

Влияние мелиттина яда пчелы на жизнеспособность клеток различных линий рака предстательной железы

Р.Р. Халиков¹, Д.Д. Громенко^{2*}, С.Ш. Галимова², К.В. Данилко², И.Д. Громенко², Ш.Н. Галимов², П.Ф. Литвицкий¹

Халиков Руслан Ринатович — студент 5-го курса, orcid.org/0000-0001-8462-9276

Громенко Дарья Дмитриевна — студентка 5-го курса, orcid.org/0000-0001-5638-1779

Галимова Саида Шамильевна — кафедра терапии и сестринского дела, orcid.org/0000-0002-7865-8326

Данилко Ксения Владимировна — к.б.н., Центральная научно-исследовательская лаборатория, лаборатория клеточных культур, orcid.org/0000-0002-4374-2923

Громенко Иван Дмитриевич — кафедра биологической химии, orcid.org/0000-0001-8582-660X

Галимов Шамиль Нариманович — д.м.н., профессор, кафедра биологической химии, orcid.org/0000-0002-5871-5151

Литвицкий Пётр Францевич — д.м.н., чл.-корр. РАН, кафедра патофизиологии, orcid.org/0000-0003-0151-9114

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Россия, Москва

²Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

* **Контакты:** Громенко Дарья Дмитриевна, e-mail: dasha.gromenko@mail.ru

Аннотация

Введение. Мелиттин является основным компонентом пчелиного яда и представляет собой водорастворимый пептид, обладающий свойствами поверхностно-активного вещества, цитолитические эффекты которого потенциально могут быть полезными в качестве противоопухолевой терапии. Нами проведена оценка влияния мелиттина из яда «башкирской» пчелы (*Apis mellifera mellifera* L.) на жизнеспособность клеток различных линий рака предстательной железы. **Материалы и методы.** Для оценки воздействия мелиттина на пролиферацию клеток различных линий рака предстательной железы (РПЖ) разной степени злокачественности: LNCaP, PC-3, DU145 проведен МТТ-тест и последующий анализ показателя жизнеспособности клеток. **Результаты и обсуждение.** Выявлена низкая чувствительность к мелиттину клеток линии DU145: подавляющее воздействие на процесс их пролиферации оказала относительно высокая концентрация пептида — 10 мкг/мл. Для линии клеток PC-3 его концентрация в 0,1 мкг/мл в значительной степени подавляла пролиферацию клеток до уровня 46,15 %, а мелиттин в дозе 10 мкг/мл оказал цитолитическое действие на большую часть клеток (4,27 % жизнеспособности). Для клеток линии LNCaP концентрация мелиттина 10 мкг/мл оказалась наименее токсичной по сравнению с линиями PC-3 и DU145. Показано подавление пролиферации клеток линий РПЖ: LNCaP, PC-3, DU145 под действием мелиттина в дозе 0,01–100,00 мкг/мл. **Заключение.** В исследовании выявлено значительное снижение жизнеспособности клеток линий РПЖ в минимальной концентрации мелиттина в 0,01 мкг/мл, что показывает высокую цитолитическую активность данного пептида и делает его потенциальным кандидатом для применения в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: мелиттин, рак предстательной железы, жизнеспособность клетки, клеточная пролиферация, клетки линии PC-3, клетки линии DU145, клетки линии LNCaP, противоопухолевая терапия

Для цитирования: Халиков Р.Р., Громенко Д.Д., Галимова С.Ш., Данилко К.В., Громенко И.Д., Галимов Ш.Н., Литвицкий П.Ф. Влияние мелиттина яда пчелы на жизнеспособность клеток различных линий рака предстательной железы. Креативная хирургия и онкология. 2022;12(2):118–122. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2022-12-2-118-122>

Impact of Honeybee Venom Melittin on Cell Viability of Different Prostate Cancer Lineages

Ruslan R. Khalikov¹, Darya D. Gromenko^{2,*}, Saida Sh. Galimova², Ksenia V. Danilko², Ivan D. Gromenko², Shamil N. Galimov², Petr F. Litvitsky¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

² Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

* **Correspondence to:** Darya D. Gromenko, e-mail: dasha.gromenko@mail.ru

Abstract

Background. Melittin is a major constituent of honeybee venom and comprises a water-soluble surfactant peptide with cytolytic effects potentially applicable in anticancer therapy. We evaluated the impact of melittin from Bashkir honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) venom on cell viability of various prostate cancer lineages. **Materials and methods.** MTT assays with cell viability index estimation were used to evaluate the effect of melittin on cell proliferation in various-grade malignancy prostate cancer (PC) lineages, LNCaP, PC-3 and DU145. **Results and discussion.** Lineage DU145 revealed a low sensitivity to melittin, because a relatively high peptide concentration of 10 µg/mL had a suppressive effect on its proliferation. With PC-3 cells, a 0.1 µg/mL concentration suppressed proliferation significantly to 46.15 %, while melittin at a 10 µg/mL dose had a cytolytic effect on most cells (4.27 % viability). LNCaP cells experienced the lowest toxicity at 10 µg/mL melittin compared to PC-3 and DU145 lineages. The LNCaP, PC-3 and DU145 PC lineages demonstrated suppressed proliferation at melittin levels 0.01–100 µg/mL. **Conclusion.** The study reveals a significant reduction of the PC lineages viability at a minimal melittin concentration of 0.01 µg/mL, which indicates a high cytolytic activity of this peptide and renders it a candidate agent in antitumour therapy.

Keywords: melittin, prostate cancer, cell viability, cell proliferation, PC-3 cells, DU145 cells, LNCaP cells, antitumour therapy

For citation: Khalikov R.R., Gromenko D.D., Galimova S.Sh., Danilko K.V., Gromenko I.D., Galimov Sh.N., Litvitskiy P.F. Impact of honeybee venom melittin on cell viability of different prostate cancer lineages. *Creative Surgery and Oncology*. 2022;12(2):118–122. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2022-12-2-118-122>

ВВЕДЕНИЕ

На долю рака предстательной железы (РПЖ), легких и колоректального рака приходится почти половина (48 %) всех случаев заболевания у мужчин, причем только на РПЖ приходится 27 % всех диагнозов [1]. При РПЖ используется хирургическое удаление новообразования, радио-, гормоно- и химиотерапия. Основной причиной низкой эффективности существующих методов лекарственной терапии является ее неклональная направленность, т.е. невозможность воздействия на все клоны опухолевой популяции, разнообразие которых в опухоли достаточно широко и определяет феномен внутриопухолевой гетерогенности. Этот феномен играет существенную роль в реализации различных клинических проявлений опухолевой прогрессии и рассматривается как один из основных факторов, определяющих развитие новообразования, поддержание онкогенного потенциала, выживание клеток в условиях динамичного микроокружения и устойчивость опухоли к лекарственному воздействию [2]. В связи с этим поиск молекул, позволяющих эффективно

воздействовать на все опухолевые популяции, является крайне важной задачей.

Одной из таких перспективных молекул является пептид мелиттин, основной токсин пчелиного яда, составляющий около 50 % от его сухого веса [3]. Промышленный способ получения пчелиного яда основан на электростимуляции пчел слабым электрическим током, под действием которого они выделяют яд на стеклянные листовые сборники [4].

Мелиттин образован 26 остатками аминокислот. В водной среде он формирует амфифильный тетрамер, что придает ему свойства катионного детергента с высокой поверхностной активностью [5]. В предыдущих исследованиях описаны противовирусные, антибактериальные, противогрибковые, противопаразитарные и противоопухолевые свойства мелиттина, и на данный момент считается, что главный эффект этого вещества как неселективного цитолитического пептида заключается в физическом и химическом разрушении всех прокариотических и эукариотических клеточных мембран [6–10]. Мелиттин связывается с отрицательно

Ruslan R. Khalikov — Graduate Student (5th year), orcid.org/0000-0001-8462-9276

Darya D. Gromenko — Graduate Student (5th year), orcid.org/0000-0001-5638-1779

Saida Sh. Galimova — Department of Therapy and Nursing, orcid.org/0000-0002-7865-8326

Ksenia V. Danilko — Cand. Sci. (Biol.), Central Research Laboratory, Laboratory of Cell Culturing, orcid.org/0000-0002-4374-2923

Ivan D. Gromenko — Department of Biological Chemistry, orcid.org/0000-0001-8582-660X

Shamil N. Galimov — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Biological Chemistry, orcid.org/0000-0002-5871-5151

Petr F. Litvitsky — Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Pathophysiology, orcid.org/0000-0003-0151-9114

заряженной поверхностью мембраны и затем нарушает целостность фосфолипидных бислоев путем образования пор, приводящих к утечке атомарных ионов и молекул и повышению проницаемости, что в конечном счете приводит к лизису клеток [11].

В настоящее время предлагаются различные механизмы доставки мелиттина к клеткам-мишеням, которыми могут являться и раковые клетки простаты [12], молочных желез [13], яичников [14] и печени [15], на развитие которых он оказывает ингибирующее действие.

Целью настоящего исследования являлась оценка механизмов влияния мелиттина яда «башкирской» пчелы на пролиферацию клеток различных линий рака предстательной железы разной степени злокачественности: LNCaP, PC-3, DU145.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мелиттин получен из яда «башкирской» пчелы (*Apis mellifera mellifera* L.) в Центре прототипирования в области нефтехимии ГУП «Института нефтехимпереработки РБ» (Карчевский С.Г.).

В исследовании использованы различные линии клеток новообразований: LNCaP (аденокарцинома предстательной железы, метастаз в лимфатический узел, эпителиоподобная), PC-3 (карцинома предстательной железы, метастаз в кость, эпителиоподобная), DU145 (аденокарцинома предстательной железы, метастаз в мозг, эпителиоподобная).

Влияние мелиттина на пролиферацию клеток трех линий рака предстательной железы оценивалось с помощью МТТ-теста. Этот тест основан на способности оксидоредуктаз клетки превращать желтый тетразолиевый краситель — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый пурпурный формазан. На этом основании рассчитывали показатель оптической плотности.

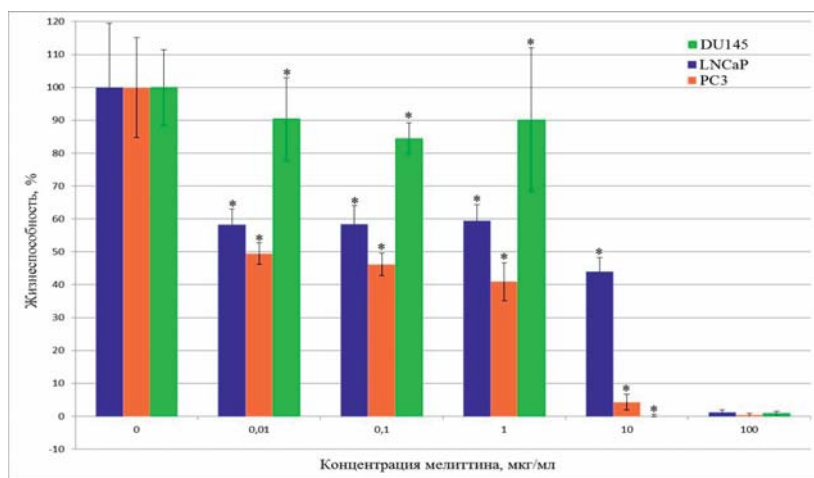


Рисунок 1. Уровень жизнеспособности клеток (в % от контроля) в зависимости от концентрации мелиттина в среде.

* — статистически значимые различия, полученные с использованием критерия Манна — Уитни в ходе попарного сравнения уровней жизнеспособности клеток линий LNCaP/PC-3, PC-3/DU145, LNCaP/DU145, $p < 0,05$ ($p = 0,0286$)

Figure 1. Cell viability (% of control) by melittin concentration in medium.

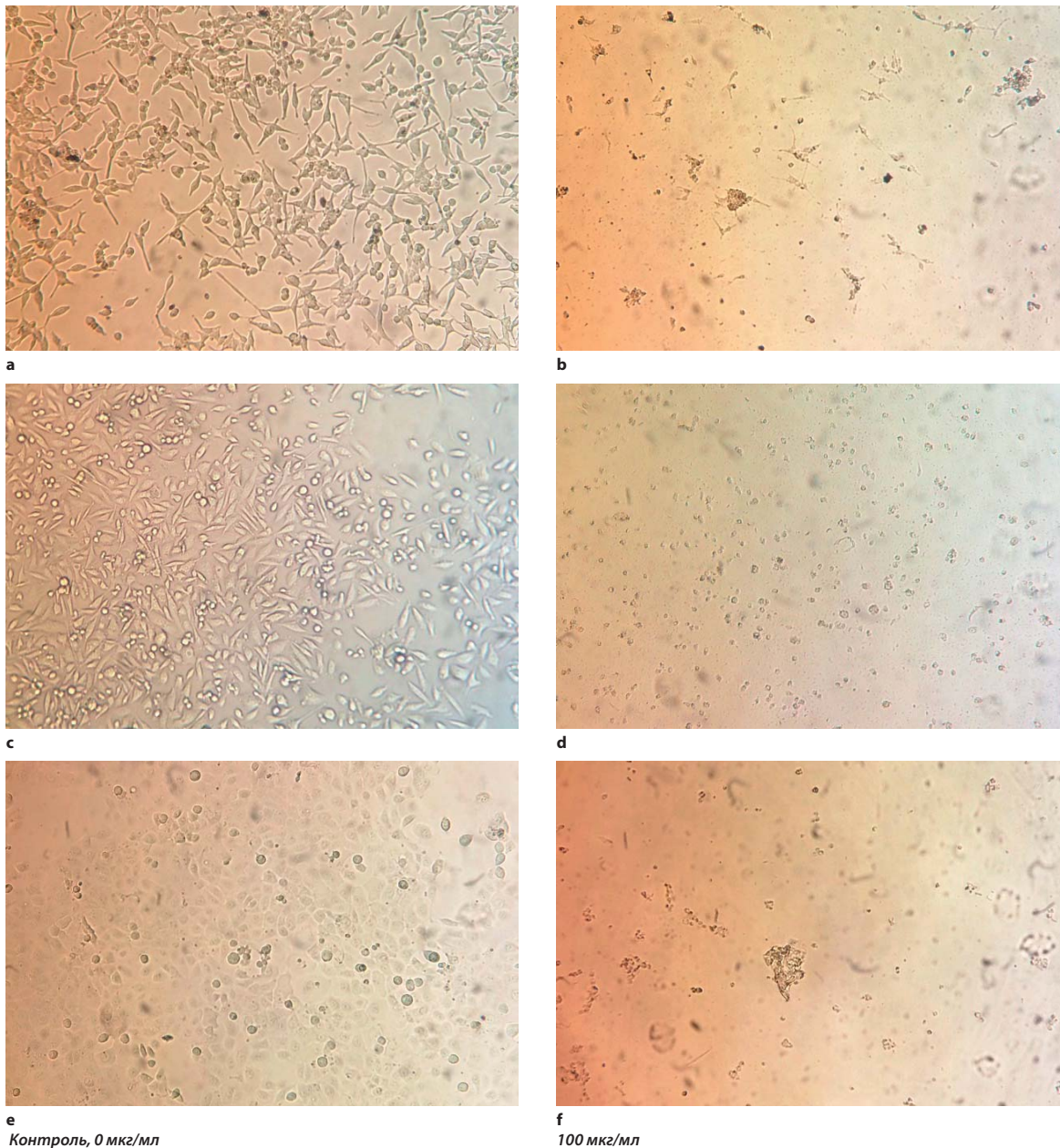
* — Mann—Whitney statistical significance of pairwise cell viability comparison for LNCaP/PC-3, PC-3/DU145, LNCaP/DU145, $p < 0,05$ ($p = 0,0286$)

Клетки культивировали в полной питательной среде DMEM (Sigma):RPMI1640 (Gibco) в соотношении 50:50, содержащей 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories), 2 ммоль L-глутамин в 25 см² культуральном флаконе при 37 °С, в присутствии 5 % CO₂ до достижения ими 80 % монослоя. Среду заменяли на новую каждые 3 суток. Далее клетки монослоя снимали с помощью раствора трипсина 0,25 % — Версена 0,02 %, подсчитывали их количество на автоматическом счетчике клеток (TC20, BioRad) и распределяли по 5×10³ на лунку в 96-луночные планшеты в 100 мкл полной культуральной среды. Через 24 часа после этого добавляли мелиттин, который растворяли в культуральной среде до стоковой концентрации 100 мкг/мл, а затем добавляли в лунки с клетками по 100 мкл раствора мелиттина до достижения его концентрации: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 мкг/мл, по 4 лунки на каждую. Через 72 часа инкубации 20 мкл МТТ реактива (Диаэм) (5 мг/мл в фосфатном буфере) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 3,5 часа при 37 °С для накопления формазана. После инкубации отбирали культуральную среду, не затрагивая клетки, добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана и тщательно перемешивали на шейкере-инкубаторе в течение 1 часа при температуре 21 °С. Абсорбцию измеряли при длине волны 530 нм и длине волны фонового поглощения 620 нм, используя мультипланшетный анализатор Spark 10M (Tecan). До внесения МТТ-реактива клетки фотографировали в проходящем свете инвертированного микроскопа с увеличением ×100, после чего сравнивали снимки до и после проведенного эксперимента.

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software Inc., США). Процент жизнеспособности клеток оценивался как среднее арифметическое значение оптической плотности для 4 измерений образцов / среднее арифметическое значение оптической плотности для 4 измерений контрольных лунок (без мелиттина) × 100 для каждой концентрации. Для каждой концентрации рассчитывалось также стандартное отклонение. Различия (в %) жизнеспособности между клеточными линиями при воздействии мелиттина в каждой из концентраций проводили с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный с помощью МТТ-теста анализ показателя жизнеспособности клеток линий LNCaP, PC-3, DU145 в присутствии мелиттина в концентрации 0,01–100,00 мкг/мл показал следующие результаты (рис. 1). Концентрация мелиттина в 100 мкг/мл была летальной для всех клеток. Это проявлялось при микроскопии признаками лизиса опухолевых клеток (рис. 2). В то же время наиболее чувствительными к концентрации мелиттина в 10 мкг/мл оказались клетки аденокарциномы предстательной железы линии DU145 (0,19 % жизнеспособности). В отличие от этого клетки опухоли линии LNCaP были более устойчивыми к пептиду



а
Контроль, 0 мкг/мл

б
100 мкг/мл

в
Рисунок 2. Влияние мелиттина на клеточные линии рака предстательной железы. Видно, что концентрация мелиттина в 100 мг/мл оказалась абсолютно летальной для всех линий клеток. Фазовый контраст, увеличение $\times 100$, коричневый фильтр. а, б — клетки линии LNCaP; в, д — клетки линии PC-3; е, ф — клетки линии DU145

Figure 2. Melittin impact on prostate cancer lineages. Melittin 100 mg/mL is totally lethal in all lineages. Phase contrast, magn. $\times 100$, brown filter. а, б — LNCaP cells; в, д — PC-3 cells; е, ф — DU145 cells

(жизнеспособность — 43,97 %). При концентрациях мелиттина от 1 до 0,01 мкг/мл наблюдалась сходная картина: наименее чувствительными к нему оказались клетки линии DU145 (более 80 % жизнеспособных клеток), а наиболее чувствительными — линии PC-3 (менее 50 % жизнеспособных клеток). Промежуточное положение занимали клетки линии LNCaP (более 50 % жизнеспособных клеток).

Ранее Park et al. показали, что мелиттин в концентрации 0,5–2,5 мкг/мл оказывает ингибирующее действие

на клетки изученных нами линий LNCaP, DU145 и PC-3 [12]. Предполагается, что этот эффект был опосредован подавлением конститутивно активированного NF- κ B. Мелиттин снижал уровень антиапоптотических белков и повышал количество проапоптотических. Мелиттин подавлял также рост клеток перевитой опухоли линии PC-3 у мышей и индуцировал их апоптоз. Имеющиеся в настоящее время данные литературы, включающие исследования *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что мелиттин также влияет на сигнальную трансдукцию

и регуляторные пути, приводящие к многочисленным механизмам гибели рака, включая ингибирование пролиферации, индукцию апоптоза, ингибирование ангиогенеза, остановку клеточного цикла, ингибирование подвижности, миграции, метастазирования и инвазии рака [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что мелиттин в концентрации 100 мкг/мл оказывает тотальное ингибирующее действие на все популяции опухолевых клеток. Более того, даже в концентрации 0,01 мкг/мл данный пептид значительно подавляет рост и размножение линий DU145, PC-3. Однако стоит отметить, что для схожего воздействия на клетки линий LNCaP дозировки 0,01 мкг/мл было недостаточно и минимальной необходимой дозой для подавления развития клеток LNCaP оказалась дозировка 10 мкг/мл, которая у других линий РПЖ вызывала практически полный цитолиз. Из всего вышесказанного можно сделать вывод об эффективности цитолитической активности мелиттина на клетки аденокарциномы предстательной железы, что подтверждает возможность использования данного вещества в качестве химиотерапии.

Информация о конфликте интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Информация о спонсорстве. Данная работа не финансировалась.

Sponsorship Data. This work is not funded.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
- 2 Arneith B. Comparison of Burnet's clonal selection theory with tumor cell-clone development. *Theranostics.* 2018;8(12):3392–9. DOI: 10.7150/thno.24083
- 3 Rady I., Siddiqui I.A., Rady M., Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2017;402:16–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.05.010
- 4 Memariani H., Memariani M., Shahidi-Dadras M., Nasiri S., Akhavan M.M., Moravvej H. Melittin: from honeybees to superbugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(8):3265–76. DOI: 10.1007/s00253-019-09698-y
- 5 Guha S., Ferrie R.P., Ghimire J., Ventura C.R., Wu E., Sun L., et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochem Pharmacol.* 2021;193:114769. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114769
- 6 Memariani H., Memariani M., Moravvej H., Shahidi-Dadras M. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(1):5–17. DOI: 10.1007/s10096-019-03674-0
- 7 Memariani H., Memariani M. Anti-fungal properties and mechanisms of melittin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(15):6513–26. DOI: 10.1007/s00253-020-10701-0
- 8 Memariani H., Memariani M. Melittin as a promising anti-protozoan peptide: current knowledge and future prospects. *AMB Express.* 2021;11(1):69. DOI: 10.1186/s13568-021-01229-1
- 9 Paray B.A., Ahmad A., Khan J.M., Taufiq F., Pathan A., Malik A., et al. The role of the multifunctional antimicrobial peptide melittin in gene delivery. *Drug Discov Today.* 2021;26(4):1053–9. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.01.004
- 10 Павлов В.Н., Рахматуллина И.Р., Фархутдинов Р.Р., Пушкарев В.А., Данилко К.В., Галимова Э.Ф. и др. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы. Креативная хирургия и онкология. 2017;7(2):54–61. DOI: 10.24060/2076-3093-2017-7-2-54-61

- 11 Jamasbi E., Mularski A., Separovic F. Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(1):40–5. DOI: 10.2174/1568026615666150703115919
- 12 Park M.H., Choi M.S., Kwak D.H., Oh K.W., Yoon D.Y., Han S.B., et al. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-κB. *Prostate.* 2011;71(8):801–12. DOI: 10.1002/pros.21296
- 13 Jeong Y.J., Choi Y., Shin J.M., Cho H.J., Kang J.H., Park K.K., et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:218–25. DOI: 10.1016/j.fct.2014.03.022
- 14 Badr-Eldin S.M., Alhakamy N.A., Fahmy U.A., Ahmed O.A.A., Asfour H.Z., Althagafi A.A., et al. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of a sub-toxic concentration of fluvastatin on OVCAR3 ovarian cancer cells after its optimized formulation to melittin nano-conjugates. *Front Pharmacol.* 2021;11:642171. DOI: 10.3389/fphar.2020.642171
- 15 Yu X., Chen L., Liu J., Dai B., Xu G., Shen G., et al. Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):574. DOI: 10.1038/s41467-019-08538-x

REFERENCES

- 1 Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
- 2 Arneith B. Comparison of Burnet's clonal selection theory with tumor cell-clone development. *Theranostics.* 2018;8(12):3392–9. DOI: 10.7150/thno.24083
- 3 Rady I., Siddiqui I.A., Rady M., Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2017;402:16–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.05.010
- 4 Memariani H., Memariani M., Shahidi-Dadras M., Nasiri S., Akhavan M.M., Moravvej H. Melittin: from honeybees to superbugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(8):3265–76. DOI: 10.1007/s00253-019-09698-y
- 5 Guha S., Ferrie R.P., Ghimire J., Ventura C.R., Wu E., Sun L., et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochem Pharmacol.* 2021;193:114769. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114769
- 6 Memariani H., Memariani M., Moravvej H., Shahidi-Dadras M. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(1):5–17. DOI: 10.1007/s10096-019-03674-0
- 7 Memariani H., Memariani M. Anti-fungal properties and mechanisms of melittin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(15):6513–26. DOI: 10.1007/s00253-020-10701-0
- 8 Memariani H., Memariani M. Melittin as a promising anti-protozoan peptide: current knowledge and future prospects. *AMB Express.* 2021;11(1):69. DOI: 10.1186/s13568-021-01229-1
- 9 Paray B.A., Ahmad A., Khan J.M., Taufiq F., Pathan A., Malik A., et al. The role of the multifunctional antimicrobial peptide melittin in gene delivery. *Drug Discov Today.* 2021;26(4):1053–9. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.01.004
- 10 Pavlov V.N., Rakhmatullina I.R., Farkhutdinov R.R., Pushkarev V.A., Danilko K.V., Galimova E.F., et al. Free radical oxidation and carcinogenesis: debatable issues. *Creative surgery and oncology.* 2017;7(2):54–61 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2017-7-2-54-61
- 11 Jamasbi E., Mularski A., Separovic F. Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(1):40–5. DOI: 10.2174/1568026615666150703115919
- 12 Park M.H., Choi M.S., Kwak D.H., Oh K.W., Yoon D.Y., Han S.B., et al. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-κB. *Prostate.* 2011;71(8):801–12. DOI: 10.1002/pros.21296
- 13 Jeong Y.J., Choi Y., Shin J.M., Cho H.J., Kang J.H., Park K.K., et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:218–25. DOI: 10.1016/j.fct.2014.03.022
- 14 Badr-Eldin S.M., Alhakamy N.A., Fahmy U.A., Ahmed O.A.A., Asfour H.Z., Althagafi A.A., et al. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of a sub-toxic concentration of fluvastatin on OVCAR3 ovarian cancer cells after its optimized formulation to melittin nano-conjugates. *Front Pharmacol.* 2021;11:642171. DOI: 10.3389/fphar.2020.642171
- 15 Yu X., Chen L., Liu J., Dai B., Xu G., Shen G., et al. Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):574. DOI: 10.1038/s41467-019-08538-x