



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

مهدی بابائی*^۱، 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.

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
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 <i>Apis mellifera</i> بر روی خون و کبد موش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها مقدار پروتئین زهر خام <i>Apis mellifera</i> تعیین گردید و زهر با کروماتوگرافی سفادکس G-50 خالص‌سازی 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، HD₅₀ 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 دریافت‌کننده 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	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: ۰۹۱۲۵۶۶۹۵۷ پست الکترونیک: m.babaie47@yahoo.com



مقدمه

زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتوئید 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 ملتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان به فسفولیپاز A₂ 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 (۸-۱۰).

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 ملتین (Melittin) است که یک پپتید ۲۶ اسید آمینه‌ای، کاتیونیک و آمفی‌پاتیک می‌باشد. ملتین 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 ملتین ۲۰ اسید آمینه انتهایی آمین پپتید به طور عمده آگریز بوده در حالی که اسیدهای آمینه انتهایی کربوکسیل آن (اسیدهای آمینه ۲۱ تا ۲۶) بیشتر آبدوست می‌باشند. این ساختمان دوگانه دوست، به ملتین امکان واکنش با غشاهای فسفولیپیدی و تخریب آنها را می‌دهد (۱۱، ۱۲). ملتین 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 ملتین به درون سلول‌های ویژه (مانند نانوذرات)، می‌توان ملتین را به عنوان هدف بزرگی برای درمان در نظر گرفت.

تاکنون خواص مختلفی برای زهر زنبور عسل و بخصوص ملتین 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



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 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 ، 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 $0 \mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (Blank)، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ از پروتئین استاندارد (۱ mg/ml) BSA 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 لوله‌ها 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 (۱۵۰×۲) به مدت ۴۸ ساعت در بافر استات آمونیوم ۰/۰۵ میلی‌مولار با pH برابر 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 سانتریفوژ، 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



(ژل پائین) ۱۲ درصد تهیه گردید و ژل به دقت در کاست شیشه‌ای ریخته شد. به منظور صاف شدن 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 جمع کننده (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 نیترا ت 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. فالكون 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 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 فالكون منتقل و حجم آن با PBS به ۱۰ میلی‌لیتر 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 X100 یک 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 اسپکتروفوتومتر خوانده شد. این آزمایشات سه بار تکرار گردید و درصد همولیز سلول‌های خونی به صورت زیر محاسبه شد (۱۹):

(جذب نوری نمونه - جذب نوری کنترل منفی)

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{جذب نوری کنترل مثبت} - \text{جذب نوری کنترل منفی}}{100} \times 100$$

(جذب نوری کنترل مثبت - جذب نوری کنترل منفی)

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



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 $\pm$ انحراف معیار بیان گردید. سطح معنی داری آماری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. جهت بررسی تفاوت معنی داری در بین میانگین ها از آزمون T-Test و آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده گردید. برای بررسی تفاوت های معنی دار هر یک از میانگین ها نسبت به هم از آزمون تعقیبی (LSD) استفاده شد.

یافته ها

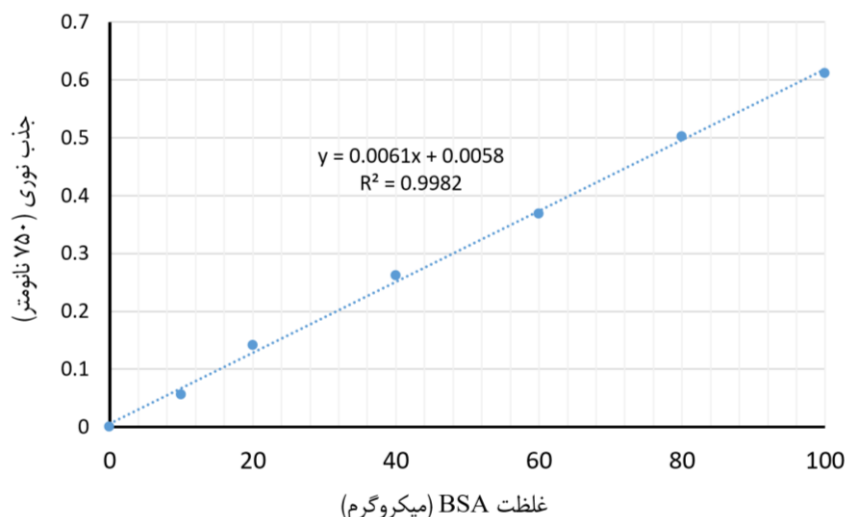
مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام زنبور عسل با توجه به نمودار منحنی استاندارد BSA (شکل ۱)، حدود ۴/۱ mg/ml بدست آمد.

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

تعیین پارامترهای سرمی

پس از خون گیری، گلوکز سرم ناشتا (fasting blood glucose; FBG)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT) و بیلی روبین با استفاده از کیت Randox colorimetric (Dublin, Randox Laboratories, Republic of Ireland) بررسی شد.

بلافاصله پس از جمع آوری خون، حیوانات با استفاده دی اتیل اتر بیهوش شدند و پس از بیهوشی، کبد موش ها جدا



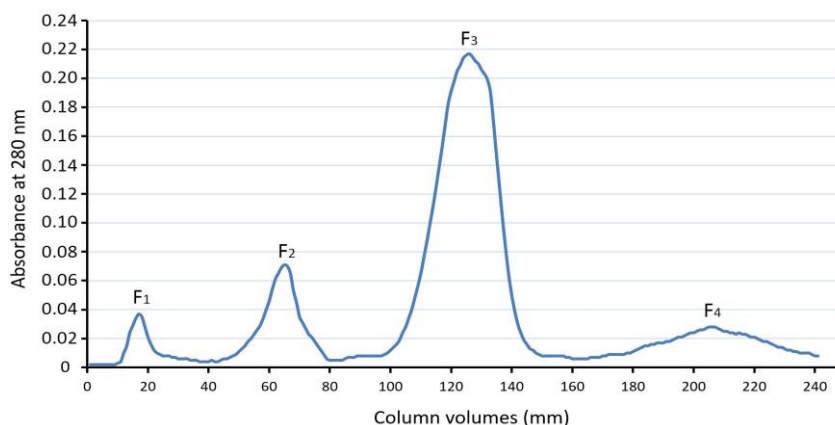
شکل ۱- منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت های مختلف محلول استاندارد BSA

مختلف در زهر بود. حدود سه پیک بزرگ در این کروماتوگرام قابل تشخیص می باشد (شکل ۲). پس از

در این مطالعه کروماتوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل زهر زنبور عسل نشان دهنده وجود بیش از چهار ترکیب

در کروماتوگرافی مشخص گردید که ملیتین حدود ۴۹ تا ۵۰ درصد زهر زنبور عسل بومی ایران را تشکیل می‌دهد.

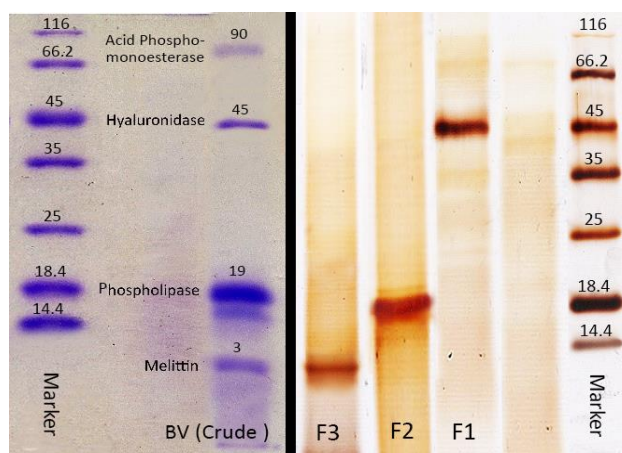
انجام کروماتوگرافی، فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی لیوفیلیزه شدند. با توزین پودر لیوفیلیزه هر فراکسیون و همچنین مقایسه سطح پیک‌های بدست آمده



شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از ژل کروماتوگرافی زهر زنبور عسل

فسفولیپاز، هیالورونیداز، فسفو مونواستراز اسید هستند. با بررسی الکتروفورز فراکسیون‌های زهر زنبور عسل نیز به وضوح این ترکیبات حاصل شد (شکل ۳).

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،



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

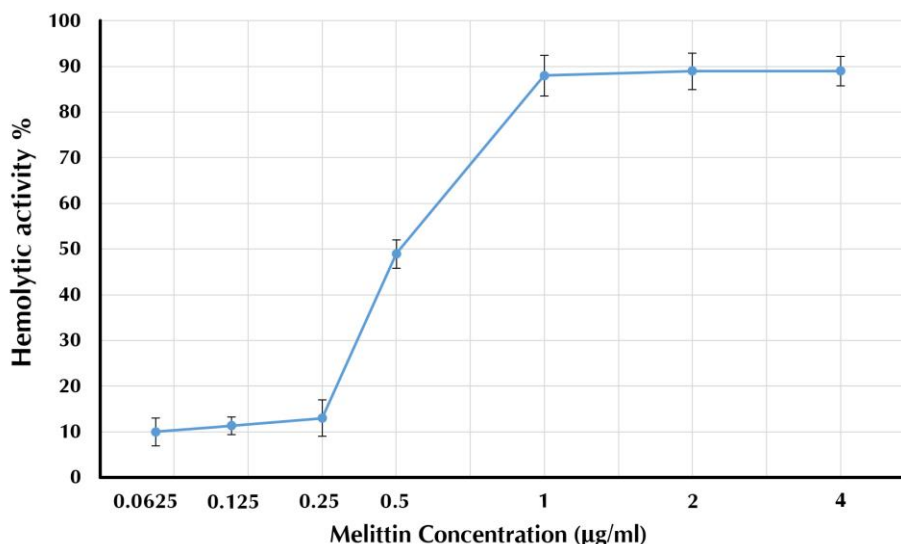
F1, F2 و F3: فراکسیون‌های حاصل از ژل کروماتوگرافی زهر زنبور عسل

کنترل، در غلظت‌های بالاتر از ۱ $\mu\text{g/ml}$ فعالیت همولیتیک ملیتین، تقریباً ۹۰ درصد بوده است. غلظتی از ملیتین که به نسبت تریاتون X100 (کنترل) باعث لیز ۵۰

در این مطالعه، آزمایش همولیتیک نشان داد که ملیتین (فراکسیون ۳) در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵ $\mu\text{g/ml}$ فاقد فعالیت همولیتیک می‌باشد، در حالی که در مقایسه با



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



شکل ۴- فعالیت همولیتیک ملیتین بر روی گلبول‌های قرمز

سوم که بیشترین دُز زهر (0.1 mg/ml) را دریافت کرده بودند، بالاترین کاهش در سطح پارامترهای سرمی مشاهده شد (جدول ۱).

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

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

پارامتر	گروه‌ها	گروه کنترل (۵ موش)	۰/۰۱ mg/ml (۵ موش)	۰/۰۵ mg/ml (۵ موش)	۰/۱ mg/ml (۵ موش)
ALT (IU/L)*		36.4 ± 1.4	29.1 ± 6.5	27.4 ± 8.1	24.1 ± 7.3
AST (U/I)*		98.1 ± 8.7	89.4 ± 11.4	92.8 ± 9.2	92.3 ± 8.1
GGT (U/I)*		11.3 ± 0.9	8.2 ± 4.1	7.4 ± 3.4	5.3 ± 3.8
Bilirubin (mg/dl)*		0.42 ± 0.1	0.39 ± 0.04	0.31 ± 0.07	0.21 ± 0.08
FBG (mg/dl)*		56.9 ± 7.4	52.4 ± 6.2	51.9 ± 7.1	48.2 ± 7.5

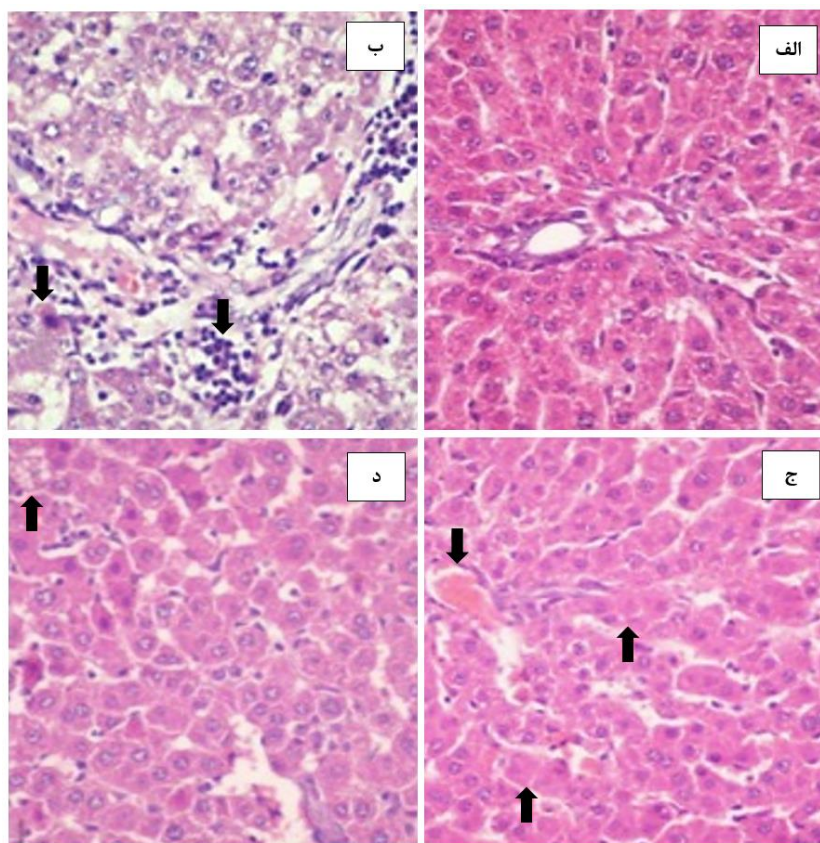
*($P < 0.05$)

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

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 بیشتر باشد این آثار بیشتر و هر چه نکروز کمتر باشد این آثار کمتر می شود. (شکل ۵).

سلول ها از بین رفت. هسته ها بزرگتر (پر رنگ تر) و چروکیده می شوند و مرز سلولی وجود نداشت که هر چه



شکل ۵- بررسی بافت شناسی کبد موش های مورد آزمایش (الف: گروه کنترل؛ ب: ۱ mg/ml؛ ج: ۰/۵ mg/ml؛ د: ۰/۱ mg/ml). در شکل الف، کبد موش های گروه کنترل، سلول های کبدی طبیعی دارند و اکثر سلول ها تک هسته ای هستند. کبد گروه دریافت کننده زهر (ب، ج و د)، با افزایش دُز زهر، کاهش التهاب سلولی و تخریب چربی در برخی سلول های کبدی و همچنین در مواردی کاهش نکروز (فلش ها) را نشان می دهد. که با افزایش دُز زهر این اثرات بیشتر نمایان است.

بحث

نشان داد که زهر *Apis mellifera* می تواند در کاهش بسیاری از پارامترها یا آنزیم های 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 می توان اظهار داشت که استفاده از کروماتوگرافی HPLC به مراتب نتایج بهتری را برای

در سال های اخیر به دلیل افزایش آمار بیماری های کبدی، عدم وجود داروهای موثر برای درمان آن و عوارض جانبی بسیاری از داروهای موجود، محققین را بر آن داشته است که برای کشف داروهای جدید (به خصوص 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 بیوشیمیایی و پارامترهای سرمی خون صورت گرفت و داده ها و نتایج



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 $0.25 \mu\text{g/ml}$ فاقد فعالیت همولیتیک می‌باشد، در حالی که در مقایسه با کنترل، در غلظت‌های بالاتر از $1 \mu\text{g/ml}$ فعالیت همولیتیک ملیتین، تقریباً ۹۰ درصد بوده است و HD_{50} ملیتین نیز برابر $0.5 \mu\text{g/ml}$ 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 قوی‌ترین 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 تعدیل‌کنندگی 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 0.1 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 کارآمدتر و دقیق‌تر، پیشنهاد می‌گردد که بررسی‌های آینده بر روی دیگر متغیرها مانند انسولین، تری‌گلیسریدها، LDL، HDL و ... انجام گیرد. همچنین لزوم استفاده از روش‌ها، کیت‌ها 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 بیوشیمیایی



از جمله ALT، AST، GGT، FBG و بیلی روبین 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 می باشد. نتایج این مطالعه می تواند به عنوان یافته های اولیه در درمان بیماری های کبدی مورد بررسی قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تعارض منافی 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. Zarrinnahad 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, Szczésna 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(10):209-25.
16. Hanafi MY, Zaher ELM, El-adely SEM, Sakr A, ghashi 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.

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.



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

Mahdi Babaie^{1, 2*}, Aram Ghaempanah²

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 activities. 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 HD₅₀ 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.