نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۴۱، زمستان ۱۴۰۲
ص‌ص: ۱۰۵~۱۱۶

بررسی کیفیت زهر زنبور عسل ایرانی در مناطق با پوشش گیاهی متفاوت

* رباب نوری[۱]، رحیمه سپهری[۲*]، بهمن فرجمند[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گرایش زنبورعسل، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

۳. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان ، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت : دی ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۴۰۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۶۴۱۸۲۸۸

Email: sepehri_r@znu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ ASJ.2023.360940.2282

چکیده

زهر زنبور عسل کاربرد وسیعی در زمینه پزشکی و داروسازی دارد. عوامل متعددی در میزان و ترکیبات زهر موثر است. تاکنون پژوهشی در خصوص میزان ترکیبات زهر زنبورعسل ایرانی انجام نشده است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی میزان سه ترکیب پپتیدی مهم (ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین) در زهر زنبورعسل ایرانی انجام شد. بدین منظور، از چهار زنبورستان مستقر در مناطق با پوشش گیاهی (غالب) مختلف استفاده شد. تیمارها عبارت بودند از پوشش گیاهی غالب آفتابگردان، گیاهان متنوع کوهپایه ای، ذرت و یونجه. پس از گذشت دو ماه از استقرار زنبورستان‌ها در این مناطق، عملیات زهرگیری توسط دستگاه زهرگیر انجام شد. نمونه‌های حاصله جهت اندازه‌گیری پپتیدهای مورد نظر به آزمایشگاه ارسال و داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار آنالیز شد. متوسط میزان پپتیدهای ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین در کل نمونه‌ها به‌ترتیب ۸/۳۷ ± ۴۰/۲۵ [۱]، ۲/۷۷ ± ۱۱/۶۶ و ۰/۵۵ ± ۲/۳۱درصد بدست آمد. میزان ملیتین در تیمار دوم (۵۲/۰۴ درصد) بطور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود. این تیمار بالاترین درصد فسفولیپاز A2 و آپامین را نیز دارا بود ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. تفاوت سه تیمار دیگر معنی‌دار نبود. نوع پوشش گیاهی متنوع و خاص در این تیمار می‌تواند دلیل این تفاوت باشد. پژوهش حاضر اولین پژوهش در زمینه مقایسه میزان ترکیبات زهر در مناطق با پوشش گیاهی مختلف در کشور است و لازم است پژوهش‌های بیشتری انجام شود. در صورت تایید، می‌توان مناطق کوهستانی و ییلاقی را بعنوان بهترین منطقه برای تولید زهر با کیفیت بالاتر معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: زنبور عسل ایرانی، تولید وکیفیت زهر، ملیتین، آپامین، فسفولیپاز،A2

[1] Mean ± SD

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 141 pp: 105-116

Quality Survey of Iranian honey bee venom in areas with different vegetation

By: Robab Noori[1], Rahimeh Sepehri[2], Bahman Farajmand[3]
1.Graduate of MSc, Department of Animal Science, Faculty of agriculture, University of Zanjan, Iran.
2. Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of agriculture, University of Zanjan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Chemistry, , Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran. *Corresponding author, Email: sepehri_r@znu.ac.ir

Received: January 2023 **Accepted: May 2023**

Bee venom is widely used in the field of medicine and pharmaceuticals. Several factors are effective in the amount and compounds of venom. So far, no research has been done on the amount of Iranian bee venom compounds. The aim of this study was investigation of the amount of three important peptide compounds (mellitin, phospholipaseA2 and apamin) in Iranian honeybee venom. Venom samples were collected from four apiaries located in areas with different (predominant) vegetation.
The areas had dominant vegetation of sunflower, various foothills plants, corn and alfalfa. The apiaries were located in that areas for at least two months. Collection of venom was carried out by a standard venom collector device. Samples were sent to the laboratory to measure the three intended peptides. The data were analyzed in a completely randomized design with 4 treatments and 3 replications. The average amount of mellitin, phospholipase A2 and apamin were 40.25 ± 8.37%, 11.66 ± 2.77 and 2.31 ± 0.55%, respectively. The amount of mellitin in second treatment was estimated 52.04%, which was significantly higher than the others. This treatment had the highest amount of phospholipase A2 and apamin too, but this superiority was not statistically significant. It seems that this can be related to the varied and special vegetation in this treatment. This study was done for first time in Iran and it is necessary to conduct more research. If the results are confirmed, Mountainous areas can be introduced as the best areas to produce bee venom with higher quality.

Key words: Iranian Honey bee,venom quality and production, melittin, phospholipaseA2, apamin

مقدمه

زنبور عسل یکی از حشرات مفیدی می‌باشد که با تولید فرآورده‌های متنوع چون عسل، گرده، موم، بره موم، ژل رویال، زهر، و نیز گرده افشانی محصولات باغی و زراعی برای انسان بسیارسودمند می‌باشد. استفاده از فرآورده‌های زنبور عسل هزاران سال است که در بسیاری از فرهنگ‌ها برای درمان بیماری‌های انسانی ثبت شده است (Azam و همکاران،2018).

زهر زنبور عسل، به عنوان یکی از مهمترین فرآورده‌های آن و با توجه به ترکیبات شیمیایی خاص، از کاربرد وسیعی در زمینه پزشکی و داروسازی برخوردار است (Wehbe و همکاران، 2019). زهر زنبور عسل مایعی است که توسط غدد زهرساز[1] واقع در انتهای شکم زنبوران ماده (کارگر و ملکه) تولید و در داخل کیسه زهر ذخیره می‌شود و در هنگام نیش زدن، توسط مجرای داخل اندام نیش به داخل بدن موجود نیش‌خورده وارد می‌شود. تولید زهر بلافاصله پس از تولد شروع شده و تا سن ۱۹-۱۶روزگی به حداکثر مقدار خود می‌رسد. زنبوران کارگر معمولا برای دفاع از کلنی نیش می‌زنند. به دلیل ساختار اره‌ای نیش و جهت گیری دندانه‌های آن پس از نیش زدن، نیش در بدن میزبان باقی می‌ماند و با حرکت زنبور، ضمائم متصل به آن نیز از بدن زنبور بیرون کشیده شده و منجر به مرگ زنبور می‌شود (Schumacher و همکاران، 1992). رنگ زهر تازه کاملا شفاف، گاه شیری، دارای طعمی تند و تلخ، رایحه بخصوص و خاصیت اسیدی با pH (۵/۵-۴/۵) می‌باشد (Wehbe و همکاران، 2019).

[1] Poison glands

عوامل متعددی در میزان تولید زهر و (احتمالا) ترکیبات آن موثر است از جمله: نژاد و سن زنبوران عسل، فصل زهرگیری و پوشش گیاهی محل پرورش (Schumacher و همکاران، 1992 و عبادی و احمدی ۱۳۹۷).

بررسی‌ها نشان داده است که تا سال ۲۰۱۸، ۷۰۰ مورد پژوهش علمی روی زهر زنبور عسل انجام شده است. عمده این مطالعات در خصوص جداسازی اجزاء آن (و به‌ویژه ملیتین موجود در آن) و تاثیر آن‌ها بر درمان بیماریهای مختلف بوده ولی مطالعات زیادی در مورد محتوای زهر زنبور عسل و استانداردسازی آن انجام نشده است (Samanci and Kekeçoğlu, 2019). اولین تلاش‌ها برای تعیین ترکیبات موجود در زهر زنبور عسل به کار لانگر در سال ۱۸۹۷ برمی‌گردد. وی دریافت که زهر زنبور عسل از اجزای اساسی فعال و همولیتیک تشکیل شده است (de Graaf و همکاران، 2021). در واقع، زهر زنبور عسل یک بیوتوکسین است که از مخلوط پیچیده‌ای از چندین پپتید فعال بیولوژیکی، آنزیم‌ها، آمین‌های فعال زیستی و ترکیبات غیر پپتیدی تشکیل شده است (Rady و همکاران، 2017). مطالعات نشان دادند که بخش پروتئینی زهر به عنوان یک نشانگر و معیاری برای تعیین کیفیت محصول حائز اهمیت است (Ionete و همکاران، 2013). ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین، سه ترکیب پپتیدی مهم زهر می‌باشد که نمایانگر کیفیت زهر بوده (Abusabbah و همکاران، 2016) و اخیرا در پژوهش‌های متعددی به بررسی این ترکیبات در نمونه‌های زهر پرداخته شده است. ملیتین، جزء اصلی زهر زنبورعسل، یک پپتید ۲۶ اسیدآمینه‌ای محلول در آب است که به‌طور متوسط ۴۰-۶۰ درصد از ترکیب زهر خشک را تشکیل می‌دهد (Rady و همکاران،2017 ؛ Aazam و همکاران،2018). ملیتین دارای یک سر آمینی (آبگریز) و یک سر کربوکسیلی (آبدوست) است. این خاصیت دو فازی ملیتین، با مختل کردن فسفولیپیدهای غشایی و ایجاد منافذ گذرا یا پایدار در غشاء سلول، سبب ورود یونها و حتی مولکول‌های نسبتا درشتی مثل گلوکز به داخل سلولها می‌شود. این منافذ، مسؤول فعالیتهای همولیتیک، ضدمیکربی، ضد قارچی و ضد توموری ملیتین است (Wehbe و همکاران، 2019). بدلیل اثرات دارویی شناخته شده ملیتین و نیز درصد بالای آن در زهر، قیمت‌گذاری زهر زنبورعسل بر اساس میزان ملیتین موجود در آن صورت می‌گیرد. فسفولیپاز A2 (PLA2)کشنده‌ترین آنزیم در زهر زنبور عسل می‌باشد که ۱۲-۱۵ درصد وزن خشک زهر را شامل می‌شود و تنها رشته پلی پپتیدی در زهر است که از ۱۲۸ اسید آمینه تشکیل شده و شامل چهار پیوند دی سولفید است. فسفولیپاز A2 قلیایی بوده و می‌تواند به عنوان لیگاند برای گیرنده‌های خاص عمل کند. فسفولیپاز A2 یک آنزیم هیدرولیتیک می‌باشد، که فعالیت آن توسط ملیتین قابل بهبود است. علاوه بر این، داده‌های جدید آزمایشگاهی پاسخ ایمنی محافظتی PLA2 در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، مانند آسم و بیماری پارکینسون را نشان داده‌اند (Wehbe و همکاران، 2019). آپامین به‌عنوان کوچکترین نوروتوکسین در زهر، یک پپتید ۱۸ اسیدآمینه‌ای است که شامل دو پل دی سولفید است. این پپتید قادر به عبور از سد خونی مغزی است و بنابراین از طریق حالت های مختلف بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی تأثیر می‌گذارد. آپامین حدود ۲-۳ درصد وزن خشک زهر زنبور عسل را تشکیل می‌دهد (Sig و همکاران، 2019).

بررسی میزان ترکیبات مهم موجود در نمونه‌های مختلف زهر زنبورعسل، در سالهای اخیر، مورد توجه پژوهشگران در برخی کشورها از جمله لهستان(Rybak و همکاران، 2003)، رومانی (Ionete و همکاران، 2013)، پرتغال (Sobral و همکاران، 2016) و ترکیه (Samanci and Kekeçoğlu, 2019) بوده‌است.

در ایران، مطالعاتی در خصوص جداسازی و اندازه‌گیری میزان ملیتین موجود در زهر زنبور عسل و اثرات درمانی آن بر برخی بیماریهای صعب العلاج (محمودزاده و همکاران، ۱۳۹۱؛ زرین نهاد و همکاران، ۱۳۹۲؛ مرادی و همکاران، ۱۳۹۳) انجام شده است. در یک پژوهش نیز جداسازی و اندازه‌گیری میزان ملیتین از چند نمونه زهر مربوط به شمال شرق ایران (Hematyar و همکاران، 2019) انجام شده است. ولی در خصوص میزان این پپتید و دیگر پپتیدهای مهم در نمونه‌های زهر زنبور عسل ایرانی (*Apis*

mellifera meda) در مناطق مختلف ایران پژوهشی انجام نشده است. از آن‌جا که زهر زنبور عسل داری ترکیبات ارزشمندی می-باشد که در زمینه داروسازی بسیار حائز اهمیت است، پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان سه ترکیب مهم پپتیدی در نمونه‌های زهر زنبور عسل ایرانی در مناطق مختلف طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، با هدف بررسی میزان سه ترکیب پپتیدی مهم در زهر زنبور عسل ایرانی انجام شد. برای انجام این آزمایش چهار زنبورستان (به‌عنوان چهار تیمار) که هر یک در مناطق با پوشش گیاهی غالب مختلف مستقر شده بودند، درنظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) مزرعه آفتابگردان به وسعت ۴ هکتار در شهرستان لواسان با طول جغرافیایی ′۳۳ °۵۱ ، ′۱۷ °۵۱ و عرض جغرافیایی ′۴۴ °۳۵ ، ′۳۶ °۳۵ واقع در شمال شرق تهران با ارتفاع ۱۷۰۰ متری از سطح دریا و میانگین بارندگی ۳۵۰ میلی‌متر می‌باشد. ۲) دامنه کوه روستای یاستی قلعه از توابع شهرستان ماهنشان واقع در غرب استان زنجان با طول جغرافیایی ′۲۰ °۳۶، ′۱۰ °۴۸ ؛ عرض جغرافیایی، ′۲۰ °۳۶، ′۱۰ °۳۷ ؛ ارتفاع ۱۳۵۰ متر از سطح دریا و میانگین بارندگی سالانه در این منطقه ۳۲۰ میلی‌متر. یاستی قلعه یک منطقه کوهستانی با پوشش گیاهی متنوع گیاهان دارویی کوهپایه‌ای همچون گون، آویشن، زول، کاسنی و... می‌باشد. ۳) مزرعه‌ی ذرت به وسعت ۱۰ هکتار واقع در شهر علویجه در بخش مهردشت شهرستان نجف آباد (شمال غربی اصفهان) با طول جغرافیایی ″۱۴ ′۹ °۵۱ ؛ عرض جغرافیایی ″۲۴ ′۰۲ °۳۳ ؛ ارتفاع ۱۸۷۰ متر از سطح دریا و متوسط بارندگی ۱۴۳ میلی‌متر. ۴) مزرعه‌ی یونجه به وسعت ۲ هکتار در شهرستان اردستان با طول جغرافیایی ′۱۰ °۵۲، ′۴۲ °۵۲ ؛ عرض جغرافیایی ′۵۱ °۳۲، ′۲۲ °۳۳ ؛ ارتفاع ۱۲۰۹ متر از سطح دریا، میانگین دمای سالانه هوا ۱۷/۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین بارش سالانه برابر با ۱۳۱ میلی‌متر در جنوب کویر نمک (شمال شرق استان اصفهان). این زنبورستان‌ها بمدت دوماه در مناطق مذکور مستقر شدند. سپس از هر زنبورستان، سه کندو به‌طور تصادفی انتخاب و زهرگیری از آنها انجام شد. زهرگیری در مهر ماه سال ۱۴۰۰ و در چهار روز متوالی (هر روز در یک زنبورستان) به وسیله «دستگاه زهرگیر برادران اصغرپور نسخه ۷» انجام شد. نمونه‌های زهر در ویال شیشه‌ای جمع‌آوری و تا زمان انجام آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۱). آنالیز ترکیبات پپتیدی موردنظر در نمونه‌های تهیه شده، در آزمایشگاه مهراندیش کرج به روش HPLC-UV انجام شد. در این روش آنالیز، جداسازی به کمک دتکتور UV با ستون ۱۸ انجام گردید که ۳ ترکیب پپتیدی ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین در زمان‌های متفاوت به صورت پیک‌های مجزا از هم ظاهر و نتایج به‌صورت کروماتوگرام بدست آمد. تایید پیک های بدست آمده با مقایسه آنها با پیک حاصل از آنالیز ترکیبات استاندارد پپتیدهای مورد بررسی نیز انجام شد. مقادیر عددی غلظت هر یک از ترکیبات پپتیدی موردنظر به‌کمک معادلات استاندارد بدست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست‌آمده در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار به وسیله نرم‌افزار SAS (V 9.4) انجام شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، مقایسه میانگین تیمارها نیز به‌روش توکی و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

شکل ۱- تصاویری از مراحل مختلف جمع آوری زهر از کلنی‌های مورد بررسی

نتایج

آماره‌های توصیفی ترکیبات مورد بررسی: تعیین میزان سه پپتید مهم در نمونه‌های زهر تازه زنبورعسل با موفقیت انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های زهر، در تمام نمونه‌ها، ملیتین بیشترین میزان و آپامین کمترین مقدار را داشت. آماره‌های توصیفی مربوط به ترکیبات مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

ملیتین: ملیتین یک ترکیب پپتیدی ۲۶ اسیدامینه‌ای می‌باشد. پیک مربوط به این پپتید در دقیقه ۲۶/۱۶ مشاهده شد. مقدار متوسط درصد ملیتین در کل نمونه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر ۴۰/۲۵ درصد بدست آمد. بیشترین مقدار ملیتین (۶۲/۵۷ درصد) در تکرار دوم از تیمار دوم که مربوط به پوشش گیاهی کوهستانی ییلاقی بود، مشاهده شد. تکرارهای دیگر این تیمار نیز مقادیر بالاتری را نسبت به سایر تیمارها داشتند. کمترین مقدار این پپتید (۳۲/۴۵ درصد) در تیمار اول (پوشش گیاهی آفتابگردان) مشاهده شد.

فسفولیپاز A2 : پیک مربوط به فسفولیپاز A2 که یک ترکیب پپتیدی ۱۲۸ اسید آمینه‌ای می‌باشد، در دقیقه‌ی ۱۵/۳۳ (در دستگاه HPLC) مشاهده شد. مقدار متوسط میزان فسفولیپاز A2 در نمونه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر ۱۱/۶۶ درصد بدست آمد (جدول ۲). بیشترین مقدار این پپتید (۱۶/۸۴ درصد) در تکرار اول از تیمار دوم (پوشش گیاهی مرتعی)، مشاهده شد. کمترین مقدار نیز (۶/۸۶ درصد) در تیمار اول (پوشش گیاهی آفتابگردان) مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آماره‌های توصیفی ترکیبات پپتیدی مورد بررسی به تفکیک تیمار (درصد)

نام ترکیب	نمونه مورد بررسی	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
	کل	۴۰/۲۵	۸/۳۷	۳۲/۴۵	۶۲/۵۷
	تیمار۱ (آفتابگردان)	۳۵/۹۶	۴/۰۸	۳۲/۴۵	۴۰/۴۵
ملیتین	تیمار۲ (مرتع)	۵۲/۰۴	۹/۱۵	۴۵/۹۳	۶۲/۵۷
	تیمار۳ (ذرت)	۳۶/۵۹	۰/۸۲	۳۵/۷۹	۳۷/۴۴
	تیمار۴ (یونجه)	۳۶/۴۱	۲/۴۴	۳۳/۶۱	۳۸/۰۹
	کل	۱۱/۶۶	۲/۷۷	۶/۸۶	۱۶/۸۴
	تیمار۱ (آفتابگردان)	۱۰/۴۷	۴/۱۲	۶/۸۶	۱۴/۹۷
فسفولیپاز A2	تیمار۲ (مرتع)	۱۳/۸۸	۲/۸۲	۱۱/۲۲	۱۶/۸۴
	تیمار۳ (ذرت)	۱۱/۹۹	۱/۲۲	۱۰/۷۳	۱۳/۱۸
	تیمار۴ (یونجه)	۱۰/۳۰	۱/۸۱	۸/۵۵	۱۲/۱۷
	کل	۲/۳۱	۰/۵۵	۱/۲۱	۳/۳۵
	تیمار۱ (آفتابگردان)	۱/۹۲	۰/۷۳	۱/۲۱	۲/۶۷
آپامین	تیمار۲ (مرتع)	۲/۷۳	۰/۶۲	۲/۱۱	۳/۳۵
	تیمار۳ (ذرت)	۲/۳۱	۰/۴۰	۱/۹۴	۲/۷۵
	تیمار۴ (یونجه)	۲/۲۵	۰/۲۹	۱/۹۴	۲/۵۲

آپامین: آپامین، ترکیب پپتیدی ۱۸ اسید آمینه‌ای می‌باشد. پیک این پپتید در دقیقه ۷/۸۱ مشاهده شد. متوسط مقدار این پپتید در نمونه‌های مورد بررسی، ۲/۳۱ درصد بدست آمد (جدول ۲). بیشترین مقدار این پپتید (۳/۳۵ درصد) نیز در تکرار اول از تیمار دوم که مربوط به پوشش گیاهی کوهستانی بود، مشاهده شد. کمترین مقدار نیز (۱/۲۱ درصد) در تیمار اول (پوشش گیاهی آفتابگردان) مشاهده شد (جدول ۱).

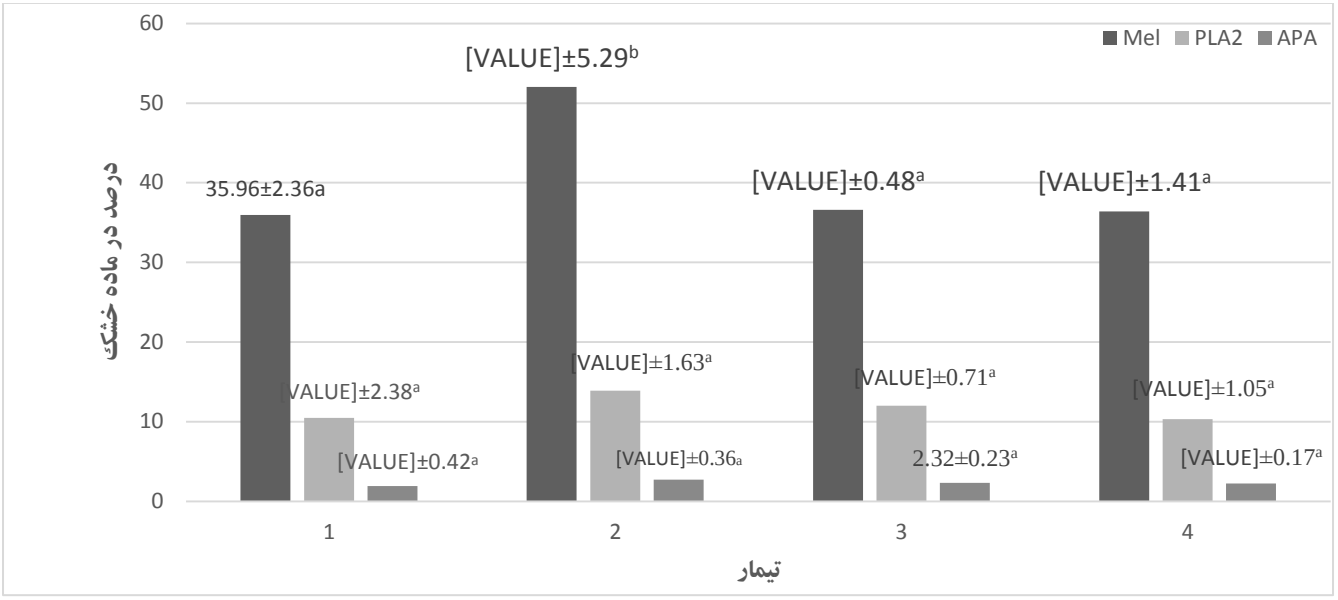
تجزیه واریانس داده‌ها: به‌منظور بررسی اثر نوع پوشش گیاهی بر میزان پپتیدهای موردنظر، تجزیه واریانس داده‌های بدست‌آمده در قالب طرح کاملا تصادفی متعادل انجام شد. جدول ۳ خلاصه‌ای از نتایج این آنالیز را نشان می‌دهد.. بر این اساس، تیمارهای مورد بررسی از لحاظ درصد ملیتین تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($\alpha < 0.05$). دو پپتید بعدی (فسفولیپاز A2 و آپامین) تفاوت معنی داری را در تیمارهای مختلف نشان ندادند (جدول ۲).

جدول ۲- خلاصه تجزیه واریانس پپتیدهای مورد بررسی

پپتید مورد بررسی	میانگین مربعات تیمار	P-value	CV
ملیتین	۱۸۵/۶۰*	۰/۰۱۳	۱۲/۸۶
فسفولیپاز A2	۸/۲۸	۰/۳۹	۲۳/۳۹۷
آپامین	۰/۳۳	۰/۳۸	۲۳/۴۶

شکل (۲) نتایج حاصل از مقایسه میانگین پپتیدهای مورد بررسی در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. بر این اساس، بیشترین درصد ملیتین مربوط به تیمار دو (منطقه کوهستانی با پوشش گیاهی مرتعی) می‌باشد [۲](۵۲/۰۴±۵/۲۹) که تفاوت معنی داری نیز با سایر تیمارها نشان داد (P-value = 0.013). منطقه مربوط به تیمار دوم، منطقه کوهستانی ییلاقی با پوشش گیاهی متنوع گیاهان دارویی کوهپایه‌ای همچون گون، آویشن، زول، کاسنی و... بوده؛ در حالی‌که پوشش گیاهی غالب سه تیمار بعدی به ترتیب: ذرت، یونجه و آفتابگردان بوده است. این سه تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

به‌طور کلی، تیمار دوم که مربوط به منطقه کوهستانی می‌باشد بالاترین درصد ترکیبات را بین ۴ تیمار مورد مطالعه نشان داد. متوسط میزان ملیتین در تیمار برتر (تیمار دوم) ۵۲/۰۴±۵/۲۹ براورد شد. این تیمار از لحاظ دو پپتید بعدی (فسفولیپاز A2 و آپامین) نیز بالاترین میزان (به‌ترتیب ۱/۶۳± ۱۳/۸۸ و ۰/۳۶ ± ۲/۷۳ درصد) را دارا بود؛ اگرچه این برتری به لحاظ آماری معنی دار نشد. تیمارهای دیگر، از لحاظ پپتیدهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشتند.



شکل ۲- مقایسه میانگین(میانگین ± خطای معیار) درصد پپتیدهای مورد بررسی (ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین) در تیمارهای مختلف به روش توکی (α = ۰/۰۵). تیمارهای مورد بررسی، مناطق با پوشش گیاهی به ترتیب: آفتابگردان، متنوع کوهپایه‌ای(مرتع)، ذرت و یونجه می باشند.

نکته: در هر یک از متغیرهای مورد بررسی، تیمارهای دارای حروف مشابه تفاوت آماری معنی‌دار ندارند.

[2] Mean ± SE

بحث

در پژوهش حاضر، میزان پپتیدهای ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین، در نمونه‌های زهر زنبورعسل مربوط به چهار منطقه با پوشش گیاهی مختلف بررسی و مقادیر متوسط آنها براورد گردید (جدول ۱). میزان این پپتیدها در کل نمونه‌ها به‌ترتیب ۴۰/۲۵ ، ۱۱/۶۶ و ۲/۳۰ درصد بدست آمد. ترکیبات موجود در زهر زنبور عسل، میزان متوسط و دامنه تغییرات آن‌ها در منابع و مقالات متعددی ذکر شده است از جمله: Ionete و همکاران2013 ؛ Sabral و همکاران 2016؛ Wehbe و همکاران، 2019؛ Tanuğur-Samanc and Kekeçoğlu، 2021 ؛ Kekeçoğlu و همکاران 2022. ولی از آنجا که این فراورده بطور رسمی به‌عنوان ترکیب دارویی شناخته نشده است، مقادیر استاندارد ترکیبات آن(در سطح بین‌المللی و یا ملی) اعلام نشده است (Krell, 1997). براساس مقادیر ارائه شده در جداول رفرنس، زهر خشک زنبورعسل دارای ۴۰ تا ۵۰ درصد ملیتین، ۱۰ تا ۱۲ درصد فسفولیپاز A2 و ۱ تا ۳ درصد آپامین است (Krell,1996 و Bogdanov,2016). میانگین پپتیدهای مورد بررسی در پژوهش حاضر با مقادیر فوق همخوانی دارد.

ملیتین توسط محققین مختلف به عنوان ترکیب اصلی زهر زنبور عسل که دارای بیشترین مقدار است، گزارش شده است (محمودزاده و همکاران، ۱۳۹۱؛ زرین نهاد و همکاران، ۱۳۹۲؛ مرادی و همکاران، ۱۳۹۳) و (Sobral و همکاران،2016؛ Wehbe و همکاران، 2019 و Samanci and Kekeçoğlu, 2019). از این لحاظ نیز پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های فوق همخوانی دارد.

تاکنون پژوهشی در خصوص بررسی کیفی ترکیبات زهر زنبور عسل ایرانی انجام نشده، ولی مطالعاتی در زمینه پزشکی با هدف استخراج ملیتین از زهر زنبور عسل ایرانی و بررسی تاثیر آن بر روی برخی از بیماری‌ها انجام شده است. در پژوهشی که توسط زرین نهاد و همکاران (۱۳۹۲) به‌منظور بررسی تاثیر ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل ایرانی بر تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم انجام شد، میانگین درصد ملیتین در نمونه مورد بررسی ۴۹ تا ۵۰ درصد گزارش گردید (زرین نهاد و همکاران، ۱۳۹۲). در پژوهشی دیگر که توسط محمود زاده و همکاران (۱۳۹۱) باهدف جداسازی ملیتین و بررسی تاثیر آن بر رشد سلول‌های سرطان معده انجام گرفت، مقدار ملیتین ۴۹/۵۸ درصد گزارش شد (محمودزاده و همکاران، ۱۳۹۱). در پژوهش حاضر، درصد ملیتین در کل نمونه-های مورد بررسی ۴۰/۲۵ درصد بدست آمد که کمتر از نتایج مطالعات مذکور بود ؛ ولی میانگین تیمار دوم (۵۲/۰۴ درصد) بالاتر از نتایج مطالعات فوق است. از آنجا که در مطالعات مذکور تنها از یک نمونه زهر استفاده شده و نیز هیچ اشاره‌ای به پوشش گیاهی منطقه‌ای که نمونه زهر از آنجا بدست آمده، نشده است. لذا مقایسه درستی نمی‌توان انجام داد. در مطالعه دیگری که با هدف اندازه‌گیری میزان ملیتین در زهر زنبور عسل ایرانی، *Apis mellifera meda*، با استفاده از نمونه‌های بدست آمده از شمال شرق ایران انجام شد، میزان ملیتین ۴۳ تا ۵۵ درصد از وزن خشک گزارش گردید (Hematyar و همکاران، 2019). دامنه تغییرات میزان ملیتین در نمونه های پژوهش حاضر بیشتر بود (۶۲/۵۷-۳۲/۴۵ درصد) که دلیل آن تفاوت در پوشش گیاهی غالب تیمارهای مورد بررسی بود و همانگونه که در نتایج آمده‌است تیمار دوم (پوشش گیاهی مرتعی) با میانگین درصد ملیتین ۵۲/۰۴، مقادیر بالاتری را در این پپتید به‌خود اختصاص داد.

در مطالعه‌ای که روی نمونه‌های سه سال متوالی در لهستان انجام شد، میزان ملیتین (۷۰/۱۵ ـ ۶۱/۱۵ درصد) با میانگین (۶۴/۴۰ درصد)، فسفولیپاز A2 (۱۵/۰۵ – ۱۱/۲۴درصد) با میانگین ۱۳ درصد و آپامین (۴/۱۸ – ۲/۰۹ درصد) با میانگین ۳/۱۰ درصد بدست آمد. اختلاف معنی‌داری در میزان درصد ملیتین سالهای مختلف مشاهده شد ولی نمونه‌های سالهای مختلف از لحاظ دوپپتید بعدی تفاوت معنی داری با هم نداشتند (Rybak و همکاران، 2004). مقادیر به دست آمده در این پژوهش از نتایج پژوهش حاضر بالاتر بود. در این پژوهش هیچ اطلاعاتی در مورد پوشش گیاهی منطقه داده نشده بود. به‌طور کلی، دلیل این تفاوت می‌تواند مربوط به تفاوت‌ها در نژاد زنبوران مورد استفاده، پوشش

گیاهی و نیز فصل و سال زهرگیری باشد.

در پژوهشی دیگر که روی نمونه‌های مختلف زهر کشور رومانی و در فصل تابستان انجام شد، میزان متوسط ملیتین ۵۲/۲۸ درصد (۲۷/۶۶ تا ۶۴/۲۲ درصد)، فسفولیپاز A2 ۱۶/۶۷ درصد (۱۰/۹۶ تا ۲۲/۸۶ درصد) و آپامین ۴/۳۴ درصد (۳/۴۲ تا ۵/۳۲ درصد) گزارش گردید (Ionete و همکاران، 2013). میانگین مقادیر به دست آمده از این پژوهش، بیشتر از متوسط نتایج پژوهش حاضر است؛اگرچه کمترین مقدار ملیتین گزارش شده در این پژوهش، پایین‌تر از نتایج پژوهش حاضر است. با توجه به این‌که، این مطالعه از لحاظ نژاد زنبوران عسل و نیز تا حدودی فصل نمونه‌گیری (پژوهش حاضر در اوایل فصل پاییز، مهرماه، انجام شده است) و نیز پوشش گیاهی (که اطلاعاتی داده نشده است) شرایط متفاوتی داشته‌اند؛ مجموعه این عوامل می‌تواند در مقدار ترکیبات زهر تاثیرگذار باشد.

بالاترین درصد ملیتین (۸۶/۷۲ درصد) توسط سوبرال[3] و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شد. نمونه‌ها مربوط به دو زنبورستان جدا از هم با فاصله ۱۲ کیلومتر از یکدیگر در کشور پرتغال بوده و بین ماه مه[4] و جولای[5] (مطابق با اردیبهشت و خرداد) تهیه شده اند (Sobral و همکاران، 2016). در خصوص نوع پوشش گیاهی منطقه توضیحی داده نشده است ولی علت این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به زمان و پوشش گیاهی منطقه استقرار زنبورستان باشد. در پژوهش مذکور (سوبرال و همکاران(۲۰۱۶))، دو نمونه‌ای که در اوایل فصل بهار گرفته شده بود کمترین مقدار ملیتین را نشان داد که این تفاوت‌ها می‌تواند به عواملی چون پوشش گیاهی و سن زنبوران بستگی داشته باشد.

در بررسی دیگری، زهر تازه زنبور عسل نژاد آناتولی ترکیه با زهر تجاری مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج نشان داد زهر تازه درصد ترکیبات بالاتری نسبت به زهرکهنه دارد (Samanci and Kekeçoğlu, 2019). میانگین درصد ترکیبات این پژوهش نسبت به نتایج پژوهش حاضر بالاتر بود ولی بیشترین مقدار ملیتین نمونه‌های زهر آناتولی (۴۶/۸۵ درصد) گزارش گردید در حالی که در پژوهش حاضر (زنبورعسل ایرانی) در تیمار دوم (پوشش گیاهی مرتعی) درصد بالاتری (۵۷/ ۶۲ درصد) مشاهده شد.

در مطالعه‌ای که اخیرا روی ۲۵ نمونه زهر زنبور عسل نژاد آناتولی از مناطق مختلف انجام شد، میانگین ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین به ترتیب ۴۰/۵۷، ۱۳/۶۷ و ۲/۱۲ درصد به دست آمد (Tanuğur-Samanc and Kekeçoğlu, 2021). مقدار ملیتین و آپامین در این بررسی با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد ولی مقدار فسفولیپاز A2 در این بررسی (۱۳/۶۷) بالاتر از برآورد پژوهش حاضر (۱۱/۶۶) است. محتوای آپامین و فسفولیپاز A2 در نمونه‌های زهر زنبور عسل آناتولی (Tanuğur-Samanc and Kekeçoğlu, 2021) و پرتغال (Sobral *et al.*, 2016) مشابه بود، ولی محتوای ملیتین متفاوت بود. آنها دلیل این تفاوت را ناشی از تفاوت نژادی، نمونه‌گیری در فصول مختلف و تفاوتهای موجود در سن غالب زنبوران کلنی در فصول بهار و پاییز بیان کردند. زیرا مقدار کل پروتئین موجود در زهر با سن حشره متفاوت است و در اوایل بهار بیشتر جمعیت کلنی زنبوران جوان‌تر هستند (Tanuğur-Samanc and Kekeçoğlu, 2021). در پژوهشی دیگر، محتوای پروتئین کل غدد زهر زنبوران‌عسل ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۰ روزه‌ی *A. mellifera L* در دو فصل تابستان و زمستان بررسی شد. نتایج حاکی از بالا بودن محتوای پروتئینی زنبوران مسن تر بود (Abreuو همکاران، 2000). بنظر می‌رسد بررسی محتوای پروتئینی زهر تولیدشده درکلنی ها در فصول مختلف و نیز در سنین مختلف زنبوران نیازمند پژوهش‌های بیشتری است.

مقایسه مجموعه این پژوهش‌ها نشان دهنده وجود دامنه تغییرات بیشتر (تنوع بیشتر) در میزان پپتید ملیتین می‌باشد. از آنجا که در منابع متعددی به اهمیت و ارزش دارویی فراوان این پپتید اشاره شده است، با توجه به این دامنه تغییرات زیاد، ارزش‌گذاری زهر زنبور عسل براساس میزان این پپتید منطقی بنظر می‌رسد.

در مطالعه دیگری، با جداسازی کیسه ذخیره زهر ۱۰۳ زنبور عسل اروپایی و ۹۲ زنبور عسل آفریقایی از ۱۲ کلنی مختلف و استخراج زهر آن‌ها به وسیله سرنگ میزان ملیتین و فسفولیپاز A2 در آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این بررسی، مقادیر محتوای ملیتین و فسفولیپاز

[3] Sobral
[4] Month of May
[5] July

A2 در زهر زنبور اروپایی (*A. mellifera mellifera* و *A. mellifera ligustica*) به ترتیب ۲۹/۶ و ۱۱/۱ درصد و در زنبور آفریقایی (*A. mellifera scutellata*) ۲۵/۵ و ۱۸/۱ گزارش شد. زنبورهای آفریقایی دارای غدد زهر کوچکتری در مقایسه با زنبورهای اروپایی هستند به همین دلیل زهر کمتری ترشح می‌کنند که این امر ممکن است در درصد ترکیبات آن نیز تاثیرگذار باشد (Schumacher و همکاران،1992).

در مطالعه‌ای که توسط Kokot و Matysiak [6] در کشور لهستان و از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۷ انجام شد، میانگین محتوای ملیتین، فسفولیپاز A2 و آپامین به ترتیب ۵۴/۰۸، ۱۳/۰۴ و ۲/۶۴ درصد گزارش شد (Kokot and Mastiysiak,2009).

در پژوهشی که به‌منظور بررسی تاثیر سه تیمار غذایی شامل کیک مخلوط غنی از پروتئین(شامل پودر سویا، مخمر و شیر خشک با نسبت (۱:۱:۳)، شربت شکر و تغذیه طبیعی (گرده و شهد گل) بر کیفیت زهر تولید شده توسط زنبورعسل گونه آسیایی (Apis cerana) انجام شد، مقدار پپتیدهای ملیتین، آپامین و فسفولیپاز A2 در تیمار شربت شکر بطور معنی‌داری کمتر از دو تیمار دیگر بود. زهر حاصل از تیمار مخلوط پروتئینی درصد پپتیدهای بالاتری از تغذیه طبیعی داشت، اگرچه این برتری معنی‌دار نبود (Abusabbah و همکاران، 2016). در پژوهش حاضر، میزان ملیتین در کلنی‌های مستقر در منطقه با پوشش گیاهی غنی کوهستانی (مرتعی) بطور معنی‌داری از سایر تیمارها (که در مناطق با پوشش گیاهی زراعی مستقر بودند) بالاتربود. بنظر می رسد استقرار کلنی‌ها در مناطق با پوشش گیاهی متنوع و غنی و یا تغذیه کلنی‌ها با ترکیبات پروتئینی غنی می‌تواند در افزایش میزان ترکیبات پپتیدی مهم و از جمله ملیتین زهر مؤثر باشد. البته این نتیجه‌گیری، نیازمند تأیید پژوهش‌های بیشتری است.

به‌طور کلی، تفاوت‌های مشاهده شده در ترکیب زهر پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل عوامل مختلفی از جمله نژاد، سن زنبوران، سال، فصل، نوع پوشش گیاهی و یا کیفیت تغذیه دستی و روش جمع‌آوری زهر باشد. در پژوهش حاضر تنها عامل متغیر بین تیمارها پوشش گیاهی غالب در منطقه استقرار کلنی‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج بدست‌آمده، بنظر می‌رسد کیفیت گرده ذخیره شده (که متاثر از پوشش گیاهی منطقه است) در میزان درصد ترکیبات زهر اهمیت بخصوصی دارد و هر چه کیفیت گرده بهتر باشد به همان میزان کیفیت زهر تولید شده توسط زنبوران بالاتر خواهد بود. در پژوهش حاضر تیمار دوم، که مربوط به منطقه کوهستانی با پوشش گیاهی متنوع گیاهان دارویی می‌باشد، درصد ترکیبات بالاتری نسبت به ۳ تیمار دیگر نشان داد که احتمالا نشان‌دهنده کیفیت بهتر گرده گیاهان متنوع مناطق کوهپایه‌ای (مرتعی) نسبت به ۳ تیمار دیگر (مزارع با کشت آفتابگردان، ذرت و یونجه) باشد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر، با هدف بررسی میزان سه ترکیب پپتیدی مهم در زهر زنبور عسل ایرانی در چهار منطقه با پوشش گیاهی مختلف انجام شد. تیمار دوم (پوشش گیاهی مرتعی)، بالاترین درصد هر سه پپتید مورد بررسی را به خود اختصاص داد. به نظر می‌رسد این امر به پوشش گیاهی متنوع و غنی در این تیمار مرتبط باشد. با توجه به این‌که تاکنون پژوهشی در زمینه مقایسه میزان ترکیبات زهر در مناطق مختلف انجام نشده و پژوهش حاضر اولین پژوهش در این زمینه است، لازم است پژوهش‌های بیشتری در مناطق با پوشش گیاهی مشابه و نیز مناطق با پوشش گیاهی دیگر و در فصول مختلف انجام شود. در صورت تأیید نتایج پژوهش حاضر، می‌توان مناطق ییلاقی با پوشش گیاهی متنوع مرتعی را بعنوان بهترین منطقه برای تولید زهر با کیفیت بالاتر معرفی نمود.

منابع

زرین نهاد، ح.، محمودزاده، ا.، پوشنگ باقری، ک.، مهدوی، م.، شهباززاده، د. و مرادی، ع. ۱۳۹۲. جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل بومی ایران و بررسی اثر آن بر تکثیر سلول های سرطانی دهانه رحم – رده HeLa. دوره ۲۱. شماره ۲. ص: ۲۳۷-۲۲۶.

محمودزاده، ا.، مرادی، ع.، زرین نهاد، ح.، پوشنگ باقری، ک.، قاسمی دهکردی، پ. مهدوی، م.، شهباززاده، د. و شاهمرادی ح. م.۱۳۹۱. جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل و بررسی تاثیر آن بر رشد سلول‌های سرطان معده. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۷۰. شماره ۱۲. ص: ۷۶۷-۷۶۰.

[6] Kokot and Mastysiak

مرادی، ع.، عیوضی اروانق، ن.، چاکرزهی، آ.، همتی م. و شاهمرادی ح. م. ۱۳۹۳. مهار بیان Rac1 توسط ملیتین در سلول های سرطان گردن رحم، رده سلولی Hela. *فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص*. شماره (۲۴)۶. ص : ۴۵-۴۰.

Abreu, R. M. M., Moraes, R.L.M. and Malaspina, O. 2000. Histological aspects and protein content of *Apis mellifera L*. worker venom glands: the effect of electrical shocks in summer and winter. Journal of Venomous Animals and Toxins. 6: 87-98.

Abusabbah, M., Lau, W. H., Mahmoud, M. E., Salih, A. M., & Omar, D. 2016. Prospects of using carbohydrates as supplemented-diets and protein rich mixture as alternative-diet to improve the quality of venom produced by Apis cerana L. *J Entomol Zool Stud*, *4*, 23-6.

Azam, M.N.K., Ahmed, M.N., Biswas, S., Ara, N., Rahman, M.M., Hirashima, A. and Hasan, M.N. 2018. A review on bioactivities of honey bee venom. Annual Research and Review in Biology. 1-13.

Graaf, D.C., Brochetto Braga, M.R., de Abreu, R.M.M., Blank, S., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Devreese, B., Ebo, D.G., Ferris, T.J., Hagendorens, M.M. and Justo Jacomini, D.L. 2021. Standard methods for *Apis mellifera* venom research. Journal of Apicultural Research. 60(4): 1-31.

Hematyar, M., Es-Haghi, A. and Soleimani, M. 2019. Quantification of Melittin in Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda*) Venom by Liquid Chromatography-electrospray Ionization-ion Trap Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-IT-MS/MS). Archives of Razi Institute. 74(4): 435-439.(In Persian)

Ionete, R.E., Dinca, O.R., Tamaian, R. and Geana, E.I. 2013. Exploring Apis mellifera venom compounds using highly efficient methods. Smart Energy and Sustainable Environment, 16(2): 89.

Kekeçoğlu, Meral, Tuğçe Çaprazlı, Aslı E. Tanuğur Samancı, Taylan Samancı, and Elif Yorulmaz Önder. "Factors Affecting Quality of Honey Bee Venom." *Journal of Apicultural Science* 66, no. 1 (2022): 5-14.

Kokot, Z.J. and Matysiak, J. 2009. Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. Chromatographia. 69(11): 1401-1405.

Krell, R., 1996. Value-added products from beekeeping (Ed),Bee venom. No. 124. Food & Agriculture Org (FAO).Pp: 227-240.

Rady, I., Siddiqui, I.A., Rady, M. and Mukhtar, H. 2017. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. Cancer letters 402: 16-31.

Rybak-Chmielewska, H. and Szczêsna, T. 2004. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera L*.) venom. Journal of Apicultural Science. 48(2): 103-109.

Samanci, T. and Kekeçoğlu, M. 2019. Comparison of commercial and Anatolian bee venom in terms of chemical composition. Uludağ Arıcılık Dergisi. 19(1): 61-68.

Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., Egen, N.B. and Dillon, K.A. 1992. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). Journal of allergy and clinical immunology. 90(1): 59-65.

Sig, A.K., GÜNEY, M., Özlem, Ö.Z. and Hüseyin, Ş.A.N. 2019. Bee venom: A medical perspective. Turkish Journal of Clinics and Laboratory. 10(3): 414-421.

Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M.J.R., Calhelha, R.C., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I.C. 2016. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. Food and Chemical Toxicology. 94: 172-177.

Tanuğur-Samanc, A.E. and Kekeçoğlu, M. 2021. An evaluation of the chemical content and microbiological contamination of Anatolian bee venom. PloS one. 16(7): p.e0255161.

Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J.M. and Fajloun, Z. 2019. Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. Molecules. 24(16): 2997.