دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۷۳۲ – ۷۲۳ (مهر و آبان ۱۳۹۳)

ISMJ 2014;17(4): 723-732

اثر زهر خام ماهی فریاله خال سیاه خلیج فارس (Pseudosynanceia melanostigma) بر روی عوامل هماتولوژیک و سطح سرمی آنزیم‌های موش صحرایی

امیر وزیری‌زاده [۱]، حسین نادری‌منش [۲*]، افشار بارگاهی [۳]، ایرج نبی‌پور [۳]، غلامحسین محبی [۳]

[۱] گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[۲] گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[۳] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۵- پذیرش مقاله: ۹۲/۸/۲۷)

چکیده

زمینه: یکی از ماهیان زهرآگین خلیج‌فارس نوعی سنگ ماهی به نام فریاله خال سیاه (**Pseudosynanceia melanostigma**) است که شناخت بسیار کمی از آن وجود دارد. این ماهی در بسترهای گلی مناطق کم عمق زیست می‌نماید و بر روی بدن سنگ مانند خود دارای خارهایی مجهز به غده‌های زهرآگین است. مسمومیت بیشتر در اثر تماس ناخواسته افراد با آن رخ داده و زهر پروتئینی این ماهی با خار به داخل پوست تزریق می‌گردد. در اثر ورود زهر به بدن علایم و نشانه‌های گوناگونی بروز می‌نمایند که شدت آن‌ها به میزان زهر وارد شده به بدن بستگی دارد. هدف از این بررسی شناخت پاره‌ای از اثرات فارماکولوژیک زهر خام این ماهی جهت پژوهش‌های آتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۸ سر موش صحرایی در سه گروه کنترل و نیز دوم و سوم با تزریق وریدی زهر خام فریاله ماهی به‌ترتیب به میزان یک دوم و یک سوم متوسط دوز کشنده قرار داده شدند و سطح سرمی آنزیم‌های کراتین فسفوکیناز، لاکتات دهیدروژناز، گلوتامات- اگزالواستات ترانس آمیناز، گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز، فسفاتاز قلیایی و آمیلاز، الکترولیت‌های سرم شامل سدیم، پتاسیم و کلسیم و نیز شمارش کامل سلول‌های خونی اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: سطح سرمی آنزیم‌های مورد بررسی و نیز سطح پتاسیم، کلسیم و شمارش گلبول‌های سفید خون در گروهی از موش‌های صحرایی که مورد تزریق زهر خام فریاله ماهی قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه کنترل افزایش چشمگیری یافته ولی (**P<۰/۰۰۱**) سطح هموگلوبین و شمارش گلبول‌های قرمز خون و نیز سطح سدیم سرمی کاهش معنی‌داری را نشان دادند (**P<۰/۰۰۱**).

نتیجه‌گیری: افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی- ماهیچه‌ای و نیز کاهش سطح هموگلوبین خون می‌تواند نشانگر وجود احتمالی رابدومیولیز و همولیز و هپاتوتوکسیسیتی سم فریاله ماهی باشند که بررسی‌های پاتولوژیک و بافتی برای بررسی آسیب‌های حاصله در این سیستم‌ها پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: فریاله خال سیاه، زهر، خلیج فارس، رابدومیولیز، هپاتوتوکسیسیتی

* تهران، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

Email:naderman@modares.ac.ir

مقدمه

دریا اکوسیستمی وسیع و کم شناخته است که به‌عنوان منبعی استثنایی از مواد زیست فعال (bioactive) طبیعی به‌شمار می‌آید؛ به گونه‌ای که در خشکی بندرت یافت می‌شوند. جانوران دریایی هر روز برای غذا و بقا مبارزه می‌کنند و این مبارزه با مواد شیمیایی‌ای انجام می‌شود که منبعی غنی از انواع ترکیبات دارویی است. از سویی، برخی از این مواد می‌توانند خطراتی جدی برای انسان به شمار روند. بیماری‌ها و ناهنجاری‌های مرتبط با زهر (Venom) در همه نقاط جهان از جمله ایران رخ می‌دهند که مسمومیت‌هایی با منشأ جانوران زهری دریایی (Envenomation) جزو این گونه مشکلات بوده و در مواردی می‌توانند خطرات جانی نیز در برداشته باشند. انسان بیشتر با تماس موضعی با این جانوران (نظیر ژله ماهیان، مارهای دریایی و ماهیان زهرآگین) و یا مصرف خوراکی برخی از این موجودات دریایی (ماهیان سمی و برخی از صدف‌ها) دچار مسمومیت می‌گردد. اما به‌دلیل ناشناخته بودن طبیعت سم، تظاهرات بالینی متنوع و نبود دانش کافی در مورد درمان مناسب آن مشکلات فراوانی بروز نموده که نهایتاً می‌توانند خطرات جدی برای انسان تلقی گردند (۳).

جانوران زهری و سمی تقریباً در همه محیط‌های دریایی و قاره‌ها یافت می‌شوند. یکی از گروه‌های مهم جانوری، ماهیان سمی می‌باشند که با جمعیتی معادل ۲۲۰۰۰ گونه، تقریباً نیمی از مهره‌داران را به خود اختصاص داده‌اند (۱). از این رقم، تقریباً ۱۲۰۰ گونه ماهی دریایی شامل سپر ماهیان گزنده، عقرب ماهیان، سنگ ماهیان، گورخر ماهیان، وزغ ماهیان، منجم ماهیان و غیره از ماهیان زهری محسوب می‌شوند (۲). بیشتر این ماهیان، غیرمهاجر و کم تحرک هستند و تمایل به زیست در آب‌های کم عمق دارند (۳). به‌نظر می‌رسد که این تمایل آن‌ها به سمت غیر فعال بودن، با تکامل اندام زهری ارتباط داشته باشد (۴).

فریاله خال سیاه یا سنگ ماهی (Pseudosynanceia melanostigma) از ماهیان بومی خلیج‌فارس است که به‌عنوان یکی از ماهیان زهری محسوب به شمار می‌رود. این ماهی در حدود ۱۸–۱۵ سانتی‌متر طول داشته و دارای ۱۳–۱۲ خار پشتی، ۲ خار سینه‌ای و ۴–۳ خار مخرجی مجهز به غده زهری است (شکل ۱). فریاله بیشتر در بسترهای گلی، مناطق آرام و کم عمق ساحلی زیست می‌نماید. با توجه به شباهت فراوان این ماهی به سنگ و قدرت استتار عالی آن، غالب مسمومیت‌ها در اثر تماس ناخواسته پا یا دست با خارهای این ماهی اتفاق می‌افتد (۵).



شکل ۱) فریاله یا سنگ ماهی خال سیاه خلیج‌فارس

نشانه‌های زنش (Sting) با این ماهی عبارتند از: درد بسیار شدید و آنی که بیشتر از محل زخم شروع می‌شود و به‌صورت تصاعدی در تمام عضو فرد مجروح گسترش می‌یابد. گاهی اوقات فلج عضو مجروح نیز اتفاق می‌افتد. در محل وقوع زخم، بی‌حسی رخ می‌دهد اما پوست اطراف آن به هنگام لمس دردناک می‌باشد. در اطراف زخم حالت

ایسکمی دیده می‌شود که اطراف آن قرمز می‌باشد و سپس منجر به تشکیل تاول، نکروز، قرحه (Ulcer) و قانقاریا (Gangrene) می‌شود. پیرو آن، تورم شدید در موضع نیش به وجود می‌آید. نشانه‌های عمومی این مسمومیت عبارتند از: ضعف عمومی بدن، تعرق شدید، تهوع، استفراغ، اسهال، سر درد، هذیان، آریتمی، کاهش دمای بدن، احساس فشار در قفسه‌ی سینه، تنگی نفس و تشنج. مرگ که در شش ساعت اولیه مسمومیت ممکن است رخ دهد (۵).

بررسی کنونی، نخستین پژوهش در مورد فریاله خال سیاه سواحل آب‌های شمالی خلیج‌فارس می‌باشد و هدف از آن بررسی تأثیر زهر فریاله بر برخی از عوامل هماتولوژیک و بیوشیمیایی در مدل موش صحرایی بوده است تا بتوان بررسی‌های بعدی بر روی این زهر را با دیدی بهتر و در صورت امکان با استفاده از نمونه‌های خون انسانی در افراد مسموم شده توسط این ماهی انجام داد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی فریاله

تعداد ۲۰۰ عدد ماهی فریاله در مدت مرداد تا بهمن‌ماه ۱۳۹۱ از بسترهای گلی مناطق ساحلی استان بوشهر (شکل ۲) به کمک تورترال (Trawl) جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر بر روی یخ در ظرف مخصوص حمل نمونه منتقل گردید.

استخراج و آماده سازی زهر خام

ماهیان صید شده به محض ورود به آزمایشگاه پوست اطراف خارهای پشتی، سینه‌ای و مخرجی جدا و خارهای متصل به غده زهری به کمک قیچی استخوان بر از قاعده بریده شد و به مدت ۲۴ ساعت در محلول کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آنکوبه گردید. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، محلول به‌دست آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل اپندورف R5417 (Eppendorf 5417R) گردیده و سپس محلول رویی جمع‌آوری و به‌عنوان عصاره زهر خام نامیده شد، سپس محلول به‌دست آمده لیوفیلیزه شده و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۶). میزان پروتئین موجود در زهر به روش برادفورد (Bradford) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل پرکین المر (PerkinElmer) آمریکا اندازه‌گیری شد (۷).

الکتروفورز عصاره اولیه سم

برای مشاهده تعداد باندهای پروتئینی در عصاره خام ماهی فریاله توسط الکتروفورز (SDS-PAGE) به‌روش لاملی (Laemmli) (۸) با ژل ۱۲ درصد و از روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (Coomassie brilliant blue) استفاده شد.

اثرات همولیتیک

برای بررسی اثر همولیتیک زهر خام فریاله از روش گارنیه (Garnier) و همکاران استفاده شد (۹). برای سنجش این فعالیت از اریتروسیت‌های شسته شده حاصل از خون موش صحرایی استفاده گردید. در این آزمایش از غلظت‌های ۰۲/۵، ۳/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. در این سنجش از کلرید سدیم به‌عنوان کنترل منفی و از آب مقطر به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان جذب هموگلوبین آزاد شده با استفاده از اسپکتروفتومتر پرکین المر

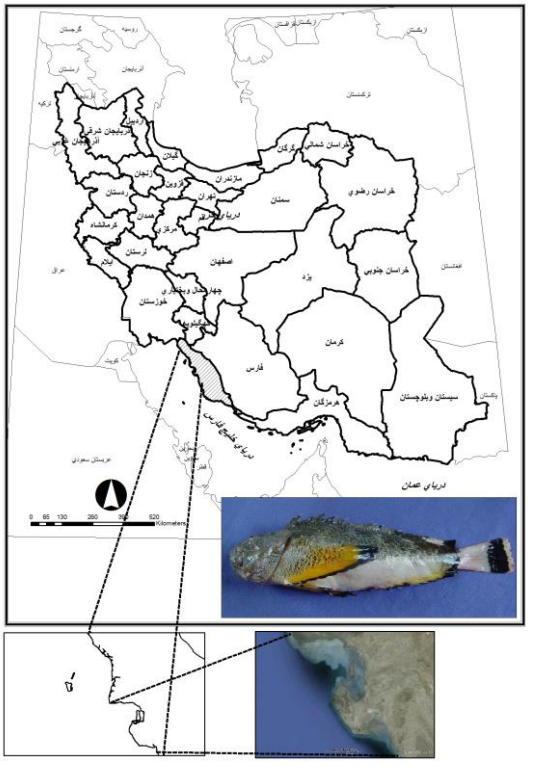
(PerkinElmer) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و نهایتاً درصد همولیز محاسبه گردید.

تعیین متوسط دوز کشندگی

جهت تعیین متوسط دوز کشندگی (LD50) زهر خام از چهار گروه موش صحرایی نر با وزن ۲ ± ۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در هر گروه بر اساس رنگ‌های مختلف نشانه‌گذاری شدند. با تزریق درون وریدی غلظت‌های فزاینده از زهر در حجم کل ۵ میلی‌لیتر از نرمال سالین استریل به ناحیه دم استفاده شد. در آزمایش‌های اولیه ابتدا یک محلول استوک اولیه به غلظت ۵ میلی‌گرم زهر در ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل تهیه شد. سپس غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن تهیه گردید و چهار تزریق ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. دوز زهر برای هر گروه به‌میزان ۱۰۰۰ میکروگرم افزایش یافت تا مرگ ومیر در موش‌ها در طی ۲۴ ساعت به مقدار ۵۰ درصد جمعیت رسید. در پایان برای محاسبه‌ی متوسط دوز کشندگی از روش آماری اسپیرمان-کاربر (Spearman-Karber) استفاده شد (۱۰).

چون موش‌های تزریق شده با ۲۰۰۰ میکروگرم در ۰/۵ میلی‌لیتر بلافاصله تلف شد پس حدود LD50 مشخص گردید که بین ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ میکروگرم می‌باشد. بنابراین از ۱۵۰ شروع کرده و جهت تعیین رقت‌های بعدی عدد فوق را در ضریب ثابت ۱/۲۵ ضرب می‌کنیم که به‌ترتیب عبارتند از ۱۵۰۰، ۱۹۰۰، ۲۳۰۰ و ۲۹۰۰ میکروگرم. سپس جهت محاسبه متوسط دوز کشندگی از فرمول زیر استفاده گردیده است.

$$\frac{50\% - lower\ of\ 50\%}{upper\ 50\% - lower\ of\ 50\%} \times \log 1.25 (constant)$$



شکل ۲) نقشه نواحی نمونه‌برداری سنگ ماهی (فریاله خال سیاه) خلیج‌فارس

مطالعات آنزیمی

در این بخش از بررسی ۱۸ سر موش صحرایی نر با وزن ۲۰±۲۰۰ گرم انتخاب و به سه گروه شش‌تایی تقسیم گردید. گروه اول به‌عنوان کنترل، گروه دوم و سوم نیز به جهت تزریق زهر به‌ترتیب به میزان یک دوم و یک سوم متوسط دوز کشنده (۱/۲LD۵۰ و ۱/۳LD۵۰) انتخاب گردید. به گروه کنترل فقط آب مقطر استریل به‌صورت داخل وریدی تجویز گردید. آنگاه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر نگهداری شدند. در این مرحله موش‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت پرهیز غذایی داده شدند و فقط آب آشامیدنی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. پس از اتمام ۲۴ ساعت ابتدا با اتر بیهوش و سپس کشته شده و خون آن‌ها

پس از باز نمودن قفسه سینه و قطع آئورت در لوله‌های مخصوص سانتریفیوژ جمع‌آوری و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس خون مورد نظر به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰×g سانتریفیوژ شده تا سرم خون به دست آید. پس از تهیه سرم بلافاصله به سنجش آنزیم‌های کراتین فسفوکیناز (CPK)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز سرم (SGOT)، گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT)، فسفاناز قلیایی (ALP) و آمیلاز (AMY) توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل RA–۵۰) اقدام گردید.

بررسی الکترولیت‌های سرم

پس از تهیه سرم با روش بالا، غلظت الکترولیت‌هایی مانند سدیم، پتاسیم و کلسیم توسط دستگاه اتوآنالایزرمدل بک من (Beckman) مورد سنجش قرار گرفتند (جدول ۳).

اثرات هماتولوژیک

بخشی از خون گرفته شده از موش‌های مورد آزمایش در لوله‌های محتوی ماده ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری و برای بررسی عوامل هماتولوژیک توسط دستگاه اتوآنالایزر هماتولوژی مدل سیسمکس (Sysmex XE-5000) به آزمایشگاه ارسال گردید (جدول ۴).

روش‌های آماری

برای آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA) ویرایش ۲۰ استفاده گردید. از روش آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون‌های دانت (Dennett's test) و توکی (Tukey's test) برای تعیین سطح معنی‌داری داده‌های به‌دست آمده استفاده شد.

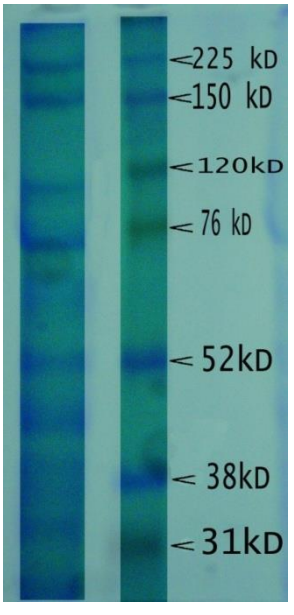
یافته‌ها

میزان پروتئین

بر اساس روش برادفورد میزان پروتئین موجود در زهر خام فریاله در حدود ۱۸/۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

الکتروفورز تک بعدی

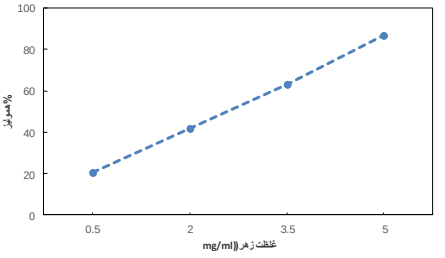
الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) عصاره اولیه یا زهر خام ماهی فریاله بر روی ژل پلی‌آکریل آمید با غلظت ۱۲ درصد متشکل از هفت باند پروتئینی بوده که از وزن مولکولی ۳۱ تا ۲۲۵ کیلودالتون را در بر می‌گیرند (شکل ۳).



شکل ۳) الکتروفوروگرام زهر خام ماهی فریاله بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد اعداد موجود در سمت راست مربوط به مارکر وزن مولکولی پروتئین می‌باشد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از کوماسی بلو انجام شد.

اثر همولیتیک بر روی اریتروسیت‌های شسته شده‌ی موش صحرایی

زهر خام، اثر معناداری بر روی اریتروسیت‌های شسته شده‌ی موش صحرایی، از خود نشان داد و با افزایش غلظت زهر میزان همولیز نیز افزایش پیدا کرد. حداکثر درصد همولیز در این بررسی ۹۱ درصد بود که مربوط به غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (نمودار ۱). اثر همولیتیک زهر به اریتروسیت‌های شسته شده‌ی موش صحرایی، وابسته به دوز بود.



نمودار ۱) اثر همولیتیک زهر ماهی فریاله خال سیاه بر اریتروسیت های موش صحرایی. اعداد درج شده در نمودار به‌صورت میانگین و مقدار P در سطح ۱ درصد (آزمون توکی) معادل صفر می‌باشد.

متوسط دوز کشندگی

متوسط دوز کشندگی محاسبه شده با استفاده از روش اسپیرمان- کاربر معادل ۳۹۸۱±۹۹۵ میکروگرم (۳/۹۸۱ میلی‌گرم) به ازای کیلوگرم وزن بدن می‌باشد.

آنزیم‌های سرمی

مقادیر آنزیم‌های مورد بررسی در گروه‌های آزمایشی موش‌های صحرایی در جدول ۱ درج شده‌اند. همان‌گونه که آشکار است تزریق زهر به میزان یک دوم و یک سوم متوسط دوز کشنده با افزایش سطح سرمی CPK، LDH، SPGT،SGOT، فسفاتاز قلیایی و آمیلاز سرمی توأم بوده است.

جدول ۱) تغییرات غلظت آنزیم‌های سرمی موش صحرایی پس از تزریق زهر خام ماهی فریاله خال سیاه

آنزیم	کنترل	½ LD_{50}	1/3 LD_{50}
کراتین فسفوکیناز	۳۰/۲۷±۲/۵	۸۶/۲۳±۲/۱***	۷۵/۴۴±۱/۱۲۵***
لاکتات‌دهیدروژناز	۱۷۶/۲۵±۵/۵	۱۷۲۵/۴±۳/۵***	۱۱۲۵±۲/۵***
گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز	۳۰/۱۷±۲/۷	۳۲۴/۵±۲/۳۴***	۲۲۵/۷±۱/۱۲***
گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز	۴۴/۳۵±۴	۷۲۵/۷±۳/۴۱***	۵۸۶/۵±۲/۴۵***
فسفاتاز قلیایی	۶۱/۲۲±۳/۴	۱۳۶/۵±۴/۲۵***	۱۱۲/۶۵±۱/۲۵***
آمیلاز	۱۰۵/۴۱±۴/۵	۱۸۴۵±۲/۵۱***	۱۴۳۴/۳۲±۱/۳۲***

***P در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد (آزمون دانت) اعداد به صورت (انحراف معیار ±میانگین) درج شده‌اند.

الکترولیت‌های سرم خون موش صحرایی

مقادیر الکترولیت‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم در گروه‌های آزمایشی موش صحرایی در جدول ۲ درج شده‌اند. تزریق زهر به میزان یک دوم و یک سوم متوسط دوز کشنده با افزایش پتاسیم،و کلسیم سرمی و کاهش سدیم سرم همراه بوده است.

جدول ۲) تغییرات غلظت الکترولیت‌های سرم پس از تزریق زهر خام ماهی فریاله خال سیاه

گروه / پارامتر	سدیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	پتاسیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر)	کلسیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر)
کنترل	۱۵۲/۵±۰/۲۶۸	۷/۱±۰/۰۴	۱۳/۱±۰/۰۷
½ LD_{50}	۱۳۲/۵±۰/۴۱	۱۵/۲۵±۰/۰۶	۱۶/۴±۰/۰۳
1/3 LD_{50}	۱۴۸/۲±۰/۶	۱۰/۸±۰/۰۴	۱۴/۷±۰/۰۲

*** مقدار (P۰/۰۰۱>). (آزمون دانت) اعداد به صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشند.

عوامل هماتولوژیک خون موش صحرایی

گلبول‌های سفید (WBC)، گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم گویچه‌ای (MCV)، میانگین هموگلوبین گویچه‌ای (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ای (MCHC) و هماتوکریت (HCT) در گروه‌های آزمایشی موش‌های صحرایی در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. تزریق زهر به میزان یک دوم و یک سوم متوسط دوز کشنده با

کاهش هماتوکریت، هموگلوبین، میانگین حجم گویچه‌ای و توده‌ی گلبول‌های قرمز همراه بوده، در حالی که تزریق این مقادیر زهر با افزایش گلبول‌های سفید توأم بوده است.

جدول ۳) تغییرات پارامترهای هماتولوژیک خون پس از تزریق زهر خام ماهی فریاله خال سیاه

پارامتر / گروه	RBC (Million/mm^3)	WBC (Million/mm^3)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	%HCT
کنترل	۳/۵۱±۰/۰۶	۴/۱۲±۰/۰۴	۱۵/۲±۰/۰۷	۵۵/۲±۱/۵	۱۹/۵±۰/۸	۳۵/۲±۲/۷	۴۳/۵±۴/۱۲
½ LD_{50}	۲/۵۲±۰/۰۸**	۶/۱۶±۰/۰۵**	۶/۸±۰/۰۴**	۳۷/۴۵±۰/۸***	۱۶/۳±۰/۴۳*	۳۳/۵±۰/۵۶	۲۵/۵±۰/۶۱***
1/3 LD_{50}	۲/۸۱±۰/۰۴**	۵/۴۱±۰/۰۹**	۸/۲±۰/۰۸**	۳۹/۲۲±۰/۴۱***	۱۶/۹±۰/۲**	۳۲/۱۲±۰/۳	۲۷/۴±۰/۲۵***

** مقدار p در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ ***مقدار p در سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱ (آزمون دانت)

بحث

بر اساس الکتروفورز به‌دست آمده مشخص می‌گردد که زهر این نوع ماهی دارای ماهیت پروتئینی است و از اجزای گوناگونی تشکیل یافته است و میزان پروتئین به‌دست آمده از مقدار بالایی برخوردار می‌باشد (شکل ۳). که بیانگر قدرت زهری و ویژگی‌های فارماکولوژیک متنوع می‌باشد. یافته‌های به‌دست آمده با نتایج پژوهشگرانی چون وینر، ساندرز (Wiener & Saunders) و همکاران هم‌خوانی دارند (۱۱ و ۱۲).

خون در واقع بازتابی کلی از وضعیت سلامت جانوران می‌باشد و نماهای مهمی را برای بررسی اثرات سم شناختی فراهم می‌آورد. بررسی عوامل هماتولوژیک و آنزیم‌های موجود در سرم و پلاسما نمودی از اثرات پاتولوژیک انواع زهرها و توکسین‌ها در بدن می‌باشد.

افت تعداد گلبول‌های قرمز و نیز کاهش هموگلوبین و هماتوکریت موش‌های مسموم شده با زهر فریاله نسبت به موش‌های کنترل، نشان دهنده بروز کم خونی در موش‌های مورد آزمون بوده با یافته‌های بررسی‌های in vitro که اثر زهر نیز بر روی اریتروسیت‌های موش صحرایی مورد آزمایش هم راستا می‌باشد (شکل ۴). این یافته‌ها با نتایج حاصل از آزمایش لینگ (Ling) با زهر سنگ ماهی و همچنین آبیرامی (Abirami) و همکاران با زهر گربه ماهی مطابقت دارند (۱۳ و ۱۴). سنجش کمی برخی از آنزیم‌های سرم و پلاسما و دیگر ترکیبات شیمیایی از اهمیت ویژه‌ای در تشخیص عمومی نکروز سلولی و تخریب عضلانی برخوردار می‌باشد؛ به‌عنوان مثال آنزیم کراتین فسفوکیناز در عضلات اسکلتی و قلبی موجود است و مقدار بالای آن در انفارکتوس میوکاردی، دیستروفی عضلانی، و سکته مغزی دیده می‌شود. مشابه این حالت در مورد آنزیم‌های گلوتامات- اگزالواستات ترانس آمیناز، گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز، لاکتات دهیدروژناز، فسفاتاز قلیایی و آمیلاز (آنزیم‌های کبدی، مغزی و عضلانی) دیده می‌شود به گونه‌ای که بالا بودن مقادیر آن‌ها در انفارکتوس قلبی، سیروز کبدی، هپاتیت حاد و مزمن، گلومرونفریت، پانکراتیت حاد و نکروز عمومی بافت اتفاق می‌افتد (۱۵).

نتایج حاصل از این بررسی (جدول ۲) در مدل موش صحرایی، نشانگر مقادیر بالای کراتین فسفوکیناز، لاکتات دهیدروژناز، گلوتامات- اگزالواستات ترانس آمیناز، گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز و فسفاتاز قلیایی می‌باشد. این امر بیانگر نکروز یا تخریب سلولی و رابدومیولیز یا تخریب بافت عضلات می‌باشد.

همچنین بالا بودن آنزیم‌های کبد و فسفاتاز قلیایی نیز بیانگر هپاتوتوکسیسیتی است و بالا بودن آمیلاز سرم نیز ممکن است به پانکراتیت دلالت نماید. یافته‌های بالینی، بافت شناختی و فارماکولوژیک خو (Khoo) و همکاران، ساندرز و همکاران، دوهیگ (Duhig) و جونز (Jones)، آوستین (Austin) و همکاران، وینر و لوپز–فریرا (Lopes-Ferriera) و همکاران همه مؤید یافته‌های ما در این پژوهش می‌باشند که همگی بر روی زهر ماهیان دریایی به ویژه سنگ ماهی کار کرده‌اند (۱۹–۱۶).

میزان سدیم، پتاسیم و کلسیم خون موش‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تغییر داشته و میزان سدیم کاهش و مقادیر پتاسیم و کلسیم افزایش داشته‌اند. بنا به نظر میر (Meier) و استاکر (Stocker) چنین اختلالی در الکترولیت‌های سرم خون می‌تواند به دلیل بروز نفروپاتی حاد باشد (۲۰).

این اختلال بر اساس نظر محمد و همکاران بر اثر فرآیند تحریک بخش قشری غدد فوق کلیه بوده که خود می‌تواند منجر به ترشح آلدوسترون و بروز چنین اختلالی گردد (۲۱). علاوه‌بر این، تخریب عضلات اسکلتی و میوکاردی نیز می‌تواند یکی از دلایل این رخداد باشد (۲۲).

میزان پتاسیم سرم خون در بررسی کنونی از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است (جدول ۳). پتاسیم یکی از الکترولیت‌های مهم خون برای عملکرد مطلوب تمام سلول‌های بدن محسوب می‌شود. این الکترولیت همچنین در انتقال جریان الکتریسیته در بدن نقش مهمی ایفا می‌کند. چنانچه میزان این الکترولیت در خون بالا باشد می‌تواند بیانگر نارسایی کلیه باشد. یکی دیگر از دلایل افزایش پتاسیم، تخریب سلول‌های آزاد کننده پتاسیم در خون می‌باشد زیرا قسمت اعظم پتاسیم در سلول‌ها متمرکز می‌باشد (۲۳).

یکی از فرضیات بیان شده برای اثر لیز کنندگی زهر فریاله ایجاد منفذ (Pore) بر روی غشای سلول بوده (۲۴) که همین امر باعث تخریب سلول و خروج بسیار سریع پتاسیم می‌باشد به گونه‌ای که کلیه‌ها قادر به باز جذب آن نمی‌باشند (۱۴).

افزایش کلسیم در بررسی پیش رو پس از تجویز زهر در موش‌های صحرایی را با دانسته‌های کنونی نمی‌توان توجیه نمود. بررسی‌های مارگزیدگی نشان داده‌اند که سطح سرمی کلسیم در افراد مار گزیده با سطوح نرمال قابل مقایسه است و اندازه‌گیری کلسیم نمی‌تواند بیانگر شدت مارگزیدگی باشد (۲۵). هر چند در بررسی کنونی هیپوناترمی پاتولوژیکی پس از تجویز زهر فریاله ماهی مشاهده نشد ولی کاهش سطح سرمی سدیم در مقایسه با گروه کنترل می‌تواند وجود فعالیت پپتید ناتریورتیک (Natriuretic) در زهر باشد که در پاره‌ای از زهرهای مارها مشاهده شده است و می‌تواند موجب دفع سدیم و افزایش ادرار شود (۲۶).

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده از این پژوهش بیانگر وجود خواص فارماکولوژیک گوناگون در زهر این نوع ماهی می‌باشد و با توجه به اینکه پژوهش پیش‌رو نخستین بررسی بر روی زهر این گونه از سنگ ماهی محسوب می‌گردد، بنابراین می‌تواند رهنمودی جهت انجام سایر پژوهش‌ها باشد. چنانچه چنین پژوهشی به همراه بررسی‌های بافت‌شناسی صورت پذیرد یافته‌های به‌دست آمده از آن می‌توانند راهگشای بسیاری از پژوهش‌های هیستوپاتولوژیک بعدی نیز باشد و به شناخت بهتر مکانیسم عملکرد زهر و استفاده‌های دارویی و نیز شیوه‌های درمانی و چگونگی تجویز بالینی ضد زهر آن کمک فراوانی کند.

References:

1.Nelson JS. Fishes of the World, 12th ed. New York: Wiley; 2010: p. 308-327.
2.Smith w, Wheerkr WC. Venom evolution widespread in fishes: A Phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. Journal of Heredity 2006; 97:206-217.
3.Maretic Z. Marine toxins and venoms. In: Tu A.T.editor, Handbook of Natural Toxins, 10th ed. New York: Marcel Dekker; 1988: p. 379-444.
4.Cameron AM and Endean R. Epidermal secretions and the evolution of venom glands in fishes. Toxicon 1973; 11:401-410.
5.Smith JLB. A case of poisoning by the stonefish, Synanceja verrucosa. Copeia 1951; 3:207-210.
6.Siddiq A. Characterization of venom proteins from two species of scorpionfish group; Hypodytes rubripinnis & Synanceja verrucosa. International Center of Chemical and Biological Sciences: Karachi University; 2002.
7.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
8.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
9.Garnier P, Goudey-Perriere F, Breton P, et al. Enzymatic properties of the stonefish (Synanceja verrucosa Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. Toxicon 1995; 33:143-155.
10.Spearman – Karber R. Alternative methods of analysis for quantal responses. In: Finney, D. editor, Statistical Method in Biological Assay. 6th ed. London: Charles Griffin; 1978: p. 524-549.
11.Wiener S. Observations of venom of the stonefish (Synanceja trachinys). Med J Aust 1959; 1:620-627.
12.Saunders PR, Rothman S, Medrano VA, et al. Cardiovascular actions of venom of the stonefish Synanceja horrida. Am physiol 1962; 203:429-432.
13.Ling SKK, Cheng SC, Yen CH. Stone fish envenomation with acute carpal tunnel syndrome. Hong Kong Medical Journal 2009; 15(6):471-473.
14.Choudhary A, Pandey P. Effect of catfish venom on haematological parameters in albino rat. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 2013; 3(1):9-15.
15.Rodwell VM. Enzymes: General properties. In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell V.M.editors, Harper's Biochemistry. 29th ed. New York: McGraw Hill; 2012: p. 58-67.
16.Khoo HE, Yuen R, Poh CH, et al. Biological activity of Synanceja horrida (Stonefish), venom. Natural Toxins 1992; 1:54-60.
17.Duhig JV, Jones G. Haematoxin of the venom of Synanceja horrida. Aust. J.exp.Biol 1928; 5:173-179.
18.Austin L, Gillis RG, Youatt G. Stonefish venom: some biochemical and chemical observations. Aust. J.exp.Biol 1965; 43:79-90
19.Lopes-Ferreira M, Barbaro KC, Cardoso DF, et al. Thalassophryne nattereri fish venom: Biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities.Toxicon 1998; 36:405-410.
20.Meier J, Stocker K. Effect of snake venoms on homeostasis. Toxicolog 1991; 21(3): 171-1820.
21.Mohamed AH, Foaud S, Abbas F, et al. Metabolic studies of the Egyptian and allied African snake venoms. Toxicon 1980; 18:381 – 383.
22.Al-Jammaz IA. Effects of single doses of Bitis arietans crude venom on serum. Scientific Journal of King Faisal University 2001; 2(1): 103-112.
23.Shiomi K, Hosaka M, Fujita S, et al. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. Journal of Marine Biology 1989, 103(8): 285-289.
24.Church JE, Hodgson WC. The Pharmacological activity of fish venoms. Toxicon 2002, 40:1083-1093.
25.Pradeep KM, Basheer MP. Snake bite: Biochemical changes in blood after envenomation by viper and cobra. Journal of Medical & Allied Sciences 2011, 1(1):36-41.
26.Trinh KX, Khac QL, Trinh LX. et al. Hyponatremia,rhabdomyolysis,alterations in blood pressure and persistent mydrisis in patients envenomed by Malayan kraits (Bungarus candidus) in southern Viet Nam. Toxicon 2010, 56(6):1070-1075.

ISMJ 2014; 17(4): 723-732

Original Article

Impacts of Persian Gulf blackfin stonefish crude venom on the haematological factors and serum enzymes levels of laboratory rat

A. Vazirizadeh [1], H. Naderi-Manesh [2*], A. Bargahi [3], I. Nabipour [3], GH. Mohebbi [3]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[2] Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[3]The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, Bushehr University of Medical Sceince, Bushehr, IRAN

(Received 6 Jul, 2013 Accepted 18 Nov, 2013)

Absract

Background: One of the venomous fishes of Persian Gulf is a type of stonefish called blackfin stonefish (Pseudosynanceia melanostigma) that is very poorly-known. This fish lives on the muddy bottoms of marine shallow waters and have venomous spines on its stone like body. The envenomation usually is happened by unwanted contact of human body to its body and the proteinic venom is injected into the skin. Upon the venom entrance to the body various symptoms and signs will occur that their intensity depends on the venom amount.The aim of study is the understanding of some pharmacological impacts of blackfin stonefish for future studies.

Material and Methods: A total of 18 male laboratory rats were divided into three groups of control, second and third and envenomed by sub lethal doses (1/3 LD50 and ½ LD50) intravenously and the serum enzymes namely Creatine Phosphokinase, Lactate Dehydrogenase, Glutamate-Oxaloacetate Transaminase, Gamma-Glutamyl Transpeptidase , Alkaline Phosphatase and Amylase, serum electrolytes namely Sodium. Potassium and Calcium and also complete blood cells of control and experimental rats were measured.

Results: The serum enzymes levels, potassium and calcium levels and withe blood cells count in envenomed rats by blackfin stonefish crude venom in compare with control rats had significant increase while the haemoglobin level, red blood cells count and also serum sodium level had significant decrease ($p<0.001$).

Conclusion: The increase in hepatomascular enzyme levels, and the decrease in haemoglobin level can be a probable marker of the presence of rhabdomyolysis, haemolysis and also hepatotoxicity activities in the blackfin stonefish venom and that needs to the histopathologic studies in these systems.

Key words: Blackfin stonefish, Venom, Persian Gulf, Rhabdomyolysis, Hepatotoxicity

***Address for correspondence**: Department of Biophysics, Faculty of Biological Scienences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN, E-mail: naderman@modares.ac.ir