

Wpływ jadu pszczelego na aktywność CYP1A2^{*)}

JAN MATYSIAK, PAWEŁ DEREZIŃSKI, AGNIESZKA KLUPCZYŃSKA,
MICHAŁ CICHOCKI*, ZENON J. KOKOT

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

*Zakład Biochemii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań

Otrzymano 07.05.2014

Zaakceptowano 11.07.2014

Matysiak J., Dereziński P., Klupczyńska A., Cichocki M., Kokot Z. J.
Effect of bee venom on CYP1A2 activity

Summary

Bee venom is a complex mixture of substances of natural origin, whose therapeutic properties are used in many areas of medicine. Generally accepted procedures applied in the process of developing new drugs include tests that examine interactions between the new drug and the enzymes of the cytochrome P450 group (CYP450), which play a key role in the metabolism of xenobiotics and endogenous substances in mammals. The use of bee venom in the treatment of various diseases and in immunotherapy makes it necessary to test this material for its effect on the enzymes of the CYP450 group in order to prevent health-threatening interactions.

The purpose of this paper was to investigate the effect of bee venom and its main component, melittin, on CYP1A2 enzyme activity. This enzyme plays an important role in the metabolism of many pharmaceuticals and toxins. This is the first study on the effect of bee venom on the activity of an enzyme of the CYP450 family.

The CYP1A2/CEC High Throughput Inhibitor Screening Kit (BD Biosciences) was used in the study. The method was based on the measurement of fluorescence of the enzymatic reaction product (3-cyano-7-hydroksycoumarin) formed by the action of the CYP1A2 on the substrate (3-cyano-7-ethoxycoumarin) in the presence of a potential inhibitor in various concentrations. Furafylline was used as a model inhibitor. Twenty samples of bee venom from different years and of different origin, as well as melittin, were analyzed. The tests were performed at 37°C in 96-well microplates with an Infinite M200 Pro (Tecan) microplate reader. Fluorescence measurement parameters were as follows: excitation – 410 nm, emission – 460 nm.

On the basis on the results obtained, IC₅₀ values were calculated, which are equal to the concentrations of particular inhibitors causing the inhibition of enzyme activity by 50%. The IC₅₀ values against CYP1A2 for different samples of bee venom ranged from 0.13 µg/ml to 2.38 µg/ml (mean = 0.74 µg/ml). Comparison of the IC₅₀ values for bee venom and furafylline (1.53 µg/ml) demonstrates potent inhibitor properties of bee venom against CYP1A2. The fact that IC₅₀ values for different bee venom samples show a relatively high variability may be caused by composition differences between particular bee venom samples. The data obtained also indicate that melittin is a relatively weak inhibitor of CYP1A2 activity compared to bee venom (IC₅₀ for melittin is 41.04 µg/ml). It can therefore be assumed that the inhibition of CYP1A2 by bee venom is caused by its other components. The results obtained highlight the problem of potential interactions between bee venom and therapy.

Keywords: bee venom, melittin, cytochrome P450, CYP1A2

Jad pszczeli jest wydzieliną gruczołów jadowych pszczoły miodnej (*Apis mellifera*). Jest on bardzo złożoną mieszaniną substancji pochodzenia naturalnego, której właściwości lecznicze znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Do głównych składników jadu pszczelego należą peptydy stanowiące około 2/3 suchej masy jadu (melittyna, apamina, peptyd MCD, adolapina), enzymy (fosfolipaza A₂, hialuronidaza) oraz związki niskocząsteczkowe (tab. 1) (16, 34). Jad pszczeli zawiera niewielkie ilości amin biogennych (histamina, dopamina, noradrenalina), węglowodanów,

aminokwasów i fosfolipidów. W ostatnich latach zidentyfikowano kolejne peptydy i proteiny wchodzące w skład jadu pszczelego (15, 22, 26, 27).

Na rynku preparatów farmaceutycznych zarejestrowanych jest wiele produktów pszczelich, w tym także kilka zawierających w swoim składzie jad jako substancję aktywną (17). Ponadto jad pszczeli jest wykorzystywany w odczulaniu, polegającym na podawaniu rosnących dawek jadu pszczelego w celu uzyskania tolerancji na ten alergen (4). Mimo wykorzystania w lecznictwie (18, 25, 30, 34) nieznany jest pełny skład jadu pszczelego, brak także jednolitych wytycznych dotyczących standaryzacji tego surowca. Powszechnie

^{*)} Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/05/B/NZ7/02535.

Tab. 1. Główne składniki jadu pszczelego (16, 34)

Grupa związków	Składnik	Zawartość w suchej masie jadu (%)
Białka	fosfolipaza A ₂	10-12
	hialuronidaza	1,5-2,0
	kwaśna fosfataza	1
	lizofosfolipaza	1
	α-glukozydaza	0,6
Peptydy	melittyna	40-50
	apamina	2-3
	peptyd MCD	2-3
	prokamina A, B	1,4
	adolapina	1
	inhibitor proteazy	< 0,8
	sekapina	0,5
	tertiapina	0,1
Aminy	inne peptydy	< 15
	histamina	1,5
	dopamina	0,13-1,0
Węglowodany	noradrenalina	0,1-0,7
	glukoza, fruktoza	1,5
Aminokwasy		0,8-1,0
Fosfolipidy		5
Biopierwiastki	niemetale (P, S) metale (K, Cu, Zn, Na, Mg, Ca, B)	4
Związki lotne	feromony	

przyjęte procedury obowiązujące podczas procesu opracowywania nowych leków obejmują ponadto testy badające interakcje między nowym lekiem a enzymami z grupy cytochromów P450 (CYP450) (13).

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że istnieją wzajemne interakcje pomiędzy użądleniem przez pszczołę a przyjmowanymi lekami. Stwierdzono, że stosowanie leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, ACEI) oraz β-blokerów zwiększa ryzyko ciężkiej reakcji alergicznej po użądleniu przez pszczołę, dlatego należy zachować szczególną ostrożność przy podejmowaniu decyzji o immunoterapii u pacjentów leczonych ACEI oraz β-blokerami. Podczas immunoterapii pacjentom przyjmującym ACEI oraz β-blokerzy zaleca się tymczasowe odstawienie leków z tych grup przed każdym podaniem jadu pszczelego (24, 32, 36).

Cytochromy P450 stanowią rodzinę enzymów występującą powszechnie we wszystkich organizmach żywych, zarówno u prokariotów, jak i eukariotów, w tym u człowieka. Białka te są zaangażowane w biotransformację około 90% wszystkich środków farmaceutycznych, zarówno tych stosowanych u ludzi, jak i u zwierząt (7, 11, 20, 40). Najważniejszymi izoenzymami uczestniczącymi w metabolizmie leków są: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4. Międzyosobnicze różnice w ekspresji białek

z rodziny CYP450 (polimorfizm) powodują zróżnicowaną odpowiedź na farmakoterapię takimi powszechnie stosowanymi lekami, jak β-blokerzy czy leki przeciwdepresyjne (14, 20). Oprócz uwarunkowań genetycznych do czynników wpływających na aktywność CYP450, a w efekcie na metabolizm leków i innych ksenobiotyków w organizmie należą m.in.: stosowanie innych leków, dieta, palenie tytoniu i spożywanie alkoholu (7). Wciąż natomiast pozostaje do wyjaśnienia wpływ toksyn pochodzenia naturalnego, w tym jadu pszczelego, na aktywność enzymów z grupy CYP450.

Rezultatem indukcji CYP450 jest przyspieszona biotransformacja leków metabolizowanych przez określony enzym z rodziny CYP450, co zazwyczaj prowadzi do obniżenia skuteczności zastosowanej farmakoterapii z powodu zbyt małego stężenia leku w organizmie. Odwrotnie sytuacja przedstawia się, gdy lek posiada aktywne metabolity: indukcja CYP450 powoduje zwiększony efekt farmakologiczny, a także może skutkować wzrostem toksyczności przyjmowanego leku (20, 28, 29). Efektem zahamowania regulowanego cytochromem P450 metabolizmu danego leku jest zwiększenie stężenia przyjętego środka w organizmie, co z kolei może powodować nasilenie działań niepożądanych leku oraz ryzyko jego przedawkowania. W przypadku, gdy środek farmaceutyczny przyjmowany jest w postaci proleku wymagającego biotransformacji do aktywnej formy, inhibicja enzymu odpowiedzialnego za jego metabolizm może prowadzić do obniżenia efektywności podjętego leczenia (20, 28, 29). Różnice w ciężkości reakcji na użądlenie przez pszczołę mogą zatem wynikać nie tylko z różnic międzyosobniczych i występowania czynników ryzyka, takich jak podeszły wiek czy choroby układu sercowo-naczyniowego, ale mogą być ponadto związane ze stosowaną farmakoterapią. Wykorzystanie jadu pszczelego w leczeniu różnych schorzeń oraz immunoterapii stwarza konieczność przebadania tego surowca pod kątem wpływu na enzymy metabolizujące leki, by zapobiec występowaniu groźnych dla zdrowia pacjenta interakcji.

Zmianę aktywności CYP450 powodują przede wszystkim stosowane leki, nie tylko te pochodzenia syntetycznego, ale również naturalnego (12, 37, 40). Nie tylko substancje lecznicze powodują zmianę aktywności CYP450, ale także niektóre toksyny zawarte m.in. w dymie tytoniowym czy jadzie rozgwiazdy z gatunku *Acanthaster planci* (korona cierniowa), jak też składniki pokarmowe (1, 7, 8, 12).

CYP1A2 pełni ważną funkcję w metabolizmie wielu środków farmaceutycznych, m.in. teofiliny (38), olanzapiny (5), melatoniny (21), takryny (35) i warfaryny (19) (tab. 2). Ponadto enzym ten jest odpowiedzialny za metabolizm toksyn (7, 8), a także związków pochodzenia roślinnego np. flawonoidów (tab. 2) (7, 8, 29, 41). W związku z zastosowaniem jadu pszczelego w praktyce klinicznej, zwłaszcza alergologicznej, badanie jego wpływu na aktywność CYP1A2 jest uzasadnionym elementem badań nad tym surowcem pszczelim.

Tab. 2. Substraty, inhibitory i induktory enzymu CYP1A2 (7, 20)

substraty	CYP1A2	
	inhibitory	induktory
amitryptylina	amiodaron	brokuł
kofeina	cymetydyna	brukselka
kłomipramina	fluorochinolony	fenobarbital
klozapina	fluwoksamina	WWA
fluwoksamina	furafylina	insulina
estradiol	interferon	karbamazepina
haloperidol	metoksalen	metrylocholanren
imipramine	mibefradil	modafinil
meksyletyna	tiklopidyna	α -naftoflawon
naproksen		omeprazole
ondansetron		dym tytoniowy
fenacetyna		
propranolol		
riluzol		
ropiwakaina		
takryna		
teofilina		
werapamil		
warfaryna		
zileuton		
zolmitriptan		

Celem badań było określenie wpływu jadu pszczelego oraz jego głównego składnika – melittyny – na aktywność enzymu CYP1A2. Jad pszczeleli, podobnie jak inne toksyny, poprzez wpływ na aktywność enzymów z grupy CYP450 może zmieniać farmakokinetykę leków. W wyniku wpływu jadu pszczelego na aktywność enzymów metabolizujących leki może dojść do zmniejszenia skuteczności stosowanej farmakoterapii lub nasilenia działań niepożądanych stosowanych leków. Inhibicja lub indukcja CYP1A2 przez jad pszczeleli może stanowić wskazanie do zastąpienia leków metabolizowanych przez ten enzym innymi, o podobnym działaniu lub spowodować konieczność monitorowania stężenia danego leku we krwi pacjenta podczas immunoterapii oraz stosowania preparatów zawierających jad pszczeleli.

Materiał i metody

Odczynniki. Do badań inhibicji wykorzystano zestaw CYP1A2/CEC High Throughput Inhibitor Screening Kit (BD Biosciences, Woburn, MA, USA). Badany cytochrom mikrosomalny otrzymano był przy wykorzystaniu komórek owadów (BTI-TN-5B1-4) zainfekowanych bakulowirusem (*Autographa californica*). Dodatkowo w skład zestawu wchodziły następujące odczynniki: 0,5 M bufor fosforanowy (pH = 7,4), 0,5 M roztwór Tris, kofaktory (1,3 mM NADP⁺, 66 mM MgCl₂, 66 mM glukozy-6-fosforan), glukozy-6-fosforodehydrogenaza, 3-cyjano-7-etoksykumaryna, 3-cyjano-7-hydroksykumaryna, furafylina. Dimetylosulfotlenek (DMSO) został zakupiony w firmie Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). Wodę dejonizowaną otrzymywano przy użyciu aparatu Millipore Simplicity UV (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Próbki jadu pszczelego. Do badań wykorzystano 20 próbek jadu pszczelego pochodzących z różnych lat i z różnych źródeł. Próbki jadu pszczelego pozyskiwane były metodą impulsów elektrycznych. Ramki jadowe umieszczano w górnym korpusie ula. Zabieg trwał 2 godziny i przeprowadzany

był w ciągu dnia, w czasie największej aktywności pszczół. Po odparowaniu frakcji lotnych suchy jad zeszkrobywano ze szklanych płytek stanowiących elementy składowe ramek jadowych. Dodatkowo jedna liofilizowana próbka jadu pszczelego oraz wzorzec liofilizowanej melittyny zostały zakupione w firmie Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). Próbki suchego jadu przechowywane były w temperaturze 5°C, bez dostępu światła.

Wyznaczanie IC₅₀. W celu wyznaczenia wartości IC₅₀ postępowano zgodnie z protokołem do zestawu CYP1A2/CEC High Throughput Inhibitor Screening Kit. Metoda oparta jest na pomiarze fluorescencji produktu reakcji enzymatycznej (3-cyjano-7-hydroksykumaryna) powstałego w wyniku działania cytochromu CYP1A2 na substrat (3-cyjano-7-etoksykumaryna) w obecności inhibitora w różnych stężeniach (jad pszczeleli, melittyna). Jako wzorcowy inhibitor wykorzystano furafylinę. Na podstawie otrzymanych wyników obliczana jest wartość IC₅₀, która jest równa stężeniu inhibitora powodującego zahamowanie aktywności cytochromu P450 w 50%. Badania prowadzono w temperaturze 37°C na 96-dołkowych mikroplątkach z wykorzystaniem czytnika mikroplątek Infinite M200 Pro (Tecan, Grödig, Austria). Parametry pomiaru fluorescencji: wzbudzenie 410 nm, emisja 460 nm.

W celu pomiaru fluorescencji produktu reakcji enzymatycznej przygotowano krzywą wzorcową 3-cyjano-7-hydroksykumaryny w zakresie stężeń 0,061-133,3 pM. Badane próbki jadu pszczelego oraz melittyny rozpuszczano bezpośrednio przed analizą w DMSO. Następnie otrzymane roztwory dodawano do mieszaniny kofaktorów oraz glukozy-6-fosforodehydrogenazy, przeprowadzając jednocześnie serię rozcieńczeń. Po 10 min. inkubacji w temperaturze 37°C do wszystkich rozcieńczeń dodano mieszaninę izoenzymu CYP1A2 i substratu (3-cyjano-7-etoksykumaryna). Po 15 minutach inkubacji w temperaturze 37°C zatrzymano reakcję enzymatyczną poprzez dodanie roztworu Tris i dokonano pomiaru fluorescencji. Wartość IC₅₀ wyliczono z następującego wzoru:

$$IC_{50} = \frac{50\% - A}{B - A} (C - D) + D$$

gdzie:

- A – najbliższa wartość procentu inhibicji poniżej 50%,
- B – najbliższa wartość procentu inhibicji powyżej 50%,
- C – stężenie inhibitora odpowiadające najbliższej wartości procentu inhibicji poniżej 50%,
- D – stężenie inhibitora odpowiadające najbliższej wartości procentu inhibicji powyżej 50%.

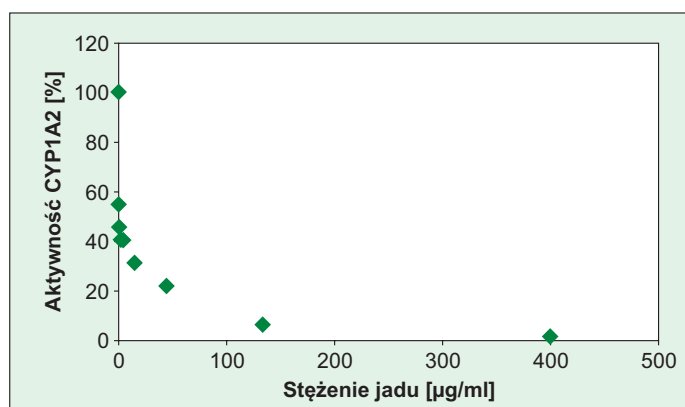
Wyniki i omówienie

Udział w aktywacji biologicznej oraz metabolizmie ksenobiotyków, w tym leków powszechnie stosowanych w praktyce klinicznej sprawił, że regulacja aktywności CYP1A2 stała się obiektem wielu badań. Testy badające wpływ różnych związków na aktywność enzymów metabolizujących leki pozwolą uniknąć zagrożeń związanych z występowaniem zwiększonej toksyczności leku lub obniżeniem efektywności podjętego leczenia. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat oddziaływania jadu pszczelego oraz jego składników na metabolizm ksenobiotyków. Są to

pierwsze badania dotyczące wpływu jadu pszczelego na aktywność enzymu z rodziny CYP450.

Do ilościowego określenia inhibitorowych właściwości określonej substancji wobec enzymu służy wartość IC_{50} . Jest to takie stężenie inhibitora, które powoduje 50% inhibicji enzymu. Zatem im niższe IC_{50} , tym silniejszym inhibitorem jest dana substancja. Uzyskano następujące parametry krzywej wzorcowej dla produktu reakcji enzymatycznej (3-cyjano-7-eto-ksumaryny): $y = 391,23x$, $r = 0,9996$. Wartości IC_{50} dla różnych próbek jadu pszczelego względem CYP1A2 różniły się, przyjmując wartości z zakresu od 0,13 $\mu\text{g/ml}$ do 2,38 $\mu\text{g/ml}$ (tab. 3). Wartość średnia IC_{50} dla jadu pszczelego wyniosła 0,74 $\mu\text{g/ml}$ (mediana = 0,63 $\mu\text{g/ml}$). Rząd wielkości wartość IC_{50} dla próbek jadu pszczelego jest porównywalny do otrzymanej wartości IC_{50} dla furafyliny, która wynosi 1,53 $\mu\text{g/ml}$. Dowodzi to silnych właściwości inhibitorowych jadu pszczelego względem CYP1A2. Krzywe inhibicji dla jadu pszczelego oraz wzorcowego inhibitora CYP1A2 – furafyliny są przedstawione na ryc. 1 i 2. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że aktywność inhibitorowa jadu pszczelego względem CYP1A2 nie spada znacząco podczas jego przechowywania w formie stałej w temperaturze 5°C, bez dostępu światła, nawet w ciągu kilku lat. W celu przeprowadzenia pełnej analizy statystycznej (opartej na testach charakteryzujących się dużą mocą), mającej na celu określenie wpływu czasu przechowywania jadu na jego aktywność względem CYP1A2 niezbędne jest jednak przeprowadzenie badań na większej ilości reprezentatywnych próbek.

W przypadku melittyny wykazano, że wartość IC_{50} wynosi 41,04 $\mu\text{g/ml}$. Otrzymane wyniki wskazują na to, że melittyna stosunkowo słabo w porównaniu do jadu pszczelego hamuje aktywność CYP1A2. Można zatem przypuszczać, że za inhibicję cytochromu CYP1A2 w przypadku jadu pszczelego odpowiadają inne jego składniki. Jad pszczeli jest niezwykle złożoną matrycą, którą charakteryzuje określona zdolność hamowania aktywności enzymu CYP1A2. Ta właściwość jadu pszczelego może pochodzić od jednego bądź od kilku jego składników, może być również wynikiem synergicznego działania dwóch lub większej liczby składników.



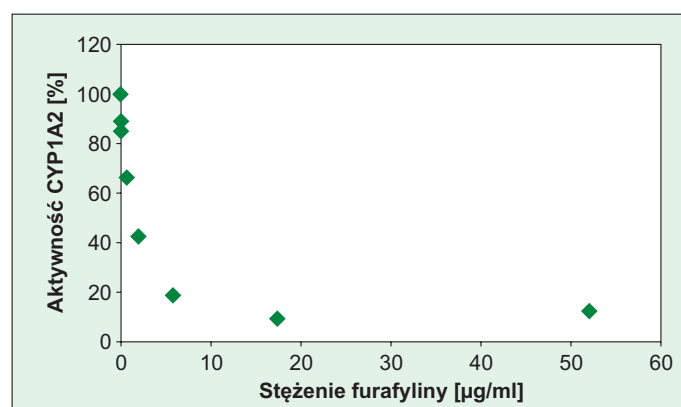
Ryc. 1. Krzywa inhibicji CYP1A2 dla próbki jadu numer 6. $IC_{50} = 0,40 \mu\text{g/ml}$

Tab. 3. Wartości IC_{50} próbek jadu pszczelego odpowiadające stężeniu jadu powodującemu zahamowanie aktywności enzymu CYP1A2 w 50%

Próbki jadu pszczelego	Wiek próbki (lata)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Jad pszczeli 1	1	0,22
Jad pszczeli 2 (Sigma)	1	0,44
Jad pszczeli 3	1	1,18
Jad pszczeli 4	2	0,13
Jad pszczeli 5	2	0,27
Jad pszczeli 6	2	0,35
Jad pszczeli 7	3	0,67
Jad pszczeli 8	3	0,70
Jad pszczeli 9	3	0,74
Jad pszczeli 10	4	0,40
Jad pszczeli 11	4	0,77
Jad pszczeli 12	4	1,00
Jad pszczeli 13	5	0,35
Jad pszczeli 14	5	0,48
Jad pszczeli 15	5	0,59
Jad pszczeli 16	8	1,11
Jad pszczeli 17	8	1,38
Jad pszczeli 18	8	2,38
Jad pszczeli 19	10	0,59
Jad pszczeli 20	10	1,14

W związku z tym, że wartości IC_{50} dla różnych próbek jadu pszczelego wykazują stosunkowo dużą zmienność, należy podejrzewać, że jest ona spowodowana różnicami w składzie badanych próbek jadu pszczelego. Dostępna literatura podaje bowiem, że skład jadu pszczelego może się zmieniać w zależności od wieku pszczoł, linii pszczoł, miesiąca oraz roku pozyskiwania próbek (17, 39).

Podczas uządlenia przez pszczołę miodną do organizmu ofiary zostaje wprowadzone od 50-150 μg jadu (6, 9). Z kolei w trakcie immunoterapii mającej na celu odciążenie pacjenta z alergią na jad pszczeli podawane są różne dawki początkowe (0,001-0,1 μg jadu) oraz podtrzymujące (100-200 μg jadu), w zależności od rodzaju terapii (3, 10, 23, 31, 33). Uwzględniając, że wartości



Ryc. 2. Krzywa inhibicji CYP1A2 dla furafyliny – wzorcowego inhibitora CYP1A2. $IC_{50} = 1,53 \mu\text{g/ml}$

IC₅₀ badanych próbek jadu mieszczą się w granicach od 0,13 µg/ml do 2,38 µg/ml należy wnioskować, iż ilości jadu wprowadzone do organizmu, wynoszące od kilkudziesięciu do kilkuset µg mogą hamować CYP1A2.

Otrzymane wyniki powinny zwrócić uwagę na problem możliwych interakcji pomiędzy jadem pszczelem a prowadzoną terapią. W przypadku inhibicji enzymów CYP450 szczególną uwagę należy zwrócić na leki o wąskim indeksie terapeutycznym, takie jak teofilina (2). W związku z zahamowaniem CYP1A2 przez jad pszczeleli może dojść do nasilenia działań niepożądanych w trakcie terapii teofiliną lub innymi lekami metabolizowanymi przez ten izoenzym. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że u pacjentów poddawanych immunoterapii zaleca się odstawienie leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz β-blokerów, ponieważ przyjmowanie tych leków zwiększa ryzyko ciężkiej reakcji anafilaktycznej po użądleniu przez pszczołę (24, 32, 36). Lista substancji mogących potencjalnie interferować z jadem pszczelem może obejmować także leki z innych grup.

Uzyskane dane, prezentowane w niniejszym artykule, powinny stanowić podstawę do dalszych badań, mających na celu pełne wyjaśnienie mechanizmu hamowania CYP1A2 przez jad pszczeleli. Ponadto należy zbadać wpływ tego surowca na inne izoenzymy z rodziny CYP450, co zwiększy bezpieczeństwo i skuteczność stosowanej farmakoterapii u ludzi oraz u zwierząt.

Piśmiennictwo

- Aniya Y, Terukina R, Minamitake Y, Shiohira S.: Effect of the spine venom from the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*, on drug-metabolizing enzyme in rat liver. *J. Tox. Sci.* 1998, 23(5), 419-423.
- Barnes P. J.: Theophylline. *Am. J. Resp. Crit. Care.* 2013, 188(8), 901-906.
- Bonifazi F, Jutel M, Bilo B. M., Birnbaum J., Muller U.: Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005, 60(12), 1459-1470.
- Boyle R. J., Elremeli M., Hockenull J., Cherry M. G., Bulsara M. K., Daniels M., et al.: Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings. *Cochrane Db. Syst. Rev.* 2012, (10).
- Callaghan J. T., Bergstrom R. F., Ptak L. R., Beasley C. M.: Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 37(3), 177-193.
- Cichożka-Jarosz E., Breborowicz A.: Uczulenie na jad pszczoły. *Ped. Dypł.* 2007, 11(2), 116-132.
- Danielson P. B.: The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* 2002, 3(6), 561-597.
- Faber M. S., Jetter A., Fuhr U.: Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 97(3), 125-134.
- Fitzgerald K. T., Flood A. A.: Hymenoptera stings. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2006, 21(4), 194-204.
- Gorska L., Chelminska M., Kuziemski K., Skrzypski M., Niedoszytko M., Damps-Konstanska I., et al.: Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008, 147(3), 241-245.
- Guengerich F. P.: Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21(1), 70-83.
- Guo L. Q., Yamazoe Y.: Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, 25(2), 129-136.
- Huang S. M., Temple R., Throckmorton D. C., Lesko L. J.: Drug interaction studies: Study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 81(2), 298-304.
- Ingelman-Sundberg M., Sim S. C., Gomez A., Rodriguez-Antona C.: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacopigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Therapeut.* 2007, 116(3), 496-526.
- Kettner A., Hughes G. J., Frutiger S., Astori M., Roggero M., Spertini F., et al.: Api m 6: A new bee venom allergen. *J. Allergy Clin. Immun.* 2001, 107(5), 914-920.
- Kokot Z. J., Matysiak J.: Inductively coupled plasma mass spectrometry determination of metals in honeybee venom. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48(3), 955-959.
- Kokot Z. J., Matysiak J., Urbaniak B., Dereziński P.: New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399(7), 2487-2494.
- Kwon Y. B., Ham T. W., Kim H. W., Roh D. H., Yoon S. Y., Han H. J., et al.: Water soluble fraction (< 10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha(2)-adrenergic activity in mice. *Pharmacol. Biochem. Be.* 2005, 80(1), 181-187.
- Lehmann D. E.: Enzymatic shunting: resolving the acetaminophen-warfarin controversy. *Pharmacotherapy.* 2000, 20(12), 1464-1468.
- Lynch T., Price A.: The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am. Fam. Physician.* 2007, 76(3), 391-396.
- Ma X., Idle J. R., Krausz K. W., Gonzalez F. J.: Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab. Dispos.* 2005, 33(4), 489-494.
- Matysiak J., Schmelzer C. E. H., Neubert R. H. H., Kokot Z. J.: Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2011, 54(2), 273-278.
- Muller U., Helbling A., Berchold E.: Immunotherapy with Honeybee Venom and Yellow Jacket Venom Is Different Regarding Efficacy and Safety. *J. Allergy. Clin. Immun.* 1992, 89(2), 529-535.
- Muller U. R., Haeberli G.: Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* 2005, 115(3), 606-610.
- Park H. J., Lee S. H., Son D. J., Oh K. W., Kim K. H., Song H. S., et al.: Antiarthritic effect of bee venom – Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum.* 2004, 50(11), 3504-3515.
- Peiren N., de Graaf D. C., Brunain M., Bridts C. H., Ebo D. G., Stevens W. J., et al.: Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *Febs. Lett.* 2006, 580(20), 4895-4899.
- Peiren N., Vanrobaeys F., de Graaf D. C., Devreese B., Van Beeumen J., Jacobs F. J.: The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Bba-Proteins. Proteom.* 2005, 1752(1), 1-5.
- Pelkonen O., Maenpaa J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998, 28(12), 1203-1253.
- Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* 2008, 82(10), 667-715.
- Putz T., Ramoner R., Gander H., Rahm A., Bartsch G., Thurnher M.: Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate. *Cancer Immunol. Immun.* 2006, 55(11), 1374-1383.
- Roll A., Hofbauer G., Ballmer-Weber B. K., Schmid-Grendelmeier P.: Safety of specific immunotherapy using a four-hour ultra-rush induction scheme in bee and wasp allergy. *Drug Metab. Dispos.* 2006, 16(2), 79-85.
- Rueff F., Przybilla B., Bilo M. B., Muller U., Scheipl F., Aberer W., et al.: Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: The importance of baseline serum tryptase. *J. Allergy Clin. Immun.* 2010, 126(1), 105-111.
- Rueff F., Wolf H., Schmitz J., Ring J., Przybilla B.: Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy* 2004, 59(6), 589-595.
- Son D. J., Lee J. W., Lee Y. H., Song H. S., Lee C. K., Hong J. T.: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Therapeut.* 2007, 115(2), 246-270.
- Spaldin V., Madden S., Pool W. F., Woolf T. F., Park B. K.: The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 1994, 38(1), 15-22.
- Stumpf J. L., Shehab N., Patel A. C.: Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. *Ann. Pharmacother.* 2006, 40(4), 699-703.
- Tanaka E.: Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions: role of cytochrome P450 enzymes. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1998, 23(6), 403-416.
- Tjia J. F., Colbert J., Back D. J.: Theophylline metabolism in human liver microsomes: inhibition studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 276(3), 912-917.
- Zhou J. H., Zhao J., Zhang S. X., Shen J. Z., Qi Y. T., Xue X. F., et al.: Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2010, 404(2), 171-178.
- Zhou S., Gao Y., Jiang W., Huang M., Xu A., Paxton J. W.: Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab. Rev.* 2003, 35(1), 35-98.
- Zhu R., Hu L., Li H., Su J., Cao Z., Zhang W.: Novel Natural Inhibitors of CYP1A2 Identified by in Silico and in Vitro Screening. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(5), 3250-3262.

Adres autora: dr Jan Matysiak, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań; e-mail: jmatysiak@ump.edu.pl