استخراج و خنثی‌سازی سم نماتوسیست عروس دریایی *Crambionella orsini* با استفاده از کیلیت Na-EDTA

نیلوفر ساکی [۱]، یدالله نیک پور [۱*]، احمد تقوی مقدم [۲]، کمال غانمی [۱]

۱. گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۲. موسسه واکسن‌سازی رازی، اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2018.47688.1812

چکیده

عروس دریایی از جمله جانوران زهرآگینی است که سم آن موجب مسمومیت انسان می‌گردد. گونه‌های متنوعی از عروس دریایی در خلیج‌فارس یافت می‌شود. این گونه‌ها اگرچه موجب مرگ سریع انسان نمی‌گردند اما اثرات سوئی بر سیستم جسمانی انسان داشته و عوارض جانبی در پی دارند. در این تحقیق سم عروس دریایی *Crambionella Orsini* طبق روش *Bloom* استخراج‌شده و غلظت آن توسط روش *Biuret* و LD۵۰ سم طبق روش *Jung and Choi* بدست آمد. با توجه به غلظت سم و LD۵۰ آن مشخص شد که ۰/۵ml از سم موجب مرگ موش می‌گردد. از Na-EDTA برای خنثی کردن سم استفاده شد. این کیلیت به دو طریق به موش تزریق گردید که در هر دو روش مانع مرگ شد. Na-EDTA یک کیلیت اختصاصی برای دفع کلسیم از بدن می‌باشد که با توجه به هسته کلسیمی سم قادر است آن را از ساختار سم جدا کرده و موجب خنثی شدن سم گردد.

واژگان کلیدی: *Na-EDTA*، *Crambionella Orsini*، کیلیت، خنثی سازی سم، خلیج فارس

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: Nikpour1342@yahoo.com

۱. مقدمه

نیداریان[۱] یکی از شاخه‌های متازوا می باشد که شامل بیش از صد هزار گونه است (Zhang, 2011; Daly *et al*., 2007). این شاخه از متازوا دارای کیسه زهری بوده و از دوره پرکامبرین وجود داشته‌اند (Cartwright *et al*,. 2007). نام شاخه نیداریان از نام سلول های گزنده یا سنیدوسیت[۲] که در روی بازو های اطراف دهان و چتر قرار دارند، گرفته شده است. سلول های گزنده یا نماتوسیت ها لوله‌های توخالی هستند که در یک محلول حاوی توکسین قرار دارند این لوله‌های تو خالی توسط دو عامل محرک مکانیکی و شیمیایی باعث تخلیه نماتوسیت می‌شوند (Ozacmak *et al*., 2001). ترکیب این سموم در گونه‌های مختلف عروس دریایی، متفاوت بوده (Kass-Simon and Scappaticci, 2002; Ramasamy *et al*., 2005; Holstein and Tardent, 1984) و برخی از این سموم باعث فلج شدن و مرگ جانوران کوچک می‌گردد. کشنده‌ترین نماتوسیت برای انسان در بدن *Box jellyfish* وجود دارد (Tibballs,2006; Brinkman and Burnell, 2007.2008). یکی از اعضای این خانواده *C.fleckeri* می‌باشد که از سوی موسسه علوم دریایی استرالیا به عنوان یکی از سمی‌ترین موجودات دریایی شناخته شده است. گزش توسط این‌گونه باعث ایجاد درد شدید در انسان و یا گاهی مرگ می‌شود (Haddock and Case, 1999).

عروس دریایی گونه‌ای از بی‌مهرگان می‌باشد که در شاخه کیسه‌تنان و رده سیفوزوا طبقه‌بندی می‌شود. این موجودات به دلیل ساختار زیبایی که دارند عروس دریایی نامیده شداند. قطر بدن در مرکز چتر و در حاشیه لبه‌ها نازک بوده و در بعضی گونه‌ها تنتاکول های لبه چتر حاوی نماتوسیت های خطرناکی می‌باشند که می‌تواند موجب مرگ انسان شود (Hsieh and Rudloe, 1994). اکثر عروس های دریایی فاقد سیستم گوارشی تخصصی، اعصاب مرکزی، گردش خون و تنفس می‌باشند. در اطراف دهان چهار بازوی دهانی و در لبه‌های چتر هشت برآمدگی در فواصل مناسب وجود داشته که وظیفه حفظ تعادل و نقش گیرنده‌های حسی را ایفا می‌کنند. سیستم تنفسی در عروس دریایی از طریق پوست نازک بدن صورت گرفته که ازاین‌رو نیاز به سیستم تخصصی برای تنفس ندارد (Satterlie, 2002).

عروس دریایی از سم خود برای گرفتن شکار یا دفاع در برابر شکارچیان استفاده می‌کند. گزش توسط این موجودات می‌تواند به آسیب های شدید موضعی و سامانه‌ای و در برخی موارد به مرگ منجر شود (Burnett *et al*., 1996). عامل گزش، سلول های اختصاصی به نام سنیدوسیت است که مشخصه همه مرجانیان می‌باشد. تماس با تنتاکول های عروس دریایی باعث فرو رفتن میلیون‌ها نماتوسیست به بافت بدن طعمه شده و سم را به آن تزریق می‌کند (Purves *et al*., 1998). سم عروس دریایی مخلوطی از پلی پپتیدهای سمی[۳] و آنزیم های بیماری زا[۴] برای انسان است. واکنش انسان به این سم بستگی به نوع فرد داشته و برای افراد گوناگون عوارض متفاوتی دارد (Burnett and Calton, 1987). تماس با عروس دریایی می‌تواند باعث ایجاد عوارض شدید سیستمیکی شود. اثرات گزش می‌تواند بدون درد، همراه با درد شدید و یا مرگ باشد. نیش عروس های دریایی رده سیفوزوا[۵] می‌تواند منجر به سوزش دردناک، درد شدید و ناگهانی شود. نیش بیشتر عروس های دریایی مرگبار نیست، اما برخی گونه‌های رده کبوزوا[۶] می‌توانند کشنده باشند (Zezima, 2010).

۱-Cnidarians
۲-Cnidocytes

۱-Antigenic
۲-Pathogenic
۳-Scyphozoa
۴-Cubozoa

شناسایی ترکیبات کشنده سم عروس دریایی نشان داد که این سم شامل پلی پپتیدهای بزرگ و ناپایدار است (Brinkman and Burnett,2009; Brinkman *et al*., 2012). این سم پپتیدی دارای طیف گسترده از فعالیت های زیستی مانند فعالیت های همولیتیک و آنزیمی و اثرات آن بر سیستم عضلانی، عصبی، تنفسی و گردش خون است (Collins *et al*., 1993; Baxter and marr, 1969; Endean and Henderson, 1969; Turner and Freeman, 1969).

سموم اکثر جانوران بر پایه پروتئینی استوار بوده و اغلب دارای آمینو اسید های قطبی و محلول در آب است. طی تحقیقات به‌عمل‌آمده ثابت شده است متالو پروتئین ها نقش عمده‌ای در سمیت زهر برخی گونه‌های عروس دریایی بازی می‌کنند (Lee *et al*., 2011). متالو پروتئین ها دسته‌ای از مولکول های بیولوژیکی مهم هستند، که حاوی یک کوفاکتور[۱] یون فلزی بوده و دارای عملکرد های مختلفی از جمله واکنش های اکسیداسیون-احیا می باشند. این عملکرد ها به نوع لیگاند های آمینو اسیدی، ساختار کئوردینه شده و ساختار پروتئینی در مجاورت یک یون فلزی بستگی دارد (Fujii *et al*., 2011). برخی از فلزات تمایل زیادی به اتصال به مولکول های آلی از جمله پروتئین ها دارند و در این میان فلزات دو ظرفیتی تمایل بیشتری نشان می‌دهند (Waldron *et al*., 2009). برخی مطالعات نشان داده‌اند که وجود کاتیون های فلزی دو ظرفیتی در ساختار سم برخی از عروس های دریایی، برای فعالیت همولیتیک سم لازم است (Brinkman and Burnell, 2007).

شیمی کئوردیناسیون، طبقه‌ای از ترکیبات شیمیایی است که فلز ها را تشکیل می‌دهند. ترکیبات کئوردیناسیون، ترکیبی از یک فلز و تعداد معینی از گونه‌ها به نام لیگاند است که به فلز متصل می‌شوند. لیگاند مولکولی خنثی یا آنیونی است که دارای جفت الکترون باشد. لیگاندها به وسیله جفت الکترون های خود به کاتیون های فلزی متصل شده و کمپلکس ها را تشکیل می‌دهند. داشتن جفت الکترون ناپیوندی یا بار منفی در لیگاند شرط اصلی برای تشکیل کمپلکس می‌باشد. کمپلکس شدن یون فلزی معمولاً باعث افزایش پایداری حالت اکسایش گونه فلزی می‌شود. نوع اتم های موجود در لیگاند که مسئول پیوند با یون فلزی هستند بر روی قدرت پیوند تأثیر می‌گذارند. قدرت لیگاند های مختلف در تشکیل پیوند با فلزات، با یکدیگر متفاوت است. تفاوت قدرت لیگاندها باعث تفاوت در مقدار شکافتگی سطوح انرژی در فلز در حضور لیگاند می‌شود. به دلیل تفاوت مقدار انرژی میدان لیگاند ها، ساختمان ترکیبات کمپلکس از هم متفاوت است. سطوح انرژی بین اوربیتال‌های مولکولی در این ترکیبات، طبق قدرت لیگاند است. تغییر لیگاندها در ترکیبات کمپلکس می‌تواند باعث جابه‌جای این سطوح انرژی شود. این لیگاند های چند دندانه از طریق نقاط اتصال خود به یک یون فلزی مشترک، کئوردینه شده و کمپلکس های با ساختار حلقوی را تشکیل می‌دهند. چنین کمپلکس های با ساختارهای حلقوی که در آن‌ها کاتیون فلزی، عضوی از حلقه را تشکیل می‌دهد، کیلیت[۲] نام دارند. (کی لیت از یک واژه یونانی به نام کلا گرفته شده است که به معنی چنگال خرچنگ است). در طول تاریخ استفاده از کیلیت های شیمیایی در سم شناسی بالینی به پزشکان کمک کرده که مسمومیت های حاد با فلزات سنگین را درمان کنند. ازآنجایی‌که کیلیت ها توانایی اتصال قوی با فلزات را دارند از آن‌ها جهت درمان برای مسمومیت هایی که از طریق فلزات ایجاد می‌شوند، استفاده می‌کنند. این کیلیت ها دارای اثر دارویی بوده و به دو صورت وریدی و خوراکی به بیمار داده می‌شود.*NaCaEDTA* و

۱-Cofactor

۲-Chelate

NaEDTA به عنوان پادزهر برای مسمومیت با فلزاتی از جمله سرب، کادمیم، کبالت، وانادیم، کروم، روی و فلزات رادیو اکتیو استفاده می‌شوند (Crisponi *et al*., 2015). همچنین از *NaEDTA* به عنوان کیلیت برای درمان مسمومیت با کلسیم در بیماری هایپرکلسیم[1] استفاده می‌گردد (Cohen *et al*., 1959). معمولاً هنگام درمان به جای استفاده از *NaEDTA* از *NaMgEDTA* استفاده می‌کنند. زیرا منیزیم مانع از حذف یون کلسیم موجود در فلبیت ها[2] می‌شود. این در حالی است که *Na-EDTA* قادر به اتصال کلسیم آزاد است. همچنین برای جلوگیری از دفع کلسیم از *NaCaEDTA* استفاده می‌کنند. این کیلیت داری یک یون کلسیم بوده که در هنگام ورود به بدن، این یون را با فلزاتی که ایجاد مسمومیت می‌کنند، تعویض می‌نماید.

در تحقیقی که توسط Beilei و همکاران (2012) بر روی ونوم *Capillata cyanea* صورت گرفت مشاهده شد که آنزیم های قلبی افزایش‌یافته‌اند. همچنین جعبه قرقره کننده‌های کانال کلسیم نظیر نیفدیپین و وراپامیل موجب بهبود عملکرد قلب شامل ضربان قلب، فشار بطن چپ و تغییرات الکترو کاردیو گرافی می‌گردند.

Kimو همکاران در مطالعه‌ای که در سال 2006 انجام شد، نشان دادند که ونوم *Nemopilema nomurai* در موش موجب کاهش فشارخون، برادی کاردی[3] و ایجاد انقباضات در آئورت، به علت فعالیت کانال‌های کلسیم، می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که علت اثرات قلبی این ونوم، تأثیرات ینوتروپ منفی و کرونوتروپ آن می‌باشد. در بررسی که توسط Houckدر سال 1996 روی ونوم *Chrysaora quinquecirrha* صورت گرفت، اثرات قلبی، تنفسی، کلیوی، کبدی و ایمنی ونوم مشخص شد.

۲. مواد و روش ها

عروس دریایی *crambionella orsini* در خردادماه سال ۱۳۹۴ از مصب رودخانه اروند توسط تور ماهی گیری صیدشده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. در این پژوهش استخراج نماتوسیست و سم بر اساس روش *Bloom* و همکاران (1998)، با تغییرات اندکی انجام شد. بازو های شکمی و لبه‌های چتر عروس دریایی جداشده و در مخزن شیشه‌ای در حجمی معادل دو برابر آب دریا به مدت ۴ روز در یخچال نگهداری شد. در طی این مدت در زمان های مختلف ظرف محتوی تنتاکول ها به‌شدت تکان داده شدند. این عمل جهت خروج نماتوسیست ها به درون آب انجام می‌شود، ضمن اینکه پدیده اسمز حاصل از شوری آب دریا دلیل اصلی خروج نماتوسیست ها از بافت عروس دریایی است. بعد از گذشت این مدت محتویات بطری ها را از یک صافی معمولی عبور داده و بعد از ته نشینی رسوبات، آب روی محلول جدا گردید. برای اطمینان از وجود نماتوسیست ها در محلول تست میکروسکپی صورت گرفت. سپس رسوبات توسط دستگاه فریز درایر در دمای ۷۰°C- به پودر خشک تبدیل گردید. پودر نماتوسیست ها تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۷۰°C- نگهداری شد. این پودر در چنین شرایطی برای مدت طولانی قابل نگهداری است.

برای آماده سازی سم، مقداری از پودر نماتوسیت ها با نسبت ۱:۷ با آب دو بار تقطیر با دمای ۴ °C مخلوط شده و به وسیله دستگاه سونیکاتور در ۳ دوره ۲۰ ثانیه‌ای بافاصله زمانی کمتر از ۱ دقیقه و روی یخ با شدت جریان ۳ میلی‌آمپر، دیواره سلول های نماتوسیت تخریب و سم از آن خارج گردید. سپس محلول حاصل به وسیله سانتریفیوژ یخچال

۱-Hyper calcium

۲- Phlebitis: به التهاب و گرفتگی سیاهرگ های بدن، فلبیت می گویند.

۳-برادی کاردی یاکند تپشی به کاهش ضربان قلب به کمتر از ۶۰ عدد در دقیقه گفته‌می‌شود.

دار در دمای ۴ °C با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه شفاف گردید. محلول رویی حاوی سم عروس دریایی بوده که در میکرو تیوپ های ۱ ml در دمای ۲۰- °C ذخیره شد. میزان غلظت پروتئین سم خام عروس دریایی *crambionella orsini* توسط روش *Biuret* صورت گرفت. بدین منظور به میزان ۰/۱ ml از معرف پروتئینی (آلبومین)، محلول بیوره و نمونه مجهول را در هر لوله آزمایش ریخته و به میزان ۵ ml محلول بیوره به معرف پروتئینی و نمونه مجهول، اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه انکوباته شده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب محلول ها در ۵۴۰nm توسط اسپکتروفتومتر UV به ثبت رسید. از فرمول (۱) جهت محاسبه غلظت پروتئین مجهول استفاده گردید.

فرمول (۱) $C = \frac{T}{S} \times 0/05$

C میزان غلظت پروتئین، T جذب نمونه مجهول،S جذب استاندارد و ۰/۰۵ غلظت استاندارد

برای اندازه‌گیری میزان سمیت (LD ۵۰) سم عروس دریایی از روش *Jung and Choi*(1994) استفاده شد. در این آزمایش ۵ mg سم خام را در ۵ ml آب مقطر حل کرده تا غلظت ۱۰۰۰ µg/ml به دست آید. سپس ۱۲ تزریق ۰/۵ ml با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۱۲ موش نر سوری بالغ ۱۸ تا ۲۰ گرمی تزریق گردید. بعد از تزریق سم میزان کشندگی (LD ۵۰) توسط فرمول (۲) محاسبه شد.

فرمول (۲)

$$LD50 = \frac{\text{میزان درصد مرده ها کمتر از } 50\% - 50\%}{\text{میزان درصد مرده هاکمتر از } 50\% - \text{بیش‌ترین درصد مرده هابالای } 50\%}$$

الکتروفورز *SDS page* یک بعدی ژل پلی آکریل آمید بر اساس روش *Laemmli* (1970)، برای تعیین وزن مولکولی سم خام و فرکشن های کشنده سم انجام شد. در این مرحله از سیستم الکتروفورز پایا پژوهش با صفحات شیشه‌ای ۱۵×۱۳ و با ضخامت ۲ mm استفاده گردید.

رنگ‌آمیزی با محلول کلوئیدی G-۲۵۰ بر اساس روش بلاسکی[1] و بوئز[2] با بعضی تغییرات صورت گرفت. با توجه به حالت کلوئیدی کماسی در این روش، زمینه ژل آن چنان رنگ نمی‌گردد. با توجه به هدف این پژوهش این آزمایش جهت بررسی عملکرد این کیلیت در خنثی کردن سم خام طراحی شد. جهت انجام آزمایش تزریق سم به موش‌ها از طریق وریدی به دو روش صورت گرفت. در مرحله اول ۰/۵ *ml* سم خام + ۰/۵ *ml* سرم فزیولوژی به ۳ موش تزریق شد و ۱۰ دقیقه بعد از تزریق سم، به ازای هر موش ۱ *ml* از هر کیلیت را با غلظت ۵ mM به موش ها تزریق شد.۱ موش نیز به عنوان شاهد برای کیلیت *Na-EDTA* با غلظت ۵*mM* بدون تزریق سم موردبررسی قرار گرفت. در مرحله دوم ۰/۵ *ml* سم خام + ۰/۵ *ml* از کیلیت *Na-EDTA* به غلظت ۵ *mM* را قبل از تزریق با یکدیگر مخلوط کرده و به ازای هر موش ۱ *ml* مخلوط سم و کیلیت تهیه شد. مخلوط فوق از کیلیت، به ۳ موش تزریق گردید.

۳. نتایج

سم خام استخراج‌شده در اولین مرحله از پژوهش بر اساس مقدار جذب UV در ناحیه ۵۴۰ nm و طبق فرمول (۱) تعیین غلظت شد که مقدار غلظت نسبی سم ۵۱ mg/ml تخمین زده شد.

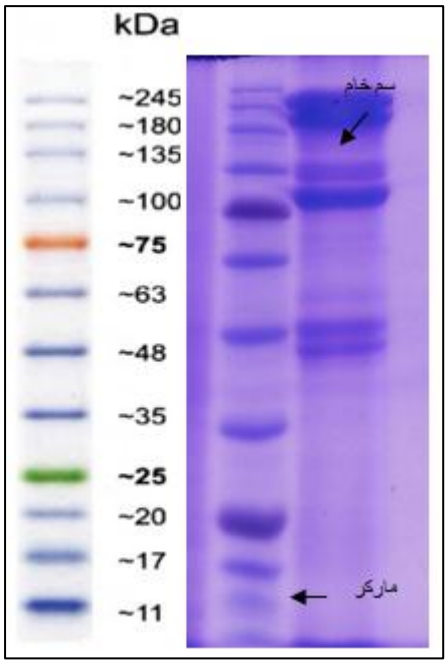
برای تعیین حداقل میزان کشندگی سم خام عروس دریایی *Crambionella orsini* از روش *Jung and Choi* (1994) استفاده شد. طبق محاسبات انجام‌شده و با استفاده از فرمول (۲) حداقل میزان سم خام که باعث کشندگی نیمی از

۱ -Blakesley

۲- Boezi

جانوران آزمایشگاهی می‌شود برابر با ۰/۵ ml از سم خالص است. وزن مولکولی سم خام جهت تعیین موقعیت پروتئین ها و تعداد گروه‌های پروتئینی توسط SDS-Page و مارکر ۱۱ تا ۲۵۰ کیلو دالتون شرکت سینا ژن به عنوان شاهد تعیین‌شده و نتایج الکتروفورز در جدول (۱) و شکل (۱) ذکر گردیده است.

این آزمایش جهت بررسی تأثیر از بین بردن سمیت، سم خام و از بین بردن فعالیت بیولوژیکی سم صورت گرفت. لازم به ذکر است که عنوان شود تمامی علائم حیاتی موش‌ها و میزان آب خوردن آن‌ها به دقت زیر نظر قرار گرفت که در این میان مشاهده شد موش های که به آن‌ها سم تزریق‌شده میزان آب بیشتری نسبت به موش‌های سالم خورده و اگر سم باعث مرگ موش نشود موش را به حالت انزوا می‌کشاند که این عملکرد با تزریق کیلیت ها برطرف شد. نتایج تزریق به شرح جدول (۲) و (۳) می‌باشد:



تصویر (۱) ژل SDS-PAGE پروتئین های سم خام عروس دریایی *Crambionella orsini*، رنگ‌آمیزی شده با کماسی G-250

جدول ۱. وزن مولکولی نمونه‌های سم عروس دریایی

نمونه	وزن مولکولی بر حسب KDa
سم خام	۲۴۵-۱۸۰-۱۷۵-۱۶۰-۱۲۶-۱۱۷-۹۳-۷۵-۶۰-۴۵-۴۲-۴۰-۲۹-۲۸-۲۴

جدول ۲. اثر کیلیت Na-EDTA بعد از تزریق سم خام (روش اول)

نوع ماده تزریق‌شده	بررسی حالات موش‌ها پس از تزریق								
	۱۰دقیقه	۲۰دقیقه	۳۰دقیقه	۴۰دقیقه	۵۰دقیقه	۶۰دقیقه	۲ساعت	۴ساعت	۶ساعت
Na-EDTA	A	A	A^+	A^+	A	A^+	A	A^{++}	A^{++}
سم خام+Na-EDTA	B	B^+	A	B^+	A	A^+	A^+	A^{++}	A^{++}

جدول ۳. اثر تزریق کیلیت Na-EDTA مخلوط شده با سم خام (روش دوم)

نوع ماده تزریق‌شده	بررسی حالات موش‌ها پس از تزریق								
	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰دقیقه	۴۰دقیقه	۵۰دقیقه	۶۰دقیقه	۲ساعت	۴ساعت	۶ساعت
Na-EDTA	A	A	A^+	A^+	A	A^+	A	A^{++}	A^{++}
سم خام+NaEDTA	B	B^+	A	B^+	A	A^+	A^+	A^{++}	A^{++}

۴. بحث و نتیجه گیری

پلی پپتیدهای تولیدشده توسط نیداریان ها ساختار و فعالیت های بیولوژیکی منحصربه‌فردی دارند. میزان سمیت این جانداران و ساختار شیمیایی سم آنها بستگی به عوامل مختلفی همانند: درجه حرارت آب، عمق آب، pH و نوع طعمه مورداستفاده دارد. عروس های دریایی که در اعماق زندگی می‌کنند به دلیل شرایط طبیعی زیستگاهی که در آن زندگی می کنند مثل، فشار بالای عمق موردنظر، دمای کم آب و پراکندگی پایین طعمه دارای متابولیسم بیوشیمیایی متفاوتی با عروس های دریایی که در نزدیکی سطح زندگی می‌کنند، دارند. این عروس های دریایی حتی دارای آنزیم های اختصاصی هستند که باعث می‌شود، بتوانند فشارهای بالای آب را تحمل کنند. تمامی عوامل محیطی باعث تغییر در ساختار شیمیایی سم عروس های دریایی می‌شود (Kawabata *et al*., 2013) .

مایع درون کپسول نماتوسیست حاوی فلزات متعددی از جمله فلز کلسیم است. با تحریک نماتوسیت این یون ها به درون سیتوپلاسم انتشاریافته و باعث ایجاد شیب غلظتی بالایی از کلسیم در سراسر غشای پلاسمایی سنیدوسیت می‌شوند. فشار اسمزی حاصل باعث نفوذ سریع مقدار زیادی آب به داخل سلول شده و در نتیجه نوک کپسول باز می‌شود و نماتوسیت همراه با رشته‌های فنر مانند حاوی سم به‌شدت به سمت طعمه شلیک می‌گردد (Holstein and Tardent, 1984).

به نظر می‌رسد که سموم عروس های دریایی هم از لحاظ ترکیب شیمیایی سم و هم از نظر عوارضی که ایجاد می‌کنند کاملاً شبیه به یکدیگر هستند (Keen, 1971). بنابراین نتیجه‌ای که از بررسی سم یک عروس دریایی به دست می‌آید در مورد اکثر عروس های دریایی دیگر نیز صدق می‌کند. در مطالعات گذشته، جهت استخراج سم از نماتوسیت ها، حلال های آلی نظیر استون و اتانول مورداستفاده قرار می‌گرفت، زیرا تصور براین بود که سم موجود در نماتوسیست ها ماهیت نا قطبی یا کم قطبی دارد؛ اما امروزه با شناخت ساختار شیمیایی این سم و با توجه به اینکه این سم یک پلی پپتید قطبی می‌باشد، بهترین و کم هزینه‌ترین راه استخراج آن استفاده از آب نمک یا نرمال سالین است (Kawabata *et al*., 2013). در روش Bloom پیشنهادشده، نماتوسیست ها با آبی که عروس های دریایی از آن صیدشده‌اند استخراج شوند زیرا عروس های دریایی با همان شرایط pH و شوری آبی که در آن زندگی می‌کنند سم خود را تولید کرده و باعث مسمومیت می‌شوند. روش Bloom به عنوان یک روش مقدماتی مؤثر و پاک در آماده سازی سم فعال نماتوسیت ها برای آنالیز آزمایشگاهی به کار می رود. دلیل استفاده از این روش ناپایداری دمایی سم استخراج‌شده از نماتوسیت است. در حین انجام آزمایش مشاهده شد که پس از هر بار فریز کردن یا در یخچال گذاشتن سم خام و استفاده دوباره از آن، تمام مواد فعال بیولوژیکی موجود در سم حتی در عرض یک روز، قدرت بیولوژیکی خود را از دست می‌دهند. این نوع عملکرد در سم اکثر عروس های دریایی مشاهده شده است. این عملکرد سم ثابت کرد که این سم در حین فرایند خالص‌سازی بسیار ناپایدار می‌باشد. با توجه به این نتایج این‌طور استنباط شد که تمامی ترکیبات فعال که قابل حل در آب بوده و توسط آب استخراج‌شده‌اند، در زمره پلی پپتیدهای (پروتئین) ناپایدار محسوب می‌شوند؛ بنابراین جهت اثبات وجود باند های پروتئینی، سم خام، توسط SDS-PAGE موردبررسی قرار داده شد. هر یک از ۱۵ باند مشاهده‌شده در SDS-PAGE مجموعه پروتئین های را نشان می‌دهد که دارای یک وزن مولکولی مشابه هستند اما ترکیبات فعال سم که باعث اثرات بیولوژیکی و مرگ می‌شود را به صورت

مستقیم، نمی‌توان توسط SDS-PAGE نشان داد. برای این که اثرات فعال بیولوژیکی موجود در سم اثبات شود، نیاز به خلوص بیشتر سم از طریق HPLC و سایر راه حل های تخلیص پروتئین، است. SDS-PAGE یک روش کم هزینه، سریع و تکرارپذیر در مطالعه پروتئین ها است. این روش به‌طورمعمول برای بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین ها و پپتید ها بکار می رود. در ضمن با انجام روش بلاتینگ بعدازآن، امکان بررسی آنتی ژنسیته[1] یا تعیین توالی پروتئین ها و پلی پپتید ها فراهم می‌شود. این روش را می‌توان به هدف خالص‌سازی مقادیر کم پروتئین ها نیز به کاربرد. بدین لحاظ امروزه SDS-PAGE به عنوان پر استفاده ترین روش در میان روش های الکتروفورزی مطرح می‌باشد (mostaffay, 1378،). طی تحقیقات انجام‌شده، وجود فلزات سنگین در سم عروس دریایی به اثبات رسیده است. آزمایش‌هایی همچون تکنیک شعله وجود مقادیر بالای از کلسیم را در این سم آشکار نموده است (hoddavand,1393). در این پژوهش بر آن شدیم که با استفاده از کیلیت های شیمیای که به صورت اختصاصی برای دفع فلزات سنگین از بدن ساخته‌شده‌اند، بتوانیم این هسته کلسیمی را از زنجیره‌های جانبی آن جدا کرده تا ساختار سم از هم پاشیده و در نتیجه آن سم کارکرد بیولوژیکی خود را از دست بدهد.

بسیاری از سموم که توسط جانوران تولید می‌گردد بر پایه پروتئینی استوار بوده و برخی از این پروتئین ها دارای یک هسته مرکزی هستند که معمولاً کاتیون یک فلز می‌باشد. این فلز اگر از جنس کلسیم باشد، با بر هم زدن نظم کانال های سدیم- پتاسیمی در سلول های قلب باعث اختلال در عملکرد ضربان قلب شده که در نتیجه آن حمله قلبی رخ می‌دهد به سمومی که داری چنین عملکردی باشند کاردیوتوکسیک[2] گفته می‌شود. (Oviedo and Rodringu, 2003). آنزیم های پروتئولیتیک[3]، سهم عمده‌ای در توکسین سم عروس دریایی دارند. این آنزیم ها باعث عوامل مسمومیت همچون ادما[4]، نکروز و خونریزی می‌شوند (Takeya *et al*., 1990). اثرات سیتوتوکسی ناشی از پروتئاز، شامل تخریب ماتریکس خارج سلولی و بافت همبند اطراف عروق خونی می‌شود (Beynon, and Bond, 1989). همچنین آنزیم هیالورونیداز به صورت رایج در سم عروس دریایی مشاهده شده است (Nget-Hong and Gnanajothy, 1992). این آنزیم در سم اکثر حیوانات موجود می‌باشد (1984 Geren and Odell,) و عامل پخش سم در بدن طعمه بوده (Kreil, 1995) و باعث هیدولیز بافت‌های آغشته به سم می‌شود که این روند در نهایت باعث تسهیل تأثیرگذاری اجزای دیگر زهر و نفوذ بیشتر زهر به بدن طعمه می‌گردد (Lee, 2011).

کیلیت های فلزی از طریق قدرت پیوند بالای که توسط الکترون های ناپیوندی‌شان ایجاد می‌شود قادرند به کاتیون های فلزی متصل شده، آن‌ها را به دام انداخته و آنتروپی سیستم را کاهش دهند. این کیلیت ها اگر به صورت دارو باشند و برای درمان با مسمومیت های فلزی مورداستفاده قرار گیرند به دو صورت خوراکی و تزریقی به فرد مسموم داده می‌شوند که پس از پیوند دادن با فلز موردنظر از طریق ادرار دفع می‌گردند. برخی از

۱-Antigenicity

۲-Cardiotoxic

۳- آنزیمی که مولکول پروتئین را می‌شکند و آن را به ترکیبات ساده‌تر تبدیل می‌کند.

٤- جمع غیرطبیعی آب و مایعات میان بافتی موجود در پلاسما در فضای میان بافتی، زیر پوست و حفره‌های بدن و بعلت انتقال آنها از درون رگها به محلهای یاد شده است.

این کیلیت ها به صورت اختصاصی عمل کرده و با فلز موردنظر پیوندی محکم‌تری برقرار می‌نمایند. سم *Crambinella Orsini* نیز مانند سم عروس های دیگر یک متالوپروتیئن با هسته کلسیمی است (hoddavand,1393). در این پژوهش مشاهده شد Na-EDTA قدرت جذب کلسیم مرکزی را داشته و باعث از هم پاشیدگی ساختار سم و در نتیجه خنثی کردن سم می‌شود. طی تحقیقی که توسط *Blaurock-Busch* و همکاران (2014) در مقایسه بین عملکرد سه کیلیت EDTA و Na-EDTA و Ca-EDTA برای پیوند شدن با کلسیم و خروج آن از بدن صورت گرفت، دریافتند که با توجه به ساختار شیمیایی این سه کیلیت Na-EDTA بهترین گزینه برای دفع کلسیم از بدن است. کیلیت Na- EDTA، کیلیت اختصاصی برای دفع کلسیم از بدن بوده که از مشتقات EDTA می‌باشد. EDTA یک لیگاند شش دندانه با میل ترکیبی قوی است که دارای ثابت تشکیل بالای می‌باشد. این کیلیت می‌تواند با نسبت ۱-۶، فلزات سنگین را از بدن خارج کرده و رفع مسمومیت کند. یکی از مشکلات عمده EDTA در هنگام مصرف، کمبود شدید کلسیمی است که فرد مسموم با آن مواجه می‌شود که این به دلیل قدرت پیوندی است که EDTA با Ca^{+2} داشته و نه تنها به کلسیم موجود در خون متصل شده، بلکه باعث خروج کلسیم از بافت های بدن موجودات زنده نیز می‌شود. این عارضه حتی زمانی که این کیلیت برای درمان مسمومیت با فلزات دیگر استفاده می‌شود، مشاهده شده است. برای رفع این عارضه معمولاً از رژیم کلسیمی بعد از استفاده از EDTA استفاده می‌کنند که البته امروزه با باند کردن Ca^{+2} با EDTA به صورت Ca-EDTA تا حدودی این مشکل را بر طرف نموده‌اند (Crisponi *et al*., 2015).

منابع

A. G., & Lieberman, B. S. (2007). Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. PloS one, 2(10), e1121.

Ceren, C. R., & Odell, G. V. (1984). Biochemistry of spider venoms.Handbook of natural toxins.

Cohen, B. D., Spritiz, N., Lubash, G. D., & Rubin, A. L. (1959). Use of a calcium chelating agent (NaEDTA) in cardiac arrhythmias. *Circulation*,*19*(6), 918-927.

Collins, S. P., Comis, A., Marshall, M., Hartwick, R. F., & Howden, M. E. H. (1993). Monoclonal antibodies neutralizing the haemolytic activity of box jellyfish (Chironex fleckeri) tentacle extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *106*(1), 67-70.

Crisponi, G., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., Crespo-Alonso, M., Zoroddu, M. A., & Peana, M. (2015). Kill or cure: Misuse of chelation therapy for human diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, *284*, 278-285.

Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., ... & Romano, S. L. (2007). The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.

Endean, R., Duchemin, C., McColm, D., & Fraser, E. H. (1969). A study of the biological activity of toxic material derived from nematocysts of the cubomedusan Chironex fleckeri. *Toxicon*, *6*(3), 179-204.

Fujii, H., Kurahshi, T., cong, Z., Ohtsuki, A., Wang, C. and Tanizawa, M., 2011. Structure-Function relationship of metalloproteins. Annual Review. 80–81.

Hadavand, 1393. Extraction and identification of the Ghetto Seaweed Nematocytic Poison. Marine Science and Technology University of Khorramshahr. MSc Thesis. P. 56

Haddock, S. H. D., & Case, J. F. (1999). Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores. *Marine Biology*, *133*(3), 571-582.

Holstein, T. and Tardent, P., 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. Science, 223 (4638): 830–833.

tentacle nematocyst venom in cultured rat hepatocytes. Toxicon, 34(7), 771-778.

Hsieh, Y. P., & Rudloe, J. (1994). Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries. *Trends in Food Science & Technology*, *5*(7), 225-229.

Jung, H., & Choi, S. C. (1994). Sequential method of estimating the LD50 using a modified up-and-down rule. *Journal of biopharmaceutical statistics*,*4*(1), 19-30.

Kass-Simon G., Scappaticci A. A., 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. Canadian Journal of Zoology, 80: 1772–1794.

Kawabata, T., Lindsay, D. J., Kitamura, M., Konishi, S., Nishikawa, J., Nishida, S., ... & Nagai, H. (2013). Evaluation of the bioactivities of water-soluble extracts from twelve deep-sea jellyfish species. *Fisheries Science*,*79*(3), 487-494.

Keen, T. E. B. (1971). Comparison of tentacle extracts from Chiropsalmus quadrigatus and Chironex fleckeri. *Toxicon*, *9*(3), 249-254.

Kim, E., Lee, S., Kim, J. S., Yoon, W. D., Lim, D., Hart, A. J., & Hodgson, W. C. (2006). Cardiovascular effects of Nemopilema nomurai (Scyphozoa: Rhizostomeae) jellyfish venom in rats. *Toxicology letters*, *167*(3), 205-211.

Kreil, G. (1995). Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. *Protein science: a publication of the Protein Society*, *4*(9), 1666.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.Lee, H., Jung, E. S., Kang, C., Yoon, W. D., Kim, J. S., & Kim, E. (2011). Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon*, *58*(3), 277-284.

Mostafaei, AS, 1378. Practical and theoretical guide for protein electrophoresis in gel. Tazkeyh Publishing House, Tehran, No. 1. The first year., P. 127.

Nget-Hong, T., & Gnanajothy, P. (1992). Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal

Houck, H. E., Lipsky, M. M., Marzella, L., & Burnett, J. V. (1996). Toxicity of sea nettle (Chrysaora quinquecirrha) fishing venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *103*(2), 299-302.

Oviedo, C., & Rodríguez, J. (2003). EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. Quimica Nova, 26(6), 901-905.

Ozacmak, V. H., Thorington, G. U., Fletcher, W. H., & Hessinger, D. A. (2001). N-acetylneuraminic acid (NANA) stimulates in situ cyclic AMP production in tentacles of sea anemone (Aiptasia pallida): possible role in chemosensitization of nematocyst discharge. *Journal of Experimental Biology*, *204*(11), 2011-2020.

Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H. and Heller, H. C., 1998. Life. The Science of Biology, 4: The Evolution of Diversity. Chapter 31.

Ramasamy, S., Isbister, G. K., Seymour, J. E., & Hodgson, W. C. (2005). The in vivo cardiovascular effects of an Australasian box jellyfish (Chiropsalmus sp.) venom in rats. *Toxicon*, *45*(3), 321-327.

Satterlie, R. A. (2002). Neuronal control of swimming in jellyfish: a comparative story. *Canadian Journal of Zoology*, *80*(10), 1654-1669.

Takeya, H., Onikura, A., Nikai, T., Sugihara, H., & Iwanaga, S. (1990). Primary structure of a hemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of Crotalus ruber ruber. Journal of biochemistry, 108(5), 711-719.

Tibballs, J. (2006). Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon*, *48*(7), 830-859.

Turner, R. J., & Freeman, S. E. (1969). Effects of Chironex fleckeri toxin on the isolated perfused guinea pig heart. *Toxicon*, *7*(4), 277-286.

Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., & Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, *460*(7257), 823-830.

Zezima, K., 2010, Death Does Not Deter Jellyfish Sting, The New York Times, July 22, 2010, page A11.

Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. Zootaxa, 3148, 7-12.

Extraction and neutralization nematocyst venom of crambionella orsini jellyfish whit using of chelating Na-EDTA

Niloofar Saki [1], Yadollah Nikpour [1*], Ahmad Taghavi Moghadam [2], Kamal Ghanemi [1]

1. Department of Sea Chemistry, Faculty of Marine and Ocean Sciences, Khorramshahr Marine Science and Technology university, Khorramshahr
2. Razi Vaccination Institute, Ahvaz

Abstract:
Jellyfish is one of the poisonous animals that causing human poisoning. Found a variety of jellyfish in the Persian Gulf. Although these species can't Cause of quick death in humans but they have harmful effects on human health system and have Following are the side effects. In this study extracted *Crambionella Orsini* Jellyfish Venom According to *Bloom* method and was obtained its Concentration by *Biuret* method and Calculated LD50 by *Jung and Choi* method. According to Venom concentration and its LD50 was determined that Cause of death mice 0.5 ml of venom. The use of Na-EDTA for neutralizing venom. This Chelate Was injected in two ways to mice that in both methods, Prevented death. Na-EDTA is dedicated Chelate for Calcium excretion from body that According to nuclear calcium's venom is able to separated that from Venom structure and neutralize venom.

Keywords: Na-EDTA, Crambionella Orsini, Chelating, Neutralize poison, Persian Gulf

Tab (1): Molecular weight samples jellyfish toxin.
Tab (2): The effect of Na-EDTA chelating by toxin injection (the first method).
Tab (3): The infusion of Na-EDTA chelating mixed with toxin (the second method). Fig (1): SDS-PAGE gel toxin of proteins jellyfish *Crambionella orsini*, stained with coomassi blue G-250.

*Corresponding author E-mail: Nikpour1342@yahoo.com