تهیه زهر زنبور عسل به صورت تزریقی و مطالعه برخی از خواص بیولوژیکی آن

● ابوالفضل اکبری ● سیدمحمد طباطبائی ● بهنام وحیدکاویانی ● محمود طوفانی
مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده
در بعضی از کشورها از نیش مستقیم زنبور عسل یا فرآورده‌های قابل تزریق آن در مداوای برخی از بیماریها از قبیل آرتریت روماتوئید،ضایعات ستون فقرات و دردهای ناشی از جراحی و سوختگی شدید و غیره استفاده می‌شود. به منظور تهیهٔ زهر زنبور عسل‌به صورت تزریقی، زهر تهیه شده از زنبور به روش شوک الکتریکی ابتدا در حلال مناسب حل و سپس با عبور دادن از پالاهای غشائی (۱/۲-۰/۲۲ میکرون) تخلیص و سترون گردید. از محلول اصلی غلظت‌های ۰/۱۴، ۰/۳۵ و ۱/۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه و از هر غلظت به طور جداگانه یک میلی لیتر در ویالهای دو میلی لیتری تقسیم و لیوفیلیزه شد. آزمایش‌های کنترل کیفی از قبیل اندازه‌گیری pH، سترونی و بی ضرری انجام گردید، که نتایج دلالت بر عدم آلودگی و سترون بودن و نیز مطلوب بودن زهر ویالها برای استفاده درمانی داشت. به علاوه برخی از خواص بیولوژیکی زهر بررسی و مطالعه شدکه نتایج حاصله به شرح زیر است. قدرت کشندگی زهر LD_{50} که به روش Reed & Muench روی موشهای ۲۰-۱۸ گرمی انجام شد، مقدار ۱/۲±۷۷/۶۲ میکروگرم در هر موش (۰/۰۶±۳/۸۸ میلی گرم به ازاء هر کیلو) را نشان داد. آزمایش اندازه‌گیری پروتئین زهر به روش Lowry نشان دادکه ۴/۸±۸۱ درصد زهر موجود در ویالها را پروتئین تشکیل می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی همولیزکنندگی زهر زنبور عسل حاکی است‌که مقدار ۲ میکروگرم از زهر زنبور بیش از نود درصد و مقادیر بیش از ۲ میکروگرم، صددرصد گلبولهای قرمز شستشده شدهٔ گوساله را همولیز می‌نماید. بالاخره عدم وجود واکنش متقاطع بین زهر زنبور و سموم عقرب به وسیله روش اشترلونی مشخص و ثابت گردید.

مقدمه

استفاده از سموم طبیعی در درمان بعضی از امراض، ریشه در فرهنگ و تمدن بشری داشته و در این میان زهر زنبور عسل جایگاه ویژه‌ای دارد. شواهد و قرائن نشان می‌دهد که بشر در قرون قبل از میلاد مسیح با درد و زنبور درمانی آشنا بود (۶). بابلیها، مصری‌ها، ایرانیان و رومی‌ها از جمله اقوامی بودند که از زهر زنبور عسل به منظور درمان امراض گوناگون بهره می‌جستند ژرمن‌ها و اسلاوها در قرون وسطی زهر زنبور عسل را در معالجه نقرس بکار می‌بردند و گرد خشک شده زنبور عسل را داروی مدر خوبی می‌دانستند (۸).

در قرن گذشته در بین مردم روسیه و اروپا معالجه بانیش زنبور در درمان امراضی از قبیل روماتیسم،نقرس، دردهای عصبی و بعضی از ناراحتی‌های پوستی متداول و مرسوم بوده است، و مهم اینکه پرورش دهندگان زنبور عسل که دائماً در معرض نیش زنبور بودند به روماتیسم و نقرس مبتلا نمی‌گشتند (۸) و نیز زنبور دارائی که به دردهای مزمن طولانی مثل آرتریت زانو، لگن یا مفاصل دیگر مبتلا بودند، دردشان پس از گزش زنبور در یک دوره طولانی از بین می‌رفت. این موضوع منجر به اولین مطالعات در مورد استفاده از زهر زنبور عسل برای درمان دردهای مفصلی شد (۱۲).

از اوایل قرن حاضر درمان با زهر زنبور عسل با امید بیشتری پیگیری شد. از طرفی استفاده از روش نیش مستقیم زنبور عسل، به علل دردناک بودن این روش، مشخص نبودن مقدار دقیق زهری که زنبور در هر گزش تزریق می‌نماید و نیز عدم امکان استفاده از این جانور در تمام فصول سال، آنطوریکه انتظار می‌رفت، مورد استقبال واقع نشد (۸). این مشکلات پژوهشگران را بر آن داشت تا نسبت به تهیه فرآورده‌های تزریقی از زهر زنبور عسل اقدام جدی نمایند. در این راستا در نقاط مختلف دنیا، مراکز و انجمن‌های زهر زنبور درمانی بوجود آمده است که با استفاده از نیش مستقیم زنبور عسل و یا فرآورده‌های تزریقی آن (آمپول زیر جلدی زهر، پماد موضعی (۸) و قرص‌های الکتروفورزی زهر (۱). به درمان یک سری از بیماریها از قبیل آرتریت‌های گوناگون، آرتروز زانو، اسکلرودرما، کشش، پیچ خوردگی و خشکی ستون فقرات، دردهای ناشی از جراحی و سوختگی شدید، ضایعات دیسک در ناحیه گردن و کمر، دردهای عضلانی فیبری و سرگیجه و نقرس می‌پردازند (۷).

مواد و روشها

تهیه زهر زنبور عسل تزریقی

مقدار سه گرم زهر زنبور عسل را در یک لیتر آب دوبار تقطیر سترون حل نموده و با عبور دادن از پالاهای غشائی تخلیص و سترون می‌نمائیم. برای تعیین غلظت زهر در محلول، ۵ میلی‌لیتر از محلول را در بشر به وسیله لیوفیلیزاتور خشک نموده و توزین می‌نمائیم تا غلظت زهر در یک میلی لیتر محلول بدست آید. این کار در ۵ بشر به طور جداگانه تکرار شد و میانگین غلظت زهر در میلی لیتر محاسبه گردید. از محلول زهر اصلی، در شرایط استریل ۴ محلول با غلظتهای ۰/۱۴، ۰/۳۵، ۰/۷۰ و ۱/۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه نموده سپس از هر غلظت، یک میلی لیتر داخل ویالهای ۲ میلی لیتری با رنگ تیره ریخته شد. ویالهای آماده شده به وسیله دستگاه لیوفیلیزاتور مطابق برنامه تنظیمی (۸ ساعت در دمای انجماد ۵۰- درجه سانتیگراد و فشار منفی خلاء، ۲ ساعت هم دماء شدن ویالها با محیط و درپوش گذاری ویالها توسط دستگاه) لیوفیلیزه گردید. مضافاً اینکه، چون از ماده محافظ به عللی که خواهد آمد، در تولید زهر تزریقی استفاده نشده است. بنابراین کلیه وسایل و تجهیزات، البسه، اتاقهای محل کار قبل از انجام مراحل تولید سترون شدند. آزمایش‌های کنترل کیفی زهر ویالها به شرح زیر انجام گردید.

الف- اندازه‌گیری pH زهر زنبور

از هر غلظت ۵ ویال را برداشت نموده و هر کدام را در ۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی سترون حل و pH آنها را در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد تعیین می‌نمائیم.

ب- آزمایش سترونی

برای انجام این آزمایش مطابق روش B.P. (۱۸)، از سویبین کازئین SCD برای رشد باکتریهای هوازی و قارچها و از محیط تیوگلیکولات برای رشد باکتریهای بی هوازی به عنوان محیطهای کشت انتخابی استفاده گردید. ۱۵ ویال از هر غلظت انتخاب و با آب مقطر استریل حل و ۰/۱ میلی لیتر از هر ویال را به داخل هر یک از لوله‌های محیط کشت منتقل می‌نمائیم (هر ویال در دو لوله حاوی محیط SCD و یک لوله محیط تیوگلیکولات کشت می‌شود) محیطهای تیوگلیکولات به

همراه یک سری از لوله‌های SCD را در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد و سری دیگر SCD در شرایط آزمایشگاهی (۲۵ درجه سانتیگراد) قرار می‌گیرند.

د - آزمایش بی ضرری

برای انجام آزمایش مطابق روش USP ۱۹۹۰ (۲۳)، ۰/۵ میلی لیتر از محلول زهر که حاوی ۴۵ میکروگرم زهر است به هر موش (۵ موش) به طریق داخل صفاقی تزریق می‌نمائیم. به موش شاهد ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی تزریق می‌گردد. موشهای مورد آزمایش به مدت ۱۴ روز احشاء درونی آنها (طحال، کلیه، کبد، ریه و قلب) به منظور اثرات احتمالی پاتولوژیک زهر مورد بررسی قرار می‌گیرند.

بررسی برخی از خواص بیولوژیکی زهر زنبور عسل

الف - تعیین قدرت کشندگی LD_{50} زهر زنبور عسل

به منظور تعیین قدرت کشندگی زهر زنبور عسل LD_{50} مطابق روش Reed & Muench (۲۱) از موشهای سوری ۲۰-۱۸ گرمی استفاده شده است. از زهر سترون لیوفیلیزه با سرم فیزیولوژی محلولی به غلظت ۱ میلی گرم بر هر میلی‌لیتر به عنوان محلول اصلی (Stock) تهیه نموده، سپس رقتهای مناسب ۷۴، ۹۴، ۱۱۷، ۱۸۳ و ۲۲۸ میکروگرم در میلی لیتر را با ضریب ۱/۲۵ تهیه می‌نمائیم. از هر رقت به میزان ۰/۵ میلی لیتر به هر موش در گروه چهارتائی تزریق نموده، و به مدت ۲۴ ساعت تحت نظر قرار می‌گیرند. براساس میزان مرگ‌ومیر حیوانات مقدار LD_{50} محاسبه می‌گردد.

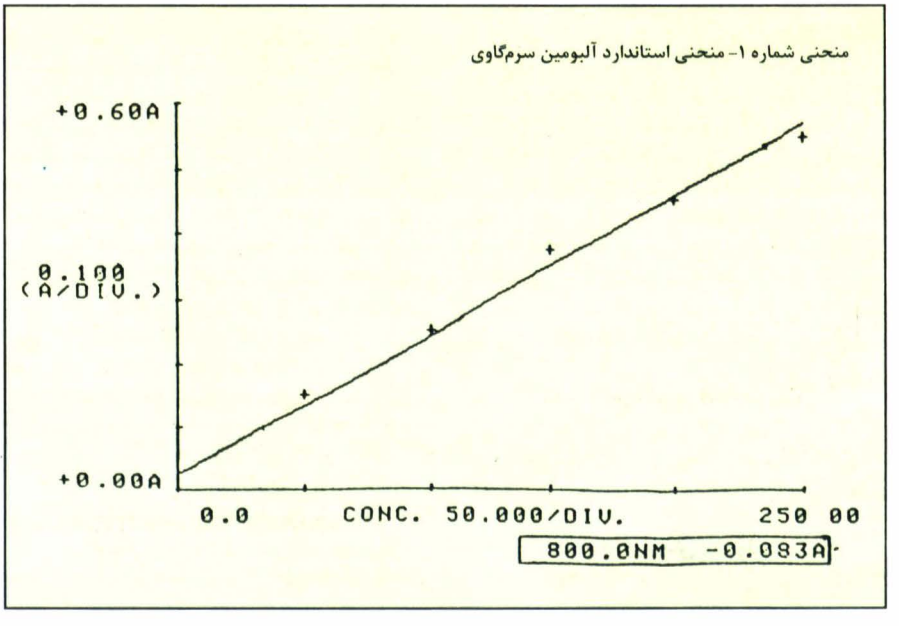
ب - اندازه گیری پروتئین زهر زنبور عسل

برای انجام این آزمایش مطابق روش Lowry (۵) عمل می‌نمائیم. از زهر لیوفیلیزه محلول یک میلی گرم بر میلی‌لیتر تهیه نموده، سپس از محلول اصلی مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم را به طور جداگانه در ۵ لوله ریخته و حجم هر کدام را با آب مقطر به یک میلی لیتر می‌رسانیم. در لوله شاهد فقط یک میلی لیتر آب مقطر می‌ریزیم. پس از اضافه نمودن آلکالین و معرف فولین به لوله‌ها، جذب پروتئینی هر رقت به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت می‌شود. آنگاه غلظت پروتئین هر رقت با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی BSA (شکل ۱) تعیین می‌گردد.

ج - انداه گیری همولیز کنندگی زهر زنبور عسل

در این آزمایش از سوسپانسیون زرده تخم مرغ به عنوان منبع لسیتین (۱۵) و سوسپانسیون گلبولهای قرمز شسته شده گوساله استفاده می‌گردد. برای انجام آزمایش، چهار لوله آزمایش تحت نامهای لوله آزمایش، لوله شاهد، لوله همولیز کامل و شاهد همولیز کامل انتخاب می‌نمائیم. در دو لوله آزمایش و شاهد هر کدام، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گلبولهای قرمز، ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ می‌ریزیم. سپس در لوله آزمایش ۰/۱ میلی لیتر زهر زنبور عسل و در لوله شاهد ۰/۱ سرم فیزیولوژی اضافه نموده و هر دو را به مدت ۴۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. پس از ۴۰ دقیقه هر دو لوله را به منظور متوقف نمودن واکنش در حمام یخ قرار می‌گیرند. از طرفی در لوله همولیز کامل ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز و در لوله شاهد همولیز کامل ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار ریخته و به هر کدام ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی، ۰/۲ میلی لیتر زرده تخم مرغ و ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه می‌نمائیم. آنگاه هر چهار لوله با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. در نهایت مایع روئی هر لوله را برداشت نموده و به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت می‌نمائیم (۲۰).

منحنی شماره ۱- منحنی استاندارد آلبومین سرم‌گاوی



آزمایش ایمنولوژیکی

این آزمایش مطابق روش اوشترلونی بین زهر زنبور عسل و سرم ضد عقرب زدگی که بر علیه سموم ۵ نوع از عقربهای خطرناک ایران ساخته شده است انجام شد (۱۹).

نتایج

تهیه زهر زنبور عسل تزریقی

بیش از سی سال است که بخش تحقیق جانوران سمی در خصوص استحصال زهر جانوران سمی، به خصوص مار و عقرب، مطالعه خواص بیولوژیکی سموم و تهیه سرمهای درمانی ضد مارگزیدگی و ضد عقرب‌زدگی تجربیات فراوانی را کسب نموده است. با بهره‌گیری از منابع علمی، تجربیات پرسنل و نیز به کارگیری لوازم و تجهیزات بخش در تهیه زهر زنبور عسل به شکل تزریقی موفقیت چشمگیری حاصل گردید. در این راستا به منظور صرفه‌جوئی در کل زهر زنبور عسل (۳/۶ گرم) و نیز به جهت رفع مشکلاتی که ممکن بود در حین انجام مراحل کار بوجود آید، تمامی مراحل ساخت ویال تزریقی، ۲ مرتبه به طور آزمایشی و هر بار با مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم زهر انجام پذیرفت. سپس کلیه مراحل کار بر روی کل زهر اعمال گردید، که در این مقاله فقط مراحل و نتایج نهائی ارائه شده است. مراحل اولیه تهیه ویالهای تزریقی زهر زنبور که شامل تخلیص، سترونی و تعیین غلظت زهر بود با موفقیت انجام گرفت، در نتیجه از ۳گرم زهر، حدود ۳۰۰۰ ویال با غلظتهای ۰/۱۴، ۰/۳۵، ۰/۷ و ۱/۴ میلی گرم به صورت لیوفیلیزه و سترون به دست آمد. از آنجائیکه روش تزریق زهر برای درمان بیماران به روش ایمنوتراپی است (یعنی از مقادیر کم زهر آغاز شده و به طور افزایشی به مقادیر زیاد خاتمه می‌پذیرد)، بنابراین دلیل انتخاب ۴ غلظت متفاوت، الگو قرار دادن روش زنبور درمانی بوده است (۶) و نیز به دلیل آنکه غلظتهای نهائی که باید مورد تزریق بیماران قرار گیرد بسیار کمتر از غلظت پایدار محلول زهر زنبور عسل می‌باشد (تنها محلولهای مائی ۱۰-۱ درصد زهر زنبور عسل از پایداری مطلوبی برخوردار می‌باشد)، ناگزیر باید فرآورده نهائی به صورت زهر لیوفیلیزه تهیه می‌شد. همانطوریکه در بخش مواد و روشها اشاره شد از ماده محافظ به دلائل زیر استفاده نشده است.

۱- بسیاری از مواد محافظ مانند فنل و مشتقات آن به دلیل وجود عواملی الکلی با زهر زنبور عسل تداخل دارند و بدین جهت قابل استفاده به عنوان ماده محافظ نمی‌باشند.

۲- روش تزریق به صورت ایمونوتراپی بوده و در بعضی از امراض نیاز به تزریق مقادیر زیاد زهر به دفعات مکرر می‌باشد. بنابراین مصرف طولانی ماده محافظ متداول نظیر مرتیولات و غیره، موجب تجمع مواد سمی در بدن بیمار و در نهایت موجب بروز عوارض جانبی خطرناک می‌گردد. نتایج حاصل از انجام آزمایش‌های کنترل کیفی زهر ویال‌های تزریقی به شرح زیر می‌باشد.

ویالهای زهر زنبور
عسل تزریقی لیوفیلیزه
در چهار غلظت متفاوت

الف - اندازه گیری pH

به منظور اندازه‌گیری pH زهر زنبور عسل از هر کدام از غلظت‌های چهارگانه با توجه به کاربرد بالینی این فرآورده، و جهت مطابقت فشار اسمزی آن با مایعات بدن از سرم فیزیولوژی برای حل نمودن زهر موجود در ویالها استفاده گردید. تمام آزمایشات در دما ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و پس از حل شدن کامل زهر انجام گردید. نتایج آزمایش بیانگر آن است که با افزایش غلظت زهر، pH آن به ترتیب از ۰/۲۱ ± ۶/۸۷ تا ۰/۱۰ ± ۵/۶۰ کاهش یافته است. نتایج بدست آمده از ۳ مرتبه اندازه‌گیری pH در جدول یک درج شده است.

ب - آزمایش سترونی

از آنجائی که زهر زنبور عسل دارای اثرات باکتریواستاتیکی و باکتریسیدی روی بعضی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۳)، بنابراین برای بررسی تأثیر محیط کشت در حضور و عدم حضور زهر زنبور عسل، از *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) به عنوان سوش هوازی و از *Clostridium sporgenes* (ATCC 19404) به عنوان سوش بی هوازی و از *Candida albicans* (ATCC 2091) به عنوان قارچ استفاده نمودیم. یافته‌های مربوط به این آزمایش همانطوریکه در جدول شماره ۲ درج شده است دلالت بر عدم آلودگی و سترون بودن زهر ویالها داشت.

ج - آزمایش بی ضرری

حیوانات تزریق شده برای انجام این آزمایش ۱۴ روز تحت نظر قرار گرفتند، همه آنها بدون استثناء در مدت ۱۴ روز افزایش وزن متعادل نشان دادند و ظاهراً هیچ عارضه مسمومیت در آنها مشاهده نگردید. بررسی آسیب‌شناسی احشاء درونی موشها نیز حاکی از سلامت کامل آنها بود نتایج حاصل از این بررسی در جدول شماره ۳ درج شده است.

بررسی برخی از خواص بیولوژیکی زهر زنبور عسل

الف - تعیین قدرت کشندگی (LD_{50}) زهر زنبور عسل

این آزمایش مطابق روش Reed & Muench سه مرتبه انجام گردید در هر مرتبه LD_{50} براساس مرگ و میر حیوانات تحت آزمایش محاسبه و تعیین گردید. سپس میانگین سه مرتبه آزمایش محاسبه و رقم ۱/۲ ± ۷۷/۶۲ میکروگرم در هر موش ۲۰-۱۸ گرمی حاصل این آزمایش‌ها بود. نتایج بدست آمده در جدول شماره ۴ ارائه شده اشت.

ب - اندازه گیری پروتئین زهر زنبور عسل

این آزمایش مطابق روش مندرج در بخش مواد و روشها دو مرتبه انجام گردید. غلظت پروتئینی زهر زنبور در مقادیر آزمایش شده با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (شکل ۱) محاسبه شد که با محاسبه میانگین نتایج آزمایش ۱ و ۲ مقدار پروتئین رقم ۴/۸ ± ۸۱ درصد زهر را نشان داد نتایج حاصله در جدول شماره ۵ ارائه شده است.

اندازه‌گیری همولیز کنندگی زهر زنبور عسل

خاصیت شکنندگی زهر با تأثیر مقادیر مختلف آن روی گلبولهای قرمز شسته شده گوساله با استفاده از سوسپانسیون زرده تخم مرغ در آزمایشگاه بررسی شد. یافته‌های این آزمایش نشان داد که مقدار بسیار کم از زهر درصد زیادی از گلبولیهای قرمز را همولیز می‌نماید. میزان شکنندگی هر مقدار از زهر با استفاده از فرمول

$$\frac{\text{جذب لوله شاهد - جذب لوله آزمایش}}{\text{جذب لوله شاهد همولیزکامل - جذب لوله همولیزکامل}} \times ۱۰۰$$

محاسبه شد.

مقادیر بدست آمده نشان داد که غلظت ۲ میکروگرم از زهر بیش از ۹۰ درصد و غلظت‌های بیشتر از ۲ میکروگرم صددرصد گلبولهای قرمز را همولیز می‌نماید. نتایج بدست آمده در جدول شماره ۶ درج شده است.

آزمایش ایمنولوژیکی

این آزمایش به منظور تعیین وجود یا عدم وجود واکنش متقاطع بین زهر زنبور و سموم عقربهای خطرناک ایران، مطابق روش اوشترلونی انجام گرفت. عدم تشکیل خطوط رسوبی بین زهر زنبور و سرم ضد عقرب زدگی نشان داد که هیچ اشتراک آنتی‌ژنتیکی یا واکنش بین زهر زنبور و سموم عقربها وجود ندارد.

بحث

تهیه زهر زنبور عسل تزریقی

اگر چه با پیشرفت علم پزشکی نکات تاریک بسیاری در زمینه بیماریهای روماتیسمی و خود ایمنی روشن گشته است، اما این بیماریها که از جمله قدیمی‌ترین امراض بشر به شمار می‌روند، هم اکنون نیز دامنگیر جوامع بشری بوده و از طب غربی نیز در اغلب موارد جز درمان علامتی و در برخی موارد جراحی و گذاشتن پروتز بجای مفاصل کاری ساخته نیست. مشکلاتی مانند مقاومت داروئی بیماران مبتلا و عدم

جدول شماره ۱- اندازه‌گیری pH محلول زهر زنبور عسل در ویالهای ساخته شده

زهر زنبور عسل mg/ml	اندازه‌گیری ph			میانگین ± انحراف معیار
	بار اول	باردوم	بارسوم	
۰/۱۴	۶/۸	۶/۷	۷/۱	۶/۸۷±۰/۲۱
۰/۳۵	۶/۳	۶	۶/۵	۶/۲۷±۰/۲۵
۰/۷	۵/۶	۶/۱	۵/۸	۵/۸۴±۰/۲۵
۱/۴	۵/۶	۵/۵	۵/۷	۵/۶±۰/۱۰
سرم فیزیولوژی	۷/۲	۷	۶/۹	۷/۰۴±۰/۱۵

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش سترونی محلول اصلی زهر ویالهای چهارگانه

زهر زنبور عسل*	رشد میکروبی در محیط ۳۷°c SCD**	رشد قارچی در محیط ۲۵°c SCD	رشد میکروبی در محیط ۳۷°c F.T***
محلول زهر اصلی قبل از تقسیم	-	-	-
۰/۱۴	-	-	-
۰/۳۵	-	-	-
۰/۷۰	-	-	-
۱/۴۰	-	-	-

* هر ویال در ۲/۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شده است.

** SCD: Soybean - Casein digest medium

*** F.T: Fluid thiogly collate medium

جدول شماره ۳- نتایج آزمایش سترونی محلول اصلی زهر ویالهای چهارگانه

حیوانات آزمایشگاهی موش سوری	وزن حیوان		
	قبل از تزریق	یک هفته پس از تزریق	دوهفته پس از تزریق
شماره ۱	۲۰	۲۳	۲۴/۵
شماره ۲	۲۰	۲۲/۵	۲۴
شماره ۳	۲۰	۲۲	۲۵
شماره ۴	۲۰	۲۳	۲۴/۵
شماره ۵	۲۰	۲۳/۵	۲۵/۵
شماره ۶ (شاهد)	۲۰	۲۲	۲۴

جدول شماره ۴- اندازه‌گیری قدرت کشندگی زهر زنبور عسل LD_{50}

آزمایش	قدرت کشندگی بر حسب میکروگرم در موش ۲۰-۱۸ گرمی	قدرت کشندگی بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن
اول	۷۷	۳/۸۵
دوم	۷۶/۸۶	۳/۴۸
سوم	۷۹	۳/۹۵
میانگین ± انحراف معیار	۷۷/۶۲±۱/۲	۳/۸۸±۰/۰۶۱

جدول شماره ۵- اندازه‌گیری پروتئین زهر زنبور عسل

زنبور عسل میکروگرم	آزمایش اول			آزمایش دوم		
	جذب پروتئین	غلظت پروتئین	درصد	جذب پروتئین	غلظت پروتئین	درصد
۵۰	۰/۱۱۸	۳۸/۸۰	۷۷/۶۰	۰/۱۱۳	۳۷/۲۰	۷۴/۳۵
۱۰۰	۰/۲۲۲	۸۷/۴۰	۸۷/۴۰	۰/۲۲۳	۸۷/۷۰	۸۷/۸۰
۱۵۰	۰/۲۹۸	۱۱۸/۲۵	۸۷/۸۰	۰/۲۷۹	۱۱۰/۷۰	۷۳/۸۰
۲۰۰	۰/۳۷۷	۱۶۵/۰۰	۸۲/۵۰	۰/۳۷۲	۱۶۲/۸۰	۸۱/۴۰
۲۵۰	۰/۴۷۶	۲۱۵/۶۰	۸۶/۲۰	۰/۴۵۰	۲۰۳/۸۰	۷۹/۷۷

جدول شماره ۶- نتایج بدست آمده از قدرت همولیز کنندگی زهر زنبور عسل

زهر زنبور عسل میکروگرم	جذب	درصد همولیز	لوله‌های شاهد	جذب	درصد همولیز
۰/۱	۰/۲۱۴	۷/۵۰	شاهد آزمایش	۰/۰۷۱	-
۰/۵	۰/۵۳۹	۲۴/۶۰	همولیز کامل	۰/۰۵۲	۱۰۰
۱	۱/۱۲۵	۵۵/۵۰	شاهد همولیزکامل	۰/۱۵۲	-
۱/۵	۱/۸۸۷	۹۵/۵۰			
۲	۱/۸۵۶	۹۳/۵۰			
<۲	≤۲/۰۵۷	۱۰۰			

وجود یک درمان قطعی برای بیماران از یک سو و وجود مقالات و گزارشهائی دال بر درمان برخی از این قبیل امراض توسط زهر زنبور عسل از سوی دیگری (۵ و ۸)، و شواهدی نظیر عدم ابتلاء بسیاری از زنبور داران به اینگونه امراض (۸ و ۱۲)، آغازگر تلاش وسیعی در سطح جهانی بوده است، تا بتوان به مطلوبترین و مؤثرترین راه درمانی قطعی این امراض دست یافت.

هم اکنون در دنیا مراکز و کلنیک‌های زنبور درمانی وجود دارد که با نیش مستقیم زنبور عسل یا فرآورده‌های زهر به درمان امراض مذکور می‌پردازند.

اولین فرآورده تزریق زیر جلدی از زهر زنبور عسل توسط لانگر در سال ۱۹۱۵ تهیه شد، در سالهای بعد فرآورده‌هایی از قبیل Apicosan (آمپول زیر جلدی) و پماد Forapin در المان، Immenin در اتریش (۸)، Toxapin در روسیه (۲)، Apikor در سوئیس، Apiveneh در فرانسه، Apitoxin در ایتالیا، Apisartron در المان و Virapin (فرآورده موضعی) در چکسلواکی ساخته شد. و در سال ۱۹۷۲، Artemow قرصهای الکتروفورزی زهر زنبور عسل را به نام Apiphor در روسیه فرموله نمود (۱).

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در سال ۱۳۷۳ با اجرای طرح (بررسی برخی از خواص بیولوژیکی زهر زنبور عسل) اقدام به تخلیص زهر زنبور عسل و تهیه آن به صورت تزریقی نمود تا اثرات درمانی این ماده بیولوژیک مورد مطالعه قرار گیرد. به دلیل کاربرد بالینی این فرآورده مجبور شدیم آزمایش‌های کنترلی کیفی آن را برابر معیارهای بین‌المللی به انجام برسانیم.

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری pH نشان داد که pH زهر موجود در ویالها با افزایش غلظت آنها کاهش یافته است (به ترتیب از pH ۶/۸±۰/۲۱ تا ۵/۶۰±۰/۰۱۰). علت کاهش pH را می‌توان به ماهیت اسیدی زهر زنبور عسل (pH=۵/۲) به دلیل وجود اسیدهای آلی در آن نسبت داد (۴). نتایج مطالعه سایر پژوهشگران در این زمینه نیز مؤید این مطلب می‌باشد. در نتیجه یکی از علل سوزش ناشی از گزش زنبور عسل را می‌توان به خاصیت اسیدی آن نسبت داد. بنابراین پیشنهاد شده است که به هنگام تزریق زیر جلدی زهر از بی حس کننده‌های موضعی استفاده شود.

در مورد بررسی سترونی زهر ویالها، از آنجائیکه زهر زنبور عسل دارای خاصیت باکتریواستاتیکی و باکتریسیدی روی بعضی میکروارگانیسمها می‌باشد، بنابراین به منظور حذف این اثرات محتویات هر ویال را با آب دوبار تقطیر استریل به مقدار ظرفیت ممکن ویال (۲/۵میلی‌لیتر) حل نموده و سپس روی محیط‌های کشت برده شد.

مطلب دیگر اینکه براساس روش پیشنهادی Bp-1993، ۲ درصد کل ویالها انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت. در راستای بررسی بی ضرری زهر تهیه شده، مقدار زهری که به حیوانات آزمایشگاهی تزریق گردید حداکثر مقداری بود که در اثر تزریق آن مرگ و میر رخ نداده بود. بنابراین حیوانات تزریق شده، نه تنها در مدت ۱۴ روز پس از تزریق از نظر وزن و سلامت ظاهری مورد کنترل واقع شدند، بلکه پس از گذشت دو هفته احشاء درونی آنها (کبد، کلیه، طحال، ریه و قلب) از نظر آسیب شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. انجام این بررسی از

آن جهت اهمیت داشت، که ممکن بود زهر در مقادیر کمتر از LD_{50} موجب مسمومیت غیر مشهودی از نظر ظاهر گردد، و این مسمومیت را با بررسی آسیب‌شناسی احشاء درونی می‌توان ردیابی نمود.

بنابراین یافته‌های این آزمایش نشان داد که فراورده‌های تزریقی زهر زنبور در مقادیر پایین‌تر از LD_{50} کاملا بی ضرر می‌باشد.

بررسی برخی از خواص بیولوژیکی زهر زنبور عسل

بخش عمده اجزاء زهر زنبور عسل را پروتئین‌ها و پپتیدهای مختلف تشکیل می‌دهد. این اجزاء را می‌توان با استفاده از خصوصیات فیزیکی از قبیل اندازه (وزن مولکولی)، بار الکتریکی و غیره جدا نمود. از اوایل قرن حاضر، پژوهشگران به مطالعه و بررسی خواص شیمیائی و فارماکولوژیک زهر خام زنبور پرداختند، سپس در سالهای بعد تلاشهایی برای جداسازی اجزای زهر صورت گرفت، که از جمله اجزای مهم زهر می‌توان به فسفولیپاز، هیالورونیداز، ملیتین (melitin)، آپامین (Apamin)، پپتید MCD (Mast cell degranulating peptide)، و غیره اشاره نمود. در این بررسی نسبت به تهیه زهر زنبور عسل به صورت تزریقی و لیوفیلیزه اقدام و پس از انجام آزمایش‌های کنترل کیفی به منظور مصرف درمانی، برخی از خواص بیولوژیکی آن برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

یکی از مواردی که انجام آن از اهمیت زیادی برخوردار بوده و لازمه سایر بررسیها می‌باشد، تعیین قدرت کشندگی (LD_{50}) زهر بود، منظور از این آزمایش بدست آوردن مقدار کمی قدرت کشندگی زهر و کاربرد آن در تعیین مقدار مناسب برای انجام آزمایش بی ضرری بود. مقادیری که برای LD_{50} زهر نژادهای مختلف زنبور عسل در دنیا ذکر نموده‌اند متفاوت و در حدود ۴-۱/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد، دلیل این تفاوت را در رابطه با خصوصیات بیولوژیکی حیوان، شرایط کار با آن، ویژگیهای اکولوژیکی و فلور گیاهی منطقه‌ای، نحوه و روش زهرگیری و اینکه پس از زهرگیری زهر خشک بشود یا به صورت محلول استفاده گردد، می‌دانند، مضافاً اینکه تعداد دفعات زهرگیری و فصل نیز از مهمترین عوامل مؤثر بر کیفیت زهر به شمار می‌روند. زهر مورد استفاده در این بررسی، زهر حاصل از ۴ بار زهرگیری در فصلهای بهار و تابستان بوده است. به هر حال LD_{50} زهر زنبور عسل تعیین شده در ایران، در محدوده LD_{50}هایی است که توسط دیگر پژوهشگران در دنیا بدست آمده و مقدار قابل قبولی است. در رابطه با تعیین مقدار پروتئین زهر زنبور، نتایج بدست آمده نشان می‌دهد، که بخش زیادی از ترکیبات زهر را اجزای پروتئینی تشکیل می‌دهد. رقم بدست آمده ۴/۸ ± ۸۱ درصد) در محدوده یافته‌های سایر مراکز تحقیقاتی در دنیا، که مقدار آن را معمولاً بین ۷۰ تا ۹۰ درصد گزارش نموده‌اند، می‌باشد.

از خواص دیگر زهر زنبور عسل خاصیت همولیز کنندگی آن می‌باشد. این اثر را به آنزیم فسفولیپاز A_2 و پلی پپتید ملیتین نسبت می‌دهند (۱۲). یافته‌های حاصل از این آزمایش بیانگر آن است که این خاصیت در زهر زنبور بسیار زیاد است. در این خصوص شایان ذکر است که، هم آنزیم فسفولیپاز A_2 و هم ملیتین اثر شکنندگی را دارا می‌باشند، و وقتی این دو عامل در کنار هم اثر داده شوند، فعالیت شکنندگی چندین برابر افزایش می‌یابد (۱۶).

مورد دیگر اینکه زهر زنبور عسل با سرم ضد عقرب زدگی در آزمایشگاه (invitro) مطابق روش اوشترلونی مورد آزمایش قرار گرفت، این سرم که بر علیه سم ۵ نوع از عقربهای خطرناک ایران ساخته می‌شود با زهر زنبور عسل هیچ خط رسوبی ایجاد ننمود. این نتیجه حاکی از آن است که سرم ضد عقرب زدگی زهر زنبور را خنثی نمی‌نماید. این آزمایش از این جهت حائز اهمیت است که برای بعضی از دست اندرکاران سئوالی مطرح بود و آن اینکه آیا می‌توان از سرم ضد عقرب زدگی برای مداوای مصدومین زنبور زدگی استفاده نمود؟ بنابراین با توجه به نتیجه بدست آمده از چنین سرمی برای درمان مصدومین فوق‌الذکر نمی‌شود استفاده نمود.

سپاسگزاری

از ریاست محترم مؤسسه رازی برادر جناب آقای دکتر علی اکبر محمدی به علت تشویق و مساعدت بی شائبه ایشان در ارائه و اجرای طرح تشکر می‌گردد. از پرسنل بخش تحقیق جانوران سمی برای تلاش همه جانبه، از جمله فراهم نمودن امکانات لازم و انجام آزمایشات مختلف، از مسئولین و پرسنل بخشهای میکروبیولوژی، ژنتیک، بیوشیمی و طیور که در مراحل مختلف اجرای طرح همکاری نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Ardemou NM: 1972. Apiphor prepration of bee venom. Uch Zap Cosk Cos Univ. 140, 70-77.

2- Beeker S: 1931. Treatment of rheumatic diseases with injection form of honey-bee venom (Immenin). Therap Cegenw 72, 251-256.

3- Benton AW., Morse RA, Kosikowski FV. 1963, Bioassay and standardization of venom of the honey bee. Nature 4877: 295-296, Apr. 20.

4- Crane E., 1990, Pollan, propolis, royal jelly. bee venom, bee brood. In: Bees and beekeeping, science, practice and world resources. Berlin, Heinemaun Naunes, 465-69.

5- David T. Plummer, 1982, An introduction to practical biochemistry. New Delhi, Hill publishing company P. 445-46.

6- Deklobusitzky D., 1971, Venomous animals and their venoms, New York, Academic press, Vol. III, Venomus invertebrates, P. 443-478.

7- Dietrich K. et al., 1990, Bee venom therapy for chronic pain, the journal of neurological & orthopaedic medicine & surgery, volume 11 , P. 195-97.

8- Fishkov E.L. 1955, therapeutic use of a product from bee venom (KF). Klin Med 32, 8, P., 20-25.

9- Gennaro R.A., 1990, Remington's pharmaceutical sciences. Easton: Mac publishing company, P. 768-1298. 1015, 1024, 1173.

10- Habermann E., 1972, Bee and wasp venoms, Science, 177 4046, P. 314-22.

11- Jacoues Kroner, M.D. et al 1938, The treatment of rheumatoid arthritis with an injectable form of bee venom. New York, Annal of internal medicine, P. 1077-83.

12- Jeffrey E. et al., 1990, Contribution of bee venom phospholipase A2 contamination in melittin fractions to presumed activation of tissue phospholipase A2. Toxicon Vol. 28, No. 6, PP. 647-656.

13- Justin, O., 1995, Toxinology of venoms from the honey bee genus apis, Toxicon Vol. 33 No. 7, PP. 917-927.

14- Kaviani-Vahid B. et al., 1992, Effects of bee venom in treatment of patients with rheumatic diseases. Singapore. Singapore National University Press, Vol., 11 P. 205-214.

15- Marinetti G.V., 1965, The action of phospholipase A on lipoproteins, biochimican et biophysica ACTA, 98, P. 554-65.

16- Mollay, C. and Kreil, G. 1974, Enhancement of bee venom phospholipase A2 activity by melittin. Directlytic factor from cobra venom and pollymyxin B, FEBS Lett. 46, P. 141-144.

17- O'coneer R., Peak M.L. 1978, Venoms of Apidae. In Bettini S. ed. Arthropod venoms (Handbook of experimental pharmacology), Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, P. 613-659.

18- Office of the British pharmacopeia commission. British pharmacopeia, London: (HMSO). Vol. 1, 207-208. Vol. II, Appendix XVIA, A180-A183.

19- Ouchterlony, 1962, Diffusion in gel method for immunological analysis, prg. Allergy. 6: 30.

20- Ouyangg C. and Ynshian S., 1970 Relationship between pharmacological actions and Enzymatic activities of the venom of T. gramineuss.

21- Reed L. J. and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. The American Journal of Hygieno, Vol. 27, No. 3 P. 493-97.

22- Short TR, Jackson R. 1978, Treatment of canine arthritis with bee venom. proc N Am Apiother Soc 1: 86.

23- United states pharmacopeical convention Inc. The United States pharmacopeia (USP. XXII), Pensylvania: Mack printing company, 1500, 1493, 1484.

24- Von Bredow J. et al. 1978. Treatment of equine arthritis with bee venom proc N Am Apiother Soc 1: 141.

25- Wermmer D. Kallenbach NR, 1983, Structure of apamin in solution: A two dimensional nuclear magnetic resonance study. Biochemistry 22: 1901-1906.

26- Yoshimoto S. 1985, Effects of Apitherapy by bee acupunture the XXXth international Apiculture congress of apimondia, Nagoya 490-495.