosti nad RP-HPLC metodom navodi se bolja razlučivost, niža granica detekcije, brzina i cijena metode.

Cilj rada Ionete i sur. (2013) bio je razvoj točne i učinkovite metode za analizu pčelinjeg otrova kombinacijom kromatografije i masene spektrometrije. Kromatografska metoda je validirana i provedena na HPLC sustavu uz detektor s nizom dioda pri valnoj duljini 220 nm. Korištena je C18 kolona (250 x 4,6 mm) uz protok mobilne faze 1 ml/min i gradijentno eluiranje (otapalo A - 0,1 % TFA u vodi, otapalo B - 0,1 % TFA u ACN : voda (80 : 20)) na temperaturi od 25°C. Spektroskopska analiza je provedena na MALDI-ToF masenom spektrometru uz laser s frekvencijom ponavljanja 60 Hz, koji je bio postavljen na 30 % svoje inicijalne snage tijekom mjerenja. Svi spektri pohranjeni su u bazu podataka „Apitoxin Taxonomy“ kojim su odredili tzv. „fingerprint“ pčelinjeg otrova kako bi olakšali procjenu kvalitete i autentičnosti otrova u nekim budućim istraživanjima.

Matysiak i sur. (2016) napravili su i analizu proteoma pčelinjeg otrova pomoću LC–MALDI–ToF/ToF i LC–ESI–QtoF masene spektroskopije, uz koju su koristili i ProteoMiner Sequential Elution Small-Capacity Kit (Bio-Rad, SAD) koji omogućuje obogaćivanje i određivanje onih proteina i peptida čija je koncentracija u uzorku vrlo niska. Detektirali su 269 proteina, od kojih 49 toksina, alergena i drugih komponenata uključenih u reakcije otrovanja, što je pomoglo sveukupnom boljem razumijevanju pčelinjeg otrova kao kompleksnog sustava proteina, peptida, enzima i drugih tvari.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada je odrediti udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova HPLC metodom te ispitati utječe li položaj skupljača prilikom sakupljanja na količinu sakupljenog otrova i udio melitina u uzorcima prikupljenim na istim pčelinjim društvima.

3.2. UZORCI PČELINJEG OTROVA

Uzorci pčelinjeg otrova su sakupljeni na pčelinjaku u mjestu Čeminac, u Baranji, a uređaji koji su korišteni za sakupljanje otrova napravila je tvrtka Tavu d. o. o., Osijek. Sakupljanje je provedeno u 3 termina na 12 košnica, u razdoblju od 27. lipnja do 12. srpnja 2019. godine. Impulsi električne struje, jakosti 9,4 V, frekvencije 558 Hz trajali su 5 sekundi nakon čega je slijedilo 5 sekundi bez stimulacije, ovakvi intervali ponavljani su tijekom 30 minuta. Sakupljeno je ukupno 36 uzoraka pčelinjeg otrova, od toga 18 uzoraka sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnice i 18 sa skupljačima postavljenim unutar košnice.

Uzorci su dostavljeni u laboratorij na staklu pokrivenom prozirnom najlon folijom nakon čega su sušeni 3 sata na sobnoj temperaturi te pomoću strugača uklonjeni sa stakla u prethodno izvagane plastične spremnike volumena 5 ml, odvagani, označeni te pohranjeni u zamrzivač do daljnje analize.

3.3. HPLC METODA

Za određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu korištena je metoda opisana u radu autora Rybak-Chmielewske i Szczesne (2004), uz određene modifikacije kako bi sama metoda odgovarala uređaju i njegovim uvjetima. Primijenjena metoda je validirana i pokazala se prikladnom namijeni.

Analiza uzoraka pčelinjeg otrova provedena je na Shimadzu HPLC sustavu, kojeg čine računalni program LabSolution Life (Release 5.52), kvarterna crpka LC-20AD, komora za kolonu CTO-

20AC, pretkolona, detektor s nizom dioda SPD-M20A i autosampler SIL10 AF. Odjeljivanje komponenata postignuto je uz Inertsil ODS-3V kolonu tvrtke GL Science, dimenzija 250 x 4,6 cm, koja je punjena česticama veličine 5 µm. Identifikacija melitina provedena je s obzirom na vrijeme zadržavanja, a kvantifikacija je izvršena metodom vanjske kalibracije. Kao standard za pripremu kalibracijske krivulje u koncentracijskom rasponu 21,3 µg melitina/ml do 708,3 µg melitina/ml te identifikaciju odijeljene komponente korišten je standard melitina (Sigma-Aldrich, SAD) čistoće ≥ 85 %. Za pripremu mobilne faze korištene su trifluoroctena kiselina za spektroskopiju Uvasol® (Merck, Njemačka), acetonitril HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska) te ultračista demineralizirana voda.

Priprema uzoraka

Vagano je 2 mg ($\pm 0,01$ mg) uzorka pčelinjeg otrova u plastični spremnik od 5 ml, dodano je 2 ml ultračiste vode, otopina je miješana na vorteks miješalici 20 sekundi, filtrirana preko membranskog najlonskog filtera promjera 0,45 µm u epruvetu od 5 ml, ponovo miješana na vorteks miješalici te prebačena u vialu od tamnog stakla od 1,5 ml koja je postavljena u autosampler HPLC uređaja. Svaki uzorak rađen je u tri paralele.

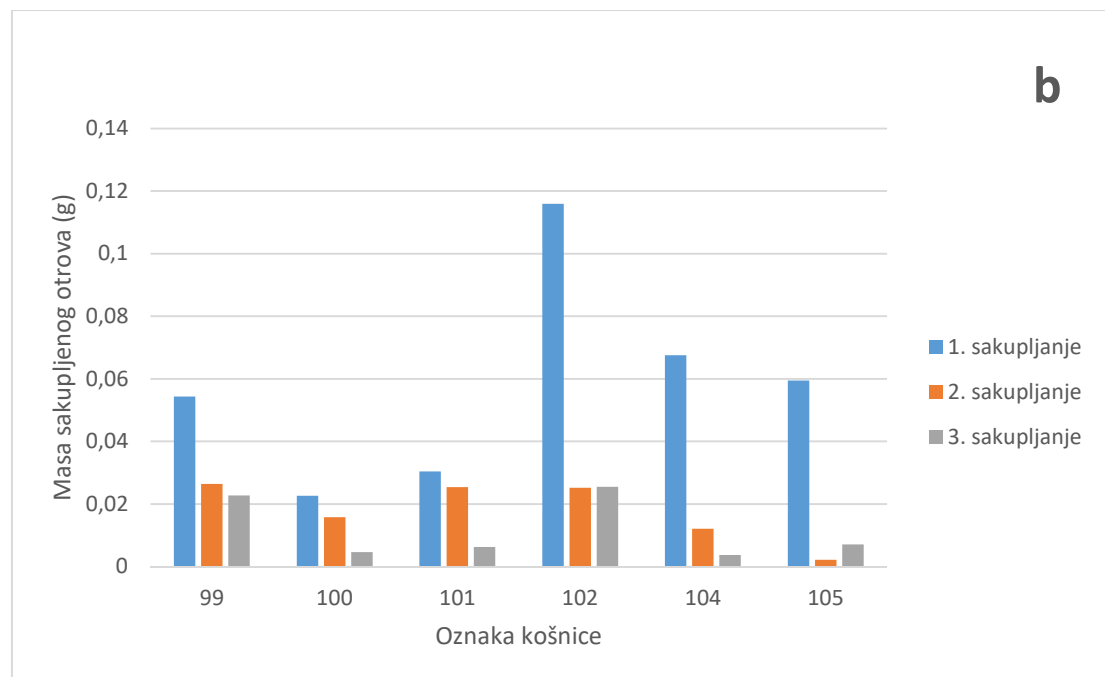
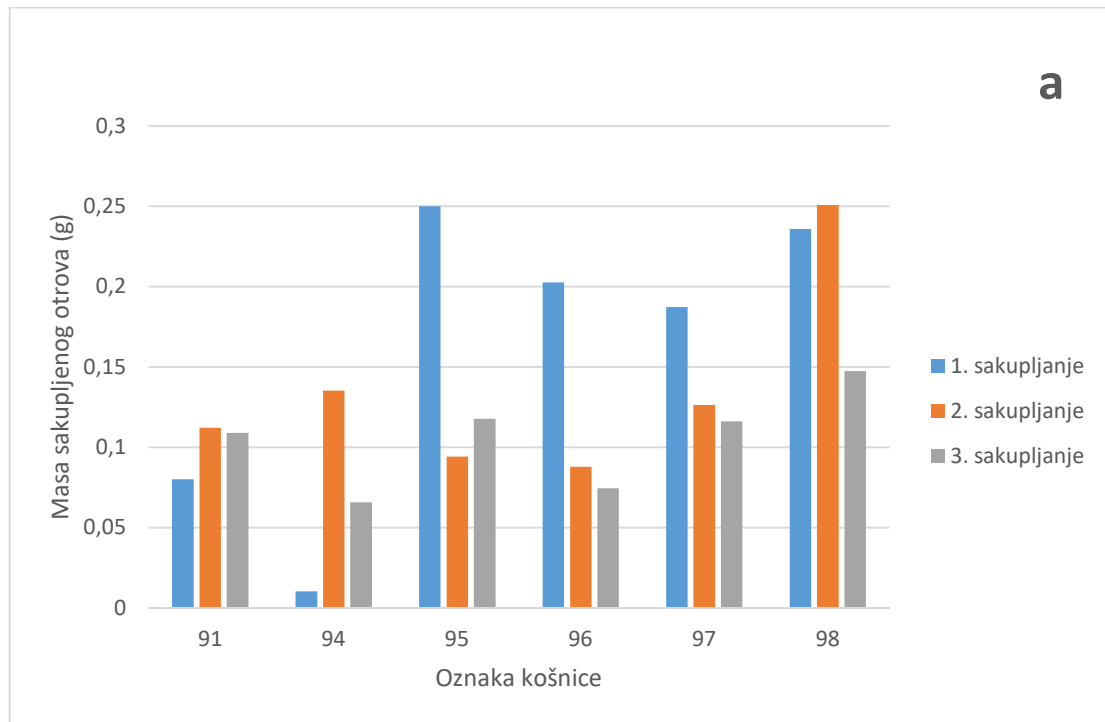
Parametri analize

Kromatografsko odjeljivanje komponenata provedeno je pomoću dviju mobilnih faza, mobilna faza A - 0,1 % TFA (trifluoroctena kiselina) u vodi i mobilna faza B - 0,1 % TFA u smjesi acetonitril : voda (80 : 20), mobilne faze su prije primjene na HPLC sustavu degazirane na ultrazvučnoj kupelji. Odjeljivanje komponenata provedeno je gradijentnim eluiranjem opisanim u **Tablici 2**, volumen injektiranja iznosio je 40 µl, a protok mobilne faze 1,5 ml/min uz radnu temperaturu kolone i detektora 25°C. Snimanje spektra je provedeno u rasponu valnih duljina od 190 do 380 nm, dok je detekcija komponenti izvršena na valnoj duljini od 202 nm.

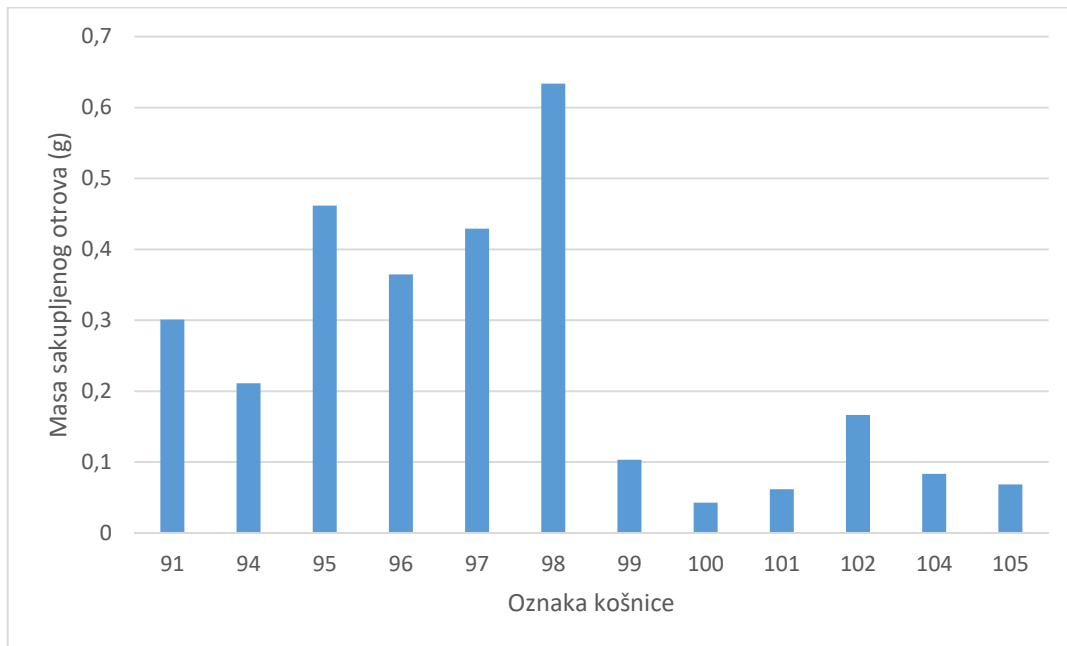
Tablica 2 Uvjeti gradijentnog eluiranja

Vrijeme analize (min)	Udio otopine B (%)
0	5
40	80
50	5

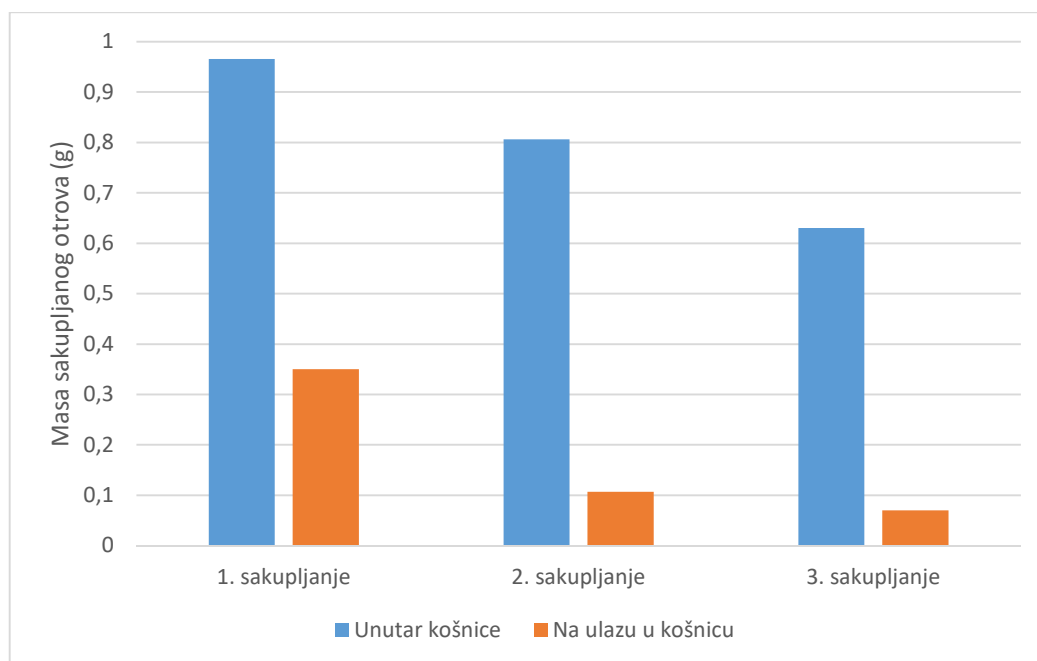
4. REZULTATI



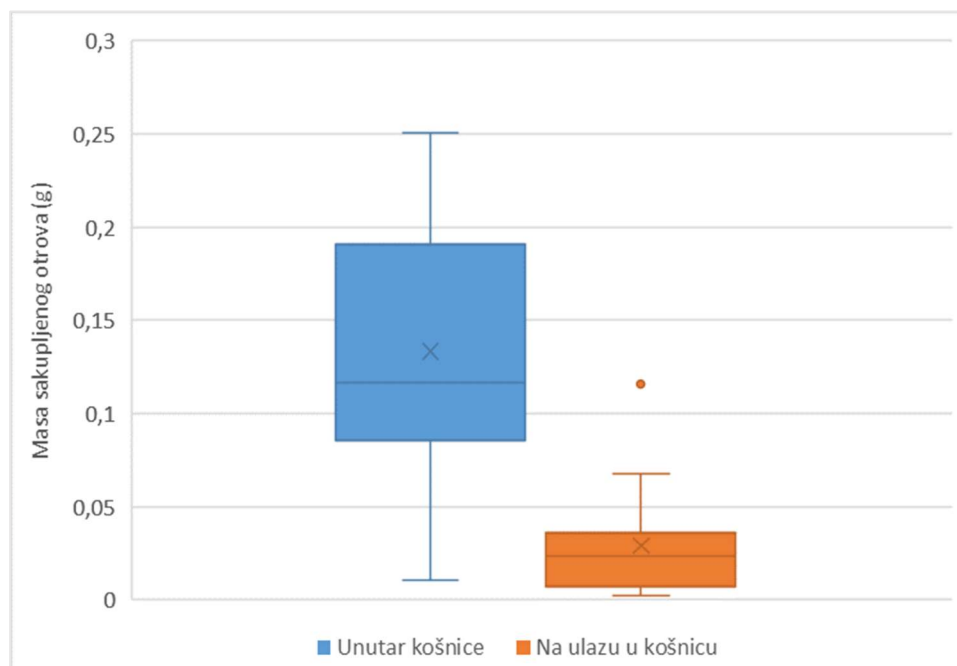
Slika 5 Mase skupljenog pčelinjeg otrova po košnici po pojedinačnim sakupljanju (a – skupljači postavljeni unutar košnice, b – skupljači postavljeni na ulazu u košnicu)



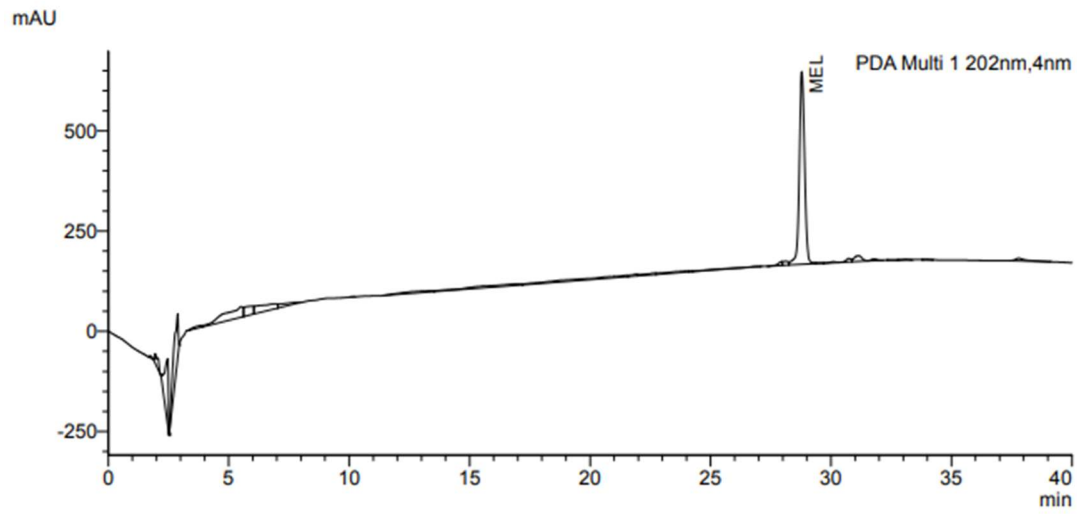
Slika 6 Ukupno sakupljena masa pčelinjeg otrova u svakoj košnici



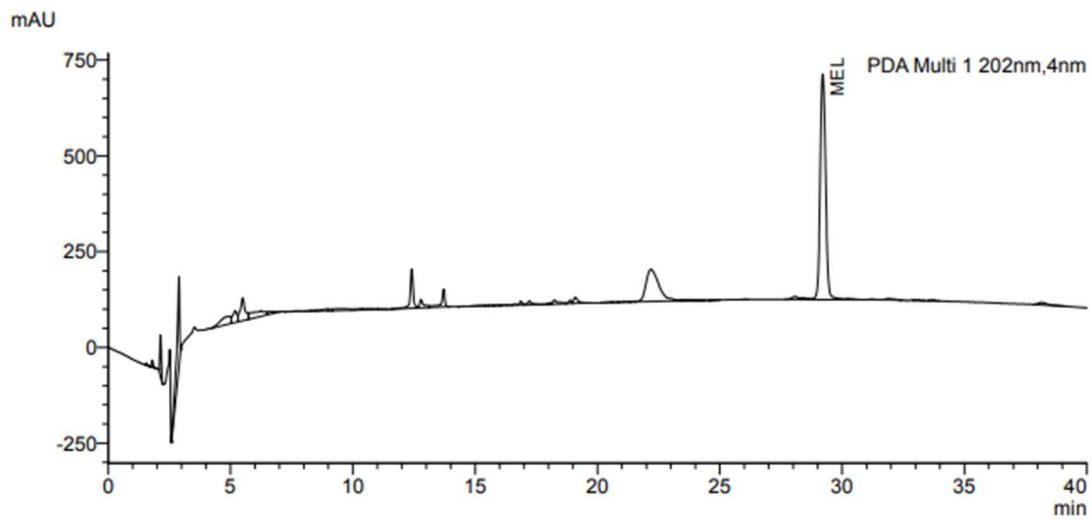
Slika 7 Ukupno sakupljene mase pčelinjeg otrova s obzirom na položaj sakupljača po pojedinačnom sakupljanju



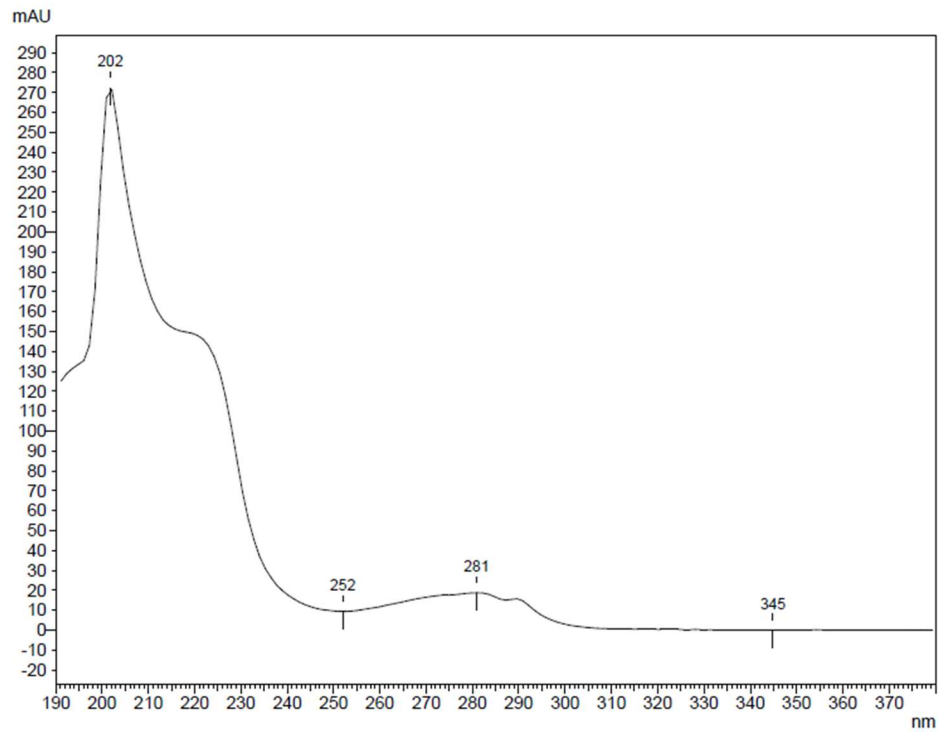
Slika 8 Masa sakupljenog pčelinjeg otrova s obzirom na položaj sakupljača u košnicama
(x srednja vrijednost; – medijan; o ekstrem; ⊥ T min i max, □ Q1-Q3)



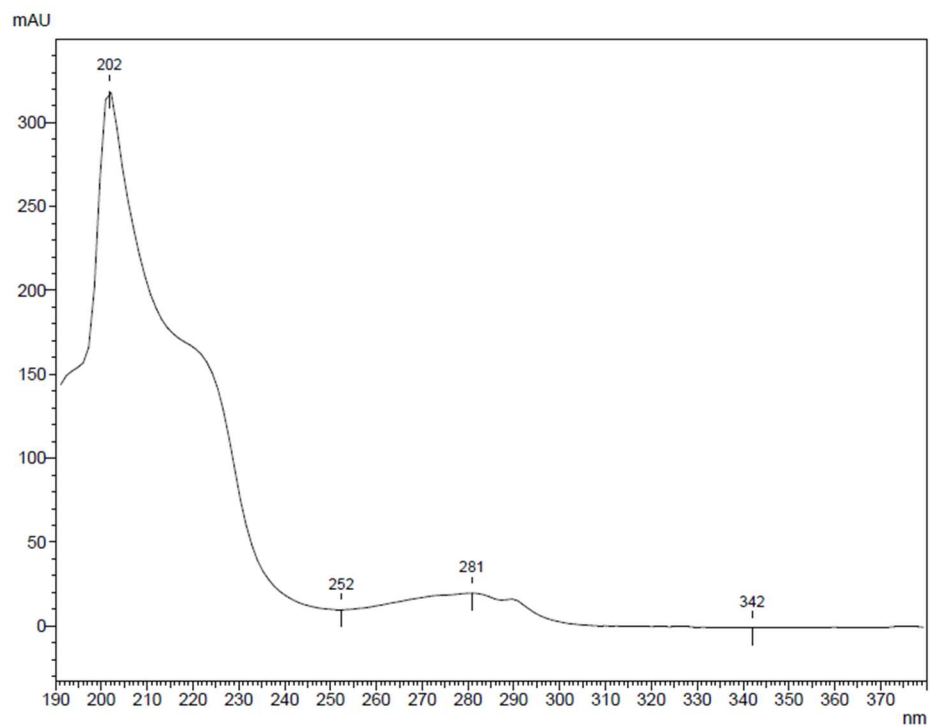
Slika 9 Kromatogram standarda melitina pri 202 nm



Slika 10 Kromatogram uzorka pčelinjeg otrova pri 202 nm



Slika 11 Apsorpcijski spektar standardne otopine melitina



Slika 12 Apsorpcijski spektar uzorka pčelinjeg otrova

Tablica 3 Udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova iz 1. sakupljanja

	Oznaka uzorka	Udio melitina (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje (%)
UNUTAR KOŠNICE	91	63,00	63,18	0,32
		63,00		
		63,55		
	94	62,96	61,86	0,96
		61,37		
		61,24		
	95	64,38	63,17	1,64
		63,82		
		61,31		
	96	62,00	62,37	0,50
		62,18		
		62,94		
97	62,62	62,14	0,74	
	62,51			
	61,28			
98	63,21	64,40	1,17	
	64,44			
	65,55			
NA ULAZU U KOŠNICU	99	62,31	60,93	1,23
		59,93		
		60,56		
	100	59,93	60,67	1,18
		60,05		
		62,03		
	101	66,25	65,64	0,53
		65,41		
		65,26		
	102	60,74	60,87	0,86
		60,09		
		61,79		
104	65,04	64,18	1,06	
	64,51			
	62,99			
105	64,92	64,12	0,72	
	63,93			
	63,51			

Tablica 4 Udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova iz 2. sakupljanja

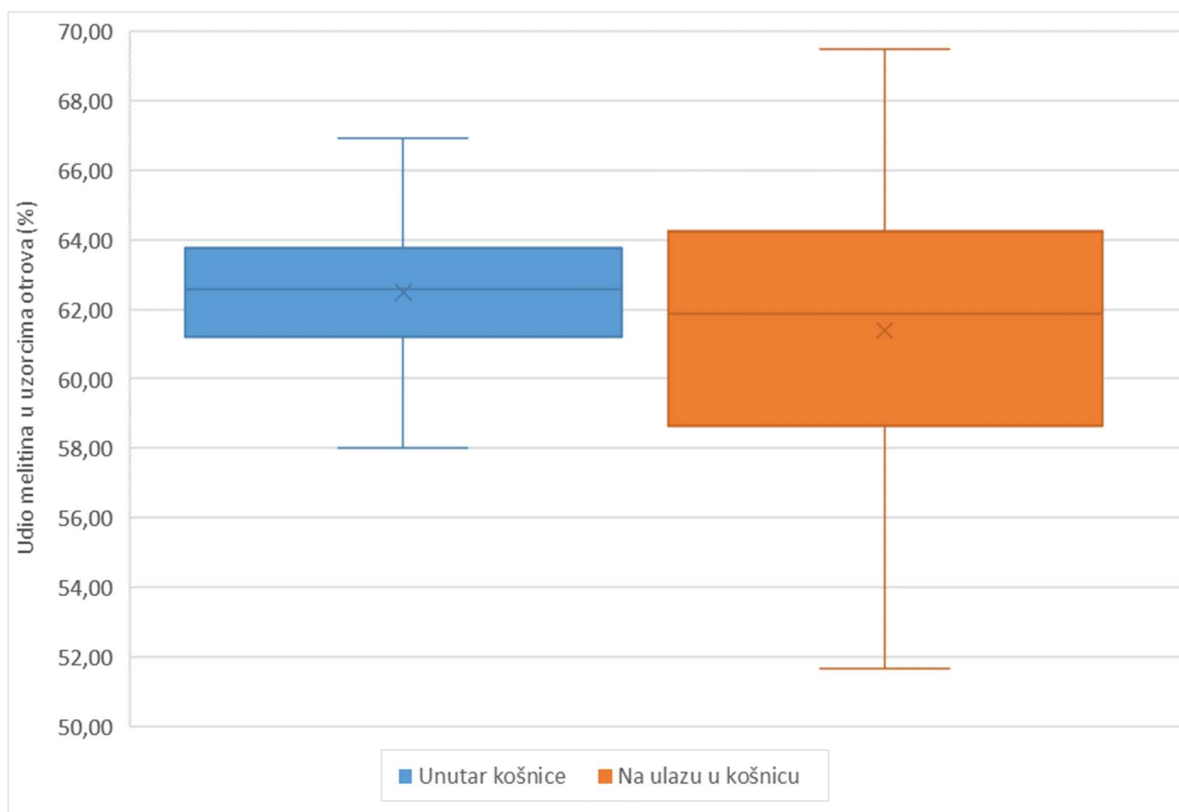
	Oznaka uzorka	Udio melitina (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje (%)
UNUTAR KOŠNICE	91	63,24	63,34	0,28
		63,12		
		63,65		
	94	66,91	66,63	0,42
		66,14		
		66,83		
	95	62,20	62,15	1,75
		59,14		
		62,12		
	96	64,32	64,39	0,46
		64,88		
		69,96		
97	63,50	63,66	0,55	
	63,21			
	64,28			
98	60,95	59,86	0,94	
	59,28			
	59,36			
NA ULAZU U KOŠNICU	99	66,24	65,45	2,53
		67,50		
		62,63		
	100	63,13	63,04	0,41
		63,40		
		62,59		
	101	62,05	61,73	0,41
		61,28		
		61,87		
	102	64,02	64,79	0,69
		65,34		
		65,02		
	104	57,93	57,16	0,78
		56,37		
		57,18		
105	N.A.	N.A.	N.A.	
	N.A.			
	N.A.			

N.A. - nije analiziran

Tablica 5 Udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova iz 3. sakupljanja

	Oznaka uzorka	Udio melitina (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje (%)
UNUTAR KOŠNICE	91	63,00	62,17	0,88
		61,24		
		62,26		
	94	65,28	64,40	0,79
		64,16		
		63,75		
	95	60,88	60,95	0,08
		61,04		
		60,95		
	96	60,03	59,07	1,00
		59,14		
		58,03		
97	60,19	60,90	0,70	
	61,59			
	60,93			
98	61,59	61,30	0,76	
	60,44			
	61,87			
NA ULAZU U KOŠNICU	99	57,47	56,90	0,80
		56,34		
		-		
	100*	51,66	51,66	-
		-		
		-		
	101*	57,01	57,00	0,01
		57,00		
		-		
	102	60,51	60,03	0,62
		60,26		
		59,33		
104*	69,50	69,50	-	
	-			
	-			
105*	57,71	57,50	0,03	
	57,28			
	-			

*analiza provedena u 1 ili 2 ponavljanja zbog male količine sakupljenog otrova



Slika 13 Udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova s obzirom na položaj skupljača u košnicama

(x srednja vrijednost; – medijan; o ekstrem; \perp τ min i max, \square Q1-Q3)

5. RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je odrediti udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova pomoću validirane HPLC metode i utvrditi postoje li razlike u udjelu melitina ovisno o uvjetima sakupljanja.

Prije HPLC analize dostavljeni otrov je osušen na zraku, pohranjen u prethodno izvagane plastične spremnike volumena 5 ml te izvagan, a skupljene mase pčelinjeg otrova u svakoj košnici po pojedinačnom sakupljanju prikazane su na **Slici 5**. U prvom terminu skupljanja najviša masa otrova sakupljena je u košnici broj 95 s 0,2499 g otrova, a najmanja u košnici broj 94 s 0,0104 g. U drugom i trećem terminu sakupljanja najveća masa pčelinjeg otrova sakupljena u košnici broj 98 (0,2508 g u drugom, odnosno 0,1473 g u trećem terminu). Najmanja masa skupljenog otrova u sva tri termina sakupljena je u košnicama broj 105 (0,0021 g) i 104 (0,0037 g). Pregledom dobivenih rezultata vidljivo je da se masa skupljenog pčelinjeg otrova kreće od minimalnih 0,0021 g po košnici i danu do maksimalnih 0,2508 g po košnici i danu. Usporedbom s literaturnim podacima može se primijetiti značajna razlika u minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti skupljene količine otrova ovisno o literaturnom izvoru. Balen Percela (2018) provela je sakupljanje otrova sa skupljačima smještenim na ulazu u košnicu i unutar košnice u periodu lipanj - srpanj 2017. godine, a masa pčelinjeg otrova kretala se u rasponu od 0,111 g do 0,193 g po košnici. Količina skupljenog pčelinjeg otrova koje je objavila Rybak (2008) kretala se od 0,063 g do 0,159 g otrova po košnici. Istraživanje je provedeno, također, u periodu lipanj – srpanj, a uz stimulaciju elektrošokovima korištena je i zvučna stimulacija. Kako je vidljivo na **Slici 5**, masa skupljenog otrova veća od 0,19 g, što je maksimalna količina koju je objavila Balen Percela (2018), dobivena je nakon sakupljanja pčelinjeg otrova sa skupljačima smještenim unutar četiri košnice, odnosno skupljena masa 4 uzorka otrova bila je veća od 0,2 g. Kada se pogleda ukupno skupljena masa otrova po košnici, najviše otrova skupljeno je u košnici broj 98, u kojoj je nakon tri termina sakupljanja masa pčelinjeg otrova bila ukupno 0,6338 g, a najmanja masa dobivena je u košnici 100 s ukupno skupljenom masom otrova od 0,0430 g (**Slika 6**). Obratimo li pozornost na raspodjelu mase prikupljene po terminima sakupljanja prikazanu na **Slici 7**, možemo primijetiti da je ukupna masa skupljenog otrova u svih 12 košnica u opadanju i da se kreće od 1,3160 g skupljenih u prvom terminu sakupljanja, do 0,6998 g u trećem terminu sakupljanja, no razlika između termina sakupljanja nije bila statistički značajna prema t-testu na razini značajnosti $p \leq 0,05$. Omar (2017) je ispitivao utjecaj sakupljanja otrova na razvoj legla i dokazao da nema razlike u masi otrova u periodu sakupljanja lipanj – srpanj, dok su Sanad i Mahonny (2013.) objavili

da sakupljanje pčelinjeg otrova u ranojutarnjim satima, također, ne pokazuje značajne razlike u skupljenoj masi otrova po danima. Suprotno trendu dobivenom u ovom istraživanju te prethodno navedenim istraživanjima, Balen Percela (2018) i Hegazi i sur. (2015) dobili su povećanje mase skupljenog otrova s danima sakupljanja. Međutim, oba istraživanja provedena su na većem broju košnica i tijekom dužeg vremenskog perioda. Daljnja istraživanja trebala bi uključiti veći broj košnica u kojima bi se provelo sakupljanje otrova, kao i veći broj termina sakupljanja kako bi se utvrdio trend skupljene mase pčelinjeg otrova. Odnos ukupno sakupljenog otrova s obzirom na položaj postavljenih skupljača (**Slika 8**) ukazuje na veliku raspršenost podataka. T-testom je potvrđena statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$) između ova dva načina sakupljanja otrova te možemo zaključiti kako je sakupljanje otrova sa skupljačima postavljenim unutar košnice bolji način sakupljanja, s obzirom na to da je na taj način moguće prikupiti veću masu otrova u istom vremenskom razdoblju sakupljanja. Ove rezultate potvrđuje i Balen Percela (2018) čije je istraživanje, također, provedeno pomoću dvije metode sakupljanja. Sakupljanjem otrova sa skupljačima postavljenim unutar košnice prikupljeno je 2,402 g na 6 košnica u tri dana, dok je sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu na istom broju košnica u istom vremenskom periodu prikupljeno 0,527 g.

Udio melitina kao najznačajnije komponente pčelinjeg otrova, čija količina ukazuje na njegovu kvalitetu, a time i cijenu na tržištu, određena je u skupljenim uzorcima HPLC metodom uz detektor s nizom dioda. Identifikacija komponente od interesa izvršena je temeljem usporedbe vremena zadržavanja internog standarda melitina (**Slika 9**) i vremena zadržavanja melitina u uzorku pčelinjeg otrova (**Slika 10**) te usporedbom apsorpcijskog spektra otopine standarda melitina (**Slika 11**) i spektra uzorka pčelinjeg otrova (**Slika 12**). Kako je vidljivo na **Slikama 9 i 10**, koje prikazuju kromatograme standardne otopine melitina i otopine pčelinjeg otrova, vrijeme zadržavanja melitina u obje otopine iznosi 28,8 minuta te na taj način potvrđuje identifikaciju odijeljene komponente. Kako bi se nedvojbeno potvrdilo da se radi o melitinu, uspoređeni su apsorpcijski spektri komponente od interesa u obje otopine (**Slike 11 i 12**). Izgled apsorpcijskih spektara ukazuje na nedvojbenu identifikaciju, odnosno može se potvrditi da je komponenta s vremenom zadržavanja 28,8 minuta melitin.

Rezultati mjerenja udjela melitina u skupljenim uzorcima pčelinjeg otrova po terminu sakupljanja prikazani su u **Tablicama 3 - 5**. U uzorcima otrova sakupljenim u prvom terminu udio melitina kretao se od 59,93 % do 66,25 % (**Tablica 3**), u drugom terminu sakupljanja od

56,37 % do 67,50 % (**Tablica 4**), dok su vrijednosti udjela melitina u trećem terminu sakupljanja iznosile od 51,66 % do 69,50 % (**Tablica 5**). U drugom terminu sakupljanja udio melitina određen je u 11 od ukupno 12 uzoraka pčelinjeg otrova jer je količina sakupljenog otrova u košnici broj 105 (0,0021 g) bila nedovoljna za provedbu HPLC analize. Osim toga, u trećem terminu sakupljanja količine sakupljenog otrova bile su nedostatne za tri ponavljanja, te su odrađena samo dva ili jedno mjerenje udjela melitina. Stoga za neke od dobivenih rezultata (uzorak 100 i 104) u **Tablici 5** nije izračunato standardno odstupanje. Gledajući ukupno dobivene rezultate, udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova analiziranih u ovom istraživanju kretao se od 51,66 % do 69,50 %, sa srednjom vrijednosti od $61,99 \pm 2,95$ %. Dobiveni rezultati u skladu su s podacima u radu kojeg su objavile Rybak- Chmielewska i Szczesna (2004) gdje su uzorci pčelinjeg otrova imali 61,16 - 70,15 % (srednja vrijednost 64,61 %) melitina. Nešto veći raspon i niže prosječne vrijednosti udjela melitina u otrovu objavili su Kokot i Matysiak (2009) s rasponom dobivenih vrijednosti od 30,29 % do 63, 28 % (srednja vrijednost 54,08 %) te Ionete i sur. (2013.) s udjelom melitina u otrovu od 27,66 % do 64,22 % (srednja vrijednost 52,28 %). **Slika 13** prikazuje rezultate određivanja udjela melitina u uzorcima pčelinjeg otrova sa skupljačima postavljenim unutar košnice i na ulazu u košnice. Na slici je uočljiva značajna razlika u rasponu dobivenih podataka pri čemu je udio melitina u uzorcima skupljenim unutar košnice iznosio od 58,03 % do 66,63 %, dok su u uzorcima otrova skupljenim sa skupljačima na ulazu u košnicu dobivene vrijednosti iznosile od 51,66 % do 69,50 %. Pretpostavka je da su ove velike razlike u vrijednostima melitina na ulazu u košnicu rezultat nečistoća koje pčele donose na skupljače, a koje se ne mogu odvojiti od uzorka otrova. Međutim, kada se pogledaju srednje vrijednosti udjela melitina u uzorcima dobivenim prilikom dva načina sakupljanja, vidljivo je da značajne razlike nema (**Slika 13**).

Gledajući ukupno dobivene rezultate o skupljenim količinama pčelinjeg otrova sa skupljačima smještenim unutar košnice i na ulazu u košnicu te dobivene vrijednosti udjela melitina u prikupljenim uzorcima, može se zaključiti da je postavljanje skupljača otrova unutar košnice bolja opcija jer su skupljene količine pčelinjeg otrova značajno veće, a udio melitina isti kao kod sakupljanja sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu. Osim toga, udio nečistoća u otrovu je manji ukoliko se skupljači postavljaju unutar košnice.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom radu i usporedbom s literaturnim podacima možemo zaključiti sljedeće:

- Sakupljanjem otrova sa skupljačima postavljenim unutar košnice moguće je skupiti veću masu otrova u odnosu na skupljače postavljene na ulazu u košnicu u istom vremenskom razdoblju sakupljanja.
- Sakupljena količina pčelinjeg otrova ne mijenja se ovisno o vremenu skupljanja.
- Primijenjena HPLC metoda za određivanje udjela melitina u pčelinjem otrovu prikladna je namijeni.
- Udio melitina u uzorcima otrova iznosi prosječno $61,99 \pm 2,95$ %.
- Udio melitina u uzorcima pčelinjeg otrova dobivenim na dva načina sakupljanja ne razlikuje se značajno, ali je veći raspon vrijednosti dobiven kod uzoraka koji su skupljeni na skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu.
- Sakupljanje otrova sa skupljačima unutar košnice bolja je opcija jer su skupljene količine pčelinjeg otrova značajno veće s manje nečistoća, a udio melitina isti kao kod sakupljanja sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu.

7. LITERATURA

- Ali, MAA-SM: Studies on bee venom and its medical uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology* 1:1-15, 2012.
- Alvarez-Fischer D, Noelker C, Vulinović F, Grünewald A, Chevarin C, Klein C, Oertel WH, Hirsch EC, Michel PP, Hartmann A: Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in Parkinson disease mouse model. *PLoS ONE* 8:e61700, 2013.
- Balen Percela, L: Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje. *Diplomski rad*. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, 2018.
- Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG, the EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity: Diagnosis of *Hymenoptera* venom allergy. *Allergy* 60:1339–1349, 2005.
- Benton AW, Morse RA, Stewart JD: Venom collection from honey bees. *Science* 142:228-230, 1963.
- Bogdanov S: *The bee venom book*. Bee Product Science, 2017. <http://www.bee-hexagon.net/venom/> (13.9.2019.)
- Brandeburgo, MAM: A safe device for extracting venom from honey bees. *Bee World* 73:28-130, 1922.
- Chen J, Guan SM, Sun W., Fu H: Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neuroscience Bulletin* 32:265-272, 2016.
- Cho, SY, Shim SR, Rhee HY, Park HJ, Jung WS, Moon SK, Park JM, Ko CN, ChoHK, Park SU: Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 18:948-985, 2012.
- Choi JH, Jang AY, Lin S, Lim S, Kim D, Park K, Han S-M, Yeo J-H, Seo HS: Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medicine Reports* 12:6483-6490, 2015.

- El-Wahed, AAA, Khalifa AMS, Sheikh BY, Farag MA, Larik FA, Saeed A, Koca-Caliskan U: Bee venom composition: From chemistry to biological activity. U *Studies in Natural products chemistry*, 459-484. Elsevier, 2018.
- Erler S, Moritz RFA: Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie* 3:389-411, 2016.
- Fakhim-Zadeh K: A new device for venom collection and apicultural research. *American Bee Journal* 130:785-787, 1990.
- Fakhim-Zadeh, K: Innovations. *Bee World* 79:52-56, 1998.
- Gajski G: Učinci pčelinjeg otrova i melitina na stanični odgovor tumorskih i ne-tumorskih stanica *in vitro*. *Doktorski rad*. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2012.
- Hauser AR, Daugio M, Wester D, Hauser M, Kirchman A, Skinkis C: Bee-venom therapy for treating multiple sclerosis: A clinical trial. *Alternative and Complementary Therapies* 7, 2004.
- Hegazi AG, EL-Feel MA, Abdel-Rahman EH, Al-Fattah AMA: Antibacterial activity of bee venom collected from *Apis mellifera* carniolan pure and hybrid races by two collection methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4:141-149, 2015.
- Hood, JL., Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA: Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral Therapy* 18:95-103, 2013.
- Ionete RE, Oana R, Dinca OR, Tamaian R, Geana EI: Exploring *Apis mellifera* venom compounds using highly efficient methods. *Progress of Cryogenics and Isotops Separation* 1689-100, 2013.
- Kokot ZJ, Matysiak J: Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. *Chromatographia* 69:1401-1405, 2009.

- Krell, R. Venom. U *Value-added products from beekeeping*, 215-227. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rim, 1996.
- Lee, J, Lee DG: Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway. *FEMS Microbiology Letters* 355:36-42, 2014.
- Matysiak J, Hajduk J, Mayer F, Hebel R, Kokot ZJ: Hyphenated LC–MALDI–ToF/ToF and LC–ESI–QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 121:69-76, 2016.
- Memeriani H, Memeriani M, Moravvej H, Shahidi-Dadras M: Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1-13, 2019a.
- Memeriani, H, Memeriani M, Shahidi-Dadras M, Nasiri S, Akhavan MM, Moravvej H: Melittin: from honeybees to superbugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:3265-3276, 2019b.
- Nguyen VH, Heger Z, Kominkova M, Michalek P, Gumulec J, Guran J, Pridal A: The electrochemical and statistical evaluation of isolation of mellitin and apamin from honey bee (*Apis mellifera*) venom. *International Journal of Electrochemical Science* 10:1249-1260, 2015.
- Omar, REM: Effect of bee venom collection on the measurement of brood rearing activity of honey bee colony *Apis mellifera* L. *Middle East Journal of Agriculture Research* 6:409-414, 2017.
- Pacakova V, Štulík K, Hau PT, Jelinek I, Vinš D, Sykora D: Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A* 700:187-193, 1995.
- Park JH, Yim BK, Lee J-H, Lee S, Kim T-H: Risk associated with bee venom therapy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 10:e0126971, 2015.

- PubChem: *Honeybee Melittin (Compound)*, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, 2019.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/90658027> (13.9.2019.)
- Rady, I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H: Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters* 402:16-31, 2017.
- Rybak, M.: Effect of venom collection using the method of coupled electrical and sound stimulation on honey yield in bee colonies. *Journal of Apicultural Science* 52:1-94, 2008.
- Rybak-Chmielewska H, Szczesna T: HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Journal of Apicultural Science* 48:103-109, 2004.
- Sanad, RE., Mohanny KM: The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects of honeybee colonies. *Journal of American Science* 9:177-182, 2013.
- Snodgrass, RE: The abdomen, wax glands, and sting. U *The anatomy of the honey bee*, 69-84. United States Department of Agriculture, Washington, 1910.
- Soman, NR, Baldwin SL, Hu G, Marsh JN, Lanza GM, Heuser JE, Arbeit JM, Wickline SA, Schlesinger PH: Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation* 119:2830-2842, 2009.
- Son, DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effect of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics* 115:246-270, 2007.
- Szokan, Gy, Horvath J, Almas M, Saftics Gy, Palocz A: Liquid chromatography analysis and separation of polypeptide components from honey bee venom. *Journal of Liquid Chromatography* 17:3333-3349, 1994.
- Terwilliger TC, Eisenberg D: The structure of melittin. *The Journal of Biological Chemistry* 257:6016-6022, 1982.

Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier JM, Fajloun Z: Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interest. *Molecules* 24:1-13. 2019.

Weiss K: *The little book of bees*. Springer, New York, 2002.

Wesselius T, Heersema DJ, Moster JP, Heerings NP, Admiraal-Behloul F, Talebian A, van Buchem MA, De Keyser J: A randomized crossover study of bee sting therapy for multiple sclerosis. *Neurology* 65:1764-1768, 2005.

Wu J, Yan S, Zhao J, Ye Y: Barbs facilitate the helical penetration of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) stingers. *PLoS ONE* 9:1-6, 2014.

Ye M, Chung H, Lee C, Yoon MS, Yu AR, Kim JS, Hwang D, Shim I, Bae H: Neuroprotective effects of bee venom phospholipase A2 in the 3xTg AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* 13, 2016.