Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

# بررسی فعالیت همولیتیک و خواص بیوشیمیایی ناشی از زهر زنبور *Apis mellifera* بر روی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH

**مهدی بابائی*[۱و۲]، آرام قائم پناه[۲]**

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.

۲- آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

**مقاله پژوهشی اصیل**

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۲

**تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۳/۰۸

***نویسنده مسئول:** مهدی بابائی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۵۶۶۶۹۵۷

پست الکترونیک: m.babaie47@yahoo.com

## چکیده

***مقدمه***

زهر زنبور عسل دارای ترکیباتی است که فعالیت بیولوژیکی و بیوشیمیایی دارد. بنابراین، خالص‌سازی زهر زنبور عسل و بررسی خواص بیوشیمیایی آن می‌تواند در درک جنبه‌های درمانی آن مفید باشند. در مطالعه حاضر، تاثیرات بیوشیمیایی زهر زنبور *Apis mellifera* بر روی خون و کبد موش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

***مواد و روش‌ها***

مقدار پروتئین زهر خام *Apis mellifera* تعیین گردید و زهر با کروماتوگرافی سفادکس G-50 خالص سازی شد. جهت بررسی پروفایل پروتئینی زهر و فراکسیون‌ها، SDS-PAGE انجام گرفت. فعالیت همولیتیک زهر بررسی شد. آزمایشات بیوشیمیایی، در یک گروه کنترل (با رژیم غذایی معمول و بدون تزریق زهر) و سه گروه آزمایشی (با تزریق دُزهای مختلف زهر) صورت گرفت.

***یافته‌ها***

مقدار پروتئین زهر، حدود ۴/۱ mg/ml بدست آمد. کروماتوگرام نشان‌دهنده سه پیک بزرگ بود و ملیتین حدود ۵۰٪ زهر زنبور را تشکیل می‌دهد. با انجام الکتروفورز، مشخص شد که زهر دارای ترکیباتی با وزن مولکولی ۳ تا ۹۰ کیلودالتون شامل ملیتین، فسفولیپاز، هیالورونیداز، فسفو مونواستراز اسید می‌باشد. آزمایش همولیتیک، $HD_{50}$ ملیتین را در غلظت ۰/۵ µg/ml مشخص کرد. آزمایشات بیوشیمیایی، بر روی گروه کنترل و سه گروه آزمایشی نشان داد که هر چه دُز زهر در سه گروه آزمایشی بالا می‌رود، گروه دریافت کننده بیشترین دُز زهر (۰/۱ mg/ml) نسبت به گروه کنترل بالاترین میزان کاهش در سطح پارامترهای سرمی را نشان می‌دهد.

***نتیجه‌گیری***

زهر زنبور عسل، بخصوص ملیتین، فعالیت همولیتیک قابل توجهی دارد و از نظر زیستی بسیار فعال است، لذا می‌توان از آن در درمان برخی از بیماری‌ها استفاده کرد.

***کلیدواژه‌ها***

زهر زنبور عسل، کروماتوگرافی، فعالیت همولیتیک



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

## مقدمه

زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتویید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. (۱، ۲). این زهر ترکیبی مایع، بی‌رنگ و اسیدی است که حاوی ۱۸ ترکیب متفاوت مانند آنزیم‌ها، پپتیدها و آمین‌های زیستی می‌باشد. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان به فسفولیپاز $A_2$ اشاره نمود. همچنین هیستامین و اپی‌نفرین را می‌توان آمین‌های فعال زیستی زهر زنبور عسل نام برد (۳، ۴).

بخش فعال زهر از پروتئین‌های متعددی تشکیل شده که موجب التهاب می‌گردند، خاصیت ضد انعقادی دارند و در پزشکی، علم داروشناسی و صنعت داروسازی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵، ۶). ترکیبات زهر و مکانیسم عمل آنها در سال‌های گذشته به دلیل عدم دسترسی به روش‌های مناسب جهت تجزیه و تحلیل، ناشناخته مانده بود. بنابراین تمام اثرات زهر به فعالیت آنزیم فسفولیپازی آن نسبت داده می‌شد (۷). گسترش روش‌های مختلف مانند الکتروفورز، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و پیشرفت در علم بیوشیمی و داروسازی، باعث شد که مکانیسم فعالیت اجزاء زهر زنبور عسل بهتر شناخته شود (۱۰-۸).

زهر زنبور عسل شامل انواعی از ترکیبات فعال زیستی است که به عنوان عوامل کمکی می‌تواند در فعالیت همولیتیک و اثرگذاری بر پارامترهای سرمی موثر باشد. ترکیب اصلی زهر لیوفیلیزه، پپتیدی به نام ملیتین (Melittin) است که یک پپتید ۲۶ اسید آمینه‌ای، کاتیونیک و آمفی‌پاتیک می‌باشد. ملیتین ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن خشک زهر زنبور را تشکیل می‌دهد و مقدار ترشح آن در زهر بسته به تغذیه و نژاد زنبور متغیر است. از ۲۶ اسید آمینه موجود در ساختمان ملیتین ۲۰ اسید آمینه انتهای آمین پپتید به طور عمده آبگریز بوده در حالی که اسیدهای آمینه انتهای کربوکسیل آن (اسیدهای آمینه ۲۱ تا ۲۶) بیشتر آبدوست می‌باشند. این ساختمان دوگانه دوست، به ملیتین امکان واکنش با غشاهای فسفولیپیدی و تخریب آنها را می‌دهد (۱۱، ۱۲). ملیتین با تداخل در برهم‌کنش لیپید-پروتئین در غشاء سلول اختلال ایجاد می‌کند و لیز سلولی را موجب می‌شود (۱۲). با پیشرفت مکانیسم‌های کارآمدتر برای انتقال ملیتین به درون سلول‌های ویژه (مانند نانوذرات)، می‌توان ملیتین را به عنوان هدف بزرگی برای درمان در نظر گرفت.

تاکنون خواص مختلفی برای زهر زنبور عسل و بخصوص ملیتین گزارش شده است که می‌توان به اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطانی آن اشاره نمود (۸، ۱۴-۱۲). در سال‌های اخیر به دلیل عدم وجود رژیم غذایی مناسب و همچنین استفاده از رژیم‌های غذایی نامناسب، بیماری‌های کبدی شیوع پیدا کرده است. عدم وجود داروهای مفید و موثر برای درمان بیماری‌های کبدی و تاثیرات مضر بسیاری از داروهای موجود، باعث گسترش این بیماری‌ها در مبتلایان شده است. این امر منجر به پژوهش و مطالعه فراوانی در طبیعت برای کشف داروهای جدید گردید. به همین دلیل در تحقیقات اخیر محققین به تاثیر کاربرد زهرهای حیوانات بخصوص زهر زنبور عسل در درمان بیماری‌های کبدی تمرکز کرده‌اند (۱۵، ۱۶).

با وجود این که زنبور عسل *Apis mellifera* یکی از فراوان‌ترین گونه‌های زنبور در ایران می‌باشد اما تاکنون بررسی خواص بیوشیمیایی آن به صورت کامل انجام نشده است. از آن جایی که شناخت الگوی پروتئینی و خواص بیوشیمیایی زهر خام می‌تواند یک ابزار کمک کننده برای شناخت کامل از خواص بیوشیمیایی زهر و تاثیرات آن در


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

مورد سلول‌های حیوانی باشد، تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات زهر زنبور عسل *Apis mellifera* بر فعالیت همولیتیک و پارامترهای سرمی موش‌های NIH و نمونه‌های خون آن‌ها صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری زهر و نمونه خون

جهت جمع‌آوری زهر زنبور عسل بومی ایران، ابتدا یک کندوی زنبور عسل ایرانی *Apis mellifera meda* واقع در زنبورستانی در منطقه کوهرنگ استان چهارمحال بختیاری انتخاب شد و از نظر سلامت و نژاد مورد تأیید قرار گرفت. زهر زنبور عسل به وسیله دستگاه شوک الکتریکی به طوری که این وسیله جمع‌آوری کننده زهر با ایجاد شوک الکتریکی، زنبورهای عسل را تحریک می‌کند تا صفحه جمع‌آوری کننده را نیش بزنند، جمع‌آوری شد. زهر از روی صفحه، جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۲۰ موش نژاد NIH از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. موش‌ها در ۴ گروه تقسیم شدند و در هر قفس در شرایط آزمایشگاهی و رژیم غذایی یکسان قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵۰، تغذیه با غذای فشرده و قفس‌های نوع ۲ و ۳ از جنس استیل و همچنین چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی، نگهداری شدند.

### پروتئین سنجی

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به روش پروتئین سنجی Lowry (۱۷) و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA)، تعیین شد. بدین منظور مقادیر ۰ µg/100µl (Blank)، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ از پروتئین استاندارد BSA (۱ mg/ml) و رقت‌های ۱:۵، ۱:۱۰، از محلول پروتئینی زهر در لوله‌های جداگانه تهیه شد و حجم تمام لوله‌ها با آب مقطر به ۱۰۰ µl رسانده شد، سپس مجدداً ۱۰۰ µl آب مقطر و ۲ میلی لیتر معرف D به لوله ها اضافه شد. پس از طی ۵ دقیقه، در مرحله بعد به لوله‌ها ۲۰۰ µl معرف فولین ۱/۲ اضافه گردید و پس از ورتکس کوتاه، لوله‌ها در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. جذب نوری تمام لوله‌ها پس از کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با محلول بلانک در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت شد و نمودار استاندارد تهیه گردید. در نهایت غلظت پروتئین مجهول با استفاده از جذبی که در محدوده جذب پروتئین استاندارد قرار دارد، طبق معادله خط نمودار محاسبه گردید.

### خالص سازی زهر

ستون ژل کروماتوگرافی سفادکس G-50 (۲×۱۵۰ cm) به مدت ۴۸ ساعت در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی‌مولار با pHبرابر ۴/۸ به تعادل رسید. ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل در ۲ میلی‌لیتر بافر استات آمونیوم (۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابر ۴/۸) حل گردید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴+ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی حاصل به تدریج به ستون تزریق گردید. بعد از اینکه نمونه به خوبی جذب ستون شد، شستشوی ستون با بافر ذکر شده انجام گرفت. محلول خروجی از ستون ژل کروماتوگرافی به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک با سرعت جریان ۶۰ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌های خروجی در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید. تمامی فراکسیون‌ها ۲۴ ساعت در مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز و در ۴ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند (۵).

### الکتروفورز

به منظور بررسی پروفایل زهر زنبور عسل و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی الکتروفورز SDS-PAGE به روش Laemmli انجام گرفت (۱۸). بدین منظور پس از آماده سازی دستگاه الکتروفورز، محلول ژل جدا کننده


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

(ژل پائین) ۱۲ درصد تهیه گردید و ژل به دقت در کاست شیشه‌ای ریخته شد. به منظور صاف‌شدن سطح ژل و جلوگیری از تماس هوا با آن، مقداری آب مقطر به آرامی از کنار شیشه روی سطح ژل ریخته شد. بعد از انعقاد ژل پائین (حدود ۲۵-۲۰ دقیقه)، آب روی آن تخلیه گردید و محلول ژل جمع‌کننده (ژل بالا) ۴ درصد تهیه شد. ژل بالا تا ارتفاع مناسب روی ژل پائین ریخته شد و سپس شانه با دقت در ژل بالا قرار گرفت. پس از انعقاد ژل بالا (حدود ۱۰ تا ۱۵ دقیقه) شانه الکتروفورز خارج شد و کاست‌های شیشه‌ای در تانک الکتروفورز قرار گرفت. درون تانک الکتروفورز بافر تانک ریخته شد و محلول پروتئینی (که از قبل به مدت ۱۰ دقیقه درون آب جوش قرار داشت) به درون چاهک‌های ژل لود گردید. در یکی از چاهک‌ها، پروتئین استاندارد (Thermo Fisher Scientific Pierce™ unstained protein MW marker) ریخته شد. سپس دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ تا ۱۰۰ ولت روشن گردید. پس از اتمام کار ژل‌های بدست به وسیله رنگ آمیزی کوماسی بلو و نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

**بررسی فعالیت همولیتیک**

توانایی ملیتین در از بین بردن غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز خون (فعالیت همولیتیک ملیتین) منجر به لیز گلبول‌های قرمز، خروج هموگلوبین و افزایش جذب سلول‌های قرمز خون (RBC) در ۵۴۰ نانومتر می‌شود. پس از خون‌گیری از ورید گردن (زیر فک) موش، حدود ۱۰ میکرولیتر هپارین به ۵ میلی‌لیتر خون تازه و سالم اضافه شد. فالکون حاوی خون هپارینه به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به منظور حذف پلاسما و سلول‌های لیز شده، خون کامل به مدت ۱۰ دقیقه و در ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و با بافر فسفات (PBS) شسته شد. این شستشو تا زمانی ادامه یافت که محلول رویی RBC کاملاً شفاف شود. پس از شستشوی نهایی، مایع رویی به آرامی با سمپلر برداشته و دور ریخته شد. به منظور تهیه سوسپانسیون RBC ۲ درصد، آریتروسیت‌ها با PBS رقیق شدند. به طوری که برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر RBC ۲ درصد، از سوسپانسیون حاصل ۲۰۰ میکرولیتر، به یک فالکون منتقل و حجم آن با PBS به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. در مرحله بعد، برای بدست آوردن رقت IC50 غلظت‌های ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند و ملیتین با ۱۰۰ میکرولیتر PBS در یک ردیف از پلیت ۹۶ خانه به طور سریالی رقیق گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر RBC ۲ درصد، به هر خانه اضافه شد (حجم نهایی هر خانه از پلیت، به ۲۰۰ میکرولیتر رسید). هم زمان با مراحل انجام آزمایش، یک ردیف از پلیت به کنترل منفی (۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر RBC ۲ درصد) و ردیف بعدی به کنترل مثبت (۱۰۰ میکرولیتر ترایتون X100یک درصد و ۱۰۰ میکرولیتر RBC ۲ درصد) اختصاص داده شد. پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. بعد از گرم‌خانه گذاری، پلیت با دور ۳۰۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی هر خانه به خانه‌های معادل آن در پلیت دیگر منتقل گردید. جذب هموگلوبین آزاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر خوانده شد. این آزمایشات سه بار تکرار گردید و درصد همولیز سلول‌های خونی به صورت زیر محاسبه شد (۱۹):

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{(جذب نوری نمونه ـ جذب نوری کنترل منفی)}}{\text{(جذب نوری کنترل مثبت ـ جذب نوری کنترل منفی)}} \times ۱۰۰$$

**آزمایشات بیوشیمیایی**

برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی، چهار گروه شامل یک گروه کنترل (۵ موش) و سه گروه آزمایشی (۱۵ موش) انتخاب شد. گروه کنترل دارای رژیم غذایی معمول بود و


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

به سه گروه آزمایشی به صورت زیر جلدی، دُزهای mg/ml ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ تزریق زهر زنبور عسل انجام گرفت. پس از یک هفته (۱۰ ساعت ناشتا)، از قلب موش‌های بیهوش شده نمونه خون گرفته شد. برای جداسازی سرم‌ها به منظور ارزیابی پارامترهای سرمی، نمونه خون‌های بدست آمده در g ۸۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

**تعیین پارامترهای سرمی**

پس از خون‌گیری، گلوکز سرم ناشتا ( fasting blood glucose; FBG)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT) و بیلی‌روبین با استفاده از کیتRandox colori metric (Randox Laboratories، Dublin، Republic of Ireland) بررسی شد.

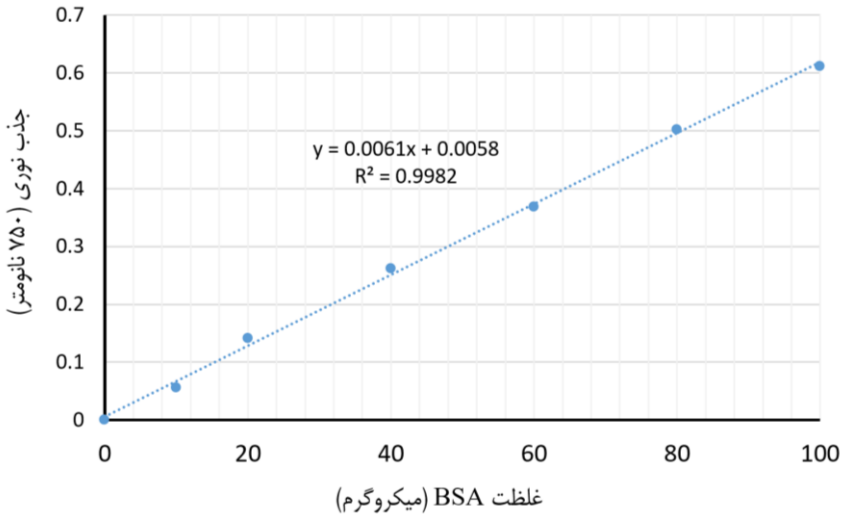
بلافاصله پس از جمع آوری خون، حیوانات با استفاده دی اتیل اتر بیهوش شدند و پس از بیهوشی، کبد موش‌ها جدا و همگن شدند و به صورت جداگانه تقسیم شدند و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری**

تمام داده های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نتایج آزمایشات مختلف بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. سطح معنی‌داری آماری p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت بررسی تفاوت معنی‌داری در بین میانگین‌ها از آزمون T-Test و آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) استفاده گردید. برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار هر یک از میانگین‌ها نسبت به هم از آزمون تعقیبی (LSD) استفاده شد.

## یافته‌ها

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام زنبورعسل با توجه به نمودار منحنی استاندارد BSA (شکل ۱)، حدود mg/ml ۴/۱ بدست آمد.




شکل ۱- منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت های مختلف محلول استاندارد BSA

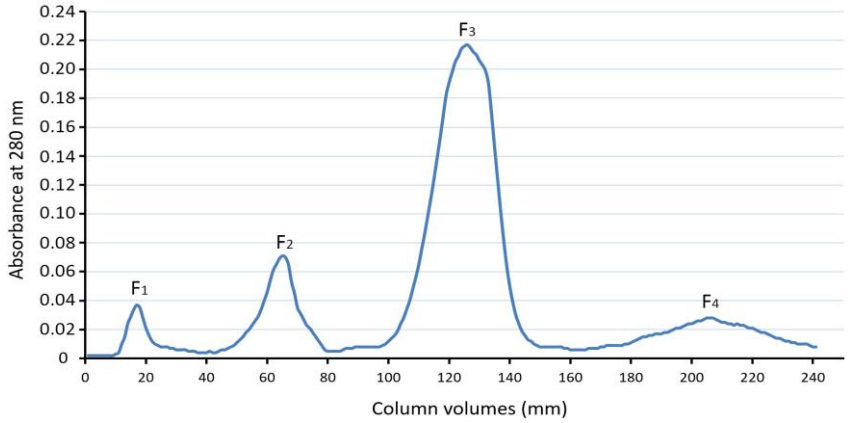
در این مطالعه کروماتوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل زهر زنبور عسل نشان‌دهنده وجود بیش از چهار ترکیب مختلف در زهر بود. حدود سه پیک بزرگ در این کروماتوگرام قابل تشخیص می‌باشد (شکل ۲). پس از


www.SID.ir

Archive of SID

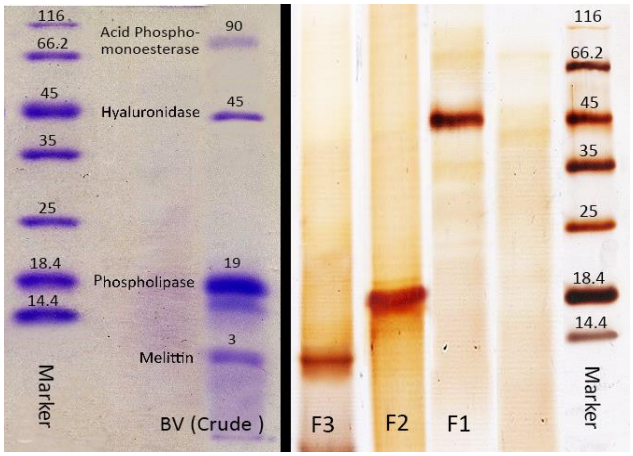

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

انجام گروماتوگرافی، فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی لیوفیلیزه شدند. با توزین پودر لیوفیلیزه هر فراکسیون و همچنین مقایسه سطح پیک‌های بدست آمده در کروماتوگرافی مشخص گردید که ملیتین حدود ۴۹ تا ۵۰ درصد زهر زنبور عسل بومی ایران را تشکیل می‌دهد.




شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از ژل کروماتوگرافی زهر زنبور عسل

با انجام الکتروفورز، مشخص شد که زهر خام زنبور عسل دارای ترکیباتی با وزن مولکولی در محدوده ۳ تا ۹۰ کیلو دالتون هستند و با توجه به گزارشات محققین می‌توان گفت که این باندهای ایجاد شده شامل ملیتین، فسفولیپاز، هیالورونیداز، فسفو مونواستراز اسید هستند. با بررسی الکتروفورز فراکسیون های زهر زنبور عسل نیز به وضوح این ترکیبات حاصل شد (شکل ۳).




شکل ۳- SDS-PAGE حاصل از زهر خام زنبور عسل (رنگ آمیزی کوماسی بلو) و فراکسیون‌های آن (رنگ آمیزی نیترات نقره)

Marker: پروتئین استاندارد با وزن مولکولی مشخص

BV (Crude): زهر زنبور عسل خام با ترکیبات آن با وزن‌های مولکولی ذکر شده

F1، F2 و F3: فراکسیون‌های حاصل از ژل کروماتوگرافی زهر زنبور عسل

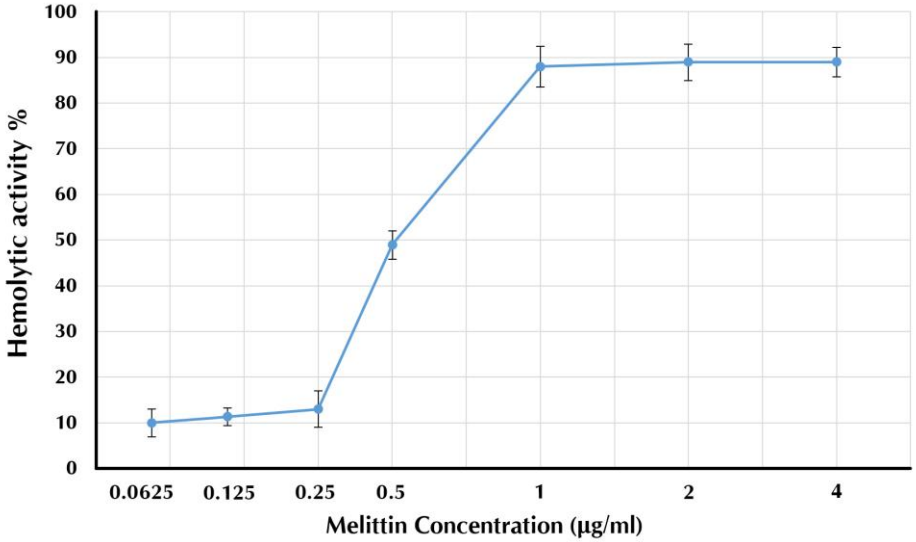
در این مطالعه، آزمایش همولیتیک نشان داد که ملیتین (فراکسیون ۳) در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵ µg/ml فاقد فعالیت همولیتیک می‌باشد، در حالی که در مقایسه با کنترل، در غلظت‌های بالاتر از ۱ µg/ml فعالیت همولیتیک ملیتین، تقریباً ۹۰ درصد بوده است. غلظتی از ملیتین که به نسبت ترایتون X100 (کنترل) باعث لیز ۵۰


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

درصد از گلبول‌های قرمز می‌شود ($HD_{50}$) برابر µg/ml ۰/۵ تعیین گردید (شکل ۴).




شکل ۴- فعالیت همولیتیک ملیتین بر روی گلبول‌های قرمز

با بررسی پارامترهای سرمی مشخص شد که سطح پارامترهای سرمی (فعالیت کبدی) گروه‌های دریافت کننده زهر زنبور عسل به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان دادند. به طوری که در گروه سوم که بیشترین دُز زهر (۰/۱ mg/ml) را دریافت کرده بودند، بالاترین کاهش در سطح پارامترهای سرمی مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- پارامترهای سرمی گروه کنترل و گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل

| پارامتر | گروه‌ها | گروه کنترل (۵ موش) | گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | ۰/۰۱ mg/ml (۵ موش) | ۰/۰۵ mg/ml (۵ موش) | ۰/۱ mg/ml (۵ موش) |
| ALT (IU/L)* | | ۳۶/۴ ± ۱/۴ | ۲۹/۱ ± ۶/۵ | ۲۷/۴ ± ۸/۱ | ۲۴/۱ ± ۷/۳ |
| AST (U/l)* | | ۹۸/۱ ± ۸/۷ | ۸۹/۴ ± ۱۱/۴ | ۹۲/۸ ± ۹/۲ | ۹۲/۳ ± ۸/۱ |
| GGT (U/l)* | | ۱۱/۳ ± ۰/۹ | ۸/۲ ± ۴/۱ | ۷/۴ ± ۳/۴ | ۵/۳ ± ۳/۸ |
| Bilirubin (mg/dl)* | | ۰/۴۲ ± ۰/۱ | ۰/۳۹ ± ۰/۰۴ | ۰/۳۱ ± ۰/۰۷ | ۰/۲۱ ± ۰/۰۸ |
| FBG (mg/dl)* | | ۵۶/۹ ± ۷/۴ | ۵۲/۴ ± ۶/۲ | ۵۱/۹ ± ۷/۱ | ۴۸/۲ ± ۷/۵ |

*($P < 0.05$)

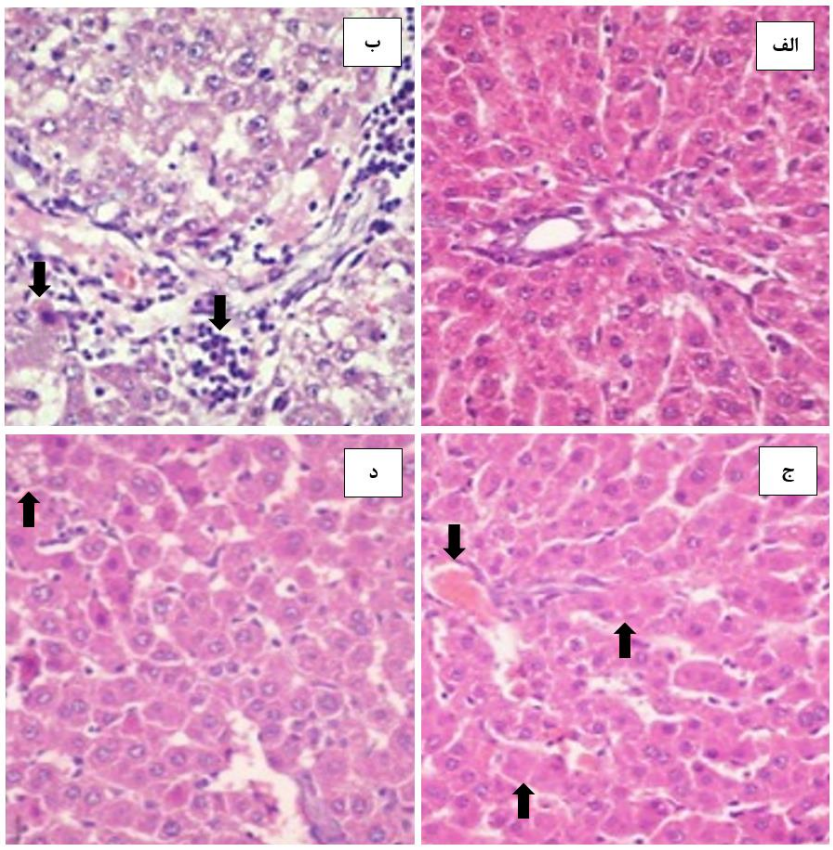
در بررسی‌های بافت شناسی مشخص شد که کبد موش‌های گروه کنترل، سلول‌های کبدی طبیعی را دارند و اکثر سلول‌ها تک هسته‌ای هستند. کبد گروه دریافت کننده زهر، کاهش التهاب سلولی و تخریب چربی در برخی سلول‌های کبدی و همچنین در مواردی کاهش نکروز (فلش‌ها) را نشان داد که با افزایش دُز زهر این اثرات بیشتر شد. در مقاطع بافتی کبد سالم، حاشیه سلول‌ها کاملاً مشخص است و هسته‌ها به وضوح مشاهده شدند و آرایش منظم سلولی و فضای بین آنها نمایان است. در سلول‌های نکروزی آماس مشاهده شد و نظم


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

سلول‌ها از بین رفت. هسته‌ها بزرگتر (پر رنگ‌تر) و چروکیده می‌شوند و مرز سلولی وجود نداشت که هر چه نکروز بیشتر باشد این آثار بیشتر و هر چه نکروز کمتر باشد این آثار کمتر می‌شود. (شکل ۵).




شکل ۵- بررسی بافت شناسی کبد موش‌های مورد آزمایش (الف: گروه کنترل؛ ب: ۰/۰۱ mg/ml؛ ج: ۰/۰۵ mg/ml؛ د: ۰/۱ mg/ml). در شکل الف، کبد موش‌های گروه کنترل، سلول‌های کبدی طبیعی دارند و اکثر سلول‌ها تک هسته‌ای هستند. کبد گروه دریافت کننده زهر (ب، ج و د)، با افزایش دُز زهر، کاهش التهاب سلولی و تخریب چربی در برخی سلول‌های کبدی و همچنین در مواردی کاهش نکروز (فلش‌ها) را نشان می‌دهد. که با افزایش دُز زهر این اثرات بیشتر نمایان است.

## بحث

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش آمار بیماری‌های کبدی، عدم وجود داروهای موثر برای درمان آن و عوارض جانبی بسیاری از داروهای موجود، محققین را برآن داشته است که برای کشف داروهای جدید (بخصوص در زهرهای حیواناتی مانند زهر زنبور عسل) تمرکز کنند (۲۰). تحقیق حاضر نیز به منظور بررسی اثر زهر زنبور *Apis mellifera* بر روی فعالیت همولیتیک، خواص بیوشمیایی و پارامترهای سرمی خون صورت گرفت و داده‌ها و نتایج نشان داد که زهر *Apis mellifera* می‌تواند در کاهش بسیاری از پارامترها یا آنزیم‌های کبدی موثر باشد. در مطالعه زرین نهاد و همکارانش (۷) که به منظور جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل بومی ایران و بررسی اثرات ناشی از آن صورت گرفت، کروماتوگرام حاصل از HPLC حدود ۲۰ پیک بزرگ را نشان داد. در مطالعه حاضر با توجه به استفاده از ژل فیلتراسیون چهار پیک مشخص حاصل گردید و می‌توان اظهار داشت که استفاده از کروماتوگرافی HPLC به مراتب نتایج بهتری را برای


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

تفکیک در بر دارد. با انجام آزمایشاتی مانند HPLC، دیده شده است ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل بومی ایران از نظر درجه خلوص نسبت به انواع دیگر به مراتب برتری دارد (۷). این مرحله از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که به دلیل کمبود امکانات و هزینه‌های بالا، استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون جایگزین آن شد. با توجه به یافته‌های زرین نهاد و همکارانش و همچنین Rybak-Chmielewska و همکارانش (۲۱)، مشخص شد که ملیتین حدود ۴۹ تا ۵۰ درصد زهر زنبور عسل بومی ایران را تشکیل می‌دهد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

بررسی اثر همولیتیک ملیتین بر سلول‌های قرمز خون انسان در مطالعه زرین نهاد و همکارانش انجام گرفت. آنها اظهار داشتند که ملیتین خریداری شده از شرکت سیگما در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵ µg/ml فاقد فعالیت همولیتیک می‌باشد، در حالی که در مقایسه با کنترل، در غلظت‌های بالاتر از ۱ µg/ml فعالیت همولیتیک ملیتین، تقریباً ۹۰ درصد بوده است و $HD_{50}$ ملیتین نیز برابر ۰/۵ µg/ml تعیین گردید. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داد که با وجود اینکه زهر از جاندار (زنبور) بدست آمده بود، اما فراکسیون سوم (ملیتین) دارای فعالیت همولیتیک مشابه ملیتین خریداری شده است. در مطالعه دیگر با بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی برخی از آنزیم‌های کبد رت (مانند ALT، AST، GGT و بیلی‌روبین) مشخص شد هنگامی که رت‌های گروه آزمایش (گروه چاق) با دُزهای مختلف زهر زنبور مواجه می‌شوند، آنزیم‌های کبدی آنها نسبت به گروه کنترل کاهش دارد و این کاهش زمانی چشمگیر می‌شود که دُز زهر بالا می‌رود. در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که دُزهای مختلف زهر بر روی فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی اثر دارند و این اثر زمانی بیشتر می‌شود که دُز زهر به مقدار بالاتری به گروه آزمایش تزریق می‌گردد (۱۶).

ملیتین، ترکیب اصلی زهر زنبور عسل، یکی از قوی ترین عوامل شناخته شده‌ای است که بر فعالیت همولیتیک اثر می‌گذارد به طوری که در تحقیق حاضر نیز آزمایش همولیتیک این اثر را نشان داد. خاصیت دوگانه دوستی ملیتین، آن را به یک ترکیب قابل حل در آب تبدیل کرده است (۲۲). این ترکیب دارای فعالیت بالای لیز سلولی به خصوص لیز غشاء گلبول‌های قرمز می‌باشد (۲۳) و در توالی خود بخشی دارد که شبیه به شوینده عمل می‌کند و احتمالاً خاصیت لیزکنندگی ملیتین به همین بخش وابسته است. با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد تاثیر ترکیبات زهر زنبور عسل مانند هیالورونیداز و فسفولیپاز $A_2$ و ... بر روی فاکتورهای مختلف و تعدیل کنندگی خواص بیوشیمیایی آنها (۲۴ و ۱۶)، انتظار آن می‌رفت که در مطالعه حاضر این اثرات را مشاهده نماییم. با توجه به نتایج بدست آمده در زمینه علائم بالینی، سطح سرمی انتظارات ما برآورده شد و مشاهده نمودیم که ترکیب زهر زنبور عسل این علائم را کاهش داده است. به طوری که تمام پارامترها در غلظت ۰/۱ mg/ml از زهر زنبور عسل کاهش چشمگیری داشته است. عدم انجام بعضی از روش‌های مرتبط به دلیل کمبود بودجه و عدم دسترسی آسان به برخی از کیت‌ها و مواد مورد نیاز از محدودیت‌های پژوهش حاضر بودند. در نهایت، برای نیل به نتایج کارامدتر و دقیق‌تر، پیشنهاد می‌گردد که بررسی‌های آینده بر روی دیگر متغیرها مانند انسولین، تری‌گلیسریدها، LDL، HDL و ... انجام گیرد. همچنین لزوم استفاده از روش‌ها، کیت ها یا دستگاه‌های جدیدتر ضروری به نظر می‌رسد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه با بررسی بیوشیمیایی زهر زنبور عسل بومی ایران، مشخص گردید که زهر زنبور عسل به لحاظ زیستی بسیار فعال است و دارای فعالیت همولیتیک می‌باشد. این زهر بر روی برخی از پرامترهای بیوشمیایی


www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

از جمله ALT، AST، GGT، FBG و بیلی‌روبین اثر گذار است و کاهش مقدار و فعالیت آنها را در پی دارد. همچنین نشان داده شد که تاثیر زهر زنبور عسل در شرایط وابسته به غلظت می‌باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یافته‌های اولیه در درمان بیماری‌های کبدی مورد بررسی قرار گیرد.

## تعارض منافع

نویسندگان هیچ تعارض منافعی ندارند.

## References

1. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol Ther. 2007;115(2):246-70.
2. Mahmoodzadeh A, Morady A, Zarrinnahad H, Pooshang Bagheri K, Ghasemi-Dehkordi P, Mahdavi M, et al. Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells. Tehran Univ Med J. 2013;70(12):760-67. [in Persian]
3. Ghabili K, Shoja MM, Parvizi M. Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. Med Hypotheses. 2009;73(3):459-60.
4. Hider RC. Honeybee venom: A rich source of pharmacologically active peptides. Endeavour. 1988;12(2):60-5.
5. Babaie M, Zolfagharian H, Salmanizadeh H, Mirakabadi AZ, Alizadeh H. Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake Echis carinatus. Acta Biochim Pol. 2013;60(1):17-20.
6. Lee J, Park J, Yeom J, Han EH, Lim YH. Inhibitory effect of bee venom on blood coagulation via anti-serine protease activity. J Asia Pac Entomol. 2017;20:599-604.
7. Zarinnahad H, Mahmoodzadeh A, Pooshang Bagheri K, Mahdavi M, Shahbazzadeh D, Moradi A. Isolation of melittin from Iranian honey bee venom and investigation of its effect on proliferation of cervical cancer-hela cell line. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013;21(2):226-37.
8. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Bee venom (Apis Mellifera) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains: Bee venom an effective potential for bacteria. J pharmacopuncture. 2016;19(3):225-30.
9. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (Apis mellifera) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. J Pharmacopuncture. 2015;18(4):7-11.
10. Rybak-Chmielewska H, Szczêsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (Apis mellifera L.) venom. J Apicul Sci. 2004;48(2):103-9.
11. Habermann E, Zeuner G. Comparative studies of native and synthetic melittins. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol. 1971;270(1):1-9.
12. Zolfagharian H, Khalilifard Borojeni S, Babaie M. Evaluation of anticancer effects induced by Apis mellifera venom on breast cancer cell line. AUMJ. 2020;9(4):357-66.
13. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med. 2009;12(6):576-83.
14. Hoshina MM, Marin-Morales MA. Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of Apis mellifera venom. Mutat Res. 2014;762:43-8.
15. El-Senosi YA, Abou Zaid OAR, Elmaged ADA, Ali MAM. Biochemical study on the regenerative effect of bee venom on experimentally induced diabetes. World J Pharm Pharm Sci. 2018;(10):209-25.
16. Hanafi MY, Zaher ELM, El-adely SEM, Sakr A, ghobashi AHM, Hemly MH, kazem AH, Kamel MA. The therapeutic effects of bee venom on some metabolic and antioxidant parameters associated with HFD-induced non-alcoholic fatty liver in rats. Exp Therap Med. 2018;15:5091-9.
17. Babaie M, Zolfagharian H, Zolfaghari M, Jamili S. Biochemical, hematological effects and complications of Pseudosynanceia Melanostigma Envenoming. J Pharmacopuncture. 2019;22(3):140-6.
18. Babaie M, Ghaem panah A, Mehrabi Z, Mollaei A. Partial purification and characterization of antimicrobial effects from snake (Echis carinatus), scorpion (Mesosobuthus epues) and bee (Apis mellifera) venoms. Iran J Med Microbiol. 2020;14(5):460-77.
19. Mahmoodzadeh A, Morady A, Zarrinnahad H, Pooshang Bagheri K, Ghasemi-Dehkordi P, Mahdavi M, et al. Isolating melittin from bee venom and evaluating its effect on proliferation of gastric cancer cells. Basic Clin Cancer Res. 2013;5(4):26-2.


www.SID.ir

20. Kang SS, Pak SC, Choi SH. The effect of whole bee venom on arthritis. Am J Clin Med. 2002;30,73-80.
21. Rybak-Chmielewska H, Szczêsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (Apis mellifera L.) venom. J Apicul Sci. 2004;48(2):103-9.
22. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Interaction of melittin with membrane cholesterol: a fluorescence approach. Biophys J. 2004;87(4):2419-32.
23. Uawonggul N, Thammasirira KS, Chaveerach A, Chuachan C, Daduang S. Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom. J Med Plants Res. 2011;5(10):1978-86.
24. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol Ther. 2007;115:246-70.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021


www.SID.ir

Arch

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

# Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of *Apis mellifera* bee venom on NIH laboratory mice

**Mahdi Babaie[1, 2*], Aram Ghaempanah[2]**

1- Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

## Original Article

**Received:** 3 Aug 2019
**Accepted:** 28 May 2020

***Corresponding Author:**
Mahdi Babaie,
Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
**TEL:** +989125666957
**Email:**
m.babaie47@yahoo.com

## ABSTRACT

***Introduction***
Bee venom (BV) contains compounds that have biological and biochemical activitis. Therefore, purification of BV and investigation of its biochemical properties can be useful in understanding its therapeutic aspects. In the present study, the biochemical effects of *Apis mellifera* venom on the blood and liver of laboratory mice were investigated.

***Materials and Methods***
Protein concentration of *Apis mellifera* crude venom was determined. Purification of venom was performed with Sephadex G-50 chromatography. SDS-PAGE was used to determine the protein profile of BV and its fractions. The hemolytic activity of venom was investigated. Biochemical tests were performed in one control group (with a normal diet and without injection of venom) and three experimental groups (with injections of different venom doses).

***Results***
Crude venom protein concentration was about 4.1 mg/ml. The chromatogram showed three large peaks and melittin account for about 50% of the BV. By electrophoresis, it was found that the venom has compounds with a molecular weight of 3 to 90 kD, including melittin, phospholipase, hyaluronidase, acid phosphomonoesterase. The hemolytic test showed $HD_{50}$ of melittin at a concentration of 0.5 µg/ml. Biochemical tests on the control and the three experimental groups showed that when venom dose increased in the three experimental groups; the group with the highest venom dose (0.1 mg/ml) showed the highest decrease in serum parameters compared to the control group.

***Conclusion***
BV, especially melittin, has a significant hemolytic activity and biologically very active, so it can be used to treat some diseases.

***Keywords***
Honey bee venom, chromatography, hemolytic activity

► ***Please cite this article as:*** Babaie M, Ghaempanah A. Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of Apis mellifera bee venom on NIH laboratory mice. J Neyshabur Univ Med Sci 2020;8(3)23-34.



www.SID.ir