

JAN MATYSIAK<sup>1</sup>, JOANNA MATYSIAK<sup>2</sup>, ZENON J. KOKOT<sup>1</sup>

## WŁAŚCIWOŚCI FARMAKOLOGICZNE JADU PSZCZELEGO

### PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF HONEYBEE VENOM

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Zenon J. Kokot  
<sup>2</sup>Oddział Chorób Dziecięcych  
Wojewódzki Szpital Zespolony im. L. Perzyny w Kaliszu  
Ordynator: dr n. med. Piotr Suda

#### Streszczenie

Ostatnie badania wykazały różnorodne mechanizmy odpowiedzialne za działanie przeciwrheumatyczne, przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwnowotworowe jadu pszczelego. Hamujący wpływ jadu pszczelego oraz jego poszczególnych składników na ekspresję genów prozapalnych: COX-2 i fosfolipazy A<sub>2</sub>, jak również spadek produkcji mediatorów procesu zapalnego, takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO oraz RFT, mogą odgrywać ważną rolę w działaniu przeciwartretycznym tego produktu. Biorąc pod uwagę działania niepożądane wielu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, terapia jadem pszczelim może być alternatywną metodą w leczeniu chorób reumatycznych, takich jak RZS.

Jad pszczeli wykazuje także aktywność przeciwnowotworową. Liczne linie komórek nowotworowych, takich jak: komórki raka nerki, płuc, wątroby, prostaty, pęcherza, piersi, jak również komórek białaczki, mogą być punktem docelowym dla działania melittyny, głównego składnika jadu pszczelego.

SŁOWA KLUCZOWE: jad pszczeli, melittyna, właściwości farmakologiczne.

#### Summary

Recent studies have shown different mechanisms responsible for the anti-rheumatic, anti-inflammatory, analgesic and anticancer activity of honeybee venom. Inhibitory effect of bee venom and its individual components on the expression of proinflammatory genes: COX-2 and phospholipase A<sub>2</sub>, as well as decrease of production of inflammation mediators such as: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO and ROS may play an important role in anti-rheumatic action of this product. Considering the many side effects of NSAIDs, bee venom therapy can be an alternative method for the treatment of rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis.

Bee venom also exhibits antitumor activity. Many cancer cell lines: renal, lung, liver, prostate, bladder and mammary cancer cells as well as leukemia cells may be the target for the action of melittin, the main component of bee venom.

KEYWORDS: honeybee venom, melittin, pharmacological properties.

#### Wstęp

Produkty pochodzenia naturalnego jako niezwykle bogate źródło związków o zróżnicowanych właściwościach chemicznych oraz biologicznych stanowią alternatywę dla leków syntetycznych. Laboratoria badawcze na całym świecie pracują nad poszukiwaniem innowacyjnych leków pochodzenia naturalnego łączących w sobie zarówno skuteczność, jak i bezpieczeństwo stosowania.

Spośród produktów naturalnych na szczególną uwagę zasługuje jad pszczeli, będący wydzieliną gruczołów jadowych pszczoły miodnej (*Apis mellifera*). Skład jadu jest bardzo złożony. Zdecydowaną większość jego suchej masy stanowią peptydy (melittyna, apamina, peptyd MCDP, tertiapina, sekapina, adolapina, prokamina) i białka o właściwościach enzymatycznych (fosfolipaza A<sub>2</sub>, hialuronidaza, fosfomonoesteraza, lizofosfolipaza,  $\alpha$ -D-glukozydaza). Ponadto w jadzie występuje wiele związków niskocząsteczkowych: feromony, aminy biogenne, cukry, aminokwasy, fosfolipidy, biopierwiastki. Wiele składników jadu pszczelego to związki farmakologicznie czynne, a złożony

skład tego surowca powoduje, że wywiera on wielokierunkowe działanie [1]. Potwierdzono już skuteczność jadu w leczeniu takich schorzeń, jak: choroby reumatyczne, ból oraz choroby nowotworowe.

Ponadto jad pszczeli podawany w dawkach terapeutycznych lub nawet znacznie wyższych jest całkowicie bezpieczny i nie powoduje żadnych skutków ubocznych, co zostało udowodnione w badaniach klinicznych.

#### Działanie przeciwrheumatyczne jadu pszczelego

##### *Etiologia choroby zwyrodnieniowej stawów i reumatoidalnego zapalenia stawów*

Choroba zwyrodnieniowa stawów jest bardzo powszechnym schorzeniem występującym głównie w wieku średnim i u osób starszych. Atakuje ona duże stawy, głównie kolanowe powodując lokalne zmiany degeneracyjne w chrząstce, przerost kości podchrzęstnych, nadmierny przyrost kości dookoła regionów podchrzęstnych

i deformację stawów. Zmianom tym towarzyszy stan zapalny.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) występuje u około 0,5% populacji osób dorosłych. RZS jest jednostką chorobową na podłożu autoimmunologicznym, której etiologia nie jest znana. Jednakże określono kaskadę immunologicznych i zapalnych reakcji powodujących to schorzenie. Mechanizmy te powodują stan zapalny błony maziowej, po czym następuje nieodwracalna destrukcja stawów i kości [2].

W RZS fibroblasty błony maziowej (synowioocyty), makrofagi, komórki T, komórki B, neutrofile, komórki tuczne, komórki dendrytyczne oraz komórki NK – natural killers naciekają tkankę błony maziowej. Nie wiadomo, w jaki sposób proces zapalny zostaje zainicjowany, ponieważ błona maziowa, w której przebiega proces zapalny, ma już histopatologiczne właściwości choroby przewlekłej w momencie, kiedy obserwuje się pierwsze objawy kliniczne [3]. W klinicznym stadium choroby stwierdzono zwiększoną komórkowość maziówki (hiperplazję). Prowadzi do tego mobilizacja komórek zapalnych, lokalny zastój i namnażanie się komórek. Napływ komórek zapalnych do maziówki jest zależny od wielu czynników immunologicznych [4].

W reakcje zapalne zaangażowane są mediatory procesu zapalnego takie jak: tlenek azotu (NO) i prostaglandyny (PG), które działają na specyficzne receptory ulokowane na powierzchni komórki [5]. Cytokiny prozapalne takie jak: IL-1 i TNF aktywują szlak indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) w komórkach kości, a powstający NO nasila procesy zapalne. Natomiast prostaglandyny związane są ze złożonymi interakcjami prowadzącymi do nadżerki chrząstki stawowej i kości okołostawowej. Podwyższony poziom PG stwierdzono w komórkach maziowych, na które działano za pomocą mediatorów procesu zapalnego oraz u pacjentów z RZS [6]. Kolejnym ważnym czynnikiem odgrywającym istotną rolę w patofizjologii stanów ciężkich chorób zapalnych takich jak RZS, jest fosfolipaza A<sub>2</sub>. Dlatego czynniki hamujące fosfolipazę A<sub>2</sub>, m.in.: COX-2 oraz NOS mogą być potencjalnie wykorzystane, jako leki przeciwzapalne i przeciwartretyczne.

#### *Terapia chorób reumatycznych jadem pszczelim*

W leczeniu chorób reumatycznych stosuje się metody konwencjonalne takie jak: leczenie farmakologiczne, fizykoterapię, kinezyterapię oraz metody chirurgiczne (obecnie szeroko stosowana artroskopia z artroplastyką). Leczenie farmakologiczne (niesteroidowe leki przeciwzapalne, sterydy, leki immunosupresyjne) obarczone jest szeregiem działań niepożądanych, zatem należy poszukiwać bezpieczniejszej i efektywniejszej terapii [7]. Alternatywną metodą może być w tym przypadku terapia z użyciem jadu pszczelego.

Działanie przeciwartretyczne jadu pszczelego badane było na różnych modelach zwierzęcych takich jak: arte-

tyzm indukowany immunologicznie – karageniną lub lipopolisacharydami. Wykazano, że po podaniu podskórnym jadu pszczelego następuje zahamowanie wywołanego karageniną immunologicznego artretyzmu szczurów w sposób zależny od dawki [8]. Pojedyncza dawka jadu pszczelego podana podskórną na dzień przed lub dzień po podaniu CFA (complete Freund's adjuvant – czynnik wywołujący chorobę) efektywnie hamowała rozwój zapalenia wielostawowego. Efekt ten maleje wraz ze zwiększającym się opóźnieniem w podaniu jadu. Jad pszczeli był najbardziej efektywny, gdy był wstrzykiwany podpodeszwowo razem z CFA. Podobnie do jadu pszczelego działają również inne antygeny np. albumina jajka. Stwierdzono, że zapobiegają rozwojowi artretyzmu, kiedy zostaną zmieszane z CFA i wstrzyknięte w tylną łapę. To sugeruje, że mechanizm antyartretycznego działania jadu pszczelego polega na modyfikacji odpowiedzi immunologicznej. Dzieje się to prawdopodobnie na drodze konkurencji antygenowej.

#### *Możliwy mechanizm działania antyartretycznego jadu pszczelego*

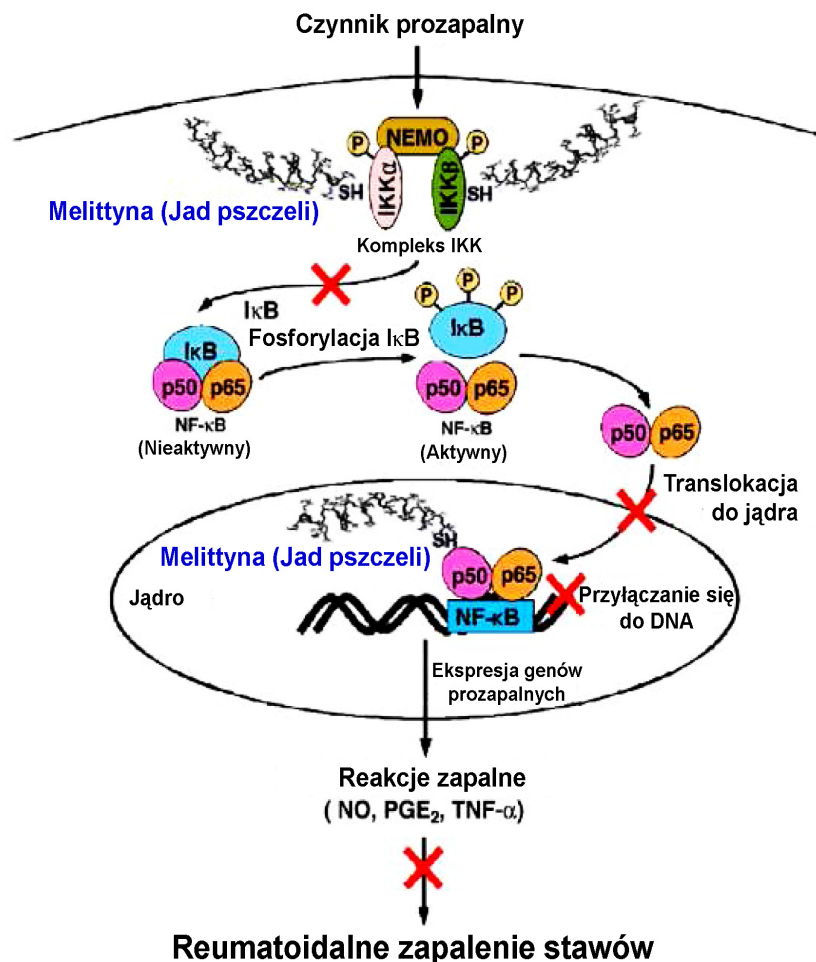
Wykazano, że wyizolowana z jadu pszczelego adolapina posiada silne właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe [9]. Przeciwartretyczne działanie adolapiny powiązane jest prawdopodobnie z hamowaniem syntezy prostaglandyn. W innych badaniach wykazano także, że jad pszczeli hamuje artretyzm wywołany przez drobnoustroje *Mycobacterium butyricum* u szczurów Lewisa. Jad pszczeli podany w dawce 2 mg/kg/dzień przez 24 dni hamował odpowiedzi zapalne, ale ich całkowicie nie znosił [10]. Badania te wykazały, że jad pszczeli hamuje artretyzm indukowany immunologicznie w większym stopniu u samic szczurów niż u samców. Natomiast podobne u obu płci były zmiany w metabolizmie hemu. Modyfikacje w metabolizmie hemu wywołane przez jad pszczeli sugerują, że zaburzenia układu immunologicznego powodują również zmiany w wątrobowych enzymach mikrosomalnych.

Przedstawiono także dowody na to, że jad pszczeli silnie hamuje produkcję nadtlenków i wodoronadtlenków przez neutrofile ludzkie. Dzieje się to w sposób nietoksyczny i zależny od dawki [11]. Stwierdzono również, że melittyna wykazuje wysokie powinowactwo do łączenia się z kalmoduliną. Ponieważ łączenie się z kalmoduliną hamuje produkcję nadtlenków w neutrofilach ludzkich, zbadano wpływ melittyny i innych peptydów jadu pszczelego na produkcję tych reaktywnych form tlenu (RFT) w ludzkich leukocytach krwi obwodowej. Wykazano, że w przeciwieństwie do pozostałych frakcji jadu pszczelego, melittyna hamuje produkcję wolnych rodników. Zatem melittyna hamując produkcję RFT przez komórki zapalne, zmniejsza sam proces zapalny w tkance. Na tej podstawie zasugerowano, że melittyna może służyć, jako modelowe białko odgrywające rolę w regulacji procesu produkcji wolnych rodników *in vivo* w przebiegu różnych schorzeń, w tym artretyzmu.

Fracja wodna jadu pszczelego (masa poniżej 20 kDa) zawiera prawdopodobnie najbardziej aktywne składniki [12]. Porównano właściwości przeciwzapalne n-heksanu, octanu etylu i frakcji wodnych jadu pszczelego poprzez pomiar *in vitro* aktywności COX i produkcji cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ). Fracja wodna jadu pszczelego została podzielona na 3 subfrakcje zgodnie z masą cząsteczkową. Frakcja 1. (powyżej 20 kDa), frakcja 2. (pomiędzy 10 i 20 kDa) i frakcja 3. (poniżej 10 kDa). Frakcje 2. i 3. silnie hamowały aktywność COX-2 i ekspresję mRNA COX-2 w sposób zależny od dawki i bez żadnych cytotoksycznych efektów. Wszystkie 3 subfrakcje hamowały produkcję TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Badania te po raz pierwszy zasugerowały działanie przeciwzapalne jadu pszczelego na drodze hamowania COX-2 oraz cytokin prozapalnych: TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Najprawdopodobniej przeciwartretyczne działanie

jadu pszczelego związane jest ze spadkiem ekspresji COX-2 i fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz obniżeniem poziomu TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO i RFT. Inne badania przedstawiają mechanizm działania przeciwzapalnego jadu pszczelego na poziomie molekularnym [1]. Jad pszczeli w dawkach 0,5–5,0  $\mu$ g/ml hamował indukowaną lipopolisacharydami (LPS) produkcję PGE<sub>2</sub> i NO w komórkach Raw 264.7 (linia komórkowa mysich makrofagów).

W bardziej precyzyjnych badaniach dotyczących mechanizmu działania jadu wykazano, że jad pszczeli albo sama melittyna hamuje, w sposób zależny od dawki, przyłączanie się do DNA czynnika NF- $\kappa$ B (Ryc. 1.). Hamowana jest również aktywność transkrypcyjna w komórkach linii Raw 264.7, synowocytach i komórkach THP-1 [13]. Jest to związane ze spadkiem uwalniania I $\kappa$ B w cytozolu.



**Rycina 1.** Proponowany mechanizm działania antyartretycznego jadu pszczelego [1].  
Figure 1. Proposed mechanism of anti-arthritis activity of honeybee venom.

**Wyjaśnienie Ryc. 1:** Aktywność czynnika NF- $\kappa$ B stymulowana jest przez różne czynniki prozapalne. Kompleks IKK składający się z kinaz IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  oraz podjednostki regulatorowej NEMO (IKK $\gamma$ ) powoduje fosforylację I $\kappa$ B (inhibitor NF- $\kappa$ B), co prowadzi do jego degradacji. W rezultacie dochodzi do wnikania aktywnych dimerów NF- $\kappa$ B do jądra komórki, gdzie łączą się one z DNA i powodują ekspresję genów prozapalnych. Jad pszczeli, względnie sama melittyna, hamuje uwolnienie I $\kappa$ B poprzez supresję kompleksów IKK. Dzieje się to na drodze interakcji pomiędzy grupami sulfhydrylowymi (SH) IKK $\alpha$  oraz IKK $\beta$  z cząsteczką melittyny, co prowadzi do dezaktywacji NF- $\kappa$ B. W rezultacie hamowana jest synteza mediatorów prozapalnych. Jad pszczeli lub melittyna może również wchodzić w interakcję z podjednostką p50 NF- $\kappa$ B w ten sposób hamować translokację p50 do jądra komórki.

Wykazano, że syntetyczna melittyna hamuje aktywność enzymatyczną wydzielniczej fosfolipazy A<sub>2</sub> pochodzącej z płynu maziowego (otrzymanego od pacjenta z reumatoidalnym zapaleniem stawów) poprzez bezpośrednie łączenie się z nią. To wskazuje, że zmniejszanie aktywności kluczowych enzymów procesu zapalnego może być potencjalnym celem działania terapeutycznego jadu pszczelego lub jego składników [14].

Reumatoidalne zapalenie stawów jest chorobą, w której stwierdzona jest niedostateczna aktywność apoptotyczna. Wykazano, że zmienione zapalnie w przebiegu RZS komórki maziówki traktowane jadem pszczelim ulegały apoptozie w ciągu 24 h [15, 16].

### Działanie przeciwbólowe jadu pszczelego

#### *Działanie nocyceptywne jadu pszczelego*

Iniekcja jadu pszczelego może powodować początkowo efekt nocyceptywny, a następnie przedłużający się efekt anty-nocyceptywny. Jad pszczeli w swoim składzie zawiera substancje wywołujące ból, w tym melittynę, histaminę, fosfolipazę A<sub>2</sub>. Dlatego szereg doniesień naukowych opisuje nocyceptywne działanie jadu po iniekcji dopodeszwowej [17, 18].

W mechanizmie działania nocyceptywnego jadu pszczelego biorą udział różne szlaki metaboliczne. Stwierdzono udział ATP P2x-purynoreceptora w trwałej nocyceptywnej odpowiedzi indukowanej iniekcją jadu pszczelego do podeszwowej powierzchni tylnej łapy szczura [19]. Śródskórne podanie 5 µg melittyny w dłoniową stronę przedramienia ludzkiego powodowało silny ból, po którym następował trwały wzrost temperatury. Miejscowa aplikacja 10% żelu z lidokainą nie zmniejszała znacząco bólu indukowanego melittyną, ale tłumiała wzrost temperatury. To sugeruje, że dawka 5 µg melittyny jest wystarczająca do powodowania bólu u ludzi, a 10% żel z lidokainą zmniejsza indukowany melittyną odruch nerwowy bez znaczącego efektu przeciwbólowego. Podskórna iniekcja melittyny w tylną powierzchnię tylnej łapy szczura powodowała natychmiastową toniczną odpowiedź nocyceptywną [20]. Zarówno intensywność, jak i czas trwania odpowiedzi na melittynę były monofazowe i zależały od dawki podania. Towarzyszącymi skutkami iniekcji melittyny były: nadwrażliwość cieplna i mechaniczna (hiperalgezia i allodynia) oraz reakcje zapalne (obrzęk łapy i wysięk). Zaproponowano, że melittyna jest odpowiedzialna za powodowanie długotrwałych zmian w neuronach rdzenia oraz za trwałą, spontaniczną nocycepcję (persistent spontaneous nociception – PSN), termiczną i mechaniczną nadwrażliwość oraz odpowiedzi zapalne.

Także u ludzi wykazano hiperalgezię wywołaną melittyną. 6 zdrowym ochotnikom podawano 10 µg melittyny śródskórnie i dowiedziono, że związek ten indukuje termiczną hiperalgezię [21].

#### *Anty-nocyceptywne działanie jadu pszczelego*

Pomimo że iniekcja jadu pszczelego powoduje ból i hiperalgezię, są dowody sugerujące, że jad pszczeli może działać również anty-nocyceptywnie w procesie zapalnym. Tradycyjnie jad pszczeli stosowany był do znoszenia bólu i leczenia przewlekłych chorób o podłożu zapalnym. Podskórne podanie jadu pszczelego w punkt akupunktury (apipunktura) powodowało silny efekt przeciwbólowy.

Mechanizm działania anty-nocyceptywnego jadu pszczelego nie został jeszcze precyzyjnie określony, lecz zasugerowano kilka mechanizmów. Aktywacja receptora adrenergicznego w miejscu sinawym i rdzeniowym rogu grzbietowym powoduje spadek transmisji nocyceptywnej z pierwotnych włókien aferentnych do neuronów wtórnych, wskutek tego hamowane jest przewodzenie do wyższych partii mózgu. Zstępujący układ noradrenergiczny moduluje transmisję informacji nocyceptywnej na poziomie rdzenia kręgowego [22].

Dodatkowymi mechanizmami odpowiedzialnymi za działanie anty-nocyceptywne jadu mogą być wyzwalanie endogennego układu hamującego ból oraz modyfikacja uwalniania lokalnych neuroprzekazników i neuropeptydów, takich jak substancja P. Celem wyjaśnienia tej sprawy niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań.

### Działanie przeciwnowotworowe jadu pszczelego

W 1950 roku po raz pierwszy opisano wpływ jadu pszczelego na proces nowotworzenia indukowany kolchicyną [23]. Prawie 30 lat później przeprowadzono 2 przeciwstawne badania. Jedne z badań wykazały, że melittyna ma działanie onkogenne, ponieważ może wnikać w fosfolipidowe dwuwarstwy i wykazywać działanie powierzchniowo czynne [24]. Następnie asocjacja melittyny z błonami komórkowymi powoduje: zaburzenie w grupach acylowych fosfolipidów, zwiększenie podatności fosfolipidów na działanie fosfolipazy i zwiększoną syntezę prostaglandyn z kwasu arachidonowego uwolnionego z fosfolipidów. Z drugiej strony stwierdzono, że podobny do melittyny, 13-octan-12-O-tetradekanoiloforbolu (TPA), mający strukturę pierścieniowej hydrofobowej cząsteczki i będący znanym promotorem nowotworów, hamuje różnicowanie się komórek czerniaka u myszy.

W innych badaniach oceniano działanie przeciwnowotworowe jadu pszczelego, określając śmiertelność u 580 zawodowych pszczelarzy w latach 1949–1978 [25]. Analizowano przyczyny ich zgonu, a otrzymane dane porównywano z resztą populacji. Odsetek zgonów pszczelarzy na skutek nowotworu był nieco niższy niż u pozostałych badanych. Ponadto odnotowano znacznie mniejszy odsetek zgonów na skutek raka płuc. Śmiertelność spowodowana innymi chorobami była porównywalna do ogólnej populacji. To sugeruje, że jad pszczeli może mieć właściwości chemoprewencyjne. W związku

z tym przeprowadzono szereg badań dotyczących właściwości onkoprotekcyjnych jadu pszczelego oraz jego głównego składnika – melittyny.

#### *Właściwości cytotoksyczne melittyny*

Melittyna będąca inhibitorem kalmoduliny hamuje wzrost ludzkich i mysich komórek białaczki [26]. Melittyna jest silniejszym inhibitorem wzrostu komórek niż metabolit fenotiazyny – sulfotlenek chlorpromazyny. Badano również wpływ melittyny na komórki gwiazdki [27]. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy aktywnością inhibitorów kalmoduliny i ich aktywnością hamującą wzrost komórek. Sugeruje się podobny mechanizm działania cytotoksycznego melittyny na komórki białaczki [28]. Stwierdzono także, że melittyna zwiększa toksyczność bleomycyny w kierunku ludzkich granulocytów/makrofagów i kolonii czerwono-krwinkowych komórek macierzystych [29]. Udowodniono również, że antagoniści kalmoduliny zwiększają działanie cytotoksyczne bleomycyny w kierunku niektórych ludzkich komórek nowotworowych i działanie to może również wpływać na patologiczne ludzkie komórki hematologiczne. Cytotoksyczne działanie melittyny jest proporcjonalne do jej antagonistycznego działania w kierunku kalmoduliny [27].

Stwierdzono, że komórki białaczki są 2–4 razy bardziej wrażliwe na cytolityczne działanie melittyny niż zdrowe komórki śledziony i komórki szpiku kostnego myszy [30]. Liza zdrowych komórek wywołana przez melittynę znoszona była po dodaniu do hodowli komórkowej galaktozaminy, glukozaminy lub  $\beta$ -laktoglobuliny, podczas gdy liza komórek białaczki nie została zahamowana. Obecność grup aminowych była niezbędna do blokowania aktywności litycznej melittyny, ponieważ sama glukoza, galaktoza i N-acetylowe pochodne nie wykazywały działania hamującego.

Inne badania dowiodły, że melittyna w stężeniu hamującym proliferację ludzkich komórek nowotworowych płuc równocześnie nie ogranicza wzrostu zdrowych komórek [31]. Ta różnica we wrażliwości na melittynę sugeruje, że uruchamiane są różne szlaki wzrostu w histologicznym różnicowaniu się komórek nowotworowych płuc i zdrowych komórek. Godne uwagi jest to, że melittyna jest szczególnie aktywna przeciwko komórkom, które wykazują wysoki poziom onkogenów ras [32]. Wykazano, że nabywanie odporności na zwiększające się stężenia melittyny połączone jest ze spadkiem poziomu ekspresji onkoprotein ras i liczby kopii genu ras. Powoduje to jednoczesny powrót przekształconych komórek do normalnej morfologii w sposób ściśle zależny od dawki. Ponadto melittyna wywołuje hiperaktywację fosfolipazy  $A_2$  w komórkach z genem ras, które uległy transformacji nowotworowej i powoduje ich selektywne zniszczenie. Sugeruje to, że hiperaktywacja fosfolipazy  $A_2$  przez melittynę może być mechanizmem działania cytotoksycznego melittyny przeciwko komórkom nowotworowym.

#### *Rola fosfolipazy $A_2$ w działaniu przeciwnowotworowym*

Fosfolipaza  $A_2$  wyizolowana z komórek ludzkiej trzustki, oznaczona jako hPLA2-I, pełni funkcję enzymu trawiennego. Stwierdzono, że dojrzała postać fosfolipazy hPLA2-I stymuluje wzrost linii komórek nowotworowych trzustki MIAPaCa-2, podczas gdy postać pro-hPLA2-I nie wykazywała takiego działania [33]. Badania wykazały, że komórki MIAPaCa-2 posiadają specyficzny punkt uchwytu dla dojrzałej cząsteczki fosfolipazy hPLA2-I. Fosfolipazy  $A_2$  z jadu wisłogona prążkowanego (*Laticauda semifasciata*), jadu grzechotnika diamentowego (*Crotalus adamanteus*), bakterii (*Streptomyces violaceoruber*) oraz jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) nie wykazywały żadnych właściwości proliferacyjnych w kierunku komórek linii MIAPaCa-2. Udowodniono również, że melittyna, aktywator fosfolipazy  $A_2$ , zwiększa aktywność kalpajny oraz nekrozę linii komórek nowotworowych wątroby (N1S1 i McA-RH7777) [34]. Śmierć komórek indukowana melittyną spotęgowana była inhibitorem proteazy kalpajny. Fakt ten sugeruje, że aktywacja kalpajny spowodowana fosfolipazą może być strategią terapeutyczną w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych przez melittynę.

Wykazano także, że jednoczesne działanie fosfolipazy  $A_2$  z jadu pszczelego i 3,4-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PtdIns(3,4)P2) powoduje wytworzenie lizatów nowotworów aktywujących dojrzewanie immunomodulujących ludzkich komórek dendrytycznych wywodzących się z linii monocytarno-makrofagowej. Takie lizaty komórek nowotworowych, które zawierają złożoną mieszaninę antygenów nowotworowych, wykazują właściwości immunostymulujące i spełniają wszystkie warunki dla szczepionki przeciwnowotworowej [35].

#### **Podsumowanie**

Zarówno badania *in vitro*, *in vivo*, jak i badania kliniczne wykazały, że terapia jadem pszczelim może być skuteczna w leczeniu takich schorzeń jak: choroby reumatyczne, ból oraz nowotwory.

Jednakże nadal do rozwiązania pozostaje wiele problemów takich jak np.: pełna charakterystyka fizykochemiczna poszczególnych składników jadu pszczelego, droga podania czy dawka jadu pszczelego stosowana w leczeniu poszczególnych chorób. Dlatego konieczne są dalsze badania kliniczne nad jadem pszczelim, aby wykorzystać w pełni jego dobroczynne właściwości.

#### **Piśmiennictwo**

1. Son D.J., Lee J.W., Lee Y.H. et al.: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Ther.*, 2007, 115(2), 246-270.
2. Bessis N., Doucet C., Cottard V. et al.: Gene therapy for rheumatoid arthritis. *J. Gene Med.*, 2002, 4(6), 581-591.

3. Tak P.P.: Is early rheumatoid arthritis the same disease process as late rheumatoid arthritis? *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001, 15(1), 17-26.
4. Buckley C.D.: Michael Mason prize essay 2003. Why do leucocytes accumulate within chronically inflamed joints? *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42(12), 1433-1444.
5. Cuzzocrea S., Wayman N.S., Mazzon E. et al.: The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol. Pharmacol.*, 2002, 61(5), 997-1007.
6. Williams J.A., Shacter E.: Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(41), 25693-25699.
7. Baumrucker S.J.: Complementary medicine and the scientific method: mainstreaming proven "alternative" therapies. *Am. J. Hosp. Palliat. Care*, 2002, 19(6), 369-371.
8. Chang Y.H., Bliven M.L.: Anti-arthritis effect of bee venom. *Agents Actions*, 1979, 9(2), 205-211.
9. Shkenderov S., Koburova K.: Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, 1982, 20(1), 317-321.
10. Eiseman J.L., von Bredow J., Alvares A. P.: Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31(6), 1139-1146.
11. Somerfield S D., Stach J.L., Mraz C. et al.: Bee venom melittin blocks neutrophil O2- production. *Inflammation*, 1986, 10(2), 175-182.
12. Nam K.W., Je K.H., Lee J.H. et al.: Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1beta) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arch. Pharm. Res.*, 2003, 26(5), 383-388.
13. Park H.J., Lee S.H., Son D.J. et al.: Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50(11), 3504-3515.
14. Saini S.S., Peterson J.W., Chopra A.K.: Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 238(2), 436-442.
15. Hong S.J., Rim G.S., Yang H.I. et al.: Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon*, 2005, 46(1), 39-45.
16. Veis D.J., Sorenson C.M., Shutter J.R. et al.: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 1993, 75(2), 229-240.
17. Luo C., Chen J., Li H.L. et al.: Spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord of anesthetized rat induced by subcutaneous bee venom injection. *Brain Res.*, 1998, 806(2), 175-185.
18. Wu S.X., Wang W., Wang Y.Y. et al.: C-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases subcutaneous bee venom injection-induced nociceptive behavior and fos expression in the rat. *Neurosignals*, 2002, 11(4), 224-230.
19. Zheng J.H., Chen J.: Modulatory roles of the adenosine triphosphate P2x-purinoreceptor in generation of the persistent nociception induced by subcutaneous bee venom injection in the conscious rat. *Neurosci. Lett.*, 2000, 278(1-2), 41-44.
20. Li K.C., Chen J.: Altered pain-related behaviors and spinal neuronal responses produced by s.c. injection of melittin in rats. *Neuroscience*, 2004, 126(3), 753-762.
21. Sumikura H., Andersen O.K., Drewes A.M. et al.: Secondary heat hyperalgesia induced by melittin in humans. *Eur. J. Pain.*, 2006, 10(2), 121-125.
22. Kuraishi Y., Harada Y., Takagi H.: Noradrenaline regulation of pain-transmission in the spinal cord mediated by alpha-adrenoceptors. *Brain Res.*, 1979, 174(2), 333-336.
23. Havas L.J.: Effect of bee venom on colchicine-induced tumours. *Nature*, 1950, 166(4222), 567-568.
24. Mufson R.A., Laskin J.D., Fisher P.B. et al.: Melittin shares certain cellular effects with phorbol ester tumour promoters. *Nature*, 1979, 280(5717), 72-74.
25. McDonald J.A., Li F.P., Mehta C.R.: Cancer mortality among beekeepers. *J. Occup. Med.*, 1979, 21(12), 811-813.
26. Hait W.N., Grais L., Benz C. et al.: Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phenothiazines and melittin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1985, 14(3), 202-205.
27. Hait W.N., Lee G.L.: Characteristics of the cytotoxic effects of the phenothiazine class of calmodulin antagonists. *Biochem. Pharmacol.*, 1985, 34(22), 3973-3978.
28. Lazo J.S., Hait W.N., Kennedy K.A. et al.: Enhanced bleomycin-induced DNA damage and cytotoxicity with calmodulin antagonists. *Mol. Pharmacol.*, 1985, 27(3), 387-393.
29. Lazo J.S., Chen D.L., Gallicchio V.S. et al.: Increased lethality of calmodulin antagonists and bleomycin to human bone marrow and bleomycin-resistant malignant cells. *Cancer Res.*, 1986, 46(5), 2236-2240.
30. Killion J.J., Dunn J.D.: Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 139(1), 222-227.
31. Zhu H.G., Tayeh I., Israel L. et al.: Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 1991, 5(2), 52-58.
32. Sharma S.V.: Melittin resistance: a counterselection for ras transformation. *Oncogene*, 1992, 7(2), 193-201.
33. Hanada K., Kinoshita E., Itoh M. et al.: Human pancreatic phospholipase A2 stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line. *FEBS Lett.*, 1995, 373(1), 85-87.
34. Arora A.S., de Groen P.C., Croall D.E. et al.: Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation. *J. Cell. Physiol.*, 1996, 167(3), 434-442.
35. Putz T., Ramoner R., Gander H. et al.: Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, 56(5), 627-640.

**Adres do korespondencji:**

prof. dr hab. Zenon J. Kokot  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP  
ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań