DOI: 10.22092/vj.2018.116295.1389
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تعیین میزان دوز کشنده و دوز موثر در سم مار شاخدار ایرانی

• **رسول مدنی (نویسنده مسئول)**
بخش پروتئومیکس و بیوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

• **سیده مریم رضوی**
دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

• **فریبا گلچین‌فر**
استادیار بخش پروتئومیکس و بیوشیمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۰۶-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۹-۰۱-۱۳۹۷

Email: madanirasool@gmail.com

چکیده

جهت تعیین میزان دوز کشنده (LD50) سم مار شاخدار ایرانی و به دنبال آن تعیین دوز موثر (ED50) پادزهر (آنتی ونوم) آن، ابتدا غلظت پروتئین‌های سم مارشاخدار به روش Lowry و با استفاده از پروتئین استاندارد BSA تعیین گردید که میزان آن برابر با ۱۵۰۰ µg/ml گزارش گردید. سپس برای اندازه‌گیری میزان کشندگی سم مار، در شش سطح، از موش‌های آزمایشگاهی تیپ BALB/c استرالیایی جنس ماده با وزن ۲۰-۱۸ gr استفاده گردید. همچنین جهت محاسبه نتایج به دست آمده از نرم‌افزار SPSS و برنامه تجزیه آماری Probit استفاده شدکه میزان آن برابر با ۲۱/۹ µg/mouse گزارش گردید وبا استفاده از مقدار LD50 به دست آمده و به وسیله مخلوط مقدارثابت سم حل شده در سالین ۸۵ درصد و مقادیر متغیری از آنتی ونوم مونووالان میزان دوزموثر (effective dose) به دست آمد بطوری که ED50 برابر با ۶۴۰۱/۳۹۵ µg/ml گزارش گردید.با توجه به میزان LD50 به دست آمده، مار شاخدار ایرانی جزء مارهای سمی و خطرناک محسوب می‌شود. با توجه به میزان بالای ED50 بدست آمده، بهتر است از سرم پلی والان برای خنثی‌سازی سم این مار استفاده شود.

کلمات کلیدی: پروتئین سنجی، سم مارشاخدار ایرانی، دوز کشنده سم مار ایرانی، دوز موثر

Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 70-76

Determination of thelethal dose (LD50) and the effective dose (ED50) of Iranian horned viper venom

By: Madani, R., (Corresponding Author), Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Department of Microbiology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.; Razavi, S.M., Student of M.Sc. in Biochemistry. Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Golchinfar, F., M.Sc. Biochemistry, Biotechnology. Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, IR Iran.

Received: 2017-11-27 **Accepted: 2018-04-18**

Email: madanirasool@gmail.com

To determine the lethal dose (LD50) of Persian horned viper venom and the effective dose of this venom, primarily concentration of proteins in snake venom was measured by Lowry method and using BSA as standard protein which was reported to be 1500 µg/ml. The lethal dose at six levels was calculated on laboratory BALB/c Australian mice and female sex with weight of 18-20 gr, using SPSS software and Probit statistical analysis program, this amount was reported to be 21.9 µg/mouse. While utilizing the obtained LD50 amount and by the fixed amount of compound solved in 85% Saline and varied amounts of monovalent antivenom, the neutralizing dosage or effective dose could be obtained, in such a way that ratio of venom to antivenom was considered at one level and Australian BALB/c mice were injected with 18-20 gr of the female sex at six levels, and the achieved results were reported to be ED50 equal to 6401.4 µg/ml using SPSS software and Probit statistical analysis program. Considering the obtained LD50 amount, Persian horned viper is regarded as one of the poisonous and dangerous snakes. Considering the high obtained ED50 amount, it is better to use the polyvalent serum to neutralize the poson of this snake.

Key words: protein assay, Persian horned viper venom, LD50 of Persian snake venom, effective dose

مقدمه

مارگزیدگی از مسائلی است که گستره وسیعی از جهان را در بر گرفته است و مشکلات بسیاری را در سازمان بهداشت جهانی مطرح ساخته است. علاوه بر اینکه سالانه تعداد زیادی ازافراد در اثر مارگزیدگی و فوت ناشی از آن در آمار جهانی قرار می‌گیرند، در کشوری مثل افریقا در فصل درو و برداشت محصول، ۷۰ درصد تخت‌های بیمارستان‌ها توسط افراد مارگزیده اشغال می‌شود. در بسیاری از کشورهای فقیر که دسترسی به مراکز بهداشتی و درمانی ندارند و یا معتقد به معالجات سنتی و بومی هستند و یا دسترسی به پادزهر مناسب ندارند، تعداد زیادی از افراد مارگزیده از بین می‌روند بدون اینکه در آمار مربوط به مارگزیدگی قرار بگیرند (۱۴و۲۱). تاکنون حدود ۳۰۰۰ گونه مار شناسایی شده است که در این میان حدود ۴۰۰ گونه آنها سمی می‌باشند و از میان آنها فقط ۵۰ گونه خطرناک بوده و می‌تواند برای انسان مشکل‌ساز باشد. البته مارهای غیرسمی نیز قادر به گاز گرفتن انسان می‌باشند، که جای نگرانی نیست. مارها به جز در قطب جنوب در سایر قسمت‌های دنیا وجود دارند (۱۱).

چهار گروه مارهای سمی شامل: ۱. گروه افعی‌ها ۲. گروه مارهای کبرا ۳. گروه مارهای دریایی ۴. گروه مارهای نیمه سمی

اثر سم مار در انواع مارها بر روی نسوج زنده متفاوت و ممکن است یک یا چند خاصیت سمی در سم یک نوع مار موجود باشد با تزریق سم مار به حیوانات آزمایشگاهی، آثار ظاهر شده، با نشانه‌های بالینی، مجموعه‌ای از تمام خواص سم خواهد بود. به عبارت دیگر سم مار از نظر آزمایشگاهی از یک سری عوامل و فاکتورهای مختلف تشکیل شده است. بنابراین تصویر نهایی مسمومیت با سم مار حاصل فعل و انفعالات پیچیده متقابل بین پلی‌پپتیدهای زهری با آنزیم‌های گوناگون و محیط داخلی بدن است. با توجه به اثرات سمی سم مار، این سم ممکن است به دو گروه طبقه‌بندی شود: ممکن است اثرات نوروتوکسیک (مثل Elapidea) بر جای گذارد و یا اثرات هموژیک (مثل Viperidae) بر روی شخص مارگزیده داشته باشد.

سم مار Viperidae یا افعی‌ها که مار شاخدار ایرانی هم جزء این خانواده است، شامل تعدادی از پروتئین‌های مختلف هستند که تغییراتی را درآبشار انعقاد خون و در سیستم شریان بند نرمال و ترمیم بافت القاء می‌کنند.

مطالعه بر روی بیماران مارگزیده به وسیله انواع گونه‌های Viperidae تفاوت‌های شگفت‌انگیزی را در تظاهرات بالینی از اختلالات عصبی تا افزایش نفوذپذیری مویرگی و ادم نشان می‌دهد. این نتایج پاتولوژیک ممکن است در اثر هم‌افزایی اثرات مختلف آنزیم‌ها و پروتئین‌های

مختلف موجود در سم باشد (۳و۸و۱۰و۱۶و۱۷و۱۸).

پژوهشگران با بررسی و استفاده از مواد موجود در سم مارها، موفق به تولید داروهای مختلفی از جمله داروهای پیشگیری‌کننده ایست قلبی و یا برطرف‌کننده دردهای عصبی و عضلانی شده‌اند. به عنوان مثال فراورده‌هایی که از سم افعی‌ها مانند بوتروپس یا راسل ساخته می‌شود، گاهی در درمان بیماری‌های هموفیلی و خونریزی‌های شدید از قبیل خونریزی رحم و شبکیه چشم و دهان به کار می‌رود (۱۱).

مار شاخدار ایرانی با نام علمی *Peseudocerastes persicus* fieldi و نام انگلیسی Persian Horned Viper شناخته شده است که جزء خانواده افعی‌هاست.

مواد و روش‌ها

سنجش پروتئین به روش لوری

شایع‌ترین روش اندازه گیری پروتئین‌ها در کارهای تحقیقاتی، روش لوری می‌باشد. این روش گروه فنل را در ریشه تیروزین، مورد شناسایی قرار داده و دارای حساسیت ۱۰۰-۱ µg/ml پروتئین است.

در این روش نخستین مرحله، آزمایش بیوره است که موجب احیاء مس دو ظرفیتی (Cu^{+2}) به مس یک ظرفیتی (Cu^{+}) می‌شود. سپس در واکنش دوم از مس یک ظرفیتی برای احیاء معرف فسسفو مولیبدنوم و فسفو تنگستات (FolinCiocaltu) استفاده می‌نماید. این محصول به مولیبدنوم/تنگستن بلو احیاء می‌شود که رنگ آبی تیره ایجاد می‌کند. و در طول موج ۷۵۰ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب نمونه‌ها خوانده می‌شود (۱۲).

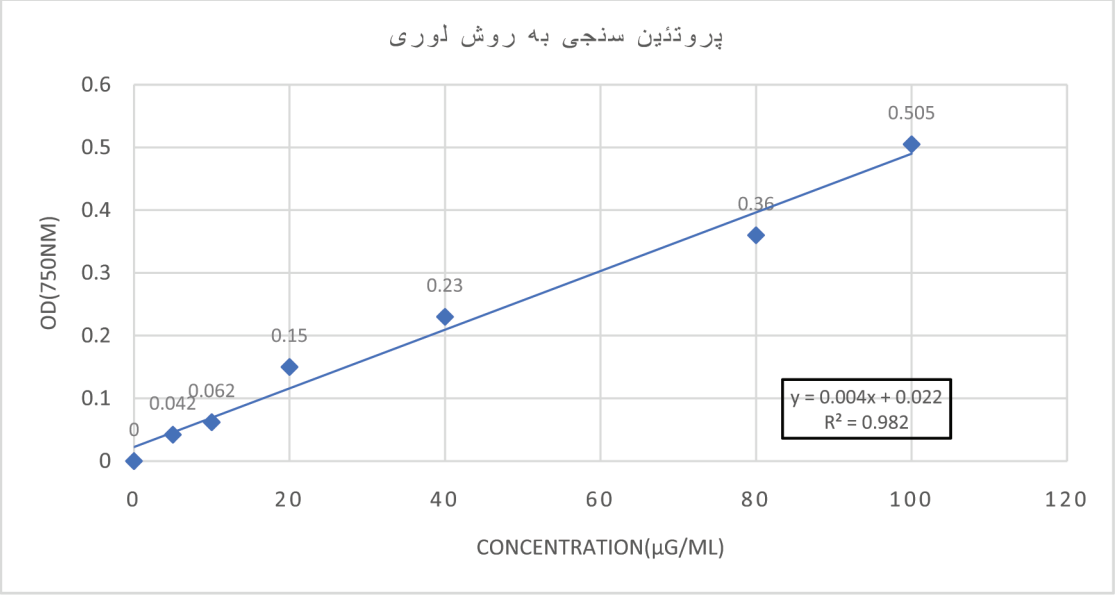
جهت تهیه نمونه‌های استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید، که غلظت آن ۱ mg/ml بوده و از آن هفت رقت مختلف (در هفت لوله آزمایش) از صفر تا صد میکرولیتر تهیه گردید. معرف Folin-Ciocalteu برای تشخیص مس احیا شده، به هر یک از لوله‌های آزمایش، اضافه گردید. ۲۵ دقیقه بعد از قرار گرفتن محلول‌ها در تاریکی، جذب آن‌ها در طول موج ۷۵۰nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل SP-A04) خوانده شد و در نهایت منحنی استاندارد در این محدوده غلظت‌ها رسم گردید.

با توجه به میزان جذب پروتئین مجهول و نمودار رسم شده (شکل ۱)، غلظت پروتئین موجود در سم به دست آمد.

تعیین دوز کشنده سم مار (تعیین LD۵۰)

برای انجام این آزمایش، از موش‌های ماده BALB/c با وزن ۲۰-۱۸ گرم استفاده شد (۲و۱۵). این موش‌ها از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردیدند. به این صورت که از شش گروه موش استفاده شد که در هر گروه شش موش قرار داشتند. ابتدا از سم مورد نظر با توجه به غلظت پروتئین موجود در آن که در روش لوری محاسبه گردید،یک استوک ۱۰۰ µg/ml به کمک سالین ۸۵ درصد تهیه شده و سنجش‌ها با استفاده از شش سطح (تعداد گروه موش‌ها)، با فاکتور رقت (Dilution Factor) ۱/۱.۲ انجام شد.

محلول تهیه شده قبل از تزریق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه



شکل ۱- تعیین غلظت پروتئین سم مار شاخدار ایرانی به روش لوری

سانتی‌گراد انکوبه شد.

تزریق به گونه‌ای بود که مرگ و میر بیشتر در گروه‌های اول و مرگ و میر کمتر در گروه‌های آخر صورت گرفت (از غلظت بالای سم به غلظت پایین) که در جدول ۱ درج شده است.

از محلول مورد نظردر هر سطح، ۰/۵ ml از طریق درون وریدی به هرموش، تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، آمار مرگ و میر بررسی گردید. از طریق برنامه نرم‌افزاری SPSS وتجزیه آماری Probit، میزان LD50 تعیین گردید (۱۹و۲۰و۲۲).

تعیین دوز موثر آنتی ونوم (ED50)

دوز موثر آنتی ونوم، با استفاده از مخلوط مقدار ثابت ونوم حل شده در سالین ۸۵ درصد با مقادیر متغیری از آنتی ونوم انجام شد که نسبت ونوم به آنتی ونوم به عنوان یک سطح در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمایش، از موش‌های ماده BALB/c با وزن ۲۰-۱۸ گرم استفاده شد. این موش‌ها از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردیدند. تزریق موش‌ها در شش سطح، صورت گرفت که در هر سطح،شش موش BALB/c استرالیایی با وزن ۲۰-۱۸ gr قرار داده شد. فاکتور رقت برابر ۱/۱.۵ در نظر گرفته شد. در گروه‌های اول تا ششم به ترتیب از دوز آنتی ونوم کاسته شد به طوری که در گروه آخر که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد، تزریق فقط با سم و سالین صورت گرفت. Challenge Dose برابر ۳ (3LD50) در نظر گرفته شد.

لوله‌های حاوی محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شد. از محلول تهیه شده برای هر سطح، به میزان ۰/۵ ml به هر موش تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق تعداد موش‌های کشته شده و زنده مانده بررسی شده و میزان ED50 (جدول ۲) با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS و تجزیه آماری Probit محاسبه گردید (۱و۴و۹و۱۹و۲۰و۲۲).

نتایج

تعیین مقدار غلظت پروتئین سم مار شاخدار ایرانی

با استفاده از نتایج حاصل از روش لوری در سنجش پروتئین، مقدار غلظت پروتئین موجود در سم مار برابر با ۱۵۰۰ µg/ml گزارش گردید.

تعیین میزان دوز کشنده (LD50) سم مار

دوز کشنده (LD50) یا Lethal Dose برابر با دوزی از سم است که قادر است ۵۰ درصد از حیوانات مورد آزمایش را از بین ببرد که در این آزمایش از شش گروه موش BALB/c با وزن ۲۰-۱۸ گرم استفاده گردید و در هر گروه، شش موش قرار گرفتند. با توجه به مرگ و میر آن‌ها و با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و تجزیه آماری Probit میزان LD50 برابر با ۲۱/۹ µg/mouseگزارش گردید.

تعیین میزان دوز موثر (ED50) آنتی ونوم

ED50 یا دوز موثر عبارت است از دوزی که یک پاسخ درمانی مناسب روی ۵۰ درصد از حیواناتی که این دوز را دریافت کرده‌اند، دارد. در این آزمایش از شش گروه موش BALB/c با وزن ۲۰-۱۸ گرم استفاده گردید و در هر گروه شش موش قرار گرفتند. با توجه به میزان مرگ و میر و زنده ماندن موش‌ها و با استفاده از نرم‌افزار SPSS و برنامه تجزیه آماری Probit میزان ED50 برابر ۶۴۰۱/۳۹۵ µg/ml اعلام گردید.

بحث

سم مار که به آن ونوم می‌گویند، مخلوطی از مواد بیولوژیکی متشکل از پلی‌پپتیدهای آنزیمی و غیر آنزیمی است که عملشان در انسان موجب بروز مسمومیت‌های مارگزیدگی می‌شود. با استفاده از این مواد

جدول ۱- تعیین قدرت کشندگی سم مار شاخدار ایرانی با استفاده از تجزیه آماری Probit

Level(µg)	Venom at ۱۰۰(µg/ml)	Salin(µl)	Total(µl)	Death
۳۵	۲۴۵۰	۱۰۵۰	۳۵۰۰	۶
۲۹	۲۰۳۰	۱۴۷۰	۳۵۰۰	۶
۲۴	۱۶۸۰	۱۸۲۰	۳۵۰۰	۴
۲۰	۱۴۰۰	۲۱۰۰	۳۵۰۰	۲
۱۷	۱۱۹۰	۲۳۱۰	۳۵۰۰	۰
۱۴	۹۸۰	۲۵۲۰	۳۵۰۰	۰
LD50=۲۱/۹µg/mouse				
LD50=۱/۰۹۵ mg/kg	Upper confidence= ۲۴/۸	Lower confidence=۱۹/۶		

بیولوژیکی موجود در سم مار، می‌توان از آن‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد.

برای شناخت سم هر نوع مار نیاز است ابتدا خصوصیات بیولوژیکی ومیزان دوز کشنده آن تعیین شود.

NaoulOukkache و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مراکش میزان LD50 سه گروه از مارهای افعی خطرناک یعنی (Cc) *Cerastes cerastes*, (Ba) *Bitis arietans*, (Mm) *Macrovipera mauritanica* را مورد ارزیابی قرار دادند. آزمایش روی موش‌های سوئیسی دو ماهه و از طریق تزریق IV صورت گرفت و مرگ و میر ۲۴ ساعت پس از تزریق، مورد بررسی قرار گرفت و میزان دوز کشنده از طریق برنامه Prism محاسبه گردید.ونوم مار Cc بیشترین میزان سمیت با LD50= ۵/۷۵ µg/mouse و سم مار Ba با میزان سمیت ۱۰ برابر کمتر، LD50 برابر با µg/mouse ۵۲/۵۴ داشت و سم مار Mm با LD50 = ۵/۹۷ µg/mouse در رده دوم از نظر میزان سمیت قرار گرفت (۱۴) . در تحقیقی که توسط گلچین فر و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران صورت گرفت، میزان LD50 سم مار ناجا از طریق روش Spearman-karber محاسبه گردید که میزان آن برابر با LD50 = ۶/۵۰ µg/mouse بود (۷). در تحقیقی که توسط طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۷۶ در ایران روی خواص بیولوژیکی سم مار شاخدار ایرانی صورت گرفت، وزن مولکولی پروتئینهای سم ۳۸ تا ۸۲/۵ KD به دست آمد (۲۰). در سال ۲۰۱۲ Nalbantsoy و همکاران، روی سم مار افعی lebetina *Macrovipera lebetina* کار کردند که LD50 سم مار و توکسیتوسیتی آن را اندازه گیری کردند. آنها سم را به چهار گروه از موش‌های آلبینوی سوییسی ۳۲-۲۸ گرمی از طریق IP تزریق کردند و در نهایت با استفاده از برنامه Probit میزان LD50 را برابر ۷/۵۸ mg/kg به دست آوردند. میزان IC50 را با استفاده از نمک زرد تترازولیوم (MTT) و در نهایت با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism برابر با ۰/۶۲ µg/ml گزارش کردند (۱۳). در پژوهشی که که توسط Gabriela و همکاران در برزیل صورت گرفت، میزان سمیت و LD50 و LD50 و آنزیم‌های سم هشت نوع مار Micrurus که از مناطق جغرافیایی مختلف برزیل جمع‌آوری شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. گزش مار Micrurus باعث فلج عضلانی و توقف تنفسی و در نهایت منجر به مرگ افراد مار گزیده چند ساعت پس از گزش می شود. برای تعیین LD50 از موش‌های سوئیسی و تزریق داخل صفاقی استفاده شد که موش‌ها در پنج سطح شش‌تایی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج با استفاده از تجزیه آماری Probit بر حسب µg venom/mouse به دست آمد. میزان LD50 این هشت گونه از مار Micrurus، مقادیر مختلفی از µg venom/mouse ۷-۷۶ را نشان داد. میزان LD50 با استفاده از تست ELIZA و Western blot محاسبه گردید که این آزمایشات، ظرفیت‌های مختلفی از آنتی ونوم برای خنثی‌سازی سم گونه‌های مختلف این نوع مار نشان داد. آزمایشات خنثی‌سازی in vitro و in vivo نشان داد که آنتی ونوم پلی والان به دست آمده از سرم اسب قادر به خنثی‌سازی خاصیت سمی تمام زهرها نخواهد بود. این نتایج نشان داد که سم گونه‌های مختلف مار Micrurus دارای خواص کیفی و کمی بسیار متفاوتی هستند که این تفاوت احتمالا به دلیل سازگاری مارهای مختلف این نوع با زیستگاه‌های بسیار متفاوتی است که دارند. همچنین این نتایج نشان داد که آنتی ونوم مورد استفاده برای درمان انسانی در برزیل به طور کامل قادر به خنثی سازی فعالیت‌های سمی زهر گونه‌های مختلف این نوع مار که در این کشور زندگی می‌کنند، نمی‌باشد. این پژوهش نشان داد که تغییرات در سطح ایمن‌سازی باید با افزودن ونوم‌های دیگر به مخلوط آنتی‌ژنیک به منظور تولید آنتی ونوم درمانی موثر صورت گیرد (۶). در سال ۱۹۹۹، Denis V و همکاران

جدول ۲-تعیین دوز موثر آنتی ونوم مار شاخدار ایرانی با استفاده از تجزیه آماری Probit

(Level(µg/ml	Venom	Anti venom(µl)	Salin(µl)	Total(µl)	Survival(µl)
۳۵۰۰	۴۶۲	۱۳۲	۲۹۰۶	۳۵۰۰	۶
۵۲۵۰	۴۶۲	۸۸	۲۹۵۰	۳۵۰۰	۴
۷۸۳۰	۴۶۲	۵۹	۲۹۷۹	۳۵۰۰	۲
۱۱۵۵۰	۴۶۲	۴۰	۲۹۹۸	۳۵۰۰	۰
۱۷۱۱۱	۴۶۲	۲۷	۳۰۱۱	۳۵۰۰	۰
Cntrol	۴۶۲	۰	۳۰۳۸	۳۵۰۰	۰
ED50= ۶۴۰۱/۳۹۵ µg/ml					
UpperConfidence =۸۳۳۰/۲۸۶µg/ml					
Lower Confidence =۴۸۶۶/۲۷۱ µg/ml					
Chi-Square=۰/۷۴۶					

پژوهشی را به منظور بررسی رابطه بین رژیم غذایی و میزان سمیت دو گونه از مارهای Pit Viper انجام دادند. مارهای *Bothrops alternatus* در تمام طول حیات خود از جانوران خونگرم تغذیه می‌کنند اما گونه دیگر یعنی مارهای *Bothrops jararaca* در دوره نوزادی از جانوران خونسرد ودرزمان بلوغ از موجودات خونگرم تغذیه می کنند. در این پژوهش از مارهای نوزاد و بالغ هر دو گونه ذکر شده، استفاده گردید و برای تغذیه هر گروه، از موش به عنوان موجود خونگرم و قورباغه به عنوان موجود خونسرد استفاده شد. در نهایت میزان LD50 با استفاده از برنامه Probit محاسبه گردید. میزان سمیت مارهای نوزاد گونه *B. jararaca* (LD50=۵۳/۶۴) که با قورباغه تغذیه شده بودند در مقایسه با نوع بالغ آن(LD50=۹۱/۴۴) تقریبا دو برابر بود. درمورد تغذیه با موش: میزان سمیت مارهای بالغ (LD50=۱/۷۴) در مقایسه با مارهای نوزاد (LD50=۵/۸۸)، ۳/۴ مرتبه بیشتر بود، که این نتایج با توجه به تغییر نوع رژیم غذایی از نوزادی به سن بلوغ قابل توجیه است. در مورد گونه *B. alternatus*، میزان سمیت بین مارهای نوزاد که از قورباغه تغذیه می‌کردند(LD50=۷۹/۱۱) و مارهای بالغ (LD50=۷۷/۵۳)، تفاوت چندانی وجود نداشت و در مورد میزان سمیت ونوم گروهی از این گونه که از موش تغذیه کرده بودند، نیز بین مارهای نوزاد (LD50 =۴/۵۴) و مارهای بالغ (LD50=۴/۶۹) تفاوت چندانی وجود نداشت زیرا این گونه از مارها در تمام طول عمر خود از موجودات خونگرم تغذیه می‌کنند (۵).

با توجه به اینکه زیستگاه مار شاخدار ایرانی شامل ایران و چند کشور همسایه می‌باشد و تحقیقات چندانی روی سم این نوع مار صورت نگرفته است، این موضوع انگیزه‌ای برای انجام آزمایشات مقدماتی، مانند تعیین غلظت پروتئین‌های سم مار شاخدار، تعیین دوز کشنده سم، و تعیین دوز موثر آنتی ونوم شد تا در کارهای تحقیقاتی آینده با استناد به نتایج این آزمایش‌ها، اقدام به شناسایی دقیق پروتئین‌های سم مار شاخدار ایرانی گردد.

در پژوهش حاضر، میزان سمیت ونوم (LD50=۲۱/۹ µg/mouse) و میزان دوز موثر آنتی ونوم (LD50=۶۴۰۱/۳۹۵ µg/mouse)، که به وسیله سرم مونووالان و با آزمایش روی موش های BALB/c استرالیایی به دست آمده است و با توجه به میزان LD50 در پژوهش‌های مورد مطالعه ذکر شده در بالا، می‌توان نتیجه گرفت که مار شاخدار ایرانی جزء مارهای سمی و خطرناک می‌باشد. با توجه به بالا بودن میزان ED۵۰ به دست آمده، نتیجه‌گیری می‌شود که سم این مار بسیار قوی بوده و مقدار بالایی از سرم مونووالان برای خنثی سازی آن مورد نیاز است و به نظر می‌رسد استفاده از سرم پلی والان برای خنثی‌سازی سم مار شاخدار ایرانی مناسب‌تر باشد. یعنی بهتر است از چند آنتی ونوم برای خنثی‌سازی سم این مار بهره جست.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همراهی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج که امکانات آزمایشگاهی را برای انجام این پروژه مهیا نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد. از تمامی کارکنان بخش پروتئومیکس و بیوشیمی این موسسه که در مراحل مختلف اجرای این پروژه همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Art Carter, Wyeth-A yerst Research, Chazy, NY. 1978. Using the Spearman-Karber Method to estimate the ED50. *Sugi* 1120-1125.

2. Bolaños, R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 21: 360–363.

3. Broadley CM. 1968.The venemous snakes in Central and South Africa. In: Bücherl, W, Buckley E, Deulofeu V (eds) Venomous Animals and Their Venoms. Academic Press, New York, London 4: 433-436.

4. Chippaux JP, GoyffonM . 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36: 823–46 .

5. Denis V. Anderade and Augusto S.1999. Relationship of venom ontogeny and diet in Bothrops. Departamento de Zoologia 200-204. http://w.w.w.jstor.org/stable/3893080.

6. Gabriela D. Tanaka, Maria de Fa ´tima D. Furtado, Fernanda C. V. Portaro, Osvaldo Augusto Sant'Anna1, Denise V. Tambourgi. 2010. Diversity of Micrurus Snake Species Related to Their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. *Journal. pntd.* Volume 4 Issue 3.

7. Golchinfar, F. Madani, Rasool. Emami, T. 2015. Designing a competitive ELISA for evaluation of anti-snake venom serum potency. *Veterinary journal (Pajuhesh & Sazandegi)*. 110: 9-16

8. Hsiang A, Davis M. 2015. The origin of snakes : revealing the ecology, behavior and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomenics and the fossil record. *BMC Evolutionary Biology*,15:87.

9. Ismail M, Al-Ahaidib MS, Abdoon N, Abd-Elsalam MA. 2007. Preparation of a novel antivenom against Atractaspis and Walterinnesia venoms. *Toxicon* 49(1): 8-18.

10. John E, Burke and Edward A, Dennis . 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. Departments of chemistry and biochemistry and department of pharmacology of California, Sandiego 92093 – 601.

11. Koh, DC; Armagun, A; Jeaseelan, K. 2006. Snake venom components and their applications biomedicine. *Cell* 63: 3030-41.

12. Mary Ann K, Markwell, Suzanne M. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in member-an and lipoprotein samples. 87:206-210.

13. Nalbantsoy,A; Karabay-Yavasoglu, NU; Sayim, F; Deliloglu-Gurhan, I; Arikan, H; Yildiz, MZ. 2012. Determination of in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity of venom from the Cypriot blunt-nosed viper *Macrovipera lebetina lebetina* and antivenom production.Vol.18: 208-216.

14. Oukkache, N.; Lalaoui, M.; Ghalim, N. 2012. General characterization of venom from the Moroccan snakes *Macrovipera*

mauretanica and *Cerastes cerastes*. *J. Venom. Anim. Toxins Trop.* Dis 18: 411–420.

15. Potter. 2003.History of the BALB/c family .Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series. CT MICROBIOLOGY. Vol. 12: 1-5. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70740-7_1.

16. RanaWaka, David G, Lallo and H Janaka de silva. 2013. Neurotoxicity in snake bite. Oct:e2302. Vol.7(10).

17. Rm Kini .2005. Structure – function relation ships and mechanism anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon*. Elsevier. 45(8):1147-61

18. S Lwanaga. 1979.Enzymes in snake venom. Springer. The series handbook of expremental pharmacology. Volume 52: 61-158.

19. Solano, G.; Segura, A.; Herrera, M.; Gómez, A.; Villalta, M.V.; Gutiérrez, J.M.; León, G. 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against Bothrops asper snake venom. *Biologicals* 38:577–585.

20. Tabatabaei,M. Toofani, M. 2001.Determination of biological characteristics of Persian horned viper venom. 0ffice of planning & coordination of research affairs.p:2-6.cod:19609.

21. Theakston, R. D. G., Warrell, D. A. 2000. Crisis in snake antivenom supply for Africa. Lancet356-400.

22. World Health Organization (WHO). 1981. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms; WHO: Geneva, Switzerland.p(44).