Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 1, 2024 p: 95-104

OPEN ACCESS

Research Paper

Production of the First Effective Immune Equine Serum Antivenom against Iranian Honey Bees (*Apis mellifera meda*)

Mahmoud Nazari[1], Hedayatolah Roshanfekr[2], Fatemeh Saalabi[3], Jamal Fayazi[4], Ali Mohammadian[5] and Fariba Kavosh[6]

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, (Corresponding author: M.nazari@asnrukh.ac.ir)
2 and 4- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
3, 5 and 6- Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

Received: 13 September, 2023 Accepted: 6 December, 2023

Extended Abstract

Background: Bee venom is a colorless, acidic liquid (pH 4.5-5.5) that contains 18 different compounds, including enzymes, peptides, and biological amino acids. Some of these compounds have anti-inflammatory properties, while others possess toxic and allergenic properties. Bee venom is produced by female worker bees, with the most important peptides being melittin, apamin, adolapin, and mast cell degranulating (MCD) peptide. The key enzymes in bee venom include hyaluronidase and phospholipase A2 (PLA2). Historically, bee venom has been used in traditional medicine to treat various diseases, such as rheumatoid arthritis, and to alleviate muscle pain. Massive bee attacks are considered a public health problem in several countries, including Iran. Currently, no specific therapy exists for bee stings; treatment typically involves chemical drugs. This has led us to explore the development of Fab-based antivenom as a potential new treatment. To date, no efforts have been made in Iran to produce Fab-based antivenom for individuals sensitive to bee stings. Therefore, this research aimed to produce an effective and safe horse serum antidote against the Iranian honey bee (Apis mellifera meda).

Methods: Crude bee venom (BV) was collected from Iranian bees (Apis mellifera meda) using an electric bee venom-collecting machine. The venom dries quickly in the air; therefore, it was collected daily from glass plates using special spatulas and stored in dark glass containers in a freezer at -20ºC for future experiments. To remove mucus and extraneous substances, the venom was dissolved in a 1:1 ratio with saline (physiological serum) and centrifuged at high speed. After centrifugation, the upper clear solution was separated and filtered using a 0.2-micron filter. The protein concentration in the crude venom solution was determined using the Bradford protein assay method, based on a standard curve obtained from different concentrations of bovine serum albumin (BSA) solution.

The median lethal dose (LD50) of BV was determined using 24 male mice, which were divided into four groups. Different doses of venom (60, 70, 80, 90, 100, and 110 µg/ml) dissolved in sterile normal saline were injected intravenously. The control group received 0.5 ml of saline solution. Mortality was recorded after 24 hours, and LD50 was calculated using probit analysis. Three horses were used to produce antivenom against honey bee venom. The horses were immunized with Iranian bee venom seven times at 7-day intervals, and immunogenicity was evaluated under laboratory conditions using the ELISA test. The precipitated antivenom with saturated ammonium sulfate was used to perform the neutralizing test in mice. To assess the quality of the antivenom, the neutralization of phospholipase A2 activity was tested with different concentrations of antivenom. Finally, the median effective dose (ED50) was calculated using probit analysis. Three adult mares (three years old, weighing 400 to 450 kg) were used for immunization. Bee venom was injected with complete and incomplete Freund's adjuvant; complete Freund's adjuvant was used in the first two inoculations, while incomplete Freund's adjuvant was used in subsequent ones. Venom doses were incrementally increased from 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, to 4000 micrograms over seven inoculations at 7-day intervals, administered subcutaneously (in the neck). Horse antibody isolation was performed using the saturated ammonium sulfate method. Immunogenicity evaluation was conducted via the ELISA test. The serum from immunized horses

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]

[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

Copyright ©2024 Nazari et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

and the precipitated antivenom were also used for neutralization tests in mice. The neutralization of phospholipase A2 activity was assessed with various concentrations of antivenom. The effectiveness of the prepared antivenom was determined by calculating the ED50 value through probit analysis.

Results: The total protein concentration in the crude BV solution was calculated to be 56 mg/ml, and the LD50 of the crude BV was determined to be 4.84 µg/g. ELISA test results indicated an immune response that increased throughout the immunization schedule. Neutralization of phospholipase A2 activity with different concentrations of antivenom demonstrated that Iranian bee venom possesses phospholipase activity, and 120 µg/ml of this antidote can completely neutralize the activity of phospholipase A2. Furthermore, 55 micrograms of antivenom are required to neutralize 50% of phospholipase A2 activity in 100 micrograms of venom. The ED50 value is approximately 54 times the LD50, indicating that the antivenom can neutralize up to 54 times the LD50. Therefore, the death caused by 4 mg of bee venom can be neutralized by 1 ml of antivenom, resulting in an average effective dose (ED50) of 4 mg/ml. If 100 micrograms of venom enters the body with each bee sting, then 1 ml of the produced antivenom can neutralize 40 bee stings.

Conclusion: The results indicate that horse antivenom against honey bee venom is capable of neutralizing crude venom in a mouse model.

Keywords: Antivenom, Equine, Iranian honey Bees

How to Cite This Article: Nazari, M., Roshanfekr, H., Salabi, F., Fayazi, J., Mohamadian, A., & Kavosh, F. (2024). Production of the First Effective Immune Equine Serum Antivenom against Iranian Honey Bees (*Apis mellifera meda*). *Res Anim Prod*, 15(1), 95 -104. https://doi.org/10.61186/rap.15.43.86

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]

[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

مقاله پژوهشی

تولید اولین پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*)

محمود نظری[۱]، هدایت اله روشنفکر[۲]، فاطمه ثعلبی[۳]، جمال فیاضی[۴]، علی محمدیان[۵] و فریبا کاوش[۶]

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران،
(نویسنده مسوول: M.nazari@asnrukh.ac.ir)
۲ و ۴- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۳، ۵ و ۶- سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۵
صفحه: ۹۵ تا ۱۰۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: زهرزنبور عسل ترکیبی مایع، بیرنگ و اسیدی (pH 4.5–5.5) است که شامل ۱۸ ترکیب متفاوت مانند آنزیم ها، پپتیدها و آمینه ای زیستی می¬باشد. برخی از این ترکیبات دارای خواص ضد التهابی و برخی دارای خواص سمی و آلرژن می‌باشد. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند. مهمترین آنزیم‌های موجود در زهر زنبور می‌توان هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 را نام برد. زهر زنبور عسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتویید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار گرفته است. زنبورگزیدگی به‌عنوان یکی از مشکلات در سیستم بهداشت عمومی برخی از کشورهای دنیا از جمله ایران مطرح می‌باشد. در حال حاضر درمان خاصی برای زنبور گزیدگی وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. در سال‌های گذشته پادزهر مبتنی بر Fab از اسب و گوسفند به‌عنوان یک درمان جدید بالقوه مطرح شده است. تاکنون در ایران اقدامی جهت تولید آنتی‌ونوم (پادزهر) برای نجات افراد حساس به نیش زنبور صورت نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق تولید پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بود.

مواد و روش‌ها: زهر خام از زنبور عسل ایرانی به‌وسیله دستگاه زهرگیر تهیه گردید. زهر در مجاورت هوا سریعاً خشک می‌شود. زهر خشک شده هر روز به‌کمک کاردک‌های مخصوص از روی صفحات شیشه‌ای جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در شیشه‌های تیره رنگ در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. به‌هنگام استفاده از سم، برای حذف موکوس و مواد اضافه، سم به نسبت ۱ به ۱ با محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دور بالا سانتریفیوژ می‌گردد. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر می‌گردد. مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به‌روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد. مقدار متوسط دوز کشندگی (LD50) با ۲۴ موش سوری نر تعیین گردید. موش‌ها به گروه‌های ۴ تایی تقسیم شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر از دوزهای مختلف زهر (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محلول در نرمال سالین استریل به‌صورت داخل وریدی به آنها تزریق شد. به موش‌های شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی تزریق شد. مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت ثبت شد و LD50 بر اساس آنالیز پروبیت محاسبه گردید. در این پژوهش از ۳ اسب مادیان بالغ ۳ ساله (۴۰۰ تا ۴۵۰ کیلوگرم) استفاده گردید. برای ایمن سازی اسب‌ها زهر زنبور به همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص تزریق گردید. در تلقیح اول و دوم از ادجوانت فروند کامل و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. تلقیح سم به صورت افزایشی به ترتیب از ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در طی ۷ مرتبه با فواصل زمانی ۷ روز اجرا شد. تزریق به صورت زیر پوستی (گردن) انجام شد. جداسازی آنتی بادی اسب با پروتکل استاندارد روش آمونیوم سولفات اشباع شده اجرا شد. ارزیابی ایمنی‌زایی در شرایط آزمایشگاهی با تست الایزا انجام گرفت. سرم اسب‌های ایمن شده و نیز آنتی‌ونوم حاصل از رسوب آمونیوم سولفات اشباع از نظر خنثی‌سازی سم ارزیابی شدند. جهت بررسی کیفیت پادزهر، خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر اجرا شد. در نهایت متوسط دوز موثر (ED50) برای پادزهر در موش سوری تعیین گردید. برای تعیین کارآیی پادزهر اسبی تهیه شده، زهر زنبور به‌صورت دوز افزایشی با مقدار ثابت پادزهر مخلوط و به موش تزریق شد.

یافته‌ها: مقدار LD50 برای زهر زنبور ۴/۸۴ میکروگرم برای هر گرم وزن زنده موش به‌دست آمد. نتایج تست الیزا نشان داد که روند پاسخ اسب‌ها نسبت به زهر افزایشی بوده و به‌خوبی با آنتی ژن ایمن شده‌اند. خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر نشان داد که سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این پادزهر قادر به خنثی‌کردن کامل فعالیت سم فسفولیپاز A2 است. از این داده‌ها مشخص است که اولاً سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و دوماً ۵۵ میکروگرم پادزهر برای خنثی‌کردن ۵۰ درصدی فعالیت فسفولیپاز A2 در ۱۰۰ میکروگرم زهر مورد نیاز است. مقدار ED50 تقریباً ۵۴ برابر LD50 خواهد شد. این بدان معنی است که پادزهر تا ۵۴ برابر LD50 را می‌تواند خنثی کند. بنابراین مرگ ایجاد شده بوسیله ۴ میلی‌گرم سم زنبور با ۱ میلی‌لیتر پادزهر خنثی می‌شود به‌همین دلیل میزان متوسط دوز موثر ED50 برابر با ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواهد بود. اگر در هر بار نیش زنبور مقدار ۱۰۰ میکروگرم زهر وارد بدن شود پس ۱ میلی‌لیتر از این پادزهر می‌تواند ۴۰ نیش زنبور را خنثی کند.

نتیجه‌گیری: پادزهر سرم اسبی که علیه سم زنبور عسل ایرانی به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: اسب، پادزهر، زنبور عسل ایرانی

مقدمه

امروزه مطالعه گونه‌های بومی به‌منظور شناخت ظرفیت‌ها و حفاظت از آنها به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است (Rohipoor *et al.*, 2019; Mohamadi ahvazi *et al.*, 2019; Rohipoor *et al.*, 2021). یکی از این گونه‌های بومی که باید مورد توجه قرار گیرد، زنبور عسل ایرانی است (Nazari *et al.*, 2023). در سال‌های گذشته تغییرات آب و هوایی و مخصوصاً گرم شدن هوا، تغییرات بسیار زیادی در رفتار و زندگی زنبورعسل ایجاد کرده است. به‌طوری‌که میزان فعالیت زاد و ولد، گرده‌افشانی، تنوع و پراکنش و حساسیت به عوامل بیماری‌زا و آفات آن‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و در درازمدت می‌تواند، منجر به تغییرات زیادی در جمعیت زنبورعسل شود (Norooz Valashedi & Bahrami Pichaghchi, 2022). با این وجود تاکنون در کشور ما زنبور عسل کمتر مورد مطالعه و توجه قرار گرفته است. زنبور عسل از جانوران متعلق به دسته حشرات و راسته پرده‌بالان است که نقش کلیدی در تولید

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

محصولات کشاورزی از طریق گرده‌افشانی دارد. علاوه بر این، این جانور توانایی تولید محصولاتی نظیر عسل، ژل رویال، زهر، گرده گیاهان، موم و بره موم را دارد (Morammazi & Mirhosseini, 2020). زهر زنبورعسل در ادوار گذشته بخصوص در درمان سنتی همواره به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت روماتویید و همچنین جهت کاهش دردهای عضلانی مورد استفاده قرار گرفته است (Ghabili *et al.*, 2009).

زهرزنبور عسل ترکیبی مایع، بیرنگ و اسیدی (pH 4.5–5.5) است که شامل ۱۸ ترکیب متفاوت مانند آنزیم‌ها، پپتیدها و آمینه‌ای زیستی می‌باشد که برخی از آن‌ها دارای خواص ضدالتهابی و برخی از آن‌ها دارای خواص سمی و آلرژن می‌باشد (Pattabhiramaiah *et al.*, 2020). زهر زنبور مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها است که در آن برخی آنزیم‌ها (کاتالیزور واکنش‌های خاص)، برخی پپتیدها (که از دو یا چند اسید آمینه تشکیل شده‌اند) و برخی دیگر از جمله انواع اجزای کم مولکولی مانند کربوهیدرات‌ها (۲ درصد وزن خشک زهر)، فسفولیپیدها (۵ درصد وزن خشک زهر)، اسیدهای آمینه (۱ درصد وزن خشک زهر)، مواد معدنی (۳–۴ درصد وزن خشک زهر)، و ترکیبات فرار (۵–۸ درصد وزن خشک زهر) مشاهده می‌شود. مهمترین پپتیدهای موجود در زهر زنبور ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده ماست سل هستند (Alia *et al.*, 2013; Lima & Brochetto-Braga, 2003) و از آنزیم‌های موجود در آن می‌توان هیالورونیداز و فسفولسپاز A2 را نام برد (Nazari *et al.*, 2023).

تولید زهر بلافاصله پس از تولد زنبورکارگر آغاز می‌شود و به‌تدریج با افزایش سن زنبور مقدار آن بیشتر می‌شود. وقتی زنبور کارگر به سن حدود ۱۶ تا ۱۹ روزگی رسید کیسه زهر آن کاملاً پر شده و ترشح زهر متوقف می‌شود. زنبور کارگر در این سن وظیفه محافظت از کلنی را بر عهده دارد و دارای حداکثر تولید زهر است (Winston, 1991). کیسه زهر زنبورهای کارگر در بهار و تابستان حدود ۱۶ تا ۲۰ روز پس از تولد آنها پر می‌شود ولی برای زنبورهای کارگر پاییزه این عمل ۴ تا ۵ روز دیرتر انجام می‌شود. زنبورهای کارگر در زمستان نیز قادر به تولید و ذخیره زهر می‌باشند. مقدار زهر تولید شده توسط یک زنبور کارگر حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکروگرم می‌باشد که این مقدار به عواملی چون سن، نژاد، فصل و میزان مصرف گرده بستگی دارد. گزیدگی زنبورهای زرد، سرخ و زنبور عسل دردناک است، ولی در اکثر موارد خطرناک نیست. یک زنبور می‌تواند تا ۰/۱ میلی‌گرم زهر را در یک بار نیش زدن تزریق کند که شبیه سم گزنه دریایی (sea nettle) است (Czarnetzki et al., 1990).

واکنش‌های آلرژی نسبت به نیش زنبور بسیار شایع است. به‌طور معمول در اولین گزش آلرژی مشاهده نمی‌گردد. زهر زنبورهای عسل حاوی هیستامین است که می‌تواند علایم موضعی یا عمومی ایجاد کند. علایم گزش بستگی به تعداد گزش در هجوم زنبورها، میزان سم، حساسیت بدن به زهر و تا حدی محل گزیدگی دارد و می‌تواند به‌صورت یک واکنش عادی و معمولی، مسمومیت، حساسیت‌های عمومی وسیع و حتی در موارد نادر به شکل واکنش‌های شدید روانی باشد. در اغلب موارد نیش زدن زنبور باعث تورم و درد در محل، به خاطر یک واکنش سمی غیرحساسیتی به زهر زنبور می‌شود. واکنش‌های حساسیتی به نیش زنبور ممکن است خفیف باشد و با درد و قرمزی موضعی پوست همراه باشد. در عین حال ممکن است واکنشی عمومی‌تر به‌همراه تورم، کهیر و قرمزی باشد. در موارد شدیدتر ممکن است کل بدن دچار تورم شود، تورم عروقی منتشرشده، مشکل تنفسی و آنافیلاکسی شدید با شوک و افت فشار خون بوجود آید. واکنش آلرژی نسبت به سم زنبور در طول ده دقیقه پس از گزیده شدن به‌وجود می‌آید. واکنش‌های شدید حساسیتی تهدید کننده حیات در افراد دارای آلرژی شدید، در افراد مسن، افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و در موارد گزش‌های متعدد ممکن است روی دهد. در موارد واکنش‌های خفیف به سم زنبور تنها مصرف قرص‌های آنتی هیستامین کافی است، در حالیکه در موارد واکنش‌های شدیدتر یا آنافیلاکسی ممکن است برای احیای بیمار به تزریق آدرنالین، آنتی‌هیستامین،کورتون و تزریق سرم نیاز باشد (Hall, 2010).

تعداد حملات انبوه زنبورها در قاره آمریکا توسط زنبورهای مهاجم آفریقایی (*Apis mellifera scutellata*)، که به‌نام "زنبور قاتل" نیز شناخته می‌شود، به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. به گفته وزارت بهداشت برزیل، تعداد گزش‌ها مربوط به این حشرات بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ در برزیل به بیش از ۴۷۰۰۰ مورد رسیده است که با ۱۵۳ مورد مرگ همراه بوده است (Santos *et al.*, 2013). آمار دقیقی از تعداد گزیده‌شدگان توسط زنبور در ایران وجود ندارد و متاسفانه اطلاعات در این زمینه بسیار کم است اما هر روز در سایت‌ها و روزنامه‌ها خبر مرگ توسط گزش حشرات و زنبور گزارش می‌شود.

در حال حاضر پادزهر (آنتی‌ونوم) مشخصی برای زنبور گزیدگی وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. در حال حاضر هیچ درمان خاص و ایمن در دسترس نیست برای درمان گزش زنبور عسل از اپی‌نفرین، کلروفنیرامین، آنتی‌هیستامین و غیره استفاده می‌شود. درمان‌های مورد استفاده برای درمان قربانیان حملات زنبور عسل، در بعضی مواقع فاقد اثربخشی هستند و منجر به فوت می‌شود.

با توجه به اینکه تا کنون برای نیش زنبور هیچ پادزهری اختصاصی تولید نشده است ضروری است نسبت به تولید پادزهر اقدام شود. در چندسال گذشته تولید پادزهر برای زنبورهای خطرناک مثل زنبور آفریقایی به میزبانی اسب و گوسفند و خرگوش تولید شده است (Barbosa *et al.* 2017; Jones *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 1996). اما در ایران اقدامی جهت تولید آنتی‌ونوم برای نجات افراد حساس به نیش زنبور صورت نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق تولید پادزهر سرم اسبی موثر و ایمن در مقابل زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری زهر

زهر زنبور عسل به‌وسیله دستگاه زهرگیر زنبورعسل اورین (اصغرپور) ورژن ۷ از یکی از کندوهای زنبور عسل ایرانی واقع

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

در زنبورستانی در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد. این دستگاه با ارسال شوک و پالس گردشی، باعث تحریک زنبورهای عسل می‌شود و زنبورها زهر خود را بر روی صفحه‌ای از جنس شیشه‌ای تخلیه می‌کنند. زهر در مجاورت هوا سریعاً خشک می‌شود. زهر خشک شده هر روز به‌کمک کاردک‌های مخصوص از روی صفحات شیشه‌ای جمع‌آوری و برای استفاده بعدی در شیشه‌های تیره رنگ در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. زهرگیری به‌مدت ۱۰ روز به طول انجامید. به‌هنگام استفاده برای حذف موکوس و مواد اضافه، سم به‌نسبت ۱ به ۱ با محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دور بالا سانتریفیوژ می‌گردد. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شده و به لوله جدیدی منتقل می‌گردد.

پروتئین سنجی

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، به‌روش پروتئین سنجی برادفورد و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد (Bradford, 1976). جذب نوری تمام لوله‌ها پس از کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با محلول شاهد در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد تهیه گردید. در نهایت غلظت پروتئین مجهول با استفاده از جذبی که در محدوده جذب پروتئین استاندارد قرار دارد، طبق معادله خط نمودار محاسبه گردید (Greenfield, 2018).

تعیین متوسط دوز کشندگی[1]

جهت تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) زهر خام از موش سوری نر با وزن ۲ ± ۲۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به گروه‌های ۴ تایی تقسیم شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر از دوزهای مختلف زهر (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محلول در نرمال سالین استریل به‌صورت داخل وریدی به آنها تزریق شد. به موش‌های شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی تزریق شد. مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت ثبت شد و LD50 بر اساس آنالیز پروبیت (Finney, 1971) توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید.

LD50 یک سم به‌عنوان حداقل مقدار سمی که باعث مرگ در ۵۰ درصد از موش‌های تزریق شده تعریف می‌شود. برای یافتن میزان سم زنبور مورد نیاز برای تزریق به اسب همین عدد با در نظر گرفتن میزان وزن اسب مورد محاسبه قرار گرفت.

ایمن‌سازی اسب‌ها

در این پژوهش از ۳ اسب مادیان بالغ ۳ ساله (۴۰۰ تا ۴۵۰ کیلوگرم) استفاده گردید. برای ایمن‌سازی اسب‌ها زهر زنبور به‌همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) تزریق گردید. در تلقیح اول و دوم از ادجوانت فروند کامل و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. تلقیح سم به‌صورت افزایشی به‌ترتیب از ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در طی ۷ مرتبه با فواصل زمانی ۷ روز اجرا شد (جدول ۱). تزریق به‌صورت زیر پوستی (گردن) انجام شد.

خونگیری از هر اسب (۳ تا ۵ میلی‌لیتر) با استفاده از سوزن گیج ۱۸ و سرنگی با حجم ۵ میلی‌لیتر انجام شد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده بلافاصله در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و جهت جداسازی سرم برای تست الایزا به آزمایشگاه منتقل شدند.

خونگیری نهایی دو هفته پس از تزریقات انجام شد. خونگیری سه بار با فواصل سه روزه انجام شد. در هر بار خونگیری ۵ لیتر خون از رگ وداج گردنی با استفاده از کیسه‌های یکبار مصرف ۵ لیتری مخصوص جمع‌آوری خون حاوی سیترات سدیم انجام شد.

جدول ۱- برنامه ایمن سازی و دوز سم زنبور عسل

Table 1. Immunization schedule and honey bee venom doses

ادجوانت Adjuvant	میزان زهر تزریقی (میکروگرم) Venom (mg)	روز Day
فروند کامل (Complete Freund's adjuvant)	50	0
فروند کامل (Complete Freund's adjuvant)	100	7
فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)	250	14
فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)	500	21
فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)	1000	28
فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)	2000	35
فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant)	4000	42

جداسازی آنتی‌بادی اسب

جداسازی آنتی بادی اسب با پروتکل استاندارد روش آمونیوم سولفات اشباع شده انجام شد (Grodzki & Berenstein, 2010).

ارزیابی پاسخ ایمنی

از نمونه‌های خون که هر هفته قبل از ایمن سازی اسب‌ها تهیه شده است سرم گرفته شد و میزان تیتر آنتی‌بادی با استفاده از تست الایزا اندازه‌گیری شد. در این روش ۵۰ میکرولیتر زهر زنبور با غلظت‌های مختلف (۲ تا ۱۶ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (کربنات سدیم-بی کربنات سدیم)) در ته پلیت الایزا قرار گرفت و با کمک BSA عمل بلاکینگ انجام شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌ها ، سرم در رقت‌های بین ۱/۵۰ تا ۱/۲۵۰ برای مشخص شدن بهترین رقت به چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از HRP Conjugated protein A/G (رهازیست پادتن، ایران) با رقت ۱/۵۰۰ اضافه شده و به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد و بعد ۱۰۰ میکرولیتر TMB اضافه شده و در جای تاریک نگهداری می‌کنیم و واکنش توسط اسید کلریدریک متوقف گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

برای اطمینان از اینکه در روش آمونیوم سولفات اشباع شده به‌درستی آنتی‌بادی‌ها را جداسازی نموده است، ۵۰ میکرولیتر

1- Median lethal dose

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

زهر زنبور با غلظت‌های مختلف (۵ ، ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (کربنات سدیم-بی‌کربنات سدیم)) در ته پلیت الایزا قرار گرفت و با کمک BSA عمل بلاکینگ انجام شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌ها، پادزهر در رقت‌های بین ۱/۱۰۰ ، ۱/۲۰۰ ، ۵۰۰ /۱ و ۱/۱۰۰۰ برای مشخص شدن بهترین رقت به چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از HRP Conjugated protein A/G (رهازیست پادتن، ایران) با رقت ۱/۵۰۰ اضافه شده و به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد و بعد ۱۰۰ میکرولیتر TMB [1] اضافه شده و در جای تاریک نگهداری می‌کنیم و واکنش توسط اسید کلریدریک متوقف گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 و خنثی‌سازی آن با پادزهر

از روش مارینتی و همکاران جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 زهر خام استفاده شد (Marinetti, 1965). برای تهیه سوسپانسیون ذخیره، یک زرده تخم‌مرغ در سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد سدیم کلراید) حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. زرده تخم‌مرغ به‌عنوان منبع لسیتین استفاده می‌شود. سوسپانسیون کار برای اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز با رقیق‌سازی (تهیه رقت ۱۰) این سوسپانسیون در سدیم کلراید ۰/۹ درصد فراهم می‌شود. به ۰/۱ میلی‌لیتر از زهر با غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون زرده تخم‌مرغ اضافه کرده (در لوله شاهد فقط ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون زرده تخم‌مرغ می‌ریزیم) و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۹۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر مدل M501 Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotomete خوانده شد (Nazari et al., 2023).

اختلاف جذب لوله شاهد با نمونه‌ها عبارت است از مقادیر فسفولیپاز زهر. هر ۱ درصد اختلاف جذب مربوط به یک واحد در هر میلی‌گرم می‌باشد.

(جذب نمونه – جذب = فسفولیپاز (برحسب واحد در میلی‌گرم) ۱۰۰۰* شاهد)

هر واحد (U) عبارت است از مقادیری از آنزیم که بتواند ۱ درصد کاهش در جذب سوسپانسیون زرده تخم مرغ بوجود آورد. برای بررسی توانایی پادزهر در خنثی‌کردن این فعالیت، روش انکوباسیون سم و پادزهر به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قبل از آزمایش تکرار شد. زهر (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با پادزهر به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قبل از افزودن سوبسترا مخلوط شد و میزان جذب نوری در ۹۲۵ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد.

تعیین متوسط دوز موثر [2] (ED50)

برای بررسی قدرت خنثی سازی زهر توسط آنتی‌سرم از ۱۵ موش سوری نر با وزن ۲ ± ۱۶ گرم استفاده شد. ابتدا جهت فعال‌سازی سم، ۱۰ میلی‌گرم سم در یک میلی‌لیتر محلول سالین (سرم فیزیولوژی) حل شده و با دور بالا سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جدا و با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شده و به لوله جدیدی منتقل گردید. سپس مقادیر ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بالا را که حاوی ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروگرم سم که در واقع ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ برابر LD50 است را برداشته و حجم آن به ۱ سی‌سی رسانده شد. به همه رقت‌های بالا ۱ سی‌سی آنتی‌ونوم (پادزهر) اضافه کرده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید. در نهایت از هر رقت ۰/۵ سی‌سی به هر موش در گروه‌های ۵ تایی به‌صورت داخل وریدی تزریق شد و تا یک هفته از نظر علایم و مرگ و میر بررسی شدند. در نهایت میزان متوسط دوز موثر بر اساس آنالیز پروبیت (Finney, 1971.) توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید.

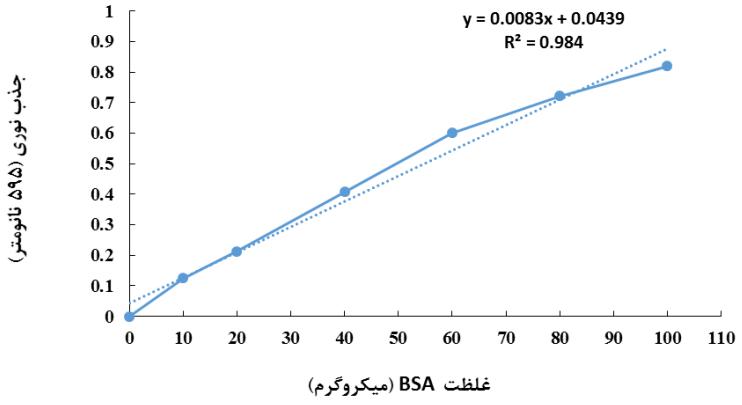
نتایج و بحث

پروتئین زهر خام

با ترسیم مقادیر استاندارد علیه عدد جذب آنها منحنی استاندارد به‌صورت شکل ۱ به‌دست آمد. بعد از ترسیم نمودار، برازش خطی (Trendline) ، معادله خط و ضریب رگرسیون را نیز بر روی نمودار به‌دست آمد. برای محاسبه غلظت محلول پروتئینی مجهول به‌کمک منحنی استاندارد، عدد جذب نمونه پروتئینی را به‌جایy قرار داده و مقدار x را مشخص کردیم. مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام ۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. محققین مقدار پروتئین زهر خام زنبور عسل *Apis mellifera lamarckii* مصری را ۴۷/۲ میلی‌گرم گزارش نمودند (Darwish *et al.*, 2021). البته محققین دیگر مقدار پروتئین زهر خام در همین زنبور ۲۷/۲ میلی‌گرم گزارش کردند (Abdel-Monsef *et al.*, 2020). زهر خام خشک شده زنبور عسل شامل ۵۵ درصد پپتیدها ، ۱۷ درصد آنزیم، ۳ درصد آمین‌های بیوژنیک و ۲۵ درصد ترکیبات غیر پروتئینی است (El Mehdi *et al.*, 2022). هرمقدار که عدد میزان پروتئین بزرگتر باشد نشان دهنده کیفیت بالای زهر می‌باشد. گراف و همکاران متوسط پروتئین زهر خام را ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده است (De Graaf *et al.*, 2020). بنابراین میزان پروتئین ۵۶ میلی‌گرم زهر خام زنبور عسل نشان‌دهنده تازه بودن و با کیفیت بودن زهر خام استفاده شده در این تحقیق است.

1- 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB)
2- Median effective dose

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]



شکل ۱- منحنی استاندارد حاصل از سنجش غلظت‌های مختلف محلول استاندارد BSA
Figure 1. The standard curve obtained from measuring different concentrations of BSA standard solution

میزان متوسط دوز کشندگی

برای تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) زهر خام زنبور عسل ایرانی ابتدا بر اساس اطلاعات گذشته و محاسبات صورت گرفته دوزهای ۱۲۰ و ۱۳۰ و ۱۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند که سبب مرگ همه موش‌ها شد. در مرحله بعد دوزهای پایین تر یعنی ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد توجه قرار گرفتند. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. براساس داده‌های ارائه شده در جدول ۲ میزان LD50 به‌ازای موش ۹۶/۸۷ میکروگرم به‌دست آمد. چون وزن موش‌ها تقریباً ۲۰ گرمی بود پس LD50 برای هر گرم موش تقریباً ۴/۸۴ میکروگرم محاسبه شد. مقدار LD50 محاسبه شده برای هر سم در هر تحقیقی متفاوت است که بستگی به نوع سم و میزبان تزریق شده متفاوت است. نتایج این تحقیق با نتایج ذوالفقاریان و همکاران تفاوت اندکی دارد (Zolfagharian *et al.*, 2016). آنها میزان LD50 برای زنبور عسل ایرانی را ۱۷۷/۸ میکروگرم (برای موش ۲۰ گرمی) گزارش نمودند. با تبدیل آن برای هر گرم موش ۸/۸ میلی‌گرم می‌شود. احتمالاً علت این امر پایین بودن کیفیت سم می‌باشد. این محققین میزان پروتئین زهر خام را ۳/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده بودند که نشان از کیفیت پایین سم دارد. سانتوز و همکاران میزان LD50 زهر زنبور افریقایی را ۴/۲ میکروگرم برای هر گرم موش بدست اوردند (Santos *et al.*, 2013). جونز و همکاران میزان LD50 را برای زهر زنبور آفریقایی ۳/۱ میکروگرم برای هر گرم موش گزارش کردند (Jones *et al.*, 1999).

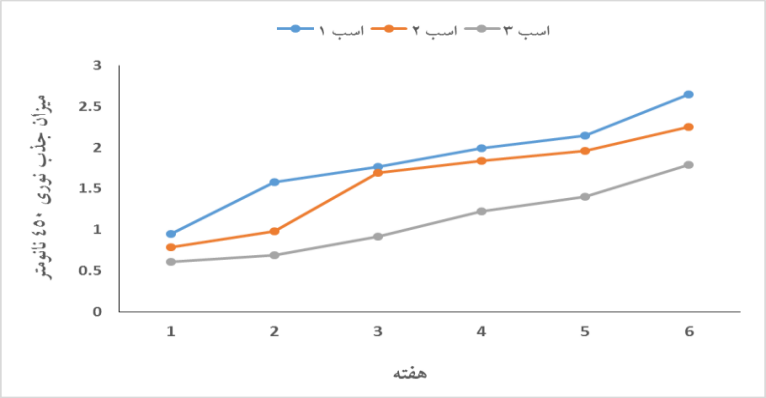
جدول ۲- کشندگی زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در موش سوری و تعیین LD50 با تجزیه و تحلیل پروبیت
Table 2. Lethality of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) venom in mice and determining LD50 by Probit analysis

گروه Group	دوز (میکرو گرم) Dose (µg)	Log Dose	تعداد موش‌ها Total number of mice	تعداد موش تلف شده Deaths in groups of mice
1	60	1.778	4	0
2	70	1.845	4	0
3	80	1.903	4	0
4	90	1.954	4	1
5	100	2.000	4	2
6	110	2.041	4	4

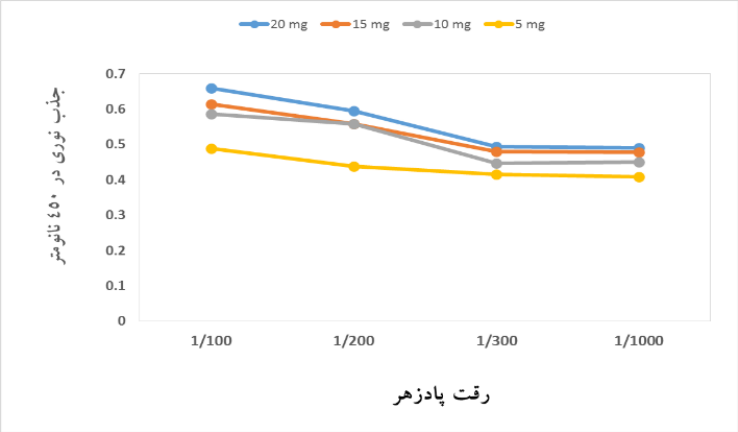
تیتراسیون آنتی بادی

پیش از هر بار تزریق زهر زنبور عسل از ورید وداج گردنی اسب‌ها خون گیری شد و سرم آنها جدا گردیده و سرم‌ها تا زمان انجام تست الایزا در فریزر ۷۰- نگهداری شدند. پس از آخرین تزریق، سرم‌ها از فریزر خارج شده و میزان تیتر آنتی‌بادی آن‌ها با تست الایزا انجام گرفت. غلظت‌های مختلف زهر و رقت‌های مختلف سرم مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که غلظت زهر زنبور ۱۵ میکروگرم و سرم با رقت ۱/۵۰ مناسب ترین است. روند پاسخ اسب‌ها نسبت به زهر افزایشی بوده و به خوبی با آنتی‌ژن ایمن شده‌اند (شکل ۲). نتایج نشان دهنده این است که با گذشت زمان اسب‌ها نسبت به زهر ایمن شده و آنتی‌بادی بیشتری تولید می‌کنند. چنین روندی در گزارشات بسیاری مشاهده شده است (Behdani *et al.*, 2010; Ismael *et al.*, 2018). برای اطمینان از اینکه در روش آمونیوم سولفات اشباع شده به‌درستی آنتی‌بادی‌ها را جداسازی نموده است واکنش پادزهر و زهر به‌روش تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. خنثی‌سازی غلظت‌های مختلف زهر توسط رقت‌های مختلف پادزهر در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است با کاهش رقت پادزهر جذب نوری کاهش می‌یابد. نتایج خوانش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر نشان دادند که میزان تولید آنتی‌بادی با افزایش رقت زهر کاهش یافته است. نتایج نشان‌دهنده حضور آنتی‌بادی است که با رقیق شدن واکنش آن‌ها با آنتی‌ژن (سم زنبور) کمتر می‌شود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]



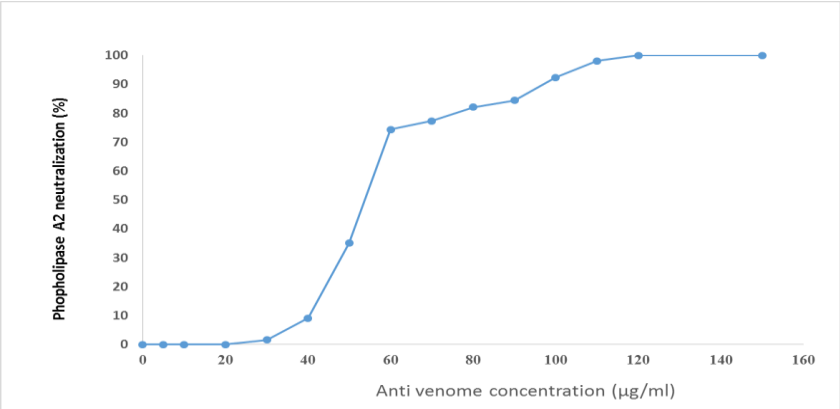
شکل ۲- پاسخ آنتی‌بادی در ۳ اسب در طول برنامه ایمن‌سازی با تست الایزا
Figure 2. Antibody response in three horses during immunization schedule by ELISA test.



شکل ۳- خنثی‌سازی غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل (۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰ میلیگرم) توسط رقت‌های مختلف پادهر با تست الایزا
Figure 3. Neutralization of different concentrations (5, 10, 15, and 20 mg) of honey bee venom with different dilutions of antivenom by ELISA test.

خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز زهر توسط پادزهر

خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از غلظت‌های مختلف پادزهر (شکل ۴) نشان داد که ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این پادزهر قادر به خنثی‌کردن کامل فعالیت سم فسفولیپاز A2 است. از این داده‌ها مشخص است که اولا سم زنبور عسل ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی است و دوما ۵۵ میکروگرم پادزهر برای خنثی‌کردن ۵۰ درصدی فعالیت فسفولیپاز A2 در ۱۰۰ میکروگرم زهر مورد نیاز است. جونز و همکاران با تولید پادزهر علیه زهر آفریقایی نشان دادند که برای خنثی‌سازی ۵۰ درصدی فعالیت فسفولیپاز A2 زهر زنبور آفریقایی حدود ۱۶ میلی‌گرم از این پادزهر مورد نیاز است (Jones et al., 1999). این نتایج نشاندهنده این است که پادزهر تولید شده در این تحقیق در مقدار کمتری می‌تواند زهر را خنثی کند و از قدرت بالایی برخوردار است.



شکل ۴- خنثی‌سازی فعالیت فسفولیپاز زهر زنبور عسل در غلظت‌های مختلف پادزهر
Figure 4. Neutralization of bee venom phospholipase activity in different antivenom concentrations

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]
[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

متوسط دوز موثر (ED50)

برای تعیین کارآیی پادزهر اسبی تهیه شده، زهر زنبور به‌صورت دوز افزایشی با مقدار ثابت پادزهر مخلوط و به موش تزریق شد. نتایج در جدول ۳ ارائه شده است. مقدار ED50 تقریبا ۵۴ برابر LD50 خواهد شد. این بدان معنی است که پادزهر تا ۵۴ برابر LD50 را می‌تواند خنثی کند. بنابراین مرگ ایجاد شده بوسیله ۴ میلی‌گرم سم زنبور با ۱ میلی‌لیتر پادزهر خنثی می‌شود به‌همین دلیل میزان متوسط دوز موثر ED50 برابر با ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواهد بود. اگر در هر بار نیش زنبور مقدار ۱۰۰ میکروگرم زهر وارد بدن شود پس ۱ میلی‌لیتر از این پادزهر می‌تواند ۴۰ نیش زنبور را خنثی کند. اگر میزان متوسط کشندگی زهر زنبور برای انسان ۲/۸ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم باشد برای فرد ۶۰ کیلوگرمی حدود ۱۶۸ میلی‌گرم می‌شود (Marinho & Soto-Blanco, 2020) که با ۱۶۸۰ بار گزش زنبور ایجاد می‌شود. تقریبا ۴۲ میلی‌لیتر از پادزهر تولید شده در این تحقیق می‌تواند این فرد را از مرگ نجات دهد. این نتایج نشان از کیفیت بالای پادزهر تهیه شده داشت. جونز و همکاران میزان ED50 برای پادزهر تولید شده در برابر زهر زنبور افریقایی را ۲۵۸ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم تقریبا ۵ برابر LD50 گزارش نمود (Jones *et al.*, 1999). تقریبا ۲۰ میلی‌گرم آنتی‌ونوم برای خنثی‌سازی هر میلی‌گرم زهر مورد نیاز بود. سانتوز و همکاران میزان ED50 برای پادزهر تولید شده در برابر زهر زنبور افریقایی را ۱/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند (Santos *et al.*, 2013). این بدین معنی بود که مقدار لازم پادزهر برای خنثی‌سازی ۱۰۰۰ تا نیش زنبور آفریقایی (حاوی ۱۰۰ میکروگرم سم در هر نیش) که منجر به مرگ یک مرد ۷۰ کیلوگرمی می‌شود برابر با ۹۰ میلی‌لیتر خواهد بود. با این حال، دوز مورد استفاده در موارد بالینی انسانی باید در یک کارآزمایی بالینی تعیین دوز تعیین شود.

جدول ۳- ظرفیت خنثی‌سازی پادزهر تهیه شده علیه سم زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در موش سوری و تعیین ED50 با آنالیز پروبیت

Table 3. Neutralization capacity of prepared antivenom against Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) venom in mice and determining ED50 by Probit analysis

گروه Group	دوز (میلی‌گرم) Dose (mg)	Log Dose Log Dose	تعداد کل موش‌ها Total number of mice	تعداد تلفات Deaths in groups of mice
1	2	0.301	3	0
2	3	0.477	3	0
3	4	0.602	3	1
4	5	0.699	3	2
5	6	0.778	3	3

نتایج نشان‌دهنده کارایی بالای پادزهر تولید شده است. در دهه‌های گذشته چندین پادزهر برای زنبور گزیدگی گزارش شده است (Barbosa *et al.*, 2017; *Jones et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 1996). اما در حال حاضر پادزهر (آنتی‌ونوم) مشخصی برای زنبور گزیدگی در ایران و افراد حساس به نیش زنبور (که با نیش زنبور دچار آنافیلاکسی شدید می‌شوند) وجود ندارد و درمان تا حدودی توسط داروهای شیمیایی انجام می‌شود. ما در این پژوهش برای اولین بار در ایران آنتی ونوم ضد سم زنبور با منشأ اسبی تولید نمودیم و نشان دادیم که این آنتی ونوم قادر است زهر زنبور عسل را خنثی نماید. در این پژوهش نشان داده شد که اسب توسط سم زنبور ایمن می‌شود و قادر است تیترهای بالایی از آنتی سرم را ایجاد نماید. در این تحقیق از روش آمونیوم سولفات اشباع که یک روش متداول در جداسازی آنتی‌بادی‌ها می‌باشد، و به‌عنوان یکی از روش‌های مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها برای مصارف درمانی می‌باشد، آنتی‌بادی‌های مورد نظر جدا شدند و در آزمایش خنثی سازی از تلف‌شدن مو ش‌ها جلوگیری نمود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق ما نشان داد که آنتی ونوم اسبی که بر علیه سم زنبور عسل ایرانی به‌دست آمد، در مدل حیوانی قادر به خنثی‌سازی سم بوده و از مرگ موش‌هایی که با سم تلقیح شده بودند جلوگیری می‌نماید.

References

Abdel-Monsef, M. M., Zidan, H. Darwish, D. A. Masoud, H. M. Helmy, M. S. & Ibrahim, M. A. (2020). Biochemical Isolation and Characterization of Hyaluronidase Enzyme from Venom of Egyptian Honey Bee Apis Mellifera Lamarckii. *Journal of Apicultural Science*, *64*(1), 153-164.

Alia, O., Laila, M. & Antonios, A. (2013). Antimicrobial effect of melittin isolated from Syrian honeybee (Apis mellifera) venom and its wound healing potential. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *21*, 318-324.

Barbosa, A.N., Boyer, L., Chippaux, J.P., Medolago, N. B., Caramori, C. A., Paixão, A. G., Vasconcelos Poli, J. P., Mendes, L. B., Santos, L. D., Ferreira, R. S., Barraviera, B. (2017). A clinical trial protocol to treat massive Africanized honeybee (Apis mellifera) attack with a new apilic antivenom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, *23*, 14.

Behdani, M., Hosseinineiad chafi, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, S. H., Ghasemi, P., Asadzadeh, N., Ghamnak, A., Pooshang Bagheri, K., Ahari, H., & Shahbazzadeh, D. (2010). Antiserum production in immunized camel by the venom of Hemiscorpius lepturus scorpion: evaluation of neutralizing test in vivo. *Tehran University Medical Journal*, *68*(5), 268-273 (In Persian).

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248-54.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]

[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]

Czarnetzki, B. M., Thiele, T. & Rosenbach, T. (1990). Evidence for leukotrienes in animal venoms. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 85*(2), 505–509.

De Graaf, D. C., Brochetto Braga, M. R., de Abreu, R. M. M., Blank, S., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., Devreese, B., Ebo, D. G., Ferris, T. J., Hagendorens, M. M., & Justo Jacomini, D. L. (2020). Standard methods for Apis mellifera venom research. *Journal of Apicultural Research, 60*(4), 1-31.

Darwish, D.A., Masoud, H.M.M., Abdel-Monsef, M.M., Helmy, M.S., Zidan, H.A., & Ibrahim, M.A. (2021). Phospholipase A2 enzyme from the venom of Egyptian honey bee Apis mellifera lamarckii with anti-platelet aggregation and anti-coagulation activities. *J Genet Eng Biotechnol, 19*(1), 10.

El Mehdi, I., Falcão, S.I., Boujraf, S., Mustapha, H., Campos, M.G., & Vilas-Boas, M. (2022). Analytical methods for honeybee venom characterization. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research, 13*, 154-60.

Finney, D. J. (1971). Probit analysis. 3d Ed. Cambridge University Press.

Ghabili, K., Shoja, M.M., & Parvizi, M. (2009). Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med Hypotheses, 73*(3), 459-60.

Greenfield, E.A. (2018). Protein Quantitation. Cold Spring Harbor Protocols. pdb. prot098202.

Grodzki, A.C., & Berenstein, E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in Molecular Biology, 588*, 15-26.

Hall, J. E. (2010). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (Guyton Physiology). Saunders Publisher. 12th edition.

Ismael, B.N., Abass, K.S., Khalil, K.A., & Salih K.A. (2018). Preparation of F $(ab')_2$ antivenom in Iraq against scorpion (Hottentotta saulcyi) venom. *Biologicals, 56*, 19-23.

Jones, R.G., Corteling, R.L., Bhogal, G., & Landon, J. (1999). A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61*(3), 361-6.

Lima, P.R. & Brochetto-Braga, M.R. (2003). Hymenoptera venom review focusing on Apis mellifera. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 9*, 149-162.

Marinetti, G. V. (1965). The action of phospholipase A2 on lipoproteins. *Biochem Biophys Acta, 98*, 554-6.

Marinho, J.B.R., & Soto-Blanco, B. (2020). Toxicological Risk Assessment of the Accidental Ingestion of a Honeybee (*Apis mellifera L.*) Present in Food. *Front in Veterinary Science, 7*, 583286.

Mohamadi ahvazi, Gh., Nazari, M., Mohamadabadi, M.R., & Heidari, R. (2019). Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. *Mod Genet J, 14*(3), 211-219 (In Persian).

Morammazi, S., & Mirhosseini, M.A. (2020). Expression of HSP90 Gene and its Relationship with Ambient Temperature and Foraging Rate in Apis Mellifera Meda. *Agricultural Biotechnology Journal, 12* (4), 185-205 (In Persian).

Nazari, M., Roshanfekr, H. & Salabi, F. (2023). Isolation, characterization, and biological activity of Phospholipase A2 (PLA2) and Hyaluronidase from Iranian honey bee venom (Apis Mellifera meda). *Agricultural Biotechnology Journal, 15* (2), 1-22 (In Persian).

Norooz Valashedi, R., & Bahrami Pichaghchi, H. (2022). Investigating the Effect of Climate Indices on the Number of Beehives in the Last Six Climatic Decades. *Research on animal production, 13* (37), 187-195 (In Persian).

Pattabhiramaiah, M., Ramesh, K., Vishwanath, K.V., & Reddy, S. (2020). Computational analysis of PhospholipaseA2 in the honey bee venom. *Journal of Apicultural Research, 59*(4), 706-721.

Rohipoor, M., Nazari, M., & Beigi Nassiri, M.T. (2019). Genetic and Phylogenetic Analysis of Adani Goat Population Based on Cytochrome B Gene. *Research on animal production, 10* (26), 84-89 (In Persian).

Rohipoor, M., Nazari, M., & Beigi nassiri, M.T. (2021) Population structure, Genetic diversity and phylogenetic analysis of control region of mtDNA in Adani goat breed. *Mod Genet J, 15*(4), 297-304 (In Persian).

Santos, K. S., Stephano, M. A., Marcelino, J. R., Resende Ferreira, V. M., Rocha, T., Caricati, C., Higashi, H. G., Moro, A. M., Kalil, J. E., Malaspina, O., Morato Castro, F. F., & Palma, M. S. (2013) Production of the First Effective Hyper Immune Equine Serum Anti venom against Africanized Bees. *PLoS ONE, 8*(11), e79971.

Schumacher, M.J., Egen, N.B., & Tanner, D. (1996). Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 55*, 197- 201.

Winston, M. L. (1991). The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press; Cambridge. London. 4th Edition

Zolfagharian, H., Mohajeri, M., Babaie, M., Mosavari, N., & Javadi, I. (2016). Investigation of the Antibacterial Effect of Crude Venom of Honey Bee (Apis mellifera) and its Fractions by Disk Diffusion Method. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 114*, 117-126 (In Persian).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-24]

[DOI: 10.61186/rap.15.43.86]