

استخراج، بررسی، تعیین LD50 و درصد پروتئین زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) خلیج فارس - خوزستان

چکیده

برای مطالعه بیوتوکسین‌های خانواده عقرب‌ماهیان (*Scorpaenidae*) که از خطرناک‌ترین ماهیان زهرآگین جهان در آب‌های گرمسیری، بویژه در خلیج فارس هستند، انگیزه‌های عملی بسیار زیادی وجود دارد، اولاً آن‌ها از نظر زیستی بسیار فعال بوده و بنابراین از نظر پژوهش‌های زیست پزشکی و یا تولید داروها و فرآورده‌های بیولوژیک، مفید می‌باشند. ثانیاً چنین بیوتوکسین‌هایی اثرات منفی یا دفعی قابل توجهی بر روی موجودات زنده جوامع دریایی از خود نشان داده و تعداد زیادی از موجودات دریایی با داشتن چنین بیوتوکسین‌هایی، تهدید جدی برای انسان محسوب می‌شوند. برای انجام این مطالعه که از اردیبهشت تا اسفند ماه سال ۱۳۹۸ انجام گرفته، تعداد ۲۰۰ عدد سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) با میانگین طول ۱۷-۱۲ سانتی‌متر و وزن نسبی ۱۶۰-۱۰۰ گرم از خلیج فارس صید و در آزمایشگاه پس از استخراج سم اقدام به خالص‌سازی، اندازه‌گیری پروتئین و تعیین LD50 آن به عنوان اساسی‌ترین اطلاعات برای بررسی اولیه زهر این گونه ماهیان (به عنوان هدف از این مطالعه) گردید. نتایج این بررسی نشان داد که زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) خلیج فارس از زهرهای بسیار خطرناک برای سلامتی و بهداشت انسان‌ها با LD50 معادل ۱۸۵ و درصد پروتئین ۲/۲۷۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: عقرب‌ماهیان، سنگ‌ماهی خال‌سیاه، فریاله، خلیج فارس، LD50، درصد پروتئین.

ابوذر فتحی^{۱*}

علیرضا فروزان^۲

هدیه جعفری^۳

۱. کارشناس بخش جانوران سمی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ایران، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور - اهواز، اهواز، ایران
۳. عضو هیئت علمی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور - اهواز، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات:

Abouzar_fathi@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۱۰۸۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۲

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

مقدمه

مبارزه دائم موجودات دریایی برای تغذیه و بقای خود از الزامات زندگی آنها می‌باشد. لازمه این دفاع از خود و بقایشان، وجود ترکیبات شیمیایی است که در بدن و برخی اندام‌های آنها به ودیعت گذاشته شده است. این ترکیبات شیمیایی که ما به صورت زهر با آن مواجه می‌گردیم در عین حالیکه سلامتی و بهداشت انسان‌ها را به مخاطره می‌افکند، منبع بالقوه‌ای از ترکیبات دارویی برای درمان بیماری‌های صعب‌العلاج می‌باشد (Bhakuni and Rawat, 2005; Ziegman and Alewood, 2015).

دانشمندان زهرشناسی و ماهی‌شناسی حدود ۲۰۰۰ نمونه جانور زهرآگین در آب‌های دریایی جهان را بررسی و گزارش کرده‌اند که این جانوران از سه طریق نیش زدن، گاز گرفتن و یا به صورت نماتوسیست (یاخته‌های گزنده) موجب مسمومیت و مسمومیت زهری در انسان و یا موجودات دریایی می‌گردند (Sitprija and Sute Parak, 2008; Ziegman and Alewood, 2015).

دانشمندان علاقه بسیار زیادی برای مطالعه بیوتوکسین‌های چنین موجودات دریایی دارند، زیرا این بیوتوکسین‌ها از نظر زیستی بسیار فعال بوده و بنابراین از نظر پژوهش‌های زیست پزشکی و یا تولید داروها و فرآورده‌های بیولوژیک، مفید می‌باشند و عرصه‌ای برای کشف مواد شیمیایی زیست فعال جدید یا ترکیبات بیودینامیک و با ارزش درمانی فوق‌العاده برای بشر می‌باشد. ثانیاً چنین بیوتوکسین‌هایی اثر قابل توجهی بر روی موجودات زنده جوامع دریایی از خود نشان داده ولی این کنش تعداد زیادی از موجودات دریایی می‌تواند خطر بالقوه و تهدیدی برای سلامت انسان محسوب شوند (Bhakuni and Rawat, 2005; Ziegman and Alewood, 2015).

همان‌گونه که ذکر گردید تعداد زیادی از گونه‌های موجودات دریایی تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می‌شوند که این موضوع ناشی از گزش، ایجاد جراحت، نیش زدن و یا وجود مواد سمی در گوشت، خون و ... آنها می‌باشد. در چند دهه گذشته پژوهش در زمینه زهرشناسی زیستی ماهیان، ابعاد جدیدی پیدا کرده است. مطالعه انواع و گونه‌ها، طبیعت، منبع و خصوصیات زهرماهیان زهری و وضعیت حاکم بر زهری بودن آنها مباحث مورد علاقه در این زمینه می‌باشند. موضوع منبع اکتسابی زهری بودن ماهی نه تنها برای اطلاعات مربوط به پادزهرها از اهمیت برخوردار است، بلکه عرصه‌ای برای کشف مواد شیمیایی زیست فعال جدید یا ترکیبات بیودینامیک و با ارزش درمانی فوق‌العاده بر روی بشر باز نموده است (ذوالفقاری، ۱۳۹۵؛ Khalil et al., 2017).

ماهیان زهری از نظر مکانیسم و نحوه اثر زهر به دو گروه تقسیم شده‌اند (Halstead, 1970; Concon, 1988):

الف) گروه ماهیان سمی که وقتی به مصرف می‌رسند باعث مسمومیت انسان می‌شوند، به عبارت دیگر سم در بدن و عضلات آنها وجود دارد.
ب) ماهیان زهری یا خارزهری که به وسیله ساختارهای غده‌ای مجهز به اندام‌های زخم زنده با تزریق زهر، تولید جراحت و یا بیماری می‌نمایند. از گروه‌های مهم جانوری، ماهیان هستند که با جمعیتی معادل ۲۲۰۰ گونه تقریباً نیمی از مهره‌داران روی زمین را شامل می‌شوند (Nelson, 2010؛ وزیری‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳). از این تعداد، حدود ۱۲۰۰ گونه ماهی دریایی زهری هستند که شامل سپرماهیان گزنده، عقرب‌ماهیان، گورخرماهیان، سنگ‌ماهیان، وزغ‌ماهیان، منجم‌ماهیان و گونه‌هایی از کوسه‌ها، موش‌ماهیان، جراح ماهیان و می‌باشند (Smith and Wheeler, 2006). بیشتر این ماهیان غیرمهاجر و کندحرکت بوده و تمایل به زندگی در آب‌های کم‌عمق و زیستگاه‌های حفاظت شده دارند (Maretic, 1988). به نظر می‌رسد که تمایل به سمت کم‌حرکتی، رابطه نزدیکی با تکامل اندام زهری آنها دارد (Cameron and Endean, 1973).

مکانیسم‌های زهرآگین در طول میلیون‌ها سال در اندام‌های تخصصی ارگانیسم‌های دریایی اعم از ساده‌ترین جانداران تا جانوران تکامل یافته‌تر برای رویارویی با چالش‌های زیستی خود در دریا و حفاظت آنها از خطر دشمنان و بقای این نوع از جانداران ایجاد و تکامل یافته است. بدین جهت است که شناسایی این جانداران زهری و خصوصیات و مکانیسم اثر زهر آنها و همچنین آشنایی با خطرات ناشی از جانوران خطرناک و زهرآگین دریا برای انسان‌ها با توجه به اینکه مسمومیت‌های ایجاد شده توسط این ماهی‌ها در سواحل جنوبی کشور یکی از معضلات بهداشتی محسوب می‌شود که سلامت افراد به ویژه جامعه صیادی را تهدید می‌کند، ضروری و الزامی می‌باشد (نبی‌پور، ۱۳۹۱).

با عنایت به اینکه این گونه ماهی‌ها، بومی حوزه آبریز اقیانوس هند غربی و خلیج فارس محسوب می‌شود، لذا مطالعه کامل و بررسی خصوصیات و ترکیبات زهر آنها می‌تواند زمینه تولید پادزهر بومی جهت مقابله با مسمومیت‌های ناشی از آن‌ها را فراهم سازد و علاوه بر آن به ایجاد اشتغال و تجاری‌سازی کمک شایانی نماید، زیرا پادزهرهای موجود در مراکز درمانی جنوب کشور از نوع غیربومی بوده و ساخت کشورهای مشترک المنافع اقیانوسیه می‌باشند و این گونه ماهی با گونه‌های بومی ماهی‌های این کشورها تفاوت عمده‌ای دارد، انجام چنین مطالعه‌ای می‌تواند نقطه عطفی در جهت مراحل کامل‌تر ساخت پادزهر باشد. لذا هدف از انجام این مطالعه، اندازه‌گیری پروتئین و تعیین LD50 آن به عنوان اساسی‌ترین اطلاعات برای بررسی اولیه زهر این گونه ماهیان و مطالعات بعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه که از اردیبهشت تا اسفند ماه سال ۱۳۹۸ انجام گرفته، تعداد ۲۰۰ عدد سنگ ماهی خال‌سیاه (فریاله) با میانگین طول ۱۷-۱۲ سانتی‌متر و وزن نسبی ۱۶۰-۱۰۰ گرم، از بسترهای گلی مناطق ساحلی استان خوزستان (شهرستان هندیجان) جمع‌آوری و با کمک تور ترال از آب‌های خلیج فارس صید و زنده‌گیری شده، بوسیله مخزن و ظرف مخصوص حمل نمونه ماهی مجهز به کپسول اکسیژن در جوار یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به آزمایشگاه موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور- اهواز منتقل گردیدند.

بلافاصله پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، پوست اطراف خارهای پشتی، سینه‌ای و مخرجی جدا و خارها در حالیکه غده زهری به آنها متصل بود، با استفاده از قیچی استخوان‌بر از قاعده بریده شد و به مدت ۲۴ ساعت در محلول کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از یک شبانه‌روز محلول بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور $12000 \times g$ سانتریفیوژ یخچال دار مدل اپندورف R5417 سانتریفیوژ گردیده و سپس محلول رویی که همان عصاره زهر خام است جمع‌آوری گردید.

برای جد سازی نمک‌ها، عصاره زهر خام در آب مقطر حل گردید. سپس محلول به داخل کیسه مخصوص دیالیز با اندازه منافذ ۲۲ کیلو دالتون مارک سیگما منتقل شد. کیسه دیالیز حاوی محلول زهر درون بشر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و آب داخل بشر در طی این مدت چندین بار تعویض شد. پس از اتمام این دوره، زهر دیالیز شده جمع‌آوری و لیوفیلیزه شد (بابایی و همکاران، ۱۳۹۳).

روش‌های بسیاری برای اثبات ماهیت پروتئین موجود در یک محلول و تعیین ویژگی‌های آن وجود دارد که از بین آنها می‌توان انواع کروماتوگرافی‌ها، الکتروفورز SDS-PAGE، نقشه‌برداری پپتیدی، آزمایش برادفورد، آزمایش لووری، وسترن بلاتینگ و انواع طیف‌سنجی را نام برد. در مطالعه حاضر از روش طیف‌سنجی فرابنفش- مرئی برای اندازه‌گیری مستقیم در صد پروتئین زهر ماهی استفاده شده است. ۵ میلی‌گرم زهر خشک سنگ‌ماهی خال‌سیاه را در ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین حل کرده و این محلول به عنوان استوک اصلی زهر مورد استفاده قرار گرفت.

۵۰ میلی‌گرم از پودر آلبومین گاوی یا BSA (Albumin Bovine V شرکت Solarbio) در ۱۰ میلی‌لیتر نرمال سالین حل کرده و با استفاده از آن، رقت‌های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم از استوک اصلی زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه تهیه گردید (Bradford, 1976).

اسپکتروفوتومتر در محدوده طول موج فرابنفش ۲۸۰ نانومتر تنظیم گردید. سپس هر یک از رقت‌های سریالی آماده شده به شرح فوق‌الذکر، به ترتیب از رقیق به غلیظ (ابتدا لوله شماره ۴ و بعد از آن لوله‌های دیگر) در اسپکتروفوتومتر قرار داده و میزان جذب نوری آنها قرائت گردید. با قرار دادن بالاترین شدت جذب نور هر یک از رقت‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به صورت متناظر در مقابل غلظت پروتئینی هر یک از آنها روی نمودار استاندارد، منحنی رگرسیون خطی نقاط حاصله بدست آمد.

متعارف‌ترین شاخص که برای بیان میزان سمیت یک ماده استفاده می‌گردد، LD50 یا همان دوز کشنده ۵۰ درصد از حیوانات تحت آزمایش (موش) است. در این روش مقادیر تزریقی به صورت عمودی و افزایشی مرتب شده و نتایج در ستون‌های مجاور آنها درج می‌گردد. در مطالعه حاضر به منظور تعیین متوسط دوز کشندگی زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه از روش Reed- Muench استفاده شده است.

آزمایشات تعیین سمیت مبتنی بر یافتن محدوده وزنی یا غلظت کشنده ماده مورد آزمایش و محاسبات آماری مربوطه است. در این آزمایشات ابتدا باید تست اولیه‌ای برای پیدا کردن محدوده چیش سری رقت‌ها انجام گیرد. این تست اولیه که به آن Rough test گفته می‌شود بر روی تعداد محدودی از حیوانات آزمایشگاهی (موش آزمایشگاهی ۲۰-۱۸ گرمی) انجام می‌شود.

برای انجام این کار ابتدا با استفاده از نرمال سالین یک محلول استوک اولیه حاوی ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه ساخته شد. سپس غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در ۰/۵ میلی‌لیتر از آن تهیه گردید. از این محلول شش غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. از هر غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر به هر موش سوری ۲۰-۱۸ گرمی (هر گروه دو موش سوری) به صورت داخل وریدی تزریق گردید

استخراج، بررسی، تعیین LD50 و درصد پروتئین زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) خلیج فارس - خوزستان / فتحی و همکاران

تا حدود LD50 زهر سنگ‌ماهی خال سیاه تعیین شود. برای تشخیص گروه‌های موش‌ها نواحی مختلف بدن آنها با رنگ‌های متفاوت علامت‌گذاری شد (جدول ۱).

جدول ۱: تعیین غلظت‌های اولیه جهت تعیین درصد کشندگی زهر سنگ‌ماهی (*Synanceia*) در خوزستان (۱۳۹۸).

رنگ موش	میزان زهر در ۰/۵ میلی لیتر	میزان محلول زهر در یک میلی گرم / میلی لیتر	میزان نرمال سالین (میلی لیتر)	حجم محلول تزریقی (میلی لیتر)
سفید	۵۰ میکروگرم	۰/۱	۰/۹	۰/۵
قرمز	۱۰۰ میکروگرم	۰/۲	۰/۸	۰/۵
آبی	۲۰۰ میکروگرم	۰/۴	۰/۶	۰/۵
سبز	۳۰۰ میکروگرم	۰/۶	۰/۴	۰/۵
سبز-آبی	۴۰۰ میکروگرم	۰/۸	۰/۲	۰/۵
قرمز-آبی	۵۰۰ میکروگرم	۱	-	۰/۵

با توجه به آزمایش اولیه و مشخص شدن حدود LD50، از رقت ۱۰۰ میکروگرم زهر سنگ‌ماهی خال سیاه شروع کرده و جهت تعیین رقت‌های بعدی عدد فوق را در ۱/۲۵ ضرب می‌کنیم (جدول ۲).

جدول ۲: محاسبه حجم‌های مورد نیاز محلول زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (*Synanceia*) برای آزمایش اصلی تعیین LD50 در خوزستان (۱۳۹۸).

تعداد موش	میزان زهر برای هر موش در ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین (میکروگرم)	رنگ و تعداد موش
۴	۱۰۰	۴ عدد - قرمز
۴	۱۲۵	۴ عدد - آبی
۴	۱۶۰	۴ عدد - سبز
۴	۲۰۰	۴ عدد - سفید
۴	۲۵۰	۴ عدد - سبز-قرمز
۴	۳۱۰	۴ عدد - قرمز-آبی

برای تعیین LD50 زهر سنگ‌ماهی خال سیاه ۲ میلی لیتر از هر غلظت را به ۴ موش (هر موش ۰/۵ سی‌سی) تزریق کرده، پس از تزریق زهر این ماهی به موش‌های آزمایشگاهی به صورت داخل وریدی، علایمی مانند لرزش، چرخش، فلج قسمتی از بدن، تعرق، خروج ادرار، خروج بزاق از دهان، نکرور موضعی، کبود شدگی و مرگ حیوان پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت میزان متوسط دوز کشندگی زهر سنگ ماهی خال سیاه از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\alpha = \lg \text{اریتم ضریب} \times \frac{50\% - <50\%}{>50\% - <50\%}$$

$$\alpha = \beta + \lg \text{اریتم دز بلافاصله کمتر از } 50\% \text{ کشنده}$$

$$\text{Antilog } \beta = \text{LD50}$$

نتایج

از هر دو غده زهری حدود ۳ میلی‌گرم زهر استخراج و برای مصارف بعدی ذخیره‌سازی شد. نتایج اندازه‌گیری میزان پروتئین در زهر سنگ ماهی در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳: اندازه‌گیری میزان پروتئین در زهر سنگ‌ماهی خال سیاه (*Synanceia*) در خوزستان (۱۳۹۸).

شماره لوله	غلظت پروتئین در محلول نرمال سالین (میلی‌گرم)	جذب نوری قرائت شده (OD)
۱	۵	۲/۶۸۵
۲	۲/۵	۱/۴۵۳
۳	۱/۲۵	۰/۷۴۲
۴	۰/۶۲۵	۰/۳۶۶

با توجه به جذب نوری ۱/۳۷۵ برای نمونه مجهول، میزان پروتئین در یک میلی‌لیتر محلول نرمال سالین برابر با ۲/۲۷۲ میلی‌گرم می‌باشد. برای تعیین LD50 ابتدا آزمایش اولیه Rough test بر روی تعداد محدودی موش انجام داده سپس بر اساس آن حدود LD50 و چینش رقت‌های متوالی در آزمایش اصلی مشخص گردید (جدول ۴).

جدول ۴: تعیین غلظت‌های اولیه جهت تعیین درصد کشندگی زهر سنگ‌ماهی خال سیاه (*Synanceia*) در خوزستان (۱۳۹۸).

وضعیت موش	حجم محلول تزریق (میلی‌لیتر)	میزان سالین (میلی‌لیتر)	میزان محلول زهر در ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر	میزان زهر در ۰/۵ میلی‌لیتر
زنده - زنده	۰/۵	۰/۹	۰/۱	۵۰ میکروگرم
زنده - زنده	۰/۵	۰/۸	۰/۲	۱۰۰ میکروگرم
مرده - زنده	۰/۵	۰/۶	۰/۴	۲۰۰ میکروگرم
مرده - مرده	۰/۵	۰/۴	۰/۶	۳۰۰ میکروگرم
مرده - مرده	۰/۵	۰/۲	۰/۸	۴۰۰ میکروگرم
مرده - مرده	۰/۵	-	۱	۵۰۰ میکروگرم

بر اساس این آزمایش اولیه از آنجایی که همه موش‌های تزریق شده با رقت ۱۰۰ میکروگرم زنده مانده و موش‌های تزریق شده با رقت ۳۰۰ میکروگرم همگی مردند، لذا حدود LD50 باید بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکروگرم باشد. پس از انجام آزمایش اولیه و تعیین حدود LD50، از رقت ۱۰۰ شروع کرده و جهت تعیین رقت‌های بعدی عدد فوق در ۱/۲۵ ضرب گردید (جدول ۵).

استخراج، بررسی، تعیین LD50 و درصد پروتئین زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) خلیج فارس - خوزستان / فتیحی و همکاران

جدول ۵: دوزها و نتایج تست اصلی محلول زهر سنگ‌ماهی خال سیاه (*Synanceia*) در خوزستان (۱۳۹۸).

تعداد موش‌های مرده و زنده	تعداد موش	میزان زهر برای هر موش در ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین (میکروگرم)
----	۴	۱۰۰
----	۴	۱۲۵
---+	۴	۱۶۰
-+++	۴	۲۰۰
-+++	۴	۲۵۰
++++	۴	۳۱۰

بر اثر تزریق زهر این ماهی به موش‌های آزمایشگاهی به صورت داخل وریدی، علائمی مانند لرزش، چرخش، فلج قسمتی از بدن، تعرق، خروج ادرار، خروج بزاق از دهان، نکروز موضعی، کبود شدگی و مرگ حیوان بررسی شد.

پس از انجام Rough test و همچنین آزمایش اصلی تعیین LD50 زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه نتایج بدست آمده براساس روش Reed-Muench در جدول زیر آمده است:

جدول ۶: تعیین LD50 زهر سنگ‌ماهی خال سیاه (*Synanceia*) در خوزستان (۱۳۹۸).

درصد مرده‌ها	جمع زنده‌ها	جمع مرده‌ها	تعداد زنده‌ها	تعداد مرده‌ها	غلظت زهر (میکروگرم)
۱۰۰	۰	۱۱	۰	۴	۳۱۰
۸۷/۵	۱	۷	۱	۳	۲۵۰
۶۷	۲	۴	۱	۳	۲۰۰
۱۷	۵	۱	۳	۱	۱۶۰
۰	۹	۰	۴	۰	۱۲۵

$$\frac{50 - 17}{67 - 17} \times \log 1.25 = 0.0639$$

$$\log 1/25 = 0.0969$$

$$\log 160 + 0.064 = \beta = 2.268$$

$$\text{antilog } 2.268 = 185$$

$$\text{LD50} = 185$$

بحث و نتیجه‌گیری

سواحل خلیج فارس در استان خوزستان گستره قابل توجهی دارد و انجام عملیات وسیع شیلاتی و صیادی و توریستی در این گستره به‌طور برجسته‌ای مد نظر علاقه‌مندان به این عرصه عظیم طبیعی قرار گرفته است. در این عرصه آبی بیش از ۶۰۰ گونه ماهی موجود است که حدود ۹۰ گونه آنها را ماهیان سمی تشکیل می‌دهند. از این میان ۴۵ گونه زهری هستند و از طریق نیش زهری خود مسمومیت ایجاد می‌کنند. سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) (*Synanceia*) خلیج فارس از خطرناک‌ترین آنها محسوب می‌گردد. همواره خطر نیش‌زدگی و مسمومیت اتفاقی صیادان، مردم بومی،

شناگران و افرادی که در سواحل خلیج فارس جهت تفریح و گذران اوقات فراغت تردد می‌کنند را تهدید می‌نماید و علائم بسیار دردناک در بدن آنها ایجاد می‌کند (Whiteley et al., 2018). متأسفانه تا دو دهه اخیر در خصوص این جانوران زهرآگین و مخاطرات آنها برای انسان، مطالعات علمی و تحقیقات اندکی صورت گرفته و اطلاعات محدودی در مورد این منابع مهم بیولوژیک در ایران وجود دارد. این عدم توجه ظاهری و کمبود اطلاعات می‌تواند به علت عدم گزارش مخاطرات ماهیان زهرآگین به مجامع علمی و عدم انجام مطالعات بنیادی و اساسی در مورد خصوصیات بیولوژیک و مشخصات فیزیولوژیک این جانوران و دلیل وجود قابلیت زهرآگینی آنها و مکانیسم زهر و مشخصات زهر و پایداری آن در شرایط آزمایشگاهی باشد. احتمالاً یکی دیگر از علل کمبود مطالعات، دشواری‌های مربوط به تنوع فوق‌العاده این موجودات دریایی و نمونه‌برداری از آنها باشد که حجم انجام مطالعه و کار زیادی را می‌طلبد. لذا براساس مطالب فوق، زهرجانوران دریایی در مقایسه با دیگر موجودات زهرآگین مانند عقرب و مار کمتر مورد توجه و بررسی علمی قرار گرفته است، ولی خوشبختانه در دو دهه اخیر دانشمندان و علاقمندان جوان کشور نسبت به انجام این مهم و انجام مطالعاتی در این خصوص مبادرت ورزیده‌اند.

انجام چنین مطالعاتی علاوه بر آشنایی با این جانوران زهری و خطرات ناشی از زهر آنها برای انسان و ترکیبات مضر زهر، می‌تواند محققین را با ترکیباتی آشنا سازد که از نظر دارویی و درمان پزشکی بسیار سودمند و مفید هستند و عرصه‌ای برای تولید فرآورده‌های بیولوژیک را پیش رو می‌گذارد (Ziegman and Alewood, 2015؛ Hodgson, 2012).

انجام مطالعه حاضر یکی از فعالیت‌های علمی می‌باشد که اطلاعات بنیادی مورد نیاز برای انجام فعالیت‌های پژوهشی جامع‌تر را که همانا شناسایی زهر و مکانیسم عمل زهر و نحوه عملکرد آن در سیستم‌های زیستی چه برای جنبه دفاعی جانور در محیط زیست خود در برابر موجودات مهاجم دیگر و چه از نظر امکان مطالعه ترکیبات و اجزاء زهر و استحصال و استخراج فرآورده‌های بیولوژیک و یا تولید آنتی‌نوم مورد نیاز فراهم می‌آورد. مبنای این مطالعه پژوهشی با گزارشات علمی محققین دیگر تطابق و هماهنگی دارد. از جمله Prithiviraj و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کرده‌اند که زهر گروه سنگ‌ماهیان از خطرناک‌ترین زهرهای موجود در بدن جانوران زهری دریایی بوده و این زهر مجموعه‌ای از توکسین‌های گوناگون با خصوصیات فارماکولوژیک متنوع و ویژگی‌های بیولوژیک فراوان می‌باشد، به گونه‌ای که هر یک از این ترکیبات و ویژگی‌های بیولوژیک و خصوصیات فارماکولوژیک آنها به صورت بالقوه می‌تواند مخزن و منبع قابل ملاحظه‌ای از داروهای مفید و سودمند باشند.

برای آشنایی با مکانیسم زهر، نحوه عملکرد آن در سیستم‌های زیستی، خصوصیات فارماکولوژیک و ویژگی‌های بیولوژیک زهر، ابتدا باید نسبت به استخراج و خالص‌سازی زهر ماهی اقدام و غلظت و درصد پروتئین‌های آن تعیین گردد. درصد و غلظت پروتئین یکی از ملاک‌ها و شاخص‌های قدرت، توانمندی و پوتنسی زهر این جانوران می‌باشد. به عبارت دیگر درصد و غلظت زیاد پروتئین زهر می‌تواند شاخص تعیین‌کننده‌ای برای افزونی قدرت و پوتنسی زهر و مبین خواص فارماکولوژیک متنوع و ترکیبات گوناگون آن باشد (Tu, 1988; Church and Hodgson, 2012).

این ملاک و شاخص زهر در مطالعه حاضر به خوبی وضعیت و نقش خود را نشان داد و میزان پروتئین زهر که از غلظت نسبتاً خوبی برخوردار بود، این امیدواری را برای انجام مطالعات دیگر با اهداف فوق فراهم نموده است.

از دیگر شاخص‌های زهر که در مکانیسم و قدرت تاثیر آن تعیین کننده است، میزان LD50 زهر است که بنا بر تاکید محققین، این غلظت زیاد پروتئین زهر می‌تواند ناشی از توان کشندگی زهر باشد که در انجام آزمایش LD50 این شاخص نمود پیدا می‌کند (Church and Hodgson, 2012; Tabarraei et al., 2019).

LD50 تعیین شده برای زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه در مطالعه حاضر و مطالعات دیگر محققین نشان داده که در بین گونه‌های مختلف عقرب‌ماهیان از نظر میزان LD50 زهر آنها تشابهاتی وجود دارد (Saunders et al., 1962).

نتایج تحقیقات نشان داده که زهر ماهیان و جانوران دریایی از نظر شیمیایی و فارماکولوژیک و با توجه به ماهیت زهر و ترکیبات و مکانیسم عملکرد بیولوژیک آن‌ها، با زهر جانوران خشکی‌زی مانند مار و عقرب و عنکبوت و ... متفاوت می‌باشد (Russell and Brodie, 1974). ولی بنا بر تاکید ماهوی و مکانیسم عملکرد بیولوژیک زهر، ویژگی‌های اساسی و مهم زهر جانوران دریایی با زهر جانوران خشکی‌زی موارد مشترک فراوانی با هم دارند (Church and Hodgson, 2012). چنانچه مشخص گردیده، جانوران دریایی هم مانند جانوران خشکی‌زی، زهر را در وحله اول برای دفاع از خود در برابر موجودات مهاجم تولید و استفاده می‌کنند. همچنین آنزیم‌های موجود در زهر آن‌ها، عمل گوارشی و یا تکمیل هضم طعمه را برای آن‌ها فراهم می‌کند. در وحله بعد مکانیسم عملکرد زهر در بدن موجودات دیگر و یا انسان، علائم بیماری و ضایعات پاتولوژیک ایجاد می‌کند، مدنظر می‌باشد. بررسی‌های گوناگون نشان داده که علائم کلینیکی و پاراکلینیکی ایجاد شده در بدن فرد یا جانور مصدوم و مسموم شده، مشابه و مشترک می‌باشد (Ahmad Khalil et al., 2018).

زهر جانوران به عنوان عوامل بالقوه فارماکولوژیک و ابزارهای فیزیولوژیک و عملکرد بیولوژیک آن‌ها شناخته شده است (Babaie et al., 2019). Garnier و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که علائم ایجاد شده در اثر زهر سنگ‌ماهی خال سیاه در بدن موش مصدوم با علائم ایجاد شده توسط دیگر ماهیان زهری خانواده عقرب‌ماهیان مشابه است و شامل علائمی از قبیل مرگ ناگهانی همراه با تظاهر نشانه‌هایی مانند تشنج، علائم عصبی، عدم تعادل عضلانی، فلج قسمتی از بدن، فلج کامل بدن، ترشح ادرار، خیز ریوی، لرزش و سیخ شدن موهای بدن مشاهده می‌گردد. Lopes-Ferreira و همکاران (۱۹۹۸) علائمی مانند حرکات تند و سریع و هیجانی و بی‌قراری موش‌های مصدوم، سیخ شدن موهای بدن، حرکات چرخشی و متعاقب آن فلج اندام خلفی و مرگ ناگهانی را گزارش کرده‌اند.

در برخی مطالعات مشابه گاهی اشاره شده است که پایداری زهر در شرایط آزمایشگاهی مورد تردید قرار گرفته و با لیوفیلیزه کردن زهر خام و عصاره زهر و یا فراکسیون‌های آن ممکن است فعالیت بیولوژیک زهر با عدم ثبات مواجه گردیده و از قدرت کشندگی آن کاسته گردد و این اتفاق را به تاثیر منفی لیوفیلیزاسیون بر عملکرد زهر نسبت داده‌اند (Russell and Brodie, 1974). با توجه به اینکه زهر موجود در غدد انتهایی هر کدام از خارهای عقرب‌ماهیان بویژه سنگ‌ماهی خال‌سیاه (*Synanceia*) حاوی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک با وزن مولکولی بالا می‌باشد، لذا در شرایط آزمایشگاهی نیز زهر پایداری و فعالیت بیولوژیک و فیزیولوژیک و پوتنسی خود را حفظ کرده است. از آنجایی که زهر این گونه ماهیان، طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیک بر روی اعصاب، عضلات و سیستم قلبی - عروقی انسان دارد، لذا می‌توان از پروتئین‌های استخراج شده از زهر آن‌ها، داروهایی برای درمان درد، سرطان، بیماری‌های عفونی، بیماری‌های خود ایمنی، آلرژی‌ها و پر فشاری خون با روش‌های علمی جدید تولید کرد.

منابع

- بابایی، م.، سلمانی‌زاده، ح.، سهمی، ن. و غلامی، س.، ۱۳۹۳. مبانی و روش‌های کروماتوگرافی و الکتروفورز. تهران: انتشارات آوای فهم، ۱۸۰ ص.
- ذوالفقاری، م.، ۱۳۹۵. استخراج و تعیین LD50 زهرماهی فریاله خال‌سیاه (*Synanceia*) خلیج فارس و بررسی علائم هماتولوژیکی ایجاد شده توسط زهر در موش آزمایشگاهی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد جانوران دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
- نبی‌پور، ا.، ۱۳۹۱. جانوران زهرآگین خلیج فارس. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، انتشارات: نزهت، ۱۱۵ ص.
- وزیری‌زاده، ا.، نادری‌منش، ح.، بارگاهی، ا.، نبی‌پور، ا. و محبی، غ. ح.، ۱۳۹۳. اثر زهر خام ماهی فریاله خال سیاه خلیج فارس (*Pseudosynanceia melanostigma*) بر عوامل هماتولوژیک و سطح سرمی آنزیم‌های موش صحرایی. دو ماهنامه طب جنوب، سال هفدهم، شماره ۴، صفحات ۷۲۳-۷۲۲.
- Ahmad Khalil, M., Mohammad Wahsha, A., Khalid Abu Khadra, M., Maroof Khalaf A. and Tariq Al-Najjar, H., 2018. Biochemical and histopathological effects of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) venom in rats - Toxicon 142: 45-51.

- Babaie, M., Zolfagharian, H., Zolfaghari, M. and Jamili, Sh., 2019.** Biochemical, Hematological and complications of *Pseudosynanceia melanostigma* envenoming. *Journal of Pharmacopuncture*, 22(3): 140-146.
- Bhakuni, D. S. and Rawat, D. S., 2005.** Bioactive Marine Natural Products. In: *Bioactive Marine Natural Products*. Anamaya Publisher, New Delhi, India, pp. 382.
- Bradford, M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Cameron, A. M. and Endean, R., 1973.** Epidermal secretions and the evolution of venom glands in fishes. *Toxicon*, 11: 401-410.
- Church, J. E. and Hodgson, W. C., 2002.** A drenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon*, 40: 787-796.
- Concon, J. M., 1988.** Food toxicology, Principle and concepts Part A. Marcel Dekker Inc, New York.
- Whiteley, G., Casewell, R. C., Pla, D., Quesada-Bernat, S., Logan, R.A.E., Bolton, F. M. S., Wagstaff, S. C., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J. and Harrison, R. A., 2018.** Defining the pathogenic threat of envenoming by South African shield-nosed and coral snakes (Genus *Aspidelaps*), and revealing the likely efficacy of available antivenom. *Journal of Proteomics*, 198: 186-198. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.09.019
- Garnier, P., Goudey-Perriere, F., Breton, P., Dewulf, C., Petek, F. and Perrière, C., 1995.** Enzymatic properties of the stonefish *Synanceja verrucosa* (Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*, 33(2):143-155.
- Halstead, B. W., 1970.** Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. USGP, Washington, DC. 3: 1006-1019.
- Hodgson, E., 2012.** Toxicology and Human Environments. Academic Press, 1th Ed. USA. NC: 450-463.
- Khalil, A. M., Wahsha, M. A., Abu Khadra, K. M., Khalaf, M.A. and Al-Najjar, T. H., 2017.** Biochemical and histopathological effects of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) venom in rats. *Toxicon*, 142: 45-51.
- Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K. C., Cardoso, D.F., Moura-Da-Silva, A. M. and Mota, L., 1998.** *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, 36 (2): 405-410.
- Maretic, Z., 1988.** Marine toxins and venoms. In: *Handbook of Natural Toxins*, 3: 379-444.
- Nelson, J. S., 2010.** *Fishes of the World*, 12th ed. New York: Wiley, p. 308-327.
- Prithiviraj, N., Sasikala, R. and Annadurai, D., 2012.** Bioactive Properties of the Stone Fish *Synanceia horrida* (Thomas, 1984) Spine Venom. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3(5):1217-1221.
- Russell, F. E. and Brodie, A. F., 1974.** Venoms of reptiles In: *Chemical Zoology*. Vol IX, Academic Press, New York. Pp. 632-644.
- Saunders, P. R., Rothman, S., Medrano, V. A. and Chin, H. P., 1962.** Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanceia horrida*. *American Journal of Physiology*, 203: 429-432.
- Sitprija, S. and Sute Parak, S., 2008.** Animal Toxins: An Overview, *As Biomed*. 2 (6): 451-457.
- Smith, W. L. and Wheeler, W. C., 2006.** Venom evolution widespread in fishes. *Journal of Heredity*, 97(3): 206-217.
- Tabarraei, H., Hassan, J. and Mosavi, Sh. S., 2019.** Determination of LD50 of some essential oils and histopathological changes in short-term exposure to one of them in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology research and Application*, No.:1-7, DOI: 10.1177/23978473 18820719
- Tu, W., 1988.** *Marine Toxins and Venoms*. Basel Marcel Dekker, INC: 21-27.
- Ziegman, R. and Alewood, P., 2015.** Bioactive components in fish venoms. *Toxins*, 7: 1497-1531.

استخراج، بررسی، تعیین LD50 و درصد پروتئین زهر سنگ‌ماهی خال‌سیاه (فریاله) خلیج فارس - خوزستان / فتحی و همکاران