Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.45; No.2

Effect of different doses of bee venom on changes in total white blood cell and lavage fluid inflammatory cells in experimental asthmatic rats

Saeedeh Kadem Zolfaghari, Ali Neamati*

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2019/12/22 Accepted: 2020/09/29)

Abstract

Background: *Asthma is a complex and chronic inflammatory disease that causes numerous changes in the shape and function of the respiratory system, including reversible obstruction and stenosis, severe response, and alteration of the airway model, and other body systems, such as the immune system, the nervous system, and the endocrine system. It also affects the psyche of the patient. Today, due to the side effects of anti-inflammatory drugs, there is a growing desire to use traditional medicine. Bee venom due to the presence of numerous antioxidants and anti-inflammatory factors can prevent the increase of free radicals and is effective in reducing the complications of asthma.*

Methods and materials: *To evaluate bee poison, 32 rats (Wistar) were divided into four groups of control, asthma, and asthma receiving categorized 5/0 mg/kg and 1 mg/kg. To inflict the experimental asthma, rats received injective–inhalation ovalbumin. Along with receiving asthma, the treatment groups received bee poison during 10 days, too. At the end of the experiment, the samples were dissected and their lavage fluid was extracted, the white blood cell counted, and the percentages of monocytes and eosinophils in the lavage fluid of the four groups were determined and compared using SPSS running ANOVA with the significance value set at .*

Results: *The results showed that the total number of white blood cells, with the mean and standard deviation of 34 ± 229 (P≤0.01), percentage of monocytes with the mean of 0.18 ± 1.71 (P≤0.001), and vasinophils with the mean of 0.26 ± 1.63 (P≤0.01) in asthma samples increased significantly compared with those of the control samples.*

Conclusions*: According to the results, it seems that, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, bee venom may be effective in the treatment of inflammatory diseases, such as asthma.*

Keywords: *Rat; Bee venom; Lavage fluid; White blood cell*

**Corresponding author: Ali Neamati*

Email: neamati.ali@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٥، شماره ٢، ١٤٠٠، صفحات ٦ تا ١٢

بررسی اثر دوزهای مختلف زهر زنبور عسل بر تغییرات تعداد کل گلبولهای سفید و سلولهای التهابی مایع لاواژ رتهای مبتلا به آسم تجربی

سعیده خادم ذوالفقاری، علی نعمتی*

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱ پذیرش: ۱۳۹۹ /۷/۸

چکیده:

سابقه و هدف: آسم یک بیماری التهابی پیچیده و مزمن است که سبب تغییرات متعددی در شکل و عملکرد دستگاه تنفسی از جمله انسداد و تنگی قابل برگشت، پاسخدهی شدید و تغییر مدل مجاری هوایی و سایر دستگاه های بدن مانند دستگاه ایمنی، سیستم عصبی و غدد درون ریز شده و روح و روان بیمار را تحت تأثیر قرار می دهد.امروزه با توجه به عوارض جانبی داروهای ضد التهاب ، تمایل زیادی به استفاده از داروهای طب سنتی ایجاد شده است. زهر زنبور عسل بدلیل وجود فاکتورهای متعدد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می تواند از افزایش رادیکال های آزاد جلوگیری کرده و در کاهش عوارض ناشی از آسم مؤثر باشد.

روش مطالعه: در این مطالعه تجربی ابتدا برای بررسی تأثیر زهر زنبور عسل ۳۲ سر رت نژاد ویستار به ۴ گروه کنترل،آسمی و آسمی دریافت کننده زهر زنبور عسل با دوز ۰/۵ mg/kg و ۱ mg/kg انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. رت ها جهت ابتلا به آسم تجربی اوآلبومین تزریقی - استنشاقی دریافت کردند.گروه های تحت درمان همزمان با القاي آسم زهر زنبور عسل را به مدت ۱۰ روز دریافت نمودند. در پایان آزمایش نمونه ها تشریح و مایع لاواژ آنها استخراج وتعداد گلبول سفید و درصد منوسیتها و ائوزینوفیلهای آن در مایع لاواژ ۴ گروه مورد آزمایش تعیین و با یکدیگر مقایسه شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزارspss و بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام و (P≥۰،۰۵) به عنوان اختلاف معنا دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان میدهد که تعداد کل گلبولهاي سفید با میانگین و انحراف معیار(۳۴ ± ۲۲۹)و(P≥۰/۰۱) ، درصد منوسیتها با میانگین (۰/۱۸ ± ۱/۷۱)و(P≥۰/۰۰۱) وائوزینوفیلها با میانگین (۰/۲۶ ± ۱/۶۳)و (P≥۰/۰۱)در نمونه هاي آسمي افزايش معني داري نسبت به نمونه هاي كنترل پيدا كرده است. مقايسه ي نتايج گروه هاي تيمار شده با زهر زنبور عسل با گروه آسمي نشان مي دهد تعداد سلول هاي التهابي شامل ، منوسيت و ائوزينوفيل در مايع لاواژ كم شده است. بعلاوه مقايسه ي نتايج گروه هاي تيمار شده با زهر زنبور عسل نشان می دهد اثر زهر زنبور عسل در گروهي كه با دوز بيشتري تيمار شده است نمایان تر است.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که زهر زنبور عسل میتواند احتمالا بدلیل داشتن مواد با خاصیت آنتي اكسيداني و ضد التهابي در درمان بيماريهاي التهابي همچون آسم مورد توجه قرار گيرد.

واژگان کلیدی: رت، زهر زنبور عسل، مایع لاواژ، گلبول سفید

مقدمه:

آسم یک بیماری التهابی شدید و پیچیده است که با انسداد و تنگی قابل برگشت، پاسخدهی شدید، التهاب شدید و تغییر مدل مجاری هوایی توصیف می شود (۱،۲). عوامل مولد بیماری آسم تحریک کننده های موجود در محیط زیست هستند که می توانند علائم و حملات بیماری را تشدید کنند و معمولا از فردی به فرد دیگر متفاوتند. از این رو می توان با شناسایی و جلوگیری از تماس با این عوامل تحریک کننده از بروز علائم شدید و آزار دهنده ی بیماری پیشگیری کرد (۳و۴).در بیماری آسم انواع رادیکال های اکسیژن شامل رادیکال های سوپراکسید، هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و اسید هیپوکلرو افزایش می یابد و ذخایر آنتی اکسیدان کاهش می یابد. در بیماران آسمی تولید رادیکال های آزاد در ائوزینوفیل ها و لکوسیت های دیگر خون و ریه ها افزایش می یابد همچنین سطح گلوتاتیون اکسید شده در مایع لاواژ و غلظت نیتریک اکسید در هوای بازدمی زیاد می شود. از طرف دیگر غلظت آنتی اکسیدان های طبیعی مثل گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ویتامین های C وE در سلول های

نویسنده مسئول: دکتر علی نعمتی
پست الکترونیک: *neamati.ali@gmail.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

خونی و پلاسما و مایع لاواژ افراد آسمی کاهش می یابد. با افزایش رادیکال های اکسیژن: پراکسیداسیون پروتئین ها، لیپید ها و اسیدهای نوکلئیک زیاد می شود و در نتیجه باعث تولید مواد جاذب شیمیایی و افزایش پاسخدهی شدید، ترشح و افزایش نفوذ پذیری رگ های خونی می شود. بعلاوه رادیکال های آزاد، باعث راه اندازی فعالیت فاکتور های پیش التهابی و در نتیجه باعث تشدید التهاب آلرژیک می شود (۷-۵). همچنین عقیده بر این است که رادیکال های آزاد اکسیژن با فعال کردن فاکتور های رونویسی باعث افزایش بیان ژن های مربوط به مدیاتور های پیش التهابی می شود (۸). استفاده از سموم طبیعی در درمان بعضی امراض از دیر زمان ریشه در فرهنگ و تمدن بشری داشته و در این میان زهر زنبور عسل جایگاه ویژه ای دارد. زهر زنبور عسل یک مایع شفاف است که به آسانی در هوای اتاق خشک می شود. بی بو،تلخ مزه بوده و دارای PH بین ۴/۵ تا ۵/۵ می باشد که توسط زنبور برای دفاع از خود به کار برده می شود. زهر خشک شده به رنگ زرد روشن و زهرهایی که به صورت تجاری آماده می شوند. قهوه ای رنگ می باشند که مربوط به اکسید شدن برخی از پروتئین های موجود در زهر است. زهر زنبور حاوی مواد بسیار فراری است که در هنگام جمع آوری زهر به آسانی تبخیر می شوند. زهر زنبور منبع غنی از آنزیم ها، پپتیدها و آمین ها می باشد. وزن ویژه آن ۱/۱۳۳ می باشد (۱۲-۹). آنالیز های مدرن بیوشیمیایی را برای شناسایی اجزا موجود در زهر حشرات به کار می برند. در نتیجه آن، حدود ۱۸ ماده فعال از نظر دارو شناختی مثل انواع آنزیم ها، انواع پپتیدها و آمین هایی نظیر ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتیدهای MCD، آنزیم هایی همچون هیستامین و اپی نفرین شناسایی شده است. علاوه بر آنها، زهر حشرات حاوی مواد غیر پپتیدی نظیر لیپیدها، هیدراتهای کربن و اسیدهای آمینه آزاد نیز می باشد. این ترکیبات زهر ها دارای خصوصیات دارویی بسیار متنوعی هستند (۱۴). زهر زنبور عسل در طب سنتی برای تخفیف درد و کاهش تورم و مخصوصا در بیماری هایی التهابی شدید و مزمن همچون آرتریت روماتوئید (RA) استفاده می شود. گزارش شده که تزریق زهر زنبور عسل در نقاط مخصوص طب سوزنی منجر به کاهش ادم مربوط به آرتریت در موشها می شود(۱۳). با توجه به عوارض جانبی داروهای ضد التهاب ، تمایل زیادی به استفاده از داروهای طب سنتی ایجاد شده است.لذا هدف از این مطالعه بررسی تعیین تاثیر ۲ دوز زهر زنبور عسل بر تغییرات تعداد گلبولهای سفید و سلولهای التهابی مایع لاواژ رتهای مبتلا به آسم تجربی می باشد.

مطالعه‌های زیادی آثار انجام فعالیت‌های بدنی گوناگون را بر سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های گوناگون بررسی کرده‌اند، با این حال، نتایج مطالعه‌ها در این زمینه با توجه به مدت، نوع و شدت تمرین‌ها، متناقض است. نتایج برخی مطالعه‌ها حاکی از آن بود که با انجام فعالیت ورزشی، بافت‌هایی که به مدت طولانی در معرض افزایش استرس اکسیداتیو قرار دارند؛ دچار تطابق در سیستم آنتی‌اکسیدانی از طریق تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند(۱۳-۱۰). در مطالعه‌ای Lima و همکاران(۲۰۱۵)، اثر ۹ هفته فعالیت دویدن را بر سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که تمرین ورزشی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد را در رت‌های دیابتی افزایش می‌دهد(۱۴). احمدیان و همکاران (۲۰۱۸)، نیز بیان کردند که تجویز فعالیت ورزشی به مدت سه هفته به افزایش آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در رت‌های پیر منجر می‌شود(۱). با این حال، هوانلو و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر دویدن با سرعت ۱۰ تا ۶۰ متر در دقیقه را در دوره‌های مختلف زمانی بر تغییر فعالیت آنزیمی کبد موش صحرایی را بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که تمرین استقامتی تا ۹ هفته نمی‌تواند سبب بروز سازگاری سیستم آنتی‌اکسیدانی شود، اما هفته‌های بیشتر تمرینی کاهش میزان فعالیت آنزیم‌ها را در پی دارد(۱۵). Rodrigues و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثر ۱۰ هفته فعالیت مقاومتی را بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد رت‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده بود (اوفورکتومی)، بررسی کردند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تمرین مقاومتی قادر به کاهش آسیب اکسیداتیو کبدی ایجاد شده توسط اوفورکتومی نیست و استرس اکسیداتیو کبدی را افزایش می‌دهد(۱۶). بنابراین، این‌گونه به نظر می‌رسد که شدت، مدت و نوع تمرین، آثار متفاوتی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی به همراه داشته باشد(۱۷،۱۶). از طرف دیگر، تحقیق‌هایی که به مقایسه بین دو نوع پروتکل تمرین‌های استقامتی با شدت مختلف بر تغییرهای میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد پرداخته‌اند، اندک هستند. به دلایل فوق و به سبب اینکه آثار احتمالی ناشی از تمرین‌های منظم ورزشی بر کیفیت زندگی به ویژه در افراد سالمند جزو موضوع‌های حایز اهمیت پژوهشگران بوده است، بنابراین هدف پژوهش حاضر تاثیر دو پروتکل تمرین تناوبی و تداومی بر سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد رت‌های مسن است.

مواد و روش‌ها:

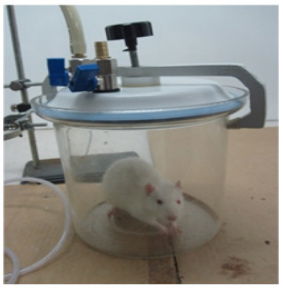
روش بررسی:

در این مطالعه تجربی از موش صحرائی نژاد ویستار استفاده گردید. رت ها از هر دو جنس (شیوع آسم در هردو جنس یکسان می باشد و هورمونهای جنسی تاثیری بر آسم ندارند) و به وزن تقریبی ۳۰۰ -۲۵۰ گرم برای انجام آزمایش انتخاب گردیدند. حیوانات مورد آزمایش از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد تهیه شدند. رت های مورد آزمایش حدوداً ۸۰ تا ۹۰ روزه بودند. آن ها در اتاق حیوانات با دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتیگراد و چرخه طبیعی روشنایی-تاریکی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شده و آب و غذای کافی در اختیار داشتند.

شرح وسایل مورد استفاده

۱- اتاق استنشاق:

اتاقک استنشاق به صورت استوانه و از جنس پیرکس شفاف درست شده است. عرض استوانه ۱۶ سانتیمتر و ارتفاع آن ۱۹ سانتیمتر است و دارای حجم کلی ۳ لیتر می باشد و دارای دربی مجزا است. در قسمت بالای درب استوانه دو مجرا قرار دارد که از طریق یکی هوای حاوی ماده اسپری شده وارد و از طریق دیگری خارج می شود. جهت وارد کردن حیوان آزمایشگاهی به درون اتاقک کافیست درب آن برداشته شود و نمونه در آن قرار گیرد.



تصویر ۱: اتاقک استنشاق

۲- نبولایزر:

نبولایزر وسیله ای است برای اسپری کردن محلول ماده حساسیت زا (اوالبومین) می باشد. این وسیله یک ظرف کوچک استوانه ای از جنس پلاستیک است که از دو قسمت تشکیل شده است: یک بخش زیرین که محلول استنشاقی در آن ریخته می شود و یک بخش بالایی که مانند دربی روی بخش زیرین قرار می گیرد.

هوای ایجاد شده توسط آئروسل از طریق یک لوله پلاستیکی متصل به قسمت زیرین وارد نبولایزر شده و محلول موجود در آنرا بصورت ذرات ریز در می آورد که با هوای ورودی مخلوط و از طریق یک رابط از بخش بالائی نبولایزر وارد اتاقک استنشاق می گردد.

۳- دستگاه تولید کننده آئروسل:

این دستگاه هوای مورد نیاز را برای تبدیل محلول اوالبومین به آئروسل جهت استنشاق حیوان آزمایشگاهی تامین می کند. دستگاه توسط یک لوله پلاستیکی به نبولایزر وصل می شود و هوا را وارد نبولایزر می کند.

نحوه ایجاد آسم تجربی به کمک اوالبومین:

اوالبومین یا آلبومین تخم مرغ عمده ترین پروتئین سفیده تخم مرغ را تشکیل می دهد. وزن ملکولی آن حدود۴۵۰۰۰ دالتون بوده و ساختمان آن از زنجیره های پلی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

پپتیدی ساده متشکل از ۴۰۰ شاخه جانبی فسفاته ساخته شده است که نیمی از آنها هیدروفوب هستند. درهر مول اوالبومین حداکثر دو شاخه جانبی فسفاته و یک الیگو ساکارید متشکل از یک مانوز و یک گلوکزآمین وجود دارد. بلورهای سوزنی و کشیده دارد که اغلب ایجاد شکل گلبرگی می کند. کریستال های این پروتئین معمولا شامل ۲ مول پروتئین و ۳ مول اسید سولفوریک می باشد. در دمای ۵۶ درجه سانتیگرد کواگوله می شود. در محلول الکترولیت عاری از آب محلول است. با اسید ها و نمک ها و باز ها ترکیب می شود. دناتوره شدن ساختمان آن می تواند در اثر دمای بالای ۵۶ درجه، جریان الکتریکی، مواد شیمیایی مثل اسیدها، نمک ها، فلزات سنگین، الکل و نمک های آمونیاکی اتفاق افتد که تمام این موارد ایجاد دناتوراسیون کامل وغیر قابل برگشت می کنند(۱۵).

روش تهیه محلول های مورد استفاده:

۱- روش تهیه اوالبومین تزریقی :

مرحله (1) : در روز اول 1mg اوآلبومین(OA) بعلاوه 50mg هیدرواکسید آلومینیوم را با 0/5ml سرم فیزیو لوژی (نرمال سالین) ترکیب نموده و به صورت داخل صفاقی به نمونه مورد نظر تزریق می کنیم(16).

مرحله (۲) : یک هفته بعد در روز هشتم ۰/۰۲ mg اوآلبومین به اضافه ۵۰mg هیدروکسید آلومینیوم را به 0.5ml نرمال سالین (سرم فیزیولوژی) اضافه نموده و به صورت داخل صفاقی به نمونه مورد نظر تزریق می کنیم.

مرحله اول : 1mg (OA) + 50 mg Al(OH)3 + 0.5 ml نرمال سالین

مرحله دوم : 0.02mg (OA)+50mg Al(OH)3 +0.5ml نرمال سالین

۲- روش تهیه اوآلبومین استنشاقی:

از روز ۱۴ به مدت ۱۸ روز نمونه های مورد نظر را در بخار ۴٪ (OA) هر روز به مدت ۵ دقیقه قرار داده ، در روز سی وسوم جهت انجام آزمایشات و بررسی سلول های التهابی در مایع لاواژ نمونه راتشریح می کنیم(۱۶).

۳- تهیه زهر:

زهر پودر شده زنبور عسل از دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران خریداری و مورد استفاده قرار گرفت.

٤- روش تهیه زهر رقیق شده زنبور عسل:

با توجه به اینکه گروه سوم نمونه ها (نمونه های آسمی دریافت کننده عصاره زهر زنبور عسل به میزان ۰/۵ mg/kg) به مدت ۱۰روز متوالی، سم دریافت می کردند، جهت ۸۰ بار تزریق (۱۰روز و ۸ نمونه)

۱۰ mg سم زنبور را در ۴۰ cc سرم فیزیولوژی حل کرده تا زهر با غلظت mg/ ۰/۵ kg بدست آید. برای گروه چهارم نمونه ها (نمونه های آسمی دریافت کننده عصاره زهر زنبور عسل به میزان ۱ mg/kg) به مدت ۱۰ روز متوالی، سم را دریافت می کردند، جهت ۸۰ بار تزریق (۱۰ روز و ۸۰ نمونه) ۲۰ mg سم زنبور عسل را در ۴۰ cc سرم فیزیولوژی حل کرده تا زهر با غلظت ۱ mg/kg بدست آید.

بعد از تهیه، ظروف حاوی زهر را در شرایط کاملاً استریل داخل یخچال نگهداری نمودیم(۱۷).

۵- روش تهیه اندام های لازم (کبد - طحال- شش):

ابتدا حیوان را وزن کرده سپس با کلروفرم بیهوش نموده و بعد از برش طولی در ناحیه شکم اقدام به برداشتن کبد، طحال و در آخر شش از ناحیه سینه گردید. بعد از تهیه اندام آن ها را توسط ترازو وزن و سپس در محلول فرمالدئید ۱۰٪ نگهداری نمودیم(۱۶).

٦- گروه های مورد مطالعه

در این تحقیق ۳۲ رت با وزن تقریبی ۳۰۰ -۲۰۰ گرم از هر دو جنس به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه (۱) : گروه کنترل که در شرایط معمولی در اتاق حیوانات نگهداری شدند.

گروه (۲) : گروه مبتلا به آسم تجربی

گروه (۳) : گروه مبتلا به آسم تجربی که با زهر زنبور عسل با دوز ۰/۵ mg/kg وزن بدن حیوان تیمار شدند

گروه (۴) : گروه مبتلا به آسم تجربی که با زهر زنبور عسل با دوز ۱ mg/kg وزن بدن حیوان تیمار شدند.

۷- روش تیمار با زهر زنبور عسل:

زهر زنبور را با دو دوز متفاوت تهیه نموده وبه گروه ۳ و۴ آسمی به مدت ۱۲ روز قبل از تشریح تا دو روز مانده به تشریح، هم زمان با استنشاق، هوای حاوی OA را دریافت می کنند به صورت داخل صفاقی تزریق نموده وطوری برنامه ریزی شد، که تزریقات ، تا ۲ روز مانده به تشریح نمونه،به اتمام رسید(۱۶).

۸- روش تهیه مایع لاواژ:

ابتدا حیوان را وزن کرده سپس با کلروفرم بیهوش نموده و بعد از برش طولی در ناحیه شکم اقدام به برداشتن کبد و طحال و در آخر ریه به همراه نای شد ، ریه بیرون کشیده را با سرم فیزیولوژی شست و شو داده و سپس به کمک سرنگ مخصوصی که جهت کشیدن لاواژ از ریه تهیه شده cc ۱۵سرم فیزیولوژی را در طی سه مرحله هر بار به مقدار cc ۵ به ریه تزریق کرده و در هر مرحله تزریق، به مدت چند دقیقه بافت ریه را ماساژ ملایم داده تا گلبول های سفید به داخل سرم تزریقی انتقال یابند.سپس مایع لاواژ را توسط سرنگ بیرون کشیده و در یک بشر کاملا تمیز جمع آوری نمودیم(۱۷).

۹- روش شمارش گلبول سفید در مایع لاواژ :

یک قطره از مایع لاواژ تهیه شده را روی لام نئوبایر ریخته و با عدسی ۱۰ میکروسکوپ شمارش گلبول سفید انجام شد. ۴ مربع مخصوص گلبول سفید را در لام نئوبایر شمارش کرده و میانگین آن را بدست آوردیم (۱۶).

۱۰- روش تهیه اسمیر لاواژ جهت شمارش افتراقی گلبول های سفید:

یک قطره از مایع لاواژ استخراج شده از شش رَت برداشته و بر روی لام قرار داده با کشیدن یک لامل بر روی لام حاوی قطره، گسترش تهیه می شود. سپس منتظر می مانیم در هوای آزمایشگاه نمونه اسمیر خشک شود و بعد با افزودن متانل بر روی لام، سلول های روی آن تثبیت می شوند. پس از خشک شدن گسترش، یک میلی لیتر رنگ گیمسا روی آن ریخته و پس از ۱۵ دقیقه، لام را با آب جاری و با ملایمت شستشو داده وصبر می کنیم تا خشک شود، سپس یک قطره روغن ایمرسیون روی گسترش رنگ آمیزی شده ریخته با درشت نمائی ۱۰۰ میکروسکوپ از یک گوشه لام بصورت زیگزاگ شروع به شمارش انواع گلبول های سفید می کنیم. باشمارش ۱۰۰ عدد گلبول سفید و تعیین تعداد هر یک از انواع گلبول های سفید در این ۱۰۰ عدد، در صد هر یک ازآنها بدست می آید(۱۷).

۱۱- مطالعه بافت شناسی

پس از انجام مراحل فوق، هر حیوان را با تزریق محلول کلروفرم بی هوش کرده و قفسه سینه را باز نموده و شش های جانور را حتی الامکان از بالای نای جدا می کنیم و پس از انجام مراحل آماده سازی بافت شامل فیکسه کردن شش، پاساژ بافتی، آبگیری و شفاف سازی، آغشتگی و قالب گیری با استفاده از میکروترم، برش های حدود ۳ تا ۵ میکرون زده شده و روی لام شیشه ای قرار می دهیم. لام های دارای برش بافتی را مدت ده دقیقه در سبد های رنگ آمیزی در فور با دمای حدود ۱۲۰ درجه قرار داده تا پارفین اضافی آن ذوب شده و بریزد و سپس مراحل رنگ با "ائوزین و هماتوکسیلن" انجام میدهیم. پس از خشک شدن کامل

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

لام ها سطح لام ها را با چسب انتلان آغشته کرده و برروی آن لامل می‌چسبانیم. پس از چند ساعت با خشک شدن کامل چسب، لام ها برای مشاهده میکروسکپی آماده می باشد(۱۷).

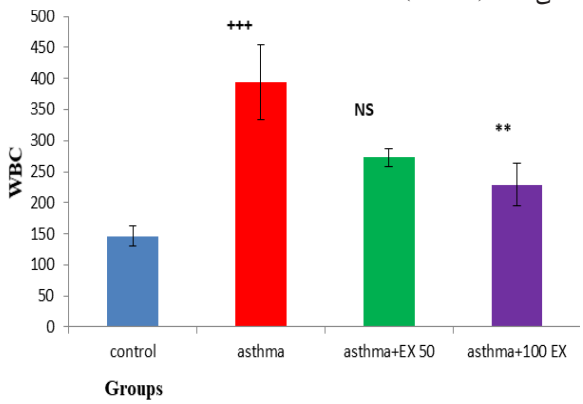
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Spss۱۶انجام و نمودار های لازم با استفاده از نرم افزار Excel رسم شده است.

مقایسه بین نمونه های کنترل و مبتلا به آسم تجربی و تیمار شده با زهر زنبور عسل با استفاده از تست آماری ANOVA انجام گردید و$P\geq$۰,۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی دار محسوب شده است.

نتایج:

بررسی گلبول های سفید خون (WBC) در مایع لاواژ:

میانگین تعداد گلبول های سفید در نمونه کنترل برابر با ۲۳ ± ۱۴۶ و در گروه آسمی۶۰ ± ۳۹۴ می‌باشد که در این رابطه اختلاف معناداری بین دو گروه در حد ($P\geq$۰/۰۰۱) وجود دارد. تعداد گلبول های سفید نمونه تحت درمان با دوز mg/ kg ۰/۵ زهر زنبور عسل برابر با ۱۴ ± ۲۷۳ است که در مقایسه با گروه آسمی اختلاف معناداری وجود ندارد. این تعداد در نمونه های تحت درمان با دوز mg/ kg ۱ زهر زنبور برابر با ۳۴ ± ۲۲۹ می باشد که داری اختلاف معنادار با گروه آسمی است ($P\geq$۰/۰۱).



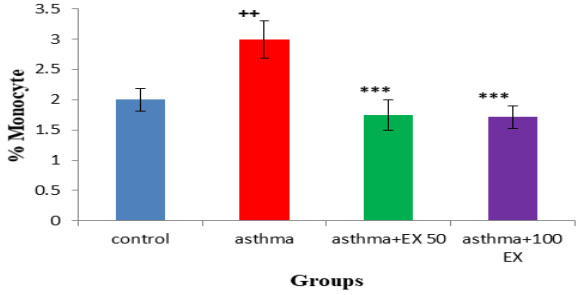
نمودار ۱: میزان گلبول های سفید مایع لاواژ بر حسب گروه ها

+++ معرف معناداری اختلاف بین گروه کنترل و آسمی در حد ($P\geq$۰/۰۰۱)می باشد.

** معرف معناداری اختلاف بین گروه آسمی و تحت درمان در حد ($P\geq$۰/۰۱) می باشد.NS معرف عدم اختلاف معناداری است.

بررسی منوسیت در مایع لاواژ:

میانگین تعداد مونوسیت در نمونه کنترل برابر با ۰/۱۹ ± ۲ و در گروه آسمی ۰/۳۱ ± ۳ می‌باشد که در این رابطه اختلاف معناداری بین دو گروه در حد ($P\geq$۰/۰۱) وجود دارد. تعداد مونوسیت نمونه تحت درمان با دوز mg/kg ۰/۵ زهر زنبور عسل برابر با ۰/۲۵ ± ۱/۷۵ است که در مقایسه با گروه آسمی اختلاف معناداری وجود دارد ($P\geq$۰/۰۰۱). این تعداد در نمونه های تحت درمان با دوز mg/kg ۱ زهر زنبور برابر با ۰/۱۸ ± ۱/۷۱



نمودار ۲: میزان منوسیت مایع لاواژ بر حسب گروه ها

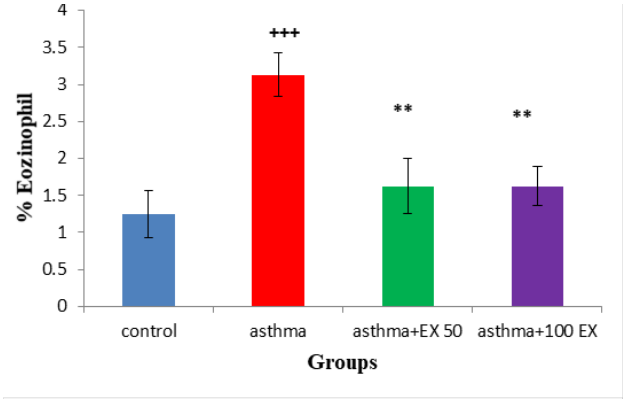
++ معرف معناداری اختلاف بین گروه کنترل آسمی در حد ($P\geq$۰/۰۱)می باشد.

*** معرف معناداری اختلاف بین گروه آسمی و تحت درمان در حد ($P\geq$۰/۰۱) می باشد.

می‌باشد که داری اختلاف معنادار با گروه آسمی است ($P\geq$۰/۰۰۱).

بررسی ائوزینوفیل در مایع لاواژ

میانگین تعداد ائوزینوفیل در نمونه کنترل برابر با ۰/۳۱ ± ۱/۲۵ و در گروه آسمی ۰/۳۰ ± ۳/۱۳ می‌باشد که در این رابطه اختلاف معناداری بین دو گروه در حد($P\geq$۰/۰۰۱) وجود دارد. تعداد ائوزینوفیل نمونه تحت درمان با دوز mg/kg ۰/۵ زهر زنبور عسل برابر با ۰/۳۸ ± ۱/۶۳ است که در مقایسه با گروه آسمی اختلاف معناداری وجود دارد($P\geq$۰/۰۱). این تعداد در نمونه های تحت درمان با دوز mg/kg ۱ زهر زنبور برابر با ۰/۲۶ ± ۱/۶۳می باشد که اختلاف معنادار با



نمودار ۳: میزان ائوزینوفیل مایع لاواژ در گروه های مورد مطالعه

+++ معرف معناداری اختلاف بین گروه کنترل آسمی در حد ($P\geq$۰/۰۰۱)می باشد.

** معرف معناداری اختلاف بین گروه آسمی و تحت درمان در حد ($P\geq$۰/۰۱) می باشد.

گروه آسمی وجود دارد($P\geq$۰/۰۱).

بحث:

در تحقیق به عمل آمده ، تعداد گلبول سفید در نمونه آسمی نسبت به نمونه کنترل روند افزایشی داشته و اختلاف معنا داری بین دو گروه وجود دارد.تعداد گلبول سفید نمونه تحت درمان با زهر زنبور عسل نسبت به نمونه آسمی کاهش یافته و این نشانه اختلاف معنا داری بین دو گروه است.

با توجه به اظهارات Pauluhn J. در سال ۲۰۰۸ مبنی بر شمارش کلی گلبول های سفید به ویژه، گرانولوسیت های نوتروفیلی و لنفوسیت ها در مایع لاواژ در تمام گروه های حساس شده به طور معنا داری افزایش پیدا کرده است (۱۷،۱۸)، همچنین در تحقیقی که Sei-Ryang Ohو همکارانش انجام دادند، ۴۸ ساعت بعد از آخرین آلودگی، سلول های مایع لاواژ شمارش شدند و مشاهده شد که اوالبومین باعث جریان معنادار گلبول های سفید به درون مایع لاواژ می شوند که با نتایج به دست آمده در نمودار (۱) مبنی بر اختلاف معنادار بین گروه کنترل و آسمی و همچنین گروه های تیمار شده با دوزهای دو گانه زهر زنبور عسل با گروه آسمی در پژوهش حاضر هماهنگ است. با توجه به اینکه آسم یک بیماری التهابی است بنابراین افزایش تعداد گلبول های سفید در مایع لاواژ جهت مبارزه با التهاب ضروری است و انتظار می رود زهر زنبور عسل بدلیل خاصیت ضد التهابی خود تعداد گلبول های سفید را کاهش دهد.

در تحقیقی که Sei-Ryang Oh و همکارانش انجام دادند، ۴۸ ساعت بعد از آخرین آلودگی سلول های مایع لاواژ شمارش شدند، اوالبومین باعث جریان معنی دار گلبول های سفید به درون مایع لاواژ(BALF) می شوند. در موش های حساس شده با اوالبومین۷۵ ٪ کل گلبول های سفید در BALF را ائوزینوفیل ها تشکیل می دهند. شمارش سلول ها در مایع لاواژ میزان کل گلبول های سفید، ائوزینوفیل و ماکروفاژ و لنفوسیت نمونه های حساس شده، اوالبومین را با یکدیگر مقایسه کرده است که بر اساس این مقایسه،بیشترین میزان را تعداد کل گلبول های سفید،سپس ائوزینوفیل ها و بعد از آن ماکروفاژ و لنفوسیت ها دارند. لنفوسیت ها نسبت به ائوزینوفیل ها افزایش کمتری داشته اند (۱۹).

در تحقیقی که روی خوکچه هندی حساس شده با اوالبومین انجام شد مشخص شد که تعداد کل گلبول های سفید خون در حیوانات حساس شده افزایش یافته

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

است همچنین افزایش ائوزینوفیلی ،نوتروفیلی،و کاهش در لنفوسیت ها مشاهده می شود (۲۰).

در تحقیقی که روی خوکچه های هندی انجام شد مشاهده شد که گلبول های سفید (WBC) در حیوانات حساس شده افزایش یافته است که این نیز تأکیدی بر مطالعات انجام شده در این تحقیق می باشد (۲۰).

در نتایج به دست آمده موجود، تعداد ائوزینوفیل در نمونه آسمی نسبت به نمونه کنترل روند افزایشی داشته است.دریافت زهر زنبور عسل توسط نمونه های آسمی تعداد ائوزینوفیل را کاهش داده و اختلاف معنا داری بین تعداد ائوزینوفیل نمونه های تحت درمان با نمونه آسمی مشاهده شد.

در مایع لاواژ (BAL) و خلط بیماران آسمی ائوزینوفیل های دگرانوله شده و فعال افزایش می یابند. مهمترین سلول های التهابی در آسم، ائوزینوفیل ها، لنفوسیت های CD4+ T و ماست سل ها هستند که با آزاد کردن میانجی‌های التهابی موجب انقباض مجاری تنفسی می گردند که مشخصه مهم بیماری آسم است (۲۱). التهاب، همه مجاری تنفسی را در آسم درگیر می کند ولی بر پارانشیم ریه اثری ندارد(۲۱). Duez و همکارانش ائوزینوفیل ها را در خون، مایع لاواژ ریه و عقده های لنفاوی مدل های موش حساس شده ردیابی کردند و تعداد زیادی ائوزینوفیل را در این قسمت ها مشاهده کردند. ائوزینوفیل ها ممکن است ریه را برای عملکردی شبیه سلول های ارائه دهنده آنتی ژن ترک کنند که در مایع لاواژ (BAL) بیماران آسمی ائوزینوفیل ها حدودا ۳٪ گلبولهای سفید را تشکیل می دهند(۲۲). در تحقیقی که Southam و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی موش های حساس شده با اوالبومین انجام دادند، گزارش شد که افزایش سلول های اجدادی CD341451IL-5Ra1 که ائوزینوفیل ها از آنها منشاء می گیرند با حداکثر افزایش IL۵ در مایع لاواژ و افزایش هر۲ نوع سلول اجدادی CD34145 در ریه و حداکثر ائوزینوفیل های مایع لاواژ منطبق است (۲۳)، که این گزارشات با نتایج درج شده در نمودار ۳ مبنی بر افزایش اختلاف معنادار ائوزینوفیل های شمارش شده در مایع لاواژ نمونه های گروه آسمی نسبت به کنترل و این پارامتر در مایع لاواژ نمونه های گروه تیمار شده با دوز های ۰/۵ mg/kg و ۱ mg/kg نسبت به ائوزینوفیل های نمونه آسمی هم سو می باشد. پس انتظار می رود که زهر زنبور عسل افزایش پاسخ دهی مجاری تنفسی که اختلال فیزیولوژیک بارز در آسم می باشد را کاهش داده و تعدادائوزینوفیل ها را به تعداد موجود در گروه کنترل نزدیک نمود.

مونوسیت (M)

در تحقیق انجام شده، با توجه به نتایج، افزایش معنا دارمونوسیت را در گروه آسمی نسبت به گروه کنترل، شاهد بودیم ونیز کاهش معناداری در تعداد مونوسیت گروه تیمار شده با دوز های ۰/۵ mg/kg و ۱ mg/kg نسبت به گروه آسمی مشاهده نمودیم.

So۰utham و همکاران در سال ۲۰۰۵، در مطالعه ای که روی موش های آزمایشگاهی انجام شد نتایج نشان داد که مونوسیت ها در حساسیت‌های تنفسی نقش دارند (۲۴).

نتیجه گیری :

این نتایج نشان میدهد که تعداد کل گلبولهای سفید، درصد منوسیتها و ائوزینوفیلها در نمونه های آسمی افزایش معنی داری نسبت به نمونه های کنترل پیدا کرده است. مقایسه ی نتایج گروه های تیمار شده با زهر زنبور عسل با گروه آسمی نشان می دهد تعداد سلول های التهابی شامل ، منوسیت و ائوزینوفیل در مایع لاواژ کم شده است. بعلاوه مقایسه ی نتایج گروه های تیمار شده با زهر زنبور عسل نشان می دهد اثر زهر زنبور عسل در گروهی که با دوز بیشتری تیمار شده است نمایان تر است به طوری که در رت هایی که با دوز ۱۰۰ mg/kg زهر زنبور عسل تیمار شدند نسبت به گروه آسمی، تعداد ائوزینوفیل و منوسیت در مایع لاواژ به طور معنی دار کاهش یافته است.زهر زنبور در گروههای تحت درمان بطور معنی داری کاهش آنها را سبب شده است.احتمالا زهر زنبور عسل بدلیل وجود فاکتورهای متعدد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می تواند از افزایش رادیکال های آزاد جلوگیری کرده و در کاهش عوارض ناشی از آسم مؤثر باشد.

منابع:

1.Tang M.L.K., Wilson J.W., Stewart A.G., Royce S.G., “Airway remodelling in asthma: Current understanding and implications for future therapies”, Pharmacol. Ther., 112 (2006) 474–488

2.Sheikh A., Alves B., Dhami S., “Pneumococcal vaccine for asthma”, Cochrane. Database. Syst. Rev., 2010 (2002) 1-9.

3.Martinez F.D., Wright A.L., Taussig L.M., Holberg C.J., Halonen M., Morgan W.J., “Asthma and wheezing in the first six years of life. The group Health Medical Associates”. N. Engl. J. Med., 332 (1995) 133-138.

4. Hamedani M., Mirshafiey A., Vatanpour H., Khorramizadeh M.R., et al., “In Vitro Assessment of Bee Venom Effects on Matrix Metalloproteinase Activity and Interferon Production”, Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol., 4(2005) 9-14.

5.Abbas A. K., Leishman AH, Pilani SH, Cellular and Molecular Immunology, Translated by Mirahadian M., First Edition, 6th Edition, Samat Publications, 2008. pp. 588-563.

6.Farid Hosseini R., Fundamentals of Immunology, Second Edition, Astan Quds Razavi Publications, 2003. pp. 584-555.

7.Li-Weber M., Giaisi M., Treiber M.K., Krammer P.H., “Vitamin E inhibits IL-4 gene expression in peripheral blood T cells”, Eur. J. Immunol., 32 (2002) 2401-2408.

8.Krylov V., “Pcelni yad, Bee venom”, Nizhny Novgorod University Nizhny Novgorod, (1995) 221-231.

9.Nilakshi N., Vijay G.R., Abhyankar M.M., “DETAILED PROFILE OF CROCUS SATIVUS”, Int. J. Pharm. Bio. Science., 2 (2011) 530-540.

10.Cho Y.S., Lee J., Lee T., Lee E.Y., “alpha-Lipoic acid inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma”, J. Allergy clin. Immunol., 114 (2004) 429-435.

11.Paula Portela C., Oliveira Massoco C., Lima W.T., Palermo-Neto J., “Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats”, Physiol. Behav. 72 (2001) 415-420.

12.Oršolić N., Josipovićand P., Bašić I., “Direct antitumor activity of honey bee venom in vivo and in vitro”, Egy. J. Nat. Toxins, 6 (2009) 1-15.

13.Rich R.R., “Clinical immunology principles and practice”, Mosby, London, (2001) chapter 2-5.

14.Mahmoud Abdu Al-Samie Mohamed A., “Studies on Bee Venom and Its Medical Uses”, IJOART., 1 (2012) 69-83.

15.Hosseinzadeh H., Shamsaie F., Mehri S., “Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of Crocus sativus L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal”, pharmaco. Magaz., 5 (2009) 419-424.

16.Oh S.R., Lee M.Y., Ahn K., Park B.Y., Kwon O.K., Joung H., Lee J., Kim D.Y., Lee S., Kim J.H., Lee H.K., “Suppressiveeffect ofverproside isolated from Pseudolysimachion longifolium on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma”, Int. Immunopharmacol. 6 (2003) 978-986.

17.Pauluhn J., “Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,40-diisocyanate (MDI): Impact of vehicle for topical induction”, Regul. Toxicol. Pharmacol., 50 (2008) 144–154.

18.Carroll N., Cooke C., James A., “The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics”, Eur. Respir. J., 10 (1997) 292-300.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]

19.Charavaryamath C., Janardhan K.S., Townsend H.G., Willson P., Singh B., “Multiple exposures to swine barn air induce lung inflammation and airway hyper-responsiveness”, Respir. Res., 6 (2005) 1-13

20.Boskabady M.H., Klahdoz G.H., “Prevalence of asthma symptoms among the adult population in the city of Mashhad (North-east of Iran)”, Respirology., 7 (2002) 267-272.

21.Al-Jawad F.H, Hashim H.M, Ismael A.H, Al-Bayati N. J. M, 2011,Role of some medicinal plants in management of chronic bronchial asthma, The New Iraqi Journal of Medicine, 8, 45-48

22.Boers J.E., Ambergen A.W., Thunnissen F.B., “Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium”, Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 157 (1998) 2000-2006.

23.Szelenyi I., “Animal models of bronchial asthma”, Inflamm. Res., 49 (2000) 639-654.

24.Sterk P.J., Bel E.M., “Bronchial hyperresponsiveness: The need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing”, Eur. Respir. J., 2 (1989) 267-274

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-15]