

بررسی تداخل اثر سم عقرب مزوبوتوس اپیوس و داروی سیکلوسپورین در مکانیسم‌های بیوشیمیایی و هیستولوژی در بافت پارانشیم کبد و کلیه موش سوری

نویسندگان: سارا زنگی آبادی^۱، شاهرخ نویدپور^۲، حسین ذوالفقاریان^۳، محمد اسلام پناه^۴، غلامحسن واعظی^{*}

۱. دپارتمان بیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲. آزمایشگاه مرجع رازی تحقیقات عقرب، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، البرز، ایران
۳. بخش آسیب‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، البرز، ایران
۴. دپارتمان بیولوژی، شاخه‌ی کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران

E-mail: gh.vaezi@yahoo.com

*نویسنده مسئول: غلامحسن واعظی

چکیده

مقدمه و هدف: زهر Mesobuthus به عنوان خانواده buthidae شناخته می‌شود که بر اساس مطالعات انجام شده، این زهر می‌تواند باعث مرگ انسان شود. از طرفی خواص ضدالتهابی سیکلوسپورین در پیوند اعضا از طریق سرکوب سیستم ایمنی و التهاب نشان داده شده است و احتمالاً می‌تواند با اثر زهر مقابله کند؛ بنابراین در مطالعه حاضر اثر سیکلوسپورین بر روی زهر Mesobuthus epeus مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است. تعداد 50 موش سوری به 5 گروه 10 تایی طبقه‌بندی شدند. زهر Mesobuthus epeus و سیکلوسپورین در دوزهای 10، 20 و 30 میلی‌گرمی انتخاب شد. در این مطالعه موش‌های هایی که سیکلوسپورین را دریافت نکردند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پارامترهای بیوشیمیایی همراه با نیتریک اکساید و سیتوکاین IL-2 در همه‌ی گروه‌ها بوسیله متد روتین اسپکتروفوتومتری و الایزا به ترتیب اندازه‌گیری شد. ضمن اینکه، بررسی‌های پاتولوژیک کلیه و کبد نیز انجام شد.

نتایج: همه‌ی شاخص‌های بیوشیمیایی و IL-2 بطور قابل‌ملاحظه‌ای پس از تزریق زهر Mesobuthus افزایش یافت ($P < 0.001$). از سوی دیگر، گروه‌های موش پس از دریافت سیکلوسپورین کاهش معنی‌داری در همه‌ی پارامترهای مورد مطالعه نشان دادند ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: سیکلوسپورین در دوز 30 میلی‌گرمی قادر به کاهش پاسخ التهابی شده و می‌تواند دارای درمانی مناسبی برای بیماران عقرب‌گزیده باشد.

واژگان کلیدی: زهر عقرب مزوبوتوس، سیکلوسپورین، پارامترهای بیوشیمیایی، کبد و کلیه، موش سوری

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم - شماره ۱۴۲
شهریور ۱۳۹۸

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۶/۰۷
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶

مقدمه

عقرب‌ها از ابتدایی‌ترین موجودات در آغاز پیدایش حیات به شمار می‌آیند که به خوبی با محیط اطراف سازگاری پیدا کرده‌اند. این جانوران از خانواده‌ی بندپایان هستند که تقریباً ۱۲۵۰ گونه از آنها شناسایی شده است. بیش از یک میلیون نوع پتید از زهر عقرب شناسایی شده ولی تا امروز تنها ۲۰۰ پتید از آنها تعیین توالی شده است (۱، ۲). عقرب *Odontobuthus* یکی از مهم‌ترین عقرب‌های یافت شده در ایران است در حالی که در سایر نقاط دنیا پراکندگی ندارد. این عقرب دارای دو زیرگونه و متعلق به خانواده‌ی *buthidae* است (۳). قدرت زهر در گونه‌های مختلف عقرب متفاوت است. اثر زهر برخی از عقرب‌ها موجب علائم شبه آنفلوانزا و در برخی دیگر موجب مرگ می‌شود. این اثرات براساس تنوع در توالی آمینواسیدها در پروتئین زهر و متعاقب آن توانایی اتصال آنها به سلول‌های هدف متفاوت است. فاکتورهای مختلفی از قبیل نوع زهر، سن عقرب، گونه‌ی عقرب، میزان زهر تزریق شده به بدن، آب و هوای منطقه، فصل و سن قربانی بر میزان آسیب زهر اثرگذار هستند (۴، ۵). در همین رابطه، *Knechtle* و همکاران در مطالعه‌ای اثر سیکلوسپورین را بر روی رد پیوند فوق حاد به دنبال زهرمار کبرا بررسی کردند که نتایج آنها نشان داد که سیکلوسپورین در دوز ۱۰mg/kg/day به طور معناداری باعث افزایش دوام حیات و تأخیر در رد پیوند در افراد مصدوم شده است (۶)؛ بنابراین، همانطور که مطالعات نشان داده است، سیکلوسپورین اثر ضدالتهابی دارد و می‌تواند در جلوگیری از زد پیوند حاد مؤثر عمل کرده است.

همچنین، نتایج مطالعه *Kang* و همکاران نشان داده است که سیکلوسپورین بیان ژن *Interleukin-2 (IL-2)* و مرگ سلولی ناشی از فعال‌سازی (AICD) سلول‌های افکتور T را مهار می‌کند. همچنین نشان دادند که سیکلوسپورین اثرات مفیدی بر روی عملکرد تکاملی *Regulatory T cells (Treg cells)* و القای تحمل آلوگرافت را دارد (۷). در این مطالعه، به دلیل اثر سرکوب‌کنندگی

که سیکلوسپورین بر روی *IL-2* و کاهش التهاب دارد، این سایتوکاین را مورد سنجش قرار دادیم. علاوه بر این، دهقانی و همکاران (۲۰۱۸)، سمیت *Mesobuthus eupeus* را بررسی کردند. نتایج LD_{50} (۰.۵٪) از حداقل دوزی که توان کشندگی داشته باشد را LD_{50} می‌گویند که در این مطالعه این میزان برای زهر محاسبه شده است). برابر ۶/۹۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بود و بیشتر عصاره‌های آن، ویژگی ایمونونژنیک داشتند (۸).

در مطالعه دیگر برادران و همکاران (۲۰۱۸)، برای اولین بار تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم عقرب ایرانی، غدد سموم *Mesobuthus eupeus* را ارزیابی کردند. روش‌های جدید توالی‌یابی نشان داد که اولین *CaTxs* از *M. eupeus* است (۹). همچنین، *DanielaRojas-Azofeifa* و همکاران، خواص بیوشیمیایی سم عقرب آمریکای شمالی دیدیموکتروس کراسی فرانک را مورد بررسی قرار داده‌اند. نتایج آنها نشان داد که این زهر قادر به ایجاد سمیت سلولی و همولیز است (۱۰). گزارش‌ها نشان داده است که عقرب‌ها عموماً در نواحی گرمسیری ایران یافت می‌شوند، اما بیشتر در نواحی گرمسیری جنوبی پراکندگی بالاتری دارند. در بیشتر موارد گزیدگی در انسان معمولاً موجب تنفس سریع، انقباض ماهیچه‌ی دیافراگم، اسپاسم عضله‌ی اتونومیک، انقباض موضعی، تشنج، ادم و ... می‌شود (۴، ۱۱).

بنابراین، یافتن راه‌های درمانی مؤثر در برابر عقرب گزیدگی ضروری به نظر می‌رسد (۱۲، ۱۳). در همین راستا، سیکلوسپورین یک داروی ضدالتهابی است و به شکل سوسپانسیون و امولسیون برای درمان بیماری‌هایی از قبیل آرتریت روماتوئید، پسوریازیس و کرون استفاده می‌شود (۱۴). سیکلوسپورین شامل پپتیدهای آروماتیک است که پس از قرار گرفتن در معرض آنتی‌ژن‌ها با اثر بر لنفوسیت‌های T از تولید سایتوکاین‌های التهابی از قبیل *IL-2* جلوگیری می‌کند. در حقیقت یکی از پرکاربردترین داروها در پیوند عضو محسوب می‌شود و مکانیسم مولکولی آن به مهار کلسی نورین و *NAFT* مربوط

در موسسه سرم و واکسن‌سازی رازی تهیه شد. برای تهیه سم خالص، از روش الکتریکی غده سمی استفاده می‌شود. برای این منظور، نیش عقرب را وارد ظرف شیشه‌ای می‌کنیم. دو سر الکتروود شوک را برای لحظه‌ای در رفین غده‌ی سمی قرار می‌دهیم. بدین ترتیب سم داخل ظرف ریخته می‌شود. معمولاً ولتاژ ۶ تا ۱۰ میلی‌ولت برای این تخلیه سم خالص استفاده می‌شود. سم حاصل در حالت انجماد و خلأ خشک کرده و به صورت پودر در می‌آورند. سم‌های حاصل در شیشه‌های در بسته در محلی خشک و تاریک نگهداری می‌شود.

داروی سیکلوسپورین در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی مورد استفاده قرار گرفت.

تست‌های آزمایشگاهی

در انتهای روز هفتم، پس از بیهوشی با اتر (که کمترین اثر را بر شاخص‌های متابولیک دارد)، از قلب خون‌گیری انجام شد. پس از جداسازی سرم، غلظت سطوح اوره، SGOT و SGPT در طول موج 340 nm و غلظت کراتینین در طول موج 500 nm با استفاده از اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مالون دی‌آلدید (MDA)، نیتریک اکساید (NO) و IL-2 با استفاده از روش ELISA براساس پروتوکول شرکت سازنده کیت اندازه‌گیری شد. جذب نوری در طول موج 450 nm خوانده شد.

آزمایش هیستوپاتولوژی

جهت بررسی پاتولوژی، کلیه و کبد از حفره‌ی شکمی خارج گردید. سپس جهت فیکس شدن، در بافر فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. نمونه‌های فیکس شده، در اتانول و متیل بنزوات دهیدراته و پاک‌سازی شدند و در پارافین قرار گرفتند. پس از تهیه‌ی مقاطع ۶-۵ میکرونی با استفاده از میکروتوم، رنگ‌آمیزی با هماتوکسین ائوزین (H+E) انجام شد. سپس نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها براساس تغییرات پاتولوژیکی ارزیابی شدند.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS

می‌گردد (۱۵). در هر صورت، سیکلوسپورین بیشترین جذب را در کمترین زمان ممکن دارد (۱۶). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که زهر عقرب می‌تواند موجب افزایش قابل ملاحظه‌ی التهاب گردد (۱۷، ۱۸)؛ بنابراین، از این دارو برای ارزیابی میانکنش بین زهر مزوتوبوس اپتوس با داروهای ضدالتهابی به وسیله اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینو ترانسفراز (SGPT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (SGOT)، معتبرترین شاخص‌ها تشخیص نکرده یا تخریب کبد، پس از تزریق زهر ارزیابی شدند (۱۹، ۲۰). علاوه بر این، سطوح اوره و کراتینین، شاخص‌های عملکرد کلیه، مالون دی‌آلدید و سوپر اکسید دیسموتاز نیز اندازه‌گیری شدند (۲۱). بررسی پاتولوژیک بافت پاراتشیم کبد و کلیه نیز انجام شد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضدالتهابی و درمانی داروی سیکلوسپورین بر روی پیشرفت سایتوتوکسی زهر با اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی، سایتوکاین IL-2 و میزان نیتریک اکساید طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه با توجه به اصول سم‌شناسی فارماکولوژی پایه و بالینی برای مطالعات تجربی و بالینی انجام شده است (۲۲) و دارای کد اخلاق به شماره RVSRI.REC.98.003 است.

تعداد ۵۰ سر موش سوری نر پنج‌هفته‌ای با میانگین وزن ۲۵ گرم انتخاب و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. پس از پنج هفته، موش‌ها به پنج گروه روغن زیتون (کنترل، بدلیل اثرات ضدالتهابی که در ادم و التهاب دارد)، زهر (10 mg/kg) (۲۳، ۲۴)، همراه با 10 mg سیکلوسپورین، زهر (1 mg/ml) با 20 mg سیکلوسپورین، زهر (1 mg/kg) با 30 mg سیکلوسپورین طبقه‌بندی شدند. محیط نگهداری حیوانات دارای درجه حرارت ۲۴-۲۰ درجه سلسیوس، رطوبت ۲۰-۷۰٪ و چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته بود. در مطالعه حاضر، زهر عقرب

دریافت‌کننده‌ی زهر *epeus mesobuthus* در غلظت یک میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در مقایسه با گروه‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم سیکلوسپورین افزایش معنی‌داری داشت. ضمن اینکه افزایش معنی‌داری بین گروه دریافت‌کننده سیکلوسپورین ۱۰ میلی‌گرم در مقایسه با سیکلوسپورین ۳۰ میلی‌گرمی مشاهده شد ($P<0/04$) (جدول ۱).

نسخه‌ی ۲۰ استفاده شد. آزمون ANOVA برای مقایسه‌ی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش و مقادیر $P<0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

IL-2

نتایج تست الایزا نشان داد که سطح IL-2 در گروه

جدول ۱: مقایسه‌ی IL-2 بین گروه‌های سیکلوسپورین

significant	P-value*	Intragroup variations	گروه‌ها
NS	0.49	30.0 \pm 3.3	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 10
S	0.04	3.0 \pm 87.0	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 20
S	0.001	28.0 \pm 3.1	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 30
NS	0.84	3.0 \pm 54.0	سیکلوسپورین 10 در مقایسه با سیکلوسپورین 20
S	0.40	3.0 \pm 97.0	سیکلوسپورین 10 در مقایسه با سیکلوسپورین 30
NS	0.16	29.0 \pm 42.0	سیکلوسپورین 20 در مقایسه با سیکلوسپورین 30

*تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در مقایسه با کنترل

NS: عدم معنی‌داری

سیکلوسپورین نشان داد ($P<0/01$) (جدول ۲).

مالون دی آلدئید (MDA)

نتایج سنجش MDA افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی سیکلوسپورین نشان داد ($P<0/001$) (جدول ۲).

نیتریک اکساید (NO)

نتایج سنجش NO افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه‌های سیکلوسپورین ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی داشت. علاوه بر این، سیکلوسپورین ۱۰ میلی‌گرمی می‌تواند موجب کاهش قابل ملاحظه‌ی NO در مقایسه با دوز ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم ($P<0/03$) (جدول ۲).

سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

نتایج سنجش SOD افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه‌های سیکلوسپورین ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی داشت ($P<0/001$). علاوه بر این، تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد (جدول ۲).

SGPT

نتایج سنجش SGPT افزایش قابل ملاحظه‌ای در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با سیکلوسپورین ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی را نشان داد. ضمن اینکه سیکلوسپورین ۱۰ میلی‌گرمی افزایش معنی‌داری در مقایسه با دوز ۳۰ میلی‌گرمی آن داشت ($P<0/005$) (جدول ۲).

SGOT

نتایج سنجش SGOT افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه سیکلوسپورین ۳۰ میلی‌گرمی داشت. علاوه بر این، سیکلوسپورین ۱۰ میلی‌گرمی می‌تواند موجب افزایش SGOT در مقایسه با دوز ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم ($P<0/0005$) (جدول ۲).

کراتینین

نتایج سنجش کراتینین افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی سیکلوسپورین نشان داد ($P<0/01$) (جدول ۲).

اوره

نتایج سنجش اوره افزایش معنی‌داری در گروه زهر *mesobuthus* در مقایسه با گروه ۳۰ میلی‌گرمی

جدول ۲. تفاوت معناداری بین گروه‌های سیکلوسپورین در تست‌ها

Urea	Cratinin	NO	SOD	MDA	SGPT	SGOT	Groups
0.15 NS	0.19 NS	0.2 NS	0.001 S	0.12 NS	0.33 NS	0.33 NS	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 10
0.21 NS	0.01 S	0.03 S	0.001 S	0.001 S	0.005 S	0.39 NS	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 20
0.001 S	0.001 S	0.001 S	0.001 S	0.001 S	0.001 S	0.004 S	زهر در مقایسه با سیکلوسپورین 30
0.91 NS	0.14 NS	0.49 NS	0.38 NS	0.11 NS	0.09 NS	0.02 S	سیکلوسپورین 10 در مقایسه با سیکلوسپورین 20
0.13 NS	0.33 NS	0.03 S	0.26 NS	0.80 NS	0.001 S	0.04 S	سیکلوسپورین 10 در مقایسه با سیکلوسپورین 30
0.35 NS	0.4 NS	0.26 NS	0.14 NS	0.14 NS	0.15 NS	0.15 NS	سیکلوسپورین 20 در مقایسه با سیکلوسپورین 30

* نوع زهر مزویوتوس اپتوس است.

* اعداد ذکر شده در جدول P.value حاصل از آنالیز است.

NS: عدم معنی داری

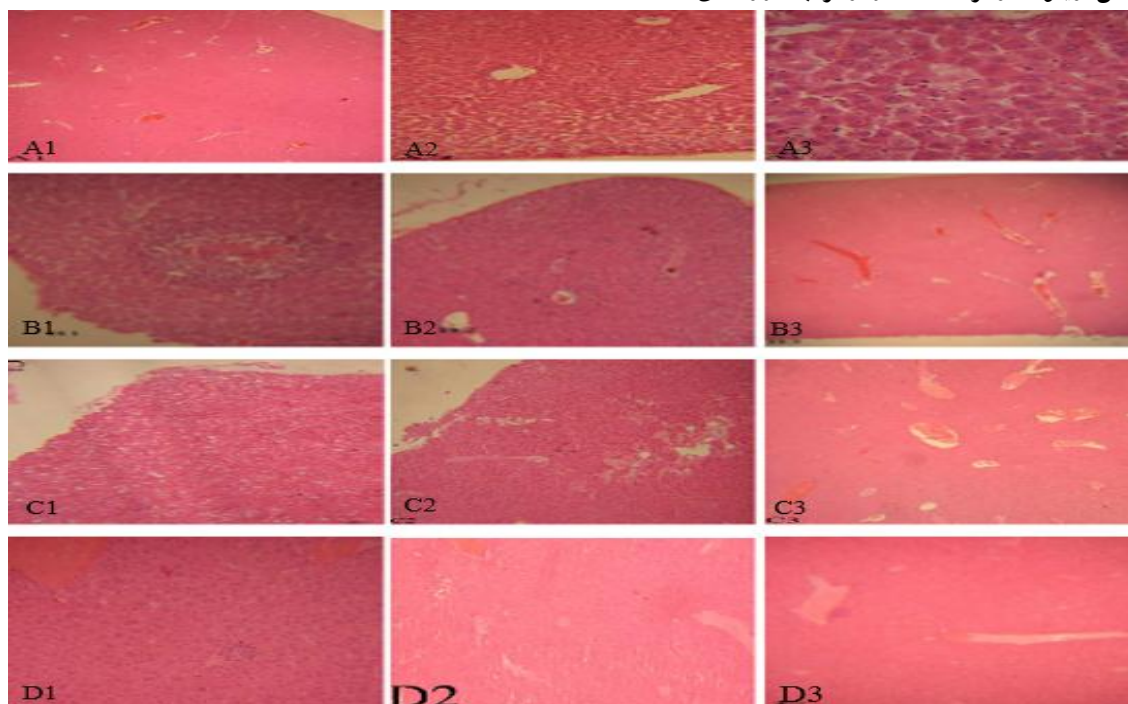
S: معنی داری

نتایج هیستوپاتولوژی

سیکلوسپورین به شرح زیر است:

تغییرات هیستوپاتولوژی در کبد موش‌های تیمار شده

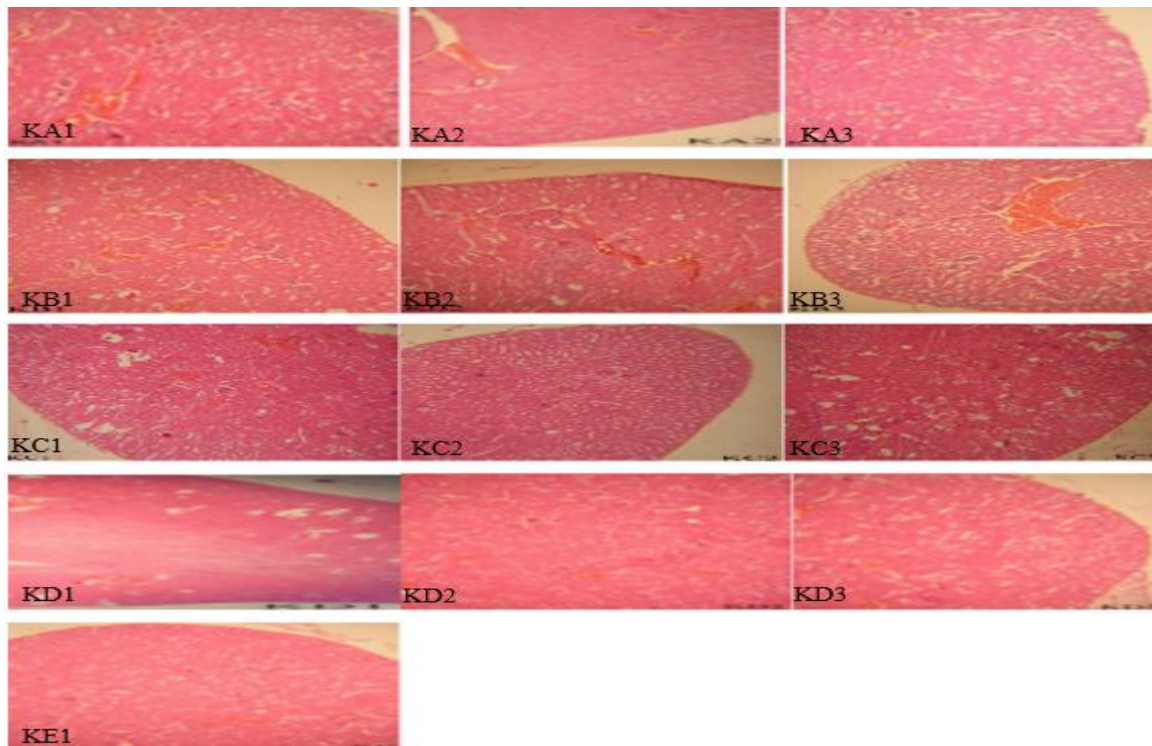
با روغن زیتون، زهر LD50 و زهر با دوزهای مختلف



شکل ۱. گروه تیمار شده با روغن زیتون A1

هایپرارمیا در مقاطع رگ و خونریزی خفیف در پاراننشیم بافت کبد مشاهده شد. A2 40x. آسیب بافت کبد با بزرگنمایی A3 100x. آسیب بافت کبد با هسته، Pyknosis. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی 400x. شکل B. گروه تیمار شده با LD50. نفوذ لنفوسیت همراه با آسیب خفیف در پاراننشیم کبد. بزرگنمایی 200x. B2. آسیب بافت کبد بزرگنمایی 100x. B3. نواحی هایپرارمیا، ادم و خونریزی در پاراننشیم کبد. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی 40x. شکل C. گروه مداخله شده با زهر و سیکلوسپورین. C1. 10% آسیب متوسط بافت کبد. C2. نکروز همراه با ادم خفیف C3. هایپرارمیا همراه با خونریزی در پاراننشیم بافت کبد. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی 40x. شکل D. گروه مداخله شده با زهر و سیکلوسپورین. D1. 20% آسیب خفیف بافت کبد در پاراننشیم کبد. بزرگنمایی 200X. D2. هایپرارمیا همراه با ادم و

خونریزی خفیف در پارانشیم بافت کبد D3. هایپرارمیا همراه با خونریزی در پارانشیم بافت کبد. رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 100$.
 نتایج هیستوپاتولوژی در کلیه موش‌های تیمار شده با سیکلوسپورین به شرح زیر است:
 روغن زیتون، زهر LD50 و زهر با دوزهای مختلف



شکل ۲. گروه تیمار شده با روغن زیتون

ادم همراه با هایپرارمیا در مقاطع رگ و خونریزی خفیف در پارانشیم کلیه مشاهده شد. KA2. ادم اطراف گلومرول KA3. آسیب اینترتوبولار خفیف با هایپرارمیا در مقاطع کلیه، نفوذ لنفوسیت و آسیب متوسط سلول‌های کلیه مشاهده شد. رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 40$. گروه تیمار شده با LD50. KB1 خونریزی همراه با ادم متوسط در بافت پارانشیم KB2. نفوذ لنفوسیت در سلول‌های کلیه و ادم در اطراف گلومرول KB3. آسیب توبول کلیه و هایپرارمیا در بافت کلیه. رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 40$. KC. گروه تیمار شده با زهر و سیکلوسپورین KC1. 10% آسیب متوسط در پارانشیم بافت کلیه KC2. نکروز همراه با ادم متوسط KC3. ادم متوسط همراه با هایپرارمیا و خونریزی در پارانشیم کلیه. رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 40$. شکل KE. گروه تیمار شده با زهر و سیکلوسپورین 30%. هایپرارمیا همراه با خونریزی و ادم خفیف در پارانشیم کلیه. رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی $\times 100$.

بحث

Mirakabbadi و همکاران، اثرات زهر عقرب Hemiscorpius lepturus را بر روی آنزیم‌های کبدی بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که آنزیم‌های SGPT و SGOT پس از تزریق زهر به حیوانات افزایش یافت (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر، Zayerzadeh و همکارانش اثرات زهر عقرب mesobuthus eupeus بر علائم بیوشیمیایی خرگوش را بررسی کردند. آنها دریافتند که ALT و کراتینین بطور معنی‌داری پس از تزریق زهر افزایش نشان داده است که نشان‌دهنده آسیب کبد و کلیه است (۲۶، ۲۷). نتایج MDA نشان داد که زهر

سیکلوسپورین در دوز ۳۰ میلی‌گرمی اثر ضدالتهابی را اعمال می‌کند و برای مقابله با زهر mesobuthus eupeus کارایی بالایی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح SGPT و SGOT پس از تزریق زهر در مقایسه با تزریق‌های سیکلوسپورین افزایش یافت. ضمن اینکه سیکلوسپورین در دوز ۳۰ میلی‌گرم بیشترین اثرات را بر روی کاهش آنزیم‌های کبدی پس از تزریق زهر داشت. از این رو سیکلوسپورین می‌تواند با اثر بر عملکرد زهر، التهاب را کاهش دهد.

می‌تواند غلظت آن را بطور قابل‌ملاحظه‌ای در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش دهد. سیکلوسپورین در دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم می‌تواند التهاب القاء شده توسط زهر عقرب را کاهش دهد. Salman و همکاران، اثرات زهر عقرب crude بر استرس اکسیداتیو و پارامترهای بیوشیمیایی را ارزیابی کردند و نتایج آنها نشان داد که MDA، کراتینین و اوره بطور معنی‌داری افزایش یافته است، در حالی که SOD پس از تزریق زهر کاهش پیدا کرده است (۲۸). نتایج غلظت کراتینین اثبات کرد که زهر موجب افزایش معنی‌دار سطوح کراتینین در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوسپورین شده است.

تنها سیکلوسپورین در دوز ۳۰ میلی‌گرم توانست موجب کاهش اثرات زهر روی غلظت اوره شود. در همین رابطه، Mirakabadi و همکاران، اثرات Odonthobuthus doriaevenom روی شاخص‌های بیوشیمیایی در خرگوش را مطالعه کردند و نتایج آنها نشان داد که زهر می‌تواند غلظت SGOT، SGPT و اوره را بطور معنی‌داری افزایش دهد (۲۹).

در مطالعه‌ای دیگر، Hidan و همکاران، آسیب‌های فیزیولوژیک در موش‌های مسموم شده با زهر عقرب roctopus liouvillei را مورد مطالعه قرار دادند. آنها دریافتند که این زهر موجب افزایش چشمگیر کراتینین، SGPT و SGOT به صورت می‌شود (۳۰). مطالعات مختلف نشان می‌دهد زهر عقرب موجب افزایش تمام پارامترهای بیوشیمیایی می‌شود و بدین وسیله باعث افزایش التهاب می‌شود. افزایش التهابی که احتمالاً می‌تواند در راستای نکروز و ادم بافتی بواسطه افزایش پارامترهای بیوشیمیایی و بویژه IL-2 باشد (۳۱)؛ بنابراین، در این مطالعه تأثیر درمانی سیکلوسپورین به منظور بهبود وضعیت ایجاد شده ناشی از اثر زهر Mesobuthus epeus با کاهش متغیرهای مورد بررسی نشان داده شده است.

همچنین، نتایج غلظت NO نشان داد که زهر epeus mesobuthus می‌تواند موجب افزایش غلظت NO در مقایسه با گروه‌های تزریق‌شده با سیکلوسپورین 20 و 30 میلی‌گرم. ضمن اینکه، دوزهای 20 و 30 میلی‌گرم از سیکلوسپورین موجب کاهش معنی‌دار غلظت NO شده است. بنابراین زهر که طبیعتاً منجر به افزایش التهاب می‌شود، با افزایش NO به التهاب بیشتر منجر شده است. افزایش NO تأیید‌کننده این موضوع است که التهاب ایجاد شده ناشی از زهر می‌تواند با نکروز نیز همراه باشد. در همین راستا، Petricevich و همکاران، سطوح سرمی سایتوکاین و NO در موش‌های دریافت‌کننده زهر عقرب Titus serrulatus را ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که سطوح نیتریک اکساید، IL-1 α ، IL-1 β ، IL-6، TNF- α و IFN- γ افزایش یافته است (۳۲)؛ بنابراین، سیکلوسپورین توانست تا با کاهش غلظت NO، به کاهش التهاب کمک مؤثری بکند.

نتایج SOD نشان داد که زهر mesobuthus موجب افزایش غلظت SOD در مقایسه با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم از سیکلوسپورین می‌شود. این نتایج اثبات کرد که همه‌ی دوزهای سیکلوسپورین می‌توانند اثرات زهر mesobuthus را کاهش دهند. نتایج سایتوکاین IL-2 نشان داد که زهر mesobuthus می‌تواند بطور معناداری غلظت IL-2 را در مقایسه با دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی افزایش دهد. این نشان می‌دهد که زهر اپتوس با افزایش IL-2 منجر به افزایش التهاب شده است.

در حقیقت سیکلوسپورین در دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی موجب کاهش اثرات زهر از طریق کاهش سایتوکاین IL-2، NO، SGOT، SGPT شده است. در همین رابطه، Kahan و همکاران، نشان دادند که داروی سیکلوسپورین می‌تواند تولید سایتوکاین IL-2 را کاهش دهد (۲۶).

نتایج بررسی پاتولوژی کلیه و کبد با LD50 و زهر در ترکیب با سه دوز سیکلوسپورین نشان‌دهنده آسیب متوسط همراه با خونریزی ملایم است و سیکلوسپورین در دوز ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم همراه با زهر موجب کاهش ادم و خونریزی از بافت پاراننشیم کبد و کلیه شده است.

Dehghani و همکاران، اثرات زهر عقرب Hemiscorpius lepturus را بر روی پارامترهای هماتولوژیک و نیز

در مطالعه‌ای دیگر، Hidan و همکاران، آسیب‌های فیزیولوژیک در موش‌های مسموم شده با زهر عقرب roctopus liouvillei را مورد مطالعه قرار دادند. آنها دریافتند که این زهر موجب افزایش چشمگیر کراتینین، SGPT و SGOT به صورت می‌شود (۳۰). مطالعات مختلف نشان می‌دهد زهر عقرب موجب افزایش تمام پارامترهای بیوشیمیایی می‌شود و بدین وسیله باعث افزایش التهاب می‌شود. افزایش التهابی که احتمالاً می‌تواند در راستای نکروز و ادم بافتی بواسطه افزایش پارامترهای بیوشیمیایی و بویژه IL-2 باشد (۳۱)؛ بنابراین، در این مطالعه تأثیر درمانی سیکلوسپورین به منظور بهبود وضعیت ایجاد شده ناشی از اثر زهر Mesobuthus epeus با کاهش متغیرهای مورد بررسی نشان داده شده است.

همچنین، نتایج غلظت NO نشان داد که زهر epeus mesobuthus می‌تواند موجب افزایش غلظت NO در مقایسه با گروه‌های تزریق‌شده با سیکلوسپورین 20 و 30 میلی‌گرم. ضمن اینکه، دوزهای 20 و 30 میلی‌گرم از سیکلوسپورین موجب کاهش معنی‌دار غلظت NO شده است. بنابراین زهر که طبیعتاً منجر به افزایش التهاب می‌شود، با افزایش NO به التهاب بیشتر منجر شده است. افزایش NO تأیید‌کننده این موضوع است که التهاب ایجاد شده ناشی از زهر می‌تواند با نکروز نیز همراه باشد. در همین راستا، Petricevich و همکاران، سطوح سرمی سایتوکاین و NO در موش‌های دریافت‌کننده زهر عقرب Titus serrulatus را ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که سطوح نیتریک اکساید، IL-1 α ، IL-1 β ، IL-6، TNF- α و IFN- γ افزایش یافته است (۳۲)؛ بنابراین، سیکلوسپورین توانست تا با کاهش غلظت NO، به کاهش التهاب کمک مؤثری بکند.

نتایج SOD نشان داد که زهر mesobuthus موجب افزایش غلظت SOD در مقایسه با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم از سیکلوسپورین می‌شود. این نتایج اثبات کرد که همه‌ی دوزهای سیکلوسپورین می‌توانند اثرات زهر mesobuthus را کاهش دهند. نتایج سایتوکاین IL-2 نشان داد که زهر mesobuthus می‌تواند بطور معناداری غلظت IL-2 را در مقایسه با دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی افزایش دهد. این نشان می‌دهد که زهر اپتوس با افزایش IL-2 منجر به افزایش التهاب شده است.

در حقیقت سیکلوسپورین در دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرمی موجب کاهش اثرات زهر از طریق کاهش سایتوکاین IL-2، NO، SGOT، SGPT شده است. در همین رابطه، Kahan و همکاران، نشان دادند که داروی سیکلوسپورین می‌تواند تولید سایتوکاین IL-2 را کاهش دهد (۲۶).

نتایج بررسی پاتولوژی کلیه و کبد با LD50 و زهر در ترکیب با سه دوز سیکلوسپورین نشان‌دهنده آسیب متوسط همراه با خونریزی ملایم است و سیکلوسپورین در دوز ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم همراه با زهر موجب کاهش ادم و خونریزی از بافت پاراننشیم کبد و کلیه شده است.

Dehghani و همکاران، اثرات زهر عقرب Hemiscorpius lepturus را بر روی پارامترهای هماتولوژیک و نیز

سیکلوسپورین برای سرکوب اثرات سایتوتوکسیک زهر *mesobuthus eupeus* کاملاً موفق نبود، اما همه‌ی شاخص‌های بیوشیمیایی ارزیابی‌شده در این مطالعه پس از تزریق سیکلوسپورین کاهش داشت. علاوه بر این، نتایج پاتولوژیک این مطالعه اثبات کرد که زهر در ترکیب با سیکلوسپورین در دوز ۱۰ میلی‌گرم نتایج بهتری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی روغن زیتون داشت. این نتایج نشان می‌دهد که سیکلوسپورین از طریق کاهش پارامترهای بیوشیمیایی و کاهش میزان ادم و خونریزی ایجاد شده توانست به بهبود وضعیت التهاب کمک کند. با این وجود، تحقیقات بیشتر برای ارزیابی درمان‌های کمکی همراه با سیکلوسپورین برای سرکوب اثرات زهر *mesobuthus* مورد نیاز است. نتایج این مطالعه آشکار کرد که استفاده از دوز ۳۰ میلی‌گرمی سیکلوسپورین به عنوان یک دوز مناسب برای اثرات ضدالتهابی و مقابله با زهر *mesobuthus* کارایی بالایی دارد.

قدردانی و تشکر

از همه کسانی که در این پروژه علمی همکاری کردند بویژه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و آزمایشگاه تحقیقاتی آرک، آقای ادیب و خانم عسگر حلوائی کمال تشکر را داریم.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

منابع

1. Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of Inflammation* 2010.
2. Prendini L, Wheeler WC. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics* 2005;21(5):446-94.
3. Pipelzadeh MH, Jalali A, Taraz M, Pourabbas R, Zaremirkabadi A. An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon* 2007;50(7):984-92.
4. Campos J, Silva O, Lopez M, Freire-Maia L. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion poisoning in children. *Natural toxins: Elsevier* 1980; 61-8.
5. Deghani R, Fathi B. Scorpion sting in Iran: a review. *Toxicon* 2012;60(5):919-33.
6. Knechtle S, Halperin E, Murphy C, Saad T, Abernethy K, Miller D, et al. The effect of cyclosporine, total lymphoid irradiation, and cobra venom factor on hyperacute rejection. *The Journal of Heart Transplantation* 1985;4(5):541-5.
7. Kang HG, Zhang D, Degauque N, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng X. Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role

تغییرات بافتی از قبیل کلیه، قلب و طحال بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند که زهر *Hemiscorpius lepturus* اثرات مضر بر روی ارگان‌های سیستماتیک و موضعی دارد (۳۳). علاوه بر این، Zayerzadeh و همکاران، مطالعه‌ای بر روی دوزهای کشنده‌ی زهر عقرب *mesobuthus eupeus* انجام دادند و بررسی‌های پاتولوژیک ریه و قلب را مورد ارزیابی قرار دادند. همه‌ی خرگوش‌ها با تزریق زهر کشته شدند. اگرچه اثرات زهر *mesobuthus eupeus* اثرات مهلکی بر قلب و ریه دارد اما به نظر می‌رسد که شدت تخریب بافت ریه مستقل از تخریب بافت قلب است و علت اصلی مرگ و میر به دلیل آسیب شدید ریه بوده است (۳۴). در همین راستا، نتایج بدست آمده از این مطالعه آشکار کرد که زهر *mesobuthus eupeus* التهاب را با واسطه‌ی مولکول‌های ایمونولوژیک و بیوشیمیایی افزایش می‌دهد. همه‌ی پارامترهای بیوشیمیایی این مطالعه پس از تزریق زهر *mesobuthus* افزایش قابل‌ملاحظه‌ای نشان دادند. همچنین سیکلوسپورین به عنوان داروی ضدالتهابی می‌تواند اثرات زهر را کاهش دهد. سیکلوسپورین در همه‌ی دوزها (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم) می‌تواند پاسخ التهابی را پس از تزریق زهر کاهش دهد. ضمن اینکه به نظر می‌رسد که دوز ۳۰ میلی‌گرم سیکلوسپورین یک دوز مناسب برای سرکوب پاسخ التهابی باشد. اگرچه

- of IL-2. *American Journal of Transplantation* 2007;7(8):1907-16.
8. Dehghani R, Khoobdel M, Sobati H. Scorpion control in military units: A review study. *Journal of Military Medicine* 2018, 20(1): 3-13.
 9. Baradaran M, Jalali A, Naderi-Soorki M, Jokar M, Galehdari H. First transcriptome analysis of Iranian scorpion, *Mesobuthus eupeus* venom gland. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2018;17(4):1488.
 10. Rojas-Azofeifa D, Sasa M, Lomonte B, Diego-García E, Ortiz N, Bonilla F, et al. Biochemical characterization of the venom of Central American scorpion *Didymocentrus krausi* Francke, 1978 (Diplocentridae) and its toxic effects in vivo and in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2019;217:54-67.
 11. Jalali A, Rahim F. Epidemiological review of scorpion envenomation in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2014;13(3):743.
 12. Kovarik JM, Mueller EA, Johnston A, Hitzenberger G, Kutz K. Bioequivalence of soft gelatin capsules and oral solution of a new cyclosporine formulation. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1993;13(6):613-7.
 13. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney International* 1985;28(5):767-74.
 14. Singh K, Argáez C. Cyclosporine for Moderate to Severe Plaque Psoriasis in Adults: A Review of Clinical Effectiveness and Safety 2018.
 15. Haider AS, Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Zaba LC, Cardinale I, Khatcherian A, et al. Identification of cellular pathways of "type 1, Th17 T cells, and TNF-and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *The Journal of Immunology* 2008;180(3):1913-20.
 16. Wu CY, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY, et al. Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1995;58(5):492-7.
 17. Fukuhara Y, Reis M, Dellalibera-Joviliano R, Cunha F, Donadi E. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 2003;41(1):49-55.
 18. Saidani C, Béchohra L, Laraba-Djebari F, Hammoudi-Triki D. Kidney inflammation and tissue injury induced by scorpion venom: comparison with a nephrotoxic model. *Toxin Reviews* 2018: 240-247.
 19. Correa M, Sampaio SV, Lopes RA, Mancuso L, Cunha O, Franco J, et al. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon* 1997;35(7):1053-67.
 20. Singh G, Atal C. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and Actions* 1986;18(3-4):407-12.
 21. Bostom AG, Kronenberg F, Ritz E. Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002;13(8):2140-4.
 22. Tveden-Nyborg P, Bergmann TK, Lykkesfeldt J. Basic & clinical pharmacology & toxicology policy for experimental and clinical studies. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2018;123(3):233-5.
 23. Modaresi M, Seif M. Effect of an organochlorine insecticide, endosulfan, on blood parameters in rat. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 2011;13.
 24. Karimi Jashni H, Novin L, Poor Ahmadi M. Effect of the herbicide glyphosate on renal tissues in adult female rats. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 2014;11(4):10.
 25. Mirakabbadi A, Zolfagharian H, Hedayat A, Jalali A. Clinical and biochemical manifestation produced by scorpion (*Hemiscorpius lepturus*) venom in experimental animals. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2007;13(4):758-65.
 26. Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Stepkowski SM, Chou T-C. Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human

- peripheral blood lymphocytes in vitro. *Transplantation* 1991;51(1):232-9.
27. Zayerzadeh E, Mirakabadi AZ, Koohi M. Biochemical and histopathological study of *Mesobuthus eupeus* scorpion venom in the experimental rabbits. *Archives of Razi Institute* 2011;66(2):133-8.
28. Salman MM, Hammad S. Oxidative stress and some biochemical alterations due to scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) crude venom in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;91:101, 7-21.
29. Mirakabadi A, Jalali A, Jahromi A, Vatanpur H, Akbary A. Biochemical changes and manifestations of envenomation produced by *Odonthobuthus doriae* venom in rabbits. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2006;12(1):67-77.
30. El Hidan MA, Touloun O, El Hiba O, Boumezzough A. Pathophysiological and neurobehavioral injuries in mice experimentally envenomed with *Androctonus liouvillei* (Pallary, 1928) scorpion venom. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2016;68(2-3):41-133.
31. Ferro T, Johnson A, Everitt J, Malik A. IL-2 induces pulmonary edema and vasoconstriction independent of circulating lymphocytes. *The Journal of Immunology* 1989;142(6):1916-21.
32. Petricevich VL, Peña CF. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation* 2002;11(3):173-80.
33. Dehghani R, Khamechian T, Vazirianzadeh B, Vatandoost H, Moravvej S. Toxic effects of scorpion, *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) venom on mice. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 2012;22(3):593-6.
34. Zayerzadeh E, Koohi M, Zare Mirakabadi A, Purkabireh M, Kassaian S, Rabbani S, et al. Cardiopulmonary complications induced by Iranian *Mesobuthus eupeus* scorpion venom in anesthetized rabbits. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2010;16(1):46-59.

Received: 15/06/2019

Last revised: 29/08/2019

Accepted: 07/09/2019

Evaluation of the interference effect of cyclosporine and Mesobut scorpion venom on some biochemical and histological parameters in parenchymal tissue of liver and kidney of male mice

Sara Zangiabadi¹, Shahrokh Navidpour², Hossein Zolfagharian³, Mohammad Eslampanah³, Gholamhassan Vaezi^{4*}

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2. Razi Reference Laboratory of Scorpion Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3. Department of Human Vaccine and Serum, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Alborz, Iran
4. Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran

*Corresponding author e-mail: gh.vaezi@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Venom of Mesobuthus in the family buthidae can result in death in humans according to the performed studies. On the other hand, it has been demonstrated that due to anti-inflammatory properties of cyclosporine in organ transplantation through suppression of the immune system and inflammation, it could counteract venom effect. Therefore, in this study, the effect of cyclosporine on Mesobuthus eupeus venom was evaluated.

Materials and Methods: This was an experimental study. For this purpose, fifty mice were classified into five groups, each group consisting of ten mice. Mesobuthus venom and cyclosporine were used at three doses of 10, 20, and 30 mg. In this study, the mice which did not receive cyclosporine were considered as control group. Biochemical features plus nitric oxide and IL-2 cytokine were measured in all groups using routine methods (i.e. spectrophotometer and ELISA assay, respectively). Also, pathological examination of liver and kidney was performed.

Results: All the studied biochemical and IL-2 levels were significantly elevated after mesobuthus venom injection. On the other hand, groups which received cyclosporine showed a significant decrease in all the studied parameters ($P < 0.001$).

Conclusion: Cyclosporine at a dose of 30 mg is able to decrease inflammatory responses and it could be a suitable therapeutic drug in patients who are bitten by scorpion sting.

Keywords: Mesobuthus scorpion venom, Cyclosporine, Biochemical parameters, Liver and kidney, Mice