



Original Research Paper

Antimicrobial and anti-inflammatory properties of gamma irradiated honey bee venom

Parvin Shawrang^{*1}, Fatemeh Abbasi¹, Farahnaz Motamedi sede¹, Maryam Sadeghi²

¹Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Atomic Energy Organization of Iran, Karaj, Iran

²Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Key Words

Gene expression
Honey bee venom
Interleukin
Processed bee venom
Well diffusion assay

Abstract

Introduction: This study was done to assess the antimicrobial and anti-inflammatory effect of raw and irradiated bee venom.

Materials & methods: Bee venom samples were irradiated at doses of 0, 2, 4, 6 and 8 kGy using gamma irradiator. Antimicrobial characteristics of raw and irradiated venom was determined using well diffusion assay. 300 µl of sample was poured in well and diameter of the clear zone of inhibition of growth for the bacteria and fungi was measured. Anti-inflammatory effect of venom was assessed using injection of formalin 2.5% in the paw. 24 rats were assigned to 6 treatments and 4 replicates for measurement of IL-6 and IL-10 in the blood of rats. Raw and irradiated venom were injected to rats at a dose of 1 mg/kg BW and blood sample was taken after 2, 4 and 6h, then serum was separated. Spleen was removed and held in liquid nitrogen until gene expression analysis of IL-6 and IL-10. Data were analyzed based on randomized complete block design using SAS software.

Results: Irradiated bee venom had no negative effects on antimicrobial and anti-inflammatory characteristics ($P>0.05$). IL-6 and IL-10 gene expression in spleen samples in rats taken 6, 48 and 72 h post IP injection down-regulated for venom irradiated doses of 4, 6 and 8 kGy compared with the control and dose of 2 kGy ($P<0.05$). Also, IL-6 and IL-10 gene expression are down regulated in spleen samples of rats taken after 72 h as compared with those taken 6 and 48 h ($P<0.05$). There were no differ among serum levels of IL-6 and IL-10 in raw venom and irradiated at doses of 2, 4 and 6 kGy ($P>0.05$), but serum level of IL-6 increased ($P<0.05$) in those received 8 kGy irradiated venom compared with the control and other treatments.

Conclusion: Based on the results of this study, gamma irradiation at a dose of 6 kGy could be applicable for honey bee venom processing without negative effects on positive venom characteristics.

* Corresponding Author's email: pshawrang@aeoi.org.ir

Received: 4 June 2022; Reviewed: 5 July 2022; Revised: 6 September 2022; Accepted: 8 October 2022

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.362124.2884

مقاله پژوهشی

مطالعه برخی خواص ضد میکروبی و ضد التهابی زهر زنبور عسل فراوری شده با پرتو گاما

پروین شورنگ^{۱*}، فاطمه عباسی^۱، فرحناز معتمدی سده^۱، مریم صادقی^۲

^۱ پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، کرج، ایران
^۲ گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: پرتوتابی گاما روشی برای حذف ترکیبات آلرژن زهر زنبور عسل است. مطالعه برخی خواص ضد میکروبی و ضد التهابی زهر زنبور عسل فراوری شده با پرتو گاما هدف این مطالعه است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های زهر با دزهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری گاما پرتوتابی شدند. برای تعیین خواص ضد میکروبی زهر از روش انتشار از چاهک استفاده شد و قطر هاله ممانعت از رشد قارچ و باکتری در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. جهت مطالعه اثرات ضد التهابی زهر زنبور عسل، از مدل ایجاد التهاب پنجه پای موش با تزریق فرمالین ۲/۵ درصد استفاده شد. سنجش اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ با استفاده از ۲۴ سر موش در ۶ گروه با ۴ تکرار انجام شد. برای این منظور مقدار ۱ میلی گرم زهر پرتوفراوری شده به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق و پس از ۲، ۴ و ۶ ساعت، خونگیری از قلب و سپس جداسازی سرم خون انجام شد. نمونه‌های طحال جهت استخراج RNA و انجام آزمایشات بیان ژن اینترلوکین ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما جدا شدند. داده‌های آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شد.

نتایج: پرتوتابی زهر زنبور عسل با دزهای ذکر شده، تأثیری بر خواص ضد میکروبی زهر زنبور عسل نداشت ($P > 0/05$). در طول ۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، کاهش قابل توجهی در میزان بیان ژن اینترلوکین-۶ و -۱۰ بافت طحال در دزهای ۴ و ۶ و ۸ کیلوگری زهر زنبور پرتوتابی شده در مقایسه با گروه شاهد و دز ۲ کیلوگری مشاهده شد ($P < 0/05$). کاهش قابل توجهی در بیان ژن اینترلوکین-۶ و -۱۰ بافت طحال در تمامی تیمارها در زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان ۴۸ و ۶ ساعت پس از تزریق مشاهده شد ($P < 0/05$). طبق نتایج تست الیزا غلظت اینترلوکین-۶ و -۱۰ سرم خون در تیمارهای مختلف زهر خام و پرتوفراوری شده با دزهای ۲، ۴ و ۶ کیلوگری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). دز ۸ کیلوگری سبب افزایش اینترلوکین-۶ سرم خون شد ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: از دز ۶ کیلوگری پرتو گاما بدون اثرات منفی بر ویژگی‌های زهر زنبور عسل می‌توان برای پرتوفراوری زهر زنبور عسل استفاده کرد.

مقدمه

استریل در محیط کشت‌های اختصاصی EMB، BPA و PDA کشت چمنی داده شد سپس، یک چاهک به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه زهر پرتوتابی شده با دزهای مختلف با غلظت ۰/۰۲ گرم در میلی‌لیتر درون چاهک‌های ریخته شد، بعد از جذب کامل زهر، محیط کشت‌ها به انکوباتور (مدل SKIR-601L، کره) انتقال یافت و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله ممانعت از رشد با استفاده از کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری و ثبت شد.

آزمایش ممانعت التهاب پنجه پا: برای ارزیابی اثرات ضدالتهابی

زهر زنبور از مدل ادم پنجه پای راست با القای التهاب از طریق فرمالین استفاده شد. التهاب با تزریق زیرجلدی ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد به پنجه پای راست ایجاد شد. سپس حجم پنجه قبل و بعد از فرمالین برای نشان دادن میزان درجه التهاب اندازه‌گیری شد و ۳۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی ۰/۱ میلی‌لیتر زهر زنبور با غلظت ۰/۰۲ گرم در میلی‌لیتر، تزریق فرمالین انجام گرفت و حجم پنجه ۱ ساعت پس از تزریق فرمالین اندازه‌گیری شد و پاسخ ضدالتهابی زهر زنبور عسل با اندازه‌گیری ادم پنجه پای راست موش با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد و درصد مهار التهاب از نسبت تفاوت میانگین التهاب دو گروه کنترل و تیمار به میانگین التهاب گروه شاهد محاسبه شد (۱۶).

سنجش سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی سرم خون:

از ۲۴ سر موش بالبسی نر با متوسط وزن ۲۰ گرم استفاده شد. گروه‌بندی موش‌ها براساس تعداد ۶ تیمار بدون تزریق زهر و تزریق زهر پرتوفراوری شده با دزهای صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ کیلوگری و ۴ تکرار انجام شد. تزریق داخل صفاقی با استفاده از سرنگ انسولین به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر (غلظت ۰/۰۲ گرم در میلی‌لیتر) انجام شد. نمونه خون موش‌ها پس از ۲، ۴، ۶ ساعت از تزریق جهت سنجش سایتوکاین‌های سرم خون به روش ELISA استفاده شد. سرم خون دو ساعت پس از خونگیری، با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد. از کیت الایزا شرکت (USA) Bioscience Mouse برای سنجش اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ استفاده شد.

سنجش بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی

بافت طحال: جهت استخراج RNA بافت طحال، ابتدا نمونه بافت طحال در هاون چینی RNAse Free با استفاده از ازت مایع کوبیده شد. جهت استخراج RNA و ساخت cDNA از روش پیشنهادی شرکت پارس طوس و دستگاه PCR (Biometra, T-Gradient- USA) استفاده شد. زمان واقعی از توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های رمزکننده

زهر زنبور عسل حاوی ترکیبات فعالی مانند پپتیدها، پلی‌پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌های فعال بیولوژیکی و ترکیبات غیرپپتیدی است. زهر زنبور به دلیل داشتن ترکیبات فعال، زیستی دارای اثرات ضد میکروبی (پپتیدهای آنتی‌باکتریال)، ضدالتهابی، ضدآپوپتوز، ضد فیبروز و ضد آرترواسکلروزیس است و به‌طور وسیع در صنعت داروسازی و آپی‌تراپی کاربرد دارد (۶). با وجود خواص درمانی زهر زنبور عسل به دلیل داشتن ترکیبات آلرژن شامل آنزیم‌های فسفولیپاز و هیالورونیداز، پپتید ملیتین، آمین‌های بیوژنیک مانند هیستامین، دوپامین و نوراپی‌نفرین می‌تواند باعث آنافیلاکسی شود. چندین روش برای سم‌زدایی و غیرفعال‌سازی پروتئین زهر شامل تیتراسیون زهر خام با محلول مونوکلرید ید، ریزپوشانی، استفاده از حرارت، انجماد، فرمالدئید یا گلو تار آل‌دئید، اتصال به کربوکسی متیل سلولز، فوتواکسیداسیون در حضور متیلن بلو، استفاده از تانن و پرتوتابی گاما گزارش شده است (۲۱). پرتوتابی گاما، از مؤثرترین روش‌ها برای کاهش سمیت زهر است. پرتوتابی گاما این قابلیت را دارد که با تغییر در ساختار عوامل آلرژن و کاهش سمیت زهر با حفظ ایمنی‌زایی آن برای فراوری زهر زنبور عسل مورد استفاده قرار گیرد (۳، ۱۷). این پژوهش با هدف تعیین دز مناسب پرتوگاما برای فراوری زهر زنبور عسل و حذف عوامل آلرژن بدون آسیب به خواص مفید زهر و ارزیابی کیفیت زهر زنبور عسل پرتوفراوری شده و مطالعه خواص مفید آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه زهر زنبور عسل پرتوفراوری شده: زهر زنبور عسل استحصال

شده با استفاده از دستگاه زهرگیر اصغرپور (ورژن ۷) به صورت خشک تهیه شد. پرتوتابی نمونه‌های زهر زنبور عسل با دز ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری گاما در پژوهشکده کاربرد پرتوها با دستگاه گاماسل تحقیقاتی GC-220 (شرکت Nordion کانادا) دارای چشمه کبالت-۶۰ با اکتیویته ۴۳۵ کوری در دمای اتاق انجام شد. پرتوتابی گاما با نرخ متوسط ۱/۰۵ گری در ثانیه و با دقت بیش از ۹۰ درصد صورت گرفت.

آزمایش هاله ممانعت از رشد باکتری و قارچ: برای مطالعه

خواص ضد میکروبی زهر زنبور عسل از روش انتشار در چاهک و اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد باکتری و قارچ استفاده شد (۸). برای این منظور ابتدا باکتری / شریشیاکلی (PTCC No:1330)، استافیلوکوکوس / اورتوس (PTCC No:1917) و قارچ / اسپرژیلوس فلاوس (PTCC No: 5018) از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی ایران تهیه و پس از رشد در محیط کشت مایع NB، با سوآپ

کمی با استفاده از رنگ SYBR Green و کیت سایبر پارس طوس در دستگاه Real-Time PCR شرکت BMS (مدل MIC، استرالیا) انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و از هر نمونه سه تکرار انجام گردید. جهت محاسبه میزان بیان ژن از روش CT مقایسه‌ای (Comparative CT) استفاده شد و داده‌های به دست آمده با نرم افزار Rest ($-\Delta\Delta CT$) تجزیه و تحلیل شد (۱۱).

اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ و آغازگر ژن خانه دار بتا اکتین (ACTB) استفاده شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. برای ساخت cDNA ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده (با غلظت ۵ نانوگرم در میلی لیتر) استفاده شد. برای انجام واکنش کمی چرخه‌ای پلیمرز در زمان واقعی از توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های رمز کننده اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ و آغازگر ژن خانه دار بتا اکتین (ACTB) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Overbergh و همکاران ۱۹۹۹)

size (pb)	Reverse 5' - 3'	Forward 5' - 3'	Gene accession	Gene
154	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	GGCTGTATCCCCTCCATCG	NM_007393.5	ACTB
172	ACTCTTTTCTCATTTCACGATTT	GTTGCCTTCTTGGGACTGATG	NM_001314054.1	IL-6
194	CCAGCAGACTCAATACACACT	GCTGTCATCGATTTCTCCCT	NM_010548.2	IL-10

ACTB: beta-actin gene, IL-6: interleukin 6, IL-10: interleukin 10.

نتایج

خواص ضد میکروبی زهر پرتو فراوری شده: داده‌های مربوط به هاله ممانعت از رشد قارچ و باکتری در جدول ۴ گزارش شده است، طبق نتایج، حساسیت باکتری و قارچ به زهر زنبور عسل متفاوت بود. حساسیت قارچ بیش تر از باکتری بود. باکتری‌های گرم مثبت نیز در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به زهر زنبور عسل داشتند و هاله ممانعت از رشد بزرگتری داشتند. خواص ضد میکروبی زهر خام و زهر پرتو فراوری شده تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$)؛ به عبارت دیگر، پرتوتابی زهر زنبور عسل، تأثیر منفی بر خواص ضد میکروبی (قطر هاله ممانعت از رشد باکتری و قارچ) زهر زنبور عسل نداشت.

جدول ۴: هاله ممانعت از رشد قارچ و باکتری زهر زنبور عسل (میلی متر)

تیمار	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
۰ کیلوگری	۲۴/۳۷	۱۴/۰۶	۱۷/۰۴
۲ کیلوگری	۲۴/۴۶	۱۳/۹۴	۱۷/۱۱
۴ کیلوگری	۲۴/۴۸	۱۳/۹	۱۷/۰۹
۶ کیلوگری	۲۴/۳۸	۱۴/۲۱	۱۷/۰۴
۸ کیلوگری	۲۴/۳۲	۱۳/۹۸	۱۷/۰۲
SEM	۰/۱۱۲	۰/۱۰۳	۰/۰۸۹

عدم درج حروف در هر ستون بیانگر نبود تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.

خواص ضد التهابی زهر پرتو فراوری شده: طبق نتایج آزمایش ممانعت التهاب پنجه پا پرتوتابی زهر زنبور عسل تأثیر منفی بر خواص ضد التهابی زهر زنبور عسل نداشت و درصد ممانعت التهاب پنجه پا بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی دار نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۲: ترکیبات مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در

نوع ماده	مقدار
مستر میکس (۲X)	۱۰ میکرولیتر
آغازگر پیشرو	۱ میکرولیتر
آغازگر پسرو	۱ میکرولیتر
cDNA	۴ میکرولیتر
آب دیونیزه دوبار تقطیر	تا حجم ۲۰ میکرولیتر

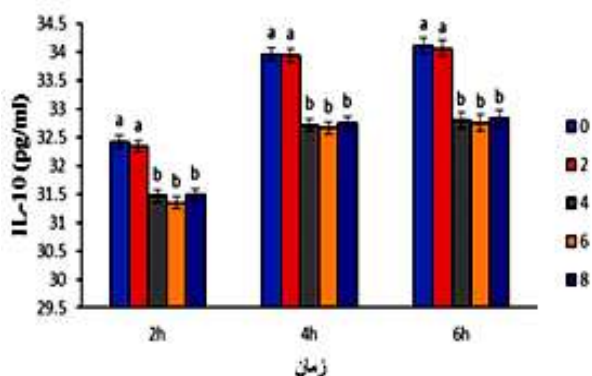
جدول ۳: دما و زمان مراحل مختلف PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی گراد)
۱	واسرشت	۱۰ دقیقه	۹۴
	واسرشت	۱۵	۹۵
۳۵	اتصال	۳۰	بر اساس دمای اتصال آغازگر
	تکنیر	۶۰	۷۲
	تکنیر نهایی	۵ دقیقه	۷۲
	شروع ذوب	۵	۹۴-۶۵

تحلیل آماری داده‌ها: آزمایشات در قالب طرح بلوک کامل

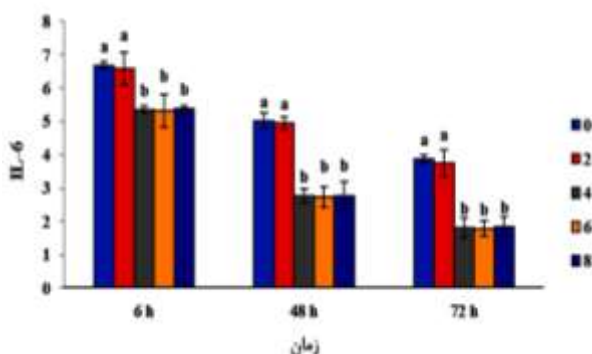
تصادفی با ۶ تیمار، ۳ زمان (بلوک) و ۴ تکرار تجزیه واریانس شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و سطح معنی داری ۵ درصد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از نرم افزار آماری SAS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

اینترلوکین-۱۰ در سرم موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل خام و زهر پرتوتابی شده با دز ۲ کیلوگری بود ($P < 0/05$). بین تیمارهای صفر و ۲ کیلوگری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). مقدار کاهش اینترلوکین-۴ در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$).



شکل ۳: مقدار اینترلوکین-۱۰ سرم خون موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوفراوری شده

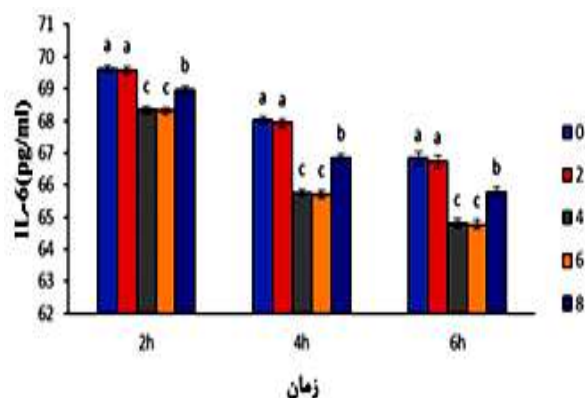
بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی بافت طحال: تأثیر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ بافت طحال در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. در طول ۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، کاهش قابل توجه در بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی بافت طحال در دزهای ۴ و ۶ و ۸ کیلوگری زهر زنبور پرتوتابی شده در مقایسه با گروه شاهد و دز ۲ کیلوگری مشاهده شد ($P < 0/05$). همچنین، در بررسی اثر زمان بر بیان ژن، کاهش قابل توجه در بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی بافت طحال در تمامی تیمارها در زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان ۴۸ و ۶ ساعت پس از تزریق مشاهده شد ($P < 0/05$).



شکل ۴: بیان نسبی ژن IL-6 در بافت طحال موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوفراوری شده



شکل ۱: هاله ممانعت از رشد قارچ زهر زنبورعسل



شکل ۲: مقدار اینترلوکین-۶ سرم خون موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوفراوری شده

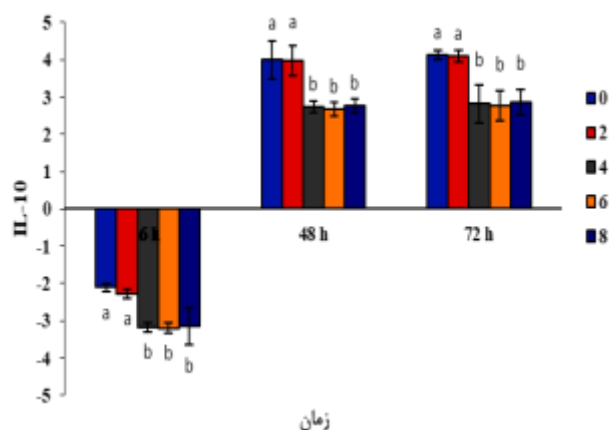
سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی سرم خون: مقدار اینترلوکین-۶ در زمان ۲ ساعت بیشتر از ۴ ساعت و در زمان ۴ ساعت بیشتر از ۶ ساعت پس از تزریق بود ($P < 0/05$). مقدار اینترلوکین-۶ با گذشت زمان کاهش پیدا کرد. مقدار اینترلوکین-۶ در سرم خون موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دزهای ۴، ۶ کیلوگری کمتر از مقدار اینترلوکین-۶ در سرم موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل خام و زهر پرتوتابی شده با دز ۲ کیلوگری بود ($P < 0/05$). بین تیمارهای صفر و ۲ کیلوگری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). مقدار کاهش اینترلوکین-۶ در دزهای ۴، ۶ کیلوگری بیشتر از دز ۸ کیلوگری بود ($P < 0/05$). مقدار اینترلوکین-۱۰ در زمان ۴ و ۶ ساعت بعد از تزریق بیشتر از زمان ۲ ساعت بود ($P < 0/05$). مقدار اینترلوکین-۱۰ در زمان ۴ و ۶ ساعت بعد از تزریق با هم تفاوت نداشت ($P > 0/05$). مقدار اینترلوکین-۱۰ در سرم خون موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری کمتر از مقدار

جدول ۵: ممانعت التهاب پنجه پا (درصد)

تیمار	۰ کیلوگری	۲ کیلوگری	۴ کیلوگری	۶ کیلوگری	۸ کیلوگری	اشتباه معیار SEM
درصد ممانعت التهاب	۱۴/۸	۱۵/۴۲	۱۵/۷۳	۱۴/۹۰	۱۵/۰۳	۰/۱۵۲

عدم درج حروف در هر ردیف بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

حساسیت را به زهر زنبور داشتند (۲۰). ملیتین، آدولاپین و آپامین از ترکیبات ضدالتهابی زهر زنبور عسل و دارای اثرات مهار بیان سیکلواکسیژناز-۲ و کاهش سطح اینترلوکین‌های پیش‌التهابی و نیتریک اکساید است (۱۰). سایر مواد مانند PLA₂ می‌تواند در غلظت‌های کم ضدالتهاب و در سایر موارد پیش‌التهابی باشد (۴). ملیتین با مهار فسفوریلاسیون IκB، فعالیت اتصال به DNA، NF-κB، که یک فاکتور رونویسی مهم تنظیم‌کننده بیان ژن التهابی است را مهار می‌کند. آپامین، به‌عنوان یک مهارکننده بسیار انتخابی کانال‌های K⁺ فعال شده با Ca²⁺ شناخته می‌شود. این ترکیب ره‌ایش هیستامین از بافت شش را مهار می‌کند و از طریق اثر تثبیت‌کننده ماست سل، التهاب آلرژیک راه‌هوایی را کاهش می‌دهد. آدولاپین به‌دلیل توانایی آن در مهار سیستم سنتز پروستاگلاندین از طریق خواص مهار COX دارای خاصیت ضدالتهابی است. MCD پپتید، به‌دلیل مهار ره‌ایش هیستامین از ماست سل‌ها دارای اثرات ضد آلرژیک است. فقدان همبستگی بین غلظت ملیتین، آپامین و PLA₂ نشان می‌دهد این ترکیبات در غلظت‌های خاصی فعال‌تر هستند و در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر احتمالاً به‌دلیل اثرات آنتاگونیست، فعالیت این ترکیبات کاهش می‌یابد (۱۹). Jang و همکاران گزارش کردند زهر زنبور عسل دارای اثرات ضدالتهابی در رده سلولی ماکروفاژ منجر به کاهش رونویسی COX-2، iNOS، فاکتور هسته‌ای kappa B و پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPKs) می‌گردد. ترکیبات ضدالتهابی زهر زنبور عسل تولید نیتریک اکساید و PGE₂ و سابتوکاین‌ها را در میکروگلیا تحریک شده با لیپوبلی ساکارید مهار می‌کند. این اثر ضدالتهابی از طریق کاهش فعالیت NF-κB (یک فاکتور رونویسی مهم برای واسطه‌های پیش‌التهابی) ایجاد می‌شود. هم‌چنین تولید نیتریک اکساید از طریق مهار مسیر JNK (از مجموعه MAPK) کاهش می‌یابد (۹). بخش بزرگی از التهاب ناشی از زهر زنبور عسل وابسته به حضور PLA₂ است. فسفولیپاز A₂ زهر زنبور عسل آنزیمی که فسفولیپیدهای غشایی را برای تولید لیزوفسفولیپیدها و آراشیدونیک اسید هیدرولیز می‌کند منجر به ایجاد التهاب وابسته به دز در هنگام تزریق زیرجلدی زهر زنبور به پنجه پای موش می‌شود (۲). PLA₂ در ایجاد التهاب نقش دارد؛ هم‌چنین آنزیم‌های پروتئولیتیک، برادی‌کینین‌ها را تولید می‌کنند که گشادکننده عروق هستند و نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهند و به‌راحتی پس از آسیب در بافت‌ها تولید می‌شوند و بنابراین عوامل



شکل ۵: بیان نسبی ژن IL-10 در بافت طحال موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبور عسل پرتوفاوری شده

بحث

ملیتین و فسفولیپاز A₂ فراوان‌ترین ترکیب زهر زنبور عسل و مسئول فعالیت ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف هستند (۱۴). حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل ماهیت لایه غشای سلولی (پپتیدوگلیکان) نسبت به باکتری‌های گرم منفی به ملیتین بیش‌تر است (۱۲). فسفولیپاز A₂ می‌تواند با ملیتین هم‌افزایی کرده و فعالیت ضد میکروبی زهر را افزایش دهد (۱۴). ملیتین یکی از مهم‌ترین اجزای زهر زنبور عسل با خاصیت ضد میکروبی (۱۲) و یک پپتید-آمید کاتیونی است که از ۲۶ اسیدآمینه تشکیل شده است. این ترکیب به ساختار ثانویه آلفا-هلیکس، آمفی‌پاتیک چین می‌خورد و سد نفوذپذیری را مختل می‌کند. ساختار و چین خوردگی‌های ملیتین به دزهای کم پرتوتابی مقاوم است (۷). در این پژوهش نیز عملکرد ضد میکروبی زهر زنبور پرتوفاوری شده حفظ شد و پرتوتابی با دزهای مورد مطالعه تأثیر منفی بر خواص ضد میکروبی زهر زنبور عسل نداشت. Casare و همکاران نیز گزارش کردند که پرتوتابی تأثیری بر مقدار ملیتین زهر زنبور عسل ندارد (۳). Babaie و همکاران با مطالعه خاصیت ضد باکتریایی زهر زنبور عسل گزارش کردند که زهر خام زنبور عسل در برابر /شریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد باکتریایی دارد و سبب ایجاد هاله ممانعت از رشد باکتری شد (۱). Sonmez و همکاران نیز گزارش کردند که حساسیت باکتری‌های مختلف به زهر زنبور عسل متفاوت است و مایکوباکترها و استرپتوکوکوس‌ها بیش‌ترین

اصلی در تشکیل هماتوما هستند. Palm و همکاران گزارش کردند بخش بزرگی از التهاب ناشی از تزریق زهر زنبور عسل وابسته به حضور PLA₂ است و ترشح هیستامین و یا سرتونین از ماست سل‌ها احتمالاً پاسخ التهابی ناشی از PLA₂ زهر زنبور عسل است در این شرایط ماست سل‌ها به سرعت هیستامین، پروتازها و سایتوکاین‌ها را از طریق اگزوسیتوز آزاد می‌کنند (۱۵). سروتونین، هیستامین، سیکلواکسیژناز، پروستاگلاندین و سیتوکین‌ها واسطه‌های التهابی هستند. Casare و همکاران گزارش کردند که پرتوتابی سبب کاهش مقدار PLA₂ زهر زنبور عسل شد (۳). کاهش التهاب در موش‌های دریافت‌کننده زهر پرتوفراوری شده می‌تواند به دلیل کاهش مقدار PLA₂ باشد. حذف ترکیبات آلرژن در زهر پرتوفراوری شده القای پاسخ‌های Th₂ و IgE را کاهش می‌دهد (۱۵). ماکروفاژ M₁ به وسیله سایتوکاین‌های Th1 القاء می‌شود، این ماکروفاژ سطوح بالایی از سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین-۶ را تولید و ترشح می‌کند (۱۸). Teixeira و همکاران گزارش کردند که تزریق زهر به شکل داخل صفاقی در موش، از طریق القای بیان NOS، سنتز NO را القاء می‌کند. این محققین بیان داشتند که NO در طول پاسخ میزبان به تزریق زهر تولید می‌گردد و در ایجاد ادم و التهاب ناشی از زهر نقش دارد (۲۲). Samy و همکاران گزارش کردند دزهای پرتوی گاما منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و PLA₂ و کاهش ادم می‌گردد که منجر به کاهش سمیت زهر و فراکسیون‌های جدا شده آن می‌شود (۱۷). Muller و همکاران گزارش کردند کاهش فعالیت سایتوکاین‌های پیش‌التهابی منجر به کاهش بیان NOS می‌گردد که نشان می‌دهد دزهای ۴ و ۶ و ۸ کیلوگری زهر پرتوتابی شده به دلیل کاهش ترکیبات آلرژن، کم‌ترین میزان التهاب را در بافت طحال نشان دادند (۱۳). این محققین گزارش کردند در ساعات اولیه تزریق زهر، ماکروفاژ M₁ که پیش‌التهابی است اینترلوکین-۶ را آزاد می‌کند در حالی که در دوره ۴۸ و ۷۲ ساعت که مهاجرت مونوسیت رخ می‌دهد، ماکروفاژ نوع M₂ ضدالتهابی فعال شده و مقدار سایتوکاین‌های التهابی کاهش می‌یابد. اینترلوکین-۶ یکی از سایتوکاین‌های واسطه در پاسخ‌های التهابی است و همراه با اینترلوکین-۱ و TNF- α منجر به ایجاد تب و فعال شدن سلول‌های T و B می‌شود (۲۳). آنزیم PLA₂ موجود در زهر منجر به ایجاد ادم، آزادسازی کراتین کیناز و رهایش اینترلوکین-۶ می‌شود (۱۰). Costa و همکاران گزارش کردند پرتوتابی گاما این قابلیت را دارد که با تغییر در ساختار عوامل آلرژن زهر زنبور عسل سبب تغییر عملکرد آن‌ها شده و برای فراوری زهر زنبور عسل مورد استفاده قرار گیرد و میزان ترکیباتی مانند PLA₂ را کاهش دهد (۵). در این پژوهش نیز دزهای ۴ و ۶ و ۸ کیلوگری زهر زنبور پرتوتابی شده سبب کاهش بیان اینترلوکین-۶ در بافت

طحال موش شد که می‌تواند به دلیل کاهش مقدار PLA₂ زهر پرتو فراوری شده باشد (۳). Zocal و همکاران گزارش کردند زهر با تحریک ماکروفاژ M₁ منجر به تولید سایتوکاین پیش‌التهابی اینترلوکین-۶ در مرحله اول پس از تزریق می‌شود پس از این مرحله به واسطه کاهش ترکیبات آلرژن موجود در زهر و نقش ماکروفاژ M₂ و به موازات آن ترشح سایتوکاین ضدالتهابی اینترلوکین-۱۰ جهت حفظ هموستاز بدن با کنترل میزان و مدت پاسخ التهابی، میزان اینترلوکین-۶ در دوره ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش می‌یابد (۲۴). اینترلوکین-۱۰ یک واسطه ضدالتهابی است که به وسیله ماکروفاژهای M₂ ترشح می‌شود و منجر به کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۶، MCP-1، TNF- α و COX-2 می‌گردد (۱۰). Shapouri و Moghaddam و همکاران گزارش کردند هنگامی که التهاب به اندازه کافی شدید باشد که بر یک اندام تأثیر بگذارد، ماکروفاژ ابتدا فنوتیپ M₁ را نشان می‌دهند تا اینترلوکین-۶، TNF- α ، اینترلوکین-۱۲ و اینترلوکین-۲۳ را در برابر محرک آزاد کند اما اگر فاز M₁ ادامه یابد، می‌تواند منجر به آسیب شود، بنابراین ماکروفاژ M₂ مقادیر بالایی از اینترلوکین-۱۰ را به مرور زمان ترشح می‌کند تا التهاب را سرکوب نماید و به ترمیم بافت، بازسازی و حفظ هموستاز کمک کند (۱۸). کاهش بیان اینترلوکین-۱۰ در هر دوره زمانی در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری زهر زنبور پرتوتابی در مقایسه با تیمار شاهد و دز ۲ کیلوگری به دلیل تأثیر پرتو گاما بر کاهش فعالیت‌های آنزیم PLA₂ (۳) و به موازات آن کاهش تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL-۱۰ در بافت مورد نظر به دنبال کاهش التهاب اولیه است. هم‌چنین زهر زنبور عسل در کنار خاصیت التهابی به دلیل داشتن ترکیبات از قبیل ملیتین و آدولاپین دارای خاصیت ضدالتهابی است (۱۰) که این ترکیبات در کنار خصوصیات پرتوتابی گاما، در مهار بیان COX-2 و کاهش سطح TNF- α ، اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱ و NO مؤثر بوده و بنابراین میزان بیان اینترلوکین-۱۰ را کاهش می‌دهد. افزایش بیان اینترلوکین-۱۰ پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق زهر در مقایسه با ۶ ساعت پس از تزریق، نشان دهنده پایان فرآیند التهاب است. نتایج این مطالعه نشان داد که زهر پرتوفراوری شده با دز ۴، ۶ و ۸ کیلوگری بر برخی خواص ضد میکروبی زهر زنبور عسل تأثیر منفی نداشت. کاهش اینترلوکین-۶ در زهر پرتو فراوری شده نشان می‌دهد که پرتوتابی در کاهش عوامل التهاب‌زا و آلرژن مؤثر بوده است. باتوجه به نتایج این پژوهش استفاده از دز ۶ کیلوگری برای پرتوفراوری زهر زنبور عسل می‌تواند مناسب باشد.

منابع

- inflammatory responses. *International Journal of Molecular Medicine*. 41: 3717- 3726.
11. **Livak, K.J.T.D., 2001.** Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25: 402-408.
 12. **Maitip, J., Mookhploy, W., Khorndork, S. and Chantawannakul, P., 2021.** Comparative Study of Antimicrobial Properties of Bee Venom Extracts and Melittins of Honey Bees. *Antibiotics*. 10(12): 1503.
 13. **Muller, J.A.I., Moslaves, I.S.B., Oliveira, E.J.T., Portugal, L.C., Oliveira, R.J., Mortari, M.R. and Toffoli-Kadri, M.C., 2021.** Pro-inflammatory response induced by the venom of *Parachartergus fraternus* wasp. *Toxicon*. 190: 11-19.
 14. **Nevalainen, T.J., Graham, G.G. and Scott, K.F., 2008.** Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1781: 1-9.
 15. **Palm, N.W., Rosenstein, R.K., Yu, S., Schenten, D.D., Florsheim, E. and Medzhitov, R., 2013.** Bee Venom Phospholipase A2 Induces a Primary Type 2 Response that Is Dependent on the Receptor ST2 and Confers Protective Immunity. *Immunity*. 39: 976-985.
 16. **Seddighfar, M., Mirghazanfari, S.M. and Dadpay, M., 2020.** Analgesic and anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of *Malva sylvestris*, *Carum carvi* or *Medicago sativa*, and their combination in a rat model. *Journal of Integrative Medicine*. 18(2): 181-188.
 17. **Samy, E.M., Shaaban, E.A., Kenawy, S.A., Elfattah, M.A.A. and Salama, W.H., 2018.** The impact of low doses of gamma radiation on *Echis coloratus* venom and its fractions. *Radiation Physics and Chemistry*. 150: 145-150.
 18. **Shapouri Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Tavakol Afshar, J. and Sahebkar, A.H., 2018.** Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 233(9): 6425-6440.
 19. **Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M.J.R.P., Calheta, R.C., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I.C.F.R., 2016.** Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 94: 172-177.
 20. **Sonmez, E., Kekecoglu, M., Bozdeveci, A. and Karaoglu, S.A., 2022.** Chemical profiling and antimicrobial effect of Anatolian honey bee venom. *Toxicon*. 213: 1-6.
 1. **Babaie, M., Ghaem panah, A., Mehrabi, Z., Mollaei, A. and Khalilifard Borojeni, S., 2020.** Partial Purification and Characterization of Antimicrobial Effects from Snake (*Echis carinatus*), Scorpion (*Mesosobuthus epues*) and Bee (*Apis mellifera*) venoms. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 14(5): 460-477.
 2. **Calixto, M.C.M., Trichês, K. and Calixto, J.B., 2003.** Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. *Inflamm. Res*. 52: 132-139.
 3. **Casare, M.S., Spencer, P., Campos, L.A. and Nascimento, N., 2006.** Study of gamma radiation effects on crotonamine and crotoxin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 269: 571-577.
 4. **Cherniack, E.P. and Govorushko, S., 2018.** To bee or not to bee: The potential efficacy and safety of bee venom acupuncture in humans. *Toxcon*. 154: 74-78.
 5. **Costa, H., Boni-Mitake, M., Souza, C.F. and Rogero, J.R., 1999.** Effects of gamma radiation on bee venom: preliminary studies. VII General Congress on Nuclear Energy, Belo Horizonte, MG, Brazil.
 6. **Dantas, C.G., Nunes, T.L.G.M., Nunes, T.L.G.M., Paixao, A.O.D., Reis, F.P., Waldecy, D.L., Junior, W.D.L.J., Cardoso, J.C., Gramacho, K.P., Gomes, M.Z., 2014.** Pharmacological evaluation of bee venom and melittin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24(1): 67-72.
 7. **Guha, S., Ferrie, R.P., Ghimire, J., Ventura, C.R., Wu, E., Sun, L., Kim, S.Y., Wiedman, G.R., Hristova, K. and Wimley, W.C., 2021.** Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochemical Pharmacology*. 193: 114769.
 8. **Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Yunus Shukor, M. and Oskoueian, E., 2011.** Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 3422-3431.
 9. **Jang, H.S., Kim, S.K., Han, J., Ahn, H.J., Bae, H. and Min, B.I., 2005.** Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 157-160.
 10. **Kang, Y.M., Chung, K.S., Kook, I.H., Kook, Y.B., Bae, H., Lee, M. and An, H.J., 2018.** Inhibitory effects of bee venom on mast cell-mediated allergic

21. **Tang, Y., Dong, W. and Kong, T., 2010.** Effects of heating on the immunogenicity and biological toxicity of *Deinagkistrodon acutus* venom and its fractions. *Toxicon*. 56: 45-54.
22. **Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G. and Chaves, F., 2009.** Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. 54: 988-997.
23. **Zamuner, S.R., Zuliania, J.P., Fernandes, C.M., Gutierrezb, J.M. and Teixeira, C.D.F.P., 2005.** Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. 46: 806-813.
24. **Zoccal, K.F., Bitencourt, C.S., Sorgi, C.A., Bordon, K.C.F., Sampaio, S.V., Arantes, E.C. and Faccioli, L.H., 2013.** Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. *Toxicon*. 61: 1-10.