



Hematological and Histological Changes in the Knee Cartilage of Male Rats Received Intra-Articular Injection of Bee Venom and Melittin

Haydeh Keyhan¹, Hasan Morovvati², Mohammad Kazem Koohi³, Jalal Hassan³,
Mohammad Mazidi⁴

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Comparative BioSciences (DCBs), Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Research Institute of Nuclear Sciences and Technology, Tehran, Iran

Received: 22 Apr 2025, Reciver in revised from: 18 Jun 2025, Accepted: 24 Jun 2025, Available online: 13 Sep 2025



10.22059/jvr.2025.385857.3468

J Vet Res, Volume 80, Number 3, 2025, 177-188

Abstract

BACKGROUND: Bee venom therapy has been used for thousands of years. Bee venom consists of at least 18 active pharmacological compounds including phospholipases and peptide as well as amino acid compounds such as melittin, which has anti-inflammatory properties.

OBJECTIVES: In this study, we aim to compare the effects of single intra-articular injections of bee venom and melittin on joint histology and hematology in male rats.

METHODS: In this research, 18 healthy male rats were used in three groups: control, bee venom (BV), and melittin. Intra-articular injection of 1mg/kg of bee venom or melittin was performed two intervention groups. One month after the injection, their hematological and immunological factors including interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were evaluated and compared with those of the control group. Also, histological studies and tissue staining by hematoxylin & eosin, periodic acid-Schiff (PAS), and Masson's trichrome were performed. Tissue expression of TNF- α was evaluated by immunohistochemical staining.

RESULTS: The findings did not show significant differences between the groups in hematologic factors. The results for histological factors showed a significant increase in knee cartilage thickness in the BV group and a significant decrease in the number of chondrocytes in both BV and melittin groups. Also, the reduction of collagen fibers and disorganization of the ground substance were observed by PAS and Masson's trichrome staining in the melittin group. TNF- α and IL-6 significantly increased in both BV and melittin groups, while immunohistochemical staining of TNF- α showed a non-significant decrease due to bee venom injection.

CONCLUSIONS: The intra-articular injection of bee venom and melittin cannot lead to hematological changes. They can increase the level of inflammatory biomarkers, TNF- α and IL-6, and reduce the number of healthy chondrocytes in the middle layer; however, further studies are needed to confirm these results. Our findings suggest that bee venom and its main component, melittin, may increase immune responses. Regarding the bee venom safety, more extensive studies are needed.

Keywords: Bee venom, IL-6, Intra-articular, Melittin, TNF- α

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Hasan Morovvati, Tel/Fax: +9821-61117117 / +9821-66933222



How to cite this article:

Keyhan H, Morovvati H, Koohi M K, Hassan J, Mazidi M. Hematological and histological changes in the knee cartilage of male rats received intra-articular injection of bee venom and melittin. Journal of Veterinary Research, 2025; 80(3): 177-188. doi: 10.22059/jvr.2025.385857.3468

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean levels of hematological factors in the study groups.

Table 2. Mean levels of TNF- α and IL-6 in the study groups. * $P < 0.01$, ** * $P < 0.001$.

Table 3. The mean TNF- α expression level in the knee cartilage of rats in three groups. * $P < 0.05$.

Figure 1. The RP-HPLC chromatogram of melittin at a wavelength of 280 nm.

Figure 2. Micrograph of the knee cartilage with H&E staining (20 $\times$ magnification). (A) control group (B) BV group (C) Melittin group.

Figure 3. Micrograph of knee cartilage with PAS and Masson's trichrome staining (A) control group with PAS staining, (B) BV group with PAS staining, (C) Melittin group with PAS staining (D) control group with trichrome staining, (E) BV group with trichrome staining, (F) Melittin group with trichrome staining.

Figure 4. Micrograph of the bone marrow with TNF- α (immunohistochemical staining with 20 $\times$ magnification); (A) BV group, (B) Melittin group.

Figure 5. Changes in superficial, middle, and deep layers of the knee cartilage. (A) cartilage thickness, (B) number of healthy chondrocytes, (C) number of oval-shaped chondrocytes, (D) isogenous group, (E) Lacunae. * $P < 0.05$, ** * $P < 0.001$.



مطالعه تغییرات خونی و بافتی غضروف زانو با تزریق داخل مفصلی زهر زنبور عسل و ملیتین در موش صحرایی نر

هایده کیهان^۱، حسن مروتی^۲، محمد کاظم کوهی^۳، جلال حسن^۳، محمد مزیدی^۴

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۴ انستیتو تحقیقاتی علوم و تکنولوژی هسته‌ای، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۲۸ خرداد ۱۴۰۴، تاریخ پذیرش: ۳ تیر ۱۴۰۴، تاریخ انتشار: ۲۲ شهریور ۱۴۰۴

doi: 10.22059/jvr.2025.385857.3468

دوره ۸۰، شماره ۳، ۱۴۰۴، ۱۷۷-۱۸۸

چکیده

زمینه مطالعه: درمان با زهر زنبور عسل یک روش درمانی با قدمت هزاران ساله است. زهر زنبور حداقل از ۱۸ ترکیب فارماکولوژیکی، شامل فسفولیپازها، ترکیبات پپتیدی و آمینواسیدی، مانند ملیتین که دارای خاصیت ضدالتهابی می‌باشد تشکیل شده است.

هدف: در مطالعه حاضر، به منظور بررسی ایمنی و نیز مقایسه تأثیر تک تزریق داخل مفصلی زهر زنبور و ملیتین در گروه‌های جداگانه بر بافت‌شناسی مفصل و خون‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در مطالعه حاضر از ۱۸ موش صحرایی نر سالم در ۳ گروه کنترل، گروه زهر و گروه ملیتین استفاده شد. تزریق داخل مفصلی ۱ میلی گرم/کیلوگرم از زهر زنبور و ملیتین در موش صحرایی انجام شد و ۱ ماه بعد از تزریق نتایج فاکتورهای هماتولوژی و نیز فاکتورهای ایمونولوژیک IL-6 و TNF- α در مقایسه با گروه کنترل ارزیابی شد. همچنین مطالعات بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی‌های بافتی، شامل هماتوکسیلین ائوزین، پریودیک اسید شیف و تریکروم ماسون انجام و سطح TNF- α بافتی با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای هماتولوژی نشان نداد. مطالعات بافت‌شناسی افزایش ضخامت غضروف در گروه دریافت‌کننده زهر و کاهش معنی‌دار تعداد کندروسیت‌ها در هر دو گروه را نشان داد. همچنین کاهش رشته‌ای کلاژن و به هم ریختگی ماده زمینه در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف و تریکروم ماسون در گروه دریافت‌کننده ملیتین مشاهده شد. تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین ۶ (IL-6) در گروه دریافت‌کننده زهر و ملیتین افزایش معنی‌دار نشان داد، در حالی که در بررسی ایمونوهیستوشیمی، سطح بافتی TNF- α تغییرات معنی‌داری نشان نداد.

نتیجه‌گیری نهایی: براساس نتایج مطالعه حاضر تزریق داخل مفصلی زهر زنبور و ملیتین تغییرات هماتولوژیک معنی‌داری ایجاد نکرد. هرچند افزایش معنی‌دار سطح بیومارکرهای التهابی TNF- α ، IL-6 به مطالعات تکمیلی نیاز دارد. همچنین در بافت‌شناسی غضروف برخی تغییرات قابل بررسی، همچون کاهش تعداد کندروسیت‌های سالم لایه میانی مشاهده شد. با وجود اثرات درمانی و ارزشمند گزارش شده از زهر زنبور عسل، یافته‌های مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند زهر زنبور و جزء اصلی آن، ملیتین، ممکن است موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی شود. البته اظهار نظر در رابطه با ایمنی زهر به مطالعات گسترده‌تری نیاز دارد.

کلمات کلیدی: اینترلوکین ۶، تزریق داخل مفصلی، تومور نکروز فاکتور آلفا، زهر زنبور، ملیتین

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: حسن مروتی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

درمان با زهر زنبور عسل یک روش درمانی با قدمت هزاران ساله است. از گذشته از نیش زنبور زنده یا زهر به صورت قابل تزریق برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌کردند. اپی‌تراپی، استفاده از محصولات زنبور عسل برای مقاصد پزشکی می‌باشد که

شامل عسل، ژل رویال، بره موم، گرده گل و عمدتاً زهر زنبور (Venom Bee) بوده که به عنوان اپی توکسین شناخته می شود. زهر زنبور حداقل از ۱۸ ترکیب فارماکولوژیکی فعال، شامل آنزیم ها مثل فسفولیپازها، ترکیبات پپتیدی و آمینواسیدی، مانند ملیتین تشکیل شده است (۱).

استفاده از زهر زنبور با بیش از ۵۰۰۰ سال قدمت در طب سنتی کاربرد داشته است (۲)، به طوری که حتی فواید درمانی آن در کتاب های مقدسی مثل ودا (کتاب مقدس هند)، انجیل و قرآن ذکر شده است. پپتیدها و آنزیم های موجود در زهر زنبور عسل می تواند در درمان بیماری های التهابی و سیستم عصبی مرکزی مثل پارکینسون، آلزایمر و اسکروز میوتروفیک و انواع مختلف سرطان مؤثر باشد. همچنین فعالیت های ضد ویروسی آن حتی در برابر ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) دیده شده است (۳). درمان با زهر زنبور و اجزای اصلی آن یک رویکرد بالینی مفید برای درمان بیماری های التهابی محسوب می شود (۴). زنبور در هر نیش ۰/۳ میلی گرم زهر تزریق می کند. بیشتر مرگ و میر انسان در اثر یک یا چند نیش زنبور به دلیل واکنش های آلرژیک، نارسایی قلبی یا خفگی ناشی از تورم در اطراف گردن یا دهان است. اولین نیش باعث تولید آنتی بادی ایجاد کننده آلرژی، ایمونوگلوبولین IgE توسط بدن می شود و در نتیجه فرد نسبت به سم حساس می شود. یک واکنش آلرژیک معمولاً پس از گزش دوم یا بعدی توسط همان گونه یا گونه های نزدیک به هم اتفاق می افتد (۵). مطالعات قبلی نشان دادند زهر می تواند هر دو لنفوسیت T و B را تحت تأثیر قرار دهد و باعث افزایش واکنش های ایمنی شود. مطالعات بیشتر در مورد اثرات ایمونولوژیک زهر زنبور عسل بر سلول های T و B، از جمله پاسخ های ثانویه و اثرات آن بر تولید سلول های T سرکوبگر و ماکروفاژها می باشد (۶).

به علت وسعت بروز و وجود مشکلات مفصلی در جوامع امروزی، یافتن راهکارهای جدید درمانی اجتناب ناپذیر است. هر چند ایمنی استفاده مستقیم به کارگیری زهر بر روی بافت طبیعی غضروف نامشخص بوده و تاکنون مطالعه ای انجام نشده است؛ بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی ایمنی و مقایسه تأثیر مستقیم زهر زنبور عسل و ملیتین بر غضروف سالم به روش تزریق داخل مفصلی با کمک روش های هیستولوژیک و ایمونولوژیک انجام شد.

مواد و روش کار

زهر زنبور عسل (*Apis mellifera*) خریداری شده از نژاد زنبور بومی منطقه آذربایجان، کوهستان های مرنده و میشو می باشد که پس از تهیه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تست حیوانی: در مطالعه حاضر از ۱۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات مورد آزمایش از شرکت پارس ایزوتوپ با سن ۳ ماه و به وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم تهیه و در ۳ گروه ۶ تایی در قفس های مجزا نگهداری شد. تغذیه این حیوانات با غذای تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس و به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. حیوانات مورد آزمایش طی مطالعه به مدت ۳۰ روز در قفس های جداگانه نگهداری شدند. در این مدت، شرایط نگهداری و تغذیه موش ها تحت نظارت و به دور از عوامل بیماری زا بود.

گروه اول: به عنوان کنترل بدون هیچ گونه تزریق، نگهداری به مدت ۳۰ روز؛

گروه دوم: تک تزریق داخل مفصلی زهر زنبور با دُز ۱ میلی گرم/کیلوگرم و نمونه برداری در روز سی ام؛

گروه سوم: تک تزریق داخل مفصلی با ملیتین با دُز ۱ میلی گرم / کیلوگرم و نمونه برداری در روز سی ام.

به علت نیاز به بیهوشی عمیق و کامل حیوان در حین تزریق داخل مفصلی از مخلوط ۳۰/۷۰ درصد کتامین / زایلازین استفاده شد که به صورت داخل صفاقی به هر حیوان تزریق شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه از تزریق داروهای هوشبری و حصول اطمینان از بیهوشی کامل حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه، میزان ۱ میلی گرم/کیلوگرم زهر (۷) و ملیتین به داخل مفصل زانوی حیوانات تزریق شد. برای ثابت نگه داشتن و ایجاد بی حرکتی در مطالعه حاضر از هیچ ابزار ثانویه ای، مانند آتل استفاده نشد.

جداسازی ملیتین: جهت انجام مرحله تخلیص ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از سم زنبور در ۱ سی سی آب مقطر حل و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. جداسازی اجزای تشکیل دهنده زهر زنبور عسل به وسیله دستگاه HPLC (Knauer GmbH) فاز معکوس

و با استفاده از ستون C₁₈ به عنوان فاز ساکن و ۲ محلول (استونیتریل - تریفلوئورواستیک اسید ۰/۱ درصد و آب - تریفلوئورواستیک اسید ۰/۱ درصد) به عنوان فاز متحرک، با روش گرادیانت خطی انجام شد. بعد از تزریق نمونه زهر (۲۰ میکرولیتر) به دستگاه، گرادیانت استونیتریل در مدت ۵۰ دقیقه به ۶۵ درصد رسیده و سرعت جریان در تمام مراحل ۱ میلی لیتر در دقیقه بود. جهت مشاهده پیک‌های به دست آمده از طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر از دتکتور UV استفاده شد. پیک مشاهده شده در زمان ۳۵ دقیقه که با منحنی استاندارد مقایسه شد، مربوط به ملیتین بود که جمع‌آوری و جهت لیوفیلیزه، در یخچال نگهداری شد. نمونه جداسده جهت صحت به دستگاه تزریق و پیک ملیتین مشاهده شد (۸).

آزمایش خون: هریک از حیوانات در روز سی‌ام مطالعه، در دیسیکاتور متصل به کپسول دی‌اکسیدکربن قرار داده شدند و شیر کپسول برای حداقل مدت ۵ دقیقه باز شد. پس از قطع تنفس، حیوان بر روی صفحه مخصوص نگهداری متصل و پس از آن خون‌گیری به وسیله سرنگ ۵ میلی لیتری از قلب حیوان انجام شد. نمونه خون در لوله‌های آزمایش فاقد ماده ضد انعقاد برای آزمایشات IL-6 و TNF- α قرار داده شد و به روش الایزا و با کیت‌های (IL6, TNf, cat no: RTA00, R&D, USA) و (CSBE04640r, susabio USA) اندازه‌گیری شد. جهت آزمایش هماتولوژی (CBC) نمونه خون در لوله حاوی ماده ضد انعقاد ریخته شد و با دستگاه سل کانتر، برند سیسمکس KX21N، شمارش سلول‌های خونی، هموگلوبین و هماتوکریت انجام شد.

مطالعه بافت‌شناسی: جهت نمونه هیستولوژی، مفصل زانوی حیوانات جدا و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. کلسیم‌گیری از آن‌ها به مدت ۳ هفته با محلول اسید فرمیک ۵ درصد در دمای اتاق انجام شد. سپس برش‌هایی با ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر طی مراحل معمول برای تهیه مقاطع بافتی تهیه شد. از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین برای مطالعات هیستومورفولوژی استفاده شد. در این خصوص از نرم‌افزار AXIVISION استفاده شد. مطالعات هیستومورفولوژی، شامل بررسی ساختار بافت از نظر ظاهر، پراکندگی، وسعت و ازهم‌پاشیدگی، وجود حفره یا شکاف در ماده زیرین، وجود تغییرات در آرایش سلول‌های غضروفی، تشکیل سلول‌های غضروفی بیضی و یا شرایط غیرطبیعی بود. همچنین رنگ‌های ماسون تری کروم و پریودیک اسید شیف (PAS) برای مطالعات هیستوشیمیایی به کار رفت (۹).

جدول ۱. مشاهده تغییرات ایجاد شده در هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول سفید، گلبول قرمز و پلاکت در گروه‌های تزریق زهر و ملیتین به طور جداگانه با گروه کنترل.

متغیر	ملیتین	زهر زنبور	میانگین $\pm$ انحراف معیار
هماتوگلوبین (گرم درصد)	۱۲/۵۹ $\pm$ ۱/۷	۱۳/۳۲ $\pm$ ۱/۹	کنترل ۱۴/۰ $\pm$ ۰/۱۷
هماتوکریت (درصد)	۴۰/۶۶ $\pm$ ۳/۳۱	۴۵/۱۶ $\pm$ ۱/۳۳	۴۴/۸۹ $\pm$ ۰/۸۱
گلبول سفید ($\times 10^3$)	۹/۸۵ $\pm$ ۱/۱۶	۸/۹۶ $\pm$ ۰/۸	۹/۶۴ $\pm$ ۱/۰۲
گلبول قرمز ($\times 10^3$)	۶/۶۷ $\pm$ ۱/۱۱	۸/۰۳ $\pm$ ۰/۱۵	۷/۷۸ $\pm$ ۰/۲۵
پلاکت ($\times 10^3$)	۷۸۴/۶ $\pm$ ۱۰۸/۳	۷۶۴/۰۷ $\pm$ ۴۹/۴۰	۱۰۵۳/۳۳ $\pm$ ۷۹/۶

جدول ۲. مقایسه تغییرات ایجاد شده در فاکتورهای خونی التهابی گروه‌های تزریق زهر و ملیتین به طور جداگانه با گروه کنترل. $P < ۰/۰۰۱^{***}$, $P < ۰/۰۱^{**}$.

متغیر	ملیتین**	زهر زنبور***	میانگین $\pm$ انحراف معیار
اینترلوکین ۶ پیکوگرم/میلی لیتر	۱۲/۰ $\pm$ ۲۲/۶۹	۱۷/۷۳ $\pm$ ۰/۴۴	کنترل ۷/۶۲ $\pm$ ۰/۹۱
تومور نکروز فاکتور α پیکوگرم/میلی لیتر	۲۳/۴ $\pm$ ۵۳/۷	۳۶/۵۲ $\pm$ ۱/۱۲	۱۱/۸۷ $\pm$ ۱/۰۷

جدول ۳. امتیاز سطح بافتی TNF- α در مغز استخوان و بافت عضلانی اطراف آن از زانوی رت (براساس اسکوربندی داخل متن) ($n=4$)، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های ملیتین و زهر زنبور با کنترل مشاهده نشد علیرغم اینکه افزایش غیرمعنی‌دار در گروه ملیتین بود $P < ۰/۰۵$.

متغیر	ملیتین	زهر زنبور	میانگین $\pm$ انحراف معیار
امتیاز سطح بافتی TNF- α	۴/۵۰ $\pm$ ۱/۲۸	۱/۱۵ $\pm$ ۰/۵۶	کنترل ۱۰/۶۶ $\pm$ ۷/۳

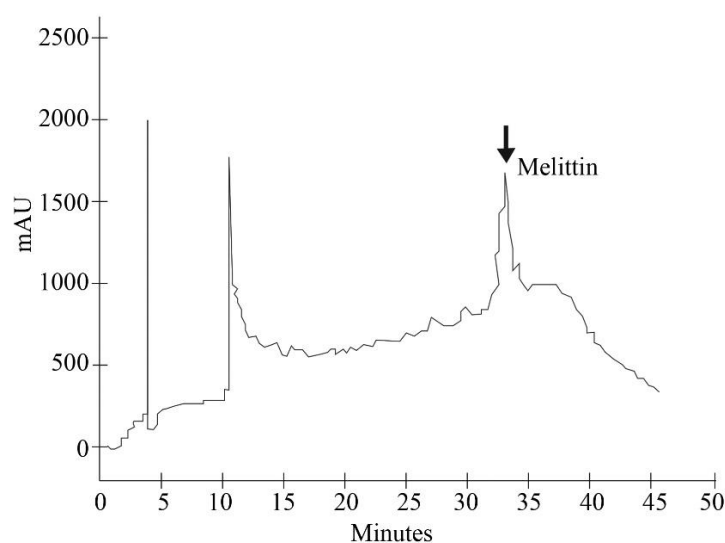
در بررسی ایمونوهیستوشیمی، مقاطع بافت‌شناسی (ضخامت ۲ میکرومتر) پاراتین‌زدایی و هیدراته شدند. لام‌ها با آلبومین سرم گاوی (BSA) به مدت ۳۰ دقیقه برای جلوگیری از واکنش‌های غیراختصاصی انکوبه شدند. پس از آن، در یک محلول بافر سیترات (PH=۶) برای بازیابی آنتی‌ژن جوشانده و با محلول پراکسید هیدروژن برای خاموش کردن فعالیت پراکسیداز درون‌زا انکوبه شدند. مقاطع با آنتی‌بادی اولیه (biorbyt/tnf-alpha-antibody-orb371962) در حمام آب به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شست‌وشوی لام‌ها با بافر مناسب، با افزودن کیت تشخیص (آنتی‌بادی ثانویه، پلیمر، DAB) هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس مقاطع مجدداً شست‌شو داده شدند و رنگ‌آمیزی با استفاده از هماتوکسیلین انجام و تصویر قهوه‌ای انتخاب شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 20$ آنالیز گردید. در نهایت، سطح رنگ‌آمیزی و شدت رنگ‌آمیزی TNF-a به روش Allred پس از چندین آزمایش امتیازدهی شد. داده‌های حاصل از آنالیز تصاویر توسط آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و تست توکی (Tukey's Test) تجزیه و تحلیل شدند.

Proportion score: 0: No cells are immunoreactive. 1: ≤ 1 درصد of cells are immunoreactive. 2: 1-10 درصد of cells are immunoreactive. 3: 35-11 درصد of cells are immunoreactive. 4: 66-34 درصد of cells are immunoreactive. 5: 67-100 درصد of cells are immunoreactive.

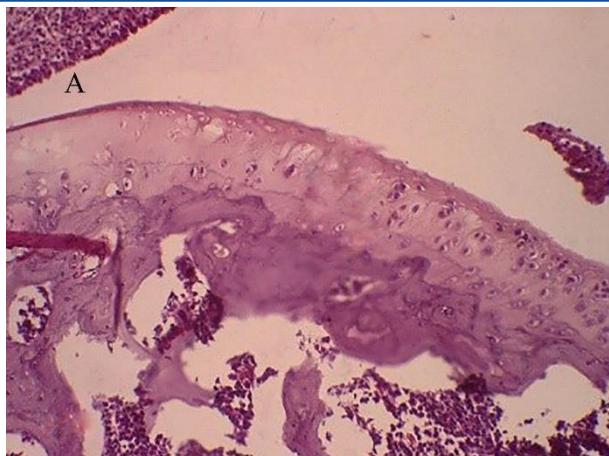
Intensity scores: 0: Negative. 1: Weak. 2: Intermediate. 3: Strong.

Allred score (P+I): 0-1: Negative. 2-3: Weak. 4-6: Moderate. 7-8: Strong

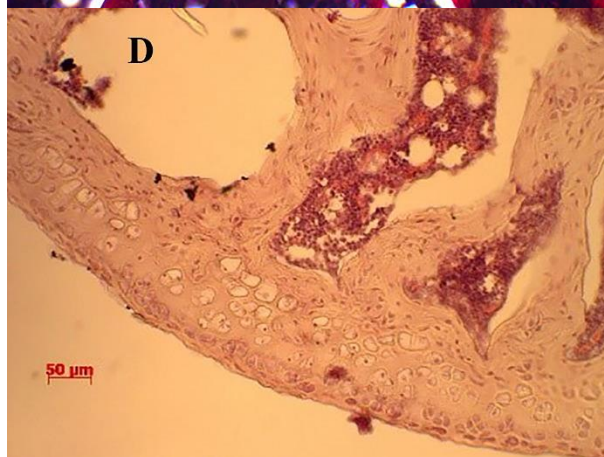
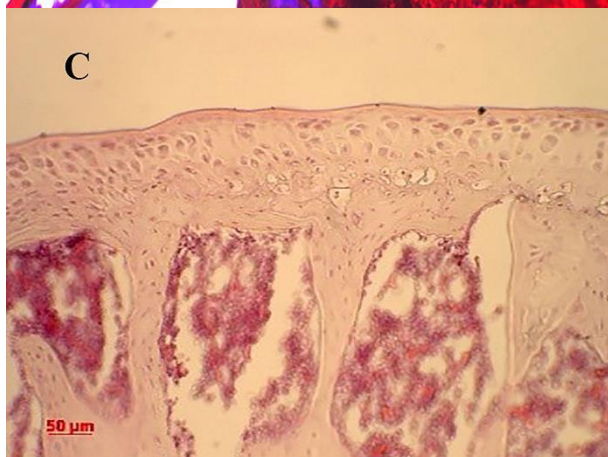
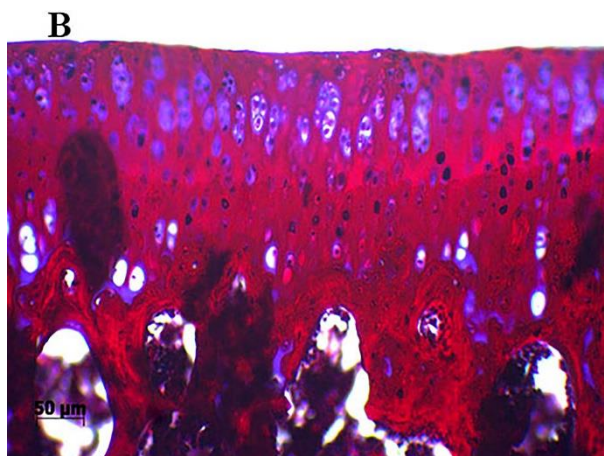
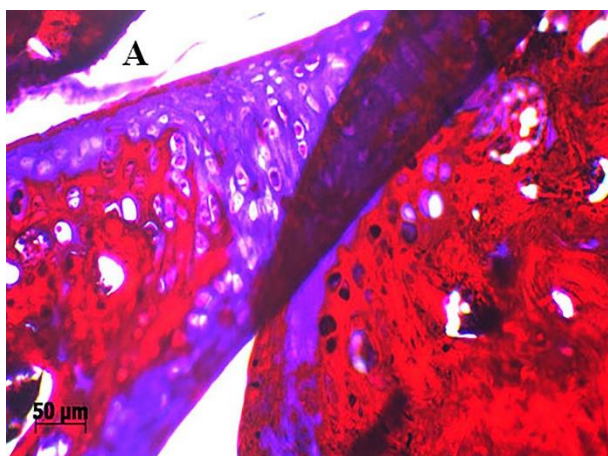
ارزیابی داده‌ها: باتوجه به کمی و پیوسته بودن داده‌ها، تعداد گروه‌های مستقل ارزیابی شدند و نیز اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون کولموگوروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) صورت گرفت. ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و تمام نتایج براساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.



تصویر ۱. کروماتوگرام ملیتین تخلیص شده به روش HPLC فاز معکوس در طول موج ۲۸۰ نانومتر.



تصویر ۲. تصویر میکروگراف مفصل زانوی موش صحرایی رنگ آمیزی شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین، درشت نمایی $20\times$. (A) تغییرات بافت غضروف در تزریق مفصلی زهر در رت سالم. (B) تغییرات بافت غضروف در تزریق مفصلی ملیتین در رت سالم.

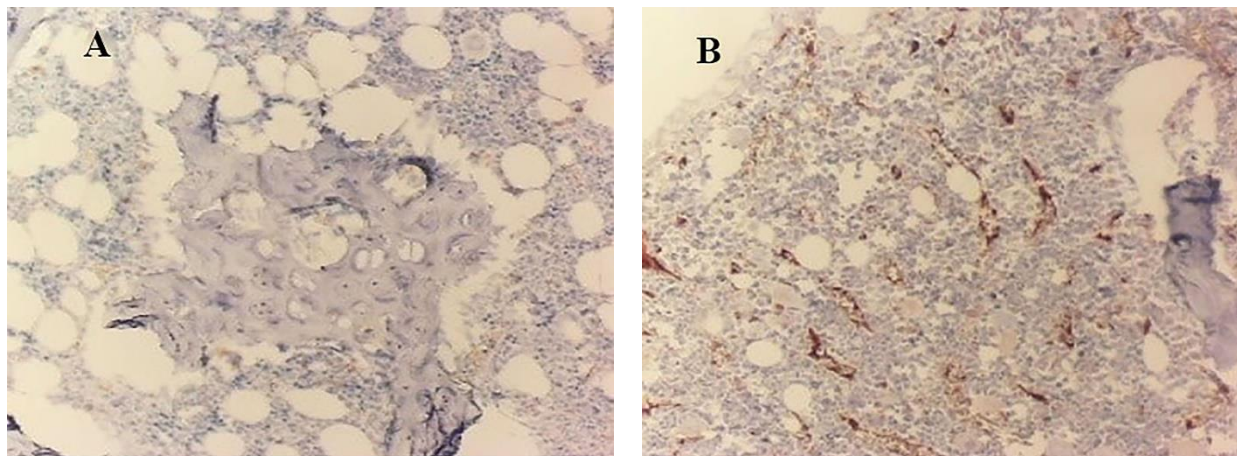


تصویر ۳. تصویر میکروگراف مفصل زانوی موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل، درشت نمایی $20\times$ تغییرات بافتی یا فلش مشخص شد. (A) تغییرات بافت مفصلی در تزریق مفصلی زهر با رنگ آمیزی تریکروم. (B) تغییرات بافت مفصلی در تزریق مفصلی ملیتین با رنگ آمیزی تریکروم. (C) تغییرات بافت مفصلی در تزریق مفصلی زهر با رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف. (D) تغییرات بافت مفصلی در تزریق مفصلی ملیتین رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف.

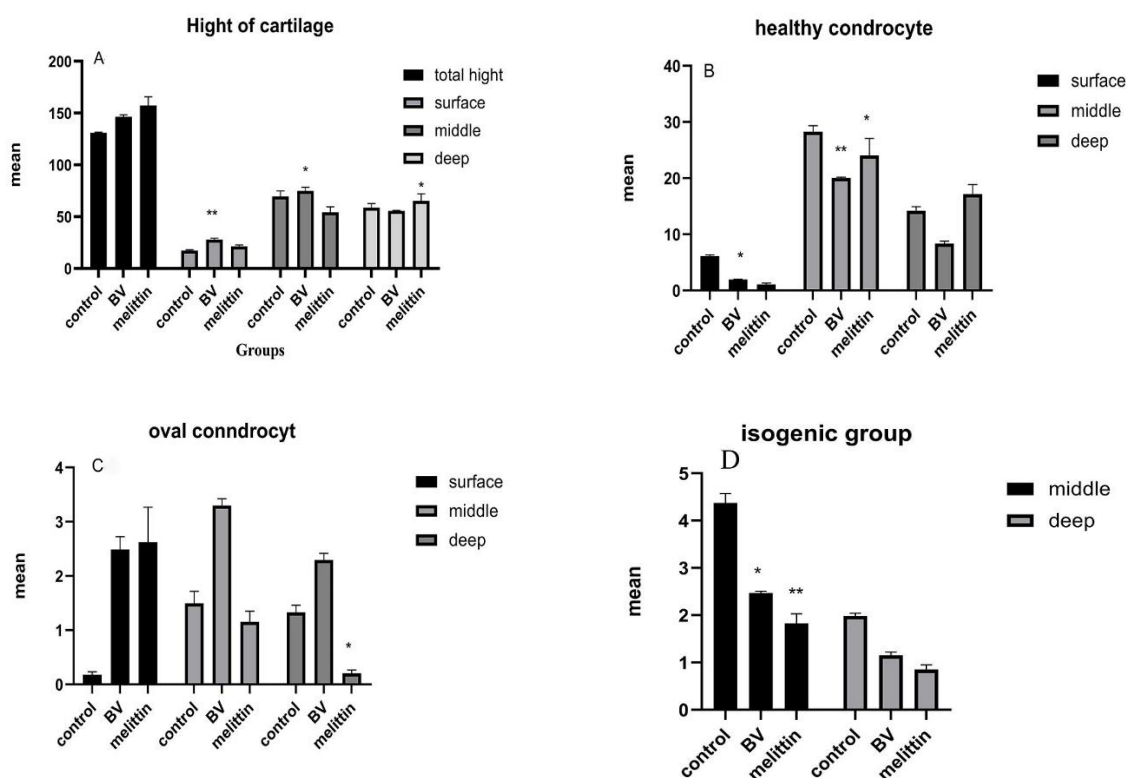
نتایج

نتایج استخراج ملیتین: مشخص شد پپتید ملیتین با غلظت تقریباً ۶۹/۵۸ درصد در زهر زنبور مورد آزمایش وجود دارد (تصویر ۱). حدود ۴ پیک در کروماتوگرام زهر قابل تشخیص بود که بیشترین سطح زیر منحنی بین فراکشن‌های موجود، مربوط به ملیتین بود.

نتایج شمارش سلول‌های خونی، هموگلوبین و هماتوکریت: در بررسی تجویز داخل مفصلی زهر زنبور و ملیتین مشخص شد زهر و ملیتین تغییرات معنی‌داری در سطح گلبول‌های قرمز و سفید خون، هموگلوبین و هماتوکریت ایجاد نمی‌کنند. درمورد تعداد پلاکت، کاهش غیرمعنی‌داری در گروه‌های مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد دیده شد (جدول ۱).



تصویر ۴. تصویر میکروگراف از مغز استخوان موش صحرایی در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی TNFα با درشت‌نمایی $100\times$ (A)، تغییرات بافت مغز استخوان در تزریق مفصلی زهر زنبور (B) تغییرات بافت مغز استخوان در تزریق مفصلی ملیتین.



تصویر ۵. مشاهده تغییرات ایجادشده در غضروف زانوئی رت در ۳ سطح بافتی گروه‌های تزریق زهر و ملیتین به‌طور جداگانه با گروه سالم (A) ضخامت لایه‌های غضروفی در لایه‌های سطحی، میانی و عمقی غضروف (B) تعداد کندروسیت سالم (C) تعداد کندروسیت بیضی‌شکل (D) گروه ایزوژنیک (E) لاکونا. $P < 0.01$, $P < 0.05$.

نتایج بررسی فاکتورهای التهابی در خون: نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار فاکتورهای التهابی در هر دو گروه تزریق زهر ($P < 0.01$) و ملیتین ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل بود (جدول ۲).

مقایسه تغییرات بافتی غضروف مفصل در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین در اثر تزریق داخل مفصلی زهر و ملیتین: تعداد کندروسیت‌ها کاهش معنی‌دار در لایه سطحی و میانی با تزریق زهر نشان داد. همچنین ملیتین باعث کاهش معنی‌دار کندروسیت در لایه میانی شد (۲B). تعداد کندروسیت‌های بیضی در اثر تزریق زهر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، اما با تزریق ملیتین کاهش معنی‌دار نشان داد (۲C). همچنین تغییرات در تعداد لاکونا اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. تعداد گروه‌های ایزوژنیک در هر دو گروه زهر و ملیتین با کاهش در لایه سطحی همراه بود (۲D). **تصویر ۲** نمایش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین می‌باشد.

همان‌طور که در **تصویر ۳** مشاهده می‌شود در رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون در گروه BV کاهش رشته‌های کلاژن (رنگ آبی) و به هم‌ریختگی در ماده زمینه دیده می‌شود. در گروه ملیتین نیز کاهش رشته‌های کلاژن با کاهش رنگ‌پذیری ماده زمینه غضروف مشاهده شد. در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف در گروه BV افزایش کندروسیت‌ها قابل مشاهده است. نسبت ماده زمینه کمتر و همچنین تعداد لاکونای خالی در لایه عمقی افزایش داشت. تزریق ملیتین به تنهایی باعث به هم‌ریختگی ماده زمینه در لایه‌های غضروفی شده است.

ایمونوهیستوشیمی: در گروه BV بیان $TNF-\alpha$ در مغز استخوان و بافت عضلانی و بافت‌های همبندی اطراف آن تقریباً منفی است. در گروه ملیتین بیان $TNF-\alpha$ در مغز استخوان مثبت، قوی و بالا است و در بافت عضلانی و بافت‌های همبندی اطراف تقریباً منفی است (**تصویر ۴**). همان‌طور که در **جدول ۳** نمایش داده شده است، در بیان بافتی $TNF-\alpha$ ، به ترتیب یک افزایش و کاهش در بیان $TNF-\alpha$ در اثر تزریق ملیتین و زهر مشاهده شد. هرچند در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود.

تغییرات بافتی غضروف در ۳ لایه سطحی، میانی و عمقی مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در **تصویر ۵** نشان داده شده است، افزایش معنی‌دار ارتفاع غضروف در لایه سطحی و میانی در اثر تزریق زهر مشاهده شد. همچنین در لایه عمقی افزایش معنی‌دار ارتفاع در گروه دریافت‌کننده ملیتین مشاهده گردید. علی‌رغم اینکه در ارتفاع کلی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت.

بحث

ایده استفاده از زهر زنبور در زمینه دارویی از این باور ناشی شد که زنبورداران به‌ندرت از روماتیسم یا درد مفاصل رنج می‌بردند (۳). زهر زنبور به‌طور گسترده در مطالعات جهت درمان برخی بیماری‌ها، از جمله آرتریت روماتوئید در طب سنتی شرق کاربرد داشته است (۱). برای درمان بیماری‌های مفصلی، مانند استئوآرتریت از روش‌های متعددی، از جمله تزریق داخل مفصلی استفاده می‌شود (۱۰). از مزایای این روش انجام شدن آن در زمان کوتاه با ایجاد کمترین حساسیت است. هرچند تزریق اشتباه می‌تواند با درد شدیدی همراه باشد (۱۱).

BV حاوی ترکیبات بسیاری، از جمله هیستامین، فسفولیپاز A₂ ملیتین می‌باشد. هیستامین تحت عنوان سم عصبی در واکنش‌های آلرژیک گاه مرگبار دخیل است و فسفولیپاز A₂ فسفولیپیدهای غشای سلولی را تجزیه می‌کند. همچنین ملیتین، یک مولکول با فعالیت لیزکنندگی بالاست که به عنوان سم عمل می‌کند (۱۲). از آنجاکه ملیتین به عنوان ترکیب اصلی زهر زنبور است، علاقه به خواص دارویی ملیتین در دهه‌های اخیر به شدت افزایش یافته است. بسته به غلظت آن، این بیوپپتید می‌تواند منافذ گذرا (جهت عبور یون‌ها) یا پادار (جهت عبور مولکول‌های بزرگ مانند گلوکز) را القا کند. تشکیل منافذ ناشی از ملیتین مسئول فعالیت‌های همولیتیک آن است (۳).

اگرچه فهرست اثرات سودمند گزارش شده از درمان نیش زنبور عسل طولانی است، اما بیشتر مطالعات در شرایطی انجام شده است که استانداردهای دقیق پزشکی را برآورده نمی‌کند و به نظر می‌رسد اساساً براساس شواهد حکایتی باشد. به همین دلیل و به دلیل عدم وجود کارآزمایی‌های کنترل شده، قضاوت نهایی در مورد اثربخشی درمان BV هنوز وجود ندارد. با وجود این، درمان BV به‌طور فزاینده‌ای محبوبیت پیدا کرده است (۱۳)؛ بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی ایمنی و مقایسه تغییرات بافت‌شناسی و فاکتورهای خونی بر اثر تک‌تزریق زهر زنبور و ملیتین در مفصل زانوی موش صحرایی سالم نر می‌باشد.

در مطالعه حاضر ملیتین با تکنیک RP-HPLC جدا شد. کروماتوگرام به دست آمده از تجزیه زهر زنبور ایرانی نشان داد ملیتین بیش از ۶۰ درصد از وزن زهر را شامل شده است. این نتایج با مطالعات Helena RC و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطابقت داشت (۱۴).

در مطالعات هماتولوژی تغییر معنی‌داری در میزان هموگلوبین و هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد. البته در مطالعه Mabrouk A و همکاران در سال ۲۰۲۳، افزایش کمی در غلظت هموگلوبین و هماتوکریت گزارش شده است (۱۳). این تفاوت می‌تواند ناشی از روش به‌کارگیری که به‌صورت تزریق زیرجلدی بوده است و همچنین دُز به‌کاررفته (۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) باشد. مشاهدات مطالعه حاضر در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های دریافت‌کننده زهر زنبور و ملیتین با گروه شاهد نشان نداد. این یافته مشابه با مطالعه Melig و همکاران در سال ۲۰۲۰ بود (۱۵). البته در مطالعه Melig و همکاران در سال ۲۰۲۰ تزریق زهر به‌صورت داخل‌صفاقی به‌مدت ۲ ماه هر روز انجام شد. علاوه‌براین کاهش غیرمعنی‌داری در تعداد پلاکت در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. این یافته هم‌راستا با مطالعات Mohammed و همکاران در سال ۲۰۱۹ می‌باشد (۱۶). در این راستا، Darwish و همکاران در سال ۲۰۲۱ تأخیر در لخته شدن خون به‌دلیل وجود فسفولیپاز A۲ را گزارش کردند (۱۷).

یافته‌های مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در فاکتورهای التهابی $TNF-\alpha$ و IL-6 را نشان داد که این نتایج با گزارش Mabrouk A و همکاران در سال ۲۰۲۳ که از دُزهای ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم استفاده کردند مطابقت نداشت. البته مطالعه Stuhlmeier KM در سال ۲۰۰۷ نشان داد ملیتین و زهر زنبور فعال‌سازی NF-kB ناشی از $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ در سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست بیماران روماتوئید را مهار نکردند (۶). این نتیجه مشابه با مطالعه Seong-Su Nah و همکاران در سال ۲۰۰۷ بود (۱۸). همچنین بنابر گزارش Mohanny در سال ۲۰۱۴ زهر زنبور به‌عنوان یک ماده طبیعی می‌تواند باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی در جوجه‌ها شود، اما عوارض نامطلوب به جا نمی‌گذارد (۱۱). البته علی‌رغم افزایش سرمی $TNF-\alpha$ در مطالعات ایمونوهیستوشیمی مطالعه حاضر، افزایش معنی‌داری در بیان بافتی $TNF-\alpha$ مشاهده نشد. TNF به ۲ شکل ترشحی یا متصل به غشا وجود دارد که عمدتاً از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها جدا می‌شود، اما انواع سلول‌های دیگر مانند لنفوسیت‌های T و B، ماست سل‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی، نوتروفیل‌ها، فیبروبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها نیز می‌توانند TNF تولید کنند (۱۹). IL-6 که از گلبول‌های سفید، ماکروفاژها و فیبروبلاست ترشح می‌شود، جزء پروتئین‌های فاز حاد محسوب شده و در پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارد (۲۰). باتوجه‌به موارد ذکرشده، بالا بودن سایتوکاین‌های سرمی مذکور می‌تواند دلیلی بر ایجاد واکنش‌های حساسیتی توسط ملیتین و فسفولیپاز باشد. از طرفی باتوجه‌به اینکه سلول‌های متفاوتی می‌توانند در تولید TNF نقش داشته باشند، یافتن این تغییرات و ارتباط بین سطح سرمی و بافتی TNF به مطالعات بیشتر در آینده نیاز دارد.

مطالعات بافت‌شناسی انجام‌شده در مطالعه حاضر برخی تغییرات در ارتفاع غضروف، تعداد کندروسیت و لاکونا در لایه‌های مختلف غضروف در گروه تزریق زهر و ملیتین را نشان داد. افزایش ارتفاع غضروف در لایه سطحی و میانی به‌طور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده زهر زنبور بیشتر از گروه ملیتین بود. علی‌رغم کاهش کندروسیت در هر دو گروه، افزایش غیرمعنی‌دار لاکونا در گروه ملیتین قابل مشاهده است. همچنین کاهش رشته‌های کلاژن و به‌هم‌ریختگی ماده زمینه در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف و تریکروم ماسون در هر دو گروه دریافت‌کننده زهر زنبور و ملیتین مورد تأیید قرار گرفت. مطالعه‌ای که Stuhlmeier KM در سال ۲۰۰۷ بر روی سلول‌های فیبروبلاست مشابه سینوویوسیت انجام دادند، نشان داد زهر زنبور موجب آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. همان‌طور که مشخص است رادیکال‌های آزاد موجب تخریب بافتی می‌شوند که ممکن است در بدن این تأثیرات منفی با تولید کلاژناز و یا اینترلوکین ۸ تقویت شود (۶).

در مطالعاتی تأثیرات ضدالتهابی، ضددرد و ضدسرطانی زهر زنبور عسل گزارش شده است که احتمالاً مرتبط با اجزای فعالی مانند ملیتین و فسفولیپاز A۲ است. گرچه هنوز اساس فارماکولوژیک زهر زنبور به‌درستی شناخته نشده است (۲۱، ۲۲)، اما ترکیب فسفولیپاز A۲ در زهر مار نیز به‌عنوان ترکیب مؤثر شناخته شده است (۲۳). این آنزیم به‌عنوان یک آلرژن مهم در زهر زنبور عسل هم مطرح می‌باشد (۲۴). در مطالعه‌ای که Bomalaski و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام دادند نشان داده شد فسفولیپاز A۲ می‌تواند باعث تحریک سایتوکاین‌های التهابی از جمله TNF شود (۲۵). همین‌طور در مطالعه دیگری که Ribardo DA و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام دادند، نشان داده شد ملیتین به‌علت خاصیت آمفی‌پاتیک وارد غشای فسفولیپید شده و دارای خوشه در قسمت c-terminal می‌باشد. مطالعات زیادی نشان دادند قسمت c-terminal می‌تواند باعث واکنش‌های آلرژیک شود. همین‌طور بررسی اثر ملیتین بر روی سلول‌های

یوکاریوسیت، افزایش بیان $TNF-\alpha$ را نشان داد (۱۲). ملیتین به ۲ فرم مونومر و تترامر است که فرم مونومر آن دارای سمیت می‌باشد و تغییرات وابسته به دُز در غشا ایجاد می‌کند (۲۶).

نتیجه‌گیری نهایی: باتوجه به کاربردهای زهر زنبور عسل در کنترل آرتریت روماتوئید و بیماری‌های مفصلی، مطالعه‌ای در زمینه ایمنی زهر زنبور و اجزای اصلی آن در تجویز داخل مفصلی انجام نشده است. براساس نتایج مطالعه حاضر تزریق داخل مفصلی زهر زنبور و ملیتین به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزای زهر، تغییرات هماتولوژیک در شرایط یکسان نداشته است. هرچند افزایش معنی‌دار سطح بیومارکرهای التهابی $TNF-\alpha$ و IL-6 به مطالعات تکمیلی نیاز دارد. همچنین در بافت‌شناسی غضروف برخی تغییرات مانند کاهش تعداد کندروسیت‌های سالم لایه میانی مشاهده شد. با وجود اثرات درمانی و ارزشمند گزارش شده از زهر زنبور عسل به نظر می‌رسد اظهارنظر در رابطه با ایمنی زهر منوط به مطالعات بیشتر و گسترده‌تری است. مطالعه حاضر اطلاعات اولیه بالارزشی را درباره ارزیابی ایمنی زهر زنبور و اجزای آن فراهم می‌کند.

ملاحظات اخلاقی

تمام مراحل مطابق با دستورالعمل‌های محلی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی (با شماره تأییدیه اخلاقی: IR.UT.VETMED.REC.1402.37) انجام شد.

حامی مالی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح شماره ۴۰۱۴۳۰۷ انجام شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان از حوزه پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به سبب حمایت‌های مالی و معنوی تشکر می‌کند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Jaafar FS, Albushabaa SHH. General study of honey bee venom *Apis mellifera*: A Review, J Appl Health Sci Med. 2025;5(1):12-8. doi: 10.58614/jahsm512
2. Carpena M, Nuñez-Estevez B, Soria-Lopez A, Simal-Gandara J. Bee venom: an updating review of its bioactive molecules and its health applications. Nutrients. 2020;12(11):3360. doi: 10.3390/nu12113360 PMID: 33142794
3. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier J-M, Fajloun Z. Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. Molecules. 2019;24(16):2997. doi: 10.3390/molecules24162997 PMID: 31430861
4. Lee WR, Pak SC, Park KK. The protective effect of bee venom on fibrosis causing inflammatory diseases. Toxins. 2015;7(11):4758-72. doi: 10.3390/toxins7114758
5. Ali M. Studies on bee venom and its medical uses. Int J Adv Res Technol. 2012;1(2):69-83.
6. Stuhlmeier KM. *Apis mellifera* venom and melittin block neither NF- κ B-p50-DNA interactions nor the activation of NF- κ B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. J Immunol. 2007;179(1):655-64. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.655 PMID: 17579088
7. Nipate S, Hurali PB, Ghaisas M. Evaluation of anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-arthritis activities of Indian *Apis dorsata* bee venom in experimental animals: biochemical, histological, and radiological assessment. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015;37(2):171-84. doi: 10.3109/08923973.2015.1009996 PMID: 25689950

8. Haghi G, Hatami A, Mehran M. Qualitative and quantitative evaluation of melittin in honeybee venom and drug products containing honeybee venom. J Apic Sci. 2013;57(2):37-44. [doi: 10.2478/jas-2013-0015](https://doi.org/10.2478/jas-2013-0015)
9. Mazidi SM, Morovvati H, Yavari K. Histological evaluation of radiocolloidal Yttrium-90-hydroxyapatite in Enrofloxacin-Induced Rheumatoid Arthritis in the rat knee Joint. YUMSJ. 2019;24(4):577-596.
10. Lee S-H, Kwon G-S, Kang M-S, Yoon H-M, Kim C-H. Comparative study on the effects of bee venom pharmacopuncture according to the treatment method for knee osteoarthritis. J Pharmacopuncture. 2012;15(4):7. [doi: 10.3831/KPI.2012.15.011](https://doi.org/10.3831/KPI.2012.15.011)
11. Ali A, Mohanny K. Effect of injection with bee venom extract on productive performance and immune response of broiler chicks. J Anim Poult Product. 5(5):237-246. 2014;5(5):237-46. [doi: 10.21608/jappmu.2014.69561](https://doi.org/10.21608/jappmu.2014.69561)
12. Ribardo DA, Peterson JW, Chopra AK. Phospholipase A 2-activating protein-An important regulatory molecule in modulating cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor production during inflammation. Indian J Exp Biol. 2002;40(2):129-38. [PMID: 12622174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12622174/)
13. Abo-Zaid MA, Yatimi KA, Ismail AH. The role of bee venom on immunological and hematological parameters in albino rats. Egypt J Immunol. 2023;30(2):11-25 [PMID: 37031394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37031394/)
14. Rybak-Chmielewska H, Szczęsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. JAS. 2004;48(2):103-9.
15. Meligi NM, Ismail SA, Tawfik NS. Protective effects of honey and bee venom against lipopolysaccharide and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats. J Tox Res. 2020;9(5):693-705. [doi: 10.1093/toxres/tfaa077](https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa077) [PMID: 33178430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33178430/)
16. Mohammed ZI, Hassan AJ. Effect of bee venom on some blood and biochemical parameters in formaldehyde induced arthritis male rats in comparison with prednisolone drug. J Phys Conf Ser. 2019: IOP Publishing. [doi: 10.1088/1742-6596/1234/1/012066](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1234/1/012066)
17. Darwish DA, Masoud HM, Abdel-Monsef MM, Helmy MS, Zidan HA, Ibrahim MA. Phospholipase A2 enzyme from the venom of Egyptian honey bee *Apis mellifera lamarckii* with anti-platelet aggregation and anti-coagulation activities. J Genetic Eng and Biotechnol. 2021;19(1):10. [doi: 10.1186/s43141-020-00112-z](https://doi.org/10.1186/s43141-020-00112-z) [PMID: 33443641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33443641/)
18. Nah S-S, Ha E, Mun SH, Won H-J, Chung J-H. Effects of melittin on the production of matrix metalloproteinase-1 and-3 in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes. J Pharmacol Sci. 2008;106(1):162-6. [doi: 10.1254/jphs.sc0070215](https://doi.org/10.1254/jphs.sc0070215) [PMID: 18212480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18212480/)
19. Chisari E, Yaghmour K, Khan W. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. Osteoarthritis Cartilage. 2020;28(5):708-18. [doi: 10.1016/j.joca.2019.09.008](https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.09.008)
20. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. J Ann Surg. 1992;215(4):356. [doi: 10.1097/00000658-199204000-00009](https://doi.org/10.1097/00000658-199204000-00009)
21. Chen J, Lariviere WR. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. J Pneurol. 2010;92(2):151-83. [doi: 10.1016/j.pneurol.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.pneurol.2010.06.006) [PMID: 20558236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20558236/)
22. Kasozi KI, Niedbala G, Alqarni M, Zirintunda G, Ssempijja F, Musinguzi SP, et al. Bee venom—a potential complementary medicine candidate for SARS-CoV-2 infections. J Fpubh. 2020;8:594458. [doi: 10.3389/fpubh.2020.594458](https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.594458) [PMID: 33363088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33363088/)
23. Péterfi O, Boda F, Szabó Z, Ferencz E, Bába L. Hypotensive snake venom components—a mini-review. J Molecules. 2019;24(15):2778. [doi: 10.3390/molecules24152778](https://doi.org/10.3390/molecules24152778) [PMID: 31370142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31370142/)
24. Sedigheh N, Mohammad T, Sara A, Mahsa Shah B, Abbas GS, Zahra A. Generating S Cell Line for Producing Recombinant Phospholipase A2 of Honey Bee (*Apis mellifera*). J Vet Res. [doi: 10.22059/jvr.2023.339344.3243](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.339344.3243)
25. Bomalaski JS, Ford T, Hudson AP, Clark MA. Phospholipase A2-activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocytes. J Immunol. 1995;154(8):4027-31.
26. Yao J, Li X, Lin M, Han Z, Wang X, Guo J, et al. Bifunctional copper ion/melittin incorporated hydrogel with antimicrobial and antioxidant capabilities for infected skin wound healing. J Mat Des. 2025;113631. [doi: 10.1016/j.matdes.2025.113631](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2025.113631)