نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه ۱۳۹۳
مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

گزارش وقوع مسمومیت با کود شیمیایی در شترمرغان یکی از مزارع استان تهران

سید جلال میریان، احمدرضا محمدی*
اعضای هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران
***mirian20010@gmail.com**

کلمات کلیدی: شترمرغ، فسفات

مقدمه:

به دنبال ورود شترمرغ به کشور در سال‌های اخیر و با توجه به این‌که دام جدیدی است بیماری‌های آن نیز باید مورد بررسی قرار گیرد. شترمرغ‌ها همه‌چیز خوار بوده و غذاهایی با کیفیت بالا را انتخاب کرده و می‌خورند و مقداری را نیز برای مواقع خشکسالی ذخیره می‌کنند. مقدار آب روزانه مصرفی بستگی به شرایط آب و هوایی و نوع تغذیه دارد. شترمرغ در حرارت بالا و رطوبت پایین روزانه ۱۲ لیتر آب نیاز دارد. شترمرغ ماده در سن ۲ تا ۳ سالگی و شترمرغ نر در سن ۳ تا ۴ سالگی به بلوغ جنسی می‌رسد. درصورتی‌که در شرایط مناسب و با سلامتی کامل نگهداری شوند، تا بیش از ۴۰ سال بارور باقی می‌مانند. شترمرغ‌ها پرندگانی هستند که کاربردهای زیادی دارند و در زمینه تولید مصنوعات چرمی با کیفیت بالا و در ساخت کیف و کفش‌های تجملاتی، پوست شترمرغ مشتری زیادی دارد. وجه تمایز چرم شترمرغ با دیگر چرم‌ها، وجود نقاط مربوط به فولیکول‌های ساقه پر می‌باشد. تخم شترمرغ از نظر طعم و خصوصیات کاملا معادل تخم مرغ بوده و به همان روش‌های متداول طبخ می‌شود. معمولا تخم این پرندگان دارای ۱۴ تا ۱۸ سانتی‌متر طول، ۱۲ تا ۱۵ سانتی‌متر عرض و ۱/۱ تا ۱/۹ کیلوگرم وزن می‌باشد و در موارد استثنایی، به بیش از ۲/۳ کیلوگرم نیز رسیده است. عسلی شدن تخم شترمرغ حدودا ۴۵ دقیقه و سفت شدن آن دو برابر این زمان وقت می‌گیرد. گوشت شترمرغ دارای خصوصیاتی از قبیل کمی چربی، پایین بودن میزان کلسترول (در حدود ۶۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم)، بالا بودن میزان پروتئین (بیش از ۲۰ درصد)، تردی استثنائی (علی‌رغم مقدار کم چربی) و واکنش مطلوب نسبت به ادویه‌جات می‌باشد. کیفیت عالی گوشت شترمرغ، با فیله گاو قابل مقایسه بوده و جهت تهیه غذاهای دلپذیر و استیک‌های ترد بسیار مناسب می‌باشد.

تاریخچه و شرح علایم:

در این مطالعه به دنبال گزارش یکی از شترمرغداران استان تهران مبنی بر تلف شدن دو قطعه از شترمرغان نر مولد و درخواست کمک جهت تشخیص و پیشگیری از تلفات بیشتر، به مزرعه مذکور مراجعه و مشاهده گردید مزرعه مذکور دارای تعداد ۴۲ قطعه شترمرغ مولد می‌باشد که در یک محوطه ۳۰۰ متری و به‌صورت مخلوط نگهداری شده و از نظر بهداشتی نیز شرایط خوبی نداشتند. به عنوان نمونه فاضلاب حاصل از آبخوری‌ها در کف جایگاه ایجاد لجن کرده بود و در انتهای جایگاه نگهداری شترمرغان یک انبار لوازم، کود و کنسانتره قرار داشت که با یک توری نازک و کم ارتفاع از محوطه شترمرغان جدا شده و بعضی از نواحی آن هم پاره بود. در بررسی تلفات مشخص گردید دو شترمرغ نر نسبتا قوی‌تر از سایر نرها تلف شده‌اند و شترمرغ دوم با فاصله ۱۵ساعت بعد از اولی تلف شده، لذا اقدام به کالبدگشایی از آن‌ها گردید.

در کالبدگشایی نقاط خون‌ریزی در میوکارد، کلیه‌ها و کبد همراه با تورم کبد مشاهده شد. در بررسی محتویات سنگدان و پیش‌معده نیز در یکی از لاشه‌ها که زودتر تلف شده بود دانه‌های جامد سفید رنگی در پیش‌معده ملاحظه گردید که از قوام نسبتا زیادی برخوردار بود. پس از کالبدگشایی لاشه‌ها، اقدام به بررسی سایر حیوانات زنده گله و تاسیسات نگهداری آن‌ها گردید که در پرندگان موجود علامتی از بیماری دیده نشد ولی در بررسی از انبار علوفه که در مجاور محل نگهداری شترمرغان قرار داشت و به‌طور ناقص با توری محصور شده بود مشخص گردید تعدادی از کیسه‌های کود فسفات مستقر در انبار علوفه که برای زمین کشاورزی نگهداری می‌شده پاره و به زمین ریخته است که حاکی از مصرف آن توسط شترمرغان تلف شده بود و در بررسی محتویات کیسه‌ها مشخص شد مواد داخل آن‌ها مشابه مواد داخل محتویات سنگدان و پیش‌معده شترمرغان تلف شده می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به علایم کالبدگشایی که حاکی از بروز مسمومیت در لاشه پرندگان تلف شده بود و تلفیق آن با وجود کود فسفات در انبار علوفه و داخل پیش‌معده، وقوع مسمومیت با کود فسفات تایید گردید. به‌طوری‌که با توصیه به دامدار در خصوص خارج کردن کودهای انبار به محلی دیگر تلفات قطع گردید. مواد شیمیایی اعم از کودها و سموم شیمیایی می‌توانند موجب آسیب زدن یا مرگ دام‌ها در اثر دخالت در وظایف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بدن آن‌ها گردند. این مواد معمولا از طریق بلع توسط حیوانات وارد بدن آن‌ها شده و باعث مسمومیت می‌گردد. ماهیت و شدت آسیب بستگی به سمیت ماده شیمیایی و مقدار سم وارده شده به بدن دارد. برخی مواد بسیار سمی هستند و موجب مسمومیت در مقادیر خیلی کم می‌شوند به‌طوری‌که فقط چند قطره از آن‌ها می‌تواند سبب بیماری شدید یا مرگ گردد. معمولا کودهای مورد استفاده در کشاورزی ممکن است ازت، فسفر، پتاس و یا npk باشد. در مورد سموم نیز متعلق به گروه‌های شیمیایی ارگانو فسفره یا کلره و یا کاربامات از قبیل سوپر اسید، دورسبان و سوین می‌باشند که پس از جذب شدن در بدن، این آفت‌کش‌ها آنزیم‌های کولین‌استراز بدن را غیر فعال می‌سازند، تشنج‌های عصبی و فعالیت بیش از حد برخی غدد روی می‌دهد و در نتیجه موجب علایم مختلف و متغیر می‌شوند. تغییرات در ضربان قلب، ضعف عمومی ماهیچه، مشکل در راه رفتن، کوچک شدن مردمک چشم، ترشح زیاد بزاق و نشانه‌های اولیه مسمومیت حاد ارگانو فسفات و کاربامات‌ها در مدت چند دقیقه یا چند ساعت پس از قرار گرفتن در معرض آن‌ها ظاهر می‌گردد. مسمومیت شدید ممکن است منجر به تشنج و بیهوشی گردد که می‌تواند منجر به مرگ شود.

در اینجا ذکر این نکات الزامی است که در اکثر شترمرغ‌داری‌ها معمولا پرندگان در یک محوطه نگهداری می‌شوند و علوفه آن‌ها نیز در مجاورشان همراه با سایر نهاده‌های کشاورزی انبار می‌شود. از آنجا که شترمرغ یک حیوان بسیار کنجکاو و همچنین ترسو و احیانا وحشی است، حتما باید حصارهای اطراف آن محکم باشد تا در صورت فرار از دعوای سایرین و یا فرار از هر گونه عامل خارجی باعث از بین رفتن حصارهای مذکور و ورود پرندگان به سایر تاسیسات و از آن‌جمله به انبار نگردد. در غیر این‌صورت پرندگان وارد شده به انبار با مصرف علوفه، کود و یا سموم، دچار اختلالات گوارشی، مسمومیت‌ها و تلفات خواهند شد.

خلاصه گزارش طرح پایش سراسری باقیمانده دارو و سموم در فرآورده های خام دامی در سال‌های ۹۲ -۹۰

محمد کشتکار[1*]، بشری [2]، عباسی [3]، نیازی [4]، موسوی [5]

[1*] رییس اداره تشخیص و درمان دامپزشکی استان اصفهان

[2] سازمان دامپزشکی کشور

[3] مرکز تشخیص و کنترل دارو و مواد بیولوژیک

[4] دفتر نظارت بر بهداشت عمومی

[5] دفتر مطالعات و ارزیابی مخاطرات بهداشتی

*dr.keshtkar_m@yahoo.com

کلمات کلیدی: پایش باقیمانده‌ها، فرآورده‌های خام دامی، آنتی‌بیوتیک، عسل، شیر

سابقه و هدف:

از آنجا که هر گونه مخاطره برای دام، می‌تواند مخاطره برای انسان محسوب شود لذا اهمیت دام سالم از نظر متولیان امر نباید مغفول بماند. توجه به مخاطرات بهداشتی (عوارضی از قبیل سرطان، حساسیت، ناقص‌الخلقه‌زایی و ...) ناشی از وجود آلاینده‌های شیمیایی مانند داروهای دامی، سموم شیمیایی، مواد بیولوژیکی، فلزات سنگین و... در منابع غذایی با منشاء دامی که مورد مصرف انسان قرار می‌گیرند این نگرانی را در مورد محصولات حاصل از این دام‌ها که عمدتاً به‌صورت صنعتی پرورش داده می‌شوند ایجاد کرده است. به همین جهت سازمان دامپزشکی کشور به عنوان متولی امر بهداشت فرآورده‌های خام دامی و با نظر کارگروه‌های کارشناسی، برنامه‌های متعددی از قبیل طرح پایش باقیمانده‌ها در مواد غذایی را به منظور بررسی و تعیین مخاطرات ناشی از مصرف داروها، سموم و... با دو هدف عمده انجام داده است:

۱- اطلاع از وضعیت گذشته و حال و چگونگی آلودگی فرآورده‌های خام دامی به آلاینده‌های شیمیایی و ...

۲- ارائه پیشنهادات و راه‌کارهای عملی در جهت حذف یا کاهش آلاینده‌های شیمیایی در مواد غذایی با منشاء دامی

مواد و روش‌ها:

نمونه‌برداری بر اساس ضوابط و دستورالعمل سازمان و با روش‌های اصولی، توسط افراد ذیصلاح دولتی با استفاده از وسایل و ظروف مناسب انجام شد و نمونه‌ها حمل و به آزمایشگاه ارسال گردید. در این طرح پایش، باقیمانده‌های دارویی و سموم در چند نوع فرآورده خام دامی از جمله عسل، شیر، ماهی قزل‌آلا و... در سراسر کشور و با روش‌های تشخیصی مختلف از قبیل روش شیمیایی، روش استفاده از دیسک F.P.T، روش الایزا (Elisa method)، روش‌های HPLC، GC و .... که روش‌های بسیار دقیق و حساس‌اند، انجام شد و میزان باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی و سموم در آزمایشگاه‌های مرجع و معتبر تعیین گردید.

یافته‌ها:

- نتایج به‌دست آمده از دو مرحله طرح پایش باقیمانده‌های دارو و سموم در عسل طی دو سال متوالی و با بیش از ۷۵۰ نمونه، نشان می‌دهند نگرانی اصلی در مورد این ماده غذایی بیشتر در ارتباط با داروی کلرامفنیکل می‌باشد که یک داروی ممنوع‌المصرف و غیر مجاز می‌باشد. در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌های مجاز، میزان باقیماندهٔ آن‌ها در نمونه‌های عسل کمتر از حد مجاز بود.

- نتایج به‌دست آمده در طرح پایش باقیمانده‌ها در ماهی قزل‌آلا در سال ۹۰ با تعداد تقریبی ۹۵۰ نمونه حاکی از آن بود که نگرانی اصلی وجود ترکیب مالاشیت‌گرین در دوره پرورش یا در تخم ماهی بوده است. ماده فوق که هرگز به عنوان یک داروی دامپزشکی ثبت نشده است، باعث ایجاد سرطان، موتاسیون و..... می‌شود.
- نتایج به‌دست آمده از طرح پایش باقیمانده‌ها در شیر خام، با تعداد حدود ۸۵۰ نمونه در سال ۹۱ نشان داد نگرانی اصلی در این ماده غذایی مربوط به پنی‌سیلین، فورازولیدن و آفلاتوکسین M_1 .. بود که با توجه به عوارض ناشی از مصرف آن‌ها در انسان، کنترل در کارخانه‌های تولید مواد لبنی اهمیت بسیاری دارد.

نتیجه‌گیری:

از وظایف سنگین دامپزشکی و تولیدکنندگان فرآورده‌های دامی، تولید مواد غذایی سالم در جامعه است لذا محافظت منابع غذایی با منشاء دامی از بقایای تمامی مواد دارویی (آنتی‌بیوتیک‌ها و.....) از لحاظ بهداشت عمومی جامعه بسیار ضروری است. برای این منظور باید:

۱) از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک توسط دامدار و افراد غیر کارشناس جلوگیری شود.

۲) زمان پرهیز دارویی (With drawltime) توسط افراد کارشناس و دامپزشکان قبل از ذبح دام‌ها به‌طور دقیق رعایت شود.

۳) کارخانه‌های فرآورده‌های غذایی با منشاء دامی (شیر، گوشت، مرغ و...) با نظارت و کنترل و نمونه‌برداری مستمر ارزیابی دقیقی از مخاطرات بهداشتی محصولات خود داشته باشند.

۴) حداکثر مجاز باقیمانده‌ها (MRL) طبق مقررات کُدِکس در محصولات دامی و حداکثر مجاز باقیمانده‌های خارجی (آلاینده‌ها و...) در خوراک دام و طیور رعایت گردد.

مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه۱۳۹۳

بررسی اثر عصاره آبی- الکلی *Peganum harmala* (گیاه اسپند) بر اثر مرگبار زهر مار کبری ایرانی *Najaj naja oxiana* در موش سوری

بهروز فتحی[۱]، بهاره احمدی ترکمانی[۱]، جیران راهوریان*[۱]، مرضیه فائزی[۱]، عباس زارع[۲]

[۱] گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] موسسه *تحقیقات* واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

***j.rahvarian@gmail.com**

کلمات کلیدی: عصاره اسپند، مارگزیدگی، مار کبری، زهر

چکیده

مار کبری ایران *Naja naja oxiana*یکی از زهری‌ترین مارها در ایران و برخی کشورهای همسایه به شمار می‌آید. این مار مسئول تعداد زیادی از حوادث مارگزیدگی در ایران و منطقه است. با هدف یافتن مواد پادزهر برای مارگزیدگی، ما در گذشته نشان داده‌ایم که عصاره اسپند بر روی زهر مار جعفری ایران *Echis carinatus* با زهری هماتوکسین، اثرات آنتاگونیستی دارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر عصاره این گیاه بر روی زهر مار کبری ایرانی با زهری نوروتوکسین است. قبل از انجام آزمایشات اصلی، در چند مطالعه اولیه (pilot) دوزهای کشنده (LD_{99}) و دوز نزدیک به LD_{50} زهر مشخص شد. جهت انجام آزمایشات اصلی تعداد ۳۷ سر موش سوری بالغ با وزن متوسط ۶ g ± ۲۸ به ۵ گروه تقسیم شدند (A، B، C، D و E). گروه A (n=7) به عنوان گروه شاهد تنها زهر مار کبری با دوز ۴mg/kg دریافت نمودند. گروه B (n=8) نیز به عنوان شاهد تنها عصاره اسپند را با دوز ۱۵mg/kg دریافت کردند. گروه‌های C (n=6)، D (n=8) و E (n=8) دوزهای یاد شده زهر و عصاره را با پروتوکل‌های متفاوت به شرح زیر دریافت نمودند.

گروه C زهر و عصاره را به‌صورت دو تزریق همزمان دریافت کردند. به گروه D ابتدا زهر و پس از ۱۵ دقیقه عصاره اسپند تزریق شد. گروه E ترکیب حاصل از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن عصاره با زهر را دریافت نمودند. در تمام آزمایشات ذکر شده روش تزریق به‌صورت داخل صفاقی (IP) بود. تمامی موش‌های گروه A که تنها زهر دریافت کرده بودند پس از مدت ۸± ۳۱ دقیقه تلف شدند درحالی‌که تمامی موش‌های گروه B که تنها عصاره اسپند دریافت کرده بودند زنده ماندند. موش‌ها درگروه‌های C، D و E به ترتیب در زمان‌های ۹± ۳۱، ۴± ۱۸ و ۵± ۱۷ دقیقه بعد از تزریقات یاد شده تلف شدند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اسپند برخلاف تاثیر آنتاگونیستی که بر زهر مار جعفری دارد بر زهر مار کبری نه تنها اثر محافظتی ندارد بلکه سرعت تاثیر زهر را نیز افزایش می‌دهد. می‌توان نتیجه گرفت در مقایسه با زهرهای هماتوکسین، عصاره این گیاه با زهرهای نوروتوکسین جایگاه رقابتی کمتری داشته یا اصلا ندارد، اگرچه نتیجه‌گیری نهایی نیاز به تحقیقات بیشتر در سطح مولکولی دارد.

مقدمه

مارگزیدگی یکی از فوریت‌های پزشکی است که در صورت عدم درمان صحیح و به موقع منجر به مرگ افراد می‌شود. در طی ده سال بررسی (۲۰۱۰-۲۰۰۱) تعداد افراد دچار مارگزیدگی تنها در ایران ۵۳۷۸۷ نفر بوده که منجر به مرگ ۶۷ نفر گردیده است (۶). به علت نبود سیستمی که بتواند حوادث مارگزیدگی را براساس نوع مار تعیین کند، نمی‌توان گفت چه تعداد از این حوادث یا مرگ و میرها توسط مار کبری است، اما شواهد پراکنده گواه بر مارگزیدگی‌های فراوانی توسط این مار می‌باشد.

درمان اصلی مارگزیدگی تجویز پادزهر است که علیرغم مشکلات تولیدی، با اثرات جانبی فراوانی از جمله واکنش‌های شدید آلرژیک همراه است. با این وجود این مواد همچنان به عنوان درمان کلیدی مطرح می‌باشند. از طرفی استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف از قدمتی تاریخی برخوردار بوده و همچنان نیز اهمیت خود را حفظ کرده است. تحقیقات نشان می‌دهد برخی از گیاهان نیز در درمان مارگزیدگی کاربرد دارند.

گیاه اسپند (*Peganum harmala*) عضوی از خانواده زایگوفیلاسه آ (Zygophyllaceae) است که در آسیای مرکزی، آفریقای شمالی و خاورمیانه پراکنده است و غالبا در مناطق نیمه خشک و خاک‌های شنی رشد می‌کند. دانه‌های این گیاه در طب سنتی در درمان آسم، زردی، تب، اسهال، استفراغ و همچنین به عنوان عامل سقط و قاعده‌آور به‌کار می‌رفته است (۱۴). تحقیقات اخیر نشان داده اسپند دارای اثرات ضد درد و ضد التهاب، ضد باکتریایی و ضد کرم نیز می‌باشد (۱۱، ۱۰، ۷، ۵، ۴). آلکالوئیدهای فعال دانه‌های اسپند ترکیبات مهارکننده مونوآمینواکسیداز-A هستند (۱). این آلکالوئیدها شامل بتا-کاربولین‌ها و مشتقات کینازولین‌ها می‌باشند. بتا-

کاربولین‌ها به گیرنده‌هایی از جمله سروتونین، موسکارینی، هیستامینی و بتا آدرینرژیک متصل می‌شوند (۱۷، ۲). همچنین مطالعات ایراکسینن و همکاران نشان داده است که بتا-کاربولین‌ها به گیرنده‌های اوپیوئیدی مو و دلتا نیز تمایل دارند (۳).

مار کبری ایرانی *N. n. oxiana* (کاسپین کبری) (تصویر ۱)، یکی از زهری‌ترین گونه‌های کبری در دنیاست. پراکندگی این مار در ایران بیشتر در شمال شرقی کشور و در استان‌های خراسان (مشهد، کلات نادری، قوچان، نیشابور، بیرجند)، استان مازندران (گنبد کاووس، آق قلعه، سد اسکندر) و استان سمنان (شاهرود) می‌باشد (۱۲). زهر این مار، نوروتوکسیک است اما اثرات سایتوتوکسیکی هم دارد (۹). با توجه به تاثیری که زهر مار کبری بر روی مهار گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین و جلوگیری از اتصال پس سیناپسی انتقال دهنده عصبی دارد، علت نهایی مرگ ناشی از فلج عضلات تنفسی به ویژه دیافراگم است (۱۳، ۱۵). زهر خالص این مار پایین‌ترین دوز کشنده را در بین تمام این گونه‌ها دارد. طی مطالعه‌ای که روی گونه‌های جمع‌آوری شده از ایران انجام شد، LD_{50} داخل عروقی زهر این مار ۰/۰۷۸ mg/kg اعلام شد (۱۶). درد و تورم شدید، به‌همراه مسمومیت عصبی حاد، ضعف، خواب‌آلودگی، عدم تعادل، کاهش فشارخون و فلجی حلق و اندام‌های حرکتی در مدت زمان کمتر از یک ساعت از اعلام عمده گزش توسط کبری ایران است.

علی‌رغم مصرف گسترده اسپند در موارد مختلف، در مورد اثر ضد زهری این گیاه، تاکنون گزارشی منتشر نشده است و مطالعه حاضر نخستین گزارش در مورد اثر اسپند بر زهر مار کبری ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

زهر مار کبری به‌صورت لیوفلیزه توسط مؤسسه رازی اهدا گردید.

عصاره دانه اسپند: قسمت‌های هوایی گیاه اسپند از اطراف شهرستان سبزوار در اوایل فصل تابستان جمع‌آوری و خشک گردید. گیاه در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تعیین گونه شد. سپس دانه‌های سیاه به‌صورت خالص جدا گردید. عصاره تغلیظ شده اسپند از دانه‌های گیاه مطابق روش عصاره‌گیری آلکالوئیدها در دانشکده داروسازی مشهد تهیه شد.

حیوانات مورد مطالعه: تعداد ۳۷ سر موش سوری بالغ، از هر دو جنس نر و ماده، با وزن متوسط ۶ g ± ۲۸ از سوی بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی تهیه گردید. موش‌ها یک هفته قبل از شروع آزمایش در شرایط استاندارد و با آب و غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی مورد تغذیه قرار گرفتند. تغذیه و شرایط محیطی برای همه موش‌ها یکسان بود. به منظور انجام این مطالعه ابتدا موش‌ها وزن‌کشی شده و به‌طور انفرادی شماره‌گذاری گردیدند. سپس به ۵ گروه (B،A ، D،C و E) تقسیم شدند. زهر و عصاره براساس پروتکل طراحی شده، با توجه به وزن هر موش، به‌صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شدند. گروه A (n=7) به عنوان گروه شاهد تنها زهر مار کبری با دوز ۴mg/kg دریافت نمودند. گروه B (n=8) تنها عصاره اسپند را با دوز ۱۵mg/kg دریافت کردند. گروه‌های C (n=6)، D (n=8) و E (n=8) دوزهای یاد شده زهر و عصاره را با پروتکل‌های متفاوت دریافت نمودند. گروه C زهر و عصاره را به‌صورت دو تزریق همزمان دریافت کردند. به گروه D ابتدا زهر و پس از ۱۵ دقیقه عصاره اسپند تزریق شد. گروه E ترکیب حاصل از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن عصاره با زهر در دمای آزمایشگاهی ۲۴°C را دریافت نمود. در تمامی این گروه‌ها، فاصله زمانی تزریق زهر تا مرگ هر موش ثبت شد و از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

در گروه کنترل A (شاهد)، تزریق زهر مار کبری با دوز ۴ mg/kg منجر به مرگ ۱۰۰ درصد موش‌ها شد. میانگین زمان مرگ موش‌ها ۸ ± ۳۱ دقیقه بود. گروه B نیز به عنوان شاهد تنها عصاره اسپند را با دوز ۱۵mg/kg دریافت کردند و ۱۰۰ درصد موش‌ها زنده ماندند (جدول ۱).

به منظور ارزیابی توانایی عصاره دانه اسپند در جلوگیری از اثرات مرگبار زهر مار کبری ایران، اثر متقابل بین عصاره مورد نظر و زهر براساس پروتکل D، C و E مورد بررسی قرار گرفت. در پروتکل C که تزریق عصاره بلافاصله پس از تزریق زهر مار کبری صورت گرفته بود، موش‌ها پس از ۹ ± ۳۱ دقیقه تلف شدند (جدول ۱). در پروتکل D که تزریق عصاره ۱۵ دقیقه بعد از زهر صورت گرفته بود، موش‌ها با میانگین ۴ ± ۱۸ دقیقه تلف شدند (جدول ۱). در پروتکل E که تزریق عصاره و زهر پس از این که به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند، صورت گرفت میانگین مدت زمان مرگ موش‌ها ۵ ± ۱۷ دقیقه بود (جدول ۱).

نتایج نشان داد که مدت زمان مرگ موش‌ها در گروه‌های D و E نسبت به گروه شاهد (A) به‌صورت چشم‌گیری کاهش یافته است (جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

مرگ و میر ناشی از گزش مار کبری ایران در صورت عدم درمان ۷۵- ۷۰ درصد است که بالاترین میزان در بین مارهای کبری به‌ویژه جنس ناجا است (۸). نتایج مطالعه حاضر برای نخستین بار نشان داد که عصاره اسپند برخلاف تاثیر آنتاگونیستی که بر زهر مار جعفری دارد، بر زهر مار کبری نه تنها اثر محافظتی ندارد بلکه به نحوی ناشناخته سرعت تاثیر مرگبار زهر را نیز افزایش می‌دهد. به بیان دیگر تاثیر سینرژیستی بر زهر داشته است. زهر مار کبری بر روی گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در ناحیه پس سیناپسی تاثیر مهاری می‌گذارد که از نظر بالینی منجر به مرگ ناشی از فلج عضلات تنفسی می‌گردد. از طرف دیگر بتا-کاربولین‌های موجود در عصاره اسپند به گیرنده‌هایی از جمله سروتونین، موسکارینی، هیستامینی و بتا آدرینرژیک متصل می‌شوند بنابراین به نظر می‌رسد نمی‌تواند با بلوک گیرنده‌های استیل‌کولینی توسط زهر تداخل داشته باشد. به بیان دیگر عصاره اسپند با مواد فعال زهر و تاثیر آن بر گیرنده‌های خاص تداخل اثر بازدارنده ندارد.

نتایج نشان می‌دهد که زهر در حالت انکوبه با عصاره اسپند با سرعت بیشتری در مقایسه با گروه کنترل، حیوانات را از پا در می‌آورد، از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که عصاره اسپند قدرت واکنش با مولکول‌های زهر را دارد و با تاثیر خود ساختمان این مولکول‌ها را آنچنان تغییر می‌دهد که می‌توانند راحت‌تر به رسپتورهای خود واکنش کنند یا به‌نحوی نامعلوم گیرنده‌های بیشتری درگیر می‌شوند. در مجموع جهت رسیدن به نتایج روشن‌تر نیاز به انجام آزمایشات بیشتری به ویژه در سطح مولکولی وجود دارد.

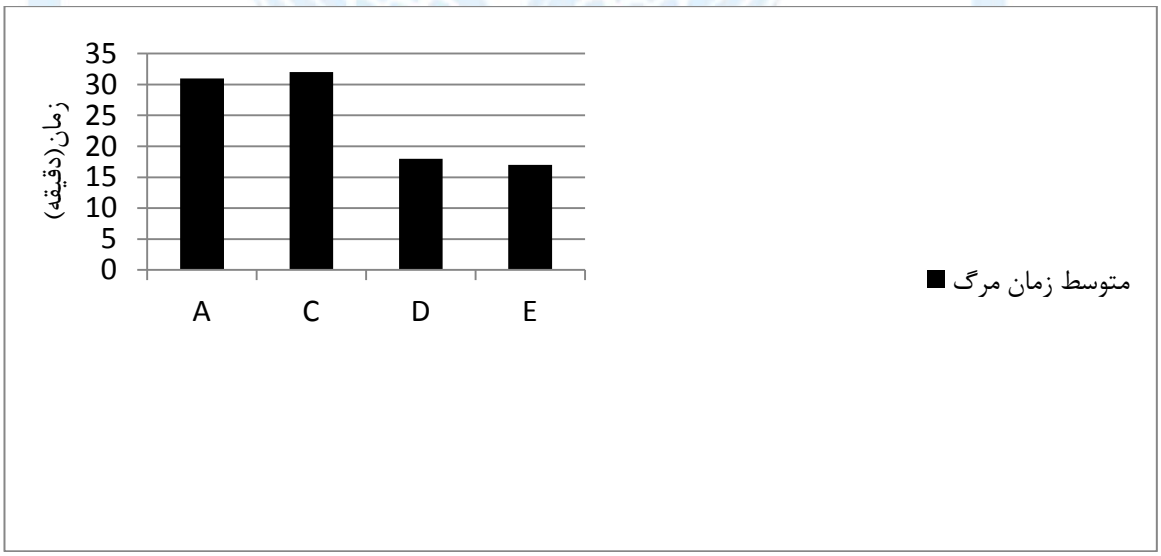
تصویر ۱- مار کبری ایرانی *Naja naja oxiana* (گرفته شده توسط ب. فتحی)

جدول ۱- متوسط زمان مرگ حیوانات در پروتکل‌های مورد آزمایش

پروتکل	تعداد موش‌ها	دوز زهر (mg/kg)	دوز عصاره اسپند (mg/kg)	متوسط زمان مرگ (دقیقه)	توضیحات
A	۷	۴	-	۳۱ ± ۸	تمامی موش‌ها تلف شدند
B	۸	-	۱۵	تمامی زنده ماندند	تمامی موش‌ها زنده ماندند
C	۶	۴	۱۵	۳۱ ± ۹	تغییری دیده نشد
D	۸	۴	۱۵	۱۸ ± ۴	تسریع در زمان مرگ
E	۸	۴	۱۵	۱۷ ± ۵	تسریع در زمان مرگ

پروتکلA: تزریق زهر به تنهایی (گروه شاهد)، پروتکلB: تزریق عصاره اسپند به تنهایی (گروه شاهد)، پروتکل C: تزریق عصاره اسپند بلافاصله پس از تزریق زهر، پروتکلD: تزریق زهر و عصاره اسپند با فاصله ۱۵ دقیقه، پروتکل E: تزریق ترکیب زهر و اسپند انکوبه شده به مدت ۱۵ دقیقه

نمودار ۱- مقایسه متوسط زمان مرگ حیوانات براساس پروتکل‌های انجام شده



پروتکل A: تزریق زهر به تنهایی (گروه شاهد)، پروتکل C: تزریق عصاره اسپند بلافاصله پس از تزریق زهر، پروتکل D: تزریق زهر و عصاره اسپند با فاصله ۱۵ دقیقه، پروتکل E: تزریق ترکیب زهر و اسپند انکوبه شده به مدت ۱۵ دقیقه

منابع

1. Abdel-Fattah AFM, Matsumoto K, Murakami Y. (1997) Central serotonin level-dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargyline- and harmaline- pretreated rats. Gen Pharmacol 28: 405-409.

2. Abdel-Fattah AFM, Matsumoto K, Gammaz HAK, Watanabe H. (1995) Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism. Pharmacol Biochem Behav 52: 421-426.

3. Airaksinen MM, Saano V, Steidel E, Juvonen H, Huhtikangas A, Gynther J. (1984) Binding of beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines by opiate receptors of the delta-type. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 55: 380-385.

4. Al-Shamma A, Drake S, Flynn DL, et al. (1981). "Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial agents from Peganum harmala seeds". J. Nat. Prod. 44 (6): 745–747.

5. Arshad N, Zitterl-Eglseer K, Hasnain S, Hess M (November (2008) "Effect of Peganum harmala or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry". Phytother Res 22 (11): 1533–1538.

6. Dehghani, R., Fathi, B., Shahi, MP., Jazayeri, M. (2014) Ten years of snakebites in Iran. Toxicon 90: 291- 298.

7. Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A (2008). "Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of Peganum harmala L.: possible mechanisms involved". J Ethnopharmacol 115 (3): 449–54.

8. Gopalkrishnaknoe, P., Chou ML. (1990) snakes of medical importance (Asia-Pacific Region). Singapore: National University of Singapore.

9. Grishin, E. V., Sukhikh, A. P., Adamovich, T. B., Ovchinnikov, Yu. A., (1974) The isolation and sequence determination of a cytotoxin from the venom of the middle-asian cobra Naja naja oxiana. FEBES. 48: 179-183.

10. Jinous Asgarpanah (2012) "Chemistry, pharmacology and medicinal properties of Peganum harmala L". African Journal of Pharmacy and Pharmacology 6 (22).

11. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, et al. (1999) "Antitumour principles from Peganum harmala seeds". Therapie 54 (6): 753–758.

12. Latifi, M. 2000. The Snakes of Iran. Published by Environment Protection organization, Tehran, 478 pp. (in Persian, with Latin index).

13. Mikhailov, A. M., Nickitenko, A.V., Trakhanov, S. D., Vainshtein, B. K., Chetverina, E. V., (1990) Crystallization and preliminary x-ray diffraction study of neurotoxin-I from Naja naja oxiana venom. FEBS. 269(1): 255-257.

14. Monsef, H. R., Ghobadi, A., Mehrdad Iranshahi; Mohammad Abdollahi (2004) "Antinociceptive effects of Peganum harmala L. alkaloid extract on mouse formalin test" (PDF). J Pharm Pharmaceut Sci 7 (1): 65–69.

15. Nickitenko, A. V., Michailov, A. M., Betzel, Ch., Wilson, K. S., (1993) Three-dimentional structure of neurotoxin-1 from Naja naja oxiana venom at 1.9 A resolution. FEBS. 320: 111-117.

16. Sharonov, V., Feofanov, V., Astapova, V., Rodionov, I., Utkin, N., Arseniev, S., (2005) Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. Biochemical Journal. 390: 11–8.

17. Shi CC, Liao JF, Chen CF. (2001) Spasmolytic effect ofthree harmala alkaloids on guinea-pig isolated trachea. Pharmacol Toxicol 89: 259-264.

نخستین همایش ملی 1st Iran Vet Tox
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه ۱۳۹۳
مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاثیر عصاره گیاه موسیر(*Allium hirtifolim*) بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی و بافت پانکراس، کبد و کلیه موش‌های صحرایی نر دیابتیک ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین

*شیما فخر آبادی[۱]، حمیده قدرتی آزادی[*۲]، احمدرضا موثقی[۳]*

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

[*۲] بخش بیوشیمی گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] بخش پاتولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

[*]**ghodrati@um.ac.ir**

کلمات کلیدی: موسیر، فاکتورهای بیوشیمیایی، بافت پانکراس، کبد و کلیه

چکیده

سابقه و هدف: دیابت ملیتوس، اختلالی است که با هایپرگلایسمی و تغییر متابولیسم لیپید، کربوهیدرات و پروتئین نیز مشخص می‌شود. هایپرگلایسمی ناشی از دیابت با آسیب طولانی مدت، تخریب و نقص ارگان‌های مختلف همراه است. یکی از این ارگان‌ها کبد می‌باشد که به عنوان ارگان غیر وابسته به انسولین نقش مهمی در هموستاز چربی و گلوکز و اختلالات کبد چرب، سیروز و سرطان دارد. جهت این بررسی عصاره هیدروالکلی موسیر به موش‌های نری که با استرپتوزوسین (STZ) Streptozocin به‌صورت تزریق داخل صفاقی دچار دیابت شده بودند تجویز و اثرات آن بر روی میزان گلوکز خون، انسولین و برخی از آنزیم‌های سرمی از جمله AST، ALT، ALP و همچنین تغییرات ساختار بافتی جزایر لانگرهانس، کبد و کلیه و سنجش توان تولید مجدد انسولین توسط این جزایر در اثر این گیاه در آزمایشگاه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ۲۵۰ گرم از گیاه با استفاده از ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب (۲۰:۸۰) سه بار عصاره‌گیری شده و پس از تقطیر در خلاء، محلول استوک، معادل ۰/۵ گرم از پودر در هر میلی‌لیتر، در دما ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ۳۰ عدد رَت نر بالغ با وزن ۳۰±۲۵۰ گرم تهیه شدند. استرپتوزوسین (STZ) به میزان ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۲۲ موش تزریق گردید. تعداد ۸ موش (گروه ۱: کنترل منفی) آب مقطر دریافت کردند. بعد از تزریق STZ، موش‌های با غلظت گلوکز خون ناشتا ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر انتخاب و مجدداً به دو گروه ۸ و ۱۲ تایی (گروه ۲ و ۳) تقسیم شدند. گروه ۸ تایی (گروه ۲: کنترل مثبت) و گروه ۱۲ تایی (گروه ۳: درمان) انتخاب گشتند. تجویز خوراکی عصاره گیاه با گاواژ معادل ۳ mg/g/day به مدت ۶ هفته انجام شد. میزان گلوکز و انسولین به‌طور مرتب اندازه‌گیری و تغییرات وزن نیز ثبت گردید.

یافته‌ها: مقادیر گلوکز– انسولین و آنزیم‌های AST، ALT و ALK در ابتدا و انتهای بررسی توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون ثبت و در ارزیابی هیستوپاتولوژیک، پس از مرگ با ترحم، نمونه‌های بافتی از پانکراس، کلیه‌ها و کبد برداشته شده و پس از تهیه بلوک پارافینی، مقاطع بافتی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و ماسون تری کروم Masson's trichrome رنگ‌آمیزی شدند.

جهت آنالیز آماری از تستOne way Anova و Kruscall wallis test استفاده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله موید اثرات چشمگیر موسیر در کاهش گلوکز و تعدیل آنزیم‌های کبدی بوده و همچنین بیانگر نقش بارز آن در ترمیم سلول‌های پانکراس و تولید مجدد انسولین در اثر این گیاه بود ($P<0.05$).

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی مزمن بوده که به عنوان مهمترین بیماری اندوکرین در جهان مطرح می‌باشد و سبب افزایش نرخ مرگ و میر شده است (۱). کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حاد و مزمن همراه است (۲). هایپرگلیسمی ناشی از دیابت باعث تخریب و نقص ارگان‌های مختلف و آسیب‌های طولانی مدت می‌گردد (۳). داروهای سنتتیک که به منظور پیشگیری و یا درمان دیابت استفاده می‌شوند همگی دارای عوارض جانبی متعددی هستند (۴). با توجه به عوارض زیاد و همچنین هزینه بالای این داروها، امروزه توجه محققان به یافتن ترکیبات طبیعی موثر افزایش یافته و مطالعات زیادی بر روی خواص درمانی گیاهان مختلف صورت گرفته است و گیاهان به عنوان عوامل طبیعی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌خصوص دیابت مطرح شده‌اند (۵). گیاه موسیر *(Allium hirtifolium boiss)* گونه‌ای از خانواده بزرگ لاله‌سانان می‌باشد که از حدود ۵۰۰ گونه مختلف

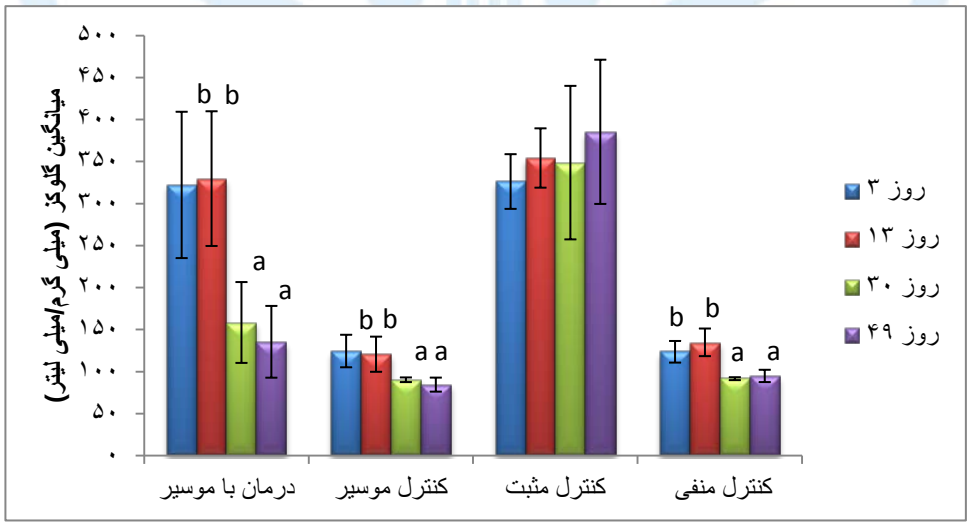
شناخته شده تشکیل می‌شود. مهمترین گونه‌های این جنس شامل پیاز، تره فرنگی، پیاز کوهی، سیر و موسیر است. از زمان‌های قدیم این گیاهان به عنوان چاشنی غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گرفتند. در ایران موسیر بیشتر به‌صورت ماست موسیر یا ترشی موسیر مصرف می‌شود (۸، ۷، ۶).

مواد و روش‌ها

برای تهیه عصاره گیاه موسیر، ۲۵۰ گرم از گیاه با استفاده از ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب (۸۰:۲۰) سه بار عصاره‌گیری شد و پس از تقطیر در خلاء، محلول استوک، معادل ۰/۵ گرم از پودر در هر میلی‌لیتر، در دما ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تعداد ۳۰ عدد رَت نر نژاد ویستار با متوسط وزن ۳۰±۲۵۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و به ۴ گروه به‌طور تصادفی تقسیم‌بندی شدند. گروه‌ها بدین شرح می‌باشند: گروه کنترل مثبت (رت‌های دیابتی شاهد)، گروه کنترل منفی (رت‌های سالم غیر دیابتیک شاهد)، گروه کنترل موسیر (رت‌های غیر دیابتیک دریافت‌کننده موسیر) و گروه درمان (رت‌های دیابتیک تیمار شونده با موسیر). برای دیابتی نمودن رت‌ها از تزریق استرپتوزوسین (STZ) به روش داخل صفاقی استفاده شد و قبل از تزریق، STZ در آب مقطر در PH=4.5 حل و به میزان ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به رت‌های گروه کنترل مثبت و گروه درمان تزریق شد. به دو گروه دیگر به همین میزان سرم فیزیولوژیک تزریق گردید. ملاک دیابتی شدن افزایش میزان گلوکز خون بین ۳۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ۷۲ ساعت بعد از تزریق یعنی روز ۳ بود (۹). در این آزمایش عصاره آبی گیاه موسیر به روش گاواژ به‌طور روزانه به میزان ۳ میلی‌گرم عصاره به ازای کیلوگرم وزن، به دو گروه درمان با موسیر و گروه کنترل موسیر تجویز شد. این روش هر روز و به مدت ۷ هفته (۴۹ روز) صورت گرفت. میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP اندازه‌گیری و همچنین بافت‌های کلیه، کبد و پانکراس رت‌ها جدا شد. مقادیر آنزیم‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر و با کیت تشخیص کمی پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. بافت‌ها به‌وسیله فرمالین نگه‌داری و تثبیت شدند و پس از تهیه بلوک پارافینی، مقاطع بافتی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و ماسون تری کروم Masson's trichrome رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

میزان آنزیم‌های کبدی در گروه درمان نسبت به گروه کنترل مثبت دیابتی، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$). کاهش گلوکز نیز در گروه‌های درمان و کنترل مثبت، معنی‌دار بود.



نمودار مقایسه میانگین گلوکز روزهای ۱۳، ۳۰ و ۴۹ با ۳ در گروه‌های تحت آزمایش. حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بین روزهای یک گروه در سطح $P<0/05$ می‌باشد

در یافته‌های بافتی در بافت‌های کلیه و کبد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما در بافت پانکراس تفاوت معنی‌داری در مورد فیبروز و تعداد جزایر لانگرهانس وجود داشت ($P<0.05$) که نشان دهنده کاهش فیبروز در گروه درمان با موسیر بود.

میزان پارامتر فیبروز در گروه‌های مختلف

گروه ها / پارامترها	درمان با موسیر	کنترل با موسیر	کنترل مثبت	کنترل منفی
فیبروز	0±0	0±0	0/67±0/516	0±0

منابع

1. Ghosh S. and Surawanshi SA. Effect of Vinca rosea extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. Indian J Exp Biol 2001;39:748-759
2. Wandell PE. Quality of life of patients with diabetes mellitus. An overview of research in primary health care in the Nordic countries Scand J Prim Health Care 2005;23(2):68-74.
3. Lyra R, Oliveira M, Lins D, Cavalcanti N. Prevention of type 2 diabetess mellitus. Arq Bras Endocrinol Metabol 2006; 50(2): 239-249.
4. Rendell M. Dietary treatment of diabetes Mellitus. N Engl J Med 2000; 342(19): 1440- 1441.
5. Arise RO, Malomo SO, Adebayo JO, Igunnu A. Effects of aqueous extract of eucalyptus globules on lipid peroxidation and selected enzymes of rat liver. J Med Plants Res 2009; 3(2): 77-81.
6. Fenwic GR. The genus Allium -Part 3.1985: Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 1985; 23: 1-73.
7. Bianchini F, Vainio H. Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? J Environ Health Persp 2001; 109(9): 893-902.
8. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O. Chemical composition of shallot (Allium ascalonicum Hort.). J Agr Food Chem 2002; 50(20): 5686-5690.
9. Huang YH, Shi M, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Therapeutic effect of interleukin -10 on CC14-induced hepatic fibrosis in rats. World J Gastroenterol. 2006 Mar; 12(9): 1386-91.

مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
نخستین همایش ملی 1st Iran Vet Tox
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه۱۳۹۳

بررسی اثرات سمی نانو ذرات کلوئید نقره با استفاده از بیومارکر دافنی ماگنا

زهرا طولابی دزفولی*[1]، اسماعیل کرمی[1]، مجتبی علیشاهی[2]، مهرزاد مصباح[2]
[1] بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[2] گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
*zahratulaby@yahoo.com

کلمات کلیدی: نانو سیلور، دافنی ماگنا، سمیت، LC_{50}

چکیده

در تحقیقات مختلف بیولوژی، از دافنی ماگنا به عنوان یک مارکر زیستی ارزیابی آلودگی منابع آبی استفاده می‌شود، در این تحقیق شاخص سمیت دو نوع نانو ذرات کلوئید نقره (L-2000 و LS-2000) ساخت شرک نانوسید با استفاده از دافنی ماگنا مورد مطالعه قرار گرفت.

ابتدا دافنی ماگنا جهت انجام زیست آزمونی در داخل یک ظرف شیشه‌ای کشت داده شد. سپس با انجام آزمایش‌های دامنه‌یابی، گستره غلظت‌های مورد نظر (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ برای نانو سیلورLS-2000 و ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ برای نانو سیلورL-2000) تعیین شد و هر غلظت در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت برای هر دو نانو ذره نقره مورد آزمایش قرار گرفت. روش انجام آزمایش‌های زیست آزمونی براساس روش‌های استانداردOECD انجام شد. در این مطالعه جهت تعیین میانه تلفات (LC_{50}) دافنی در مراحل مختلف از نرم افزار Probit ویرایش ۱/۵ استفاده گردید.

یافته‌ها نشان داد که مقدار LC_{50} ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعته نانو سیلورLS-2000 به ترتیب برابر ۰/۴۱۹، ۰/۴۱۹ و ۰/۴۱۰ میلی‌گرم می‌باشد، و LC_{50} ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعته نانو سیلور L-2000 به ترتیب برابر ۰/۱۲۵، ۰/۱۷۷ و ۰/۱۷۷ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید.

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات نقره سمیت بالایی برای دافنی ماگنا داشته و این سمیت با افزایش غلظت و همچنین با افزایش مدت مجاورت، افزایش معنی‌داری نشان داد. در بین دو نانو ذره مورد استفاده، سمیت L- 2000 بالاتر از سمیت LS -2000 ارزیابی گردید.

مقدمه

در رشته‌های اکولوژی، فیزیولوژی و اکوتاکسیکولوژی، تحقیقات قابل ملاحظه‌ای بر روی جنس دافنیا(Phyllopoda Crustacea) انجام شده است. هرچند Daphnia pulex و D. longispina به‌طور گسترده در تحقیقات اکولوژیکی استفاده می‌شوند، D. magna بیشترین کاربرد را در مطالعات اکوتاکسیکولوژی دارد. بنابراین D. magna یکی از مهم‌ترین موجودات آزمایشگاهی در ارزیابی خطرات آفت‌کش‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و مواد شیمیایی می‌باشد (۷، ۴). کیفیت آب‌ها معمولاً با فاکتورهایی مانند اکسیژن محلول، غلظت ترکیبات ویژه و pH ارزیابی می‌گردد. این فاکتورها تا حدودی می‌توانند کیفیت آب مورد مطالعه را مشخص کنند ولی نمی‌توانند اثر سوء یک ماده سمی ورودی به یک اکوسیستم را نشان دهند (۶). زیست آزمونی (Bioassay) روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبزی برای آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به تنهایی یا توأم با یکدیگر را مورد بررسی قرار می‌دهد (۵). با استفاده از در معرض قرار دادن ارگانیسم‌ها در دوزهای مختلف آلوده‌کننده، زیست آزمونی برای ارزیابی اثرات سمیت آن‌ها انجام می‌گیرد که به‌وسیله پایش خصوصیات و رفتارهای بیولوژیکی این ارگانیسم‌ها و مقایسه آن‌ها با ارگانیسم-هایی که هیچ‌گونه مواجهه‌ای با مواد آلوده‌کننده نداشته‌اند، امکان‌پذیر می‌باشد. این‌گونه روش‌ها خصوصاً در موارد آلودگی سریع یا انتشار یافته و آلاینده‌های با پتانسیل ایجاد مسمومیت حاد در انسان، بسیار مفید هستند (۶).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی-کاربردی که در مقیاس پایلوتی در آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران صورت گرفت، سمیت دو نانو ذرات (L-2000 و Ls-2000) به روش زیست آزمونی مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق دافنیا مگنای اولیه مورد استفاده برای کشت انبوه از مرکز معتبر تهیه و سپس برای تولید محیط کشت براساس روش استاندارد مواد و نوترینت‌های لازم به آب مقطر اضافه گردید. براساس روش‌های استاندارد، محیط کشت

مورد نیاز برای کشت دافنیا از ۵ گرم کود خشک، ۲۵ گرم خاک و یک لیتر آب مقطر تهیه شد. بعد از چند روز مواد مغذی لازم حاصل و محیط کشت فیلتر گشت و شیرابه آن جهت تکثیر دافنی مورد استفاده قرار گرفت.

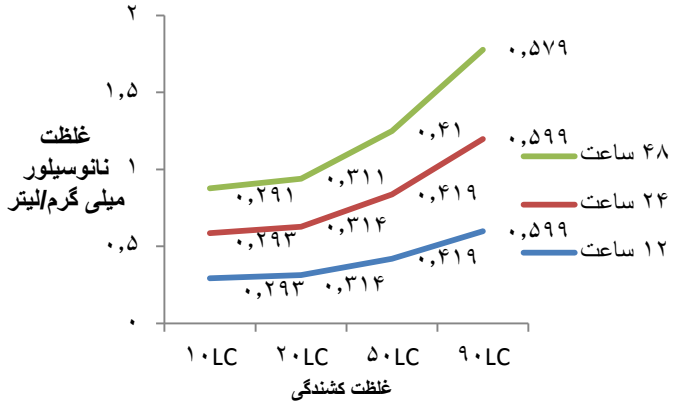
برای تکثیر دافنیا از ظرف شیشه‌ای دهان گشاد به حجم ۵ لیتر که حاوی ۳ لیتر محیط کشت بود، استفاده شد. محیط کشت دافنیا به‌صورت هفتگی عوض و دافنیاهای مرده از آن خارج گردید و با پمپ هوای آکواریومی و به‌صورت ملایم هوادهی شد. برای آزمایش از دافنیاهای چند روزه با اندازه یکسان استفاده گشت. برای تغذیه دافنیا یک روز بعد از کشت اولیه یک میلی‌گرم مخمر خشک به آب ظرف به‌طور یک روز در میان اضافه شد. همچنین کنترل دما به‌طور دایمی با یک دماسنج در داخل محیط کشت انجام گرفت. جهت انجام آزمایش سمیت، با انجام آزمایش‌های دامنه‌یابی، گستره غلظت‌های مورد نظر به دست آمد و برای نانو سیلور Ls-2000، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ و L-2000، ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره تهیه شد. در مرحله بعد جهت انجام زیست آزمونی، نوزادان سه تا چهار روزه دافنی ماگنا از محیط کشت جمع‌آوری و سه مرتبه در آب رقیق‌سازی گشتند و به مدت پنج دقیقه شستشو داده شدند. سپس تعداد ۱۰ عدد دافنی ماگنا توسط پیپت در هر یک از ظروف آزمایش رها گردید و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. در هر مرحله از آزمایش، یک شاهد نیز برای هر سری به‌کار رفت، سپس نتایج (شمارش تعداد دافنیاهای مرده در هر ظرف) به ترتیب بعد از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت شدند.

یافته‌ها

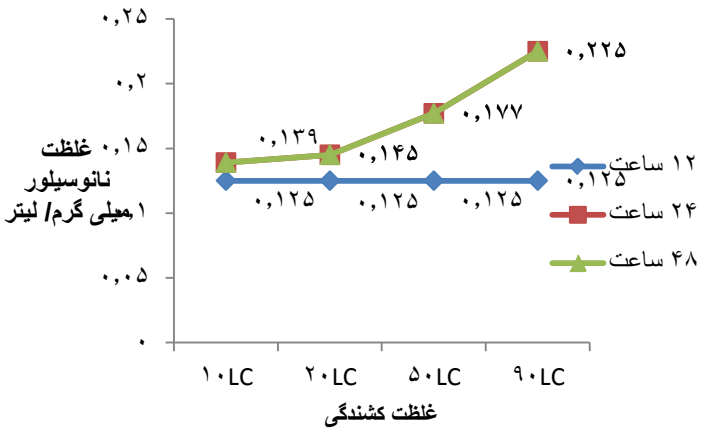
نتایج سمیت نانو ذره نقره L-2000 و Ls-2000 در جدول ۱ و نمودار ۱ و ۲ خلاصه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود سمیت نانو ذره نقره در دافنی ماگنا با افزایش زمان مجاورت، افزایش می‌یابد. یافته‌ها نشان داد که مقدار LC_{50} ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعته نانو سیلور LS-2000، به ترتیب برابر ۰/۴۱۹، ۰/۴۱۹ و ۰/۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر است در صورتی‌که LC_{50} ۱۲، ۲۴ و ساعته ۴۸ نانو سیلور L-2000 به ترتیب برابر ۰/۱۲۵، ۰/۱۷۷ و ۰/۱۷۷ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید.

جدول ۱- غلظت ایجادکنندهLC_{50} بعد از مواجهه با دو نانو سیلور نقره بعد از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

نوع نانو سیلور	غلظت ایجادکننده	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
L-2000	LC_{10}	۰/۱۲۵	۰/۱۳۹	۰/۱۳۹
L-2000	LC_{50}	۰/۱۲۵	۰/۱۷۷	۰/۱۷۷
L-2000	LC_{90}	۰/۱۲۵	۰/۲۲۵	۰/۲۲۵
Ls-2000	LC_{10}	۰/۲۹۳	۰/۲۹۳	۰/۲۹۱
Ls-2000	LC_{50}	۰/۴۱۹	۰/۴۱۹	۰/۴۱۰
Ls-2000	LC_{90}	۰/۵۹۹	۰/۵۹۹	۰/۵۷۹



نمودار ۱ - روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت دافنی ماگنا با نانو ذرات نقره Ls- 2000



نمودار ۲ - روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت دافنی ماگنا با نانو ذرات نقره L- 2000

بحث و نتیجه‌گیری

با پیشرفت فناوری نانو و استفاده از نانو سیلور به دلیل خواص ضد باکتری، ضد ویروس و ضد قارچی در صنایع مختلف از جمله کشاورزی، شیلات، غشای فیلتراسیون پساب‌های بیمارستانی و کاربرد آن‌ها در علوم مختلف از جمله پزشکی و ورود مستقیم یا غیر مستقیم این ماده از طریق پساب‌های صنایع مختلف به اکوسیستم‌های آبی، ضرورت بررسی تأثیر آن بر سطوح ابتدایی زنجیره غذایی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۶). سمیت حاد و مزمن نانو سیلور بر روی دافنی ماگنا به عنوان یک معرف زیستی آلودگی در آب‌های شیرین بررسی شده است که نشان دهنده تجمع زیست محیطی بالای این ماده می‌باشد، به‌طوری‌که تماس دافنی با نانو سیلور با غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر، ایجاد ۵۰ درصد تلفات نمود و با غلظت ۵ میکروگرم در لیتر باعث کاهش رشد و باروری دافنی گردید (۳).

در مطالعه دیگری مشخص گردید که نانو ذره نقره برای آرتمیا که یک سخت پوست مقاوم نسبت به شوری آب می‌باشد نیز سمی بوده ولی مقاومت ناپلی آرتمیا نسبت به آبزیان دیگر به ویژه ماهیان بالاتر می‌باشد (۲).

در مطالعه مؤمنی‌ها و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی اثرات سمی نانو ذرات اکسید روی تماس یافته با رنگ آبی ۲۹، مشخص شد که با افزایش زمان تماس، مقدار LC_{50} کاهش یافت و به عبارت دیگر سمیت نانو ذرات اکسید روی بر روی دافنیا افزایش پیدا کرد (۱).

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات نقره سمیت بالایی برای دافنی ماگنا داشته و این سمیت با افزایش غلظت و همچنین با افزایش مدت مجاورت افزایش معنی‌داری نشان داد. در بین دو نانو ذره مورد استفاده، سمیت L- 2000 بالاتر از سمیت LS -2000 ارزیابی گردید.

منابع

۱. مؤمنی‌ها، م.، ندافی، ک.، حسنوند، م.، بنی زاده، ر. و حیدری، م. (۱۳۹۰): بررسی سمیت نانو ذرات اکسید روی تماس یافته با رنگ آبی ۲۹ با استفاده از دافنیا مگنا. مجله تحقیقات نظام سلامت، سال هشتم. ۲: ۲۷۴-۲۶۷.

2-Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M, Fako, V.E, and Furgeson, D.Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebra fish embryos. Small J. 5: 1897-1910.

3- Chun-Mei, Z., and Wen-Xiong, W. (2011) Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to Daphnia magna. Environ. Toxicol. Chem. 30: 885-892.

4-Forbes, V.E. and Calow, P. (1999) Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 18 (7): 1544–1556.

5-Martins, J., Oliva, TL. And Vasconcelos, V. (2007) Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology. Environ Int. 33(3): 414-25.

6-Navarro, E., Piccapietra, F., Wanger, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L. and Behra, R. (2008) Toxicity of silver Nanoparticles to *Chlamydomonas einhardti*.Environment Science technology. vol. 42(23): 8959-8964.

7-Ratte, H.T. (1996) Statistical implications of end-point selection and inspection interval in the Daphnia reproduction test a simulation study. Environ. Toxicol. Chem. 15 (10): 1831–1843.

نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه ۱۳۹۳
مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

بررسی سمیت حاد با نانو ذرات نقره در ماهی زبرا (*Danio rerio*)

اسماعیل کرمی[۱]، زهرا طولابی دزفولی[۱]، مجتبی علیشاهی[۲]، مریم شکوهمند[۱]*

[۱] بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

*zahratulaby@yahoo.com

کلمات کلیدی: نانو سیلور، زبرا، سمیت، LC_{50}

چکیده

ماهی زبرای دانیو (*Danio rerio*) یک ماهی مدل آزمایشگاهی است که در تحقیقات زیست محیطی و بررسی اثر سموم محیطی به عنوان یک شاخص استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد لذا در این تحقیق اثرات سمی (LC_{50}) دو محصول نانو سیلور محلول در آب (L-2000 و LS-2000) در ماهی زبرا به عنوان مدل آزمایشگاهی، ارزیابی گردید.

به این منظور از روش استاندارد OECD استفاده شد. تعداد ۳۰۰ قطعه بچه ماهی زبرا در غلظت‌های پنج غلظت افزایشی (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و هر غلظت در سه تکرار در مورد هر نانو ذره قرار داده شد و تلفات روزانه تا ۹۶ ساعت ثبت و نهایتا سمیت حاد بر اساس LC_{50} ۹۶ ساعته نانو ذرات در این ماهی با استفاده از نرم افزار Probit مشخص گردید. میزان LC_{50} ۹۶ ساعته دو نانو ذره نقره L-2000 و LS-2000 به ترتیب برابر ۱/۱ و ۰/۷۸۸ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) این دو نانو ذره نیز به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۷۹ میلی گرم در لیتر به دست آمد. در این مطالعه مشخص گردید که دو نانو ذره مورد بررسی برای ماهی زبرای دانیو سمیت بالایی داشته و سمیت نانو ذرات نقره در ماهی در ۲۴ ساعت اول اعمال شده و افزایش مدت مجاورت با سم تأثیر زیادی بر سمیت این دو نانو ذره در ماهی زبرای دانیو ندارد.

مقدمه

همواره توسعه صنایع جدید سبب ورود ترکیبات مخاطره‌آمیزی به محیط زیست می‌گردد که در برخی از موارد اثرات آن‌ها بر انسان و محیط زیست جبران ناپذیر خواهد بود. نانو مواد در سال‌های اخیر توانسته‌اند به علت ویژگی‌های ممتاز الکتریکی، اپتیکی، مکانیکی و شیمیایی توجهات زیادی را به خود جلب کنند (۱۱). امروزه فن‌آوری نانو به سرعت در حال توسعه بوده و ممکن است اثرات قابل توجهی بر صنعت، جامعه و محیط زیست داشته باشد. نانو سیلور شامل یون‌های نقره است که به‌صورت کلوئیدی در محلولی به حالت سوسپانسیون قرار گرفته و دارای اندازه ۱۰۰-۱۰ نانومتر می‌باشد که در مقایسه با محلول‌های دیگر پایداری بیشتری دارد. این یون‌ها برحسب اندازه کمی که دارند قادرند سطح تماس بیشتری را با فضای بیرون داشته باشند و در نتیجه تأثیر بیشتری بر محیط بگذارند (۸).

در ایران نیز مسأله آلودگی زیست محیطی به نانو ذرات که به تازگی وارد چرخه فرایندی صنایع کشور گردیده، از اهمیت چشم گیری برخوردار است چرا که در صورت توجه به این مسأله و اقدامات صحیح در زمینه مدیریت این ترکیبات جدید، می‌توان از آلودگی‌های به وجود آمده جلوگیری به عمل آورد. نانو مواد را می‌توان در چهار گروه ۱- مواد با پایه کربن ۲- مواد با پایه فلز (شامل نانو ذرات فلزی و نانو ذرات اکسید فلزات) ۳- دندریمرها و ۴- کامپوزیت‌ها طبقه‌بندی نمود. نانو ذرات اکسید فلزات دارای ویژگی فوتوکاتالیزوری، هدایت الکتریکی، جذب اشعه ماورای بنفش و اکسیدکنندگی نوری در برابر نمونه‌های شیمیایی و بیولوژیکی می‌باشند. تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با نانو ذرات اکسید فلز با تمرکز روی قابلیت‌های ضد میکروبی و رفع آلودگی خودکار صورت گرفته است (۳).

زیست آزمونی (Bioassay) روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبزی برای آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به تنهایی یا توأم با یکدیگر را مورد بررسی قرار می‌دهد (۶). با استفاده از در معرض قرار دادن ارگانیسم‌ها در دوزهای مختلف آلوده‌کننده، زیست آزمونی برای ارزیابی اثرات سمیت آن‌ها انجام می‌گیرد که به‌وسیله پایش خصوصیات و رفتارهای

بیولوژیکی این ارگانیسم‌ها و مقایسه آن‌ها با ارگانیسم‌هایی که هیچ‌گونه مواجهه‌ای با مواد آلوده‌کننده نداشته‌اند، امکان‌پذیر می‌باشد (۷).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی- کاربردی که در مقیاس پایلوتی در آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران صورت گرفت سمیت نانو ذرات به روش زیست آزمونی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین سمیت نانو ذرات نقره از روش استاندارد OECD استفاده گردید. ابتدا اقدام به انجام آزمایشات مقدماتی در سطح کوچک برای به دست آوردن حدود غلظت کشنده نانو ذرات L-2000 و LS-2000 در ماهی زبرا گردید و سپس براساس این اطلاعات ۵ غلظت بر مبنای ۲ از نانو ذرات نقره در نظر گرفته شد به‌طوری‌که غلظت ایجادکننده ۱۰۰٪ تلفات و غلظت غیر کشنده، در بین این غلظت‌ها قرار گیرد. هر یک از غلظت‌های نانو ذرات نقره در یک سطل ۱۰ لیتری تهیه شد. غلظت‌های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. ابتدا ماهی‌ها به مدت یک هفته برای سازگاری با شرایط جدید نگهداری گردیدند، سپس غلظت‌های مورد نظر در هر یک از ظروف مورد استفاده ایجاد شد. تعداد ۱۰ قطعه ماهی زبرا به هر غلظت اضافه و تلفات روزانه ثبت گردید. ثبت تلفات تا ۹۶ ساعت انجام شد. پس از ثبت تلفات اقدام به تعیین LC_{50}، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته با استفاده از نرم افزار Probit گردید. حداکثر غلظت مجاز با تقسیم نمودن غلظت کشنده ۹۶ ساعته نانو ذره نقره در هر گونه بر عدد ده محاسبه شد (۹).

جدول ۱- تعداد تیمار و غلظت‌های به‌کار رفته نانو ذره نقره برای تعیین LC_{50} در ماهی زبرا

ماهی	تعداد تیمار	غلظت به‌کار رفته (mg/l)
زبرا	۶	۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴

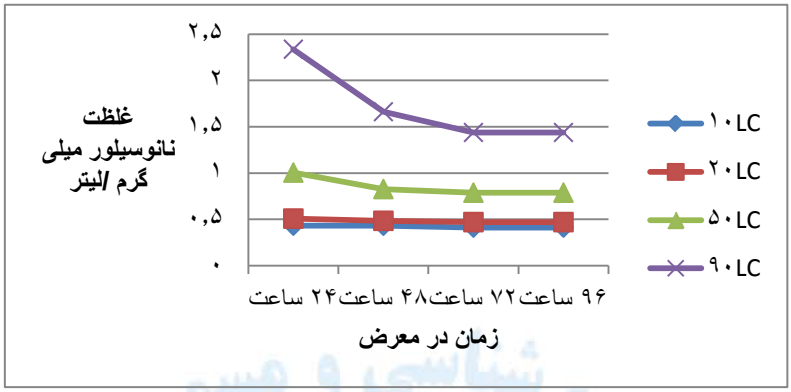
یافته‌ها

نتایج در جدول ۲ و نمودار شماره ۱ و ۲ به‌طور خلاصه آورده شده است. یافته‌ها نشان داد که LC_{50} ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، نانو سیلور Ls-2000، به ترتیب برابر ۱/۰۰۵، ۰/۸۲۸، ۰/۷۸۸ و نانو سیلور L-2000 ۱/۱۱، ۱/۱۱، ۱/۱۱ و ۱/۱۱ میلی‌گرم در لیتر بود. با افزایش زمان در معرض قرار گرفتن نانو ذره Ls-2000، میزان سمیت افزایش یافته است.

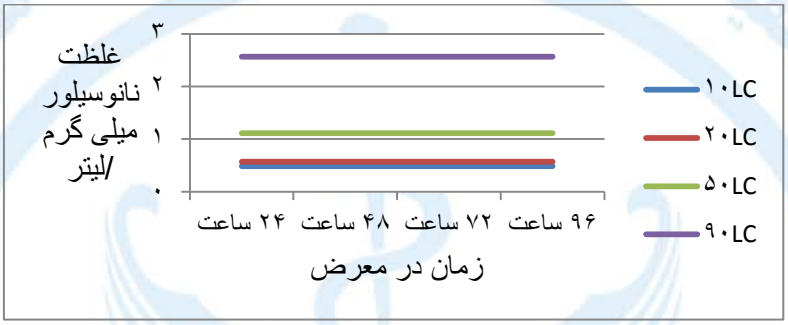
از آنجا که حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) برابر ۱۰٪ میزان LC_{50} ۹۶ ساعته می‌باشد، لذا حداکثر غلظت قابل قبول نانو سیلور Ls-2000 در ماهی زبرا، ۰/۰۷۹ و نانو سیلور L-2000، ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید.

جدول۲- غلظت ایجادکننده LC_{50} بعد از مواجهه با دو نانو سیلور نقره بعد از ۲۴، ۴۸،۷۲ و ۹۶ ساعت

نوع نانوسیلور	غلظت ایجاد کننده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
L-2000	LC10	۰/۴۸۳	۰/۴۸۳	۰/۴۸۳	۰/۴۸۳
	LC50	۱/۱۱	۱/۱۱	۱/۱۱	۱/۱۱
	LC90	۲/۵۶	۲/۵۶	۲/۵۶	۲/۵۶
Ls-2000	LC10	۰/۴۳۲	۰/۴۳۱	۰/۴۱۱	۰/۴۱۱
	LC50	۱/۰۰۵	۰/۸۲۸	۰/۷۸۸	۰/۷۸۸
	LC90	۲/۳۳۷	۱/۶۶	۱/۴۳	۱/۴۳



نمودار ۱– روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت ماهی زبرا با نانو ذرات نقره Ls- 2000



نمودار ۲ – روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت ماهی زبرا با نانو ذرات نقره L- 2000

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود استفاده روز افزون از نانو ذرات در صنایع مختلف (۴) تا به حال گزارشات معدودی از مطالعه سمیت نانو ذرات نقره در صنعت آبزی‌پروری وجود دارد (۵). نانو ذرات نقره بیشتر به خاطر اثرات ضد باکتریایی خود معروف می‌باشند و اثرات ضد باکتریایی ثابت شده‌ای دارند (۱۰). با توجه به این اثرات امکان استفاده از آن‌ها در بهداشت آبزیان وجود دارد، لذا یافتن غلظت کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این مواد در گونه‌های مختلف ماهی ضروری می‌باشد. در بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) مشخص شد که بین ۴ گونه ماهی کپور، برزم، گوپی و افرا، برزم بیشترین حساسیت و ماهی گوپی کمترین حساسیت را نسبت به نانو ذرات نقره L-2000 داشتند و سمیت نانو ذرات نقره در دو گونه کپور و برزم نیز فاقد تفاوت معنی‌دار بود. حداکثر غلظت مجاز نانو ذرات نقره برای ۴ گونه ماهی کپور، برزم، افرا و گوپی به ترتیب برابر ۰/۱۱، ۰/۰۷۸، ۰/۵۷، ۰/۷۴ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید. نتایج حاصل از سمیت نانو ذرات نقره بر روی ماهی زبرا نشان داد که سمیت این نانو ذرات در ماهی زبرا بیشتر از افرا و گوپی و کمتر از برزم می‌باشد و حداکثر غلظت مجاز L-2000 برای ماهی زبرا ۰/۱۱ و مشابه با کپور است. در مطالعه دیگری که توسط علیشاهی صورت گرفت، سمیت نانو ذرات نقره L-2000 و LS-2000 در ماهی شیربت به ترتیب ۰/۰۱۳ و ۰/۰۰۸ مشخص گردید که این نتایج بیانگر آن است که ماهی شیربت به نانو ذرات نقره بسیار حساس‌تر از زبرا می‌باشد. در بررسی دیگری که توسط Bar- Ilan و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت سمیت نانو ذرات نقره و طلا را در جنین ماهی زبرا دانیو (ماهی مدل آزمایشگاهی) مطالعه و سمیت بالای نانو ذرات نقره را گزارش نمودند در صورتی‌که نانو ذرات طلا فاقد سمیت برای ماهی بود (۲، ۱). نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که سمیت نانو ذرات نقره L-2000

در ماهی در ۲۴ ساعت اول اعمال شده و افزایش مدت مجاورت با سم تأثیر زیادی بر سمیت این دو نانو ذره در ماهی زبرای دانیو ندارد. درصورتی‌که سمیت نانو ذرات LS -2000، با افزایش زمان کاهش یافته است.

منابع

۱- علیشاهی، م. مصباح، م. قربانپور، م. (۱۳۹۰): بررسی سمیت نانو ذرات نقره در چهار گونه ماهی. مجله دامپزشکی ایران. دوره هفتم، شماره ۱، صفحات ۴۱-۳۶.

۲- علیشاهی، م. (۱۳۸۹): مقایسه سمیت دو نوع نانو ذره نقره کلوئید در ماهی شیربت *Barbus grypus*. مجله پژوهش‌های نوین دامپزشکی. سال اول، شماره ۴، صفحات ۱۶-۹.

3- Chakrabarti, S. and Dutta, BK. (2004) Photocatalytic degradation of modeltextile dyes in wastewater using ZnO as semiconductor catalyst. J Hazard Mater. 112(3): 269-78.

4- Chen, X., Schluesener, H.J. and Nanosilver. (2008) A nanoproduct in medical application,Toxicology Letters. 176 (1), 1-12.

5- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao J., Bonzongo, J.C. and Barber, D.S. (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry. 27, 9, 1972-1978.

6- Martins, J. Oliva, TL. And Vasconcelos, V. (2007) Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology. Environ Int. 33(3): 414-25.

7- Nadafee, K. (1995) Bioassay with micro organism, review article. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci.

8- Navarro, E., Piccapietra, F., Wanger, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L. and Behra, R. (2008**)** Toxicity of silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardti*. Environment Science technology. vol. 42(23). 8959-8964.

9- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances. 27, 76-83.

10- Reynolds, G.H. (2001). Environmental Regulation of Nanotechnology: Some Preliminary Observations, Nano Archive, 31, 10681-10688.

11- Strunk, J., Kahler, K., Xia, X. and Muhler, M. (2009) The surface chemistry of ZnO nanoparticles applied as heterogeneous catalysts in methanol synthesis. Surface Science. 603(10-12): 1776-83.

نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه ۱۳۹۳
مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

گزارش مسمومیت حاد ناشی از آفلاتوکسین در یک گله گاو شیری در شهرستان اردکان

مجید مروتی شریف آباد*[1]، الهام صالحی[1]، رضا احمدوند[2]

[1] عضو هیات علمی، دانشگاه اردکان

[2] دانشجوی رشته دامپزشکی، دانشگاه اردکان

*Dr.morovati@yahoo.com

کلمات کلیدی: آفلاتوکسیکوز، گاو، خوراک دام

چکیده

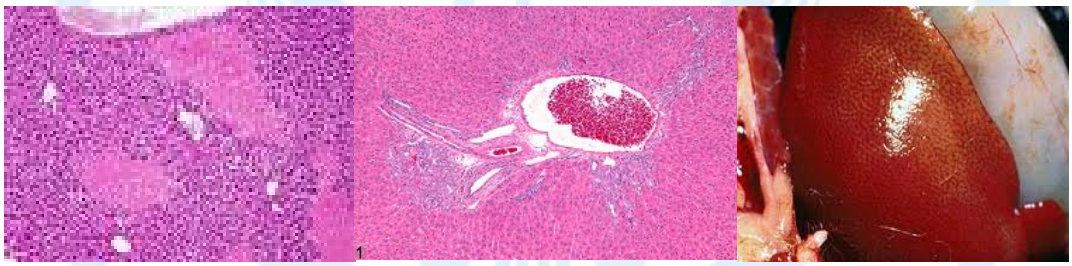
آفلاتوکسین در حقیقت نوعی مایکوتوکسین است که عمدتا توسط قارچهای آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شود و یکی از سرطان‌زاترین سموم شناخته شده در حیوانات اهلی و انسان می‌باشد. مقدار مجاز آفلاتوکسین‌ها در خوراک دام تا ۲۰ ppb برآورد شده است. در طی تابستان ۹۲ در یک گاوداری شیری در شهرستان اردکان، ۸ راس از گاوهای شیری و ۱۰ راس گوساله شیرخوار، دچار اسهال خونی حاد شده و ۶ راس گوساله تلف شدند. در گاوهای شیری کاهش تولید شیر به میزان ۴۰ درصد و کاهش مصرف خوراک، و در گوساله‌های شیرخوار نشانه‌هایی از ضعف، بی‌حالی، کم‌خونی و دهیدراتاسیون شدید قابل مشاهده بود. درمان‌های آنتی‌بیوتیکی در توقف اسهال بی‌تاثیر بود. آنالیز خوراک جدید دام که شامل مقادیر زیادی کنجاله پنبه‌دانه می‌شد میزان آفلاتوکسین تام را تا غلظت ۱۵۰/۲ ppb مشخص کرد. در کشت میکروبی مدفوع دام‌ها و کنسانتره، هیچ نشانه‌ای از آلودگی میکروبی مشاهده نشد. در کالبدگشایی دام‌های تلف شده هپاتومگالی و هیپرپلازی مجاری صفراوی و در لام‌های پاتولوژیک کبد، پرخونی در فضای پورتال کبد، قابل رویت بود. بعد از قطع کنسانتره جدید و استفاده از ترکیبات مسهل جهت خروج محتویات از دستگاه گوارش و تجویز مقادیر قابل ملاحظه‌ای E- سلنیوم و آلفوس، گله رو به بهبودی رفت. به نظر می‌رسد حذف ماده سمی از جیره، استفاده از ترکیبات مسهل و درمان علامتی نارسایی کبدی، تنها روش‌های درمانی در آفلاتوکسیکوزیس باشند.

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچها هستند که ممکن است. دارای اثرات سمی سرطان‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی باشند. متابولیک‌های اولیه (مانند اسیدهای آمینه، استات، پیرووات و...) ترکیباتی هستند که برای رشد قارچها ضروری‌اند اما متابولیت‌های ثانویه که در انتهای فاز رشد به هنگام تجمع متابولیت‌های اولیه تولید می‌شوند، تاثیرات چندانی بر روی رشد قارچ ندارند. سموم قارچی برخلاف سموم باکتریایی، اغلب دارای جرم مولکولی پایین هستند. بسیاری از کپک‌هایی که قادر به تولید مایکوتوکسین‌ها هستند به‌طور مرتب مواد غذایی و فرآورده‌های کشاورزی را آلوده می‌کنند. براساس اظهارنظرهای FAO، سالانه ۲۵٪ غذای دنیا به مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌باشد. آفلاتوکسین‌های اصلی در طبیعت شامل G_1, G_2, B_1, B_2 می‌باشد. آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 متابولیت‌های هتروسیلیک از آفلاتوکسین‌های B_1وB_2 هستند که ممکن است در فرآورده‌های لبنی به دست آمده از چهارپایانی که از غذای آلوده استفاده کرده‌اند پیدا شود. قارچهای A.parasiticus, Aspergillus.flavus وA.nomius از مهم‌ترین گونه‌های مولد آفلاتوکسینB_1, B_2, G_1 و G_2 در خوراک دام و مواد غذایی هستند. بیماری آفلاتوکسیکوز به دو صورت حاد و مزمن بروز می‌کند. ولی نوع شایع آن حالت مزمن بیماری است. علایم آفلاتوکسیکوز حاد شامل: تهوع، اسهال، دل درد، تب، بی‌اشتهایی، خواب‌آلودگی، کما و در نهایت مرگ در انسان بوده و میزان زیادی سم در کبد، قلب، ریه، طحال و مغز یافت می‌شود. علایم آفلاتوکسیکوز مزمن در انسان شامل هپاتیت مزمن، زردی، هپاتومگالی، تورم کیسه صفرا، سیروز کبدی و کبد چرب می‌باشد. علایم بالینی بیماری در گاو شامل راه رفتن دایره وار، تکان دادن گوش‌ها، دندان قروچه، زور پیچ شدید و پرولاپس مقعد بوده و نهایتا زمین‌گیری، تشنج و مرگ رخ می‌دهد. در شکل فوق حاد، خون‌ریزی، اسهال خونی، افزایش زمان انعقاد خون و در مسمومیت تحت حاد، نارسایی کبدی، سقط جنین، زردی، بی‌اشتهایی، لرزش عضلانی، کاهش حرکات شکمبه و مرگ گزارش شده است.

تاریخچه و شرح علایم

در طی تابستان ۹۲ در یک گاوداری ۶۰ راسی در شهرستان اردکان، به‌طور ناگهانی اسهال خونی حاد همراه با کاهش شدید تولید شیر و کاهش اشتها مشاهده گردید. قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی، نمونه مدفوع از دام‌ها اخذ و در ظروف پلاستیکی دهان گشاد جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه ارسال شد. همزمان درمان آنتی‌بیوتیکی با مشکوک شدن به سالمونلا آغاز گشت. از داروی تری‌متوپریم سولفونامید با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر ۵ کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴ روز استفاده شد. در این مدت ۶ راس گوساله تلف گشت و پاسخی به درمان مشاهده نگردید. دام‌های درگیر علایمی از دهیدراتاسیون، آنمی، زردی، دندان قروچه، دپرشن و بی‌حالی را نشان دادند. در گاوهای شیری کاهش ۴۰ درصدی تولید شیر و در گوساله‌های کم سن‌تر، زور پیچ شدید مشاهده گردید که این موارد شک به مسمومیت دام‌ها با سموم قارچی را برانگیخت. در کالبدگشایی لاشه‌های تلف شده، هیپرپلازی مجاری صفراوی و هپاتومگالی مشاهده گردید. در نمونه‌برداری هیستوپاتولوژیک از کبد، پرخونی کبد و هیپرپلازی مجاری صفراوی به اثبات رسید. در تاریخچه‌نگاری معلوم شد اخیرا کنجاله پنبه‌دانه جدید به خوراک دام‌ها اضافه شده است. مقداری از خوراک جدید جهت ارسال به آزمایشگاه اخذ گردید. با کشت دادن مدفوع و خوراک دام در محیط‌های مک کانکی آگار و سلنیت f و انجام تست‌های بیوشیمیایی TSI و تست‌های سرولوژیک (آگلوتیناسیون در مجاورت سرم) هیچ عامل سالمونلایی جدا نشد. همزمان مقداری از خوراک دام در پاکت‌های کاغذی گذاشته شد که امکان تبادل هوا در آن وجود داشته باشد تا میزان رطوبت افزایش نیابد و به آزمایشگاه تخصصی ارسال گردید. در آزمایشگاه به روش TLC میزان آفلاتوکسین موجود در خوراک اندازه‌گیری شد که این میزان ppb ۱۵۰/۲ و تاییدی بر تشخیص اولیه بود. همزمان با نمونه‌برداری از خوراک، دستور قطع مصرف کنسانتره داده شد و از داروهای مسهل جهت خروج محتویات از دستگاه گوارش استفاده گردید. همچنین مقادیر زیادی E سلنیوم و آلفوس تجویز شد و گله رو به بهبودی نهاد.



پرخونی کبد

بحث و نتیجه‌گیری

آفلاتوکسین‌ها ترکیبات سمی هستند که نقش موتاژن، سرطان‌زا و تراتوژن دارند که عمدتا توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند. این قارچ‌ها نقش مهمی در فساد گندم، ذرت، آرد، سبوس، نان و سایر مواد غذایی دارند. AFB_1 یکی از متداول‌ترین سرطان‌زاها است که از طریق مصرف خوراک آلوده به AFB_1 به‌صورت AFM_1 تغییر یافته و در شیر حیوان وارد می‌شود. در اغلب کشورهای غربی حد مجاز آفلاتوکسین در غذای انسان ۲۰-۵ ppb می‌باشد. سازمان غذا و داروی آمریکا حد مجاز AFB_1 در بسیاری از مواد غذایی را ۲۰ ppb و حد مجاز AFM_1 در شیر را ۰/۵ ppb تعیین نمود. در حیوانات، LD_{50} آفلاتوکسین B_1 بسته به نوع حیوان از ۰/۳ تا ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گزارش شده است.

آسپرژیلوس تمایل زیادی به دانه‌های خوراکی و روغنی دارد. ذرت، بادام زمینی و پنبه‌دانه مهمترین مواد غذایی مرتبط با آفلاتوکسیکوز به‌شمار می‌روند. دمای بالای محیط، صدمات مکانیکی حین برداشت و ریزش باران در حین برداشت محصول و انبارداری تحت شرایط گرم و مرطوب، احتمال وقوع آفلاتوکسیکوز را افزایش می‌دهد. آفلاتوکسین‌ها در بسیاری از حیوانات عامل فعال سرطان‌زایی در کبد بوده و آفلاتوکسین B_1 در حیوانات باعث کاهش جذب مواد غذایی شده و آن‌ها را نسبت به بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و

انگلی مستعد می‌سازد. علاوه بر این قدرت زاد و ولد، تخم‌گذاری و شیردهی را کاهش می‌دهد و مسمومیت شدید کبدی به وجود می‌آورد. تمام گونه‌های حیوانی نسبت به آفلاتوکسیکوز حساس‌اند. اما بیشترین موارد آلودگی در خوک‌ها، گاوها و گوسفندان گزارش شده است. اردک، میمون، خرگوش، قزل‌آلا و موش صحرایی نسبت به سایرین حساس‌تر هستند. بقای موجود زنده در برابر آفلاتوکسیکوز به سیستم سم‌زدایی کبد، ساختمان ژنتیکی، سن و فاکتورهای تغذیه‌ای آن موجود بستگی دارد. مقادیر بیش از ۱ ppm باعث آسیب بافتی شدید و مرگ در دام‌های اهلی می‌شود. به علت در دسترس نبودن علف تازه و سالم به اندازه کافی، ما نمی‌توانیم سم آفلاتوکسین را به‌طور کامل از خوراک دام حذف کنیم ولی می‌توان میزان آلودگی را به حداقل رساند. در این راستا حد ماکزیمم سم AFB_1 در خوراک دام ۲۰ ppb و حد ماکزیمم AFM_1 در شیر ۰/۵ ppb تعیین شده است. خوراک دام‌هایی که میزان سم موجود در آن‌ها بیش از این مقدار باشد نباید به مصرف دام‌های شیرده برسد. جهت پیشگیری و کنترل آفلاتوکسیکوز در برخی کشورها مانند آمریکا و فرانسه از گاز آمونیاک تحت دما و فشار زیاد برای تخریب آفلاتوکسین در غذای دام استفاده می‌شود. انبارداری دانه‌های روغنی در کمتر از ۵ درجه سانتیگراد و اتمسفر ۲۰ درصد اکسیژن، ۶۰ درصد دی‌اکسیدکربن و ۲۰ درصد نیتروژن، احتمال تولید سم را کاهش می‌دهد. همچنین استفاده از مواد ضد قارچ مانند سوربات پتاسیم و اسید پروپیونیک، از رشد قارچ جلوگیری می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد غذای سرشار از پروتئین مقاومت در برابر مسمومیت آفلاتوکسین را در برخی حیوانات افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد حذف ماده سمی از جیره، استفاده از ترکیبات مسهل و درمان علامتی نارسایی کبدی، تنها روش‌های درمانی باشند.

منابع

۱-مهدی‌زاده مهرانگیز، علیپور مهدی، آلودگی‌های باکتریایی و قارچی، اصفهان، انتشارات ارکان، ۱۳۷۷، ۱۰۲-۱۰۵.

2- Binder, E.M., Heidler, D., Schatzmayr, G., Thimm, N., Fuchs, E., Schuh, M., Krska, R. and Binder, J. (2001). Microbial detoxification of mycotoxins in animal feed. Proceedings of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 21-25 May, 2000 Guarujá, Brazil, 271 - 277.

3- Hamid, A. B. and Smith, J. E. (1987). Degradation of Aflatoxin by Aspergillus flavus. J. Gen. Microb. 133, 2023-2029.

4- Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E. and Hall, H. H. (1966). Microbial Detoxification of Aflatoxin. Appl. Microb. 14, 6, 934-939.

مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه۱۳۹۳

یک مورد مسمومیت با فسفید آلومینیوم در گوسفند: مطالعه آسیب‌شناسی

فرشاد باغبان[۱]، امین کاظمی[۲]، پدرام معیری[۲]، میلاد حیدری[۲]، محمدرضا اصلانی[۲*]*

[۱] گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج

[۲] گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* aslani@vet.sku.ac.ir

کلمات کلیدی: فسفید آلومینیوم، فسفین، سیتوکروم اکسیداز، گوسفند

چکیده

فسفیدهای فلزی، جونده‌کش و حشره‌کش‌های غیرآلی می‌باشند که به فراوانی برای محافظت برخی از محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آفت‌کش‌ها در تماس با اسید و رطوبت، گاز بسیار سمی فسفیت آزاد می‌کنند که پس از جذب موجب مسمومیت حاد می‌شود. فسفین جذب شده از طریق مهار فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز و جلوگیری از روندهای متابولیکی مانند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و تولید انرژی عمل می‌کند.گزارش حاضر رخداد مسمومیت با فسفید آلومینیوم در گوسفند با تاکید بر یافته‌های آسیب‌شناسی را توصیف می‌کند. هفت راس گوسفند به دنبال تجویز اشتباهی قرص فسفید آلومینیوم به عنوان ضد انگل در مدت کوتاهی تلف شده بودند. در کالبدگشایی این دام‌ها پرخونی و خونریزی‌های پراکنده در بافت‌های احشایی مشاهده گردید. در هیستوپاتولوژی نیز هپاتیت، نفروز، پرخونی، ادم و آمفیزم ریوی، ضایعات میوکارد و تغییرات دژنراتیو مخاط دیواره روده‌ها یافت شد. یافته‌های آسیب‌شناسی مسمومیت با فسفید آلومینیوم در گوسفند کم و بیش با آنچه در سایر دام‌ها و انسان گزارش شده مشابه می‌باشد. پرخونی بارز بافت‌های احشایی و ادم و پرخونی ریه از یافته‌های ثابت در موارد مسمومیت دام‌های مختلف بوده و در موارد مسمومیت انسانی نیز توصیف شده است.

مقدمه

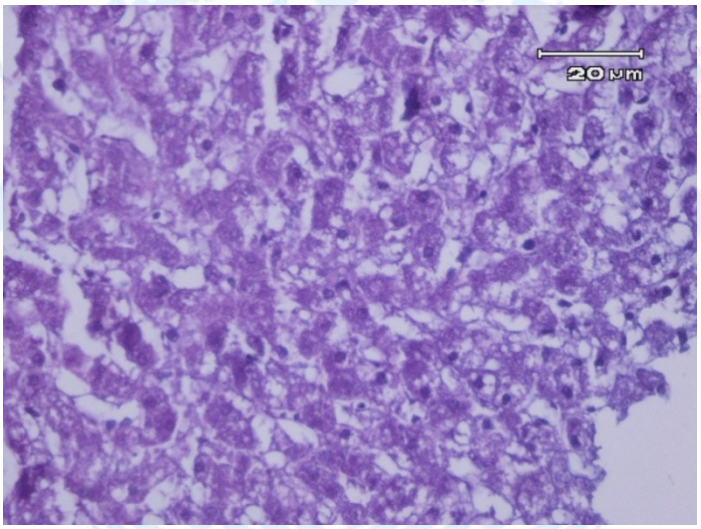
فسفیدهای فلزی (فسفید آلومینیوم، فسفید روی و فسفید منیزیم) حشره‌کش و جونده‌کش‌های غیر آلی بسیار موثر، ارزان، در دسترس، شدیدا سمی و بدون پادزهر می‌باشند. فسفید روی اولین بار در ۱۷۴۰ سنتز شد و بعدها در ۱۹۱۲-۱۹۱۱ به عنوان حشره‌کش توسط ایتالیایی‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۳). این آفت‌کش‌ها به اشکال قرص، گرد، گرانول و پلت عرضه شده و به فراوانی برای محافظت غلات در انبارها و طی حمل و نقل مورد استفاده قرار می‌گیرند. فسفیدهای فلزی در تماس با اسید معده و آب، گاز بسیار سمی فسفین آزاد کرده که به‌راحتی از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش جذب و ایجاد مسمومیت می‌کنند. فسفین بدون رنگ و بو است ولی وقتی در معرض هوا قرار می‌گیرد بویی شبیه سیر و یا ماهی گندیده می‌دهد (۴). استنشاق گاز فسفین می‌تواند خطرناک و کشنده باشد به‌طوری‌که متصاعد شدن آن از مواد استفراغ شده یا محتویات دستگاه گوارش هنگام کالبدگشایی ممکن است باعث مسمومیت دامپزشکان شود. غلظت ۰/۰۰۰۲ درصد فسفین در هوا می‌تواند کشنده باشد. مکانیسم دقیق بیماری‌زایی فسفیدها مشخص نشده است با این حال تصور می‌شود که فسفین جذب شده از طریق مهار فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز و جلوگیری از روندهای متابولیکی مانند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و تولید انرژی عمل کند. نشانه‌های عصبی که در بیشتر موارد مسمومیت با فسفیدها دیده می‌شود نیز با توجه به وابستگی شدید مغز به این روندهای متابولیکی، در همین راستا تفسیر می‌شوند (۴، ۲).

مسمومیت با فسفید روی و یا آلومینیوم (قرص برنج) به فراوانی در انسان رخ می‌دهد به‌طوری‌که سالانه بیش از ۱۰۰۰ نفر در ایران به علت این مسمومیت تلف می‌شوند. همچنین رخداد مسمومیت با این سموم در دام‌های مختلف مانند اسب، انواع طیور و دام‌های کوچک گزارش و توصیف شده است (۳، ۱).

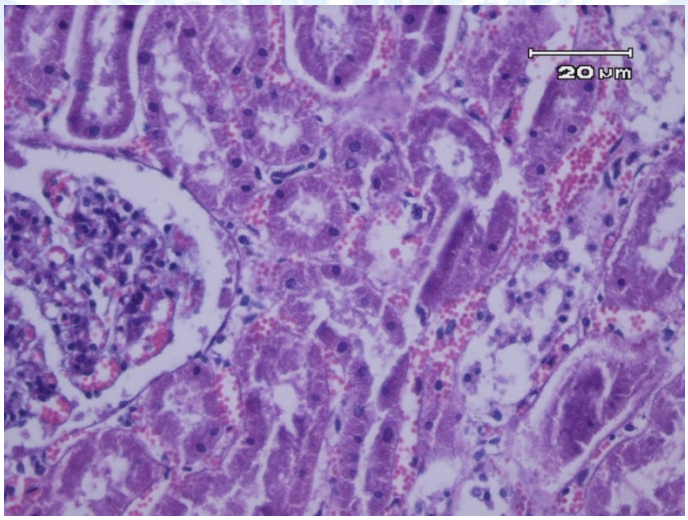
تاریخچه و شرح علایم

در تیر ماه ۱۳۹۳ به دنبال تجویز اشتباهی قرص فسفید آلومینیوم (BHOSTOXIN-Aluminium Phosphide 56%) به عنوان داروی ضد انگل به ۵ راس میش و ۲ راس بره ۶ -۵ ماهه، همه آن‌ها در عرض ۱۲-۷ ساعت تلف شده بودند. در کالبدگشایی دام‌های تلف شده، درجاتی از پرخونی و خونریزی‌های پراکنده در بافت‌های مختلف احشایی مشاهده شد. از این بافت‌ها نمونه‌برداری و در فرمالین

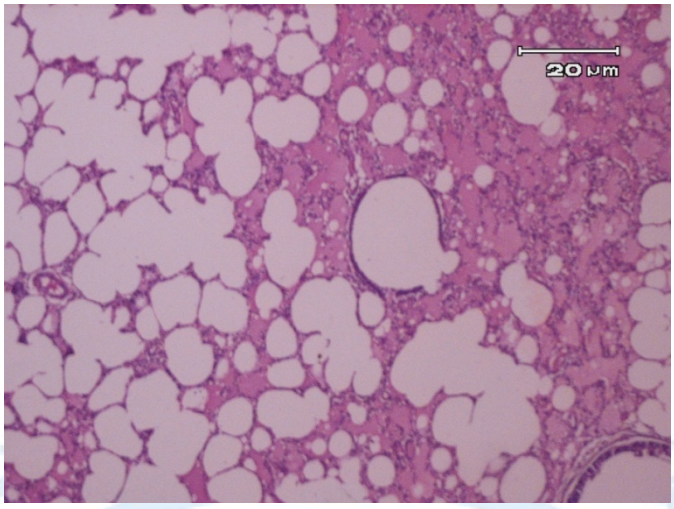
خنثی قرار داده شدند. این نمونه‌ها پس از ثبوت برای هیستوپاتولوژی آماده گشتند. کبد هپاتیت ملایم تا متوسط، به‌صورت پرخونی، دژنرسانس سلولی به شکل تورم ابری (Cloudy swelling) و تغییر چربی را نشان داد (تصویر ۱). در کلیه‌ها پرخونی و همچنین دژنرسانس شدید و نکروز توبولی مشاهده گردید (Nephrosis). در داخل توبول‌ها تغییرات سیتوپلاسمیک و هسته‌ای به خوبی مشهود بود. سیتوپلاسم سلول‌ها ائوزینوفیلیک‌تر و هسته‌ها پیکنوزه و در برخی موارد کاریولیز شده بودند به‌طوری‌که در برخی موارد، دیگر آثاری از هسته وجود نداشت (تصویر ۲). در ریه‌ها پرخونی، آمفیزم شدید و نفوذ مایع ادم در فضاهای آلوئولی مشاهده گردید (تصویر ۳). دژنرسانس میوسیت‌های قلبی و نفوذ پراکنده سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در میان رشته‌های عضلانی قلب مشاهده شد. در روده پرخونی، نفوذ شدید و گسترده سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در تمام ضخامت لایه‌های مخاطی روده مشاهده گردید ولی معماری خمل‌های روده‌ای تا حدود زیادی سالم باقیمانده بودند.



تصویر ۱- دژنرسانس و تورم سلولی و تغییر چربی در کبد. هماتوکسیلین و ائوزین، ×۴۰۰



تصویر ۲- نفروز شدید کلیوی: پرخونی، خون‌ریزی و تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز سلول‌های توبولی. هماتوکسیلین و ائوزین، ×۴۰۰



تصویر ۳- پرخونی، ادم و آمفیزم شدید در ریه. هماتوکسیلین و ائوزین، ×۴۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

مسمومیت با فسفید روی و یا فسفید آلومینیوم در دام‌ها به دنبال خوردن خوراک و آب آلوده و یا بلع اتفاقی طعمه‌های حاوی این سموم رخ می‌دهد. همچنین به‌طور غیر مستقیم پس از خوردن جوندگان تلف شده توسط گوشتخواران مسمومیت اتفاق می‌افتد. همه دام‌های اهلی نسبت به این سموم حساسیت دارند (۳). فسفیدهای فلزی و گاز فسفین آزاد شده از آن‌ها هر دو توسط دستگاه گوارش و به طریق انتشار ساده جذب می‌شوند. باور عمده بر این است که نشانه‌های مسمومیت حاد، به فسفین مربوط بوده و فسفیدها می‌توانند با تاخیر، ضایعات کبدی و کلیوی ایجاد کنند. قسمت عمده فسفین جذب شده به‌صورت دست نخورده از ریه‌ها طی بازدم از بدن خارج می‌شود و مقداری از آن نیز به یون‌های فسفیت و هیپوفسفیت اکسید شده که از راه ادرار دفع می‌شوند. بافت‌هایی که نیاز به اکسیژن بیشتری دارند و در واقع از فعالیت بالای فسفوریلاسیون اکسیداتیو برخوردارند اهداف اصلی در مسمومیت با فسفیدها بوده و ضایعات بیشتری نشان می‌دهند. ریه‌ها، مغز، کبد و کلیه‌ها از جمله این بافت‌ها می‌باشند (۲).

گزارشی از روند مسمومیت با فسفیدها و ضایعات بافتی ناشی از آن در نشخوارکنندگان کوچک در دسترس نیست. با این حال براساس نتایج این گزارش، یافته‌های آسیب‌شناسی مسمومیت در گوسفند، کم و بیش مشابه آن در سایر دام‌ها می‌باشد. پرخونی بارز بافت‌های احشایی و ادم و پرخونی ریه از یافته‌های ثابت در موارد مسمومیت دام‌های مختلف بوده و در موارد مسمومیت انسانی نیز توصیف شده است (۴، ۲، ۱). ادم و آمفیزم ریوی در گوسفندان تلف شده بسیار شدید بود. در بیشتر موارد مسمومیت، ضایعات و اختلالات قلبی و ریوی عامل مرگ می‌باشد. در موارد مسمومیت انسان آریتمی‌های متنوع قلبی شامل جابجایی قطعه ST، وقفه کامل قلبی، طولانی شدن PR و QRS و ضربان‌های زودرس گزارش شده است (۴).

مقدار LD_{50} فسفیدها برای جوندگان مختلف mg/kg ۴۰- ۱۸ می‌باشد. این مقدار برای اغلب دام‌های اهلی mg/kg ۴۰ تعیین شده است. با این حال در برخی منابع LD_{50} فسفیدها برای گوسفند mg/kg ۷۰- ۶۰ اعلام شده است (۳). هر چند مقدار LD_{50} این سموم برای سگ mg/kg ۴۰ گزارش شده است ولی وضعیت محتویات معده در دام‌های تک معده‌ای تاثیر سرنوشت‌سازی بر روی روند مسمومیت دارد به‌طوری‌که در معده حاوی مواد غذایی با توجه به ترشح اسید کلریدریک، رهاسازی فسفین و رخداد مسمومیت سریع‌تر رخ می‌دهد.

رخداد مسمومیت با فسفیدها در گونه‌های مختلف دام اغلب حاد و با مرگ و میر بالا همراه می‌باشد. بنابراین هشدارها و احتیاط لازم در خصوص ارایه، نگهداری و به‌کارگیری این ترکیبات باید صورت گیرد.

منابع

۱. تقی‌پور بازرگانی، ت. اشرفی هلان، ج. سالار آملی، ج. خسروی، ع. نجفی، ج. اسماعیل زاده، ر. علی‌اصفهانی، ط. (۱۳۸۷) مسمومیت عمدی با فسفید روی (Zn_3P_2) در یکی از باشگاه‌های پرورش، نگهداری و سوارکاری اسب در اطراف تهران. مجله دامپزشکی ایران. ۴: ۱۱۵-۱۰۸.

2. Bumbrah, G.S., Krishan, K., Kanchan, T., Sharma, M., Sodhi, G.S. (2012) Phosphide poisoning: A review of literature. Fores Sci. Inter. 214: 1-6.
3. Gupta, R.C. (2007) Non-anticoagulant rodenticides. In: Gupta RC, Veterinary Toxicology; Basic and Clinical Principles. Elsevier, Amsterdam, 548-560.
4. Moghadamnia, A.A. (2012) An update on toxicology of aluminum phosphide. DARU J. Pharma. Sci. 20: 25-33.

مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
نخستین همایش ملی 1st Iran VET TOX
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳ و ۲۴ مهرماه ۱۳۹۳

بررسی کارایی گل ختمی در کاهش اثرات سوء آفلاتوکسین بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی

حسن نظری‌زاده
دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد علوم دامی
Hasan.nazrizade@gmail.com

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، گل ختمی، جوجه گوشتی

چکیده

کاهش اثر آفلاتوکسین جیره بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی با به‌کارگیری گل ختمی بررسی شد. در یک دوره ۲۱ روزه، سه سطح صفر، ۱ و ۲ قسمت در میلیون آفلاتوکسین B_1 در جیره جوجه‌ها اعمال گردید. در پایان دوره آزمایش، غلظت ایمونوگلبولین G سرم، شمار لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نسبت آلبومین به گلوبولین تعیین شد. سطح ایمنی جوجه‌ها با خوردن جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین فاقد عصاره به‌شدت کاهش یافت ($P<0/05$). استفاده از گل ختمی سبب بهبود فراسنجه‌های ایمنی گشت. مشخص شد که گل ختمی در سطح ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره روی سیستم ایمنی اثر خوبی دارد.

مقدمه

قارچ‌های گروه آسپرژیلوس از پراکندگی گسترده‌ای در سطح جهان برخوردار بوده و موجب آلودگی دانه‌هایی مانند ذرت، پنبه دانه، گندم، جو و سویا می‌شوند که به‌طور معمول در جیره‌های غذایی دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند. شرایط ذخیره‌سازی و نگهداری نامناسب مواد اولیه غذایی، رشد انواع مختلف قارچ‌ها و تولید زهرابه قارچی آن‌ها را مقدور می‌سازد، به همین سبب احتمال آلوده بودن مواد اولیه مورد استفاده به منظور تهیه خوراک طیور و همچنین خوراک‌های آماده شده با انواع سموم قارچی به ویژه آفلاتوکسین وجود دارد. تلاش برای به حداقل رساندن اثرات زیان‌آور ناشی از مسمومیت با آفلاتوکسین (AF) در گله‌های طیور، ضمن آن‌که موجب کاهش خسارات اقتصادی ناشی از افت بازدهی گله‌ها و سایر عوارض نامطلوب حاصل از این نوع مسمومیت می‌شود، می‌تواند به تأمین بهداشت جوامع انسانی نیز کمک شایانی نماید (۲، ۱). گیاهان دارای ترکیبات با ارزشی هستند که علاوه بر افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای غذا به‌صورت‌های دیگر از جمله نوشیدنی، رنگ، مواد آرایشی، دارویی و درمانی استفاده می‌گردند. برخی از گیاهان دارای آنتی‌اکسیدان طبیعی به میزان قابل توجهی هستند. به دنبال مصرف آن‌ها ملاحظه شده که ظرفیت آنتی‌اکسیدان پلاسما به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۶). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو فرم سنتتیک و طبیعی هستند. دانشمندان و متخصصان تغذیه همواره درصدد یافتن ترکیباتی طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی جهت کاهش اثرات تحمیلی رادیکال‌های آزاد بر بدن می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اثرات جانبی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک را ندارند. از طرفی برخی از گیاهان نیز دارای ترکیبات ضد التهابی هستند که می‌توان از آن‌ها در درمان انواع التهاب‌های مزمن، عفونت‌های پوستی، دردهای روماتوئیدی، تب و عفونت‌ها استفاده نمود (۷). بیماری‌های التهابی عموماً شامل استئوآرتریت، لوپوس اریتماتوز، آسم و ناهنجاری‌های روماتوئیدی همانند آرتریت‌ها و تب‌های روماتوئیدی می‌باشند. استفاده طولانی مدت از داروهایی که به منظور سرکوب واکنش‌های التهابی استفاده می‌گردند، منجر به عوارضی از جمله زخم‌های معده و روده و متعاقباً آنمی خواهد شد (۸). استفاده از گیاه گل ختمی به دلایل مختلف در طب سنتی ایران رایج است. هدف این مطالعه، ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی و قدرت ضد التهابی این گیاه بر اثرات سوء آفلاتوکسین است.

مواد و روش‌ها

ذرت سترون شده با سوش توکسین‌زای *Aspergillus flavus* آلوده گردید، آفلاتوکسین B_1 به میزان ۳۷/۶۳۴ قسمت در میلیون تولید شد. سپس ذرت آلوده شده به بقیه جیره پایه (جدول ۱) اضافه گردید تا میزان آلودگی جیره به AFB_1 به ۱ و ۲ قسمت در میلیون برسد. تیمارهای آزمایشی روی جیره‌های آلوده به‌صورت افزودنی‌های زیر مورد مطالعه قرار گرفتند: ۵ گرم در کیلوگرم گل ختمی، ۱۰ گرم در کیلوگرم گل ختمی و جیره عاری از آفلاتوکسین نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ۲۷۰ قطعه جوجه گوشتی نژاد راس در

سن ۱ روزگی، به‌صورت تصادفی به ۲۷ گروه ۱۰ تایی با میانگین وزنی برابر (۴۰ گرم) تقسیم و هر گروه آزمایشی در ۳ تکرار و به مدت ۲۱ روز با تیمار مربوطه تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایشی، غلظت ایمونوگلبولین G سرم اندازه‌گیری و مقدار چند فاکتور خونی دیگر تعیین گردید. داده‌ها با برنامه آماری SAS به روش GLM آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد.

یافته‌ها

جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آفلاتوکسین، کمترین میزان IgG، شمار لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نسبت آلبومین به گلوبولین را نشان دادند. این نتایج تأییدی بر کاهش معنی‌دار سطح ایمنی با مصرف جیره آلوده به آفلاتوکسین است. آفلاتوکسین، مونوسیت‌ها و هتروفیل‌ها را نابود نموده، مانع فاگوسیتوز شده و با مختل کردن عملکرد ماکروفاژها، رشد تیموس و جلوگیری از مهاجرت لکوسایت‌ها و Lymphoblastogensis، سبب کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌شود (۵، ۴، ۳). جوجه‌هایی که با جیره حاوی گل ختمی تغذیه شده بودند، بیش‌ترین میزان فراسنجه‌های ایمنی را داشتند (جدول ۲). مشخص شد که گل ختمی در سطح ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره روی عملکرد و سیستم ایمنی اثر خوبی دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

افزودن گل ختمی سبب کاهش اثرات سوء آفلاتوکسین بر سیستم ایمنی شد. از بین تیمارهای استفاده شده در این آزمایش، گل ختمی در سطح ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره توانست در حفظ سطح IgG، مونوسیت و لنفوسیت جوجه‌ها بهتر از تیمارهای دیگر عمل نماید.

جدول ۱- ترکیب جیره غذایی در طول دوره آزمایش

مواد غذایی	۱ تا ۷ روزگی (درصد)	۷ تا ۲۱ روزگی (درصد)
ذرت	۵۳	۵۷
کنجاله سویا	۳۷	۳۴
روغن	۱/۴	۱/۸
کنسانتره تجاری (۵ درصدی)	۷	۵
صدف	۱/۶	۱/۶
ضد کوکسیدیوز	۰/۰۵	۰/۰۵

جدول ۲- تأثیر مقدار آفلاتوکسین جیره (صفر، ۱ و ۲ قسمت در میلیون) و گل ختمی (۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره) بر فراسنجه‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی

جیره	سطح مایکوتوکسین	منوسیت (درصد)	لنفوسیت (درصد)	Alb/Glu	IgG (mg/ml)
شاهد	۰	۳^{ab}	$۷۷/۲^{ab}$	$۰/۷۹^{a}$	$۳/۷۵^{cb}$
شاهد	۱	$۰/۸۷^{c}$	$۶۰/۵^{c}$	$۰/۴۹^{bc}$	$۰/۷۵^{e}$
شاهد	۲	$۰/۷۱^{d}$	$۵۷/۲^{d}$	$۰/۳۹^{c}$	$۰/۱۴^{f}$
شاهد + گل ختمی ۵	۰	$۱/۶۵^{b}$	۸۲^{b}	$۰/۷۴^{a}$	$۴/۱۹^{b}$
شاهد + گل ختمی ۵	۱	$۲/۶۵^{a}$	۸۱^{a}	$۰/۶۲^{abc}$	$۳/۷۲^{bc}$
شاهد + گل ختمی ۵	۲	۳^{ab}	$۷۶/۲^{ab}$	$۰/۶۹^{ab}$	$۲/۶۹^{d}$
شاهد + گل ختمی ۱۰	۰	$۲/۶۵^{a}$	$۸۲/۳^{a}$	$۰/۸۲^{a}$	$۵/۹۶^{a}$
شاهد + گل ختمی ۱۰	۱	$۱/۶۵^{b}$	$۷۷/۶^{b}$	$۰/۷۹^{a}$	$۳/۰۴^{c}$
شاهد + گل ختمی ۱۰	۲	$۱/۳۱^{b}$	$۷۹/۶^{b}$	$۰/۸۱^{a}$	$۲/۷۵^{d}$
انحراف معیار میانگین (SEM)		۰/۲۸	۱/۷۹	۰/۰۹	۰/۴۰

a و b و ... در هر ستون و در هر زیر گروه، میانگین‌هایی که واژه یا واژهای همانند دارند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>۰/۰۵).

منابع

1. Butra, P., A.K Pruthi,. and J.R. Sadana. 1991. Effect of aflatoxin B_1 on the efficacy of turkey herpesvirus vaccime against Marek's disease. Res. Vet. Sci. 51:115-119.

2. Campbell, T.C., and J.R. Hayes. 2004. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxic. Appli. Pharn. 35:199 (Abstract).

3. Chang, C.F., and P.B. Hamilton. 1979. Impairment of phagocytosis in chicken monocytes during aflatoxicosis. Poult. Sci. 58:562-566.

4. Klein, P.J., T.R. Van-Vleek, J.O. Hall, and R.A. Coulombe. 2004. Biochemical factors underlying the age-related sensitivity of turkeys to aflatoxin B_1. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxic Pharm. 132:193-301.

5. Ortatatli, M., and H. Oguz. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. Res. Vet. Sci. 71:59-66.

6. Kahkonen M, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujla TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 1999; 47:3954-3962.

7. Anilkumar M. 10 ethnomedicinal plants as anti-inflammatory and analgesic agents. Ethnomedicine 2010; 2:267-293.

8. Palasuwan A, Soogarun S, Lertlum T, Pradniwat P, Wiwanitkit V. Inhibition of heinz body induction in an in vitro model and total antioxidant activity of medicinal thai plants. Asian Pacific J Cancer Prev 2006; 6:458-463.

نخستین همایش ملی
1st Iran Vet Tox
سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
15-16 October 2014
۲۳و۲۴مهرماه ۱۳۹۳
مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تعیین الگوی پروتئینی سم زنبور عسل *آپیس ملیفرای* ایران و اروپا

صدیقه نبیان*[1]، محمد طاهری[2]، فاطمه نوع پرست[3]، محمد حسن بمانیان[4]، علی ملک شاهی مقدم[5]، عباس گرامی صادقیان[6]، پرستو یوسفی[2]

[1*] دانشیار، گروه انگل‌شناسی و بخش پرورش و بیماری‌های زنبور عسل دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[2] کارشناس ارشد، آزمایشگاه مرکزی دکتر رضا رستگار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[3] دانشجوی سال آخر دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[4] استادیار، گروه ایمونولوژی و آلرژی بالینی بیمارستان رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران

[5] پژوهشگر، گروه تغذیه سلولی- مولکولی دانشکده علوم تغذیه و رژیم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

[6] کارشناس ارشد گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

*nabian@ut.ac.ir

کلمات کلیدی: سم، SDS-PAGE، زایموگرافی، آپیس ملیفرای ایران، آپیس ملیفرای اروپا

چکیده

نیش و سم زنبور عسل یک سلاح بی‌نظیر و اولین خط دفاعی در برابر جانوران مختلف است. براساس مطالعات اپیدمیولوژیک، بین ۵۷ تا ۹۰ درصد مردم حداقل برای یک بار مورد گزش زنبورهای هایمنوپترا قرار گرفته و حدود ۱ تا ۵ درصد از ایشان نیز واکنش آلرژیک شدیدی را نسبت به سم زنبور عسل نشان می‌دهند. با توجه به نقش ویژه‌ای که پروتئین های سم زنبور عسل در ایجاد آلرژی در بین افراد حساس دارند، در مطالعه حاضر به بررسی و شناسایی الگوی پروتئینی و زایموگرافی آن پرداخته شده است. در این تحقیق تعدادی زنبور از زنبورستان‌های اطراف تهران جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه، کیسه سم آن‌ها جدا و در محلول بافر فسفات با pH=۷/۲ شناور گردیدند. متعاقب سانتریفوژ نمودن آن با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی حاوی پادگن جمع‌آوری شد. سپس، محلول سم در بافر SDS-PAGE حل و الکتروفورز گردید. جهت انجام زایموگرافی، ژل SDS به مدت یک شب بر روی آگارز حاوی زرده تخم‌مرغ قرار گرفت. پس از انجام الکتروفورز، در هر دو نمونه حدود تعداد ۸ باند پروتئینی در طیف ۱۱ تا ۱۸۰ کیلو دالتون به دست آمد که یکی از واضح‌ترین باندها با وزن مولکولی حدود ۲/۸ کیلو دالتون، مربوط به یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین ترکیبات سم یعنی ملیتین بود. در زایموگرافی هر دو نمونه، باندهای مربوط به ایزوفرم‌های مختلف پروتئین مهم دیگر سم، فسفولیپاز A_2، با وزن مولکولی ۱۷ تا ۴۰ کیلو دالتون به‌صورت باندهای کدر مشاهده گردید. با توجه به نقش بسیار مهمی که پروتئین‌های سم زنبور عسل در ایجاد واکنش‌های آلرژیک در بدن افراد مختلف دارند، شناسایی و تعیین الگوی پروتئینی سم مزبور و مقایسه آن با سم سایر زنبورها می‌تواند نقش موثری در به‌کارگیری استراتژی‌های سم‌زدایی در این گونه افراد داشته باشد.

مقدمه

سم زنبور از گذشته‌های بسیار دور در طب سنتی و شرقی، در درمان بیماری‌های التهابی مختلف از جمله آرتریت روماتوئید، لوپوس، ام اس و بیماری‌های پوستی کاربرد داشته است (۱). سم زنبور عسل حاوی ترکیبات بیولوژیک با ارزشی همچون آنزیم‌ها، پپتیدها و آمین‌های مختلف است. از مهم‌ترین آنزیم‌ها می‌توان به فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز اشاره کرد. پپتیدهای مهم سم زنبور عسل شامل ملیتین، آپامین و پپتید ماست سل دگرانوله می‌باشد. همچنین از آمین‌های فعال بیولوژیک آن نیز می‌توان به هیستامین و دوپامین اشاره نمود. لازم به ذکر است که از میان اجزاء نام برده شده، دو ترکیب ملیتین و فسفولیپاز A_2 از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند (۲).

ملیتین یک پپتید ۲۶ اسیدآمینه‌ای، آمفی‌پاتیک، با وزن مولکولی ۲/۸ کیلو دالتون است. این ماده در حدود ۵۰٪ ماده خشک زهر زنبور عسل را تشکیل می‌دهد و مقدار ترشح آن در زهر بسته به تغذیه و نژاد زنبور متغیر است. از ۲۶ اسیدآمینه موجود در ساختمان ملیتین، ۲۰ اسیدآمینه انتهای آمین، آب‌گریز و اسیدآمینه ۲۱ تا ۲۶ انتهای کربوکسیل آن، آب‌دوست است. در واقع این خاصیت ذاتی ملیتین (دوگانه دوست بودن آن) امکان واکنش با غشاهای فسفولیپیدی و تخریب آن‌ها را ایجاد می‌نماید. ویژگی ساختاری ملیتین نقش بسیار مهمی در توکسیکوسیتی دارد و می‌تواند افزاینده اثر فسفولیپاز A_2 نیز باشد (۲). ملیتین به عنوان یک ضد التهاب عمل

نموده و در بدن منجر به تولید کورتیزول می‌شود (۳). امروزه گزارش‌های متعددی از اثر ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد التهابی ملیتین در انواع سلول‌های مختلف وجود دارد (۲).

آپامین پپتید دیگر سم زنبور عسل بوده که ۳-۲٪ ماده خشک زهر زنبور عسل را تشکیل می‌دهد و یک نوروتوکسین با وزن مولکولی ۲/۰۲ کیلو دالتون است و سبب افزایش تولید کورتیزول از غده آدرنال می‌گردد (۳).

فسفولیپاز A_2 که ۱۰ تا ۱۲٪ آنزیم‌های موجود در سم زنبور عسل را تشکیل می‌دهد، یکی از مخرب‌ترین آنزیم‌ها در سم محسوب می‌گردد و منجر به از بین رفتن فسفولیپیدها در غشای سلولی می شود، همچنین از عملکردهای دیگر این آنزیم می‌توان به کاهش فشارخون و ممانعت از لخته شدن خون اشاره نمود، در واقع این آنزیم با فعال کردن آراشیدونیک اسید سبب متابولیزه شدن چرخه سیکلواکسیژناز از پروستاگلندین می‌گردد. پروستاگلندین سبب تنظیم پاسخ التهابی بدن می‌شود (۳).

هیالورونیداز با وزن مولکولی ۴۱ کیلو دالتون، ۱ تا ۳٪ آنزیم‌های سم زنبور عسل را تشکیل داده و سبب انتشار التهاب می‌شود (۳).

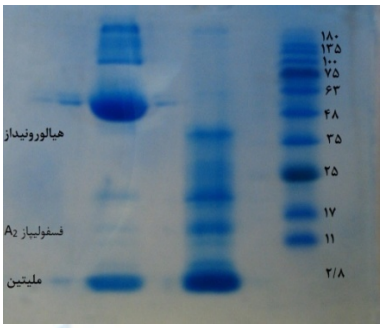
مواد و روش‌ها

تعدادی زنبور از زنبورستان‌های اطراف تهران جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، کیسه سم آن‌ها جدا و در محلول بافر فسفات با PH= ۷/۲ شناور گردید. متعاقب سانتریفوژ نمودن آن با دور ۱۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی حاوی پادگن جمع‌آوری شد.

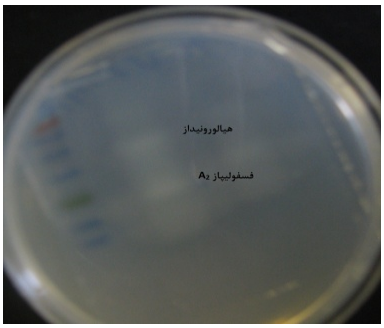
تعیین الگوی پروتئینی با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آکریل‌آمید یا SDS-PAGE براساس روش لاملی و همکاران (۱۹۷۰) و توسط دستگاه الکتروفورز عمودی (Bio rad)انجام پذیرفت. جهت جدا شدن باندهای پروتئینی، ژل متراکم‌کننده ۵٪ و ژل جداکننده ۱۲٪ مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا حجمی از محلول پروتئینی که حاوی ۲۰ میکروگرم از پروتئین مورد نظر به ازای هر گوده بود با هم حجم خود بافر 1X مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جوشانده شد. جهت انجام الکتروفورز، محلول پروتئین از سم زنبور در گودهای ایجاد شده ریخته شد، سپس ولتاژ دستگاه روی ۱۰۰ تنظیم گردید. ظهور باندها به مدت ۴ ساعت طول کشید. انجام زایموگرافی طبق روش پالاکشا و همکاران صورت پذیرفت. به این منظور ژل SDS به مدت یک شب بر روی آگارز زرده حاوی تخم مرغ قرار گرفت.

یافته‌ها

پس از انجام الکتروفورز، حدود تعداد ۸ باند پروتئینی در گستره ۱۱ تا ۱۸۰ کیلو دالتون در هر دو نمونه به دست آمد. یکی از واضح‌ترین باندها با وزن مولکولی حدود ۲/۸ کیلو دالتون، مربوط به یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین ترکیبات سم یعنی ملیتین بود. باند دیگری که در SDSو در هر دو نمونه سم مشاهده گردید، فسفولیپاز A_2 بوده که بر طبق مطالعات انجام شده، وزن مولکولی این آنزیم در سم زنبور عسل بین ۱۵ تا ۱۷ کیلو دالتون است. باند مهم دیگر، هیالورونیداز با وزن مولکولی ۴۱ کیلو دالتون بوده که در هر دو نمونه، در ژل قابل تشخیص است. باند مربوط به آپامین با توجه به وزن مولکولی تقریبا نزدیک آن به ملیتین احتمالا در مجاورت نزدیک آن قرار دارد (تصویر ۱). در زایموگرافی هر دو نمونه، باندهای مربوط به ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های مهم سم، فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز، با وزن مولکولی ۱۷ تا ۴۰ کیلو دالتون به‌صورت باندهای کدر مشاهده گردید (تصویر ۲).



تصویر ۱- باندهای به دست آمده از ژل SDS



تصویر ۲- باندهای مشاهده شده از زایموگرافی

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از سم و سایر محصولات زنبور عسل در درمان بیماری‌ها به سالیان دور بر می‌گردد. اثرات درمانی زنبور و فرآورده‌های آن، در کتب مذهبی چون انجیل و قرآن کریم بیان شده است. این سم در طب سنتی در درمان بیماری‌هایی چون آرتریت، آرتریت روماتوئید، ام اس و لوپوس کاربرد داشته است (۳، ۲). سم زنبور از ۸۸٪ آب تشکیل شده است. گلوکز، فروکتوز و محتوای فسفولیپیدی سم بسیار مشابه خون زنبور می‌باشد. سم زنبور حاوی پروتئین‌ها، پپتیدها و آمین‌های فعال مختلفی است. اصلی‌ترین ماده در سم زنبور عسل که سبب ایجاد درد در مهره‌داران می‌گردد، شامل ملیتین، هیستامین و آمین‌های بیولوژیک است که منجر به ایجاد درد و خارش نیز می‌گردد. ملیتین یک ضد التهاب قوی است و منجر به ایجاد کورتیزول در بدن می‌شود. آپامین یک نوروتوکسین متوسط و افزاینده کورتیزول از غده آدرنال است. هیالورونیداز سبب انتشار التهاب می‌شود. فسفولیپاز A_2 یکی از مخرب‌ترین آنزیم‌ها در سم محسوب شده که منجر به از بین رفتن فسفولیپیدها در غشای سلولی می‌گردد (۳، ۲). تحقیقات مختلفی در زمینه ماهیت پروتئین‌های سم زنبور عسل توسط برخی از محققین از جمله بیلو و همکاران (۲۰۰۵) و باگدانو و همکاران (۲۰۱۴) انجام پذیرفت (۴، ۲). در تحقیق حاضر نیز اقدام به شناسایی باندهای پروتئینی سم زنبور عسل ایرانی و مقایسه آن با سم زنبور عسل اروپایی نموده‌ایم. نتایج به دست آمده در بررسی حاضر، از نظر وزن مولکولی باندهای تعیین‌شده، با نتایج به دست آمده در تحقیق‌های محمود عبدالله و همکاران (۲۰۱۲)، بلنک و همکاران (۲۰۱۴) و مولر (۲۰۱۱) مطابقت داشته است. درحالی‌که محمود عبدالله و همکاران عدم حضور ملیتین را در زنبور Yellow Jacket اعلام نموده‌اند.

به نظر می‌رسد که مطالعات بعدی مشابه در مورد سایر زنبورها (زنبورهای وحشی) جهت یافتن پروتئین‌های مشترک به منظور طراحی راهکارهای مناسب جهت آلرژی‌زدایی می‌تواند مثمر ثمر باشد. با توجه به نتایج تحقیقات صورت گرفته و نتایج این پژوهش، شناسایی پروتئین‌های مختلف سم زنبور عسل و زنبورهای وحشی کمک بسیار شایانی در شناسایی مکانیزم عملکردی این پروتئین‌ها در ایجاد واکنش‌های آلرژیک و حتی در درمان بیماری‌ها می‌تواند داشته باشد.

منابع

1. Abdu Al, M., Mohamed Ali, S.(2012) Studies on Bee Venom and Its Medical Uses.2(1).
2. Bilo, B.M., Ruëff, F.,Mosbech, H., Bonifazi, F., Oude-Elberink, J.N.G., Birnbaum, J., Bucher, C., Forster, J., Hemmer, W., Incorvaia, C., Kontou Fili, K.,Gawlik, R., Müller., U., Fernandez, J., Jarisch, R., Jutel, M., Wüthrich, B. (2005) Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. Allergy.60:1339-1349.
3. Blank, S., Seismann, H.,Bockisch, B., Braren, I., Cifuentes,L., McIntyre,M.,Ru¨ hl,D., Ring,J., Bredehorst, R.W., Ollert, M., Grunwald,T., Spillner, E.(2014) Identification, Recombinant Expression, and Characterization of the 100 kDa High Molecular Weight Hymenoptera Venom Allergens Api m 5 and Ves v 3, Journal of Immunology,184:5403-5413.
4. Bogdanov, S.(2014) Bee Venom:Composition, Health, Medicine: A Review,Bee Product Science.
5. Müller, U.R. (2011) Hymenoptera Venom Proteins and Peptides for Diagnosis and Treatment of Venom Allergic Patients.10:420-428.