مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

حفاظت رادیوبیولوژیکی کروموزوم های انسانی با استفاده از سم زنبور عسل

*سید کمال الدین شفائی، امیر رضا جلیلیان، فرحناز معتمدی سده، بهنام ناصریان، حامد عسکری، مصطفی غفوری، داریوش فخاری ، نرگس نشان

پژوهشکده کشاورزی هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده: به منظور انجام این پژوهش از ۴۰ نفر از افراد سالم که سیگاری نبوده و سن آن‌ها بین ۴۰-۲۰ بوده خون‌گیری بعمل آمد و در محیط کشت، کشت داده شدند. خون هپارینه را به پنج قسمت (۵ تیمار) تقسیم نموده، قسمت اول بدون پرتودهی و بدون زهر زنبور به عنوان شاهد کشت داده شد، قسمت دوم نمونه‌ها بدون زهر زنبور، پرتودهی شده، قسمت سوم ۶ ساعت قبل از پرتودهی نمونه، زهر زنبور اضافه کرده و قسمتی نیز چند ساعت بعد از پرتودهی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف، زهر زنبور اضافه شده تمام نمونه‌ها با دزهای ۰،۱،۲،۳ گری پرتودهی و کشت داده شدند. قسمت پنجم، به نمونه‌ها همزمان با پرتودهی، زهر زنبور اضافه کرده و کشت داده شدند. و از هر نمونه ۵۰ متافاز مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت و آزمایشات براساس طرح کاملاً تصادفی و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن صورت گرفت. نتایج نشان می‌دهد تزریق زهر زنبور عسل با غلظت ۰/۰۰۰۱۵ میکرولیتر بر میلی لیتر، ۶ ساعت قبل از پرتودهی نمونه‌ها، می‌تواند کمترین میزان ناهنجاری‌ها را باعث شود که ناشی از اثر حفاظتی زهر زنبور عسل در برابر اثرات مخرب پرتو گاما می‌باشد.

واژگان کلیدی: زهرزنبورعسل، پرتودهی، لنفوسیت‌های انسانی

Radiobiological protection on human cells by bee venom

S.k. Shafaie, A. Jajijeyan, F. Motamedi, B. Naseryan, H. Askari, M. Ghafori, D. Fakhari, N. Neshan.

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI)

Abstract: To carry out this study of 40 healthy subjects who were smokers, Blood samples were taken between the ages of 40-20 and in the culture medium, were cultured. Heparinized blood to five (5 treatments) is divided, as the First, no radiation and no controls were cultured as bee venom, bee venom sample without the second part, irradiated, Part 6 hours before irradiation, for example, part of the bee venom was added and the samples were irradiated at different times after a few hours,, bee venom was added to all samples with doses of 0,1,2,3 Gy and were cultured, the samples were irradiated at the same time, bee venom was added and cultured. From each sample, 50 metaphases were studied and tested according to a completely randomized design and statistical analysis using SPSS and statistical comparison was done by Duncan. Results show that bee venom injection concentration 0.00015 mL, 6 hours before irradiation the samples, would cause the least amount of abnormalities caused by the protective effect of bee venom against the damaging effects of gamma radiation would-be

Keywords: Bee venom, Irradiation, Human lymphocytes.

مقدمه

با توجه به تحقیقات انجام شده در بسیاری از کشورها مشاهده شده است که زهر زنبور عسل یک حفاظت کنندهٔ بسیار مؤثر است که در برابر پرتوها یونساز می‌تواند از بوجود آمدن ناهنجاری‌های کروموزومی (مخصوصاً دی سنتریک) در لنفوسیت خون انسان جلوگیری کند. ناهنجاری‌های یاد شده، می‌تواند به صورت شکست تک زنجیری و یا شکست دو زنجیره در ساختمان DNA ظاهر شود که این به عنوان یکی از معرف های دزیمتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. عواقب این تغییرات ممکن است به صورت سرطان‌های مختلف بروز کند. اثر حفاظتی زهر زنبور عسل در کشورهای مختلف بر روی بیماری‌ها و آلرژی در برابر پرتو بررسی شده است(۵ و۶). مطالعات زیادی در خصوص تأثیر رادیو پروتکتیوی زهر زنبور عسل به خصوص ترکیبات آن، ملیتین و هیستامین از اجزاء اصلی تشکیل دهنده این زهر را به ما نشان می‌دهند. رادیو پروتکتیوی زهر زنبور عسل با درگیر شدن، سیستم خون سازی بدن را تحریک کرده و هیستامین آزاد شده باعث کاهش تنش اکسیژن و در نتیجه به حفاظت پرتوئی زهر زنبور کمک می‌کند [۱،۲،۳،۴]. در برزیل اثر حفاظتی زهر زنبور عسل بر روی لنفوسیت‌های خون انسان در مقابل پرتو [۱۴و۱۵] و همچنین در آمریکا و چین اثر حفاظتی زهر و موم زنبور عسل بر روی موش‌های آزمایشگاهی پرتو دیده مورد مطالعه قرار گرفته است [۹ و۱۰]. در کشور ما هیچگونه تحقیقاتی در زمینهٔ اثر حفاظتی زهر زنبور عسل بر روی لنفوسیت‌های خون انسان صورت نگرفته است، لذا نتیجهٔ این پروژه که برای اولین بار در ایران صورت می‌گیرد، می‌تواند برای افراد پرتوکار بسیار مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

زهر زنبور عسل به صورت لیو فیلیزه و استریل از موئسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و به مقدار ۱ میلی‌گرم در یک لیتر آب مقطر حل کرده و سپس با غلظت ۰/۰۰۰۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر به محیط کشت اضافه گردید [۷و۸]. برای جلوگیری از انعقاد خون از هپارین استفاده گردید. برای خون‌گیری، ۴۰ نفر از افراد سالم که سیگاری نبوده و سن آن‌ها بین ۴۰-۲۰ بوده و هم چنین افراد خون دهنده نباید تحت پرتو درمانی و شیمی درمانی قرار گرفته باشند، منظور گردید [۱۲و۱۱]. یک میلی‌لیتر ازخون هپارینه به لوله‌های آزمایش که حاوی ۸۰ درصد محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) همراه با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله ، ۴ درصد فیتو هم آگلوتینین (PHA)، آنتی بیوتیک (استرپتومایسین، پنی سیلین) و گلوتامین می‌باشد، افزوده شد. محیط کشت به دو قسمت تقسیم شد، قسمت اول با زهر زنبور و قسمت دوم بدون زهر زنبور کشت داده شدند [۲۶ و ۲۷]. خون هپارینه را به پنج قسمت (۵ تیمار) تقسیم نموده، قسمت اول بدون پرتودهی و بدون زهر زنبور به عنوان شاهد کشت داده شد، قسمت دوم نمونه‌ها بدون زهر زنبور پرتودهی شد، قسمت سوم ۶ ساعت قبل از پرتودهی نمونه زهر زنبور اضافه شد و قسمت چهارم نیز بعد از پرتودهی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف، زهر زنبور اضافه کرده و سپس بوسیلهٔ دستگاه پرتودهی کبالت ۶۰ پیکر V9 با اکتیویتهٔ حدود ۲۰۰۰ کوری از فاصلهٔ یک متری با دزهای ۰، ۱، ۲ و ۳ گری پرتودهی و کشت داده

شدند. به قسمت پنجم نمونه‌ها همزمان با پرتودهی، زهر زنبور اضافه و کشت داده شد. تمام نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. تعداد نمونه‌های خون زن و مرد یکسان بود. پس از ۷۰ ساعت به همهٔ نمونه ها ۵۰-۲۵ میکرولیتر کلشی‌سین اضافه کرده و به مدت دو ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول بالائی نمونه‌ها را بیرون ریخته و به باقیمانده ml ۵ محلول KCl اضافه کرده و دو باره با KCl نرمال شستشو داده، و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. دو بار از فیکساتیو ۱ : ۳ (۳ متانول :۱ اسید استیک) استفاده کرده و پس از سانتریفوژ به مدت ۷ دقیقه و با دور rpm ۱۶۰۰ نمونه‌ها تثبیت شدند. نمونه‌ها را بر روی لام فیکس نموده با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۱۰ دقیقه لام‌ها در محلول گیمسا قرار گرفته به روش Banding - G رنگ آمیزی و از هر نمونه ۵۰ متافاز مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت [۱۶و۱۷]. کلیه آزمایشات براساس طرح کاملاً تصادفی و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح آماری(۰/۰۵ $p\leq$) صورت گرفت.

نتایج

با توجه به جدول ۱ تغییرات ناهنجاری‌های کروموزومی (دی سنتریک، حلقوی و ناهنجاری) به عنوان تابعی از تغییرات دز پرتوتابی (۳، ۲، ۱، ۰) گری در بین تیمارهای مختلف (بدون تزریق سم، تزریق سم ۶ ساعت قبل از پرتوتابی، تزریق سم همزمان با پرتوتابی و تزریق سم بعد از پرتوتابی) را نشان می‌دهد. نمونه‌های آزمایش فاقد سم زنبور عسل بواسطه افزایش دز پرتوتابی منجر به افزایش دی سنتریک، حلقوی و ناهنجاری در آنها گردیده است که به علت عدم وجود سم زنبور عسل در نمونه‌ها و عدم حضور ترکیب محافظ جهت جلوگیری از اثرات مخرب پرتو، میزان این تغییرات در بین تیمارهای مختلف بالاترین را دارا بوده است که با توجه به زمان تزریق سم به نمونه‌ها، ۶ ساعت قبل از پرتودهی نمونه‌ها، کمترین میزان ناهنجاری‌ها را باعث شد که ناشی از اثر حفاظتی زهر زنبور عسل در برابر اثرات مخرب پرتو گاما می‌باشد.

جدول۱- تفاوت تیمارها و دز های مختلف و مقایسه آن‌ها با یکدیگر

	دز	تیمارها			
		Non-Toxin	6 h Before	Same time	After 6 h
دی سنتریک	۰	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰$^{A}_{a}$
	۱	۲/۲۰$^{B}_{c}$	۰/۳۰$^{B}_{a}$	۱/۴۷$^{B}_{b}$	۱/۵۲$^{B}_{b}$
	۲	۴/۶۷$^{C}_{d}$	۲/۰۰$^{C}_{a}$	۳/۴۵$^{C}_{b}$	۴/۰۰$^{c}_{c}$
	۳	۸/۶۵$^{D}_{b}$	۴/۱۷$^{D}_{a}$	۷/۸۷$^{D}_{b}$	۸/۰۶$^{D}_{b}$
حلقه	۰	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$
	۱	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۲$^{A}_{a}$
	۲	۰/۳۲$^{B}_{b}$	۰/۰۵$^{A}_{a}$	۰/۲۷$^{B}_{b}$	۰/۲۷$^{B}_{b}$
	۳	۱/۲۵$^{C}_{c}$	۰/۱۷$^{B}_{a}$	۰/۷۷$^{C}_{b}$	۰/۹۵$^{C}_{b}$
ناهنجاری	۰	۰/۰۰$^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$	۰/۰۰ $^{A}_{a}$
	۱	۰/۹۷$^{B}_{a}$	۰/۶۰$^{B}_{a}$	۰/۹۲$^{B}_{a}$	۱/۰۵$^{B}_{a}$
	۲	۲/۲۰$^{C}_{b}$	۱/۳۵$^{C}_{a}$	۲/۰۲$^{C}_{b}$	۲/۰۲$^{C}_{b}$
	۳	۳/۲۲$^{D}_{b}$	۱/۹۰$^{D}_{a}$	۳/۰۵$^{D}_{b}$	۲/۰۲$^{C}_{a}$

حروف متفاوت بزرگ در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ در بین دزهای پرتو تابی مختلف می-باشد

حروف متفاوت کوچک در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

با توجه به جدول ملاحظه می‌شود در مقایسه نمونه‌های پرتو دیده و نمونه پرتو دیده بدون سم، تزریق سم زنبور عسل ۶ ساعت قبل از پرتودهی به نمونه‌ها می‌تواند تعداد کروموزوم‌های تری و دی سنتریک را در حد چشم گیری کاهش دهد. همچنین تعداد کروموزوم‌های تری و دی سنتریک در زمان تزریق سم ۶ ساعت قبل از پرتودهی به نمونه‌ها در مقایسه با دیگر نمونه-های پرتو دیده با سم، کاهش چشم‌گیری داشته است.

کروموزوم‌های تری و دی سنتریک وآسنتریک با فلش نشان داده شده است که در اثر تابش پرتو بر لنفو سیت‌های انسان بوجود آمده است

بحث

خاصیت بعضی از مواد خوراکی و یا داروهای حفاظتی در برابر پرتوهای یونساز یعنی رادیو پروتکتورها (Radio-protector) به اثبات رسیده است. این دسته از مواد باعث افزایش مقاومت سلول زنده در برابر اثرات مخرب پرتوهای یونساز می‌شوند. پپتیدها و آمین‌های فعال فیزیولوژی از مواد پروتکتیوی هستند که در زهر زنبور عسل وجود دارند. یکی از ترکیبات زهر زنبور عسل که از آمین‌های فعال فیزیولوژیکی است، گلاسین هیستامین (histamine-terminal peptides) می‌باشد. این ماده در ترکیب با مس نقش بسیار مهمی در حفاظت لنفوسیت‌های خون انسان در برابر پرتو ایفاء می‌کند [۶، ۷، ۸]. نتایج تحقیقات دلالت براین دارد که باید تحقیقات گسترده ای برروی ماده گلایسیل هیستامین و نمونه‌های مشابه انجام شود که بسیار امیدوار کننده است. سمیت کم وخصوصیات ماده گلایسیل هیستامین نشان می‌دهد که این ترکیبات می‌توانند حیوانات پستاندار را در برابر دزهای کشنده پرتوهای یونساز محافظت نمایند[۱۵و ۱۷]. در تحقیقاتی که الینا و همکاران در این زمینه انجام داده‌اند، به این نتیجه رسیدند که تعداد کروموزوم‌های دی سنتریک وحلقوی در زمانیکه ۶ ساعت قبل از پرتودهی با دز ۲ کیلو گری، زهر زنبور عسل به نمونه‌ها اضافه کرده بودند، در حد معنی‌داری در مقایسه با دز و زمان‌های مختلف، کمتر

مشاهده شدند. در تحقیقی که وارندا در سال ۱۹۹۲ برروی مغز استخوان حیوانات آزمایشگاهی (موش) با تزریق سم زنبور عسل به داخل بدن حیوان انجام دادند، با آزمایش الینا در ۱۹۹۳ مطابقت می‌نمود. این نتیجه زمانی حاصل شد که زمان تزریق سم به نمونه‌ها، ۲۴ ساعت قبل از پرتودهی با دز ۳ و۴ گری انجام گردید و اثر حفاظتی زهر زنبور عسل کاملاً در این زمان خود را آشکار نمود. ولی وقتیکه ۱ ساعت قبل و بعد از پرتودهی، به نمونه‌ها سم زنبور عسل اضافه شده بود، هیچگونه اثر حفاظتی زهر زنبور عسل مشاهده نگردید و در نتیجه کروموزوم‌های دی سنتریک، رینگ و ناهنجاری‌های کروموزومی به وفور مشاهده گردید. کم شدن تعداد کروموزوم‌های دی سنتریک نشان دهنده رابطه بین زهر زنبور عسل و زمان تزریق آن به نمونه‌های لنفوسیت می‌باشد و نتیجه‌گیری نمودند که زهر زنبور عسل یک حفاظت کننده (Radioprotective) بسیار مؤثر است که از به وجود آمدن کروموزوم‌های دی سنتریک تا حد زیادی جلوگیری نموده به شرطی که زمان تزریق سم به نمونه‌ها ۶ ساعت قبل از پرتودهی صورت گیرد [۱۷]. نتایج بدست آمده در این پروژه با تحقیقاتی که الینا و همکاران در سال ۱۹۹۳ در این زمینه انجام داده‌اند، در خصوص تعداد کروموزوم‌های دی سنتریک وحلقوی در زمانیکه ۶ ساعت قبل از پرتودهی با دز ۲ کیلو گری، زهر زنبور عسل به نمونه‌ها اضافه کرده بودند، کاملاً مطابقت دارد. در خصوص تزریق سم در حین پرتوتابی و بعد از پرتوتابی، اختلاف آماری با نمونه اولیه خون در این پروژه مشاهده نگردید که این نتایج نیز با تحقیقات وارندا در سال ۱۹۹۲ برروی مغز استخوان حیوانات آزمایشگاهی (موش) با تزریق سم زنبور عسل به داخل بدن حیوان انجام دادند، کاملاً مطابقت داشته و هیچگونه اختلاف آماری تزریق سم در حین پرتوتابی و بعد از پرتوتابی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده افزایش دز پرتوتابی می‌تواند منجر به ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی گردد که تزریق زهر زنبور عسل با غلظت ۰/۰۰۰۱۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، ۶ ساعت قبل از پرتودهی نمونه‌ها، می‌تواند کمترین میزان ناهنجاری‌ها را باعث شود که ناشی از اثر حفاظتی زهر زنبور عسل در برابر اثرات مخرب پرتو گاما می‌باشد.

منابع

1. MJ. Pabst,WH.Habig,WB.Jakoby, ″Glutathione S-transferase A. A novel reaction pathway depends on substratekinetic mechanism in which the major concentration″,J Biol Chem 249(22):7140-7 (1974).
2. W. Droge,″Free radicals in the physiological control of cell function″, Physiol Rev, 82(1):47-95 (2002).
3.K.Roy,S.Kodama,K.Suzuki,M.Watanabe,″Delayed cell death,giant cell formation and chromosome instability induced by X-irradiation in human embryo cells″, J Radiat Res (Tokyo), 40(4):311-22 (1999).
4. HL. Liber, VH. Ozaki, JB. Little, ″Toxicity and mutagenicity of low dose rates of ionizing radiation from tritiated water in human lymphoblastoid cells″, Mutat Res,157(1):77-86 (1985).
5. L. Hagmar, U. Stromberg, H. Tinnerberg, Z. Mikoczy, ″The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis″. Int J Hyg Environ Health, 204(1):43-7 (2001).

6. DC. Lioyd, ″The relationship between chromosome aberrations and LOW LET radiation dose to
human Lymphocytes″. Int.J.Radiat. Biol, 28: 75-90 (1975).
7. El. Fishkov,″ thera peutic use of a product from bee venom(KF)″, Klin Med 32,(8), 20-25(1955).
8. S. Beeker, ″Treatment of rheumatic diseases with injection form of honey bee venom (Immenin)″, Therap Gegenw 72:251-256 (1931).
9. E. Ardemounm, ″Apiphor Preparation of bee venom″, Uch zap gosk gos Univ. 140: 70-77 (1972).
10. S.Yoshiato, ″Effects of Apitherapy by bee acupunture the XXXth international Apiculture congress of apimondia″, Nagoya 490-495 (1985).
11. TR. Short, R. JACKSON, ″Treatment of canine arthritis with bee venom″. Proc. Nam Apiother Soc. 1:86 (1978).
12. Dietrich. et al, ″Bee venom therapy for chronic pain″, the journal of neurological and ortopadic medicine and surgery,11: 195-197(1990).
13. E A. Varanda, ″Effect of pretreatment with venom of Apis mellifera bees on the Yield of Gamma-ray induced chromosome aberrations in human blood lymphocytes″. Revista-Brasileira-de- Genetica. 16(3):551-559 (1993).
14. K. Fakim zadeh, ″Improved device for venom extraction″.Beeworld, 79 (1):52-56(1998).
15. ML.Peck, ″Radioprotective potential and chelating properties of Glycylhistamine an nalog of histamine terminal peptides found in bee venom″. Toxicon, 16(6): 690-694; B(1978).
16. SK.Shafai, ″Fragile stellen auf Menschlichen chromosomen″ . Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Uni- Mainz, Germany (1988).
17. EA.Varanda, DC.Tavares,″Radioprotection: Mechanisms and Radioprotective Agents Including Honeybee Venom″, J Ournal of venomous,Animal and Toxins.Toxins vol.4n.1 Botucatu(1998).