

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA HORVAT

DIPLOMSKO DELO  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA HORVAT

**CITOTOKSIČNI UČINEK MELITINA NA  
ENDOTELIJSKE CELICE ČLOVEKA**

**CYTOTOXIC EFFECT OF MELITTIN ON  
HUMAN ENDOTHELIAL CELLS**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Fakulteti za medicino pod mentorstvom izr. prof. dr. Lovra Stanovnika in pod somentorstvom doc. dr. Katarine Černe. Meritve s citometrom in mikroskopijo so bile opravljene v laboratoriju za pretočno citometrijo in v laboratoriju za celične kulture na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. Fluorescenčna mikroskopija je bila opravljena v laboratoriju na Inštitutu za biologijo celice na Fakulteti za medicino.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Lovru Stanovniku za vse strokovne napotke in doc. dr. Katarini Černe za vodenje diplomskega dela in pomoč pri eksperimentalnemu delu.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Petru Veraniču, da je omogočil poskus s fluorescenčno mikroskopijo.

Zahvaljujem se tehnični sodelavki Nevenki Dolžan za pomoč pri eksperimentalnemu delu in za prijaznost ter potrpežljivost.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Lovra Stanovnika in pod somentorstvom doc. dr. Katarine Černe.**

**Jerneja Horvat**

# KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 ČEBELJI STRUP .....	1
1.1.1 Škodljivi učinki čebeljega strupa .....	1
1.1.2 Čebelji strup in kardiovaskularni sistem .....	3
1.1.3 Sestava čebeljega strupa.....	3
1.2 MELITIN .....	5
1.2.1 Melitin in membrana .....	6
1.2.2 Melitin in celični proteini.....	7
1.2.3 Melitin in kardiovaskularni sistem.....	8
1.3 NEKROZA .....	9
1.4 APOPTOZA - PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT.....	9
1.5 INTRACELULARNE PROTEOLITIČNE KASKADE, KI JIH VODIJO KASPAZE .....	10
1.6 REGULACIJA KASPAZ IN PREŽIVETJA CELICE.....	12
1.7 CITOTOKSIČNI UČINEK MELITINA .....	15
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	17
2.1 HIPOTEZE .....	18
<b>3 METODE IN MATERIALI</b> .....	18
3.1 KEMIKALIJE, TOPILA, REAGENTI.....	18
3.2 MATERIALI .....	19
3.3 APARATURE .....	20
3.4 METODE IN POSTOPKI .....	20
3.4.1 Celična kultura .....	20
3.4.2 Izpostavljenost celične kulture HUVEC melitinu.....	21
3.4.3 Štetje celic z Neubaumanovo komoro s pomočjo svetlobne mikroskopije in določanje celične viabilnosti z barvilom tripan modro .....	22

3.4.4 Metoda s flourescenčno označenim proteinom aneksin V in barvilom 7-AAD za določanje apoptotičnih in nekrotičnih celic s pretočnim citometrom .....	23
3.4.5 Metoda z barvilom DAPI za določanje apoptotičnih celic s pomočjo flourescenčne mikroskopije .....	24
3.5 STATISTIKA .....	24
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>25</b>
4.1 VREDNOTENJE DEJAVNIKOV, KI VPLIVAJO NA ODZIVNOST CELIČNE KULTURE HUVEC NA MELITIN .....	25
4.1.1 Vpliv raztopine melitina.....	25
4.1.2 Vpliv konfluentnosti celic .....	29
4.1.3 Vpliv plastike .....	31
4.1.4 Čas po pasaži.....	31
4.2 ŠTETJE CELIC Z NEUBAUMANOVO KOMORO S POMOČJO SVETLOBNE MIKROSKOPIJE IN DOLOČANJE CELIČNE VIABILNOSTI Z BARVILOM TRIPAN MODRO .....	31
4.3 METODA S FLUORESCENČNO OZNAČENIM PROTEINOM ANEKSIN V IN BARVILOM 7-AAD ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH IN NEKROTIČNIH CELIC S PRETOČNIM CITOMETROM .....	34
4.3.1 Citogrami.....	34
4.3.2 Časovna odvisnost odzivnosti adherentnih celic na učinek melitina .....	36
4.3.3 Odzivnost adherentnih celic (ad) in celic v suspenziji (susp) po 15 min reakciji z melitinom .....	39
4.3.4 Združene posamezne faze pritrjenih celic v različnih časovnih intervalih in faze pri primerjavi med pritrjenimi celicami in celicami v suspenziji po delovanju melitina .....	42
4.4 METODA Z BARVILOM DAPI ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH CELIC S POMOČJO FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE .....	44
<b>5 RAZPRAVLJANJE</b> .....	<b>46</b>
5.1 REZULTATI VREDNOTENJA UČINKA MELITINA Z MIKROSKOPOM .....	46
5.2 ŠTETJE CELIC Z NEUBAUMANOVO KOMORO IN DOLOČANJE CELIČNE VIABILNOSTI Z BARVILOM TRIPAN MODRO .....	48

5.3 DOLOČANJE APOPTOTIČNIH IN NEKROTIČNIH SPREMENB S PRETOČNIM CITOMETROM Z UPORABO FLUORESCENČNO OZNAČENEGA PROTEINA ANEKSIN V IN Z BARVILOM 7-AAD	49
5.4 BARVANJE Z BARVILOM DAPI ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH CELIC S POMOČJO FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE .....	50
5.5 VREDNOTENJE HIPOTEZE IN PREDLOGI IZBOLJŠAVE EKSPERIMENTALNIH POSTOPKOV .....	53
5.6 MOŽNE RAZLAGE ŠKODLJIVIH UČINKOV PIKOV ČEBEL ZARADI TOKSIČNEGA UČINKA NA ENDOTELIJSKE CELICE (EC).....	54
5.7 ALI BI LAHKO CITOTOKSIČNI UČINEK MELITINA NA ENDOTELIJSKE CELICE UPORABILI V TERAPEVTSKE NAMENE? .....	56
<b>6 ZAKLJUČEK</b> .....	<b>58</b>
<b>7 LITERATURA</b> .....	<b>59</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1</b> Struktura linearnega monomera melitina.....	5
<b>Slika 2</b> Različni načini orientacije in lokacije molekule melitina glede na ravnino membrane .....	6
<b>Slika 3</b> Shema toroidnega modela.....	7
<b>Slika 4</b> Intrinzična pot apoptoze .....	11
<b>Slika 5</b> Ekstrinzična pot apoptoze.....	12
<b>Slika 6</b> Signalizacijske poti aktivacije MAP kinaz .....	14
<b>Slika 7</b> Signalna pot PI3-kinaza/Akt.....	14
<b>Slika 8</b> Neubaumanova komora .....	23
<b>Slika 9</b> Mreža komore .....	23
<b>Slika 10</b> HUVEC celična linija .....	26
<b>Slika 11</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 10 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina. ....	26
<b>Slika 12</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 20 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina .....	27
<b>Slika 13</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 30 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina .....	27
<b>Slika 14</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 120 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina. ....	28
<b>Slika 15</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi takoj po izpostavitvi mediju z 10 µg/ml dodanega melitina.....	28
<b>Slika 16</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v nekonfluentni kulturi po 40 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina. ....	29
<b>Slika 17</b> in <b>Slika 18</b> Morfološke spremembe celic HUVEC v nekonfluentni kulturi po 10 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina. ....	30
<b>Slika 19</b> Časovna odvisnost učinka melitina na število živih celic HUVEC v pritrjeni celični kulturi.....	32
<b>Slika 20</b> Razlika v učinku melitina na število živih celic HUVEC, če so celice pritrjene (ad) oz. če so celice v suspenziji (susp) .....	32

<b>Slika 21</b> Razlika med mrtvo/nekrotično celico in med živo celico ugotovljena z barvilom tripan modro .....	33
<b>Slika 22</b> Postopna izguba integritete membrane ugotovljena z barvilom tripan modro.....	33
<b>Slike 23</b> Točkovni citogrami .....	35
<b>Slika 24</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež živih celic HUVEC v pritrjeni kulturi .....	36
<b>Slika 25</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v zgodnji apoptozi v pritrjeni kulturi.....	37
<b>Slika 26</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v pozni apoptozi v pritrjeni kulturi.....	37
<b>Slika 27</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež mrtvih celic HUVEC v pritrjeni kulturi.....	38
<b>Slika 28</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež živih celic HUVEC v pritrjeni (ad) celični kulturi in kulturi v suspenziji (susp).....	39
<b>Slika 29</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v zgodnji apoptozi v pritrjeni (ad) celični kulturi in kulturi v suspenziji (susp).....	40
<b>Slika 30</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v pozni apoptozi v pritrjeni (ad) celični kulturi in kulturi v suspenziji (susp).....	40
<b>Slika 31</b> Časovna odvisnost učinka melitina na delež mrtvih celic HUVEC v pritrjeni (ad) celični kulturi in kulturi v suspenziji.(susp).....	41
<b>Slika 32</b> Časovna odvisnost učinka melitina na žive celice, celice v zgodnji in pozni apoptozi in na mrtve celice v pritrjeni kulturi .....	42
<b>Slika 33</b> Časovna odvisnost učinka melitina na žive celice, celice v zgodnji in pozni apoptozi in na mrtve celice v pritrjeni (ad) kulturi in kulturi v suspenziji (susp). .....	43
<b>Slika 34</b> Celice, ki smo jih izpostavili 30 min reakciji z raztopino melitina s koncentracijo 2 µg/ml in jih barvali z barvilom DAPI.....	44
<b>Slika 35</b> Celice, ki smo jih izpostavili 30 min reakciji z raztopino melitina s koncentracijo 5 µg/ml in jih barvali z barvilom DAPI.....	45
<b>Slika 36</b> Celice, ki smo jih izpostavili 30 min reakciji z raztopino melitina s koncentracijo 10 µg/ml in jih barvali z barvilom DAPI.....	45
<b>Slika 37</b> Tri možne poti celične smrti z apoptozo in nekrozo.....	51



## **KAZALO TABEL**

<b>Tabela 1:</b> Sestava nehlapnega dela strupa čebele.....	3
<b>Tabela 2:</b> Kaspaze, vključene v proces vnetja in apoptoze .....	10
<b>Tabela 3:</b> Delitev proteinov iz družine Bcl 2 na pro-/anti-apoptotične proteine .....	13

# POVZETEK

Melitin je glavna komponenta čebeljega strupa medonosne čebele (*Apis mellifera*). Sestavljen je iz 26 aminokislin. Zaradi značilne amfifilne strukture ga uvrščamo v skupino citotoksičnih peptidov, ki se lahko vežejo na membrano in motijo njeno integriteto, ionsko homeostazo celice ter vplivajo na procese, ki odločajo o usodi celice. Zanimalo nas je, kakšen učinek bo melitin izzval na endotelijski celici. Pri tem smo upoštevali študije, ki so pokazale, da lahko melitin povzroči nekrotične in apoptotične spremembe na različnih celicah, in študije, ki so preučevale vplive melitina na izolirane žile in kažejo na možnost, da melitin poškoduje endotelij. Vpliv melitina na endotelijske celice smo preučevali z linijo endotelijskih celic iz popkovnične vene človeka (HUVEC). Pri delu s pretočnim citometrom smo uporabili barvili aneksin V in 7-amino-aktinomicin D (7-AAD). Aneksin V se veže na fosfatidil serin (PS). Premik le-tega iz notranje strani celične membrane na zunanjo je zgodnja apoptotična sprememba. 7-amino-aktinomicin D je barvilo, s katerim ločujemo med živimi in mrtvimi celicami, ker lahko prehaja v celico samo, ko je integriteta membrane porušena. Celico lahko obarva pri nekrotični spremembi in pri pozni apoptozi, ko celica v zadnji fazi izgubi integriteto membrane. Delovanje melitina na celico smo spremljali tudi z mikroskopom in vrednotili morfološke spremembe. Z barvilom 4',6-diamidin-2-fenilindolom (DAPI) smo želeli dokazati segmentacijo jedra, ki je tudi zgodnja apoptotična sprememba. Z Neubaumanovo komoro in z barvanjem s tripan modrim smo prešteli žive celice po delovanju melitina.

Rezultati, dobljeni z mikroskopiranjem in citometrom, nakazujejo na prisotnost apoptotičnih in nekrotičnih sprememb. Dokazali smo prisotnost fosfatidil serina in segmentacije jedra, kar je značilno za apoptozo. Po drugi strani pa smo s tripan modrim v Neubaumanovi komori ugotovili prisotnost nekrotičnih celic in močan upad celic po delovanju melitina, kar nakazuje na nekrozo, ki je dosti hitrejši proces kot apoptoza. S takšnimi rezultati lahko potrdimo citotoksični učinek melitina na endotelijske celice. Za natančnejšo opredelitev učinka bi bilo potrebno dokazati več značilnosti apoptoze in nekroze. Citotoksični učinek melitina na endotelijske celice bi lahko tudi doprinesel k nekaterim sistemskim poškodbam, ki so jih dokumentirali po pikih čebel. Ali lahko citotoksični in anitiproliferativni učinek melitina izkoriščamo pri bolezenskih stanjih, kjer je prisotna patološka angiogeneza, je zanimivo vprašanje za raziskave v prihodnosti.

Ključne besede: citotoksičnost, melitin, endotelijske celice

# ABSTRACT

Melittin is the principal component in the venom of the honeybee *Apis mellifera*. It is composed of 26 amino acid residues. Because of the amphiphilic property it suits to a group of cytotoxic peptides that bind to the plasma membrane. They can modify the membrane integrity, ion-homeostasis and interact with signal pathways that are responsible for cell destiny. We were interested in the action of melittin on the endothelial cell. Previous studies had reported that melittin causes necrosis and apoptosis on various cell types. In some experiments on isolated vessels melittin is expected to cause endothelial damage. The effect of melitin on the endothelial cell was examined on the cell line of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). For the experimental work we used flowcitometer and dyes annexin V and 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Annexin V specifically binds to external phosphatidylserine (PS). The externalization of phosphatidylserine is a hallmark of changes in the cell surface during early apoptosis. 7-amino-actinomycin D can be used to discern nonviable cells from viable cells. It can colour cells with lost membrane integrity. These cells are necrotic or in the last phase of apoptosis where they undergo lysis. In our experiments we also used a microscopic examination and with the dye 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) we tried to detect the segmentation of nuclei. This change also occurs early during apoptosis. One of our strategies was also counting cells in the Neubauman chamber after the action of melittin and staining with tripan blue.

Our results suggest that both necrosis and apoptosis are present. We proved the externalization of phosphatidylserine and the segmentation of nuclei. These are early apoptotic events. On the other hand, we showed the presence of necrotic cells in the Neubauman chamber and a strong decrease in number of viable cells after the action of melittin. Such rapid decrease is more typical for necrosis than for apoptosis. With such results we can say that melittin has cytotoxic effects on the endothelial cell. For more detailed answer, it would be necessary to prove more apoptotic or necrotic characteristics. It could be possible that the cytotoxic effect of melittin on the endothelial cell is also playing a role in some systemic complications after envenomation. If melittin could be used in diseases with angiogenic pathology because of its cytotoxic and antiproliferative affect, is an interesting question for further investigations.

Key words: cytotoxicity, melittin, endothelial cells

# SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC - (American Type Culture Collection)

AIF - (Apoptosis inducing factor) faktor, ki inducira apoptozo

Apaf-1 - (Apoptotic protease activating factor-1) apoptotični proteaze aktivirajoč faktor-1

Bcl-2 - (B-cell lymphoma 2)

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenilindol

DISC - (death-inducing signaling complex) signalni kompleks, ki inducira smrt

EDHF - od endotelija odvisen hiperpolarizacijski faktor

EndoG - endonukleaza G

EC - endotelijska celica

ER - endoplazemski retikulum

ERK - (extracellular-signal-regulated kinase) kinaza, regulirana z zunajceličnim signalom

FADD - (Fas-associated protein with death domain) s Fas-proteinom povezan protein, ki ima domeno za signalizacijo celične smrti

FITC - fluorescein izotiocianat

GSK-3 - glikogen sintaza kinaza-3

HUVEC - (human umbilical vein endothelial cells) endotelijske celice iz popkovnične vene človeka

Hb - hemoglobin

IAP - (inhibitor of apoptosis protein) inhibitor apoptotičnih proteinov

IL - interleukin

JNK - c-Jun N - terminalna kinaza

MAC - (membrane attack complex) kompleks komplementa, ki napade membrano

MAPK - (Mitogen-activated protein kinases) z mitogenom aktivirane protein kinaze

MCD - mastocyte degranulirajoči peptid

NFκB - nuklearni faktor κB

PLA2 - fosfolipaza A<sub>2</sub>

PS - fosfatidil serin

PARP - poli (ADP-riboza) polimeraza

RA - revmatoidni artritis

ROS - reaktivne kisikove snovi

SMAC/DIABLO - (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI)

TNF - tumor nekrotizirajoči faktor

GMC - gladkomišične celice

7-AAD - 7-amino-aktinomicin D

# 1 UVOD

## 1.1 ČEBELJI STRUP

Uporaba čebeljega strupa je znana skozi stoletja. Že stari Egipčani so cenili čebelji strup za zdravljenje revmatizma (1). Zagovorniki uporabe čebeljega strupa pri alternativnem zdravljenju pripisujejo strupu številne koristne in zdravilne učinke. Obstajajo poročila o koristnem delovanju pri boleznih, kot so multipla skleroza, astma, polinevritis, nevralgija, malarija, epilepsija, pospeševal bi naj celjene ran, deloval protibolečinsko, proti kožnim boleznim, rakavim obolenjem, artritisu ... Ima pa tudi imunomodulatorsko aktivnost (2, 3, 4). Prve študije izolacije, identifikacije in ugotavljanja sestave so bile narejene v 50-ih in 60-ih letih 20. stoletja in od takrat dalje potekajo študije, ki preučujejo predvsem učinek melitina na membrane, njegov morebitni protivnetni in antirevmatični učinek, zanimiv pa postaja tudi citotoksični učinek čebeljega strupa, natančneje melitina. Čebelji strup deluje na številne organske sisteme: krvni obtok, prebavni organi, dihalni in živčni sistem (1). Ne smemo pozabiti, da ima čebelji strup tudi škodljive učinke. Poleg anafilaktičnega šoka in ledvične odpovedi so kardiovaskularni učinki najbolj resni in življenjsko ogrožujoči zapleti, ki jih lahko povzroči čebelji strup. V dosedanjih študijah so že preučevali učinek čebeljega strupa in njegove glavne sestavine citotoksičnega melitina na kardiovaskularni sistem poskusnih živali, na primarno kulturo srčnomišičnih celic miške in učinek na krčenje/relaksacijo izolirane žile pri podgani in prašiču (5, 6), medtem ko citotoksični učinek na endotelijske celice še ni bil raziskan.

### **1.1.1 Škodljivi učinki čebeljega strupa**

Strup lahko povzroči:

- alergično reakcijo (pojavi se od nekaj minut do ene ure po piku, lahko je lokalna ali sistemska),
- toksično reakcijo (pojavi se pri več sočasnih pikih in nastopi po nekaj urah, smrt pa lahko nastopi tudi po nekaj dneh),
- miokardni infarkt (nepredvidljiva, kasna reakcija, ki se pojavi zelo redko - navadno se pojavi pri ljudeh, ki imajo srčnožilno obolenje) (7, 8).

Najpogostejši škodljivi učinek pri človeku je alergična reakcija. Stopnja le-te je različna in sega od rahlega neugodja, eritema, pruritisa, slabosti, angioedema, diareje, bruhanja, hipotenzije, aritmije, dispneje do anafilaktičnega šoka (1, 6, 9). Smrtni zaplet najpogosteje povzroči anafilaktični šok, ki ga lahko povzroči en sam pik. Sistemske alergijske in anafilaktične reakcije so navadno posledica z IgE povzročene senzibilizacije (8). Dosti redkejši pa so primeri smrti po masovnem napadu čebel, kjer lahko pride od 100 do 1000 in več pikov in vodi v nastanek sistemskih poškodb. Masovni napadi so značilni za afrikanizirane čebele (*Apis mellifera scutellata*), ki so zelo agresivne (10). LD<sub>50</sub> za človeka je ocenjen med 500 in 1200 pikov. Znani so primeri, kjer so žrtve ob pravočasni zdravniški pomoči preživele napade z več kot 2000 piki in tudi primeri, kjer je smrt nastopila po 100 ali 200 pikih. Sistemsko toksičnost povzroči že približno 50 pikov (7, 10, 11). Najvišja koncentracija strupa, ki je bila pri človeku določena v serumu, je 3,8 µg/ml po eni uri, po 24 urah pa 1,9 µg/ml (6). Ocenjujejo, da je absorpcija z mesta pika strupa približno 29 % (7).

Pri masovnem napadu čebel so simptomi nastanek angioedema, bolečina, eritem, omotičnost, slabost, bruhanje, vročina in izguba zavesti. Endogeni histamin lahko povzroči diarejo in inkontinenco. Sistemske poškodbe se razvijejo znotraj 24 ur, lahko pa nastopijo tudi pozneje (2-6 dni) (10, 11). Sistemske poškodbe vključujejo hemolizo, rabdomiolizo in akutno poškodbo ledvic. Smrt lahko nastopi zaradi odpovedi ledvic ali srčnožilnih zapletov. Akutna odpoved ledvic pogosto nastopi zaradi akutne tubulne nekroze. To je indirektna ledvična poškodba, ki najverjetneje nastane zaradi razkroja eritrocitov ali mišičnega tkiva, a ne vedno. Takšne poškodbe so navadno reverzibilne, se dobro odzivajo na dializo in se regenerirajo v 3-6 tednih (10). Intravaskularna hemoliza (sočasno se lahko pojavita tudi hemoglobinurija in hemoglobinemija) je glavni učinek v primerih z več sočasnimi piki. Pogosto lahko hemoliza vodi v poškodbo ledvic, anurijo, nezavest in smrt po 1 do 3 dnevih (7). Tudi rabdomioliza je ena izmed glavnih toksičnih učinkov strupa. Pri bolnikih so našli mioglobin v krvi in v urinu, povišani vrednosti kreatin-fosfokinaze, laktat dehidrogenaze (10) in aspartat-aminotransferaze v serumu ter histopatološke dokaze o rabdomiolizi (7).

Čebelji strup podaljšuje protrombinski čas, aktiviran parcialni protrombinski čas in zmanjšuje število trombocitov (7). Pri bolnikih so našli tudi dokaze o nekrozi hepatocitov,

povišan indirektni bilirubin in povišano jetrno transaminazo (11). K takšnim spremembam prispeva tudi šok. Sistemske krvavitve, ki so jih opazili pri nekaterih bolnikih zaradi motenj v strjevanju krvi, so lahko posledica pomanjkanja koagulacijskih faktorjev (7). Naštete poškodbe in motnje lahko spremljajo tudi mišična bolečina, krči, motnje v elektrolitskem ravnotežju, kot je hiperkaliemija, oligurija kot posledica nekroze ledvičnih tubulov (10) ...

### **1.1.2 Čebelji strup in kardiovaskularni sistem**

Pri bolnikih, ki so jih sprejeli v bolnišnico po napadu čebel, so pogosto ugotovili hipotenzijo, pri nekaterih tudi hipertenzijo in pljučni edem. Ugotovljene so bile elektrokardiografske spremembe in motnje ritma srca. Mehanizem motenj ni jasen. Do zapletov bi lahko prišlo zaradi nekroze tkiva kot posledice hipotenzije, zaradi direktnega toksičnega učinka na srce ali indirektnega učinka na koronarne arterije. Strup lahko povzroči ishemijo zaradi močne hipotenzije ali zmanjšano oskrbo s kisikom zaradi direktnega inotropnega in kronotropnega delovanja na srce. Možno je tudi, da je nezadosten koronarni pretok posledica anafilaktičnega šoka (9), čeprav lahko subendokardialne poškodbe in povišanje kardialnih encimov povzroči strup direktno, brez sočasne anafilaksije ali hipotenzije (11).

### **1.1.3 Sestava čebeljega strupa**

**Tabela 1: Sestava nehlapnega dela strupa čebele, vir: prirejeno po (1, 3, 4, 7)**

Sestavine čebeljega strupa	% suhe teže celotnega strupa	delovanje
POLIPEPTIDI		
melitin	50-60	Citotoksičnost, relaksacija/krčenje žil, depolarizacija in skrčenje mišic, kardiotoksičnost, aktivacija fosfolipaze A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ), veže se na membrano, sproži metabolizem membranskih fosfolipidov, povzroči nastanek kanalov, micelinizacijo, detregentsko delovanje, inducira bolečino ...
apamin	1-3	Inhibitor od Ca <sup>2+</sup> odvisnih K <sup>+</sup> kanalčkov majhne prevodnosti (SK kanali). Je nevrotoksin. Inhibicija kanalov prepreči izstopanje K <sup>+</sup> ionov iz celice in tako onemogoči hiperpolarizacijo membrane. SK kanali pa igrajo pomembno vlogo tudi pri relaksaciji, ki poteka preko od endotelija odvisnega hiperpolarizacijskega faktorja (EDHF). Apamin kot inhibitor SK kanalov zavre relaksacijo žile.



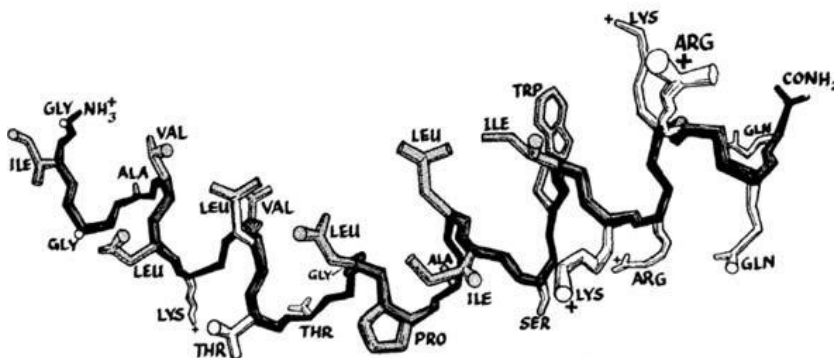
Sestavine čebeljega strupa	% suhe teže celotnega strupa	delovanje
adolapin	0,1-0,8	Protivnetni peptid, inhibicija sinteze prostaglandinov.
sekarpin	0,5-2	
kardiopep	manj kot 0,7	Poviša moč kontrakcije in frekvenco bitja srca.
proteazni inhibitor	manj kot 0,8	
prokamin	0-1	
mastocite - degranulirajoči peptid (MCD)	1-3	Je inhibitor napetostno odvisnih K <sup>+</sup> kanalov (selektivni za Kv1 in Kv6). Kv kanali imajo glavno vlogo pri določanju mirovnega potenciala. Njihova inhibicija lahko vodi v žilna obolenja kot so hipertenzija in vazokonstrikcija.  Nizki odmerki: sproščanje histamina iz mastocitov, hipotenzija .  Viskoki odmerki: kratkodobna ekscitacija s krči in domnevna inhibicija sproščanja histamina.
minimin	2-3	Zavre razvoj vrst <i>Drosophila</i> .
<b>HIDROLITIČNI ENCIMI</b>		
hialuronidaza	1-3	Alergeno delovanje z anafilaktičnim šokom. Povzroči razgradnjo hialuronske kisline in beljakovin v tkivu, zaradi česar se strup v tkivu širi hitreje.
fosfolipaza A <sub>2</sub>	10-12	Alergeno delovanje z anafilaktičnim šokom. Povzroči hidrolizo strukturnih fosfolipidov in vpliva na tvorbo lipidnih mediatorjev. Preprečuje delovanje encimov trombokinaz.
kisla fosfomonoestereza	1	
lizofosfolipaza	1	
α-glukozidaza	0,6	
<b>NIZKOMOLEKULARNE ORGANSKE SNOVI</b>		
histamin	0,5-2	Širjenje ožilja, krčenje gladkih mišic (bronhijev, tankega črevesa, maternice), izločanje eksokrinih žlez, ekscitatorni nevrottransmitor v centralnem živčnem sistemu.
dopamin	0,2-1	Inhibitorni nevrottransmitor v centralnem živčnem sistemu, vpliva na frekvenco bitja srca in poveča krvni pritisk.
noradrenalin	0,1-0,7	Nevrottransmitor simpatičnega živčevja, večinoma inhibitorni nevrottransmitor v centralnem živčnem sistemu.
druge sestavine	8,5	Glukoza, fruktoza, fosfolipidi, aminobutirna kislina, α-amino kisline, acetilholin, magnezijeve soli ...

Čebelji strup je zmes bioaktivnih snovi, kot so polipeptidi, hidrolitični encimi in nizkomolekularne organske snovi. Nahaja se v strupnem mešičku in poleg nehlapnih snovi vsebuje tudi 88 % vode in od 4 % do 8 % hlapnih snovi (feromonov). Sestava nehlapnega dela strupa je prikazana v tabeli 1. Čebela lahko, odvisno od vrste, iz žela iztisne od 94  $\mu\text{g}$  do 300  $\mu\text{g}$  strupa (7) - navajajo se tudi vrednosti do 500  $\mu\text{g}$  (1). Glavna sestavina strupa je polipeptid melitin, glavni alergen je fosfolipaza  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ). Različne sestavine strupa imajo nasprotujoče si učinke. Posamezne sestavine strupa lahko posredno delujejo tako, da povzročijo sproščanje endogenih snovi - med drugim tudi histamina iz mastocitov - in tako pride do enakih posledic kot pri alergiji. Na primer: degranulacijo mastocitov povzroči predvsem peptid MCD, poškodbo membrane mastocitov in sproščanje histamina pa lahko povzroči melitin sam ali pa skupaj s  $\text{PLA}_2$ . Melitin tudi mobilizira arahidonsko kislino in spodbudi nastajanje njenih derivatov v endoteliju. Predvidevajo, da sta glavna povzročitelja toksičnih učinkov citotoksični melitin in  $\text{PLA}_2$ . Posledice njunega delovanja so poškodbe različnih tkiv (skeletalna mišica, srčna mišica, ledvični tubuli, jetra), hemoliza in lokalni učinki (hemoragična nekroza kože). Učinke na centralni živčni sistem pripisujejo delovanju melitina in apamina, ker lahko preideta hematoencefalno bariero. Lahko pa nastanejo tudi kot posledica hipoksije, hipovolemije in anafilaktičnega šoka (7).

## 1.2 MELITIN

Aminokislinska sestava je:

$\text{NH}_2\text{-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH}_2$

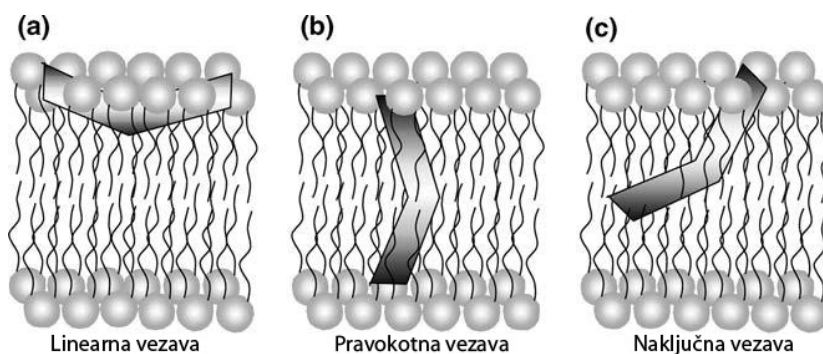


Slika 1: Struktura linearnega monomera melitina, vir: po (12)

### **1.2.1 Melitin in membrana**

Melitin je amfifilen citotoksični polipeptid, zgrajen iz 26 aminokislin, ki ima kationske in (hemo)litične lastnosti. N-terminalni del (1-20) je hidrofoben, C-terminalni del (21-26) pa je, zaradi predela pozitivno nabitih aminokislin, hidrofilen. Predeli pozitivno nabitih aminokislin, vključno z amfifilno naravo, so značilni za mnoge peptide, ki se vežejo na membrano (12).

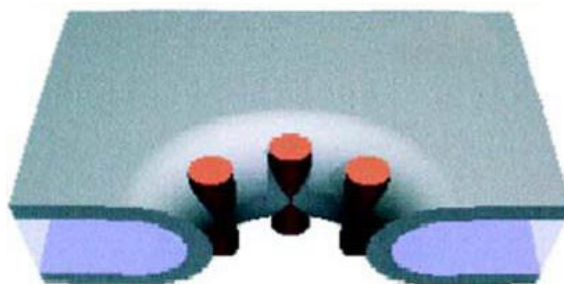
Melitin lahko zavzame različne konformacije. Konformacijo melitina v vodni raztopini lahko opišemo kot kompleksno funkcijo koncentracije peptida in lastnosti raztopine, kot so ionska moč, pH in temperatura (2). Že v nekaj milisekundah se lahko veže na lipidno membrano, privzame  $\alpha$ -helikalno konformacijo in se orientira vzporedno, pravokotno ali naključno glede na ravnino membrane (slika 2) (13, 14). Pomemben dejavnik, ki vpliva na orientacijo peptida v membrani, je njegova koncentracija; pri nižjih koncentracijah je orientiran večinoma paralelno, pri višjih pa pravokotno na ravnino membrane (2, 13).



**Slika 2: Različni načini orientacije in lokacije molekule melitina glede na ravnino membrane** (A prikazuje linearno (paralelno) vezan melitin na površini membrane. Pri B je melitin vezan pravokotno (perpendikularno) in je lociran transmembransko, pri C je vezava naključna in je lociran pseudo-transmembransko.), vir: prirejeno po (2)

K strukturnim zahtevam melitina, ki vplivajo na njegovo aktivnost, prištevamo amfifilnost peptida, obliko  $\alpha$ -vijačnice, linearnost, naboj in značilnosti znotraj peptidnega zaporedja, kot je prisotnost triptofana in motiva levcinske zadrge (2). Membranske komponente, ki vplivajo na interakcijo melitina z membrano in njegovo orientacijo, so struktura membrane (delež holesterola, predeli nenasičenih in nasičenih lipidov), naboj lipidov in stopnja hidratacije (2, 12). Selektivno reagira predvsem z negativno nabitimi lipidi. Predpostavlja se, da so primarna mesta vezave membranski lipidi in ne specifični receptorji (2, 15).

V nizkih koncentracijah melitin najprej tvori začasne difuzijske motnje, zaradi katerih se poveča prevodnost membrane za ione (7). Pri srednjih koncentracijah načne barierno funkcijo celične membrane, poruši ionsko homeostazo celice in v lipidnem dvosloju tvori kanalčke/pore (2, 7). Zaradi akumulacije pozitivnega naboja na C-terminalnem koncu melitina, so napetostno odvisni kanali/pore selektivnejši za anione kot za katione (2). Melitin, ki povzroči nastanek transmembranskih por, je orientiran večinoma pravkotno na membrano (2, 13). Usmeritev, ki je vzporedna z membrano, ne povzroči nastanka por, možno pa je, da stanjša lipidni dvosloj (15). Tudi nepopolni prodor molekule melitina v membrano lahko doprinese k poškodbi membrane (2, 13). Tvorba in velikost por je odvisna predvsem od koncentracije peptida in razmerja med lipidom in peptidom (2, 13, 14, 15). Prevladuje mnenje, da tvori melitin v membrani pore, ki ustrezajo toroidnemu modelu (2). Toroidni model transmembranske pore predvideva, da steno pore tvorijo ne samo peptid ali protein, temveč tudi membranski lipidi (slika 3).



Slika 3: Shema toroidnega modela, vir: po (2)

Pri višjih koncentracijah vodi v micelizacijo in fuzijo lipidnih dvoslojev, kar imenujemo detergentno delovanje.

### **1.2.2 Melitin in celični proteini**

Melitin ne vpliva samo na integriteto membrane, temveč učinkuje tudi na dinamiko membranskih proteinov in proteinov znotraj celice. Je inhibitor  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaze,  $\text{H}^+\text{K}^+$ -ATPaze in  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPaze (2). Poročajo tudi o delovanju na  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjevalni sistem, na  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin, na encim kinazo lahkih verig,  $\text{PLA}_2$  (7) in na različne encime, ki so vključeni v signalne poti preživetja celice. Verjetno so za učinek na membranske proteine in encime odgovorne tako interakcije med melitinom in membrano kot tudi direktne in specifične reakcije med melitinom in proteinom (2).

### **1.2.3 Melitin in kardiovaskularni sistem**

Delovanje melitina privede tudi do morfološke degeneracije srčnomišičnih celic. Predlagan mehanizem za toksičnost je povišanje znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . Melitin vpliva na  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjevalni sistem in povzroči kopičenje  $\text{Ca}^{2+}$  v celici (7).

Melitin vpliva tudi na kontraktilnost žil. Vpliv na kontraktilnost je odvisen od njegove koncentracije, časa delovanja melitina na tkivo in od vrste žile ter organa (16). Predhodne študije so pokazale, da čebelji strup, kot tudi melitin, v nižjih koncentracijah sproži prehodno relaksacijo, ki pri višjih koncentracijah prehaja v kontrakcijo. Na predhodnih študijah na izolirani prašičji arteriji so določili koncentracijo melitina, ki sproži relaksacijo med 0,1  $\mu\text{g/ml}$  in 10  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentracija, pri kateri se začne in nato narašča kontrakcija, pa je višja kot 7  $\mu\text{g/ml}$  (6).

Relaksacija žile vključuje predvsem mehanizme, ki so odvisni od endotelijskih celic. Poteka preko nastajanja dušikovega monoksida v endotelijskih celicah, možna je tudi vpletenost EDHF, cikličnega gvanozin monofosfata, cikličnega adenozin monofosfata in različnih metabolitov arahidonske kisline (5, 6). V poskusih na mezenterični arteriji zajca so ugotovili, da na relaksacijo delno vpliva tudi aktivacija od  $\text{Ca}^{2+}$  odvisne  $\text{PLA}_2$  v endotelijski celici. Pri nekaterih tipih žil relaksacija poteka preko gladkih mišičnih celic, vendar mehanizmi še niso znani, nekateri eksperimenti nakazujejo vpletenost od  $\text{Ca}^{2+}$  odvisnih  $\text{K}^+$  kanalov ( $\text{Kca}$ ), ki so locirani na gladkomišičnih celicah (6, 7).

Višje koncentracije melitina (višje od 10  $\mu\text{g/ml}$ ), ki povzročijo morfološko degeneracijo endotelijske celice, povzročijo krčenje izolirane aorte pri podgani (5). Kontraktilno aktivnost melitina lahko povežemo z njegovo sposobnostjo, da poveča permeabilnost za ione, predvsem za  $\text{Na}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{PLA}_2$  lahko igra vlogo tudi pri kontrakciji žile. Po aktivaciji encima nastajajo produkti, ki lahko inducirajo kontrakcijo gladke mišičnine. Prav tako pa lahko k vazokonstrikciji pripomore MCD, ki sprošča histamin iz mastocitov, histamin deluje na tuniko medijo, kjer inducira vazokonstrikcijo (16).

### **1.3 NEKROZA**

Pri nekrozi gre za odmrtnje celic zaradi akutne poškodbe. To lahko zajema poškodbo tkiva ali pomanjkanja dotoka krvi. Navadno poškodovana celica nabrekne in počí zaradi izgubljene integritete membrane (17). Spremembe, ki so značilne za to celično smrt, so nabrekanje celice, nabrekanje mitohondrijev, pojav vakuol v citoplazmi, poškodba membrane organelov, propad DNK in - zaradi izgubljene integritete membrane - liza celice (18, 19, 20). Nekrotična celica lahko sprostí svojo vsebino na sosednje celice in tako povzroči vnetne procese in poškodbe (17). V zadnjem času se uvaja tudi pojem programirana nekroza. To je proces, odvisen od aktivacije znotrajcelične signalne kaskade, ki je podobna signalizaciji pri apoptozi in se izraža z nabrekanjem celice, masivnimi poškodbami organelov in poškodbo membrane (21).

### **1.4 APOPTOZA - PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT**

Apoptoza je pomemben proces, ki je vključen v številne biološke dogodke, vključno z homeostazo, embriogenezo in patogenezo (23). Ko celice v organizmu niso več uporabne ali postanejo škodljive, preidejo v proces programirane celične smrti oziroma apoptoze. Čeprav lahko številni dražljaji in signalne poti doprinesejo k pojavu apoptoze v različnih tipih celic, pa so morfološke značilnosti zelo podobne, kot na primer krčenje celice, segmentacija jedra, kondenzacija kromatina, značilne cepitve DNK in spremembe na membrani celice, kot je nabrekanje membrane in izpostavitve fosfatidil serina (PS) (18). V proces apoptoze je vključena kaskada specifičnih proteolitičnih encimov, ki sodeluje pri apoptotičnih spremembah celice, ki omogočijo, da se lahko fagocitirajoča celica nanjo pritrdi in jo fagocitira. Značilen je tudi nastanek apoptotičnih telesc. To so z membrano obdani fragmenti, ki nastanejo z razgradnjo celične površine. Pomembno je to, da sosednje celice ali makrofagi te fragmente ali propadajočo celico pogoltnejo, preden le-ti izločijo svojo vsebino (17).

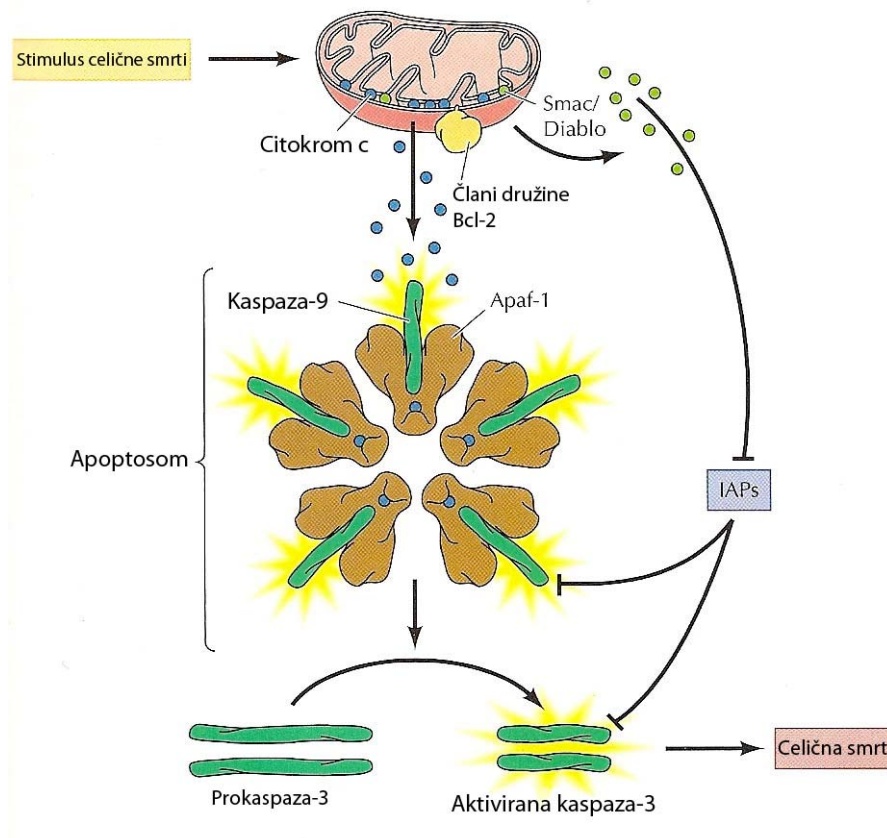
## 1.5 INTRACELULARNE PROTEOLITIČNE KASKADE, KI JIH VODIJO KASPAZE

Apoptozo proži in vodi družina cisteinskih proteaz - kaspaz. Ti encimi se sintetizirajo in hranijo v celici v obliki neaktivnih prokaspaz. Ko signal za celično smrt privede do njihove aktivacije, ti encimi cepijo in aktivirajo druge prokaspaze in prožijo kaskadno reakcijo, ki razgrajuje celične proteine. Celica tako razgradi samo sebe, njene ostanke pa fagocitirajo okolijske celice. Kaspaze so vključene tudi v vnetne procese in imunske odgovore, največ pa jih je vključenih v proces apoptoze (17).

**Tabela 2: Kaspaze, vključene v proces vnetja in apoptoze, vir: povzeto po (17)**

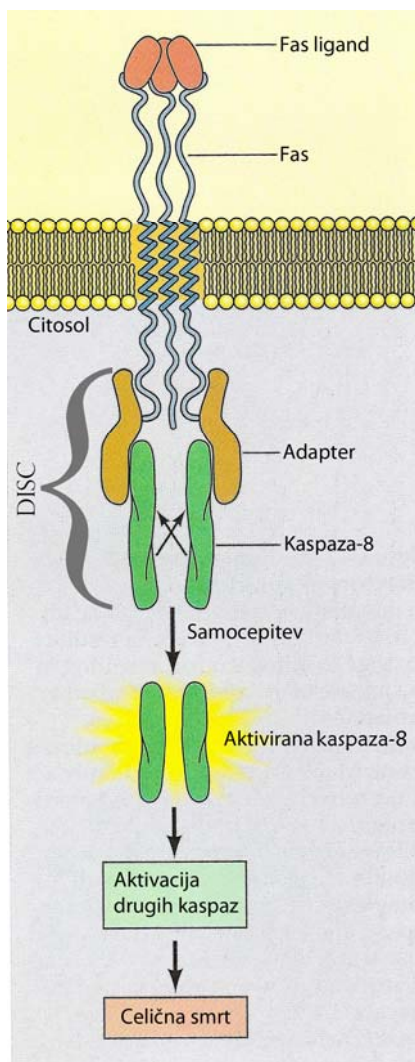
Kaspaze, vključene v proces vnetja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICE (kaspaza 1 ali interlevkin 1 converging protein)</li> <li>• kaspaze 4 in 5</li> </ul>
Kaspaze, vključene v proces apoptoze	<ul style="list-style-type: none"> <li>• iniciatorske kaspaze 2, 8, 9, 10, aktivne na začetku kaskade.</li> <li>• izvršitvene kaspaze 3, 6, 7, cepijo druge izvršitvene kaspaze in specifične tarčne proteine, kot so nuklearni lamini, in sprožijo aktivacijo endonukleaz, ki v jedru cepijo DNK. V skupino tarčnih proteinov spadajo tudi komponente citoskeleta in proteini, ki omogočajo adhezijo celice na sosednjo celico. Cepitev teh proteinov omogoča, da se apoptotična celica odlepi od sosednjih celic in posledično jo lahko makrofag iz okolice lažje fagocitira.</li> </ul>

Poznamo ekstrinzično (slika 5) in intrinzično pot (slika 4), ki sta v sesalski celici odgovorni za apoptozo. Vsaka ima svoje iniciatorske prokaspaze in aktivacijske komplekse.



**Slika 4: Intrinzična pot apoptoze** (Ta se lahko aktivira zaradi poškodbe DNK, pomanjkanja kisika, hranil ali drugih ekstracelularnih signalov. Kaspazno kaskado aktivirajo mitohondrijski proteini, ki prehajajo v citosol. Iniciatorska kaspaza 9 se aktivira z vezavo na homolog apoptotičnega faktorja 1, ki aktivira proteaze (apaf-1). Ta vezava zahteva prisotnost citokroma c. Le-ta se sprosti iz mitohondrija kot odgovor na stimulus za apoptozo. V normalnih razmerah se citokrom c nahaja v intermembranskem prostoru mitohondrija, kaspaza 9 in apaf-1 pa se nahajata v citosolu. Poškodba mitohondrija vodi v sprostitev citokroma c v citosol, kjer se veže na apaf-1 in proži formacijo multipodenote apaf-1/kaspaza 9 kompleksa, ki se imenuje apoptosom, in kjer pride do aktivacije kaspaze 9. Kaspaza nato cepi in aktivira izvršitvene kaspaze (npr. kaspaza 3). Smac/DIABLO je protein, ki se sprošča iz mitohondrijskega intermembranskega prostora in pomaga pri procesu apoptoze z inhibicijo inhibitorjev apoptotičnih proteinov (IAP)), vir: prirejeno po (17, 22)





**Slika 5: Ekstrinzična pot apoptoze** (To pot aktivira direktna vezava proteinov iz družine tumor nekrotizirajočih faktorjev (TNF) na receptorje na površini celice. Med glavne mediatorje apoptoze sodijo TNF, FAS ligand (24) ... Receptorji za TNF in dejavnike iz sorodnih družin so iz treh domen; ekstracelularne, na katero se veže ligand, transmembranske in iz intracelularne domene, preko katere se aktivira apoptoza (death domain) Po aktivaciji prenesejo signal apoptoze direktno na kaspaze in jih s tem aktivirajo. Intracelularni deli polipeptidnih verig receptorja so povezani z adaptorskim proteinom (FADD), le-ta pa je povezan s kaspazo 8 ali 10. Tako se tvori aktivacijski kompleks, ki signalizira indukcijo celične smrti (DISC). Kaspaze se aktivirajo s samocepitvijo in se tako sprostijo z adaptorskega proteina in nato stopajo v verižno reakcijo ter aktivirajo druge kaspaze, kar končno vodi v apoptozo celice.), vir: prirejeno po (17, 22)

## 1.6 REGULACIJA KASPAZ IN PREŽIVETJA CELICE

V organizmu je natančno ravnovesje med celično delitvijo in celično smrtjo velikega pomena. Obstajajo številne signalizacijske poti, ki odločajo o usodi celice, zelo pomembna pa je tudi regulacija aktivnosti kaspaz.

Pri regulaciji aktivnosti kaspaz sodelujejo številni dejavniki:

- proteini družine Bcl-2: lahko so inhibitorji ali promotorji aktivnosti kaspaz.
- IAPs: so supresorji apoptoze, ki direktno inhibirajo kaspazne aktivnosti. Navadno se vežejo nanje in jih inaktivirajo, ali pa jih označijo za razgradnjo v proteosomu. Glavna naloga je preprečevanje napačne kaspazne aktivacije.

Proteini družine Bcl-2 so lahko pro-/antiapoptotični. Člani družine, ki inhibirajo apoptozo, preprečujejo predvsem sproščanje citokroma c, medtem ko člani, ki inducirajo celično smrt, vplivajo na indukcijo poškodbe mitohondrija na povečano sproščanje citokroma c in povečano kaspazno aktivnost. Lahko izničijo funkcijo drug drugega, zato ravnotežje med temi proteini odloča o usodi celice (17, 22).

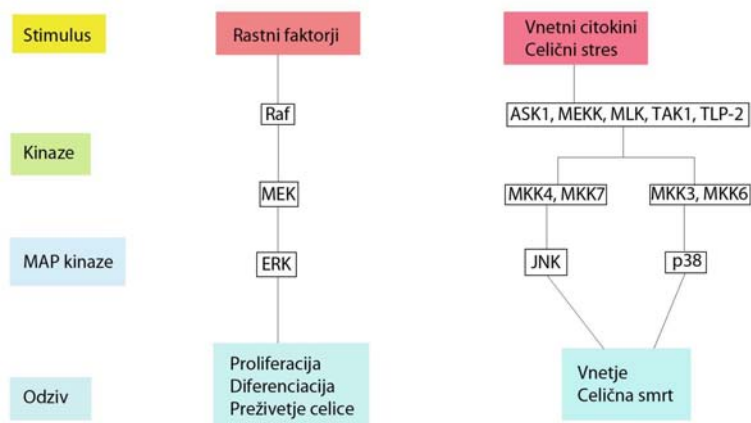
**Tabela 3: Delitev proteinov iz družine Bcl 2 na pro-/anti-apoptotične proteine, vir: povzeto po (17)**

Antiapoptotični proteini	Bcl-2, Bcl-x <sub>2</sub>
Proapoptotični proteini	BH123 (Bax, Bak) BH3-only (Bad, Bim, Bid, Puma, Noxa)

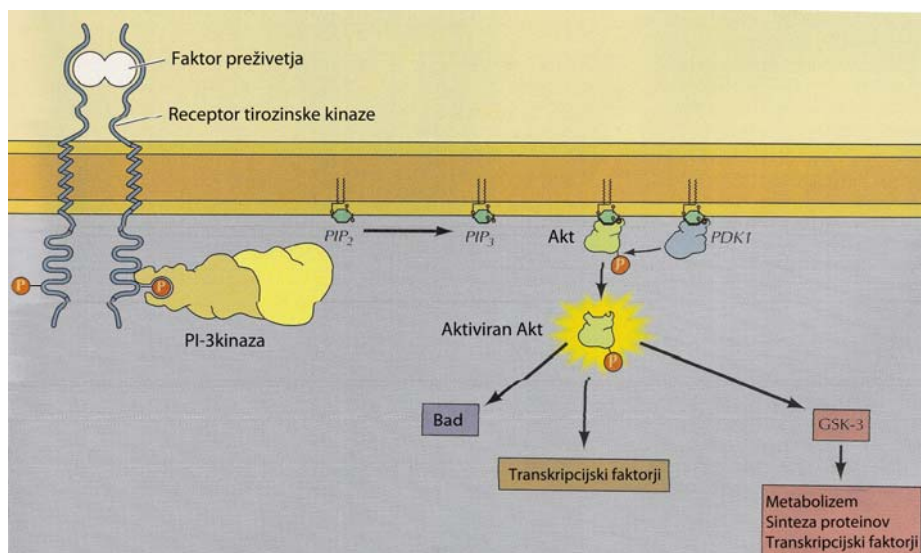
Celica producira in aktivira BH3-only kot odgovor na apoptotični stimulus. Apoptozo inducirajo predvsem z inhibicijo Bcl-2 proteina, verjetno pa so povezani tudi z aktivacijo Bak in Bax. Aktivirana Bax in Bak, inducirata sproščanje intermembranskih proteinov, delujeta na membrano endoplazemskega retikuluma (ER) in jedrno ovojnico, kar lahko poveča sproščanje Ca<sup>2+</sup> v citosol in pomaga pri intrinzični poti apoptoze. Bcl-2 in Bcl-x<sub>2</sub> ohranjata integriteto membran in preprečujeta sproščanje Ca<sup>2+</sup> iz ER in intermembranskih proteinov iz mitohondrija (17).

Ekstrinzična pot lahko aktivira intrinzično pot apoptoze. Protein, ki povezuje ekstrinzično in intrinzično pot, je protein Bid. Aktivacija receptorja za smrt na površini celice sproži ekstrinzično pot, kjer lahko aktivirana iniciatorska kaspaza 8 cepi Bid. Nastane tBid, ki se prenese do mitohondrijev, kjer inhibira antiapoptotične proteine Bcl-2 in pospeši delovanje Bax in Bak ter vodi v aktivnost kaspaze 9, kar samo še pospeši kaspazno kaskado (17, 22). Domneva se tudi, da ima Bid tudi funkcijo pri preklopu apoptoze v nekrozo.

Celica se lahko izogne apoptozi s signalizacijo iz okolja ali od drugih celic (17). Signali, ki signalizirajo preživetje celice, so polipeptidni rastni faktorji ali celični kontakti, ki aktivirajo nerekceptorske tirozin kinaze, ki so povezane z integrini (22). Med signalnimi potmi, ki so vpletene v usodo celic, uvrščamo tudi signalne poti z mitogenom aktiviranih protein kinaz (MAPK) (slika 6) in signalne poti specifičnih serin/treonin kinaz (AKT) (slika 7).



**Slika 6: Signalizacijske poti aktivacije MAP kinaz** (Le-te regulirajo usodo celice. Aktivnost MAP kinaz je regulirana z dvema »upstream« kinazama.), vir: prirejeno po (22)



**Slika 7: Signalna pot PI3-kinaza/Akt** (Le-ta regulira preživetje celice preko različnih tarč, med katerimi so tudi IAPs in njihovi regulatorji ter predstavniki Bcl-2 družine. Fosfoinozitol-3 kinaza (PI3-kinaza) fosforilira fosfatidilinozitol-(4,5)-bifosfat (PIP<sub>2</sub>), ki se pretvori v fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat (PIP<sub>3</sub>), ta pa poveča prisotnost protein-serin/treonin kinaze Akt ob plazemski membrani, kjer jo fosforilira od 3-fosfoinozitida odvisna protein kinaza-1 (PDK1). Aktivirana Akt fosforilira veliko število proteinov, ki regulirajo apoptozo. Med temi proteini je tudi Bad. S fosforilacijo Akt ustvari na Bad vezavna mesta za proteine, ki Bad razcepijo. Med substrati Akt so tudi rastni faktorji, ki regulirajo preživetje celice s kontrolo genske ekspresije, ki vključuje tudi člane Bcl-2 družine. Akt fosforilira tudi protein kinazo GSK-3, ki regulira apoptozo s transkripcijo in translacijo tarčnih genov.), vir: prirejeno po (22)

## 1.7 CITOTOKSIČNI UČINEK MELITINA

Uporaba melitina kot citotoksičnega peptida je zlasti zanimiva pri bolezenskih stanjih, kjer želimo ustaviti proliferacijo celic in vplivati na zmanjšanje njihovega števila. Vse pogostejše so študije, ki preučujejo protitumorni učinek melitina. Mnoge raziskave kažejo na citotoksični ali antiproliferativni efekt čebeljega strupa/melitina na različne tipe tumorskih in nekaterih drugih celic. Apoptotični učinek melitina so preučevali tudi na gladkomišičnih celicah (GMC) podganje aorte. Želeli so ugotoviti, ali melitin prepreči razmnoževanje GMC žile, ki je značilno pri aterosklerozi ali restenozi (25). Prav tako so apoptozo preučevali pri človeških revmatoidnih sinovijskih fibroblastih (4, 26). Poleg študij o možnih zdravilnih učinkih melitina, pa obstajajo tudi raziskave o njegovih škodljivih učinkih. Preučevali so učinek melitina na izolirani prašičji koronarni arteriji in podganji aorti, kjer je melitin povzročil prehodno relaksacijo, kateri je sledila kontrakcija. Domnevajo, da relaksacija preide v kontrakcijo zaradi litičnega učinka melitina na endotelijsko celico (5, 6).

Vzrok za apoptotični in antiproliferativni učinek melitina pogosto pripisujejo povišanju nivoja znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  (23, 24, 27, 28). Eksperimentalni rezultati so pokazali delovanje melitina na  $\text{Ca}^{2+}$  kanale tako na membrani celice (L-tip) (16, 27) kot tudi na membrani celičnih organelov, kot je ER ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza) (23, 28), ki vodijo v močan porast  $\text{Ca}^{2+}$  in verjetno tudi v aktivacijo od  $\text{Ca}^{2+}$  odvisnih encimov, ki prožijo signalizacijske poti, ki odločajo o usodi celice (24).

Pri nekaterih tipih celic so kot odgovor na delovanje melitina dokazali tudi porast tvorbe reaktivnih kisikovih snovi (ROS) (3, 23, 24). Poskusi so pokazali, da lahko dodatek antioksidantov k melitinu uspešno zaščiti celice in zniža procent apoptoze, ki bi jo lahko sprožil melitin sam. Tako se predpostavlja, da je tvorba ROS tudi vpletena v proces programirane celične smrti, ki jo sproži melitin (23, 24).

Melitin ima vpliv tudi na pomembne signalne poti, kot so MAPK,  $\text{PI}_3/\text{Akt}$  in  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (nuklearni faktor  $\kappa\text{B}$ ) poti. Zmanjša stopnjo fosforilacije Akt in tako inaktivira signalno pot (24, 25, 29). Pogosto se omenja vpliv melitina na posamezne kinaze (ERK, JNK, p38) znotraj MAPK signalizacijske poti, vendar rezultati niso enotni, zato so potrebne podrobnejše raziskave. Nekateri strokovnjaki menijo, da lahko melitin delno vpliva na apoptozo tako, da prepreči aktivacijo  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (24, 25). Prevladuje mnenje, da melitin prepreči fosforilacijo in posledično razgradnjo  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ter tako ohrani  $\text{NF}\kappa\text{B}$  v neaktivnem

kompleksu (24, 25). I $\kappa$ B $\alpha$  je protein, ki vezan na NF $\kappa$ B ohranja le-tega v neaktivni obliki. Aktiven NF $\kappa$ B poveča ekspresijo nekaterih antiapoptotičnih molekul (nekateri IAP, Bcl-xl ...) (24). Domneva se, da lahko Akt z regulacijo Nf $\kappa$ B pospešuje celično proliferacijo in poveča odpornost celic na apoptozo (25).

V literaturi se pogosto pojavljajo rezultati poskusov, ki kažejo, da melitin vpliva tudi na povečano izražanje proapoptotičnih in zmanjšano izražanje antiapoptotičnih regulatorjev. Na različnih celicah so pokazali, da lahko melitin inducira apoptozo zaradi povečane ekspresije proapoptotičnih proteinov, kot so Bax, kaspaza 3, kaspaza 9, poli-(ADP-riboza) polimeraza (PARP), endonukleaza G (EndoG), faktor, ki inducira apoptozo (AIF) ... Hkrati se zniža ekspresija antiapoptotičnih proteinov, kot so Bcl-2, IAPs (23, 24, 26, 29). Zanimiva je tudi aktivnost melitina kot spodbujevalca hiperaktivnosti fosfolipaze A<sub>2</sub>. V začetku 90-tih let je Sharma s sodelavci prvi dokazal povezavo med vključenostjo PLA<sub>2</sub> in citotoksično aktivnostjo melitina na rakave celice. Njegovi eksperimenti so pokazali, da melitin selektivno spodbudi hiperaktivacijo PLA<sub>2</sub> in vdor Ca<sup>2+</sup> v celico, v kateri je močno izražen proonkogen *ras*. Od takrat so bile izvedene številne študije, ki so dokazovale vključenost PLA<sub>2</sub> v citotoksični efekt melitina (4), spet druge pa so povezavo med PLA<sub>2</sub> in prehajanjem Ca<sup>2+</sup> v celico na nekaterih tipih celic ovrgle (27).

Citotoksičnosti melitina pa ne povezujejo samo z apoptozo temveč tudi z nekrozo. Nekrotične spremembe zaradi delovanja melitina so pokazali na podganjih timocitih, glodalski skeletni mišici, mišjih embrijskih fibroblastih (21), eritrocitih, limfocitih, limfoblastoidnih celicah, gastrointestinalnih celicah in drugih (30). Tudi pri nekrotični smrti celice zaradi citotoksičnega učinka melitina se pogosto navaja dvig koncentracije znotrajceličnega Ca<sup>2+</sup> kot možen dejavnik, ki vpliva na propad celice (30, 31). Nekateri poskusi nakazujejo na možnost, da nekroza delno poteka tudi kot programirana celična smrt, ki je odvisna od aktivacije intracelularnih signalnih kaskad. Eksperimentalno so pokazali, da lahko proapoptotični protein Bid poveča občutljivost celic do nekrotične lize. Takšno senzitivizacijo lahko sproži tudi melitin (21).

## 2 NAMEN DELA

Endotelijske celice sestavljajo sloj, ki prekriva svetlino žile. Izražajo tako morfološko kot tudi funkcionalno heterogenost znotraj krvožilnega sistema, kar je posledica fiziološke prilagoditve na potrebe žile. Določajo stopnjo prepustnosti žile, sodelujejo pri vazokonstrikciji in vazodilataciji, imajo vlogo pri regulaciji hemostaze, pri vnetnih odgovorih in angiogenezi (32).

Melitin med drugim povzroča prehodno relaksacijo s posledično kontrakcijo žile. Predhodne študije so dokazale, da je v relaksacijo žile vključen endotelij preko mehanizma tvorbe NO. Ni še razjasnjeno, zakaj preide relaksacija v kontrakcijo. Možno bi bilo, da melitin poškoduje endotelijske celice. Predhodne študije so potrdile tudi litični učinek na naravne in sintetične membrane. Izvedli so številne poskuse, katerih rezultati nakazujejo, da lahko melitin v različnih celicah sproži apoptozo ali nekrozo. Tovrstni poskusi na endotelijskih celicah pa še manjkajo.

V diplomskem delu nas bo zato zanimal citotoksični učinek melitina na endotelijske celice. Skušali bomo ugotoviti, ali izzove apoptozo ali nekrozo in kakšna je koncentracijska ter časovna odvisnost delovanja melitina. Skušali bomo dokazati skladnost s predhodnimi študijami melitina na relaksacijo in kontrakcijo izolirane koronarne arterije prašiča. Tako bomo poskusili odgovoriti na vprašanje, ali preide relaksacija v kontrakcijo zaradi poškodbe endotelijskih celic. Najprej bomo optimizirali razmere za izvedbo našega poskusa. V ta namen bomo ovrednotili tudi to, kako tip plastike, na katero se pritrdijo celice, starost raztopine melitina, čas (število dni) celic po pasaži in konfluentnost kulture vplivajo na odzivnost celične linije HUVEC na melitin.

S svetlobnim mikroskopom bomo ovrednotili vidne učinke melitina na HUVEC v odvisnosti od plastike, starosti raztopine melitina, števila dni po pasaži in konfluentnosti. Določili bomo časovni in koncentracijski interval, znotraj katerega je aktivnost melitina najbolj očitna. Uporabili bomo barvila, s katerimi bomo dokazali spremembe v membrani, ki so karakteristične za nekrozo in apoptozo. Ta barvila so 7-AAD in aneksin V. Učinek bomo določili s pomočjo pretočne citometrije. Za vizualizacijo fragmentacije jedra bomo uporabili barvilo DAPI in flourescenčni mikroskop.

## 2.1 HIPOTEZE

**Preverili bomo naslednje delovne hipoteze.**

1. Najpomembnejši razlog za prehod iz relaksacije v kontrakcijo žile, ki je posledica delovanja melitina, je njegova citotoksičnost za endotelijske celice.
2. Melitin bo povzročil apoptozo ali nekrozo HUVEC kot modelnega sistema za endotelijske celice.
3. Velikost učinka melitina na HUVEC v razmerah *in vitro* bo odvisna od koncentracije in starosti raztopine melitina, od lastnosti celične kulture (konfluentnost, čas po pasaži) in od vrste plastike, v kateri je kultura.

# 3 METODE IN MATERIALI

## 3.1 KEMIKALIJE, TOPILA, REAGENTI

- raztopina M199 (GIBCO)
- medij za celično linijo (raztopina M199 + serum (20 %) + antibiotik (1,5 %))
- antibiotiki (penicilin in streptomycin, GIBCO, tekočina 100 ml, P5000 U/ml S5000 ug/ml)
- fetalni goveji serum (GIBCO)
- tripsin-EDTA (SIGMA)
- PBS (phosphat bufered saline/fosfatni pufer, brez kalcija in magnezija, pH = 4).
- melitin (bel prašek, M = 2846,54 g/mol SIGMA M-4171) - v trdni obliki se hrani v zmrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pred uporabo smo ga natehtali in ga raztopili v segretem mediju za celice. V primeru, da smo uporabljali raztopino melitina v dnevih po pripravi sveže raztopine, smo melitin hranili pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Melitin izgubi citotoksičnost v roku enega tedna.

- aneksin V-FITC/7-AAD kit vsebuje barvili aneksin V-FITC in 7-AAD ter vezavni pufer. Obe barvili sta občutljivi na svetlobo, zato je pri delu z njima pomembno, da ju ne izpostavljammo svetlobi. Vezavni pufer moremo pred uporabo 10-krat razredčiti z destilirano vodo in ga hraniti na ledu.
- tripan modro (FLUKA)
- DAPI (VECTOR LABORATORIES)
- 4 % formaldehid (SIGMA)

### **3.2 MATERIALI**

- petrijevke (tip Sarstedt in TPP)
- pipete
- epruvete za centrifugo
- vsebniki za vzorce pri merjenju s citometrom
- inzulinska injekcija
- epice
- alufolija
- čaše
- Neubaumanova komora
- plošča z luknjami
- krovno in objektno stekelce



### **3.3 APARATURE**

- faznokontrastni-invertni mikroskop (Nikon, Eclipse TS 100)
- fluorescenčni mikroskop (Nikon, Eclipse 300)
- inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C)
- komora z laminarnim pretokom zraka
- centrifuga
- pretočni citometer (Beckman Coulter: Quanta SC MPL)
- tehnica
- fotoaparati (Nikon, Coolpix 4500)

### **3.4 METODE IN POSTOPKI**

#### **3.4.1 Celična kultura**

##### **3.4.1.1 Celična linija HUVEC**

Pri delu smo uporabili ATCC (American Type Culture Collection) celično linijo HUVEC, ki izvira iz popkovnične vene človeka. Je nesmrtna celična linija endotelijskih celic.

##### **3.4.1.2 Odmrzovanje celične linije**

Celice, shranjene v tekočem dušiku, smo hitro odtalili v vodni kopeli ( $T = 37\text{ °C}$ ). Odmrznjene celice smo prenesli v 10 ml medija, sestavljenega iz raztopine M199, 20 % fetalnega govejega seruma in 1,5 % raztopine antibiotika (streptomycin, penicilin) ter jih centrifugirali 10 min pri 125 x g. Supernatant smo zavrgli in celice resuspendirali v svežem mediju ter jih prenesli v gojiščno steklenico. Naslednji dan smo odlili medij, v katerem so plavale odmrle celice in dodali svež medij.

### **3.4.1.3 Gojenje celične linije**

Gojenje celic vedno poteka v aseptičnem okolju, pri delu z njimi uporabljamo sterilni pribor in reagente. Celice smo gojili v petrijevkah z 9 ml medija. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C, v atmosferi, nasičeni z vlago in 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 urah smo prvič zamenjali medij in nato po enem tednu. Ko se je kultura bližala konfluentnosti, smo medij menjavali na dva dni.

### **3.4.1.4 Pasaža/tripsinizacija celic**

Ko pritrjene celice prerastejo 70 %–80 % gojiščne površine, jih tripsiniziramo. To smo naredili tako, da smo celicam odlili medij in kulturo sprali z 2×5 ml raztopine M199. Nato smo v petrijevko dodali 4 ml tripsina-EDTA in pustili delovati 3 min v inkubatorju. Da smo zagotovili popolno odlepljenost celic od podlage, smo vsebino petrijevke dobro premešali s pipeto. Dodali smo 6,5 ml medija za celično linijo, s katerim prekinemo aktivnost tripsina, in suspenzijo celic centrifugirali 5 min na 500× g. Nato smo usedlino celic resuspendirali v 10 ml medija. V vsako petrijevko smo dali 0,5 ml pripravljene suspenzije in dodali še 10 ml medija. Na vsaka dva dneva se je celicam menjal medij.

### **3.4.2 Izpostavljenost celične kulture HUVEC melitinu**

Pri adherentnih celicah: Celicam smo odlili medij, jih sprali z 2×5 ml raztopine M199 in dodali 9 ml medija z melitinom v koncentraciji 10 µg/ml. Celice smo različno dolgo inkubirali z melitinom, odvisno od poskusa. Za določanje fragmentacije jedra z barvilom DAPI pa smo celice inkubirali z 2 µg/ml, s 5 µg/ml in z 10 µg/ml melitina. Po delovanju melitina smo raztopino melitina odlili in celicam v petrijevki dodali tripsin. Priprava vzorcev po dodatku tripsina poteka enako kot zgoraj opisan postopek tripsinizacije.

Pri celicah v suspenziji: Suspenzijo celic smo dobili tako, da smo adherentne celice tripsinizirali po enakem postopku, kot je opisan zgoraj. Nato smo suspenziji celic dodali medij z enako koncentracijo melitina kot adherentnim celicam in celice v suspenziji z melitinom inkubirali 15 min. Po 15 min smo vzorec centrifugirali 5 min na 500× g.

### **3.4.2.1 Vrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na odzivnost celične kulture HUVEC na melitin**

Dejavniki, ki so nas zanimali, so bili vrsta plastike, čas/dnevi po pasaži, konfluentnost celic in starost raztopine melitina. Uporabili smo petrijevke Sarstedt in TPP, preučevali odzivnost celic na melitin 1., 2., 3. in 4. dan po pasaži, primerjali smo odzivnost celic na sveže pripravljen in predhodno pripravljen melitin (star od 1, 2, 5, 6 do 7 dni) in ocenjevali, kako konfluentnost vpliva na odzivnost celic. Celice smo opazovali do tri ure po dodatku raztopine melitina s koncentracijo 10 µg/ml.

Celice so bile na dan pasaže dane v petrijevke Sarstedt ali TPP, dodan jim je bil medij, inkubacija (37 °C) je potekala do določenega dneva po pasaži. Na dan poskusa smo celicam pod mikroskopom ocenili konfluentnost, odlili star medij, celično kulturo sprali z 2×5 ml raztopine M199 in jim dodali 9 ml raztopine melitina. Spremembe smo vrednotili s pomočjo svetlobnega mikroskopa in jih fotografirali.

### **3.4.2.2 Izbira razmer *in vitro* za določevanje nekroze in apoptoze**

Po opazovanju reakcije melitina z mikroskopom smo določili časovne intervale izpostavljanja celic melitinu. Inkubacijo z melitinom smo prekinili po 15 min, 30 min in 60 min. Za gojenje celic smo uporabili sveže pripravljeno raztopino melitina, petrijevke Sarstedt in eksperimente izvajali na konfluentnih celicah en dan po pasaži. Primerjali smo tudi odzivnost celic pri adherentni kulturi in kulturi v suspenziji po 15 min reakciji z melitinom. Celice in vzorci so bili pripravljene po opisanih metodah in postopkih.

### **3.4.3 Štetje celic z Neubaumanovo komoro s pomočjo svetlobne mikroskopije in določanje celične viabilnosti z barvilom tripan modro**

Barvilo tripan modro omogoča ločevanje med živimi in mrtvimi (nekrotičnimi) celicami. Mrtve celice imajo poškodovano membrano, skozi katero lahko prehaja tripansko barvilo in celice obarva modro. Najprej smo iz 10 ml celične suspenzije vzeli 20 µl in to zmešali z 20 µl tripanskega modrila. Nato smo obarvan vzorec nanесли na Neubaumanovo komoro (slika 8) tako, da smo dodali na vsako stran 9 µl. Z vzorcem se mora zapolniti celotna komora, krovno steklo pa ne sme plavati. Nato smo s pomočjo svetlobnega mikroskopa prešteli vse celice v devetih kvadratih in izračunali povprečno število celic na en

kvadrata (ŠKC, na sliki 9 je označen z rdečo barvo), nato pa še posebej žive in modre celice.

Število celic v vzorcu izračunamo po formuli:

$$\text{Število celic} = \text{ŠKC} (X/9) \times 2 (\text{razredčitev}) \times 10 \text{ ml (celotni volumen)} \times 10^4$$



Slika 8: Neubaumanova komora, vir: prirejeno po (40)

**Rdeč** kvadrat = 1 mm<sup>2</sup>, 100 nl

**zelen** kvadrat = 0.0625 mm<sup>2</sup>, 6.25 nl

**rumen** kvadrat = 0.04 mm<sup>2</sup>, 4 nl

**moder** kvadrat = 0.0025 mm<sup>2</sup>, 0.25 nl

Dimenzije mreže: globina je 0,1 ml

Slika 9: Mreža komore, vir: prirejeno po (41)

### **3.4.4 Metoda s flourescenčno označenim proteinom aneksin V in barvilom 7-AAD za določanje apoptotičnih in nekrotičnih celic s pretočnim citometrom**

Pri tej metodi smo uporabili poseben kit in jo izvedli po navodilu proizvajalca. Za analizo potrebujemo približno od  $1 \times 10^6$  do  $2 \times 10^6$  celic. Po pripravi 1 ml suspenzij celic smo suspenzije iz centrifugirk prenesli v epice in jih centrifugirali 5 min na 500x g. Usedlini celic smo dodali 500 µl PBS, resuspendirali in ponovno centrifugirali na enakem programu. Nato smo usedlini celic dodali 100 µl vezavnega pufra, 20 µl 7-AAD in 10 µl aneksina V-FITC. Vsebino epic smo premešali, jih inkubirali v temi 15 min, po inkubaciji smo dodali 400 µl vezavnega pufra. Pri delu je pomembno, da so celice in reagenti ves čas

na ledu. Zaradi občutljivosti barvil je pomembno, da vzorcev v procesu barvanja ne izpostavimo svetlobi. Po končanem postopku barvanja vzorce analiziramo s pretočnim citometrom v roku 30 min.

Izvor svetlobe pri pretočnem citometru je bil 22 mW argonski laser, ki obratuje pri 488 nm. Za meritev smo uporabili elektronski volumen in tri fotopomnoževalke: (1) za granuliranost je bil uporabljen detektor za stransko sipanje svetlobe; (2) za detekcijo fluorokroma FITC smo uporabili filter 525 BP (FL1) in (3) za detekcijo 7-AAD smo uporabili filter 670 LP (FL3). Za zajem in analizo podatkov smo uporabili programsko opremo Quanta SC MPL 1.0.

### **3.4.5 Metoda z barvilom DAPI za določanje apoptotičnih celic s pomočjo fluorescenčne mikroskopije**

Fragmentacijo jedra smo dokazovali 30 min po inkubaciji celične kulture z raztopino melitina s koncentracijami 2 µg/ml, 5 µg/ml ali 10 µg/ml. Preden smo dali celice v petrijevke, smo jih prešteli in na dno vsake petrijevke dali dve krovni stekelci tako, da se med sabo nista dotikali. Ko je bila kultura konfluentna, smo krovna stekelca iz petrijevk prenesli na plošče z luknjami. Nato smo v luknje s krovnimi stekelci dodali raztopino melitina in inkubirali 30 min. Po inkubaciji smo odstranili medij in za fiksacijo uporabili 4 % formaldehid. Celice smo v fiksativu inkubirali 30 min na sobni temperaturi. Nato smo jih 30 min spirali s PBS. Po spiranju smo na objektno stekelce dodali sredstvo proti bledenju (vectashield) z barvilom DAPI in stekelce prekrili s krovnim stekelcem s celicami. Preparat smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom.

## **3.5 STATISTIKA**

Vse vrednosti so izražene kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine (SEM). Statistično značilno razliko med aritmetičnimi sredinami smo izračunali z enosmerno analizo variance (ANOVA) pri primerjavi več skupin hkrati. Statistično značilno razliko bo predstavljala stopnja tveganja največ 0,05. Statistično značilne razlike so označene kot: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  in \*\*\* $p < 0,001$ . Podatke smo obdelali v programih Excel, SigmaStat 3,5 in SigmaPlot 10.

## 4 REZULTATI

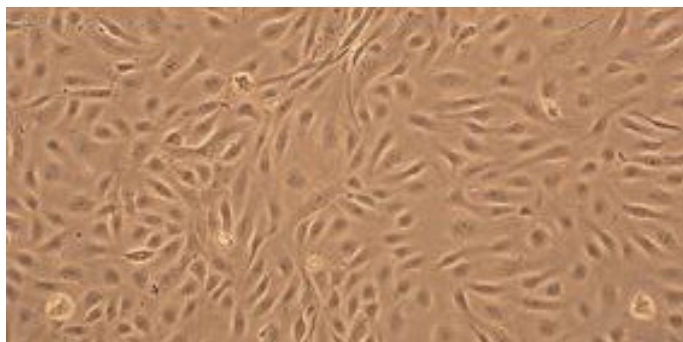
### **4.1 VREDNOTENJE DEJAVNIKOV, KI VPLIVAJO NA ODZIVNOST CELIČNE KULTURE HUVEC NA MELITIN**

#### **4.1.1 Vpliv raztopine melitina**

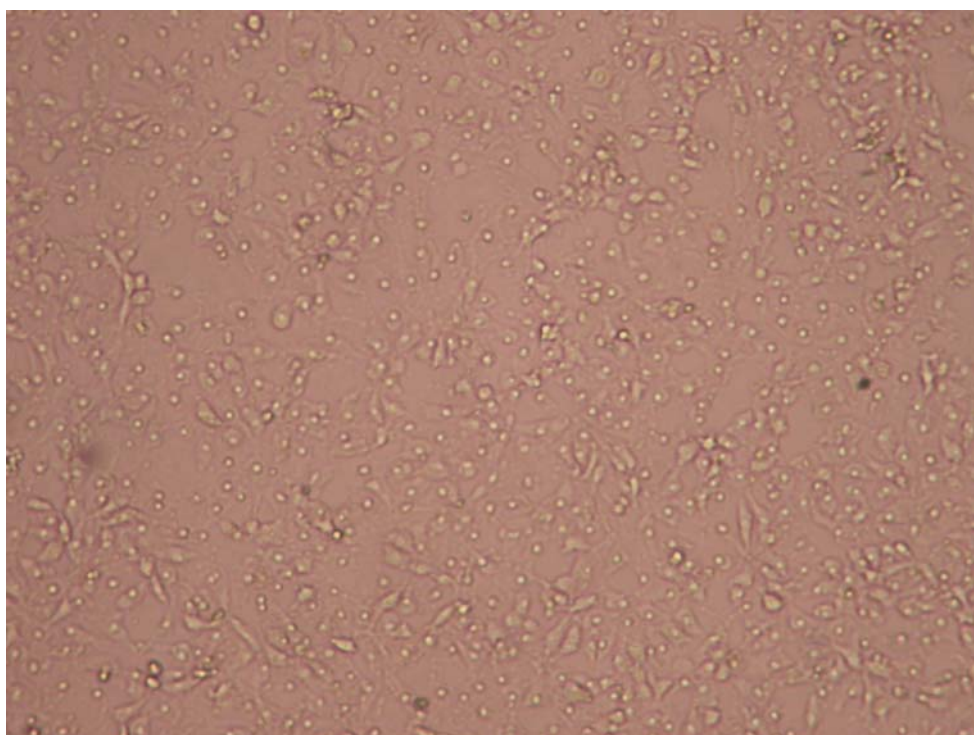
V primeru sveže pripravljene melitina je bil odziv celic vedno hiter in izrazit. Značilen je pojav vakuol znotraj celic v časovnem intervalu 5-10 min (slika 11). V primerih zelo močnega odziva se vakuole pojavijo v skoraj vsaki celici že pri 3 min. Hitro je opazna tudi spremenjena oblika celic. Normalna oblika celic je rahlo podolgovata, ozka ali poligonalna (slika 10), v primeru odziva na melitin pa postane celica okrogla, pogosto z majhno vakuolo znotraj celice. Značilen je tudi pojav skrčenja celic, na podlagi katerega izgleda celotna kultura v petrijevki redkejša, kot je bila pred dodatkom melitina. Pojavljajo pa se tudi vezikli različnih velikosti zunaj celic (slika 12). Odvisno od velikosti odziva lahko v času približno od 30 min do 45 min vidimo tudi posamično odlepljanje celic od podlage in redčenje, ki se postopoma povečuje (slika 13 in 14).

Raztopina melitina, ki ni sveža, ima prav tako učinek na celice, ki pa ni tako močan. Pri melitinu, starem en dan ali dva dneva se opazi povišana stopnja vakuolizacije, tvorba veziklov in prehod celic v okroglo obliko v časovnem intervalu 10-20 min. V primerjavi s svežim melitinom je tukaj pojav vakuol v celicah manjši, so pa dobro vidni vezikli zunaj celic in ponekod tudi skupki veziklov. Poleg okroglih celic, ki nastanejo kot posledica delovanja melitina, smo tukaj ugotovili večji delež celic normalne oblike. Redčenje kulture smo opazili po približno 30-45 min, vendar je bil proces manj intenziven, odlepljanje celic pa ni bilo izrazito (rezultati niso prikazani). Pri sveže pripravljene raztopine melitina ali stari en dan do dva dneva smo opazili (vendar ne vedno) nastanek obsežnejše prazne površine z močno vakuoliziranim robom. Njen nastanek je neodvisen od vrste plastike in časa po pasaži (slika 15).

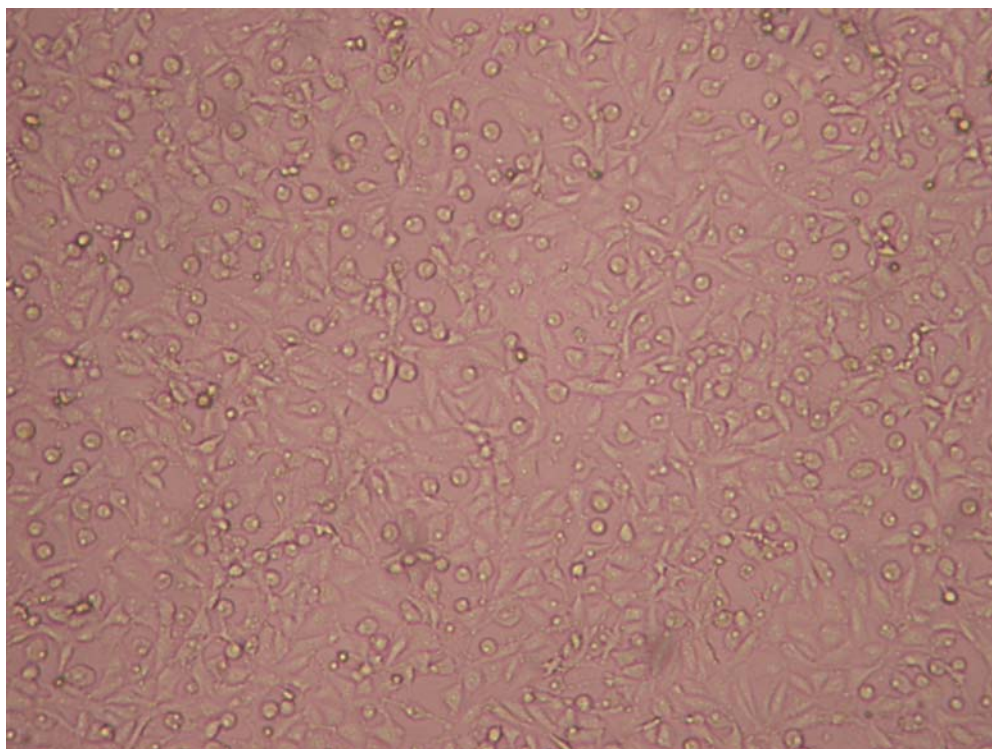
Odziv celic na raztopino melitina, staro 5, 6 in 7 dni, je še opazen, vendar izrazitost pada. Vakuole v celicah niso značilne, opazimo lahko spremembe v obliki celic in vezikle zunaj celic, redčenje kulture ali odlepljanje celic ni značilno (rezultati niso prikazani).



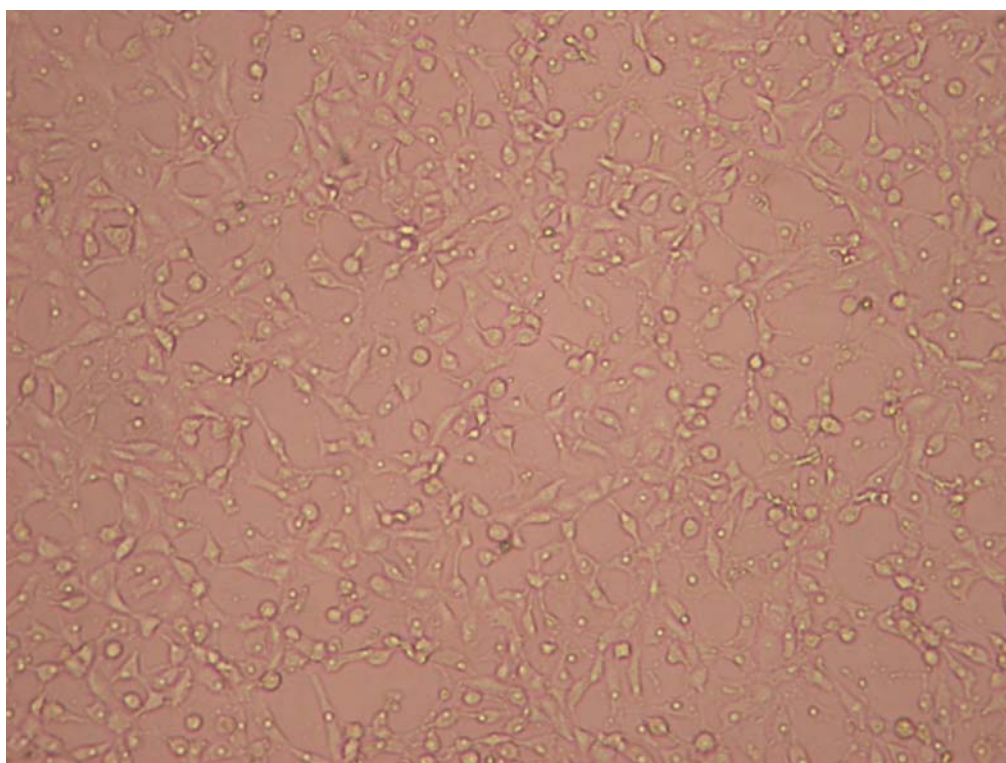
Slika 10: HUVEC celična linija, vir: po (42)



Slika 11: Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 10 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Primer močnega odziva, kjer so skoraj v vsaki celici vidne vakuole. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 100))

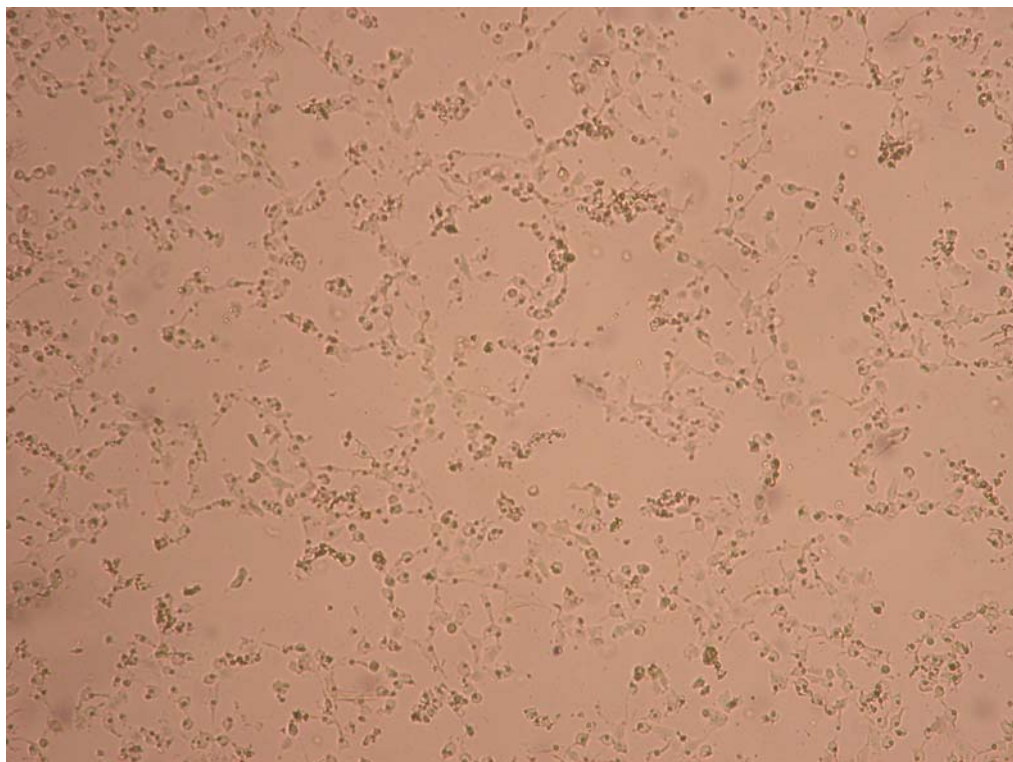


**Slika 12: Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 20 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Vidne so okrogle celice, vakuole, vezikli in normalne celice. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 100))**

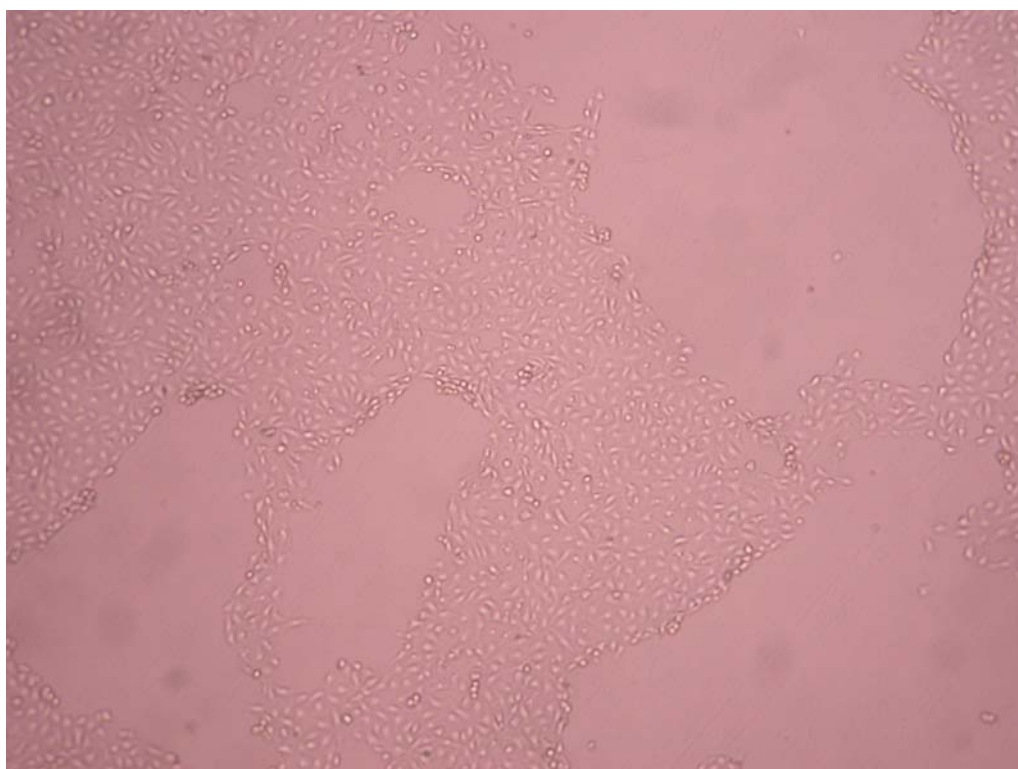


**Slika 13: Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 30 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Prišlo je do nastanka vakuol, veziklov, do nastanka okroglih celic, opazno je pa tudi redčenje kulture. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 100))**





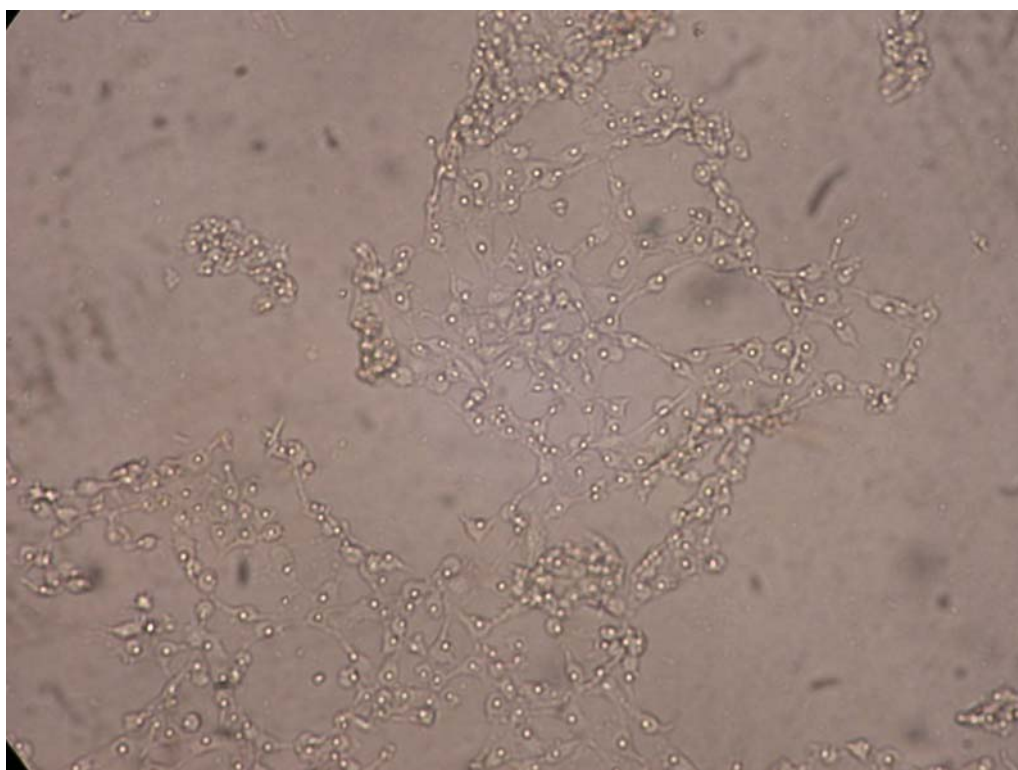
**Slika 14: Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi po 120 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Napredovan pojav redčenja in odlepljanja celic. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 40))**



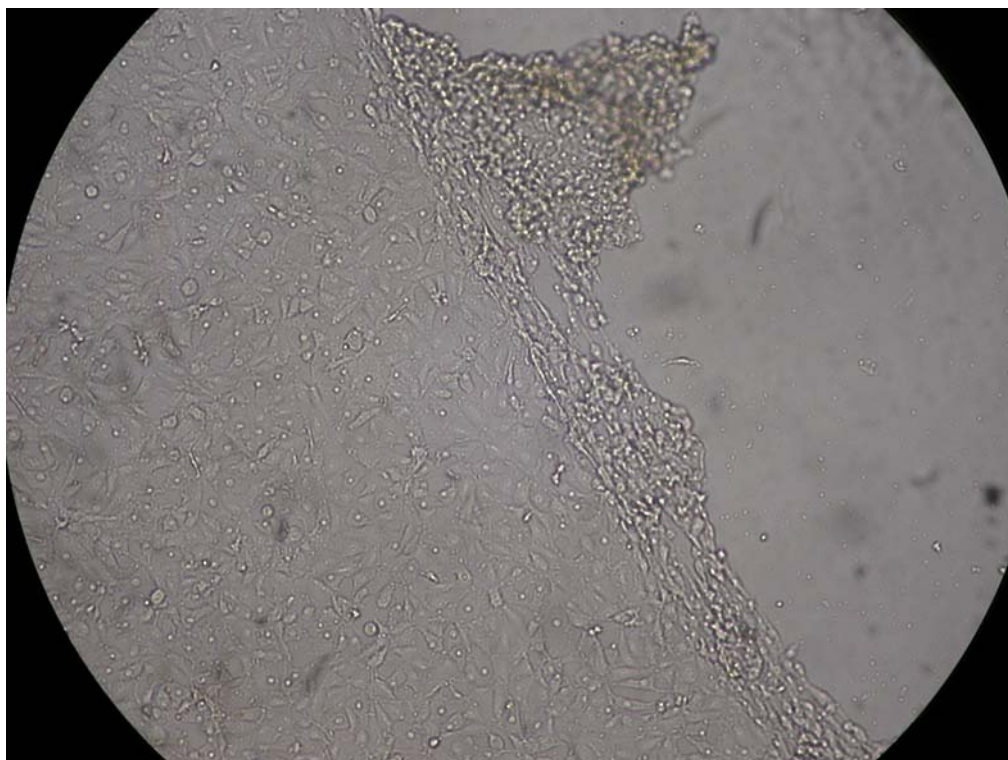
**Slika 15: Morfološke spremembe celic HUVEC v konfluentni kulturi takoj po izpostavitvi mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Primer nastanka praznih površin z vakuoliziranim robom. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 40))**

#### **4.1.2 Vpliv konfluentnosti celic**

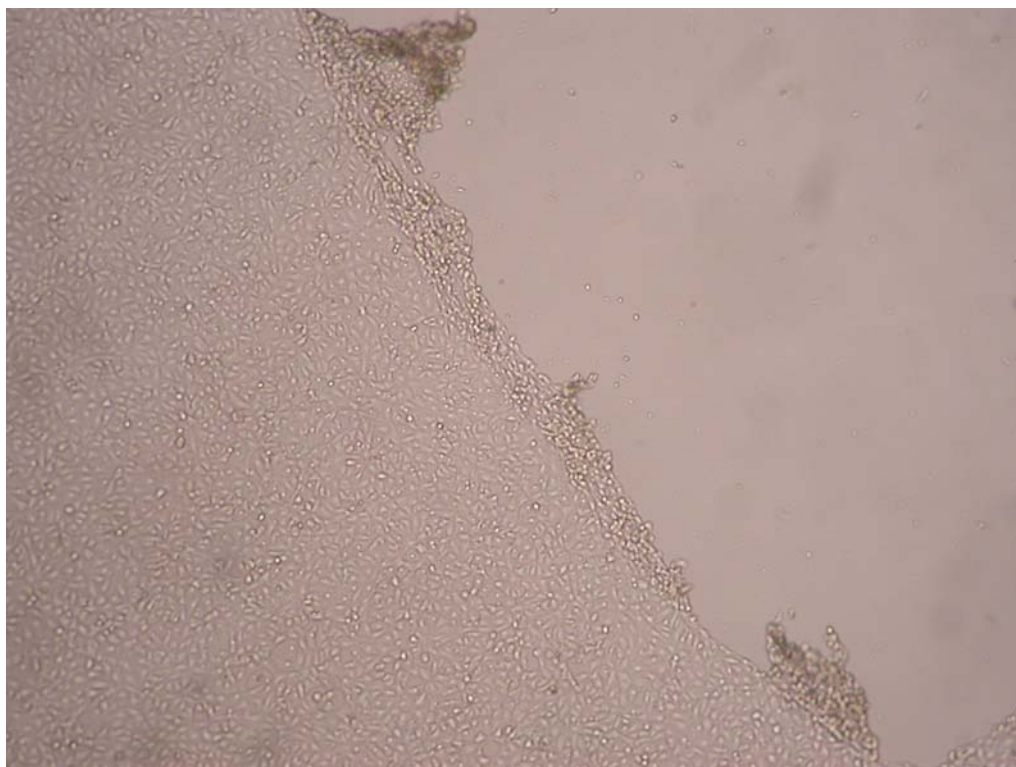
Ob sveže pripravljenem melitinu ima največji vpliv na odzivnost celic njihova konfluentnost. Pri eksperimentalnem delu smo opazili, da ima melitin enakomeren učinek po celotni kulturi. To pomeni, da se stopnja vakuolizacije in začetno preoblikovanje celic na različno konfluentnih območjih ne razlikuje. Smo pa ugotovili, da se redčenje kulture na redkeje poseljenih delih razvija hitreje (slika 16). Edina izjema, kjer pride do močnejše vakuolizacije kot drugod, je močno vakuoliziran rob ob predelih večjih praznih površin, katere bi lahko povzročil melitin (slika 17 in 18). Pri nekaterih poskusih smo pri nekonfluentni kulturi ugotovili, da so celice po dodatku raztopine melitina na nekaterih predelih slabše pritrjene na podlago in se nato v skupkih odlepajo. Do takšnega odlepljanja in do tvorbe večjih praznih površin z močno vakuoliziranim robom pa pri nekonfluentnih celicah ni prišlo vedno oziroma so nastale tudi pri konfluentnih celicah. Težko je opredeliti, ali je opisani pojav odvisen od konfluentnosti ali ne in kaj bi lahko bil vzrok. Glede na rezultate nastanka praznih površin ne moremo vedno povezati s konfluentnostjo celic.



**Slika 16: Morfološke spremembe celic HUVEC v nekonfluentni kulturi po 40 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Primer vakuolizacije, odlepljanja in redčenja celic pri nekonfluentni kulturi. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X 100))**



**Slika 17 in Slika 18: Morfološke spremembe celic HUVEC v nekonfluentni kulturi po 10 min izpostavljenosti mediju z 10 µg/ml dodanega melitina (Močno vakuoliziran rob, celice za robom pa izkazujejo enakomeren učinek melitina. (Nikon ECLIPSE TS100; povečava X100 pri sliki 17 in X 40 pri sliki 18)**



### **4.1.3 Vpliv plastike**

Uporabili smo petrijevke Sarstedt in TPP. Dno petrijevke Sarstedt je iz plastike, ki omogoča boljše pritrjevanje celic na podlago. To so potrdili tudi naši rezultati. Celice v petrijevkah TPP so skoraj vedno izkazale močnejšo reakcijo na melitin ali v nastanku večjih praznih površin ali pa v stopnji odlepljanja in redčenja celic (rezultati niso prikazani).

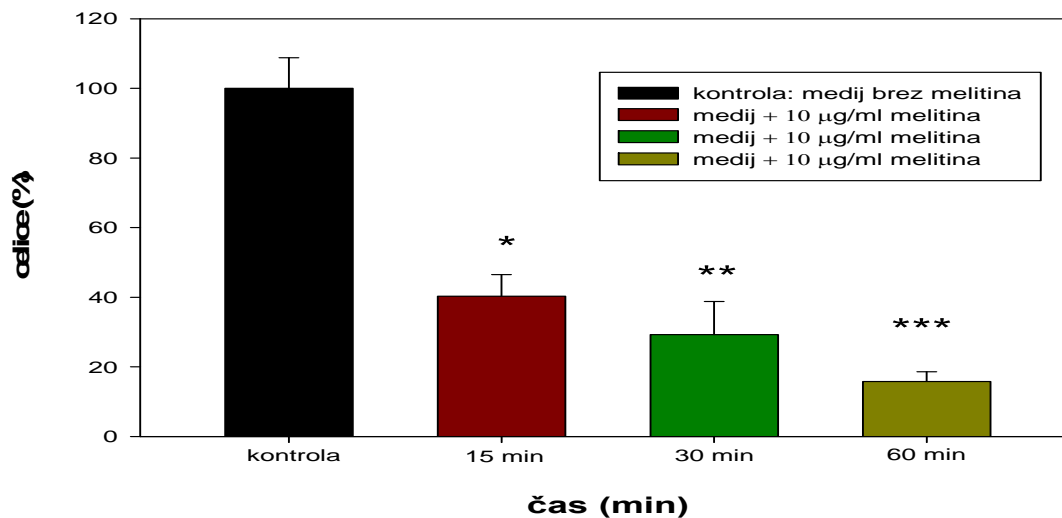
### **4.1.4 Čas po pasaži**

Pri eksperimentalnem delu smo opazili, da se lahko celice po prvem dnevu po pasaži močneje odzivajo na melitin kot poznejše dni. Pomembno je tudi dejstvo, da smo takšne rezultate dobili takrat, ko reakcija na melitin ni bila posebno močna. Takrat, ko smo z melitinom dosegli močan učinek, je bilo razlike med različnimi časi po pasaži težko opredeliti. Poskuse smo nato izvajali na celicah en dan po pasaži, ker smo izhajali iz izhodišča, da so celice takrat najmanj pritrjene na podlago in je zato učinek melitina najmočnejši (rezultati niso prikazani).

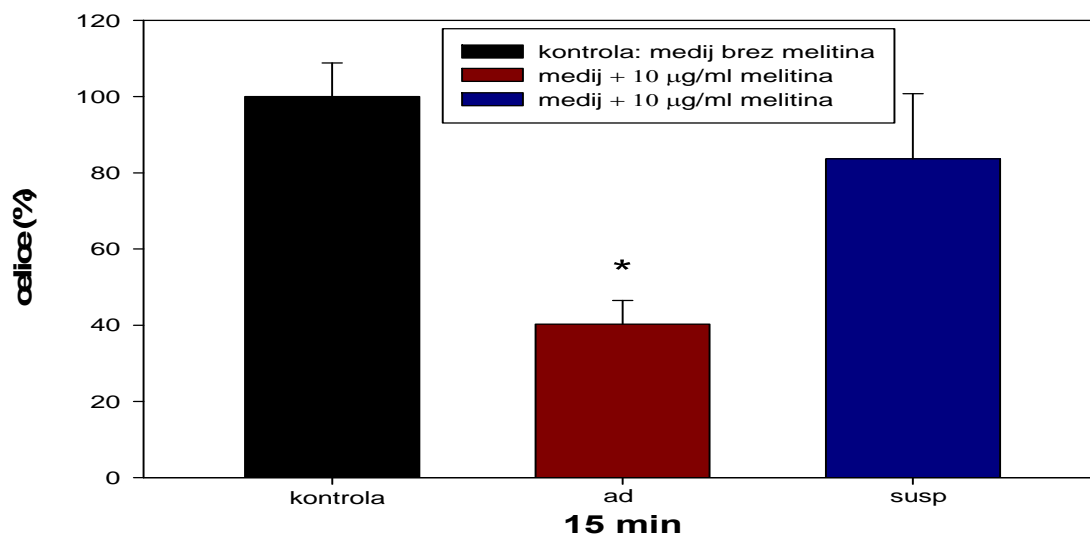
## ***4.2 ŠTETJE CELIC Z NEUBAUMANOVO KOMORO S POMOČJO SVETLOBNE MIKROSKOPIJE IN DOLOČANJE CELIČNE VIABILNOSTI Z BARVILOM TRIPAN MODRO***

Po reakciji z melitinom smo celice v Neubaumanovi komori prešteli in glede na kontrolo preračunali procent živih celic po 15 min, 30 min in 60 min reakciji z melitinom. Razvidno je, da z dolžino reakcije število živih celic statistično značilno upada.

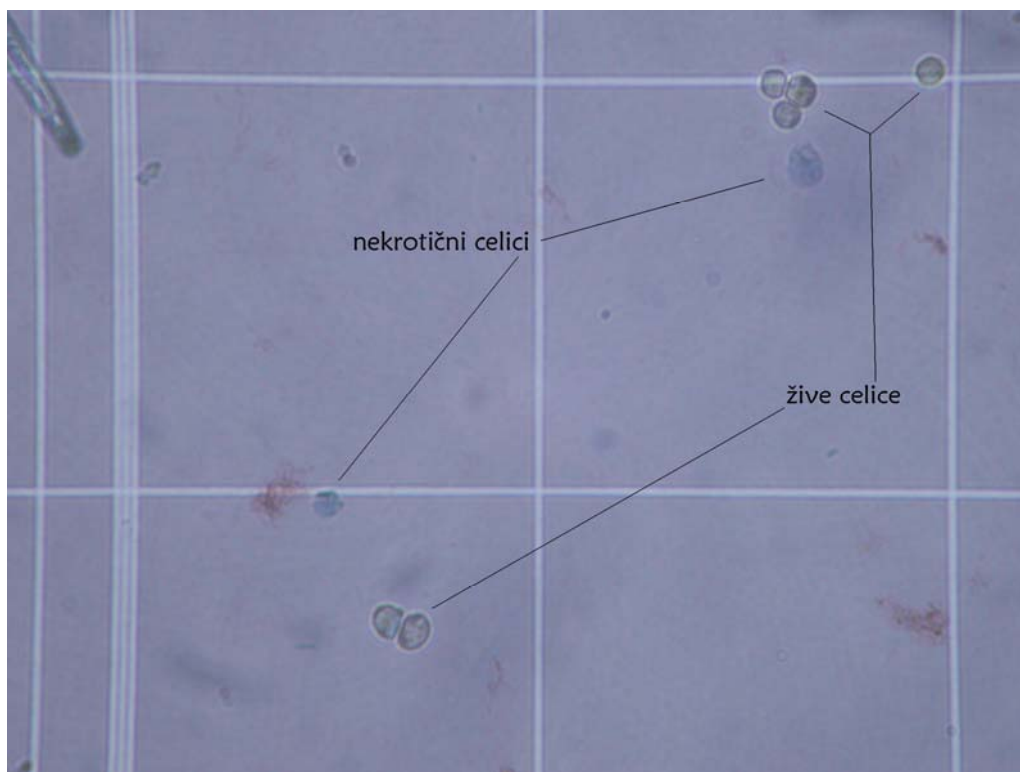
Zanimalo nas je tudi, ali se celice v suspenziji odzivajo drugače kot adherentne celice. Za suspenzijo smo celice najprej odlepili od podlage in nato dodali melitin. Po 15 min smo v obeh vzorcih reakcijo prekinili. Rezultati so pokazali razliko v občutljivosti adherentnih celic in celic v suspenziji. Upad števila celic smo ugotovili pri obeh vzorcih, čeprav je statistično značilen upad celic samo pri adherentnih celicah. Z barvilom tripan modro smo pokazali tudi prisotnost nekrotičnih celic s še ohranjeno celično obliko. Takšne celice smo našli samo pri kulturi v suspenziji, pri adherentni kulturi pa so verjetno v postopku priprave vzorcev razpadle.



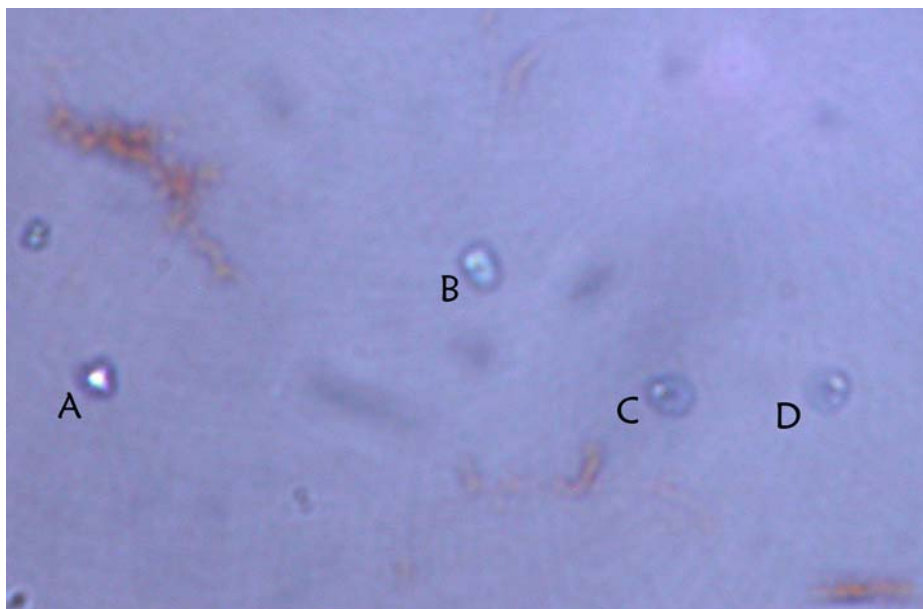
**Slika 19: Časovna odvisnost učinka melitina na število živih celic HUVEC v pritrjeni celični kulturi** (Pritrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10  $\mu\text{g/ml}$  dodanega melitina za 15 min, 30 min in 60 min pri 37 °C. Število živih celic v skupini, izpostavljeni melitinu, je izraženo v % od števila živih celic v skupini, ki ni bila izpostavljena melitinu. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*\* $p$  < 0.001, \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 v primerjavi s kotrolo.)



**Slika 20: Razlika v učinku melitina na število živih celic HUVEC, če so celice pritrjene (ad) oziroma če so celice v suspenziji (susp)** (Celice smo izpostavili mediju z 10  $\mu\text{g/ml}$  dodanega melitina za 15 min pri 37 °C. Število živih celic v skupini, izpostavljeni melitinu, je izraženo v % od števila živih celic v skupini, ki ni bila izpostavljena melitinu. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 3). \* $p$  < 0.05 v primerjavi s kotrolo.)



**Slika 21: Razlika med mrtvo/nekrotično celico in med živo celico, ugotovljena z barvilom tripan modro (Slika prikazuje žive in modro obarvane, najverjetneje nekrotične celice. Celice smo izpostavili mediju z 10  $\mu\text{g/ml}$  dodanega melitina za 15 min pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Velikost kvadrata, v katerem so celice, je 0.0625  $\text{mm}^2$ . Nikon ECLIPSE TS100 . )**



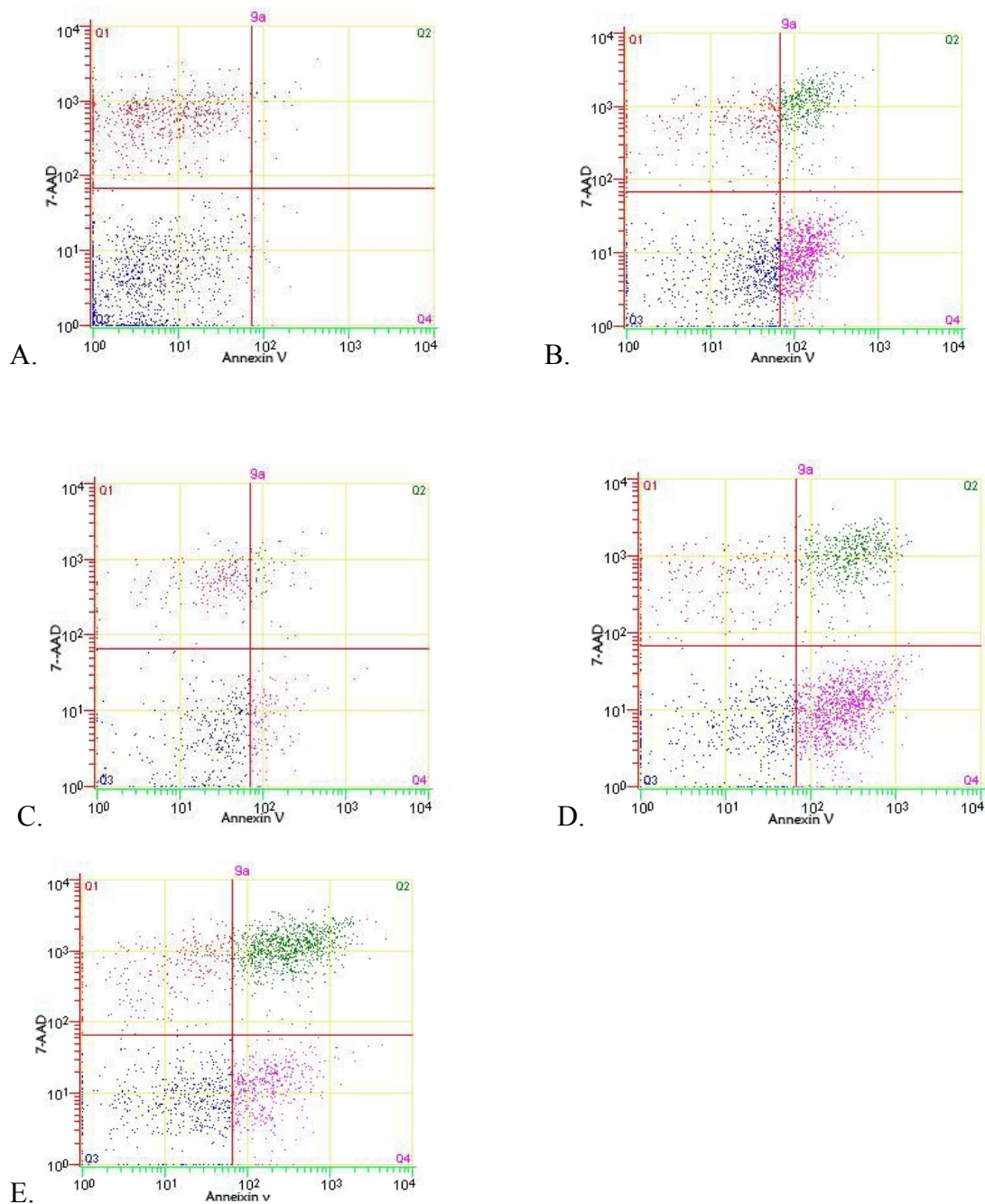
**Slika 22: Postopna izguba integritete membrane, ugotovljena z barvilom tripan modro (Slika prikazuje živo celico A z intaktno membrano, ki izključi barvilo. Zanimiva je celica B, pri kateri izključitev barvila ni več tako očitna kot pri A. Pri C in D je obarvana citoplazma že jasno vidna. Lahko bi sklepali, da izkazujejo celice B, C in D porušeno integriteto membrane. Takšen zaključek pomeni nekrotičen proces v celicah, zato ker apoptoza ne more biti tako hitra in zato, ker za apoptozo porušena integriteta membrane ni značilna. Nikon ECLIPSE TS100. )**

### **4.3 METODA S FLUORESCENČNO OZNAČENIM PROTEINOM ANEKSIN V IN BARVILOM 7-AAD ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH IN NEKROTIČNIH CELIC S PRETOČNIM CITOMETROM**

Ugotavljali smo, kakšen je učinek melitina po 15 min, 30 min in 60 min na celice HUVEC v pritrjeni kulturi. Primerjali smo tudi učinek, ki ga ima melitin po 15 min, če so celice pritrjene oziroma če so v suspenziji. Zanimalo nas je število živih celic, celic v zgodnji in pozni apoptozi ter število mrtvih celic.

#### **4.3.1 Citogrami**

Slike 23 (A, B, C, D, E) predstavljajo porazdelitev živih celic, katere so aneksin V in 7-AAD negativne (Q3) in mrtvih celic, katere so aneksin V negativne ter 7-AAD pozitivne (Q1) ter celic v zgodnji apoptozi, katere so aneksin V pozitivne ter 7-AAD negativne (Q4) in pozni apoptozi, katere so aneksin V pozitivne ter 7-AAD pozitivne in so tudi mrtve celice (Q2). Ločitev med živimi in mrtvimi celicami omogoča barvilo 7-AAD, spremembe v zgodnji apoptozi pa označi aneksin V.

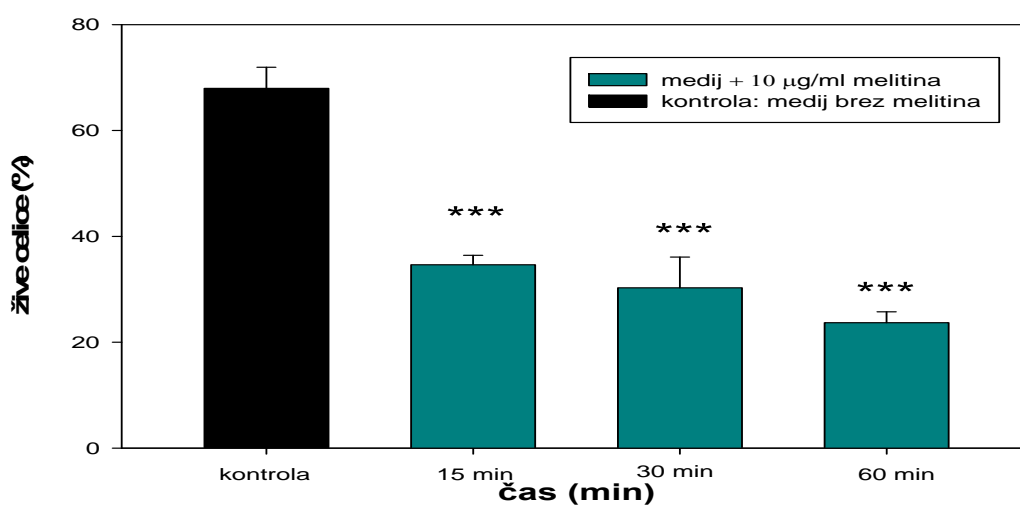


**Slika 23: Točkovni citogrami** (Le-ti s celicami HUVEC prikazujejo žive in mrtve celice ter celice v zgodnji in pozni apoptozi. Celice so bile barvane z aneksinom V-FITC in 7-AAD. Q3 so žive celice, ki so aneksin V-FITC in 7-AAD negativne. Q1 so mrtve celice, ki so Aneksin V-FITC negativne in 7-AAD pozitivne. Q4 so celice v zgodnji apoptozi, ki so aneksin V-FITC pozitivne in 7-AAD negativne. Q2 so celice v pozni apoptozi, ki so aneksin V-FITC in 7-AAD pozitivne. (A) kontrola (pritrjena celična kultura, ki ni bila izpostavljena melitinu); (B) pritrjena celična kultura izpostavljena mediju z 10  $\mu$ g/ml melitina za 15 min; (C) celična kultura v suspenziji in izpostavljena mediju z 10  $\mu$ g/ml melitina za 15 min; (D) pritrjena celična kultura izpostavljena mediju z 10  $\mu$ g/ml melitina za 30 min; (E) pritrjena celična kultura izpostavljena mediju z 10  $\mu$ g/ml melitina za 60 min.)

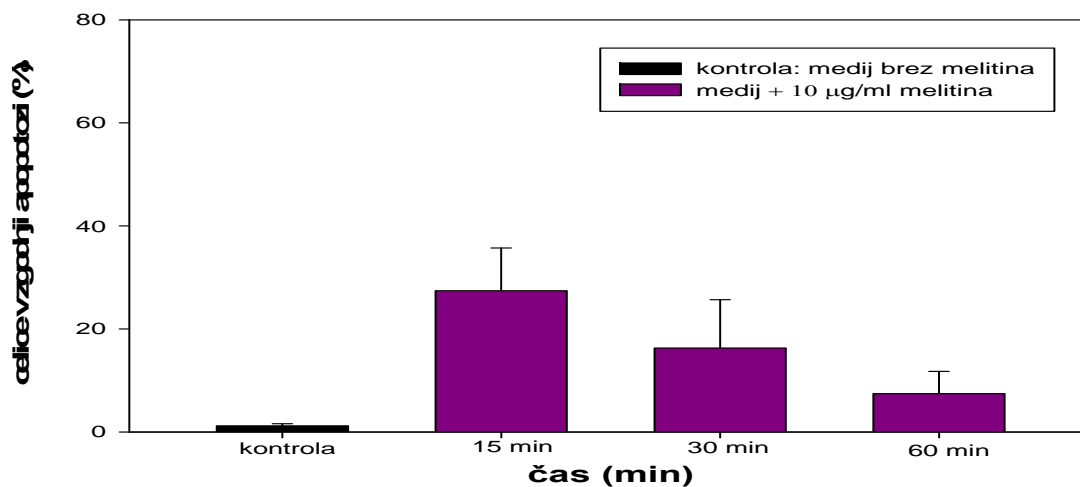


### **4.3.2 Časovna odvisnost odzivnosti adherentnih celic na učinek melitina**

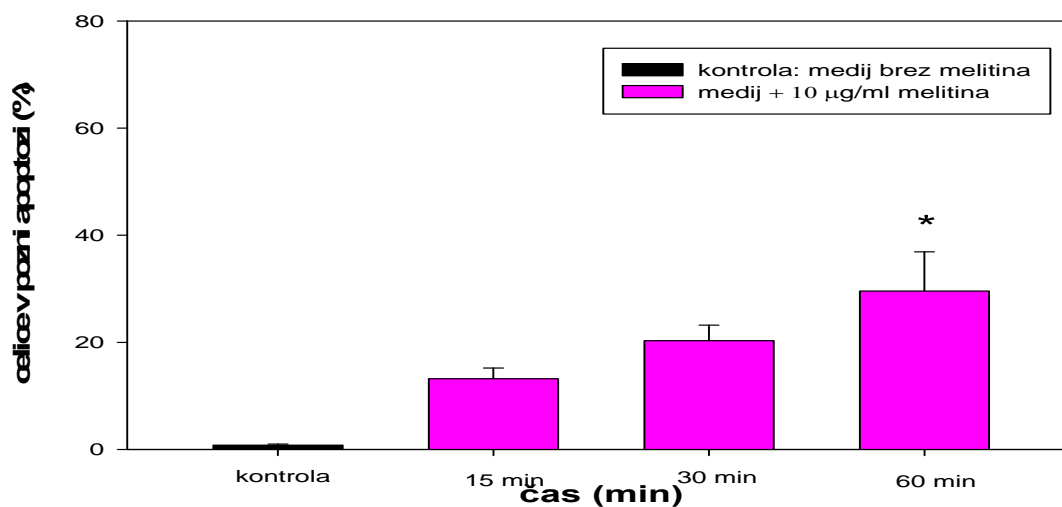
Ugotovili smo, da melitin pri vseh časih (15 min, 30 min in 60 min) statistično značilno zmanjša število živih celic HUVEC v pritrjeni kulturi (slika 24), medtem ko se število celic v pozni apoptozi statistično značilno poveča šele po 60 min (slika 26). Število celic v zgodnji apoptozi se sicer poveča, vendar povečanje ni statistično značilno (slika 25). Melitin nima učinka na število mrtvih celic v primerjavi s kontrolo (slika 27).



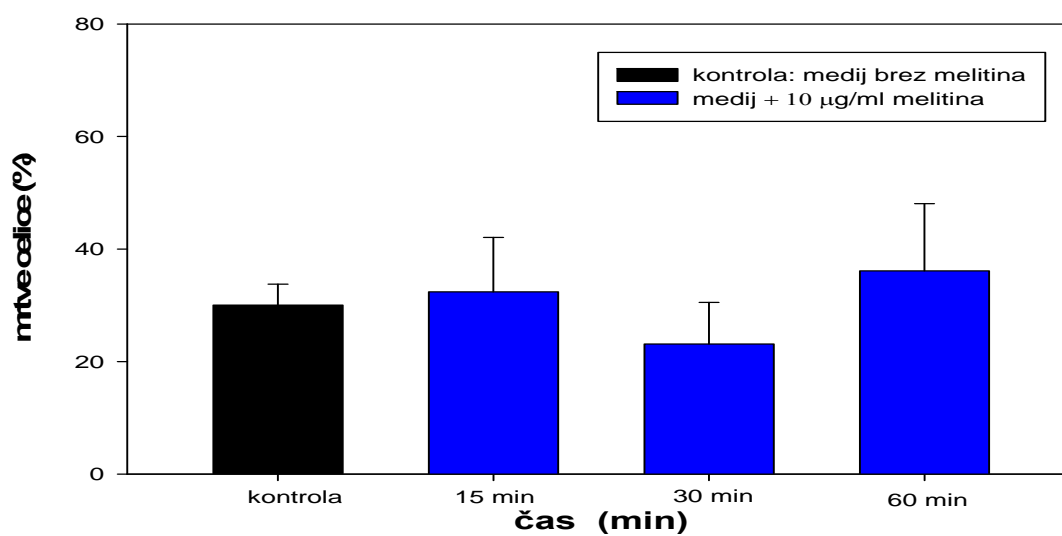
**Slika 24: Časovna odvisnost učinka melitina na delež živih celic HUVEC v pritrjeni kulturi** (Pitrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3). \*\*\*p < 0.001 v primerjavi s kontrolo.)



Slika 25: Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v zgodnji apoptozi v pritrjeni kulturi (Pritrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3).)



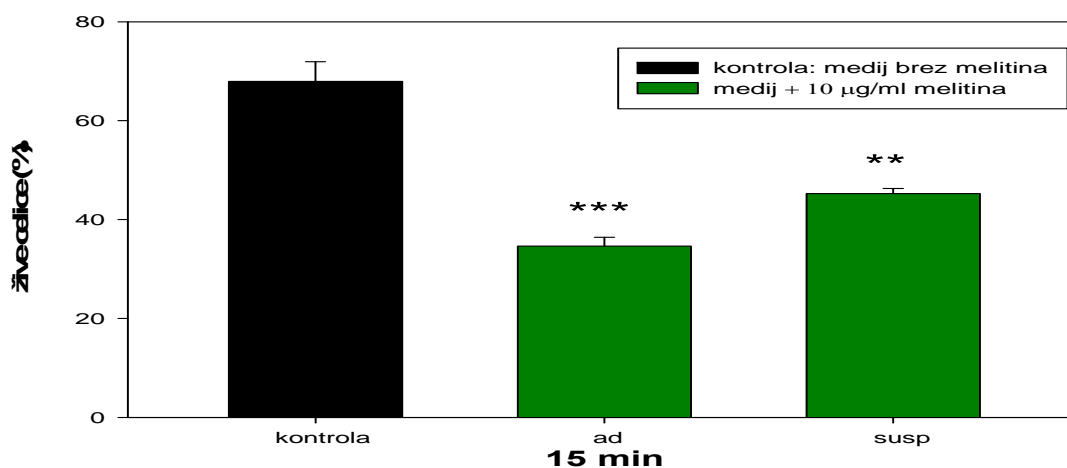
Slika 26: Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v pozni apoptozi v pritrjeni kulturi (Pritrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3). \*p < 0,05 v primerjavi s kontrolo po 60 min izpostavljenosti celic melitinu.)



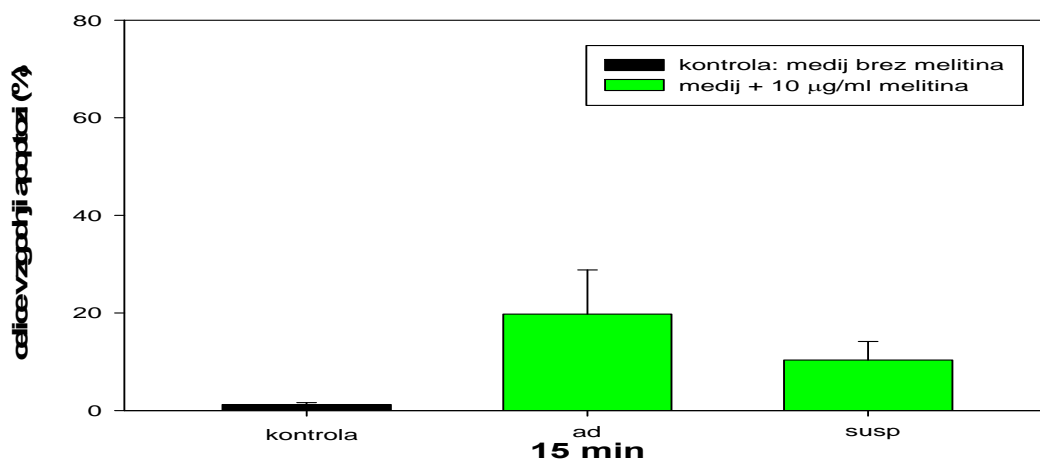
Slika 27: Časovna odvisnost učinka melitina na delež mrtvih celic HUVEC v pritrjeni kulturi (Pritrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3).)

### **4.3.3 Odzivnost adherentnih celic (ad) in celic v suspenziji (susp) po 15 min reakciji z melitinom**

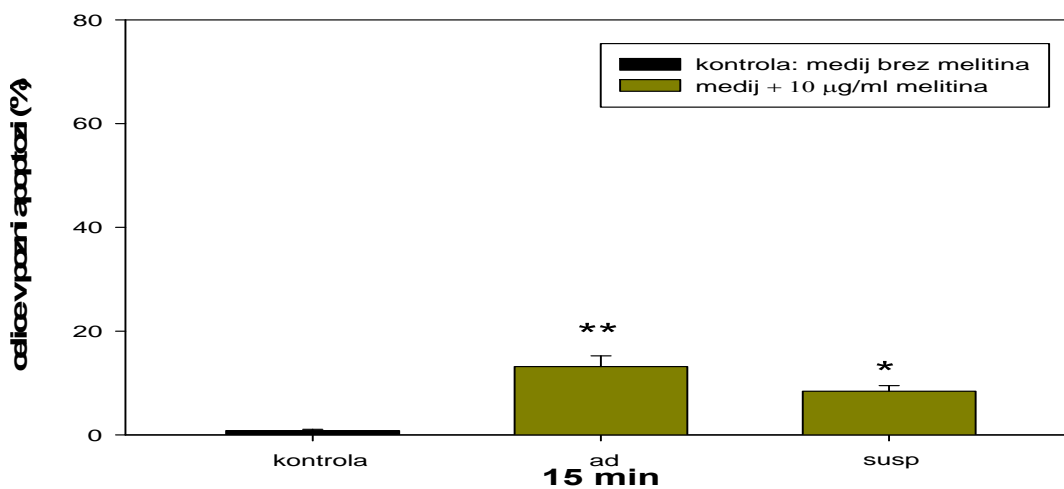
Ugotovili smo razliko med odzivnostjo adherentnih celic in celic v suspenziji. Melitin statistično značilno zmanjša število živih celic v obeh vzorcih celic. Upad števila živih celic je pri adherentnih celicah večji kot pri celicah v suspenziji (slika 28). Statistično značilno se poveča število celic v pozni apoptozi, ki je pri adherentnih celicah višje (slika 30). Porast celic v zgodnji apoptozi ni statistično značilen, čeprav so tudi tu, tako kot pri celicah v pozni apoptozi, adherentne celice bolj občutljive na apoptotične spremembe (slika 29). Melitin nima učinka na število mrtvih celic v primerjavi s kontrolo (slika 31).



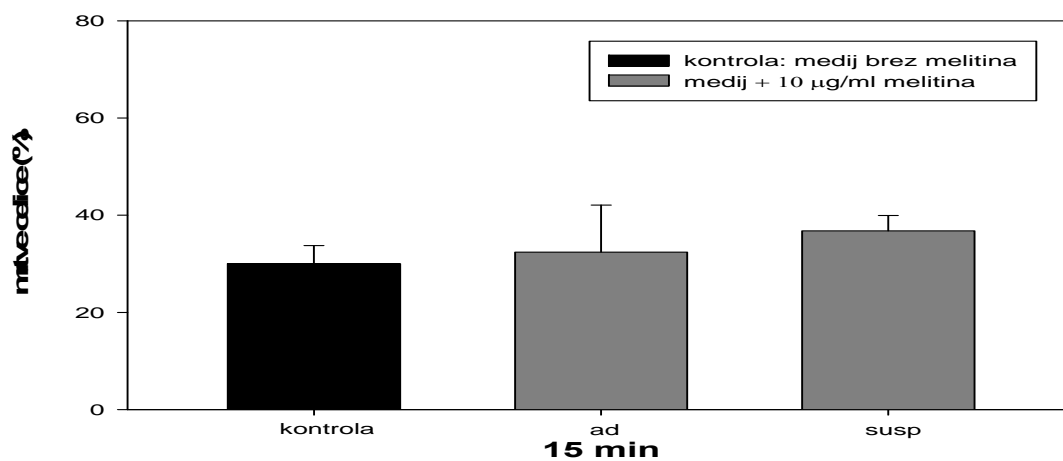
**Slika 28: Časovna odvisnost učinka melitina na delež živih celic HUVEC v pritrjeni celični kulturi (ad) in kulturi v suspenziji (susp)** (Pritrjeno celično kulturo in kulturo v suspenziji smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3). \*\*\* $p < 0.001$  pri pritrjeni celični kulturi in \*\* $p < 0.01$  pri kulturi v suspenziji v primerjavi s kontrolo.)



Slika 29: Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v zgodnji apoptozi v pritrjeni celični (ad) kulturi in kulturi v suspenziji (susp) (Pritrjeno celično kulturo in kulturo v suspenziji smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3).)



Slika 30: Časovna odvisnost učinka melitina na delež celic HUVEC v pozni apoptozi v pritrjeni celični (ad) kulturi in kulturi v suspenziji (susp) (Pritrjeno celično kulturo in kulturo v suspenziji smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3). \*\* $p < 0.01$  pri pritrjeni celični kulturi in \* $p < 0.05$  pri kulturi v suspenziji v primerjavi s kontrolo.)

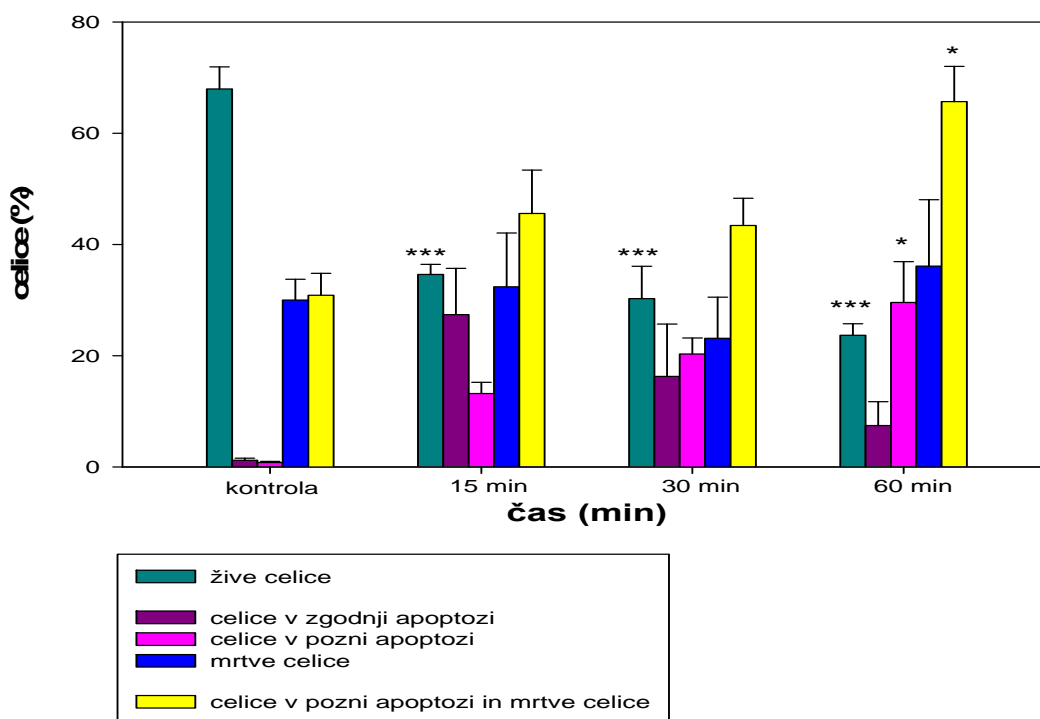


Slika 31: Časovna odvisnost učinka melitina na delež mrtvih celic HUVEC v pritrjeni celični kulturi (ad) in kulturi v suspenziji (susp) (Pritrjeno celično kulturo in kulturo v suspenziji smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3).)

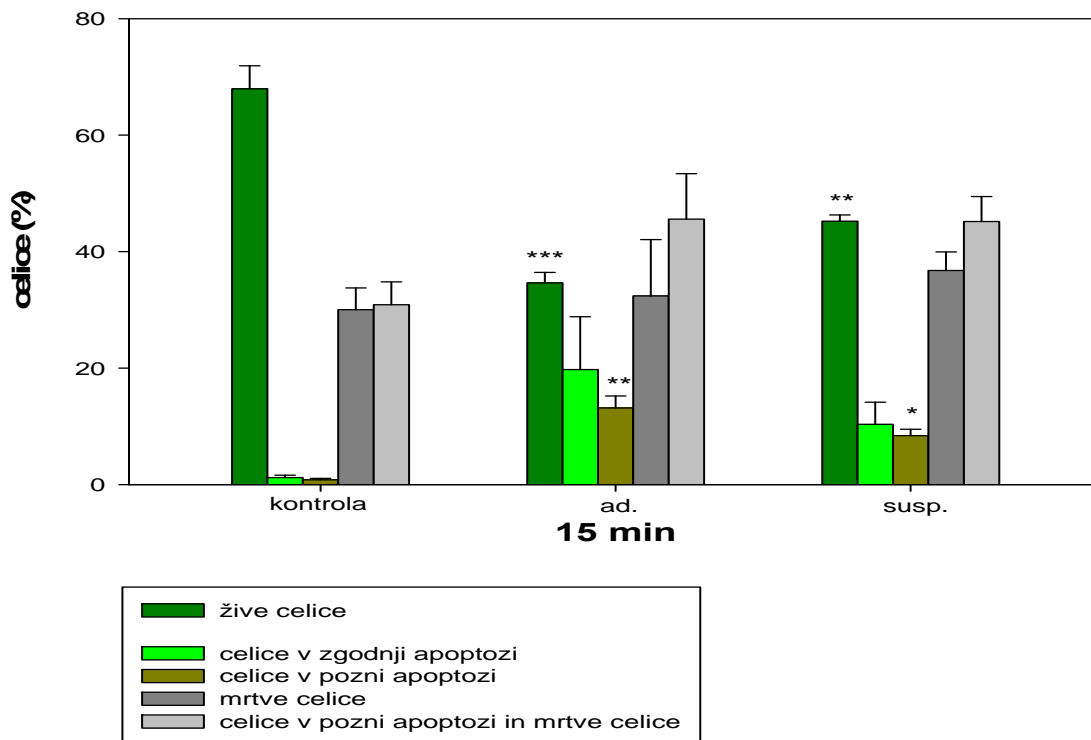
#### **4.3.4 Združene posamezne faze pritrjenih celic v različnih časovnih intervalih in faze pri primerjavi med pritrjenimi celicami in celicami v suspenziji po delovanju melitina**

Združili smo posamezne faze pritrjenih celic pri časovnih intervalih 15 min, 30 min in 60 min (slika 32). K stolpcem, ki predstavljajo žive celice, zgodnjo in pozno apoptozo ter mrtve celice, smo dodali stolpec, ki predstavlja vsoto mrtvih in celic v pozni apoptozi, saj lahko slednje prištevamo k mrtvim celicam. Statistično značilnost izkazuje število živih celic, celice v pozni apoptozi po 60 min in seštevek mrtvih celic in celic v pozni apoptozi po 60 min.

Tudi posamezne faze pri primerjavi odzivnosti med adherentnimi celicami in celicami v suspenziji smo združili (slika 33). Posebej smo sešteli mrtve celice in celice v pozni apoptozi. Statistično značilno je število živih celic in celic v pozni apoptozi v obeh vzorcih.



**Slika 32:** Časovna odvisnost učinka melitina na žive celice, celice v zgodnji in pozni apoptozi ter na mrtve celice v pritrjeni kulturi (Posebej so seštete tudi mrtve celice in celice v pozni apoptozi. Pritrjeno celično kulturo smo izpostavili mediju z 10 µg/ml dodanega melitina pri 37 °C. Stolpci so prikazani kot srednja vrednost ± SEM (n = 3). \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  v primerjavi s kotrolo.)

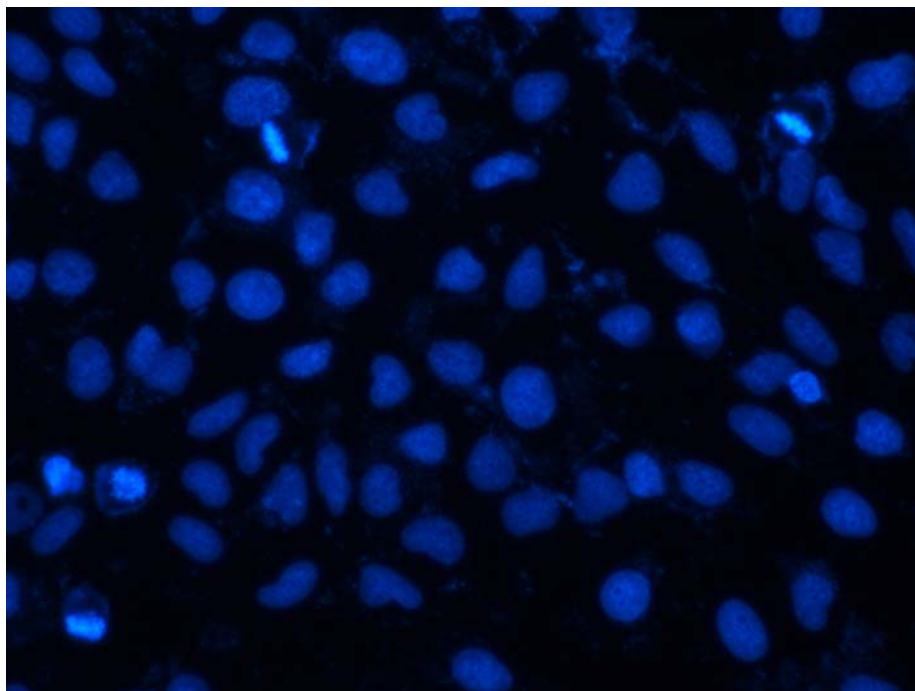


**Slika 33: Časovna odvisnost učinka melitina na žive celice, celice v zgodnji in pozni apoptozi ter na mrtve celice v pritrjeni kulturi in kulturi v suspenziji** (Posebaj so seštete tudi mrtve celice in celice v pozni apoptozi. Pritrjeno celično kulturo in kulturo v suspenziji smo izpostavili mediju z 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dodanega melitina pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Stolpci so prikazani kot srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  v primerjavi s kontrolo.)

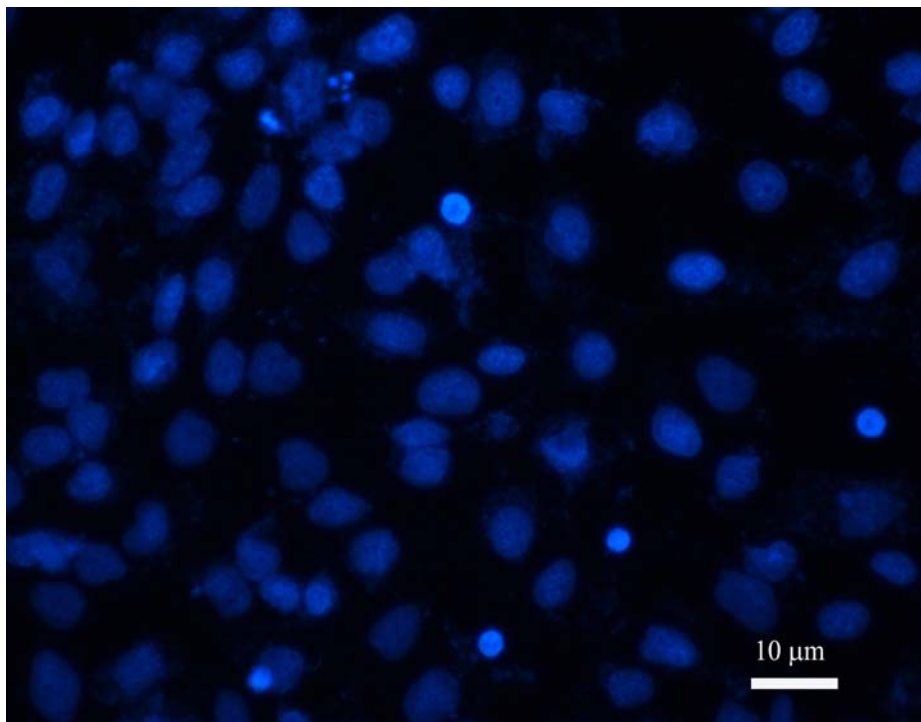


#### **4.4 METODA Z BARVILOM DAPI ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH CELIC S POMOČJO FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE**

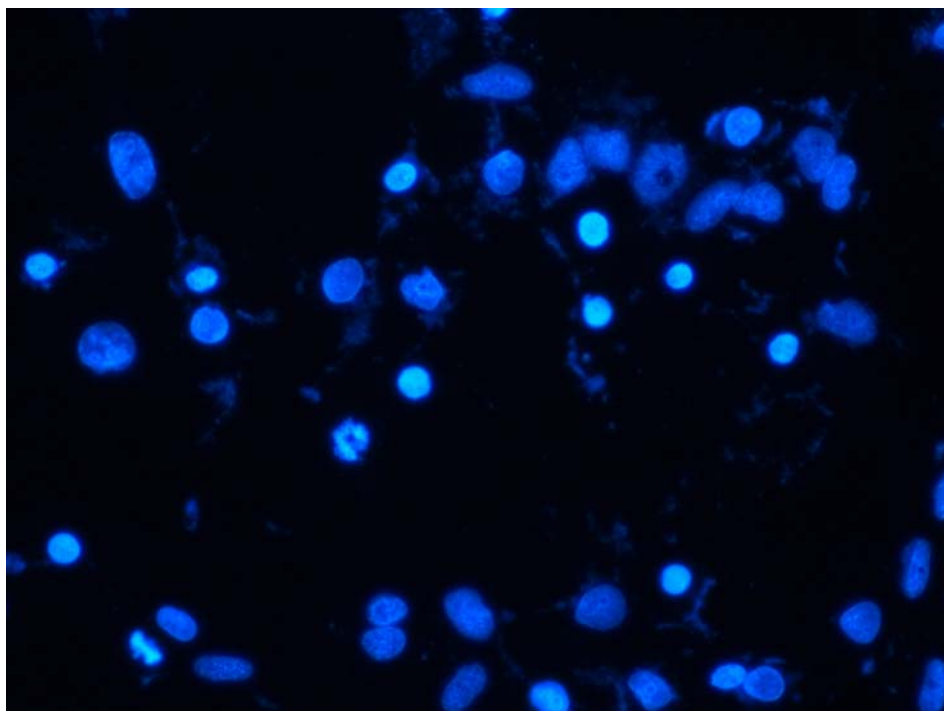
Viden je očiten odnos med koncentracijo melitina in velikostjo učinka. Pri koncentracijah 2  $\mu\text{g/ml}$  in 5  $\mu\text{g/ml}$  je fragmentacija jeder šibka, vendar je fluorescenca pri fragmentiranih jedrih jasno vidna. Pri 10  $\mu\text{g/ml}$  je viden močan porast fluorescence. Veliko število celic je propadlo ali se je odluščilo.



**Slika 34: Celice, ki smo jih izpostavili 30 min delovanju raztopine melitina s koncentracijo 2  $\mu\text{g/ml}$  in jih barvali z barvilom DAPI (Nikon, Eclipse 300)**



**Slika 35:** Celice, ki smo jih izpostavili 30 min delovanju raztopine melitina s koncentracijo 5  $\mu\text{g/ml}$  in jih barvali z barvilom DAPI (Nikon, Eclipse 300)



**Slika 36:** Celice, ki smo jih izpostavili 30 min delovanju raztopine melitina s koncentracijo 10  $\mu\text{g/ml}$  in jih barvali z barvilom DAPI (Nikon, Eclipse 300)

## 5 RAZPRAVLJANJE

V naši raziskavi nas je zanimal citotoksični učinek melitina na endotelijske celice. Naši rezultati nedvomno nakazujejo na citotoksični učinek, ki je bil viden s spremljanjem morfoloških sprememb pod mikroskopom, z barvanjem z barvili DAPI, tripan modrim, aneksinom V in 7-AAD.

### 5.1 REZULTATI VREDNOTENJA UČINKA MELITINA Z MIKROSKOPOM

Koncentracijo raztopine melitina 10  $\mu\text{g/ml}$  smo izbrali na podlagi predhodnih poročil, ki povezujejo podobne koncentracije s poškodbo celičnih membran drugih vrst celic (3), in na podlagi raziskav na izolirani žili prašiča in podgane, kjer naj bi bil razlog za prehod iz relaksacije v kontrakcijo poškodba endotelija (5, 6). Sami smo s pomočjo mikroskopa predhodno spremljali učinke 15  $\mu\text{g/ml}$  in 35  $\mu\text{g/ml}$  melitina na HUVEC, a je bila liza celic v teh primerih prehitra in premočna za podrobnejše raziskavo propada celice.

Eksperimentalni del, kjer smo preučevali, kako različni dejavniki vplivajo na učinek melitina na HUVEC, je pokazal hiter učinek. Najhitrejši učinek, ki smo ga pod mikroskopom opazili pri koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  melitina, je bil viden že po 3 min. V poskusih, kjer so spremljali učinek čebeljega strupa na membrano eritrocitov, so ugotovili sproščanje hemoglobina že v 4 min po dodatku strupa pri koncentracijah, ki so bile višje in tudi nižje kot 10  $\mu\text{g/ml}$  melitina (3). V poskusih, kjer so uporabili fibroblastom podobne sinovците in barvilo kalcein, so v 15 min in 60 min dokazali upad barvila v celicah in s tem poškodbo membrane. Uporabili so koncentracije čebeljega strupa 10  $\mu\text{g/ml}$  (ustreza 5  $\mu\text{g/ml}$  melitina) in tudi nižje (3). V raziskavah, ki so jih izvedli na izolirani žili prašiča in podgane, pa so bili učinki melitina takojšnji (5, 6).

Rezultati, ki smo jih dobili v prvem delu naših poskusov, nakazujejo na možno skladnost s predhodnimi poskusi na izolirani prašičji arteriji. Pri teh študijah je pri 5  $\mu\text{g/ml}$  začela prehodna relaksacija upadati, kontrakcija pa se je pojavila pri 7  $\mu\text{g/ml}$  in se močno povečala pri 10  $\mu\text{g/ml}$ . Raztopina melitina s koncentracijo 10  $\mu\text{g/ml}$  je, tudi pri barvanju celične linije HUVEC z barvilom DAPI v primerjavi s koncentracijo 2  $\mu\text{g/ml}$  in 5  $\mu\text{g/ml}$ , povzročila najmočnejšo fluorescenco fragmentiranih jeder.

V kolikor se koncentracije raztopine melitina v posameznih poskusih skladajo in rezultati nakazujejo na direkten toksičen učinek na endotelijske celice, je vprašanje časovnega intervala posameznih dogodkov še vedno odprto. Odgovor, za razlike v časovnem odzivu tkiva in celic na melitin, bi lahko bil v komunikaciji med različnimi sloji celic v plasti žile in tvorbi signalnih molekul, ki potujejo med poškodovanimi endotelijskimi celicami in drugimi celicami globlje v tkivu (gladkomišičnimi celicami). V celični kulturi, ki je enakomerno izpostavljena vplivom melitina, pa signali, ki bi sicer potovali naprej, izzvenijo in tako lahko opazujemo direkten učinek melitina na samo celico.

Morfološke spremembe celic, ki smo jih spremljali pod mikroskopom, kažejo na nekrozo in apoptozo, saj je vakuolizacija v citoplazmi značilna za nekrozo, prehod celice v okroglo obliko, ker niso več pritrjene, pa naj bi bil značilen za apoptozo, tako kot je tudi krčenje celic (33). Nekateri tudi prehod celice v okroglo obliko opisujejo kot nekrotično spremembo (19). Mogoče je v tem primeru prehod v okroglo obliko mišljen kot nabrekanje celice, kar je značilno za nekrozo.

Ob opazovanju učinka melitina na celice pod mikroskopom smo ugotovili, da ima raztopina melitina enakomeren učinek po celotni kulturi. To pomeni, da so vakuolizacija, preoblikovanje celic v kroglasto obliko in druge spremembe nastajale enakomerno po celotni petrijevki. Opazili smo razliko pri redčenju celic na konfluentno in nekonfluentno poseljenih območjih. Redčenje je bilo izrazitejše na redko poseljenih predelih, možna razlaga zato bi lahko bila v značilnosti endotelijskih celic, da rastejo v tesnem stiku med sabo. Tako bi bilo možno, da melitin pri celicah, ki niso imele tesnih stikov, deluje na večji celični površini.

Ugotovili smo tudi padeč učinka melitina glede na starost raztopine. Sveže pripravljena raztopina in raztopina, stara en dan do dva dneva, so imele primerljiv učinek na celice, nato pa je le-ta začel upadati. Raztopino melitina za kasnejšo uporabo smo hranili v plastičnih vsebnikih. Proteini se lahko adsorbirajo na stene plastičnih vsebnikov, zaradi česar lahko pade koncentracija proteina v raztopini. Plastični materiali vsebujejo aditive (mehčalci, stabilizatorji ...), ki se lahko odpuščajo v raztopino (34). Čeprav so to možni vzroki za spremembo lastnosti proteina v plastičnih vsebnikih, je malo verjetno, da je do upada učinkovitosti melitina prišlo zaradi vsebnika, saj raztopina melitina v njem ni bila dolgo shranjena. Verjetneje je, da je večkratno segrevanje in ohlajanje raztopine vplivalo na

spremembo hidrofobnih in elektrostatskih interakcij v strukturi peptida. To bi lahko vplivalo na konformacijo peptida in na njegovo citotoksičnost (2).

## **5.2 ŠTETJE CELIC Z NEUBAUMANOVO KOMORO IN DOLOČANJE CELIČNE VIABILNOSTI Z BARVILOM TRIPAN MODRO**

Po 15 min, 30 min in 60 min delovanju melitina na celično kulturo je štetje celic v Neubaumanovi komori pokazalo statistično značilen upad števila živih celic v primerjavi s kontrolo. Tako hitremu upadu celic je vzrok liza celic. To, da je potekala tako hitro, bi lahko bil znak nekroze, ki je hiter proces. Primerjava upada deleža živih celic pri adherentni kulturi in kulturi v suspenziji, v primerjavi s kontrolo, je pokazala statistično značilen padec samo pri adherentni kulturi. Primerjava upada deleža živih celic, med adherentno kulturo in kulturo v suspenziji, ni pokazala statistično značilnih razlik. Eden od razlogov je slaba ponovljivost poskusa. Ob primerjavi števila celic pri posameznih poskusih pa je razlika med kulturama celic jasno vidna in velika. Upad deleža živih celic pri adherentni kulturi je bil približno dvakrat večji kot pri celicah v suspenziji. Domnevali smo, da s postopkom priprave vzorcev, pri adherentnih celicah, poškodbo celic še stopnjujemo in povzročimo še hitrejšo lizo celice. Razlog za tako hiter propad celic je verjetno nekroza. Zanj je značilno, da se lahko razvije v sekundah, medtem ko je apoptoza vprašanje ur ali dni, kar je odvisno od iniciatorja (33). V prid nekroze govorijo tudi rezultati barvanja celic v suspenziji. Z barvilom tripan modrim so se obarvale modro in ohranile obliko. Žive celice, ki imajo intaktno membrano, tripan modro barvilo izključijo. Barvilo prehaja v celico le, če je membrana poškodovana. Pri celicah, ki so bile adherentne, takšnega obarvanja nismo zasledili, ker so verjetno takšne celice že v pripravi vzorcev razpadle.

Zanimiva je študija, kjer so dokazali, da so celice v zgodnji apoptozi občutljivejše na nekrozo, povzročeno s kompleksom komplementa, ki napade membrano (MAC) in s proteini, ki tvorijo pore, med katerimi je bil tudi melitin (35). Tako bi lahko bilo tudi možno, da smo s pripravo vzorcev pospešili nekrozo celic v zgodnji apoptozi, za katero je značilno, da lahko nastopi tudi zaradi mehanskega vzroka. V našem primeru lahko mehanski vzrok predstavlja centrifugiranje, mešanje s pipeto, nenazadnje pa bi lahko hitrejši proces smrti izzvali tudi s tripsinizacijo.

### **5.3 DOLOČANJE APOPTOTIČNIH IN NEKROTIČNIH SPREMEMB S PRETOČNIM CITOMETROM Z UPORABO FLUORESCENČNO OZNAČENEGA PROTEINA ANEKSIN V IN Z BARVILOM 7-AAD**

Prehod fosfatidil serina (PS) na zunanjo stran lipidnega dvosloja je značilen za zgodnjo fazo apoptoze in se pojavi po segmentaciji jedra. S specifičnim barvilom aneksin V smo dokazali prisotnost določenega deleža endotelijskih celic v zgodnji apoptozi po 15 min, 30 min in 60 min inkubaciji celic z raztopino melitina s koncentracijo 10 µg/ml. Največji delež je bil po 15 min in je s časom upadal. Povečanje deleža celic v zgodnji apoptozi pa ni bilo statistično značilno. Procent celic v pozni fazi apoptoze v naši raziskavi narašča, statistično značilna je samo razlika pri 60 min. Zgodnja apoptoza ni signifikantna zaradi variabilnosti med eksperimenti. Možna razlaga za to je dejstvo, da je lahko odziv celic na apoptotični iniciator časovno zelo različen. Zgodi se lahko, da celice iste kulture vstopajo v proces apoptoze ob različnih časih in tudi trajanje faz apoptoze je lahko različno dolgo (33).

Naši rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik pri procentu mrtvih celic. Glede na to, da je apoptoza počasnejši proces, takšni rezultati kažejo na izrazitejši prehod živih celic v faze apoptoze kot v odmiranje.

Ugotovili smo tudi statistično značilen upad živih celic, ki se veča s časom. Čeprav je upad celic pri vseh časovnih intervalih v primerjavi s kontrolo izrazit, pa med posameznimi intervali (od 15 min do 60 min) ni več velike razlike. Tako velik upad živih celic v primerjavi s kontrolo kaže na proces lize oziroma nekroze celice. Vzrok za počasnejši upad živih celic med posameznimi časovnimi intervali je lahko izrazitejše dogajanje apoptotičnih procesov.

Drugačna razlaga rezultatov bi lahko bila podana na podlagi upada deleža celic v zgodnji apoptozi (od 15 min do 60 min) in naraščanja deleža celic v pozni apoptozi. Nenavadno je, da je lahko celica v pozni apoptozi že po 15 min. Takši rezultati lahko kažejo, da ob apoptozi vzporedno poteka tudi nekroza. V pozni apoptozi je celica aneksin V in 7-AAD pozitivna, slednji pa prehaja v celico, ko je integriteta membrane že porušena. Zanimivo je tudi, da lahko aneksin V, ob poškodovani integriteti membrane, prehaja v celico in se na PS veže tudi iz notranje strani membrane (33).

Čeprav je pri primerjavi med pritrjeno kulturo in kulturo v suspenziji pojav zgodnje in pozne apoptoze močnejše izražen pri pritrjenih celicah, je statistično značilen samo pojav

pozne apoptoze. Glede na močnejši upad števila živih celic pri adherentni kulturi, je visok procent mrtvih celic pri kulturi v suspenziji nenavaden. Manjši delež živih in mrtvih celic ter višji delež apoptotičnih sprememb pri adherentnih celicah si lahko razlagamo tako, da smo s postopkom priprave vzorcev (tripsinizacije in centrifugiranje) celicam z izgubljeno integriteto membrane pospešili propad in je ostal le debri, na katerega pa se 7-AAD ne veže. Tako so v našem vzorcu ostale celice v manjšem številu, ampak z ohranjeno integriteto membrane in v procesu apoptoze. V vzorcu suspenzije pa so celice, ki izkazujejo apoptotične in nekrotične spremembe. V tem primeru se lahko 7-AAD veže na večji procent celic, saj so v tem vzorcu tudi nekrotične celice, ki bi jih drugače tekom postopka priprave vzorcev odstranili. Tako lahko razložimo višji procent mrtvih celic pri celicah v suspenziji. Takšen sklep potrjuje tudi barvanje celic v suspenziji s tripanskim modrilom.

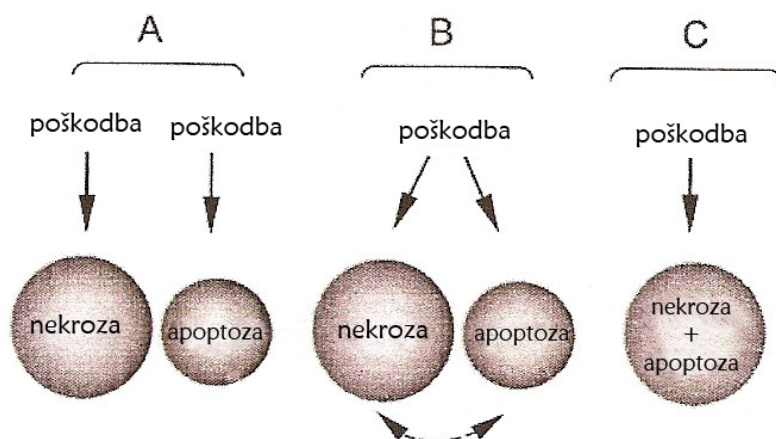
#### **5.4 BARVANJE Z BARVILOM DAPI ZA DOLOČANJE APOPTOTIČNIH CELIC S POMOČJO FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE**

S tvorbo por melitin moti integriteto membrane in vodi v porušeno ionsko homeostazo celice, v micelinizacijo in fuzijo membrane. Ali melitin na koncu vodi samo v apoptozo ali samo v nekrozo, je težko razjasniti. Pri določevanju apoptotičnih celic je proces apoptoze smiselno najprej vizualizirati. Segmentacija jedra je ena izmed zgodnejših stopenj v procesu apoptoze in pomeni spremembo okrogle oblike jedra v manjše, kompaktne, homogene mase kromatina različnih velikosti. Ta sprememba se dogaja v fazi zgodnje apoptoze, navadno hitro po nabrekanju membrane (33). To značilno spremembo v apoptozi smo dokazali z barvilom DAPI po 30 min inkubaciji celic z melitinom. Barvanje je pri koncentracijah raztopine melitina 2  $\mu\text{g/ml}$  in 5  $\mu\text{g/ml}$  pokazalo manj izrazito fluorescenco, medtem ko je bila fluorescenca pri 10  $\mu\text{g/ml}$  dosti izrazitejša. Pri nekrozi se segmentacija jedra ne pojavlja.

Z rezultati, ki smo jih dobili, ne moremo z gotovostjo izključiti niti nekroze niti apoptoze. Apoptoze ne moremo izključiti zato, ker smo z barvilom DAPI pri treh različnih koncentracijah dokazali segmentacijo jedra, ki je specifična za zgodnjo apoptozo. Dokazali smo tudi izpostavitvev PS, ki je tudi značilen za zgodnjo apoptozo. Po drugi strani pa ne moremo izključiti nekroze. Nanjo kažejo predvsem tipične morfološke značilnosti (vakuolizacija citoplazme), ki smo jih spremljali z mikroskopom, in barvanje celic v

suspenziji s tripanskim modrilom. Tudi štetje celic, ki smo ga izvedli v Neubaumanovi komori je pokazalo zelo močan upad celic, ki s časom narašča. Močan upad živih celic je razviden tudi iz meritev s citometrom. Tako hiter proces za apoptozo ni značilen, za nekrozo pa je. Če upoštevamo možnost, da smo med pripravo vzorcev celice tako močno poškodovali, se je potrebno vprašati, če bi bilo bolje celoten eksperiment izvesti s celicami v suspenzijah.

Nekateri so mnenja, da lahko nekateri induktorji celične smrti pri nižjih koncentracijah izzovejo apoptozo, pri višjih pa nekrozo (35, 19). Glede na to, da smo rahlo segmentacijo jedra dokazali že pri 2  $\mu\text{g/ml}$  in 5  $\mu\text{g/ml}$ , bi lahko bil učinek 5-krat in 2-krat večje koncentracije melitina tako močan, da bi lahko vodil tudi v nekrozo. Možno je tudi, da se naši rezultati ujemajo s poročili o večji občutljivosti na nekrozo pri celicah v zgodnji fazi apoptoze. Rezultati, ki ne izključujejo niti apoptoze niti nekroze, niso nujno napačni, saj sta lahko prisotna oba procesa. Čeprav sta apoptoza in nekroza dva različna in samostojna procesa, ki imata vsak svoje značilnosti, se pogosto pojavljajo poročila, da je celica v procesu celične smrti izkazovala značilnosti obeh procesov. Nekatera poročila navajajo zaporedno pojavnost procesov (18, 35), spet druga pa vzporedno pojavnost (18, 19).



**Slika 37: Tri možne poti celične smrti z apoptozo in nekrozo** (A-model predstavlja klasičen potek apoptoze in nekroze, kjer sta procesa prožena z različnimi poškodbami, potekata samostojno in izkazujeta karakteristične morfološke spremembe. B-model predstavlja proces, kjer lahko ena poškodba v celicah sproži apoptozo ali nekrozo. Pri tem se dopušča možnost, da lahko prehaja en proces v drugega. C-model predstavlja proces, kjer poškodba v eni celici sproži apoptozo in nekrozo; v takšnih celicah se izražajo karakteristike obeh procesov.), vir: prirejeno po (18)

Študije z melitinom so pokazale, da lahko v različnih celicah povzroči nekrozo (30, 31) ali apoptozo (23, 24, 25, 26, 27, 29). Obstajajo pa tudi rezultati raziskav, kjer celična smrt



izkazuje vmesno stopnjo med nekrozo in apoptozo. Zanimiv je primer, kjer so pri človeških melanomskih celicah dokazali segmentacijo jedra, nastanek fragmentov DNK in sproščanje mitohondrijskih proteinov (Endo G, AIF), ki so vsi značilni za apoptozo, z inhibitorji kaspaz pa niso uspeli preprečiti celične smrti (23). V raziskavi, kjer so preučevali povezavo med nekrozo in apoptozo, so skušali dokazati, da je proapoptotični protein Bid vključen v nekrozo celic, ki jo inducira MAC. Ker obstajajo poročila, da melitin deluje podobno na celico kot MAC, so ga uporabili tudi pri indukciji nekrotične smrti. Aktiven MAC inducira prehajanje  $\text{Ca}^{2+}$  v celico, poškoduje mitohondrij in izčrpa produkcijo ATP, kar vse skupaj vodi v lizo nekrotičnega tipa. Z različnimi celicami, kjer so utišali proapoptotični protein Bid, so dokazali, da so te celice bolj odporne na nekrotično lizo s komplementom. Takšne celice so izkazovale tudi večjo odpornost na toksične učinke melitina. V celicah je do lize prihajalo v manjši meri. Domnevajo, da komplement, melitin in nekateri ionoforji na Bid vplivajo tako, da le-ta direktno napade intracelularne organele, jih poškoduje in povzroči sproščanje toksičnih komponent, ki prožijo nekrotičen tip celične smrti. Glede na rezultate so zaključili, da lahko melitin deluje po dveh poteh - po poti, ki je odvisna od kaspaz in aktivnosti proapoptotičnega proteina Bid, in po poti, ki je od Bid neodvisna (21).

Tudi naši rezultati kažejo na pojavnost obeh procesov. Ali potekata vzporedno ali prehajata drug v drugega, bi lahko bil predmet raziskav v prihodnosti. Možen pokazatelj za vzporeden potek procesov znotraj ene celice bi lahko bil sočasen obstoj vakuolizirane citoplazme in prehoda celic v kroglasto obliko ter krčenje celice. Na prehod iz apoptoze v nekrozo bi pa lahko sklepali na podlagi predhodnih poročil o senzitivaciji celic v zgodnji apoptozi do nekroze ali možnosti alternativne vloge proapoptotičnega proteina Bid, ki bi lahko vodil do preklopa med apoptozo in nekrozo. Vsekakor pa so naši rezultati pokazali citotoksični učinek melitina na celično linijo HUVEC oziroma na endotelijske celice.

## **5.5 VREDNOTENJE HIPOTEZE IN PREDLOGI IZBOLJŠAVE EKSPERIMENTALNIH POSTOPKOV**

Rezultati, ki smo jih predstavili, lahko potrdijo našo prvo hipotezo, da lahko relaksacija prehaja v kontrakcijo zaradi poškodbe endotelija. Zaradi razlike med časovnim odzivom celice in tkiva bi k uskladitvi med našimi rezultati in rezultati poskusov, izvedenih na izolirani koronarni arteriji prašiča, doprineslo tudi barvanje z barvilom DAPI v krajših časovnih intervalih. Zanimivi bi bili intervali, krajši od 30 min, predvsem 15 min, ali pa še krajši. Porast fluorescence barvila DAPI pri koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  v intervalu 15 min bi bilo v skladu tudi s poskusi določevanja PS, saj je zanj značilno, da se izpostavi na zunanjo stran membrane po segmentaciji jedra. Da bi dobili natančnejši vpogled v to, kaj se dogaja z žilo med prehodom iz relaksacije v kontrakcijo, bi bilo zanimivo preučiti učinek na endotelijske celice, ko začne relaksacija pri 5  $\mu\text{g/ml}$  popuščati in pri 7  $\mu\text{g/ml}$ , kjer začne kontrakcija naraščati.

Druge hipoteze, ki predpostavlja, da lahko melitin na HUVEC povzroči nekrozo ali apoptozo, ne moremo niti potrditi niti ovreči, saj rezultati nakazujejo na verjetno prisotnost obeh procesov. Z mikroskopom, ki smo ga pri delu uporabili, smo začetni pojav kroglaste strukture v celici opisali kot vakuolizacija. Če je ta pojav res vakuola, potem je to karakteristika, ki je značilna za nekrozo. Za nedvoumno določitev bi potrebovali zmogljivejši mikroskop, možna bi bila tudi uporaba metode »video time-lapse«, s katero lahko spremljamo celoten proces v celici. Tako bi bile tudi druge spremembe v nekrotični ali apoptotični celici boljše vidne in bi jih lažje vrednotili. Ena izmed tipičnih značilnosti apoptoze je tudi fragmentacija DNK in pojav apoptotičnih teles - določevanje le-teh bi bilo zanimivo, če bi celice inkubirali z melitinom dlje časa (več ur ali dni). Glede na to, da je bil pri naših eksperimentih čas inkubacije z melitinom kratek, je vprašanje, če bi bilo določevanje fragmentov DNK ali dokazovanje apoptotičnih teles smiselno, ker te faze nastopijo pozneje v apoptozi. Mogoče bi lahko s takšnimi eksperimenti vseeno razjasnili fazo apoptotičnih sprememb po izpostavitvi PS. Glede na to, da smo dokazali zgodnjo fazo apoptoze, bi bilo zanimivo ugotoviti, katere kaspaze so aktivne, in ali so prisotni kaspazni substrati, kot je PARP. Apoptotične spremembe se pokažejo tudi kot izguba mitohondrijskega potenciala. Membranski potencial lahko merimo s pozitivno nabitimi fluorescenčnimi barvili, ki se akumulirajo v mitohondriju zaradi negativnega naboja na notranji strani notranje membrane. Ob padcu mitohondrijskega membranskega potenciala

se zmanjša fluorescenca. Ne nazadnje so v eksperimentih, kjer so ugotavljali toksični učinek melitina, pogosto določevali spremembe v nivoju koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Sprememba v koncentraciji tega iona sicer ni značilna niti za apoptozo niti za nekrozo in jo povezujejo z obema procesoma. Mnogi raziskovalci so mnenja, da je dvig  $\text{Ca}^{2+}$  v celici velikega pomena v procesu celične smrti in tudi pri eksperimentih na izoliranih žilah rezultati kažejo, da je  $\text{Ca}^{2+}$  ključnega pomena pri prehodu tkiva v kontrakcijo.

Tretjo hipotezo lahko potrdimo. Ugotovili smo, da predvsem konfluentnost in starost raztopine melitina pomembno vplivajo na odzivnost celic. Vrsta plastike petrijevk in čas po pasaži sta manj pomembna dejavnika. Pri tipu plastike smo ugotovili, da je bil nastanek praznih površin pri tipu TPP pogostejši in da je bila površina navadno večja. Večinoma je bil tudi citotoksični učinek melitina na celice pri TPP bolj izražen - navadno takrat, ko je melitin izzval močno reakcijo. Najmanjši vpliv na odzivnost celic ima čas po pasaži. Takrat, ko je melitin izzval močno reakcijo, se razlike med časi po pasaži ni dalo ugotoviti. Spremembe smo opazili le takrat, ko delovanje melitina ni bilo močno.

## **5.6 MOŽNE RAZLAGE ŠKODLJIVIH UČINKOV PIKOV ČEBEL ZARADI TOKSIČNEGA UČINKA NA ENDOTELIJSKE CELICE (EC)**

Zanimivo je vprašanje, kako bi lahko endotelijske celice na delovanje melitina odreagirale *in vivo* in ali lahko nekatere posledice, ki so jih opisali ob pikih čebel, povežemo z učinkom melitina na endotelij.

Ena izmed funkcij EC v normalnem fiziološkem stanju je zagotavljanje gladke notranje stene žil, ki preprečuje tvorbo strdkov. Vnetne reakcije preprečuje z onemogočanjem vezave levkocitov in z izločanjem prostaciklinov. EC vzdržuje pretok krvi z reguliranjem izločanja vazokonstriktorjev in vazodilatatorjev. V aktivirano stanje prehajajo celice kot odgovor na vnetne mediatorje. Takšne celice spodbujajo koaguliranje z izražanjem tkivnega faktorja in inhibitorjem plazminogenskega aktivatorja 1. Aktivirane celice pospešujejo vnetne procese z izražanjem molekul, kot je E-selektin in interlevkin-1. V študiji, kjer so preučevali učinek MAC na endotelijske celice, so aktivacijo EC z MAC predstavili kot prototip aktivacije EC s transmembranskimi peptidi, ki tvorijo pore, med katerimi je bil v študijo vključen tudi melitin. Iz študije zaključujejo, da peptidi, ki tvorijo pore, vodijo v koagulacijo in vnetne reakcije preko povečanega izražanja IL-1 $\alpha$  in njegove avtokrine funkcije (povečana ekspresija tkivnega faktorja in ciklooksigenaze 2) na

endotelij, kar vodi v lokalizirano vnetje in koagulacijo. IL-1 $\alpha$  tudi zmanjša perfuzijo tkiva, zaradi večje ekspresije vazokonstriktorjev (tromboksana A<sub>2</sub> in endotelina-1). Tako se na mestu omejenega pretoka nivo IL-1 $\alpha$  še dodatno poveča. Zmanjšan pretok krvi zniža pH, kar aktivira heparinazo, ki odstranjuje heparinat-sulfat proteoglikane z EC in kar vodi v izgubo antikoagulatornih in protivnetnih funkcij ter v izgubo barierne funkcije EC (36). Rezultati raziskave, kjer so ugotavljali učinek hemoglobina in lipopolisaharida na HUVEC, so pokazali, da lahko prosti hemoglobin (Hb) poveča prokoagulatorne procese poškodovane celice. Endotelijske celice, ki so izpostavljene lipopolisaharidu, izkazujejo več protrombotičnih značilnosti, med katerimi je tudi povečano izražanje tkivnega faktorja, ki je še močneje izražen ob prisotnosti prostega Hb (37). Tako bi bilo možno, da lahko intravaskularna hemoliza, ki je ena izmed glavnih posledic toksične reakcije čebeljega strupa, še dodatno pripomore k morebitni poškodbi endotelija. Z nagnjenostjo poškodovanih endotelijskih celic k povečanemu izločanju prokoagulatornih snovi, bi se dalo razložiti sicer zelo redko pojavnost srčnih infarktov po pikih čebel. Seveda je potrebno upoštevati, da je takšnemu končnemu rezultatu vzrok predvsem obolenje kardiovaskularnega sistema, kjer so endotelijske celice že poškodovane, čebelji strup pa je eden izmed faktorjev tveganja. Ob tem je omembe vredno tudi dejstvo, da tudi zdravila, kot so  $\beta$ -blokatorji in inhibitorji angiotenzinske konvertaze, predstavljajo riziko za močnejšo anafilaktično reakcijo na čebelji strup (8).

V študijah so dokazali vpliv melitina in čebeljega strupa na kontraktilnost izoliranih žil. Predpostavlja se, da se preko endotelijskih celic pošiljajo signali gladkomišičnim celicam, kako naj se odzivajo. Najvišja koncentracija čebeljega strupa, ki je bila izmerjena v serumu je bila 3,8  $\mu\text{g/ml}$  po eni uri po napadu, kar bi bilo približno 1,9  $\mu\text{g/ml}$  melitina. Pri tej koncentraciji v eksperimentih *in vitro* do kontrakcije žile še ni prišlo. Pri naših rezultatih z barvilom DAPI smo pri 2  $\mu\text{g/ml}$  melitina po 30 min ugotovili rahlo segmentacijo jeder. Če bi prenesli naš rezultat v sistem *in vivo*, bi lahko predpostavili, da je imela v plazmi izmerjena koncentracija strupa že šibak toksičen učinek na endotelijske celice, ki bi se lahko odzvala tako, da bi gladkomišični celici poslala signale za relaksacijo. Možno bi bilo, da lahko do pojava hipotenzije pri napadih čebel doprinese tudi poškodba endotelija zaradi melitina/čebeljega strupa.

Sklepamo lahko, da kardiovaskularna obolenja predstavljajo tveganje za močnejšo reakcijo na čebelji strup. Pri bolezenskih stanjih, kjer so endotelijske celice že poškodovane, lahko čebelji strup stanje še dodatno poslabša.

### **5.7 ALI BI LAHKO CITOTOKSIČNI UČINEK MELITINA NA ENDOTELIJSKE CELICE UPORABILI V TERAPEVTSKE NAMENE?**

V sredini osemdesetih let 20. stol. so prvič dokazali inhibitorni učinek melitina na rast celic in od takrat dalje je antiproliferativni učinek melitina predmet zanimanja. Aplikacija citolitičnih peptidov pri terapiji raka je ovirana zaradi toksičnosti, nespecifičnosti in hitre degradacije peptida (38), zato postajajo zanimivi dostavni sistemi. Neelesh, R. in sodelavci, so oblikovali sintetičen dostavni vehikel, kjer se melitin vključi v zunanji lipidni sloj perfluorokarbonskih nanodelcev. Melitin so vključili v neoznačen prenašalni sistem in sistem, ki je bil označen s specifičnim integrinom. Antitumorni učinek sta dosegla oba sistema. Neoznačen sistem se je nespecifično zadržal na predelih tumornega ožilja, označen pa se je vezal na specifične, prekomerno izražene integrine na angiogeničnih endotelijskih celicah. Študijo so izvedli na treh eksperimentalnih tumorjih; na mišjem melanomu, na celicah raka dojke in na prekancerogenih lezijah mišjih celic s skvamozno displazijo in karcinomom. Kot vzrok smrti so pri celicah določili proces apoptoze. Rezultati prikazujejo melitin kot učinkovit antivaskularni in protitumorski agens, ki ubije prekancerogene lezije kot tudi trdne tumorske tvorbe (38).

Angiogeneza se lahko pojavlja v različnih bolezenskih stanjih, kot so revmatoidni artritis, ateroskleroza in rak (32). Zanimivo je, da so antiproliferativne učinke melitina preučevali pri vseh treh bolezenskih področjih. Študije so izvajali na revmatoidnih sinovijskih fibroblastih, na različnih tumorskih celicah in tudi pri GMC žil; proliferacija slednjih je značilna pri aterosklerozi in restenozni. Antiproliferativen učinek so uspeli dokazati pri vseh naštetih tipih celic.

Že pri zelo nizkih koncentracijah melitina (0,8 µg/ml in nižje) so Dong Ju Soon in sodelavci pokazali antiproliferativen/apoptotičen učinek na gladkomišične celice podganje aorte in zaključili, da je lahko inhibicija GMC pomembna terapevtska strategija pri razvoju aterosklerotičnih lezij in postangioplastični restenozni (25). Toshio Imashini s sodelavci je ob kokultivaciji HUVEC in izoliranih človeških GMC pokazal, da lahko EC sprožijo apoptozo GMC preko signalne poti Fas/FasL. Sklepali so, da lahko interakcija med EC in

GMC preko povišane ekspresije FasL v EC vodi v progresijo aterosklerotičnih lezij, saj lahko poškodovan endotelij vodi v hiperplazijo intime in žilno remodelacijo, značilno v aterosklerozi. Ugotovili so tudi, da je povišana ekspresija FasL prisotna v EC nad aterosklerotičnim plakom in ne v EC intaktne žile (39).

Na eni strani lahko takšni podatki potrdijo sklep, da bi lahko z melitinom poškodovana EC doprinesla k poslabšanju ali k morebitnim komplikacijam kardiovaskularnega obolenja. Po drugi strani pa se lahko vprašamo, če bi lahko s primernimi dostavnimi sistemi z melitinom zmanjšali remodelacijo žilja in proliferacijo GMC pri aterosklerozi.

Hong s sodelavci je dokazal, da lahko 10  $\mu\text{g/ml}$  čebeljega strupa (cca. 5  $\mu\text{g/ml}$  melitina) izzove apoptozo na človeških revmatoidnih sinovijskih fibroblastih (26). Za revmatoidni artritis je značilna sinovialna proliferacija in majhna stopnja apoptoze (26). Hkrati je za sinovij pri revmatoidnem artritisu značilen močno vaskulariziran fenotip. Ob presežnem izločanju angiogenični faktorji povzročajo sinovitis (32). Tako bi bile tudi na tem področju smiselne nadaljnje raziskave uporabe melitina.

## 6 ZAKLJUČEK

Z našim delom smo želeli opredeliti toksični učinek melitina na endotelijske celice. Razumevanje poškodbe endotelija bi lahko doprineslo k razjasnitvi rezultatov poskusov na izoliranih žilah, ponudilo razlage za nekatere patofiziološke posledice čebeljega strupa in opredelilo smiselnost uporabe čebeljega strupa/melitina pri nekaterih boleznih.

1. Rezultati poskusov potrjujejo našo prvo hipotezo, da lahko relaksacija prehaja v kontrakcijo žile zaradi citotoksičnosti melitina za endotelijske celice. Morfološke spremembe v celicah HUVEC so vidne že po 3 minutah izpostavljenosti melitinu, obenem pa v odvisnosti od časa upada tudi število viabilnih celic.
2. V HUVEC smo dokazali prisotnost tako nekrotičnih (vakuolizacija citoplazme, hiter upad živih celic, obarvanje citoplazme celic s tripan modrim) kot apoptotičnih sprememb (izpostavitve fosfatidil serina, fragmentacija jedra, skrčenje celic). Čeprav je verjetnejša nekroza, pa tudi apoptoze oziroma prepletanja obeh procesov ne moremo izključiti in bi potrebovali dodatne raziskave.
3. Velikost učinka melitina na HUVEC v razmerah *in vitro* je odvisna predvsem od starosti pripravljene raztopine melitina in konfluentnosti celične kulture. Učinek melitina je večji, če uporabimo sveže pripravljeno raztopino in če kultura ni konfluentna. Manjši vpliv na učinek melitina ima vrsta plastike in čas po pasaži. Melitin je manj učinkoval, če smo uporabili petrijevke s posebnim dnom za boljše pritrjanje in če so bile celice daljši čas po pasaži.

Ne glede na širok spekter možne uporabe lahko rečemo, da je melitin citotoksičen za endotelijske celice. Vsaka prizadeta celica pa se odzove na specifičen način, odvisno od tipa celice, koncentracije melitina in trajanja izpostavljenosti ter od fiziološkega oziroma patološkega stanja celice. Ali je uporaba melitina v različnih bolezenskih stanjih smiselna, je zanimiva podlaga za raziskave v prihodnosti.

## 7 LITERATURA

1. Peter Kampš: Odzivi organizma na med, Grafika, Novo Mesto 2005: 77-82.
2. H. Raghuraman, Amitabha Chattopadhyay: Melitin: a membran-active protein with diverse function. *Biosci Rep.* 2007; 27: 189-223.
3. Karl M. Stuhlmaier: Apis Mellifera Venom and Melittin block neither NF $\kappa$ B-p50-DNA interactions nor the activation on NF $\kappa$ B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates, *J. Immunol.* 2007; 179: 655-664.
4. I. Kimura, Dong Ju Son, Jae Woong Lee, Young Hee Lee, Ho Sueb Song, Chong Kil Lee, Jin Tae Hong: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *J pharmthera.* 2007; 115: 246-270.
5. Robert M. Rapoport, Muhammad Ashraf and Ferid Murad: Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cGMP levels in rat aorta, *Circulation Research.* 1989; 64: 463-473.
6. Katarina Černe, Katarina Č. Kristan, Metka V. Budihna, Lovro Stanovnik: Mechanisms of changes in coronary arterial tone induced by bee venom toxins, *Toxicon.* 2010; 30: 1-8.
7. Katarina Černe: Kompleksna sestava in učinki strupa medonosne čebele - od anafilaksije do toksičnosti, *Farm vestn.* 2009; 60: 319-325.
8. U. R. Miller: Hymenopteren gift-anaphylaxie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, *Der Hautartz.* 2008; 59: 206-211.
9. Mosche Gueron, Reuben Ilia, Gloria Margulis: Arthropod poisons and cardiovascular system, *Am J Emerg Med.* 2000; 18: 708-714.



10. Vetter R.S., Visscher P.K., Camazine S.: Mass envenomations by honey bees and wasps. *West J Med.* 1999; 170: 223-227.
11. David P. Betten, William H. Richardson, Tri C. Tong and F. Clark: Massive honey bee envenomation induced rhabdomyolysis in an adolescent, *Pediatrics.* 2006; 117: 231-235.
12. H. Raghuraman and Amitabha Chattopadhyay: Orientation and Dynamics of Melittin in Membranes of Varying Composition Utilizing NBD Fluorescence, *Bioph J.* 2007; 92: 1271–1283.
13. Van den Bogaart, G., Guzmán, J.V., Mika, J.T., Poolman B.: On the mechanism of pore formation by melittin., *J Biol Chem.* 2008; 283(49): 33854-7.
14. Katsumi Matsuzaki, Shuji Yoneyama, and Koichiro Miyajima: Pore Formation and Translocation of Melittin, *Bioph J.* 1997; 73: 831-838.
15. Ming-Tao Lee, Wei-Chin Hung, Fang-Yu Chen, and Huey W. Huang: Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides, *PNAS.* 2008; 105(13): 5087–5092.
16. Katarina Černe, Gorazd Drevenšek, Metka V. Budihna: Lacidipine decreases the honeybee venom-induced vasoconstriction of the isolated porcine coronary artery, *Pfluegers Arch-Eur J Physiol.* 2000; 440: 139-140.
17. Alberts: *Molecular Biology of the cell*, 5th ed., Garland Science: New York, 2008 18:1115-1127.
18. Ai Ying Xiao, Ling Wei, Shuli Xia, Steven Rothman, and Shan Ping Yu: Ionic Mechanism of Ouabain-Induced Concurrent Apoptosis and Necrosis in Individual Cultured Cortical Neurons, *J Neurosci.* 2002; 22(4): 1350–1362.
19. Marcin Kamiński, Mariusz Karbowski, Yu Miyazaki, Jakub Kędzior, Jan Henryk Spodnik, Aleksandra Gil, Michał Woźniak, Takashi Wakabayashi: Co-existence of apoptotic and necrotic features within one single cell as a result of menadione treatment, *Folia Morphol.* 2002; 61(4): 217–220.

20. Sabina Sperandio, Ian de Belle, Dale E. Bredesen: An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, PNAS. 2000; 97(26): 14376-14381.
21. Lea Ziporen, Natalie Donin, Taisia Shmushkovich, Atan Gross, Zvi Fishelson: Programmed necrotic cell death induced by complement involves a Bid dependent pathway, J Immunol. 2009; 182: 515-521.
22. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman: The cell a molecular approach, 3th ed., Sinauer Associates, Inc., Washington, D.C, 2004, 13; 542-583.
23. Wu Chun Tu, Chun Chi Wu, Hui Lien Hsieh, Chiu Yuan Chen, Shih Lan Hsu: Honeybee venom induces calcium dependent but caspase independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells, Toxicol. 2008; 52: 318-329.
24. Chen Wang, Taoyong Chen, Ning Zhang, Mingjin Yang, Bai Li, Xiang Lu, Xuetao Cao and Changquan Ling: Melittin, a Major Component of Bee Venom, Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis by Activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and Inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase-NF $\kappa$ B, J Biol Chem. 2009; 284( 6): 3804-3813.
25. Dong Ju Son, Seong Jong Ha, Ho Sueb Song, Yong Lim, Yeo Pyo Yun, Jae Woong Lee, Dong Cheul Moon, Young Hyun Park, Byeoung Soo Park, Min Jong Song, Jin Tae Hong: Melittin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through Induction of Apoptosis via Suppression of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Akt Activation and Enhancement of Apoptotic Protein Expression, JPET. 2006; 317: 627-634.
26. Seung-Jae Hong, Gyu Sung Rim, Hyung In Yang, Chang Shik Yin, Hyeong Gyun Koh, Mi-Hyeon Jang, Chang-Ju Kim, Bong-Keun Choe, Joo-Ho Chung: Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, Toxicol. 2005; 46: 39-45.

27. Sau-Tung Chu, He-Hsiung Cheng, Chun-Jen Huang, Hong-Chiang Chang, Chao-Chuan Chi, Hsing-Hao Su, Shu-Shong Hsu, Jue-Long Wang, I-Shu Chen, Shih-Inn Liu, Yih-Chau Lu, Jong-Khing Huang, Chin-Man Ho, Chung-Ren Jan: Phospholipase A2-independent  $Ca^{2+}$  entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells, *Life Sciences*. 2007; 80: 364-369.
28. Si Liu, HH Cheng, HC Chang, WC Chen, IS Chen, SS Hsu, HT Chang, JK Huang, JS Chen, YC Lu, CR Jan: Melittin induced  $[Ca^{2+}]_i$  increases and subsequent death in canine renal tubular cells, *Hum Exp Toxicol*. 2008; 27: 417-424.
29. Dong-Oh Moon, Sung-Yong Park, Yung Hyun Choi, Nam Deuk Kim, Chan Lee, Gi-Young Kim: Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells, *Toxicol*. 2008; 51:112-120.
30. Sam Maher, Siobha'n McClean: Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol, *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 1104-1114.
31. Richard C. Duke, Roxana Z. Witter, Paul B. Nash, John Ding E. Young, David M. Ojcius: Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis, *FASEB J*. 1994; 8: 237-246.
32. Carolyn A. Staton, Claire Lewis, Roy Bisknell: *Angiogenesis Assays A critical appraisal of current techniques*, Wiley, west Sussex, 2006, 1-28.
33. Mark C. Willingham: Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *JHC*. 1999; 47(9): 1101-1109.
34. Vojko Kmetec, Robert Roškar: *Vaje iz stabilnosti zdravil*, Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Ljubljana 2002.
35. Gitit Attali, Dana Gancz, Zvi Fisheson: Increased sensitivity of early apoptotic to complement mediated lysis, *Eur J Immunol*. 2004; 34: 3236-3245.

36. Soheyla Saadi, Robert A. Holzknrecht, Christian P. Patte, Jeffrey L. Plat: Endothelial Cell Activation by Pore-Forming Structures Pivotal Role for Interleukin-1 $\alpha$ , *Circulation*. 2000; 101: 1867-1873.
37. Robert I. Roth: Hemoglobin Enhances the Production of Tissue Factor by Endothelial Cells in Response to Bacterial Endotoxin, *Blood*. 1994; 83: 2860-2865.
38. Neelesh R. Soman, Steven L. Baldwin, Grace Hu, Jon N. Marsh, Gregory M. Lanza, John E. Heuser, Jeffrey M. Arbeit, Samuel A. Wickline Paul H. Schlesinger: Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth, *J Clin Invest*. 2009; 119: 2830-2842.
39. Toshio Imanishi, Takuzo Hano, Ichiro Nishio, David K.M. Han, Stephen M Schwartz: Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells is Induced by Fas Ligand Derived From Endothelial Cells, *Jpn Circ J*. 2001; 65: 556–560.
40. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>
41. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
42. [http://www.cellapplications.com/product\\_desc.php?id=82](http://www.cellapplications.com/product_desc.php?id=82)