

mgr farm. Eliza Maria Matuszewska

Zastosowanie spektrometrii mas do charakterystyki wybranych produktów pszczelich oraz do proteomicznych analiz wpływu jadu owadów błonkoskrzydłych na organizm ludzki

Streszczenie

Produkty pszczele, dzięki zawartości składników odżywczych i bioaktywnych, takich jak białka i aminokwasy, a także niezbędnych makro- i mikroelementów, wywierają korzystny wpływ na ludzki organizm. Z drugiej strony, ich naturalne pochodzenie sprzyja zawartości toksycznych zanieczyszczeń nieorganicznych, w tym metali ciężkich. Ponadto, produkty pszczele, szczególnie jad, cechują się silnymi właściwościami alergizującymi. Użądlenie przez owady należące do rzędu błonkoskrzydłych (łac. *Hymenoptera*) może skutkować wystąpieniem miejscowej lub uogólnionej reakcji alergicznej, w tym zagrażającej życiu anafilaksji. Aby poprawić bezpieczeństwo wykorzystania terapeutycznych produktów pszczelich, a także zwiększyć możliwości diagnostyczne i prognostyczne alergii, należy poznać wszystkie składniki bioaktywne zawarte w produktach pszczelich oraz wyjaśnić korzystne oraz niepożądane zmiany zachodzące w ustroju pod ich wpływem.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy doktorskiej była charakterystyka wybranych produktów pszczelich ze szczególnym uwzględnieniem ich składu oraz właściwości biologicznych, determinujących wpływ na organizm ludzki, w oparciu o zaawansowane techniki przygotowania próbek i nowoczesne metody spektrometrii mas. W wyniku przeprowadzonych badań dokonano charakterystyki składu białkowo-peptydowego mleczka pszczelego, oznaczono zawartość pierwiastków chemicznych w mleczku pszczelim, pyłku pszczelim i propolisie, przeanalizowano wpływ składników jadu pszczelego: apaminy, melityny i tertiapiny na cienie erytrocytów oraz opisano zmiany zachodzące w proteomie surowicy krwi pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych po użądleniu przez pszczołę lub osę.

Analiza składu białkowo-peptydowego mleczka pszczelego skutkowałą identyfikacją 86 białek taksonomicznie zaklasyfikowanych do rodzaju pszczół (łac. *Apis* spp.). Wśród nich, 74 białka zidentyfikowano w próbkach poddanych wstępnemu

przygotowaniu z wykorzystaniem techniki wyrównywania stężeń. W próbach analizowanych z pominięciem zagęszczania frakcji proteomicznej zidentyfikowano natomiast tylko 50 białek. Uzyskane wyniki dowodzą użyteczności zaproponowanej techniki, jako sposobu do przygotowania próbek pochodzenia naturalnego znacząco poprawiającego możliwości identyfikacyjne spektrometru mas.

Badania elementarne pyłku pszczelego, propolisu i mleczka pszczelego wykazały, że stężenia poszczególnych pierwiastków, w tym makro- i mikroelementów oraz zanieczyszczeń w produktach pszczelich różnią się w zależności od rodzaju produktu. Różnice odnotowano także pomiędzy próbkami propolisu zebranych w dwóch następujących po sobie latach. Pszczoły i ich produkty uznawane są za czułe wskaźniki antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska. Uzyskane wyniki mogą więc wskazywać na stopień emisji czynników prowadzących do degradacji środowiska. Ponadto, znajomość zawartości zanieczyszczeń mineralnych w produktach pszczelich pozwala oszacować bezpieczeństwo ich przyjmowania doustnego.

Wyniki analiz wpływu wybranych alergenów jadu pszczelego: melityny, tertiapiny i apaminy na cieni ludzkich erytrocytów potwierdziły zależną od stężenia aktywność lityczną melityny. W próbkach inkubowanych z apaminą w stężeniu 10^{-9} M i tertiapiną w stężeniach 10^{-9} - 10^{-7} M zaobserwowano natomiast obniżenie stopnia hemolizy, co może wskazywać na działanie ochronne i stabilizujące apaminy i tertiapiny na błony komórkowe. Analizy proteomu cieni erytrocytów po inkubacji z peptydami wykazały, że największe zmiany w profilach białkowo-peptydowych błon komórkowych wywołane są działaniem apaminy. Otrzymane wyniki wykazały ponadto, że metoda oparta na chromatografii cieczowej w skali nano (nanoLC) w połączeniu ze spektrometrią mas typu MALDI-TOF/TOF może zapewnić szybką i dokładną analizę składu białkowego błon komórkowych, w tym cieni erytrocytów.

Porównanie profili białkowo-peptydowych surowicy krwi pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych i osób zdrowych doprowadziło do wytypowania czterech białek statystycznie istotnie różnicujących badane grupy: łańcucha alfa fibrynogenu, składowej C4-A dopełniacza, ciężkiego łańcucha H4 inhibitora inter-alfa-trypsyny oraz łańcucha A czynnika koagulacji XIII. Wszystkie zidentyfikowane białka uczestniczą w odpowiedzi zapalnej, co znajduje potwierdzenie w IgE-zależnym mechanizmie powstawania reakcji alergicznej.

Założenia pracy zostały w pełni zrealizowane dzięki wykorzystaniu zaawansowanych technik przygotowania próbek, nowoczesnych metod spektrometrii

mas oraz szerokiego wachlarza narzędzi bioinformatycznych i statystycznych. Przeprowadzone badania doprowadziły do identyfikacji nowych białek zawartych w mleczku pszczelim. Po raz pierwszy oznaczono także tak szerokie spektrum pierwiastków chemicznych obecnych w produktach pszczelich pochodzących z pasieki położonej w Wielkopolsce. Ponadto, przeprowadzenie analiz zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* procesów zachodzących w ustroju pod wpływem jadu pszczelego pozwoliło na wielokierunkowy opis jego bioaktywności i wpływu na organizm ludzki.

Abstract

Dissertation title: Application of mass spectrometry for characterization of selected bee products and for proteomic analyses of the effect of *Hymenoptera* venom on the human organism

Due to their nutrients and bioactive compounds, such as proteins, amino acids and essential macro-, and microelements, bee products have a beneficial effect on the human body. However, because of their natural origin, they may contain toxic inorganic contaminants, including heavy metals. Moreover, bee products, especially bee venom, possess strong allergenic properties. *Hymenoptera* stings can result in local or systemic allergic reactions, including life-threatening anaphylaxis. Thus, in order to improve the safety of the therapeutic use of bee products, and increase the diagnostics and prognostics of allergy, it is necessary to know all bioactive components contained in bee products and clarify both beneficial and adverse effects occurring in the body under their influence.

Therefore, this doctoral dissertation aimed to characterise selected bee products, focusing on their composition and biological properties (which determine their effect on the human organism), based on advanced sample preparation techniques and up-to-date mass spectrometry methods. The performed experiments allowed for the characterisation of the protein-peptide composition of royal jelly, the determination of the content of chemical elements in royal jelly, bee pollen and propolis, the analysis of the influence of bee venom components: apamin, melittin and tertiapin on erythrocyte membranes, and for describing the changes in the serum proteome of patients allergic to *Hymenoptera* venom after a bee or wasp sting.

Analysis of the protein-peptide composition of royal jelly resulted in the identification of 86 proteins taxonomically classified to *Apis* spp. Among them, 74 proteins were identified in samples pre-treated with the equaliser technique. In contrast, only 50 proteins were identified in samples not enriched with this technique. These results prove the utility of the equaliser enrichment technique in enhancing the protein identification ability by mass spectrometry approaches.

Elemental studies on bee pollen, propolis and royal jelly have shown that the concentrations of individual elements, including macro-, and microelements, as well as contaminants in bee products, differ depending on the type of product. Differences were

also noted between propolis samples collected in two consecutive years. Bees and their products are considered sensitive indicators of anthropogenic environmental pollution. Thus, the obtained results may indicate the degree of emission of factors leading to environmental degradation. In addition, the knowledge of mineral contamination content in bee products allows estimating the safety of their oral intake.

Analysing the effect of selected bee venom allergens: melittin, tertiapin and apamin on human erythrocyte ghosts confirmed the concentration-dependent lytic activity of melittin. In contrast, a decrease in hemolysis was observed in samples incubated with apamin at 10^{-9} M and tertiapin at 10^{-9} - 10^{-7} M, indicating a protective and stabilising effect of apamin and tertiapin on cell membranes. Furthermore, the analysis of erythrocyte ghost proteome after incubation with peptides showed that the most remarkable changes in protein-peptide profiles of cell membranes were induced by apamin. The obtained results further demonstrated that a method based on nanoscale liquid chromatography (nanoLC) combined with MALDI-TOF/TOF MS/MS mass spectrometry could provide rapid and accurate analysis of the protein composition of cell membranes, including erythrocyte ghosts.

The comparison of the serum protein-peptide profiles obtained from patients allergic to *Hymenoptera* venom and healthy subjects led to identifying four proteins that statistically significantly differentiate the studied groups. These proteins were: fibrinogen alpha chain, complement component C4-A, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, and coagulation factor XIII chain A. All of the identified proteins are involved in the inflammatory response, as evidenced by the IgE-dependent mechanism of allergic reaction.

The study's assumptions were fully accomplished by using advanced sample preparation techniques, modern mass spectrometry methods and a wide range of bioinformatics and statistical tools. The research carried out led to the identification of new proteins contained in royal jelly. For the first time, such a broad spectrum of chemical elements present in bee products originating from an apiary located in the Greater Poland region was determined. Moreover, *in vivo* and *in vitro* analyses of the processes occurring in the body exposed to bee venom have allowed for a multidirectional description of its bioactivity and effect on the human organism.