

اثر زهر زنبور پرتو فرآوری شده با پرتو گاما بر وظایف عملکردی کبد و فراسنجه خونی در

مدل حیوانی موش

INC29-1009

پروین شورنگ\*، فاطمه عباسی

پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی: ۸۳۶-۱۴۳۹۵، تهران-ایران

چکیده:

این پژوهش با هدف سنجش اثر زهر زنبور پرتو فرآوری شده با پرتو گاما (دزهای صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری، حجم ۰/۱ میلی لیتر و غلظت ۰/۲ میلی گرم/میلی لیتر) بر وظایف عملکردی کبد، فراسنجه خونی و آنالیز پروتئین سرم انجام شد. برای این منظور ۲۰ سر موش به تصادف به ۵ گروه در قالب طرح کاملاً تصادفی (هر گروه ۴ موش) تقسیم شدند. بافت‌شناسی نرمال در کبد موش‌های دریافت کننده زهر پرتو فرآوری شده با دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). سطوح سرمی آنزیم ALT و تمام پروتئین‌های سرم در موش‌های دریافت کننده زهر پرتو فرآوری شده با دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری در مقایسه با گروه شاهد و دز ۲ کیلوگری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). زهر زنبور پرتو فرآوری شده با پرتو گاما در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری با کاهش ترکیبات آلرژن هیچ‌گونه تأثیر منفی بر آنزیم ALT، بافت کبد و آنالیز پروتئین سرم نداشت ( $P < 0/05$ ).

کلیدواژه‌ها: آلانین ترانسفراز، بافت شناسی، پرتوتابی گاما، پروتئین سرم، زهر زنبور عسل.

## Effect of gamma ray processed honey bee venom on blood parameters and functional functions of the liver in a Mouse Animal Model

P. Shawrang\*, F. Abbasi

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, P.O. Box: 14395-836, Tehran, Iran.

### Abstract:

This study aims to measure the effect of gamma ray processed honey bee venom (doses of 0, 2, 4, 6, and 8 kGy, volume of 0.1 ml and concentration of 0.2 mg/ml) on functional functions of the liver, blood parameters and Serum protein analysis was performed. 20 mice were randomly divided into 5 groups in the form of a completely random design (4 mice in each group). Therefore, normal histology was observed in the liver of the mice receiving the honey bee venom irradiated at 4, 6, and 8 kGy. The serum levels of ALT enzyme and all serum proteins at 4, 6, and 8 kGy was reduced, compared with the control group and that irradiated at 2 kGy. Therefore, gamma ray processed honey bee venom at 4, 6 and 8 kGy with the reduction of allergen compounds had no negative effect on ALT enzyme, liver tissue and serum protein analysis.

**Keywords:** Alanine aminotransferase, Gamma irradiation, Histopathological, Honey bee venom, Serum protein.

## ۱. مقدمه:

زهر زنبورعسل برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. تحقیقات اخیر بینش‌های قابل توجهی را در مورد فعالیت‌های بیولوژیکی اجزای زهر زنبورعسل ارائه و پتانسیل آن را برای درمان انواع بیماری‌های التهابی برجسته کرده است [۴-۱]. همچنین، شواهد فراوانی اثرات مثبت زهر زنبورعسل را بر درمان انواع بیماری‌های انسانی مانند عفونت‌های ویروسی و میکروبی، دیابت و سرطان نشان داده‌اند [۱]. علاوه بر این، زهر زنبورعسل دارای ترکیبات آلرژن شامل آنزیم‌های فسفولیپاز (PLA<sub>2</sub>) و هیالورونیداز، پپتید ملیتین، آمین‌های بیوژنیک مانند هیستامین، دوپامین و نوراپی نفرین است [۵]. روش‌های مختلفی برای سم‌زدایی زهر پیشنهاد شده است [۶]. پرتوتابی گاما به عنوان یکی از موثرترین روش‌ها برای کاهش سمیت زهر، علاوه بر حفظ خواص ایمونولوژیکی آن در نظر گرفته می‌شود [۷]. بنابراین، این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی اثر زهر زنبورعسل پرتوآوری شده بر بافت‌شناسی کبد، پارامتر خونی و آنالیز پروتئین سرم انجام شد.

## ۲. روش کار:

### ۱.۲. پرتوتابی زهر زنبورعسل:

زهر زنبورعسل مورد استفاده در این تحقیق از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (تهران، ایران) خریداری شده است. پرتوتابی زهر زنبورعسل با دزهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری گاما در پژوهشکده کاربرد پرتوها (سازمان انرژی اتمی - تهران - ایران) با دستگاه پرتودهنده تحقیقاتی (CG-220) (Gamma Cell 220) دارای چشمه کبالت-۶۰ با اکتیویته ۴۳۵۰ کوری انجام شد [۸]. زهر زنبورعسل در دمای یخچال نگهداری شد و در زمان استفاده در آب دیونیزه رقیق شد.

### ۲.۲. حیوان و طرح آزمایشی:

موش نر Balb/c (۲۰ گرم) تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (تهران، ایران) در طول مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در یک چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. همچنین ۲۰ موش به تصادف به ۵ گروه در قالب طرح کاملاً تصادفی (هر گروه ۴ موش) تقسیم شدند.

### ۳.۲. سنجش هیستوپاتولوژیک:

موش‌های دریافت‌کننده زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف ( غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، حجم ۰/۱ میلی‌لیتر) تشریح شدند و بافت کبد برای بررسی هیستوپاتولوژیک برداشته شد. بافت مورد نظر در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. بافت کبد پس از آگیری با درجات صعودی اتانول بوسیله پارافین قالب‌گیری شد. برشگیری بافت کبد با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم انجام شد. سپس برش‌های تهیه شده با استفاده از رنگ هماتوکسلین-آئوزین رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ با درشت‌نمایی ۱۰۰× مشاهده و تصویربرداری شد.

### ۴.۲. سطح نشانگر بیوشیمیایی

۱۲ ساعت پس از تزریق زهر، ۰/۵ میلی‌لیتر خون از رگ قلب گرفته شد و در لوله جمع‌آوری شد. پس از لخته شدن خون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سطوح سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) طبق دستورالعمل کیت سازنده (پارس آزمون، ایران) به دست آمد. میزان جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر (JENWAY 6705 UV/VIS) قرائت شد.

### ۵.۲. آنالیز پروتئین سرم

الگوی زیرواحدهای پروتئین سرم خون با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکرلامید به صورت Native تعیین و مقدار هر زیرواحد پروتئینی با استفاده از دنسیتومتری محاسبه شد. برای این منظور از ژل ۱۲/۵ درصد استفاده شد. مقدار پروتئین سرم ۷ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بود و برای تزریق در چاهک‌ها به نسبت مساوی با بافر استخراج مخلوط و به مقدار ۲۰ ماکرولیتر به چاهک‌ها تزریق شد [۹].

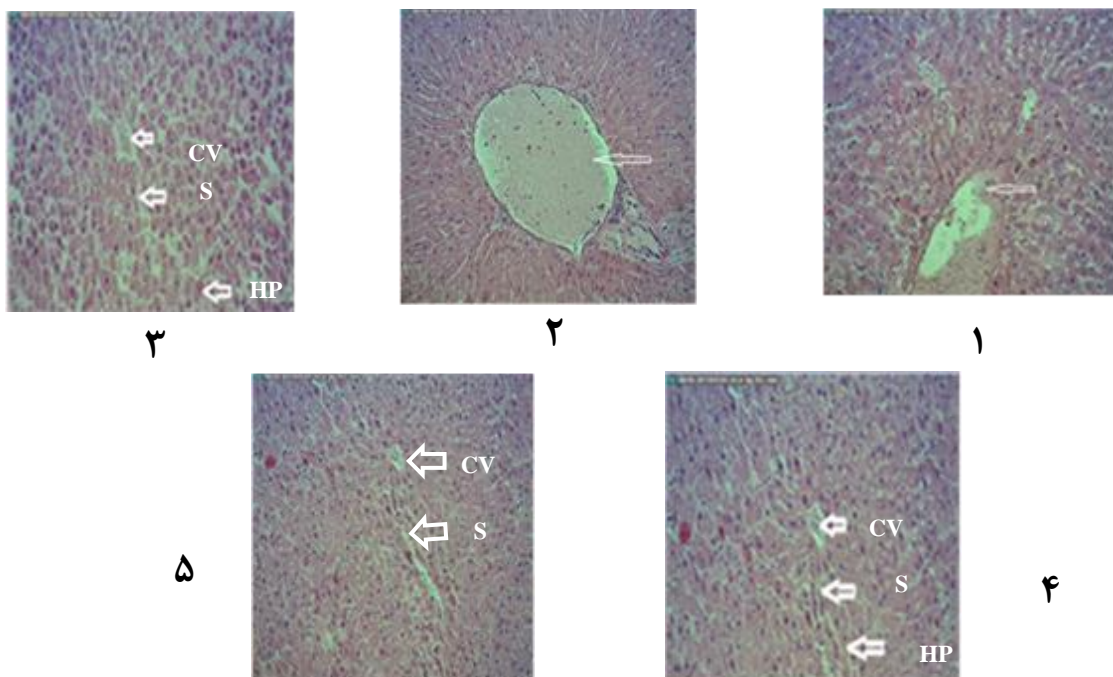
## ۶.۲. آنالیز آماری:

داده‌های آزمایشی در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار آنالیز و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد [۱۰].

## ۳. نتایج و بحث:

### ۱.۳. یافته‌های هیستوپاتولوژیک:

تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی کبد موش، تغییرات قابل توجهی را در بافت کبد نشان داد. بافت‌شناسی نرمال در کبد موش‌هایی که زهر زنبور عسل پرتوتابی شده ۱۰ دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری را دریافت کرده بودند مشاهده شد (۳، ۴ و ۵). خونریزی در ورید کبدی و نکروز سلول‌های مجاور و احتقان شدید در ورید کبدی در کبد موش‌هایی که زهر زنبور عسل را به ترتیب در دزهای صفر و ۲ کیلوگری دریافت کرده بودند مشاهده شد (۱ و ۲).



شکل ۱. ساختار بافت‌شناسی کبد موش‌های دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف. (۱) گروه شاهد: خونریزی در ورید کبدی و نکروز سلول‌های مجاور مشاهده شد (فلش). (۲) گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده در دز ۲ کیلوگری: احتقان شدید در ورید کبدی مشاهده شد (فلش). (۳) گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده در دز ۴ کیلوگری: ساختار طبیعی بافت کبد مشاهده شد. (۴) گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده در دز ۶ کیلوگری: ساختار طبیعی بافت کبد مشاهده شد. (۵) گروه دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده در دز ۸ کیلوگری: ساختار طبیعی بافت کبد مشاهده شد. CV: ورید کبدی مرکز لوبولار، S: سینوزوئید، HP: پورتال کبدی.

## ۲.۳. آنزیم ALT

نتایج سطوح سرمی آنزیم ALT در جدول ۱ نشان داده شده است. سطح سرمی ALT ناشی از تزریق زهر زنبور پرتوتابی شده در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری در مقایسه با گروه شاهد و دز ۲ کیلوگری کاهش یافت.

جدول ۱. نتایج ALT زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف.

تیمار	ALT(IU/UL)
شاهد	۲۶ <sup>a</sup>
۲ کیلوگری	۲۵/۹ <sup>a</sup>
۴ کیلوگری	۱۷/۸ <sup>b</sup>
۶ کیلوگری	۱۷/۷ <sup>b</sup>
۸ کیلوگری	۱۸ <sup>b</sup>
اشتباه معیار	۰/۱۱۶

درج حروف متفاوت بیانگر وجود تفاوت معنی دار است ( $P < 0.05$ ).

### ۳.۳. تجزیه و تحلیل الکتروفورز پروتئین‌های سرم

نتایج الکتروفورز پروتئین سرم در جدول ۲ نشان داده شده است. تمام پروتئین‌های سرم پس از تزریق زهر زنبور عسل پرتوتابی شده در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری در مقایسه با گروه شاهد و دز ۲ کیلوگری کاهش یافت.

جدول ۲. نتایج سطوح پروتئین سرم بعد از تزریق سالین (کنترل منفی) و زهر زنبور عسل پرتوفراوری شده (درصد).

تیمار	آلبومین (درصد)	آلفا-۱ (درصد)	آلفا-۲ (درصد)	بتا (درصد)	گاما (درصد)
کنترل منفی	b ۱۵/۳۵	b ۱۱/۹۴	b ۱۵/۸۳	b ۱۱/۸۹	b ۱۵/۰۸
شاهد	a ۱۹/۱۲	a ۲۵/۸۳	a ۱۷/۹۹	a ۲۵/۹۵	a ۱۹/۵۰
صفر	a ۱۹/۰۱	a ۲۵/۶۳	a ۱۷/۸۵	a ۲۵/۸۲	a ۱۹/۴۸
۲ کیلوگری	b ۱۵/۴۳	b ۱۲/۰۲	b ۱۵/۹۸	b ۱۱/۹۴	b ۱۵/۲۰
۴ کیلوگری	b ۱۵/۴۸	b ۱۲/۲۶	b ۱۶/۰۹	b ۱۲/۰۶	b ۱۵/۳۵
۶ کیلوگری	b ۱۵/۵۹	b ۱۲/۳۱	b ۱۶/۱۶	b ۱۲/۲۴	b ۱۵/۳۸
۸ کیلوگری	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۲

درج حروف متفاوت بیانگر وجود تفاوت معنی دار است ( $P < 0.05$ ).

در مطالعه حاضر، اثرات زهر زنبور عسل پرتوتابی شده بر بافت کبد بررسی شد. پرتوتابی گامای زهر زنبور عسل در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری منجر به هیستوپاتولوژی نرمال بافت کبد گردید. پرتوتابی زهر با کاهش ترکیبات آلرژی‌زا از جمله PLA<sub>2</sub> (با اختلال در نفوذپذیری غشای سلول از طریق بهم ریختن دو لایه لیپیدی روی غشای پلاسمایی منجر به تشکیل منافذ با هجوم سدیم و آب و در نتیجه تخریب سریع بافت‌ها می‌شود)، که نقش کلیدی در آسیب بافتی دارد، از آسیب بافتی جلوگیری می‌کند [۱۱].

در این مطالعه، پرتوتابی زهر زنبور عسل منجر به کاهش سطوح ALT شد. پرتوتابی گاما در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری با کاهش مقدار ترکیبات آلرژی‌زا منجر به کاهش سمیت زهر زنبور عسل و کاهش سطح سرمی ALT گردید. آنزیم ALT نشانگر آسیب سلولی است. این آنزیم در ارزیابی التهاب و نکروز کبد اهمیت دارد. در شرایط غیرالتهابی، ALT به دلیل کاهش نفوذپذیری غشای سلولی در گردش خون آزاد نمی‌شود [۱۲]. این نتایج با یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در یافته‌های ما مطابقت دارد.

الکتروفورز پروتئین سرم، کاهش در تمام پروتئین‌های سرم پس از تزریق زهر زنبور عسل پرتوتابی شده را در دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری نشان داد. پرتوتابی گاما با کاهش ترکیبات آلرژی‌زا از کم آبی بدن پس از تزریق جلوگیری می‌کند و در نتیجه میزان آلبومین را کاهش می‌دهد [۱۳-۱۵].

کاهش آلفا-گلوبولین‌ها نیز در موش‌هایی که زهر پرتوتابی شده را دریافت کردند مشاهده شد. کاهش آلفا-گلوبولین‌ها زمانی که آسیب بافتی وجود ندارد مشاهده می‌شود [۱۳]. پرتوتابی با کاهش ترکیبات آلرژن، از تاثیر PLA<sub>2</sub> بر روی لکوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال جلوگیری می‌کند، بنابراین میزان ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را کاهش می‌دهد [۱۴ و ۱۶]. کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، به ویژه سطوح IL-6 از سنتز پروتئین‌های فاز حاد جلوگیری می‌کند و بنابراین کل پروتئین‌های سرم را کاهش می‌دهد [۱۳]. این نتایج با یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشاهده‌شده در یافته‌های ما مطابقت دارد.

#### ۴. نتیجه‌گیری:

پژوهش حاضر نشان داد که دزهای ۴، ۶ و ۸ کیلوگری پرتو گاما را می‌توان برای پرتوتابی زهر زنبور عسل و کاهش ترکیبات آلرژن‌زا بدون هیچ گونه تأثیر منفی بر بافت کبد، آنزیم ALT و پروتئین سرم استفاده کرد، با توجه به مؤثر بودن هر سه دز، استفاده از دز ۴ کیلوگری برای پرتوفراوری زهر زنبور عسل پیشنهاد می‌شود.

#### ۵. مراجع:

1. El-Wahed, A.A.A. Khalifa, S.A.M. Sheikh, B.Y. Farag, M.A. Saeed, K.A. Larik, F.A. Koca-Caliskan, U. AlAjmi, M.F. Hassan, M. Wahabi, H.A. Hegazy, M.E.F. Algethami, A.F. Buttner, S. Hesham, R. Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity, Stud. Nat. Prod. Chem. 60 (2019) 459-484.
2. Hong, S.J. Rim, G.S. Yang, H.I. Yin, C.S. Koh, H.G. Jang, M.H. Kim, C.J. Choe, B.K. Chung, J.H. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, Toxicol. 46 (1) (2005) 39-45.
3. Suh, S.J. Kim, K.S. Kim, M.J. Chang, Y.C. Lee, S.D. Kim, M.S. Kwon, D.Y. Kim, C.H. Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats, Toxicol. in Vitro. 20 (8) (2006) 1465-1471.
4. Liu, C.C. Hao, D.J. Zhang, Q. An, J. Zhao, J.J. Chen, B. Zhang, I.I. Yang, H. Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment, Cancer. Chemother. Pharmacol. 78 (2016) 1113-1130.
5. Bogdanov, S. Bee Venom: Production, Composition, Quality. The Bee Venom Book, Chapter 1, Muehlethurnen, Switzerland. (2016) 9 pages.
6. Moroz-Perlmutter, C. Goldblum, N. Vries, A.D. Gitter, S. Detoxification of Snake Venoms and Venom Fractions by Formaldehyde, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112 (3) (1963) 595-598.
7. Samy, E.M. Shaaban, E.A. Kenawy, S.A. Elfattah, M.A.A. Salama, W.H. The impact of low doses of gamma radiation on *Echis coloratus* venom and its fractions, Rad. Phys. Chem. 150 (2018) 145-150.
8. Costa, H. Boni-Mitake, M. Souza, C.F. Rogero, J.R. Effects of gamma radiation on bee venom: preliminary studies. VII General Congress on Nuclear Energy, Belo Horizonte, MG, Brazil, (1999).
9. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly 780 of the head of bacteriophage T4. Nature 227, (1970) 680-685.
10. SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics. Cary NC: SAS Inst Inc. (2008).
11. Adeyi, A.O. Ajisebiola, B.S. Adeyi, O.E. Badru, O.S. Paul, O. Idowu, B. *Moringa oleifera* ethyl acetate fraction ameliorated the pathophysiological and histopathological alterations induced by *Naja katiensis* venom, Phytomed. Plus. 1 (3) (2021) 100034.
12. Tohamy, A.A. Mohamed, A.F. Moneim, A.E.A. and Diab, M.S.M. "Biological effects of *Naja haje* crude venom on the hepatic and renal tissues of mice". 26(3), Journal of King Saud University - Science, (2014) 205-212.
13. Pessini, A.C., de Souza, A.M., Faccioli, L.H., Gregório, Z.M., Arantes, E.C., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. Int. Immunopharmacol. 3 (5) (2003) 765-774.

14. Boumaiza, S. Oussedik-Oumehdi, H. Laraba-Djebari, F. Pathophysiological effects of *Cerastes cerastes* and *Vipera lebetina* venoms: Immunoneutralization using anti-native and anti-<sup>60</sup>Co irradiated venoms, *Biologica*, 44 (1) (2016) 1-11.
15. Cusinato, D.A.C. Souza, A.M. Vasconcelos, F. Guimarães, L.F.L. Leite, F.P. Gregório, Z.M.O. Giglio, J.R. Arantes. E.C. 2010. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 56 (2010) 1477-1486.
16. Yacouba, T. Rimab, M. Sadec, R. Hleiheld, W. Fajloun, Z. Karama, M. *Montivipera bornmuelleri* venom has immunomodulatory effects mainly upregulating pro-inflammatory cytokines in the spleens of mice, *Toxicol. Rep.* 5 (2018) 318–323.