محافظت درون بدنی علیه سموم عقربها به وسیله ایمنی‌زایی لیپوزومی

بهزاد مسیحی‌پور - کارشناس ژنتیک مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام خوزستان
احمد تقوی مقدم- کارشناس ارشد بیوشیمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام خوزستان

چکیده

امکان افزایش پاسخ ایمنی هومورال که قادر به محافظت بدن در برابر اثرات کشنده سم عقربها باشد در موش ارزیابی شده است. فراکسیون سمی تهیه شده از سم عقرب Tityus serrulatus[1] که توسط لیپوزومهای[2] اسفنگومیلین - کلسترول بدام افتاده بودند موجب تولید ایمونوژنهای سم‌زدا گردید. بعد از سه تزریق از این ایمونوژن به گروه ۱۸ تایی موش، بجز سه عدد از آنها بقیه همگی پاسخ ایمنی IgG نشان دادند که هم اختصاصی بوده و هم میل ترکیبی خوبی با آنتی‌ژن سمی داشتند. آزمایشهای خنثی‌سازی In vitro نیز نشان داده است که مجاور سازی قبلی دوز کشنده این فراکسیون سمی با سرم ایمن شده در گرمخانه، قدرت کشندگی سم را قویاً کاهش می‌دهد. آزمایشات محافظتی In vivo همچنین نشان داد موشهائی که حداکثر میزان آنتی بادیهای ضد سم را در گردش خون دارند می‌توانند در مقابل دو برابر میزان LD50 نرمال فراکسیون سمی مقاومت کنند و زنده بمانند در حالیکه همین میزان از فراکسیون سمی باعث مرگ تمامی موشهای غیر ایمن شاهد گردید. با وجود این معلوم شد که چنین حفاظتی در برابر سم، چه از نظر پایداری زمانی بیش و چه از نظر تأثیر در مقادیر بالاتر سم محدودیت دارد.

مقدمه

سم عقربها دارای اثرات مسموم کننده قوی می‌باشد. به طوری که در بعضی از مناطق جهان مشکلات بهداشتی مهمی را بوجود می‌آورد.

در کشور برزیل عقرب *Tityus serrulatus* غالباً باعث گزش انسانها می‌شود که در نتیجه آن درصد قابل ملاحظه‌ای از افراد جان خود را از دست می‌دهند. تجویز سرمهای اختصاصی ضد عقرب گزیدگی تهیه شده از اسب، روش درمانی پذیرفته شده برای خنثی سازی اثرات سم است. با اینحال تاثیر اینگونه درمان، قویاً به سرعت شروع درمان اختصاصی وابسته است، زیرا پروتئینهای سمی سریعاً در تمامی بدن انتشار می‌یابند و همین مسئله به دام اندازی آنها را توسط آنتی‌بادیهای اختصاصی دچار مشکل می‌سازد. برعکس، در صورتیکه از قبل پادتنهایی که میل ترکیبی زیادی نسبت به سم دارند در گردش خون وجود داشته باشند، به محض ورود پادگن سمی به بدن بر اثر گزش عقرب، بلافاصله بوسیله این پادتنهای اختصاصی به دام می‌افتند. امکان ایجاد حالت ایمنی مطلوب در افرادی که در معرض خطر عقرب گزیدگی قرار دارند هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از این تحقیق رسیدن به چنین نتیجه‌ای بااستفاده از مدل حیوانی است. به دلیل ماهیت بسیار اختصاصی سم عقرب، مشکلات خاص فراوانی در این زمینه وجود دارد. این سمها پروتئینهای کوچکی هستند (۶۰ تا ۶۴ اسیدامینه) که برای پستانداران بسیار سمی هستند (در بعضی موارد LD50 آن کمتر از ۰/۲ میکروگرم برای هر موش است) و این ویژگی به این دلیل است که این سموم قادرند با کانال سدیم بافتهای عصبی باندهای بسیار قوی تشکیل دهند. در دستورالعمل‌های ایمن‌سازی، میبایست این قابلیت سم مد نظر قرار گیرد.

علاوه بر این سم، عقرب تیتیوس توکسینهای متعددی دارد که به دو گروه متفاوت آلفا و بتا تعلق دارند و می‌توان آنها را بر اساس چگونگی پیوندشان به کانال سدیم تشخیص داد. بویژه که سم این عقرب دارای توکسین بتا است و تمایل زیادی به کانال سدیم دارد. کار منتشر نشده‌ای از این آزمایش نشان داده که شباهتهای ساختاری خیلی کم بین توکسین آلفا و بتا وجود دارد بنابراین سرم ضد توکسین آلفا نمی‌تواند توکسین بتا را شناسائی نماید. عکس قضیه نیز صادق است. با وجود این برای محافظتی مطلوب می‌بایست هر دو نوع توکسین خنثی شوند. بنابراین هر کوششی برای افزایش پاسخهای ایمنی با یک سری سئوالات مهم بنیادی روبر می‌شود.

به ویژه نکات مهم در طریقه استفاده از این پادگنها برای بوجود آوردن پاسخهای ایمنی مطلوب میزان ایمنی مورد انتظار و مدت زمان پایداری آنهاست. در این مقاله سعی بر این بوده تا با آزمایشهایی به چنین سئوالاتی پاسخ داده شود و نتایج قانع کننده‌ای ارائه گردد.

مواد و روشها

تهیه فراکسیون سمی از سم عقرب *Tityus serrulatus*

فراکسیون سمی دریافتی، مطابق با باند اصلی توکسینی است که پس از عبور سم خام عقرب *Titius cerolatus* از روی ستون کرماتوگرافی حاوی ژل سفادکس ۵۰ توسط بنیاد Ezequiel dias در Belo Horizonte برزیل تهیه گردیده است. این فراکسیون پس از لیوفیلیزاسیون به میزان ۳/۳۵ میلی گرم در میلی لیتر در بافر سرم فیزیولوژی فسفاته (PBS) حل شد. سپس برای تهیه لیپوزومها، آزمایشهای الیزا یا سنجشهای توکسیسیتی با غلظت معین و مناسب رقیق گردید.

تهیه لیپوزومها

لیپوزومهای اسفنگومیلین - کلسترول طبق روش New و همکاران که روش اصلاح شده دستورالعمل تبخیری فاز معکوس میباشد و تولید لیپوزومهای لایه‌ای بزرگ می‌کند، تهیه شده است. غلظت اولیه فراکسیون سمی ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. در آزمایشات کنترل، از آلبومین سرم گاو (BSA) بجای مواد سمی استفاده شد. مقدار پیوستن پادگن با استفاده از دوز Lowry در محلول شروع کننده و صاف شده رویی، مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از برداشت نهائی (گلوله کردن) لیپوزومومها (۱۰۰۰ g برای ۲۰ دقیقه)، لیپوزومهای

تهیه شده در دمای ۴°C نگهداری شدند.

الیزا

پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ایمونولون NUNC II به مدت یکشب با ۱۰۰ میکرولیتر (حجم استاندارد) از محلول حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر فراکسیون سمی در بافر کربنات با pH=۹/۶ پوشانده شدند.

بعد از شستن با سرم فیزیولوژی، توئین ۰/۰۵٪ محلول مهار کننده (۲ درصد کازئین در P.B.S.) به آن اضافه شد (یکساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد). بعد از ۶ بار شستشو، رقت‌های مناسبی از سرم موش (P.B.S و ۰/۲۵٪ کازئین و ۰/۵٪ توئین ۲۰) اضافه شد (یکساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد). سپس IgG ضد موش جفت شده با پراکسیداز (سیگما، با رقت $\frac{1}{1000}$) اضافه و حفره‌ها شسته شد (یکساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول - فنیلین دی‌آمین (۰/۳۳ میلی گرم در میلی لیتر در بافر سیترات با pH=۵/۲) در حضور آب اکسیژنه ۰/۰۴٪ اضافه گردید. با افزودن ۲۰ میکرولیتر اسید سولفوریک با رقت $\frac{1}{20}$ واکنش متوقف و مقدار (جذب نور) آن در دستگاه Titer tek multiscan خوانده شد.

با تغییر در رقت سرم از $\frac{1}{50}$ تا $\frac{1}{3200}$ پادتنها بادیها تعیین گردید. بر مبنای رقت سرمی که دو برابر جذب سرم قبل از ایمن‌شدن را بدهد).

برای الیزای مقایسه‌ای از همان دستورالعمل استفاده شد. با این تفاوت که قبل از انتقال سرمها به حفره‌ها، رقت سرمی که نصف حداکثر علائم را بدهد ($\frac{1}{200}$) با غلظت‌های افزایشی فراکسیون سمی، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شد.

دستورالعمل‌های ایمن‌سازی

در این زمینه‌دو دستورالعمل متفاوت وجود دارد که در هر دوی آنها از موش نژاد C57BL/6 پرورشی در آزمایشگاه استفاده می‌شود.

دستورالعمل استاندارد

بعد از جمع‌آوری سرمهای ایمن‌شده (خونگیری از قسمت Retro-Orbital)، ۱۵ میکروگرم از فراکسیون سمی در برگرفته شده با لیپوزوم در ۱ میلی‌گرم ژل هیدروکسیدآلومینیوم به ۱۸ موش از راه زیر جلدی (روز اول) تزریق گردید. ۱۷ روز بعد دوز یادآور مشابهی داده شد. در روز بیست و چهارم، تزریق نهائی (۱۵ میکروگرم) در پریتوئن انجام گردید. سرم ایمن شده در روز سی و یکم جمع‌آوری و از بعضی از موشها نیز بعد از هفته نهم دوباره خون گیری شد.

دستورالعمل سریع

به گروههای دوتائی موش، مقادیر متفاوتی از فراکسیون سمی در برگرفته شده توسط لیپوزوم (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکروگرم) در یک میلی‌گرم هیدروکسید آلومینیوم تزریق شد. این تزریقها در روزهای صفر، ۴، ۸ و ۱۳ انجام شد و در روز بیستم موشها خونگیری شدند.

سنجش سمیت

LD50 فراکسیون سمی عقرب *T. serrulatus* که در این تحقیق استفاده شده ۷ میکروگرم برای هرموش ۲۰ گرمی بود. (تزریق زیر جلدی در موش نژاد C57B1/6) دوز ۱۰ میکروگرمی که تمامی اعضای یک گروه را به هلاکت رساند به عنوان LD100 محسوب شد. میزان سمیت لیپوزومهای حاصله نیز با استفاده از گروههای ۳ تا ۶ تایی موش که مقادیر متغیری لیپوزوم و یک میلی‌گرم هیدروکسید آلومینیوم به آنها تزریق گردید، اندازه گیری شد.

سنجش خنثی‌سازی در In vitro

نمونه‌هائی (۱۰ میکروگرم) از فراکسیون سمی (یک I LD100) با ۲۰ میکرولیتر سرم ایمن یا سرم پیش ایمن موش با حجم نهائی ۱۰۰ میکرولیتر به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه قرار داده شدند. سپس به موشهای نژاد C57Bl/6 از راه زیر جلدی (۴ حیوان در هر گروه) تزریق گردید. پس از ۲۴ ساعت تعداد مرده‌ها شمارش شدند.

سنجش محافظت ایمنی In vivo

موشهای ایمن شدنه که براساس تیترهای الیزا گروه بندی شده بودند (چهار حیوان در هر گروه) با ۱۴ میکروگرم LD50 2) و یا ۲۱ میکروگرم LD50 3) از فراکسیون سمی با تزریق زیرجلدی چالش شدند. موشهای گروه‌های کنترل با BSA (آلبومین سرم گاو) در بر گرفته شده با لیپوزوم، ایمن شده بودند. پس از ۲۴ ساعت موشهای مرده شمارش شدند.

جدول ۱- آزمایشات خنثی‌سازی به روش In vitro

موشها	سرم مورد آزمایش	متوسط جذب الیزا	موشهای زنده مانده
گروه ۱	-	-	۰/۴
گروه ۲	پیش‌ایمن	-	۰/۴
گروه ۳	ایمن	۰/۵	۲/۴
گروه ۴	ایمن	۱/۰	۳/۴

چهار گروه از موشهای C57Bl/6 به طریق زیرجلدی ۱۰ میکروگرم از سم *Tityus serrulatus* (LD100) را که به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه‌سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و با ۲۰ میکرولیتر از سرم موش ایمن همراه بود دریافت داشتند. گروه ۱ فقط جزء سمی را دریافت داشتند. موشهای زنده مانده ۲۴ ساعت پس از تزریق شمارش شدند.

جدول ۲- آزمایشات محافظت به شکل In vivo

	موشها	وضعیت ایمنی موشها	میانگین جذب الیزا توسط سرمهای انفرادی	موشهای زنده مانده
آزمایش A[a]	گروه ۱	شاهد	-	۰/۴
	گروه ۲	غیر حساس	۰/۰۵۰	۱/۴
	گروه ۳	خیلی حساس	۱/۰۲۲	۳/۴[b]
آزمایش B	گروه ۱	شاهد	-	۰/۴
	گروه ۲	غیر حساس	۰/۰۶۰	۱/۴
	گروه ۳	خیلی حساس	۱/۳۸۷	۴/۴
آزمایش C	گروه ۱	شاهد	-	۰/۴
	گروه ۲	خیلی حساس	۱/۰۷۴	۱/۳

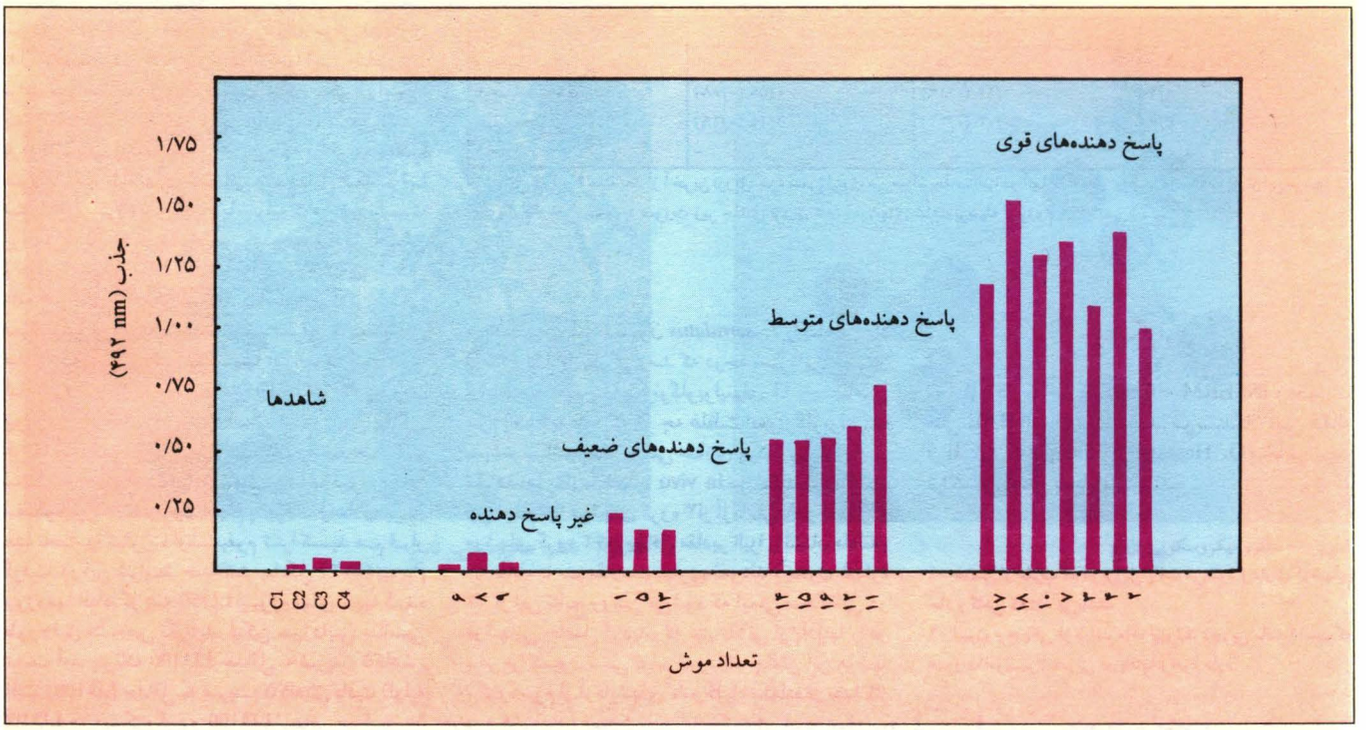
موشها براساس پادگن، آنتی‌توکسین سرم طبقه‌بندی شدند. ۴ گروه موشها به طریق زیرجلدی ۱۴ میکروگرم (آزمایش B, A یا ۲۱ میکروگرم (آزمایش C) اجزاء سمی *Tityus serrulatus* را دریافت داشتند. گروههای شاهد بوسیله لیپوزوم پیچیده BSA-ایمن‌شدند. موشهای زنده مانده ۲۴ ساعت پس از تزریق شمارش شدند.

* موشهای که براساس سریع ایمن شده‌اند

* نمونه‌های سرم موشهای مرده دارای یک ارزش Elisa به میزان ۰/۵ واحد جذب بودند.

نتایج

لیپوزومها طبق روش New و همکاران، هم با فراکسیون سمی G-50 عقرب *T. serrulatus* و هم با BSA به عنوان کنترل تهیه شده بودند هر دو پادگن به دام اندازی به طور مطلوبی (۷۳ تا ۷۵ درصد) را نشان داده بودند. در مورد پادگن سمی، کاهش قابل



شکل ۱- پاسخهای انفرادی موشها به ایمنی‌زایی با ۱۵ میکروگرم از جزء سمی لیپوزوم به دام افتاده *T. serrulatus*. موشها بوسیله تزریق زیرجلدی در روزهای ۱، ۱۸ و ۲۴ ایمن شدند. سرم در روز ۳۱ جمع‌آوری و بوسیله روش الیزای مستقیم مورد آزمایش قرار گرفت.

ملاحظه‌ای در میزان سمیت آن حاصل گردید. LD100 اولیه پادگن (۱۰ میکروگرم برای هر موش ۲۰ گرمی) به حدی کاهش یافت که قدرت کشندگی کامل آنتی‌ژن در برگرفته شده توسط لیپوزومها، به حد ۵۰ میکروگرم برای هر موش ۲۰ گرمی نرسید (ارقام نشان داده نشده).

به همین دلیل براساس دستورالعمل استاندارد ایمن‌سازی از رقم ۱۵ میکروگرم از پادگن در برگرفته با لیپوزوم برای هرموش، هم به عنوان دوز شروع کننده هم به عنوان دوز یادآور استفاده گردید. تمامی موشها با این روش ایمن‌سازی، زنده ماندند. بعد از تزریق سوم، سرم موشها بطور جداگانه جمع‌آوری گردیدند و با روش مستقیم الیزا، مورد آزمایش قرار گرفتند. شکل شماره ۱ پاسخهای انفرادی مشاهده شده در موشها را نشان می‌دهد. سه موش بطور وضوح قادر به دادن پاسخ ایمنی برضد فراکسیون سمی نبودند در صورتیکه بقیه پاسخ دادند.

حداکثر پاسخگویی ایمنی در موشها متغیر بود و بر همین اساس می‌توان آنها را به سه گروه تقسیم‌بندی نمود (شکل ۱). میانگین تیترهای ایمونوگلوبولین G ضد سم از سرمهای هر کدام از سه گروه موش اندازه گیری شده و به ترتیب به $\frac{1}{5}$ (پاسخ ایمنی ضعیف)، $\frac{1}{100}$ (پاسخ ایمنی متوسط) و $\frac{1}{3200}$ (پاسخ ایمنی قوی) تقسیم‌بندی شدند. اختصاصی بودن پاسخ پادتن بوسیله آزمایشهای الیزای مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفت (نتایج نشان داده نشده اند).

مهار کامل پادگن در بالاترین غلظت استفاده شده، مشاهده گردید (۱۰ میکروگرم در هر حفره) و بعضی علامات در حدود ۵۰٪ بوسیله کمتر از ۰/۱ میکروگرم پادگن مهار گردید که این نشان می‌دهد ایمونوگلوبولینها میل ترکیبی زیادی دارند. تجربیات خنثی سازی در شرایط In vitro به منظور متعادل کردن انتخاب دوز چالش برای آزمایشات In vivo انجام شد. نتایج آنها در تابلوی شماره ۱ گزارش شده است. سرمهای جمع‌آوری شده ایمن و غیر ایمن با جذبهای نوری متفاوت الیزا با مقدار فراکسیون سمی معادل یک LD100 به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد ایمن تمامی موشها کشته شدند. به هر حال اثرات ایمنی‌زا در زمانی که فراکسیون سمی قبلاً با سرم ایمن مجاور گردیده بود، مشاهده شده است و این نکته بیانگر آنست که پادتن‌های محافظت‌کننده توسط موشها ساخته شده‌اند. بنظر می‌رسد که اثر حفاظتی با مقادیر آنتی توکسین الیزا مطابقت داشته باشد. (تابلوی شماره ۱). این نتایج تائید کننده نتیجه آزمایشهای حفاظتی In vivo است (تابلوی شماره ۲). موشهای ایمن براساس وضعیت ایمنی که بوسیله مقادیر انفرادی تعیین شده از الیزا و مقایسه با مقادیر فراکسیون سمی که مشخصاً بالاتر از LD100 است تقسیم‌بندی شدند. در آزمایش A، موشهای ایمن شده با دستورالعمل سریع ایمن سازی (به مواد و روش کار مراجعه شود) در مقابل جالشی مرگ آفرین، مقاوم بودند (گروه ۲ و ۳). و این‌به وضوح ارتباط با تیترهای پادگن داشت.

از گروهی که پاسخ ایمنی قوی داده بودند فقط یک موش مرد و این همان موشی بود که حداقل‌مقدار الیزا را داشت (۰/۵ واحد جذب در مقایسه با مقدار متوسط ۱/۰۲). در آزمایش B هر ۴ موش از گروه با پاسخ ایمنی قوی (گروه ۳) با روش ایمن سازی اصلی در آزمایش پادتن جان سالم بدربردند. مجدداً موشهائیکه سطح آنتی بادی ضد سم کمی داشتند، مقاومت اندکی نسبت به چالش نشان دادند. در آزمایش C از یک گروه شامل ۳ موش با تیترهای پادگن بالا که با مقدار توکسین معادل 3LD50 تزریق شده بودند فقط ۱ موش در برابر این چالش سخت، زنده ماند. نهایتاً مشاهده شد که اثر محافظتی به طوری که در جدول شماره ۳ نشان داده شده موقتی بوده است. دو گروه موش با ۱۴ میکروگرم پادگن سمی (LD50) مورد آزمایش قرار گرفتند که ۹ هفته پس از آخرین تزریق یاد آور لیپوزوم انجام گرفت. در گروه موشهای با پاسخ ایمنی متوسط، هیچ موش زنده‌ای مشاهده نشد در صورتیکه ۳ موش از ۶ موش گروه با پاسخ ایمنی قوی، زنده ماندند. این مشاهده‌ها به وضوح با کاهش تیترپادتن ضد سم موجود در سرم موشهای استفاده شده برای این آزمایش، مطابقت داشته است (تابلوی شماره ۳).

بحث

سم عقرب *T. serrulatus* فوق‌العاده سمی است و باعث مرگ افراد زیادی در برزیل می‌شود. این بررسی

به منظور ارزیابی امکان محافظتی موثر بر علیه اثرات سم *T. serrulatus* به اجرا در آمده است. موش به عنوان مدل آزمایشگاهی انتخاب گردید. زیرا این جانور به اثرات سم حساس و مدل مناسبی برای پیگیری ایجاد ایمنی محافظت کننده در مقابل پادگنهای سمی است. در آزمایشهای اولیه سعی بر این بود که فراکسیون G50 سم را با تغییر شکلهای شیمیائی سم زدایی نمائیم (با استیلاسیون گروههای آمین یا نیتراته کردن ته نشست تیروزین). نتیجه آن تشخیص ضعیف پادگن اصلی بوسیله پادتنهای تولید شده با فراکسیون تغییر شکل یافته شد (نتایج منتشر نشده). بنابراین پادگن سمی همراه با لیپوزومها به سیستم ایمنی معرفی گردید با این امید که تغییر فیزیکی توکسینها اثرات مرگبار آن را کاهش دهد با توجه به اینکه قابلیت یاور بودن لیپوزومها هم قبلاً ثابت شده است. سم‌زدایی پادگن (فراکسیون کروماتوگرافی G50 نشان دهنده حداکثر سمیت سم خام است) باوارد سازی آن به لیپوزومهای اسفنگومیلین - کلسترول انجام پذیرفت و علاوه بر آن بعداً تحت واکنش با اوسمیفوم تتراکسید هم قرار گرفت. در این شرایط حداکثر پادگن (۷۳٪) به دام لیپوزومها افتاد. گرچه LD50 لیپوزومهای تهیه شده بطور دقیق مشخص نگردید، لیکن سم‌زدایی مناسبی بدست آمد چونکه LD100 حداقل به ضریب ۵ کاهش یافت (LD100 حداقل به ضریب ۵ کاهش یافت (اولیه LD100 ۱۰ میکروگرم و LD100 نهائی برابر ۵۰ میکروگرم یا بیشتر بود). میزان سم‌زدایی از سم مار که توسط دیگران انجام شده، بیشتر بود زیرا وزن LD50 بعد از بدام افتادن توسط لیپوزومها از ۲۱ به میکروگرم بیش از ۱۲۰۰ میکروگرم افزایش یافت در مورد کارما بنظر می‌رسد که سمیت باقیمانده به دلیل جذب سطحی بعضی از پادگنها که به سهولت بعد از تزریق ایمونوژن آزاد می‌شوند. در جریان این مطالعه از دوز ۱۵ میکروگرمی ایمن سازفراکسیون سمی در بر گرفته شده با لیپوزومها، برای هر موش C57 استفاده شد که هیچ مرگی در پی نداشت. با استفاده از دستورالعمل شرح داده شده در قسمت مواد و روش کار، این امکان وجود دارد که در تمامی این حیوانات بجز سه موش از ۱۸ موش دستورالعمل اصلی، پادنهای ضد سم را استخراج نمائیم. (موشهای شماره ۶، ۸، ۹ جدول شماره ۱). ایمنی حاصله ۱ هفته بعد از آخرین تزریق در بین حیوانات متفاوت بود. اکثر موشها (۱۲ عدد از ۱۸ عدد) پاسخ ایمنی IgG متوسط یا زیادی دادند که با روش الیزا ارزیابی شد (شکل ۱). این مسئله مشخص نیست که چرا بعضی از موشها قادر به تولید ایمنی نیستند اما این امکان وجود دارد که بعضی از این حیوانات پاسخ ایمنی IgM داشته باشند، بخصوص اگر بعضی پادگنها جذب سطحی لیپوزومها شده باشند. با این وجود نتایج حاصل دلگرم‌کننده هستند به خصوص در حیواناتی که زمینه ژنتیکی واحدی دارند و به تحریکات پادگن سمی به دام افتاده لیپوزومها بخوبی پاسخ می‌دهند. ظرفیت پادتنهای موجود در گردش خون برای خنثی‌سازی سم به روشهای In vitro - In vivo مورد ارزیابی قرار گرفت. مجاورسازی یک LD100 پادگن با سرمهای ایمن موش در گرمخانه و سپس تزریق آن به موش C57BL/6 به طوری قابل ملاحظه‌ای میزان سمیت فراکسیون *T. serrulatus* را کاهش داد (جدول ۱). به نظر می‌رسد که درجه سم‌زدایی سم در ارتباط مستقیم با ایمونوگلوبولینهای G اختصاصی سرم باشد، به طور که هر چه غلظت ایمونوگلوبولین G بیشتر باشد اثر خنثی سازی بیشتری دارد. این مشاهده‌ها با آزمایشهای In vivo نیز تائید گردید. در این آزمایشها موشهای گروه ۳ از آزمایش A و B بهتر از موشهای گروه ۲ که حداقل مقادیر الیزا را نشان دادند، در مقابله با سم مقاومت بهتری نمودند (جدول شماره ۲). از این نتایج روشن می‌شود که ایمنی محافظتی در موشهایی حاصل گردیده که تیتر بالائی از پادتنها را در برابر فراکسیون سمی تولید نموداند. چالش این موشها (گروه سوم از آزمایشهای A و B با استفاده از حداکثر دوز کشنده فراکسیون توکسیک سم عقرب *T. serrulatus* به زنده ماندن این حیوانات انجامید و بعد از چند ساعت بطور کلی آثار کسالت آنها بر طرف شده و سلامت خود را بازیافتند اگرچه قدرت ایمنی در هر دو مورد به وسعت عمل و زمان محدود بود. اولاً در آزمایش C از جدول ۲، حیوانات با مقاومت بالا کاملاً نسبت به مقابله با یک دوز پادگن معادل سه برابر LD50 مقاوم نبودند که نتیجه گرفته می‌شود ظرفیت خنثی‌کنندگی پادتنهای ضد توکسین با دوز توکسین به صورت اشباع در آمده است. ثانیاً موشهائی که با دستورالعمل استاندارد برای اولین بار ۹ هفته بعد از آخرین تزریق پادگن مورد آزمایش قرار گرفتند، به طور ضعیف در مقابل اثرات توکسین سم عقرب مقاوم بودند (جدول شماره ۳). این مسئله احتمالاً بدلیل کاهش پادتنهای ضد توکسین در گردش خون بوده است. همانگونه که کاهش در مقادیر الیزا بین هفته‌های اول و نهم مشاهده شد (جدول ۳). در نتیجه، این مطالعه نشان می‌دهد که توکسین عقرب در برگرفته شده توسط لیپوزومها می‌تواند باعث تولید پادگنها در گردش خون شود که برای خنثی نمودن توکسینها در موش کافی باشند. البته وقتی که این پادگنها از طریقی وارد بدن حیوان شوند که احتمالا شبیه به گزش عقرب باشد (مانند طریق زیرجلدی). تصور می‌شود که برای محافظت مؤثر موش در برابر چالش شدید به میزان زیاد پادگن نیاز باشد. به خصوص برای حمایت موثر از موش در آزمایشهای این نتایج می‌توانند نویدی در زمینه پیشرفت آسیب‌شناسی انسانی بشمار آیند. اما مسائلی از قبیل تفاوتهای ژنتیکی که باعث تولید تیتر بالایی از پادگن در هر فرد می‌گردد و نیز پایداری و ثبات میزان بالای پادگن در گردش خون، در مراحلی طولانی باید حل شود.

جدول ۳- مقاومت زمانی پادتن‌های آنتی‌توکسین سرم و اثر حفاظتی آنها در ایمنی موشها

وضعیت ایمنی موشها	متوسط جذب الیزا (انحراف معیار)		موشهای زنده مانده
	۱ هفته بعد	۹ هفته بعد	
با حساسیت معمولی	۰/۵۹ (۰/۰۸)	۰/۲۳ (۰/۱۶)	۰/۴
خیلی حساس	۱/۲۹ (۰/۱۸)	۰/۷۳ (۰/۲۲)	۳/۶
شاهد	-	-	۰/۶

موشهایی که ۱ و ۹ هفته بعد از آخرین تزریق جزء سمی لیپوزومی میزان جذب الیزا در آنها اندازه‌گیری شد. در یک سری از این موشها ۱۴ میکروگرم از جزء سمی به صورت زیر جلدی تزریق شد. (موشهای شاهد بوسیله لیپوزوم BSA ایمن شدند

سپاسگزاری

این کار با اجازه INSERM - CNPQ و حمایت مالی RHAE امکان پذیر شد. نویسندگان این مقاله از آقایان O. Hassani, F. Sampiert بخاطر تهیه فراکسیون سمی بسیار متشکرند.

پاورقی

۱- جنسی از عقرب که در برزیل یافت می‌شود و دارای گزشهای حاد و گاهی کشنده می‌باشد.

۲- لیپوزوم = یکی از ذرات ماده لیپوئید (چربی مانند) است که بصورت امولسیون نامرئی در بافتها وجود دارد.

منبع مورد استفاده

Carlos Chavez - Olortegui, Djamel Ait Amara, Hervé Rochat, Carlos dinirz and Claude Granier, 1991, In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. Vaccine, Vol. 9, PP: 907-910.

● سم عقرب دارای اثرات مسموم کنندهٔ قوی می‌باشد و به همین منظور آزمایشی به منظور آزمایش به منظور افزایش پاسخ ایمنی هومورال که قادر به محافظت بدن می‌باشد در مدل حیوانی (موش) بررسی شد.