تأثير سم نحل العسل *Apis mellifera* في الجهاز العصبي لذكور الجرذان البالغة السليمة والمعاملة ببيروكسيد الهيدروجين

كرم هاشم الملاح† فرع الأمراض

مزاحم أيوب الصائغ قسم وقاية النبات

كلية الزراعة والغابات

جامعة الموصل

إنتصار منصور عبد الرسول فرع الفسلجة

كلية الطب البيطري

جامعة الموصل

الاستلام **2009 / 04 / 08**

القبول **2009 / 09 / 09**

Abstract

The study was designed to demonstrate the effects of honey bee (Apis mellifera) venom on the nervous system of normal and hydrogen peroxide treated male rats. Twenty four male rats were randomly divided to 4 groups, with 6 animals for each group: group 1 (control), group 2 (treated with 1% hydrogen peroxide with drinking water), group 3 (exposed to bee venom by normal stings according to 155 sting program) and group 4 (treated with hydrogen peroxide and exposed to stings). The groups treated for 49 days included 4 stinging periods, central nervous system and autonomic nervous system activities were monitored at the end of each period. The animals were sacrificed at the end of experiment period, Gross and histopathological examinations of the brain were performed. The result of the tests (moving oncet, open field, negative geotaxis) showed a significant decrease of central nervous system activities at the 3 treated groups from control with the progression of the experiment, lower levels were recorded at group 4. At the same time there were no expressional significant deferences appeared at sensomobilary stimulatory response tests including (approach, touch, sound, tail pinching) tests reflecting activity of autonomic nervous system. The histopathological examination of brain revealed pathological changes at treated groups represented by vaculation of brain nervous cells, infiltration of microgelial cells, congestion of capillaries with

lymphocytic infilteration, demylination in neuronal axons. These changes were more sever at group 4 with presence of different stages of apoptosis in some neurons at group 4. Conclusion: bee venom cannot reduce the harmful effects of hydrogen peroxide on nervous system beside that bee venom it self was harmful on the nervous system of adult male rats at the density of stings used in this study.

Key words: Bee venom, nervous system, rats.

corresponding auther; E-mail: † karamalmallah@yahoo.com

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية للتعرف على تأثير سم نحل العسل على الجهاز العصبي المركزي والذاتي لذكور الجرذان السليمة والمعاملة ببيروكسيد الهيدروجين. استخدم 24 جرذاً قسمت عشوائياً الى4 مجاميع (6/ مجموعة)، الأولى (السيطرة) والثانية عوملت ببيروكسيد الهيدروجين تركيز 1% عن طريق ماء الشرب، والثالثة لسعت بسم النحل حسب البرنامج 155 لسعة، اما المجموعة الرابعة فقد عوملت ببيروكسيد الهيدروجين 1% مع لسعها بسم النحل وبنفس البرنامج المذكور. واستمرت مدة المعاملة لهذه المجاميع لمدة 49 يوماً تضمنت 4 مدد لسع أساسية، وتم قياس نشاط الجهاز العصبي المركزي والذاتي في نهاية كل مدة لسع وتم قتل الحيوانات في نهاية التجربة وأجري عليها الفحص المرضي العياني والنسيجي للدماغ. أظهرت نتائج كل من اختبارات (بدء الحركة، الميدان المفتوح، الأنتحاء الأرضي السالب) وجود إنخفاض معنوي لنشاط الجهاز العصبي المركزي عند المجاميع الثلاث المعاملة عن مجموعة السيطرة مع تقدم مدة التجربة وصل إلى أدنى مستوياته عند المجموعة الرابعة، في حين لم تظهر نتائج اختبارات الاستجابات التحفيزية الحسية والحركية لكل من (الاقتراب، اللمس، الصوت، قرص الذيل) وجود فروق معنوية مميزة في نشاط الجهاز العصبي الذاتي بين المجاميع المختلفة مع تقدم التجربة، وأظهر الفحص المرضي النسيجي للدماغ وجود تغيرات مرضية عند المجاميع المعاملة تمثلت بتفجي الخلايا العصبية وتكاثر الدبقيات الصغيرة واحتقان الأوعية الدموية في القشرة الدماغية مع الارتشاح اللمفي، وإزالة النخاعين حول المحاور العصبية، وكانت هذه التغيرات أكثر شدة عند المجموعة الرابعة مع ظهور مراحل للموت الخلوي المبرمج في بعض الخلايا العصبية عند بعض حيوانات المجموعة الرابعة. لقد تم استنتاج أن سم النحل لا يحد من تأثير بيروكسيد الهيدروجين على الجهاز العصبي وأن له تأثيراً ضاراً على الجهاز العصبي لذكور الجرذان السليمة عند كثافة اللسع المستخدمة في هذه الدراسة.

المقدمة

ينتمي نحل العسل Apis mellifera *L.* إلى مجموعة الحشرات اللاسعة من عائلة النحل رتبة غشائية الاجنحة (Hymenoptera: Apidae) والتي وصفها المصريون القدماء بكونها تحمل سماً مؤذياً للفقريات، وهم أول من سجل تأريخيا حالات لموت الإنسان بسبب لسع النحل(1). لقد وصف بعض الباحثين سم نحل العسل بأنه ذو سمية عصبية Neurotoxic (2). وسجل باحثون آخرون حالات لإلتهاب الدماغ نتيجة لسعات النحل المتعددة لأطفال تحت السنتين من العمر (3). إلا أن بعض الباحثين والمعالجين لاحظوا أن هناك قيمة علاجية لسم نحل العسل في علاج بعض أمراض الجهاز العصبي كحالات التصلب المتعدد Multiple sclerosisوالشقيقة Migrains في الإنسان واقترحوا استعماله بديلاً عن بعض الأدوية (4). وذكر باحثون آخرون أن قابلية سم نحل العسل المضادة للالتهاب والمثبطة للدبقيات الصغيرة في الدماغ يمكن أن توقف أو تحد من تطور التغيرات التنكسية العصبية المترافقة أو المعتمدة على تحفيز الدبقيات الصغيرة (5). لقد عرف أيضاً عن سم النحل قابليته على تسدير الآلام الموضعية بسبب احتوائه على متعدد الببتيد Adolapin (6)، وبالأخص الآلام الناتجة من التهاب المفاصل (7) على الرغم من كونه يحدث ألماً مؤقتاً في مكان اللسع بفعل متعدد الببتيد Melittin (8)، ولاحظ الباحثون أن حقن سم نحل العسل يحدث تغيرات هورمونية جهازية إذ أنه يزيد من تحرير هورمون الستيرويد القشري من الغدة الكضرية (9)، ويزيد من تحرير الهستامين من الخلايا البدينة (10) فضلاً عن احتوائه على الكاتيكولامينات كالدوبامين والنورأدرينالين (11)، وكذلك أحتوائه على متعدد الببتيد Apamin(12)، وجميع هذه المركبات معروفة بتأثيرها على الجهاز العصبي. كما أشارت بعض المصادر بأن الميليتين الذي يشكل حوالي 52% من متعددات الببتيد في سم النحل يمكن أن يلعب دوراً مضاداً للأكسدة النسيجية (13). ولذلك فقد صممت دراستنا الحالية لمعرفة تأثير سم نحل العسل باللسع المباشر في الجرذان السليمة والمعاملة ببيروكسيد الهيدروجين على الجهاز العصبي المركزي والذاتي بالاعتماد على بعض الصفات الفسلجية والفحوصات المرضية العيانية والنسيجية للدماغ.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المستخدمة:

استخدم في هذا البحث 24 من ذكور الجرذان البيض Albino Rats تراوحت أوزانها (200_230) غم والتي تمت تربيتها وتكاثرها في بيت الحيوانات في كلية الطب البيطري وأخذ الجيل الثاني منها بصورة نقية. تراوحت أعمارها مابين 4_5 أشهر، وضعت

هذه الحيوانات في أقفاص ذات أبعاد (20×25 ×20)سـم. وأخـضعت الجـرذان لظـروف مختبرية خاصة تمثلت بدورة ضوئية طبيعية 10 ساعات إضاءة و14 ساعة ظـلام وبدرجـة حرارة 22 +2 مº. وأعطيت الجرذان الماء والعليقة بصورة حرة *Adlibitum*.

النحل وطريقة اللسع:

تم التقاط شغالات نحل العسل البالغة (Hony bee workers) من طوائف نحل قوية وجمعت في قنان بلاستيكية شفافة ذات أغطية مثقوبة حفاظاً على الشغالات من الموت، حلقت المنطقة الظهرية للجرذان من الشعر وصولاً إلى الجلد، لسعت الجرذان في المنطقة المحـددة بالتقاط النحلة بملقط خاص إذ تم غرس شوكة النحلة وتركت لمدة 5 دقائق لتفريـغ محتويـات غدة السم ثم أزيلت.

برنامج اللسع والقياسات العصبية:

اعتمد برنامج اللسع وفقا للحلوجي (13) والذي يتـضمن 155 لـسعة نحـل، تـضمن البرنامج خمس أيام لسع أبتداء بلسعة في اليوم الأول ووصولاً إلى خمـسة لـسعات فـي اليـوم الخامس ويكون مجموع ما تلقاه خلال هذه المدة 15 لسعة، أعطيت الحيوانـات اسـتراحة لمـدة يومين تهيئة للمدة الثانية التي تلقى فيها الحيوان 40 لسعة نحل خلال مدة 8 أيام أي بمعدل خمسة لسعات يومياً، أعطيت الحيوانات استراحة لمدة 7 أيام تهيئة للمدة الثالثة من برنامج اللسع الـذي يتضمن 50 لسعة نحل خلال مدة عشرة أيام (5 لسعات يومياً). أعطيت الحيوانات استراحة لمدة أسبوع لتطبيق المدة الرابعة للسع والتي تتضمن 50 لسعة نحل لمدة عشرة أيام فأصبح مجموع ما تلقاه كل حيوان 155 لسعة خلال مدة التجربة البالغة 49 يوماً، تم خلالها قياس نـشاط الجهـاز العصبي المركزي من خلال الاختبارات السلوكية العصبية والتي تضمنت أ- اختبار بدء الحركة (14). ب- اختبار النشاط الحركي داخل الميدان المفتوح والذي شمل قياس عدد المربعات التـي يجتازها الجرذ وعدد مرات الوقوف في 3 دقائق (14). ج- اختبار الأنتحاء الأرضـي الـسالب (15). وتم أيضاً قياس نشاط الجهاز العصبي الذاتي من خلال إجـراء اختبـارات الاسـتجابات التحفيزية الحسية والحركية والتي تضمنت أ- اختبار الاستجابة التحفيزية للاقتراب، ب- اختبار الاستجابة التحفيزية للمس، ج- اختبار الاستجابة التحفيزيـة للـصوت، د- اختبـار الاسـتجابة التحفيزية لقرص الذيل. (15). وتم أخذ جميع هذه القياسات في اليوم الأخير من كل من أوقـات اللسع الأربعة.

الفحص المرضي العياني والنسيجي:

عند نهاية مدة التجربة تمت التضحية بالحيوانات باستخدام الأيثر وتـم إجـراء الـصفة التشريحية وفحص الدماغ عيانياً ثم أخذت أجزاء منه حفظت في محلـول الفورمـالين الـدارئ

المتعادل 10% ثم تم تمرير العينات بالكحولات وشمع البارافين وصبها وتقطيعها وصبغها بالاعتماد على طريقة Luna (16). وفحصت الشرائح نسيجياً بالمجهر الضوئي وتم تصويرها باستخدام الكاميرا الرقمية.

تصميم التجربة

أجريت التجربة على 24 حيواناً من ذكور الجرذان البيض البالغة، قسمت عشوائياً بعد وزنها إلى 4 مجاميع وكل مجموعة تتكون من 6 حيوانات. المجموعة الأولى عدت مجموعة سيطرة تم وخزها باستخدام رأس دبوس بنفس عدد واوقات اللسعات والمجموعة الثانية أعطيت بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 1% عن طريق ماء الشرب لمدة 49 يوماً ووخزها برأس دبوس بنفس عدد وأوقات اللسعات والمجموعة والمجموعة الثالثة لسعت بسم النحل حسب البرنامج المذكور أعلاه أما المجموعة الأخيرة فقد أعطي لها بيروكسيد الهيدروجين 1% عن طريق ماء الشرب مع لسعها بسم النحل حسب البرنامج أعلاه.

التحليل الاحصائي

حللت البيانات المعلمية parametric باستخدام تحليل التباين باتجاه واحد او باتجاهين one or two way analysis of variance وحددت الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن (Duncan test). وكان مستوى الاختلاف المعنوي للاختبارات كافة عند مستوى احتمالية (أ $\leq$ 0.05) (17). أما البيانات غير المعلمية فقد تم تطبيق اختبار مان وتني Mann-Witney-U-test على البيانات التي كانت بشكل مراتب رقمية Scores. (18).

النتائج

أ- نشاط الجهاز العصبي المركزي:

1) <u>اختبار بدء الحركة</u>:

أظهرت نتائج اختبار بدء الحركة تفوق المجاميع المعاملة الثلاث معنوياً عن مجموعة السيطرة عند نهاية الفترتين الأولى والثانية بينما لوحظ تفوق المجموعتين الثانية والرابعة عن مجموعة السيطرة وعدم اختلافهما عن المجموعة الثالثة معنوياً عند نهاية المدة الثالثة. وعند نهاية المدة الرابعة تفوقت المجموعة الرابعة معنوياً عن مجموعة السيطرة. أما ضمن المجموعة الواحدة فلم يلاحظ وجود فروق معنوية بين الفترات المختلفة لكافة مجاميع التجربة عدا وجود تفوق معنوي لمعدل المدة الأولى عن الثالثة عند المجموعة الثالثة. جدول (1).

جدول (1): يوضح نتائج اختبار بدء الحركة

الفترات / المجاميع	المدة الأولى	المدة الثانية	المدة الثالثة	المدة الرابعة
الأولى (السيطرة)	0.3±2.0 ج د	0.2±1.8 د	0.2±1.8 د	0.3±2.0 ج د
الثانية (بيروكسيد الهيدروجين)	0.3±3.8 أ ب	0.6±3.6 أ ب	0.5±3.8 أ ب	0.3±3.0 أ ب ج د
الثالثة (اللسع)	0.4±4.0 أ	0.3±3.8 أ ب	0.2±2.6 ب ج د	0.3±3.0 أ ب ج د
الرابعة (اللسع+بيروكسيد الهيدروجين)	0.5±4.2 أ	0.3±3.2 أ ب ج	0.3±3.2 أ ب ج	0.3±3.8 أ ب

عدد الحيوانات لكل مجموعة = 5
القيم معبر عنها بالمعدل (ثانية) ± الخطأ القياسي.
الأحرف المختلفة أفقياً وعمودياً تعني فرقاً معنوياً عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$).

2) اختبار الميدان المفتوح (عدد المربعات المقطوعة في 3 دقائق):

أظهرت نتائج اختبار الميدان الفتوح (عدد المربعات المقطوعة في 3 دقائق) وجود انخفاض معنوي لمعدلات المجموعتين الثانية والثالثة عن مجموعة السيطرة وانخفاض لمعدل المجموعة الثانية عن الرابعة عند نهاية المدة الأولى وكذلك لوحظ وجود إنخفاض لمعدلات المجموعتين الثانية والرابعة عن السيطرة والرابعة عن الثالثة عند نهاية المدة الثانية، ولوحظ انخفاض معدلات المجاميع الثلاث المعاملة عن مجموعة السيطرة بدون أن تختلف بينها معنوياً عند الفترتين الثالثة والرابعة. أما ضمن المجموعة الواحدة فقد لوحظ انخفاض معدل المدة الرابعة عن المدة الثانية عند المجموعة الثانية وانخفاض معدلي الفترتين الثالثة والرابعة عن الأولى والثانية عند المجموعة الثالثة، بينما لوحظ انخفاض معدلات الفترات الثانية والثالثة والرابعة عن المدة الأولى عند المجموعة الرابعة. جدول (2).

جدول (2): يوضح نتائج اختبار الميدان المفتوح (عدد المربعات المقطوعة في 3 دقائق)

الفترات / المجاميع	المدة الأولى	المدة الثانية	المدة الثالثة	المدة الرابعة
الأولى (السيطرة)	3.0±41.0 أ ب	3.9±39.8 أ ب	2.8±43.8 أ	2.7±39.4 أ ب
الثانية (بيروكسيد الهيدروجين)	3.9±22.0 د هـ و	1.5±24.8 ج د هـ	0.6±18.6 هـ و	2.6±13.6 و س
الثالثة (اللسع)	1.8±26.0 ج د هـ	4.9±32.0 ب ج د	3.5±11.6 و س	2.0±8.0 س
الرابعة (اللسع+بيروكسيد الهيدروجين)	5.5±34.6 أ ب ج	4.3±21.6 هـ و	2.3±17.4 هـ و س	1.9±17.6 هـ و س

عدد الحيوانات لكل مجموعة = 5
القيم معبر عنها بالمعدل (مربع/ 3 دقائق) ± الخطأ القياسي.
الأحرف المختلفة أفقياً وعمودياً تعني فرقاً معنوياً عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$).

3) اختبار الميدان المفتوح (عدد مرات الوقوف في 3 دقائق):

لوحظ من نتائج اختبار عدد مرات الوقوف في 3 دقائق وجـود انخفـاض معنـوي لمعدلات المجاميع المعاملة كافة عن معدل السيطرة وعند كل فترات التجربة بـدون وجـود فروق معنوية فيما بينها عند الفترتين الأولى والثانية، بينما انخفضت معـدلات المجمـوعتين الثالثة والرابعة عن المجموعة الثانية عند الفترتين الثالثة والرابعة.

وضمن المجموعة الواحدة لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين الفترات المختلفـة عنـد المجموعة الثانية ولكن لوحظ انخفاض معنوي لمعدلات الفترتين الثالثة والرابعة عن الفتـرتين الأولى والثانية عند المجموعة الثالثة وأنخفض معدلا الفترتين الثالثة والرابعة عن المدة الأولى مع انخفاض معدل المدة الثالثة معنوياً عن المدة الثانية عند المجموعة الرابعة. جدول (3).

جدول (3): يوضح نتائج اختبار الميدان المفتوح (عدد مرات الوقوف في 3 دقائق)

الفترات / المجاميع	المدة الأولى	المدة الثانية	المدة الثالثة	المدة الرابعة
الأولى (السيطرة)	0.6±9.8 أ	0.5±10.4 أ	0.9±10.4 أ	0.3±9.8 أ
الثانية (بيروكسيد الهيدروجين)	0.3±5.2 ب	0.8±5.8 ب	0.9±3.8 ب ج	0.6±4.4 ب
الثالثة (اللسع)	1.3±5.8 ب	0.8±4.0 ب ج	0.3±0.8 د	0.6±1.0 د
الرابعة (اللسع+بيروكسيد الهيدروجين)	0.8±4.8 ب	1.2±3.6 ب ج	0.5±1.2 د	0.8±1.6 ج د

عدد الحيوانات لكل مجموعة = 5

القيم معبر عنها بالمعدل (وقفة/ 3 دقائق) ± الخطأ القياسي.

الأحرف المختلفة أفقياً وعمودياً تعني فرقاً معنوياً عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$).

4) اختبار الانتحاء الأرضي السالب:

أوضحت نتائج اختبار الانتحاء الأرضي السالب وجـود تفـوق معنـوي لمعـدلات المجموعتين الثانية والرابعة عن معدل مجموعة السيطرة مع تفوق المجموعة الرابعة معنويـاً عن المجموعة الثالثة عند نهاية المدة الأولى، كما لوحظ تفوق المجاميع المعاملة الثلاث معنوياً عن مجموعة السيطرة وبدون فوارق معنوية بينهم عند نهاية المدة الثانيـة، وكـذلك تفـوق

المجموعتين الثانية والثالثة عن مجموعة السيطرة عند نهاية المدة الثالثة، وعند المدة الرابعة لوحظ تفوق المجموعة الثالثة فقط معنوياً عن مجموعة السيطرة.

أما ضمن المجموعة الواحدة فلم يلاحظ وجود فوارق معنوية بين الفترات المختلفة لكافة المجاميع عدا المجموعة الرابعة التي أظهرت تفوقاً معنوياً لمعدل المدة الأولى عن المدة الثالثة من التجربة. جدول (4).

جدول (4): يوضح نتائج اختبار الانتحاء الأرضي السالب

الفترات / المجاميع	المدة الأولى	المدة الثانية	المدة الثالثة	المدة الرابعة
الأولى (السيطرة)	0.5±4.2 د	0.5±4.2 د	0.8±4.4 د	0.3±5.2 ج د
الثانية (بيروكسيد الهيدروجين)	0.5±8.6 أ ب	0.8±7.6 أ ب ج	0.6±7.6 أ ب ج	0.7±7.8 أ ب ج
الثالثة (اللسع)	1.2±5.8 ب ج د	0.9±7.4 أ ب ج	0.8±7.6 أ ب ج	0.5±8.6 أ ب
الرابعة (اللسع+بيروكسيد الهيدروجين)	1.3±9.0 أ	1.0±8.6 أ ب	0.9±6.0 ب ج د	0.9±8.0 أ ب ج

عدد الحيوانات لكل مجموعة = 5

القيم معبر عنها بالمعدل (ثانية) ± الخطأ القياسي.

الأحرف المختلفة أفقياً وعمودياً تعني فرقاً معنوياً عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$).

ب- نشاط الجهاز العصبي الذاتي (اختبارات الاستجابات التحفيزية الحسية والحركية):

لم تشر نتائج اختبارات الاستجابات التحفيزية الحسية والحركية المتضمنة كل من اختبارات (الاقتراب، اللمس، الصوت، قرص الذيل) إلى وجود فروق معنوية في الاستجابات عند المجاميع الثلاث المعاملة مقارنة بالسيطرة طيلة مدة التجربة، باستثناء وجود ارتفاع معنوي في مراتب الاستجابة لقرص الذيل في المجموعة الثالثة عند الفترتين الأولى والثانية وكذلك في المجموعة الثانية عند المدة الثالثة، مع وجود ارتفاع معنوي في مراتب الاستجابة للمس في المجموعتين الثانية والرابعة عند نهاية المدة الثانية للسع. جدول (5).

جدول (5): يوضح نتائج اختبارات الاستجابات التحفيزية الحسية والحركية

المجموعة	المدة	الاختبار			
		الاقتراب	اللمس	الصوت	فرص الذيل
الأولى السيطرة	الأولى	0.0±2.0	0.0±2.0	0.0±3.0	0.0±2.0
الثانية البيروكسيد	الأولى	0.5±1.6	1.0±3.0	0.0±3.0	0.4±1.8
الثالثة اللسع	الأولى	0.4±1.8	1.2±2.0	0.8±2.8	*1.0±3.2
الرابعة اللسع+بيروكسيد	الأولى	0.4±1.8	0.4±1.8	0.5±2.6	0.8±2.6
الأولى السيطرة	الثانية	0.4±1.8	0.0±2.0	0.0±3.0	0.0±2.0
الثانية البيروكسيد	الثانية	0.5±1.4	*1.0±3.2	0.0±3.0	0.0±2.0
الثالثة اللسع	الثانية	0.0±2.0	0.5±2.4	0.5±3.4	*1.0±3.2
الرابعة اللسع+بيروكسيد	الثانية	0.4±1.8	*0.5±1.4	0.8±2.6	0.4±1.8
الأولى السيطرة	الثالثة	0.4±1.8	0.4±1.8	0.4±2.8	0.0±2.0
الثانية البيروكسيد	الثالثة	0.5±1.4	0.5±1.4	0.4±2.8	*0.5±1.4
الثالثة اللسع	الثالثة	0.4±1.2	0.5±1.4	1.0±2.0	0.0±2.0
الرابعة اللسع+بيروكسيد	الثالثة	0.4±1.8	0.4±1.8	0.8±2.6	0.4±1.8
الأولى السيطرة	الرابعة	0.4±1.8	0.4±1.8	0.8±2.6	0.0±2.0
الثانية البيروكسيد	الرابعة	0.4±1.2	0.5±1.6	0.8±2.6	0.5±1.6
الثالثة اللسع	الرابعة	0.5±1.4	0.5±1.4	0.8±2.2	1.3±2.6
الرابعة اللسع+بيروكسيد	الرابعة	0.4±1.8	0.5±1.6	0.8±2.6	0.4±1.8

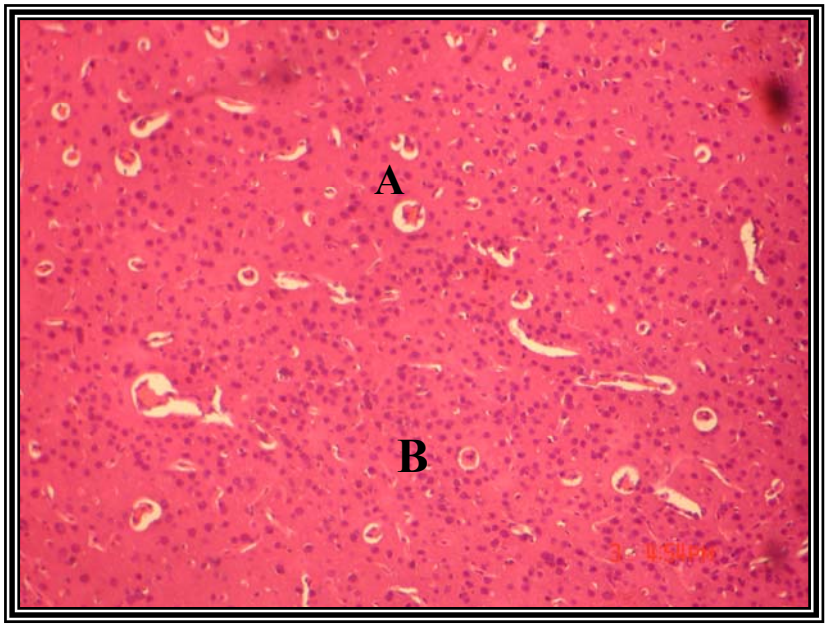
عدد الحيوانات لكل مجموعة = 5

القيم معبر عنها بالمعدل (مرتبة) ± الانحراف القياسي.

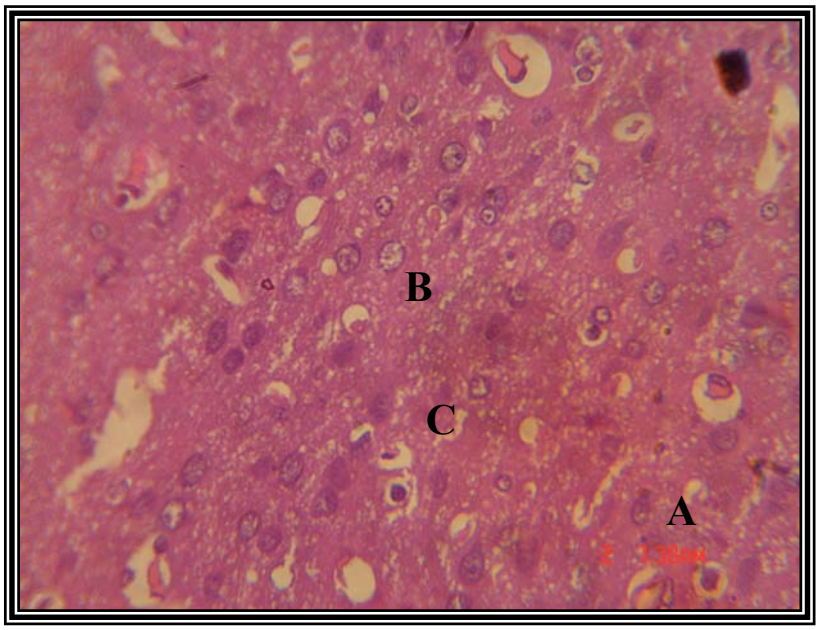
تتم المقارنة بين السيطرة وكل مجموعة على حدة، العلامة *تعني فرقاً معنوياً عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$).

ج- الفحص المرضي العياني والنسيجي:

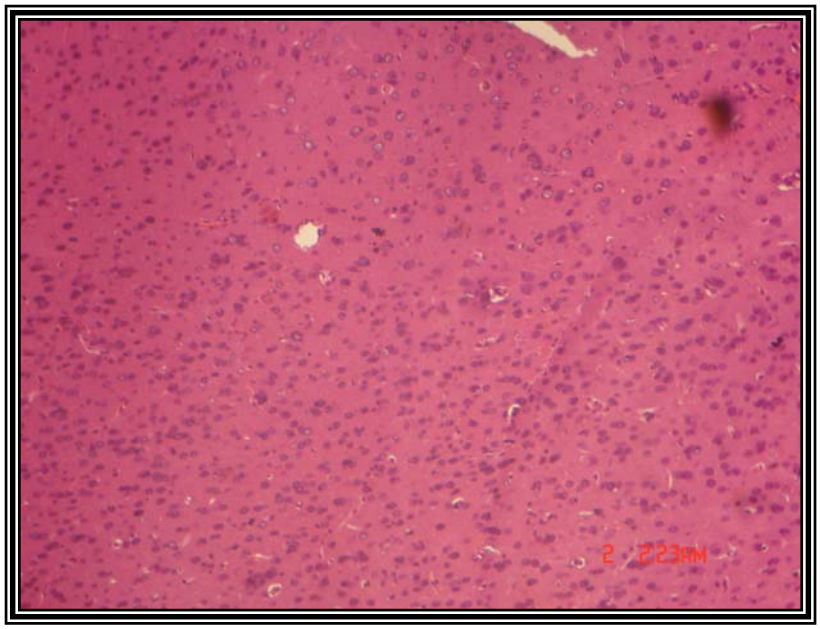
أظهر الفحص المرضي العياني للدماغ إحتقانات متفاوتة الشدة للأوعية الدموية الدماغية عند المجاميع المعاملة الثلاث مقارنة بمجموعة السيطرة كانت أشدها عند المجموعة الرابعة (اللسع + بيروكسيد الهيدروجين). بينما أظهر الفحص المرضي النسيجي للدماغ وجود تغيرات مميزة للمجاميع المعاملة عن مجموعة السيطرة إذ لوحظ احتقان الأوعية الدموية وتفجي الخلايا العصبية وزوال النخاعين حول المحاور العصبية عند المجاميع المعاملة تراوحت من طفيفة إلى متوسطة عند حيوانات المجموعتين الثانية والثالثة وشديدة عند المجموعة الرابعة. الصور (1،2)، مع ارتشاح وتكاثر للدبقيات الصغيرة في المتن الدماغي وخاصة في القشرة الدماغية لوحظت عند المجاميع المعاملة الثلاث وأكثر شدة عند المجموعتين الثالثة والرابعة. صورة (3)، ترافق معها إرتشاح للخلايا اللمفية حول الأوعية الدموية عند 3 حيوانات من المجموعة الرابعة وحيوان واحد من المجموعة الثالثة مع تكاثر كثيف للدبقيات الصغيرة. الصور (4،5). وكذلك لوحظ إحتقان الظفائر المشيمية الدماغية عند المجاميع الثلاث المعاملة وفرط التنسج للظفائر المشيمية الدماغية عند 3 حيوانات من المجموعة الرابعة. صورة (6)، كما لوحظت مراحل من موت الخلايا المبرمج Apoptosis لبعض الخلايا العصبية عند المجموعة الرابعة.



صورة (1): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الرابعة (اللسع + بيروكسيد الهيدروجين) توضح التفجي الشديد للخلايا العصبية (A)، وتكاثر الدبقيات الصغيرة في المتن الدماغي (B).
الصبغة H&E قوة التكبير X 68.

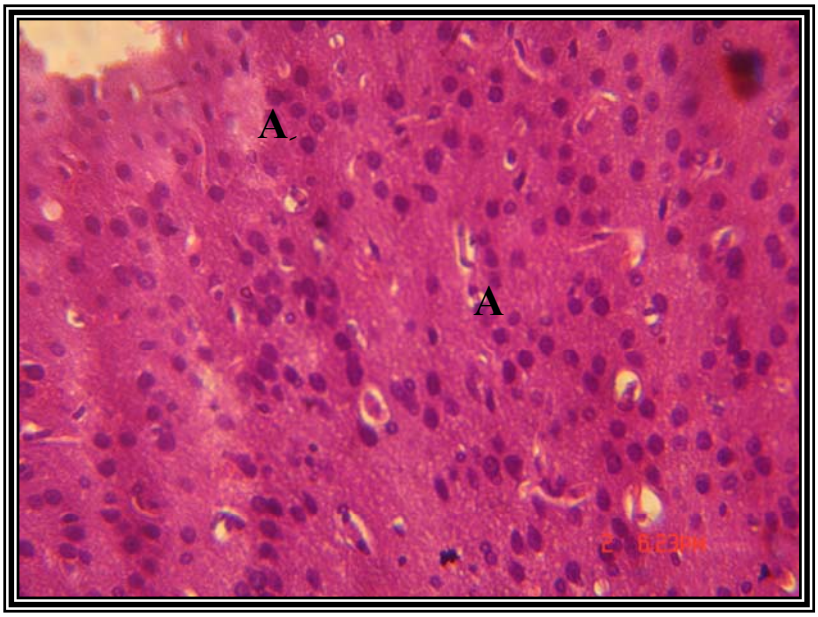


صورة (2): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الرابعة (اللسع + بيروكسيد الهيدروجين) توضح التفجي الشديد للخلايا العصبية (A)، وتكاثر الدبقيات الصغيرة (B)، وإزالة النخاعين من المحاور العصبية (C). الصبغة H&E قوة التكبير. X 560 .

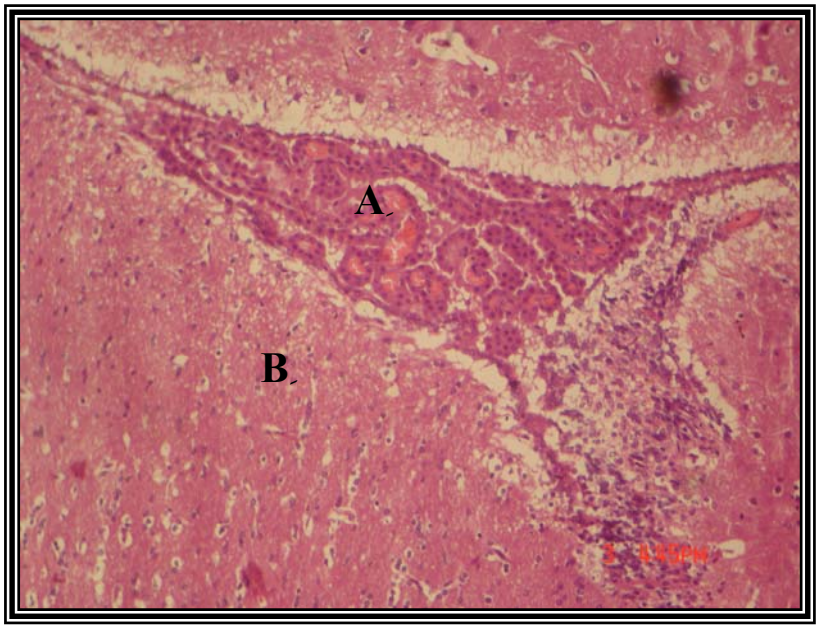


صورة (3): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الرابعة (اللسع + بيروكسيد الهيدروجين) توضح الارتشاح والتكاثر الشديد للدبقيات الصغيرة في الدماغ (A). الصبغة H&E قوة التكبير100 X.

صورة (4): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الرابعة (اللسع + بيروكسيد الهيدروجين) توضح احتقان الأوعية الدموية (A) وارتشاح الخلايا اللمفية حول الأوعية الدموية في القشرة الدماغية (B). الصبغة H&E قوة التكبير165 X.



صورة (5): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الثانية يوضح تكاثر الدبقيات الصغيرة في المتن الدماغي (A). الصبغة H&E قوة التكبير 370 X.



صورة (6): مقطع في الدماغ لجرذ من المجموعة الرابعة يوضح احتقان وفرط تنسج الضفائر المشيمية الدماغية (A)، وتفجي الخلايا العصبية (B). الصبغة H&E قوة التكبير X .165

المناقشة

لقد أظهرت نتائج الدراسة وجود إنخفاض معنوي لنشاط الجهاز العـصبي المركـزي تمثل بزيادة في الوقت اللازم لبدء الحركة وإنخفاض في عدد المربعات وعدد مرات الوقـوف في 3 دقائق وزيادة في وقت الاستجابة للانتحاء الأرضي الـسالب عنـد المجـاميع الـثلاث المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة ولمعظم فترات التجربة وكانت هذه التأثيرات أكثـر شـدة عند المجموعة الرابعة (بيروكسيد الهيدروجين + اللسع)، لقد أيـد ذلـك ظهـور التغيـرات المرضية النسيجية في الدماغ عند المجاميع المعاملة تميزت باحتقان الأوعية الدموية وتفجـي الخلايا العصبية وتكاثر الدبقيات الصغيرة والارتشاحات اللمفية وزوال النخاعين حول المحاور العصبية وكانت هذه التغيرات أكثر شدة عند المجموعة الرابعة إذ تميزت بظهور موت الخلايا المبرمج وفرط تنسج الضفائر المشيمية. إن ظهور هذه التغيرات في الاختبـارات الـسلوكية العصبية والنسيجية عند الحيوانات المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين ربما يعـود إلـى إحـداث الجهد التأكسدي ومن ثم التغيرات التنكسية العصبية، إذ ذكر الباحثون (20،19) أن العوامـل المؤكسدة والمنتجة للجذور الحرة كبيروكسيد الهيدروجين تلعب دوراً أساسياً في إحداث تنكس الأعصاب الإنتقائي في حالة التصلب الضموري الوحشيAmyotrophic lateral sclerosis وتنكس الأعصاب الأدرينالية أو الدوباميني‌ةDopaminergic neurons في مرض باركنسون Parkinsons disease في الإنسان. وذكـر البـاحثون (21) إن الجـذور الحـرة Free

radicals هي العامل الأساسي في إحداث الأذى العصبي ويمكن تقليل تأثيرها باستخدام مضادات الأكسدة. لقد أشار الباحثون (22،23) بأن إضافة بيروكسيد الهيدروجين إلى زرع مختبري للخلايا العصبية يؤدي إلى ظهور موت الخلايا المبرمج Apoptpsis في هذه الخلايا وأن ذلك يعتمد على المدة الزمنية والتركيز المضاف. وأكد الباحثون (22) ظهور تغيرات مثل أنكماش النواة Apoptic nuclear shrinkage وتكثف الكروماتين Chromatin condensation وانتفاخ العضيات النخري Necrotic swelling of organells وهي التغيرات الخاصة بالموت المبرمج في خلايا الأعصاب الحسية بعد إضافة بيروكسيد الهيدروجين. إن كل من (22،23) لم يؤكد معرفة الآلية الجزيئية الدقيقة لحدوث الموت المبرمج بسبب بيروكسيد الهيدروجين فقد أقترح الباحثون (22) أن ذلك يحدث بسبب التكسرات في ال DNA بفعل الجذور الحرة. في حين وجد الباحثون (23) أن بيروكسيد الهيدروجين يحفز وبسرعة أنزيمات Mitogen activated protein kinases (MAPK) والتي تشمل Extracellular signal regulated kinases 1/2 (ERK1/2)، C-Jun-N-Terminal-kinase (JNK) و P38 ، فضلاً عن ان إلى أن أصناف الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) الناتجة من بيروكسيد الهيدروجين تثبط أنزيمات Serine/therionin protein phosphatases 2A وأن هاتين العمليتين هي التي تؤدي إلى موت الخلية المبرمج وأن إضافة كاسحات الجذور الحرة مثل N-acetyl-L-cysteine توقف تحفيز ال (MAPK) ومن ثم توقف موت الخلية. ووجد الباحثون (24) أن إضافة بيروكسيد الهيدروجين يزيد من فسفرة عامل النسخ Transcription factor وعامل النواة Kappa B (NF- Kappa B) ويغير من مواقعها الطبيعية حول النواة في الخلايا العصبية لورم Neuroblastoma وأن ذلك يختزل وبشدة حيوية Viability الخلايا العصبية وهذا يتفق مع ما لوحظ في دراستنا الحالية من إنخفاض لنشاط الجهاز العصبي المركزي والتغيرات المرضية النسيجية عند المجاميع المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين.

إن التغيرات في الاختبارات السلوكية العصبية عند المجموعة المعاملة بسم نحل العسل قد تكون بسبب الألم الموضعي نتيجة اللسع إذ ذكر الباحثون (25) بأن الميليتين وهو متعدد الببتيد الأساسي في سم النحل يحدث ألماً موضعياً عند حقنه في الجلد عند الإنسان. وذكر الباحثون (26) أن حقن جرذ بالغ في راحة قدمها الخلفية بالميليتين يظهر سلوكاً مختلفاً من إذ الاستجابة التحفيزية للقرون الظهرية الشوكية وكذلك سلوك تحمل الألم المحدث بالقرص Behavioral flinching reflex وهو يشابه ما لوحظ في دراستنا الحالية من تفوق مراتب الاستجابة لقرص الذيل عند مجموعة اللسع في نهاية الفترتين الأولى والثانية من اللسع. وكذلك فأن انخفاض نشاط الجهاز العصبي المركزي قد يكون بسبب تأثيرات جهازية عصبية

لبعض مكونات سم النحل فقد ذكر الباحثون (27) أن حقن الأبامين وهو أحد متعددات الببتيد لسم نحل العسل في البطين الوحشي لدماغ الجرذان يخفض من قدرة الجرذان على التوازن. وإن ظهور التغيرات المرضية النسجية في الدماغ عند المجموعة المعاملة بسم النحل على الجهاز العصبي يظهر تأثيراً سلبياً لسم النحل على الجهاز العصبي. وهذا يتفق مع ما ذكره (2) أن سم نحل العسل له سمية عصبية Neurotoxic. ولم يتم العثور على الألية التي يحدث سم النحل بواسطتها هذه التغيرات في النسيج العصبي، ولكن يمكن تفسير بعض التغيرات النسيجية حسب الفعالية الجزيئية لبعض مركبات سم نحل العسل، فقد وجد الباحثون (10) أن متعددي الببتيد الأبامين Apamin والسيكابين Secapin والذي يعرف ببتيد الأفراز من الخلايا البدينة Mast cell degranulation peptide يسبب إفراز الهستامين من الخلايا البدينة، والذي يعمل بدوره على توسيع الأوعية الدموية الشعرية ومن ثم إحداث فرط الدم وارتشاحات خلايا الدم البيض في الأنسجة (28). وكذلك فأن احتواء نحل العسل على أنزيم الفوسفولايبيز A2 Phospholipase A2 قد يسبب التغيرات التنكسية في الخلايا العصبية إذ ذكر الباحثون (29) أن بعض أصناف الفوسفولايبيز A2 (SPLA2-II A) تسبب التغيرات التنكسية وموت الخلايا المبرمج من خلال ارتباطها بزيادة أنتاج مؤيضات ال Arachedonic acid مثل البروستاكلاندين وهذا ربما يفسر ظهور التغيرات التنكسية في الخلايا العصبية كالتفجي وزوال النخاعين حول المحاور العصبية. لقد ذكر الباحثون (30) أن زيادة تركيز أيون الكالسيوم في سايتوبلازم الخلية العصبية يعتقد بكونه الآلية الأساسية في إحداث السمية العصبية في الأمراض التنكسية المرتبطة بتغير أشكال البروتينات في الغشاء الخلوي. ولذلك فأن الميليتين ربما يلعب دوراً في إحداث التغيرات التنكسية، إذ ذكر الباحثون (31) أن الميليتين يزيد من تركيز أيون الكالسيوم في سايتوبلازم الخلايا العدلة عند إضافته للزرع الخلوي. إن هذه الآليات الجزيئية لبعض مركبات سم نحل العسل ربما تفسر إحداثه للتغيرات المرضية النسيجية الملاحظة عند المجموعة المعرضة للسع.

لقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية أن أشد التغيرات في الاختبارات السلوكية العصبية والمرضية النسيجية لوحظت عند المجموعة الرابعة المعرضة لبيروكسيد الهيدروجين وسم النحل. إن ذلك يمكن أن يعزى إلى أنه نوع من التآزر بين التأثيرين السلبيين في ضوء ما لوحظ من نتائج كل من مجموعة بيروكسيد الهيدروجين ومجموعة اللسع كل على حدة فقد وجد الباحثون (32) أن الدوبامين Dopamine يحدث موت الخلية العصبية المبرمج في الخلايا العصبية المبرمج في المزارع الخلوية وأن هذا التأثير يزداد عند إحداث الجهد التأكسدي بإضافة بيروكسيد الهيدروجين بينما يمكن منع هذه التأثيرات عند إضافة مضادات الأكسدة كحامض الأسكوربيك Ascorbic acid والكلوتاثايون Glutathione. إن ذلك يمكن

افتراضه كأحد الآليات المحتملة لإحداث الضرر النسيجي العصبي الأكثر شدة بتوفر الدوبامين من سم النحل مع الأجهاد التأكسدي المحدث ببيروكسيد الهيدروجين عند المجموعة الرابعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع سم النحل في دراستنا الحالية فضلاً عن آليات محتملة أخرى غير معروفة في الوقت الحالي. إن هذه النتائج لا تتفق مع ما تم افتراضه من الباحثين (13) حول ألية الميليتين المضادة للأكسدة أو المضادة لتكوين الجذور الحرة أو بأفتراض أن الميليتين يحفز إفراز هورمون الستيرويد القشري والذي يثبط أنزيم الفوسفولايبيز A2 ويثبط تحرير الأركيدونيك ومن ثم التقليل من النواقل الالتهابية كالبروستاكلاندين والأنترلوكين -1 بيتا وعامل نخر الورم TNF- α (33) والتي تؤدي بالنهاية الى التقليل من إنتاج الجذور الحرة لدى خلايا الدم البيض متعددة أشكال النوى Polymorph nuclear cells PMN (28). وإن هذا الاختلاف يمكن أن ينتج من اختلاف الجرع وكثافة اللسع المستخدمة في الدراسات المختلفة.

شكر وتقدير: يتقدم الباحثون بالشكر والتقدير لعمادة كلية الطب البيطري وإدارة بيت الحيوانات في الكلية على مساعدتهم القيمة في إجراء هذه الدراسة.

المصادر

1) Cohen S.G., Bianchine P.J. Hymenoptra. Hypersensitivity and history: A prologue to current day concepts and practices in the diagnosis treatment and prevention of insect sting allergy. Ann. Allergy. Asthma. Immunol. 74: 198-217 (1995).
2) Blum M.S. Chemical defenses in arthropods. Academic Press. New york: 562 (1981).
3) Paramanik, S. and Barnerjee, S. Hymenoptera stings with multisystem dysfunction. Indian Pediater. 44: 788-790 (2007).
4) http://www.arthritis-ms.com/FAQ.htm
5) Moon, D.O., Park, S.Y., Lee, K.J., Heo. M.S., Kim, K.C., Kim, M.O., Lee, J.D., Choi, Y.H. and Kim, G.Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide stimulated BV2 microgelia. Int. Immunopharmacol. 7: 1092-1101 (2007).
6) Skenderov, S. and Koburova,K. Adolapin-A newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide frome bee venom. Toxicon. 20: 317-321 (1982).
7) Kwon, Y.B., Kim, J.H., Yoon, J.H., Lee, J.D., Han, Mar, W.C., Beitz, A.J. and Lee, J.H. The Analgesic efficacy of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis: a comparative study with needle acupuncture. Am. J. Med.29:187-199 (2001).

8) Li, K.C. and Chen, J. Alterd pain-related behaviors and spinal neuronal responses produced by S.C. injection of milittin in rats. Neuroscience. 126:753-762 (2004).

9) Couch, T.L. and Benton, A.W. The effect of the venom of the honey bee, Apis mellifera L., on the adrenocortical response of the adult male rat. Toxicon. 10: 55-62 (1972).

10) Dotimas, E.M., Hamid, K.R., Hider, R.C. and Ragnarsson, U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. Biochimica. et. Biophysica. Acta –protein structure and molecular enzymology. 911: 285-293 (1987).

11) Habermann, E. and Horvath, E. Localization and effects of apamin after application to the central nervous system. Toxicon. 18: 549-560 (1980).

12) Owen, M.D. and Bridges, A.R. Catecholamines in honey bee (Apis mellifera L.) and various vespid (Hymenoptera) venoms. Toxicon. 20: 1075-1084 (1982).

13) رقية محمد الحلوجي. العلاج بلسع النحل. مطابع دار المـأمون، (ج.م. ع) رقـم الايداع 2740. (1966).

14) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F., Macphail, R.C., Comparsion of subchronic neurotoxicity of 2-hydroxyethyl acrylate and acrylamide in rats.Fun Apl Toxicl . 18:343-352 (1992).

15) Mohammad, F.K., Omer, V.E.V. Behavioral and developmental effects in rats following *invitro* exposure to 2,4-D/2,4,5-T Mixture. Neurobehave Toxicol Teratol. 8:551-558 (1986).

16) Luna, L.G. Manual of histologic staining methods of the armes forces institute of pathology.3rd ed. McGraw-Hill book company, New york (1968).

17) Bruning, J.L. and Kintz, B.L. Computational handbook of statestistics. 18th ed. Scott, Foresman and Co, Glenview, Illinois (1977).

18) Runyon, R.P. Non-parametric statistics: A contemporary approach. Addison-Wesley publishing Co. Reading. Massachusetts. 1st ed. 42-44 (1977).

19) Brujin, L.I., Miller, T.M. and Cleveland, D.W. Unrevealing the mechanisms involved in motor degeneration in ALS. Annual Review of Neuroscience. 27: 723-749 (2004).

20) Sawada, H., Kawamura, T., Shimohama, S., Akaike, A. and Kimura, J. Different mechanisms of glutamate – induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. Journal of neuroscience research. 43: 503-510 (1996).

21) Xiao, Q.X., Yang, J.W. and Tang, X.C. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide – induced injury.Neuroscience Letters. 275: 73-76 (1999).

22) Lim, C.S., Lee, J.C., Kim, S.D., Chang, D.J and Kang, B.K. Hydrogen peroxide-induced cell death in cultured aplysia sensory neurons. Brain Res. 941: 137-145 (2002).

23) Chen, L., Lin, L., Yin, J., Luo, Y. and Huang, S. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2 A and 5, leading to activation of MAPK pathway. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 41: 1284-1295 (2009).

24) Chestwang, B., Putthaprasart, C. and Phansuwan-Pujito, P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cell: involvement of nuclear factor Kappa B, Bax and Bcl-2.J Pineal Res. 41: 116-1123 (2006).

25) Koyama, N., Hirata, K., Hori, K., Dan, K. and Yokota, T. Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin. Pain. 84: 133-139 (2000).

26) Li, K.C. and Chen, J. Alterd pain related behaviors and spinal neuronal responses produced by S.C. injection of melittin in rats. Neuroscience. 126: 753-762 (2004).

27) Habermann, E. and Horvath, E. Localization and effects of apamin after application to the central nervous system. Toxicon. 18: 549-560 (1980).

28) Kumar V, Cotran D. and Robins Md. Basic pathology. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company (1997).

29) Yagami, T., Veda, K., Asakura, K., Hata, S., Kuroda, T., Sakaeda, T., Takasu, N., Kazushige, T., Gemba, T. and Hori, Y. Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis.Mol Pharmacol: 114-126 (2002).

30) Kawahara, M. Disruption of calcium homeostasis in the pathogenesis of Alzheimer s disease and other conformational diseases. Current Alzheimer Research. 1: 87-95 (2005).

31) Nielsen, O.E, Bouchelouche, P.N. and Berlid, D. Arachedonic acid and calcium metabolism in melittin stimulated neutrophils. Mediators inflamm. 1: 313-317 (1992).

32) Pedrosa, R. and Soares-de-Silva, P. Oxidative and non oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. Br J Pharmacol. 137: 1305-1313 (2002).

33) Nam, K.W., Je. K.H., Lee, J.H., Han, H.J., Kang, S.K., Mar, W. Inhibition of Cox-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1 beta) production by water-soluble subfractioned parts from bee (Apis Millifera) venom. Arch Pharm Res. 26: 383-388 (2003).