

Poređenje količine melitina i fosfolipaze A2 u pčelinjem otrovu prikupljenom za vreme paše uljane repice i suncokretove paše

Ispitivana je količina melitina i fosfolipaze A2 u dva uzorka pčelinjeg otrova, sakupljenih za vreme paše pčela uljanom repicom i suncokretom. Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u količini aktivnih komponenti (melitin i fosfolipaza A2) kod ova dva otrova. Kvantifikacijom količine proteina pokazano je da u otrovu dobijenom iz pčela za vreme paše uljane repice ima 0.45 mg/mL proteina, dok otrov dobijen za vreme suncokretove paše sadrži 0.31 mg/mL proteina. Titrimetrijskim esejem određena je količina masnih kiselina, nastalih kao posledica aktivnosti fosfolipaze A2 (2.96×10^{-5} mol paša uljane repice, 1.89×10^{-5} mol suncokretove paše). Hemolitička sposobnost otrova, srazmerna količini melitina, kod otrova prikupljenog za vreme paše uljane repice bila je 76%, dok je za otrov prikupljen za vreme suncokretove paše hemoliza iznosila 29%, merena u odnosu na 100%-nu hemolizu izazvanu 10%-nim SDS-om. Može se zaključiti da otrov pčela u vreme paše uljane repice ima značajno intenzivniji fiziološki efekat od otrova istih pčela dobijenog za vreme suncokretove paše. Ovi rezultati mogu biti značajni za ljude koji pokazuju visoku osetljivost na ubod pčela, jer veća koncentracija aktivnih komponenti otrova dovodi do intenzivnije reakcije, kao i u alternativnim terapijama maligniteta i infekcija HIV virusom. Pretpostavljena korelacija između količine proteina i ishrane pčela otvara prostor daljim istraživanjima.

Vukašin Mračajac (1999), Mladenovo, Kosovska 95, učenik 3. razreda Medicinske škole „7. april” u Novom Sadu.

Uvod

Pčelinji otrov je smeša proteina i biogenih amina koju stvaraju pčele kako bi zaštitile košnicu. Jedna pčela u toku života proizvede 0.3–0.5 mg otrova. U sastav pčelinjeg otrova ulazi više jedinjenja (melitin, fosfolipaza A2, histamin, dopamin, noradrenalin itd) od kojih su najzastupljeniji melitin i fosfolipaza A2. Melitin je peptid molekulske mase 2.8 kDa sa hemolitičkom sposobnošću i predstavlja dominantnu komponentu otrova sa zastupljenošću od 50 do 60% suve mase otrova (Brochetto-Braga *et al.* 2006). Melitin deluje sinergistički sa fosfolipazom A2 (Ownby *et al.* 1997),

MENTORI:

Stefan Maksimović,
student III godine
Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Ivan Milenković,
diplomirani biohemičar,
IS Petnica

koja čini oko 11% suvog otrova (Owen 1979). Pretpostavlja se da melitin uspostavlja hidrofobne interakcije sa membranom i na taj način čini dostupnijim glavni supstrat (fosfatidilholin) za fosfolipazu A2 (Fletcher *et al.* 1989). Primećeno je da se sastav otrova, naročito količina melitina i fosfolipaze A2, menja u zavisnosti od starosti pčela, tako što vrlo mlade pčele imaju manju količinu otrova od starijih pčela, pri čemu im se otrov kvalitativno razlikuje po količini histamina (Owen i Braidwood 1974). Električnom stimulacijom pčela na ulazu u košnicu moguće je prikupiti velike količine čistog otrova (Benton *et al.* 1963), gde je prikupljeni otrov proizveden od strane pčela približno iste starosne dobi budući da samo najstarije pčele, izletačice, napuštaju košnicu.

Pčelinji otrov se koristi u alternativnoj terapiji maligniteta i infekcija HIV virusom, relaksaciji mišića i kao analgetik (Son *et al.* 2007; Fenard *et al.* 2001). Zbog toga istraživanja na ovu temu mogu biti značajna u farmaceutskoj industriji za optimizaciju proizvodnje pčelinjeg otrova i za desenzitizaciju ljudi alergičnih na pčelinji ubod.

Cilj ovog rada je da se uporedi količina i aktivnost melitina i fosfolipaze A2 u pčelinjem otrovu prikupljenom za vreme paše uljane repice i suncokretove paše, i utvrdi razlika u efikasnosti ova dva otrova.

Materijal i metode

Identifikacija fosfolipaze A2 i melitina je vršena elektroforezom. Aktivnost fosfolipaze A2 je merena titrimetrijskim esejem, dok je aktivnost melitina merena hemolitičkim esejem. Koncentracija fosfolipaze A2 i melitina u otrovu je direktno proporcionalna njihovoj aktivnosti.

1. Uzorkovanje pčelinjeg otrova. Uzorci pčelinjeg otrova su prikupljeni električnim skupljačem otrova (ESPO1988 COMPAKT) za vreme paše pčela na uljanoj repici tokom aprila i za vreme paše pčela na suncokretu tokom jula. Prikupljeni otrov sa različitih paša poreklom je od jedne pčelinje zajednice (*Apis mellifera carnica*) iz Langstrot Rutove-LR košnice. Od čistog otrova napravljen je vodeni rastvor koncentracije 1 mg/mL.

2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorcima pčelinjeg otrova. Određivanje koncentracije proteina vršeno je spektrofotometrijski. Kao standard za kalibracionu krivu korišćen je goveđi serumski albumin (BSA) u opsegu koncentracija od 0.1 do 1 mg/mL. U 0.5 μ L rastvora otrova dodato je 200 μ L Bredfordovog reagensa. Analiza je rađena u triplicatu. Absorbanca je merena na ELISA čitaču na 595 nm (Vujčić 2002).

3. Određivanje količine masnih kiselina titrimetrijskim esejem. Titrimetrijskim esejem izmerena je aktivnost fosfolipaze, praćenjem potrošnje NaOH za neutralisanje masnih kiselina. Za jednu analizu upotrebjeno je 30mL supstrata koji je dobijen mešanjem kalcijum-hlorida, natrijum-deoksiholata, BSA, vode i rastvora žumanceta (jedno žumance se razmuti u 200 mL vode) u odnosu 3 : 3 : 3 : 6 : 15. Neophodno je da pH supstrata bude 8. U supstrat je dodato 50 μ L otrova, dodavanjem 0.005 M

NaOH je pH održavan na 8. U određenim vremenskim intervalima (1, 3, 5, 7, 8.83 min) je očitavana potrošnja NaOH. Svaki uzorak je rađen u tripliku (Owen *et al.* 1990).

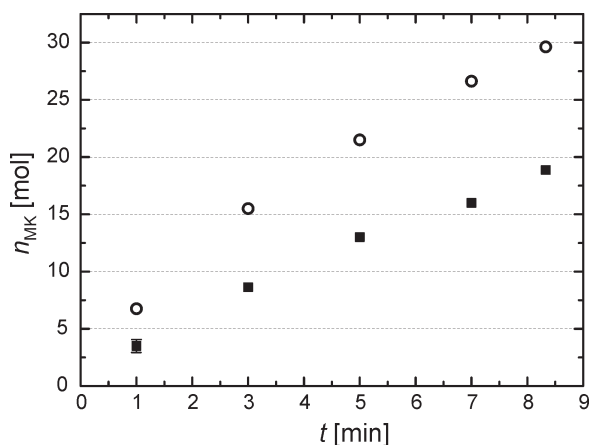
4. Hemolitički esej. Hemolitička sposobnost otrova je dobijena spektrofotometrijski, merenjem absorbance hemoglobina oslobođenog iz hemoliziranih eritrocita. Korišćena je suspenzija opranih eritrocita u fiziološkom rastvoru u odnosu 1:80. U 0.5 mL suspenzije eritrocita je dodato 0.95 mL fiziološkog rastvora i 50 μ L razblaženja otrova (uzorak otrova uljane repice je razblažen 200 puta, dok je otrov suncokreta razblažen 50 puta). Smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Nakon inkubacije smeša je centrifugirana 8 min na 650 G. Merena je absorbancia supernatanta na talasnoj dužini od 413 nm. Kao pozitivna kontrola za apsolutnu hemolizu eritrocita korišćeno je 1.5 μ L 10% SDS (Owen i Pfaff 1995).

5. Identifikacija prisustva melitina i fosfolipaze A2 u uzorcima pčelinjeg otrova. SDS-Poliakrilamidna Gel Elektroforeza (SDS-PAGE) je korišćena za dokazivanje prisustva melitina i fosfolipaze A2 u otrovima. Korišćen je 30%-tni akrilamidni gel, dok je za uzorke korišćeno 45 μ L otrova i 5 mL pufera za uzorke (Vujčić 2002).

Rezultati i diskusija

1. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorcima pčelinjeg otrova. Količina proteina izračunata je na osnovu kalibracionih krivi napravljenih uz pomoć standarda BSA (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL). Koncentracija proteina u otrovu prikupljenom za vreme paše uljane repice iznosila je 0.4576 mg/mL, dok je za suncokret iznosila 0.3172 mg/mL. S obzirom da je otrov prikupljen od istih pčela, iz ovih rezultata proizilazi da sastav otrova verovatno zavisi od sastava nektara ovih medonosnih biljaka odnosno od same ishrane pčela, što zahteva dalja istraživanja.

Uzorci otrova su sakupljeni kod pčela izletačica čija je starost približno ista (sve izletačice se po starosti razlikuju najviše 10-ak dana).



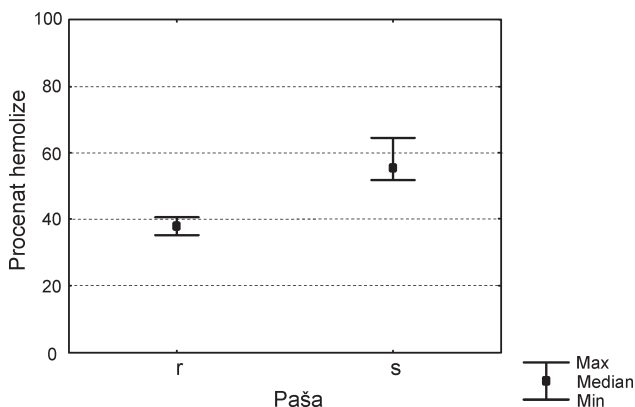
Slika 1. Aktivnost fosfolipaze A2 kod upoređenih otrova:
beli krugovi – uljana repica
crni kvadrati – suncokret

Figure 1. Activity of phospholipase A2 in the compared poisons:
white circles – rapeseed pasture
black squares – sunflower pasture

2. Određivanje količine masnih kiselina titrimetrijskim esejem.

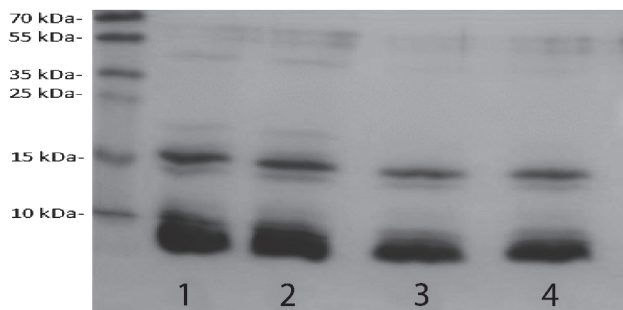
Aktivnost fosfolipaze A2 je srazmerna količini masnih kiselina nastalih kao posledica aktivnosti fosfolipaze A2 u određenom vremenskom periodu. Količina masnih kiselina je preračunavana u vremenskim intervalima od 1, 3, 5, 7 i 8:49 min. Za uzorak otrova za vreme paše uljane repice količina masnih kiselina iznosila je 6.8×10^{-6} , 15.5×10^{-6} , 21.5×10^{-6} , 29.6×10^{-6} mol, dok je za otrov za vreme suncokretove paše iznosila 3.5×10^{-6} , 8.6×10^{-6} , 13×10^{-6} i 18.9×10^{-6} mol (slika 1). Iz ovih rezultata može se zaključiti da je u otrovu prikupljenom za vreme paše uljane repice veća aktivnost fosfolipaze A2 nego u otrovu prikupljenom za vreme suncokretove paše, što je posledica veće koncentracije samog enzima kao i aktivnog peptida-melitina, koji doprinosi aktivnosti enzima.

3. Hemolitički esej. Količina melitina srazmerna je hemolitičkoj sposobnosti otrova. Procenat hemoliziranih eritrocita izražen je relativno u odnosu na hemolizu izazvanu 10%-tnim SDS-om, čija je vrednost uzeta kao apsolutna hemoliza. Otrov za vreme paše uljane repice je izazvao hemolizu 76% eritrocita, dok je otrov za vreme suncokretove paše izazvao hemolizu 29% eritrocita (slika 2). Otrov prikupljen za vreme paše uljane repice je pokazao značajno veću hemolitičku sposobnost, zbog toga što se u tom otrovu nalazi veća koncentracija melitina u odnosu na otrov prikupljen sa suncokretove paše.



Slika 2. Procenat hemolize 100 puta razblaženog otrova:
r – otrov za vreme paše uljane repice
s – otrov za vreme suncokretove paše

Figure 2. Percentage of hemolysis of 100-fold diluted poison:
r – poison collected during rapeseed pasture
s – poison collected during sunflower pasture



Slika 3. Elektroforeza, uzorak 1 i 2 odgovaraju otrovu za vreme paše uljane repice, a 3 i 4 otrovu za vreme suncokretove paše (melitin 2.8 kDa, fosfolipaza A2 18 kDa)

Figure 3. Electrophoresis, sample 1 and 2 correspond to poison during the rapeseed, and 3 and 4 to poison during the sunflower pasture (melitin 2.8 kDa, fosfolipaza A2 18 kDa)

4. Identifikacija prisustva melitina i fosfolipaze A2 u uzorcima pčelinjeg otrova. Na slici 3 jasno se uočavaju razlike u debljini i intenzitetu traka kod frakcija melitina i fosfolipaze A2 kod poređenih otrova, iz čega se može zaključiti da se u otrovu prikupljenom za vreme uljane repice (uzorci 1 i 2) nalazi više melitina i fosfolipaze A2 u odnosu na otrov prikupljen za vreme suncokretove paše (uzorci 3 i 4).

Zaključak

Ovim radom je pokazano da se kod pčelinjeg otrova prikupljenog za vreme paše uljane repice nalazi značajno veća količina aktivnih komponenti nego u otrovu prikupljenom za vreme suncokretove paše, što može biti posledica samog sastava nektara ovih biljaka. S obzirom da su ova dva jedinjenja najodgovornija za efekat otrova i alergijsku reakciju, može se zaključiti da otrov pčela u vreme paše uljane repice ima značajno intenzivniji efekat nego otrov proizveden od strane istih pčela za vreme suncokretove paše. S tim u vezi, ovaj rad otvara prostor za dalja istraživanja uz pretpostavku da ishrana pčela i sastav nektara ovih biljaka utiču na sastav otrova. Ovi rezultati mogu biti značajni u merama predostrožnosti za ljude koji imaju reakciju preosetljivosti na ubod pčela, kao i u postupcima desenzitizacije. Ovi rezultati su značajni i za optimizaciju komercijalne proizvodnje otrova, jer otrov prikupljen na paši uljane repice daje značajno veći prinos aktivnih supstanci u odnosu na otrov prikupljen na suncokretovoj paši.

Literatura

- Benton A. W., Morse, R. A., Stewart J. D. 1963. Venom collection from honey bees. *Science*, **142**: 228.
- Brochetto-Braga M. R., Palma M. S., Carmona E. C., Chaud-Netto J., Rodrigues A., Da Silva G. P. 2006. Influence of the collection methodology on the *Apis mellifera* venom composition: peptide analysis. *Sociobiology*, **47**: 761.
- Fenard D., Lambeau G., Maurin T., Lefebvre J. C., Doglio A. 2001. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Molecular pharmacology*, **60** (2): 341.
- Fletcher J. E., Michaux K., Jiang M. 1989. Contribution of bee venom phospholipase A2 contamination in melittin fractions to presumed activation of tissue phospholipase A2. *Toxicon*, **26**: 647.
- Owen M. D. 1979. Relationship between age and hyaluronidase activity in the venoms of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*, **17**: 94.

- Owen M. D., Braidwood J. L. 1974. A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Canadian Journal of Zoology*, **52**: 387.
- Owen M. D., Pfaff L. A., Reisman R. E., Wypych J. 1990. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon*, **28**: 813.
- Owen M. D., Pfaff L. A. 1995. Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*, **33**: 1181.
- Owby C. L., Powell J. R., Jiang M. S., Fletcher J. E. 1997. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*, **35**: 67.
- Son D. J., Lee J. W., Lee Y. H., Song H. S., Lee C. K., Hong J. T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & therapeutics*, **115** (2): 246.
- Vujić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec

Vukašin Mračajac

Comparison of Melittin and Phospholipase A2 Levels in Bee Venom Collected During Rapeseed and Sunflower Pasture

In this paper the levels of melittin and phospholipase A2 were examined in two samples of poison taken during the pasture of rapeseed and sunflower, and then compared. The results showed a significant difference in the amount of active components (melittin and phospholipase A2) for these two toxins. Quantification of proteins led to the result that the poison from the rapeseed sample has 0.45 mg/mL of proteins, while the poison from the sunflower has 0.31 mg/L proteins. The amount of the products of phospholipase A2 (fatty acids) in the rapeseed sample amounted to 2.96×10^{-5} mol, while in the sunflower sample it was 1.89×10^{-5} mol. The ability of the poison to hemolyze red blood cells, which is proportional to the amount of melittin, was 76% with the poison of the rapeseed sample, while it was 29% with the poison from the sunflower pasture. It can be concluded that the venom of bees during the pasture of rapeseed would have significantly increased effects, made by the same bees, than during the sunflower pasture. These results may be important for people who show a high sensitivity to bee stings. It is also believed that the increased amount of proteins is connected to the nourishment of bees in that period, which opens space for further research.

