DOI:10.22092/VJ.2022.358010.1955
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثرات سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا بر آزاد سازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در موش صحرایی

• **محمد نعمتی (نویسنده مسئول)**
گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **ناصر محمدپور**
گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **عباس زارع میرک‌آبادی**
گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **فاطمه ثعلبی**
گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **محمد خسروی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۲-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۲-۲۶
Email: dr_mnemati58@yahoo.com

چکیده

ترشح و فعال‌سازی واسطه‌های پیش‌التهابی از مهم‌ترین عواملی است که در پاتوژنز سم عقرب نقش دارند. این مطالعه به منظور مقایسه میزان سایتوکین پیش التهابی(IL-6) و سایتوکین ضدالتهابی(IL-10) در گروه موش‌های صحرایی (رت) پس از تزریق زیرجلدی سم عقرب *Androctonus crassicauda* با گروه کنترل که فقط سرم فیزیولوژی را به شکل زیرجلدی دریافت نمودند، انجام شده است. ۰/۵ میلی‌گرم سم عقرب آندرکتونوس کراسیکودا با ۴۰۰ mg/kg LD۵۰به ۱۲ موش صحرایی گروه دریافت‌کننده سم، زیر جلدی تزریق گردید. علاوه بر آن ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (هم حجم سم عقرب) به ۱۲ موش صحرایی در گروه کنترل به شکل زیرجلدی تزریق گردید. در زمان‌های صفر، ۴ ،۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم(۲۸)، نمونه خون هپارینه از قلب حیوانات جمع‌آوری و با استفاده از کیت تشخیصی الایزا ZellBio، سطح پلاسمایی سایتوکین‌های (IL-6 و IL-10) تعیین گردید.

چهار ساعت بعد از تزریق سم از لحاظ آماری میزان اینترلوکین ۱۰ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ولی مقدار اینترلوکین ۶ نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود. بیست وچهار ساعت بعد از تزریق سم میزان اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۶، نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری نشان نداد و به حالت پایدار رسیدند. در نهایت نتیجه‌گیری شد که به علت تعادل بین سایتوکین‌های پیش التهابی و ضد التهابی (IL-6 و IL-10) علائم بالینی ناشی از عقرب‌زدگی متغیر می‌باشد و تعادل بین سایتوکین‌ها نقش محوری در بروز علائم بالینی در افراد عقرب‌زده دارد.

کلمات کلیدی: عقرب آندرکتونوس کراسیکودا، سایتوکین‌های پیش التهابی، سایتوکین‌های ضد التهابی، موش صحرایی

Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 73-82

Effects of Androctonus crassicauda scorpion venom on the release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rats

By: Nemati, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. Mohammadpour, N., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. Mirakabadi, A.Z., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. and Salabi, F., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.
Khosravi, M.,Department of Pathobiology, faculty of veterinary medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz,Iran.

Received: 2022-03-12 **Accepted:2022-05-16**

Emali: dr_mnemati58@yahoo.com

The secretion and activation of proinflammatory mediators is one of the most important factors involved in the pathogenesis of scorpion venom.

This study was performed to compare the levels of proinflammatory cytokine (IL-6) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) in rats after subcutaneous injection of Androctonus crassicauda scorpion venom with control group that received only physiological serum subcutaneously. 0.5 mg of Androctonus crassicauda scorpion venom with LD50 400mg / kg was injected subcutaneously into 12 rats in the venom group. In addition, 0.5 ml of physiological serum (equal volume of scorpion venom) was injected subcutaneously into 12 rats in the control group. At 0,4,24 and 72 hours after injection of the venom (28), heparinized blood samples were collected via the heart of animals and the plasma levels of cytokines (IL-6 and IL-10) were determined using the ZellBio ELISA diagnostic kit.

Four hours after injection of the venom, the level of interleukin 10 was statistically significantly increased compared to the control group, but the level of interleukin 6 was decreased compared to the control group. 24 hours after injection of the venom, the levels of interleukin 10 and interleukin 6 did not show a significant change compared to the control group and reached a stable state.

Finally, it was concluded that due to the balance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-10), the clinical symptoms of scorpion stings are variable. And the balance between cytokines plays a pivotal role in the development of clinical symptoms in scorpion stings.

Key words: Androctonus crassicauda Scorpion, Pro-inflammatory cytokines, Anti-inflammatory cytokines, Rat

مقدمه

عقرب ها بندپایان سمی از اعضای رده *Arachnida* و راسته *Scorpiones* هستند. این حیوانات در تمام قاره‌ها به جز قطب جنوب وجود دارند و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مشکل ایجاد می‌کنند. رده‌بندی این حیوانات شامل ۱۶ خانواده و تقریباً ۱۵۰۰ گونه و زیرگونه مختلف بوده و مورفولوژی آن‌ها تقریباً بدون تغییر حفظ شده است. گونه‌های عقرب که از نظر پزشکی دارای اهمیت هستند متعلق به خانواده *Buthidae*، شامل جنس *Androctonus ,Buthus ,Mesobuthus ,Buthotus* *Parabuthus* و *Leirus* هستند که در شمال آفریقا، آسیا، خاورمیانه و هند یافت می‌گردند. در مناطق مختلف جهان عقرب‌زدگی به عنوان یکی از اصلی‌ترین مشکلات بهداشت عمومی تلقی می‌شود و می‌تواند باعث ایجاد بیماری کشنده در انسان، به ویژه در کودکان شود(۲۶).

علائم عقرب‌زدگی بلافاصله یا چند دقیقه پس از نیش خوردن شروع می‌شود و معمولاً طی ۵ ساعت به حداکثر شدت می‌رسد. در این دوره انتشار گسترده انتقال‌دهنده‌های عصبی منجر به تحریق، حالت تهوع و استفراغ می‌شود(۳۳). قربانیان معمولاً دارای علائم عمده هستند، که شایع‌ترین آنها میدریازیس، نیستاگموس، لرزش شدید، دیسفاژی و بی‌قراری است. همچنین ممکن است علائم و نشانه‌هایی از جمله تحریک سیستم عصبی مرکزی، تحریک سیستم عصبی خودمختار و گاهی اوقات، نارسایی تنفسی و قلبی و حتی مرگ را نشان دهند. علائم و نشانه‌های ناشی از نیش زدن توسط عقرب‌های خطرناک در نقاط مختلف جهان با هم مشابه است (۳۶).

سم عقرب زندگی ۲/۳ میلیارد نفر از ساکنان زمین را تهدید می‌کند. تزریق ترکیب سموم چند گونه عقرب به مدل‌های حیوانی، اختلال‌هایی

در اندام‌ها و سیستم‌های مختلف بدن آنها ایجاد می‌کند. تزریق سم عقرب در حیوانات تجربی اثرات سیستمیک با علائم و نشانه‌هایی مشابه آنچه در عقرب‌زدگی در انسان اتفاق می‌افتد، ایجاد می‌کند مانند تب، ترشح بزاق، افزایش حرکات دستگاه گوارش،آریتمی قلبی و تنفسی، فشار خون شریانی به دنبال افت فشار خون، نارسایی قلبی، ادم ریوی و شوک. اما علاوه بر آن، آزادسازی واسطه‌های سندرم پاسخ التهابی سیستمیک نیز ممکن است در بروز علایم نقش مهمی داشته باشند. اخیراً فعال‌سازی سیستم ایمنی در بیماران مبتلا به عارضه عقرب‌زدگی با افزایش سطح سرمی اینترلوکین-۶ گزارش شده است. سطح سرمی این نوع سایتوکین تا ۶ ساعت پس از گزش بالا باقی می‌ماند و هیچ ارتباطی بین شدت عقرب‌زدگی و تولید سطح IL-6 مشاهده نشده است. سایتوکین‌ها نقش مهمی به عنوان واسطه سندرم پاسخ التهاب سیستمیک (SIRS) دارند و به عنوان پیش آگهی‌دهنده هستند. یک ارتباط قوی بین افزایش سطح سایتوکین‌های فاز حاد IL-1a، (TNF-a و IL-6) و پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به شوک سپتیک گزارش شده است. IL-1a و TNF-α باعث وقوع تب، خواب با امواج آهسته، سنتز پروتئین‌های فاز حاد کبدی، ترشح نوتروفیل‌ها، ACTH، کورتیزول و انسولین می‌شود. با وجود ویژگی‌های بالینی ناشی از SIRS مشاهده شده در بیماران، به ویژه کودکان، اطلاعات کمی در مورد مشارکت سایتوکین‌ها در پاتوفیزیولوژی عقرب‌زدگی وجود دارد.

سم عقرب از پپتیدهای نوروتوکسیک مانند موکوپلی ساکاریدها، هیالورونیداز، فسفولیپاز، سروتونین، هیستامین، مهارکننده‌های آنزیم و پروتئین‌ها تشکیل می‌شود و از نظر بیولوژیک، ترکیبات شیمیایی، سمیت، فارماکولوژیک، فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک دارای ویژگی‌های متنوعی می‌باشند و مسئول ایجاد علائمی هستند که در هنگام عقرب‌زدگی با تعامل با کانال‌های یونی ظاهر می‌شوند. سم عقرب با ایجاد اختلال در فعالیت کانال‌های یونی، ویژگی‌های عملکردی آنها را تعدیل و آسیب جدی به سیستم عصبی مهره‌داران و بی‌مهره‌ها وارد می‌کند. برای مشخص کردن خاصیت و ویژگی‌های سموم جانوری از روش‌های پیشرفته فراکسیناسیون، کروماتوگرافی و تعیین توالی پپتید استفاده می‌گردد (۲۱و۳۰).

سموم عقرب بر اساس ساختار، نحوه عملکرد و محل اتصال آنها در کانال‌ها یا زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. سموم با زنجیره بلند که بر کانال‌های سدیم تأثیر می‌گذارند، به دو زیرگروه اصلی توکسین‌های α- و β- تقسیم شده‌اند(۴۶و۴۷). از جمله اثرات سموم جانوران سمی اثر بر آزادسازی واسطه‌های التهابی از طریق این کانال‌های یونی می‌باشد.مهم‌ترین واسطه‌های یونی موثر در فرایند التهاب ناشی از عقرب‌زدگی سایتوکین‌ها می‌باشند. سایتوکین‌ها را می‌توان با توجه به عملکرد یا خواص آنها، به پیش التهابی و یا ضد التهابی طبقه‌بندی کرد. سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IL-6، IL-1 و TNF در وهله اول مسئول ایجاد یک دفاع موثر در برابر عوامل بیماری‌زای برون‌زا هستند. با این حال، تولید بیش از حد این واسطه‌ها می‌تواند مضر باشد و در نهایت ممکن است منجر به شوک، نارسایی چند عضو و مرگ شود (جدول ۴) (۳۲و۴۵). برعکس، سایتوکین‌های ضدالتهاب شامل IL-6، IL-5، IL-4 و IL-10 برای کاهش تنظیم روند التهابی تشدید شده و حفظ هموستازی برای عملکرد مناسب اندام‌های حیاتی بسیار مهم هستند، اما پاسخ ضدالتهابی بیش از حد نیز ممکن است منجر به سرکوب عملکرد ایمنی شود. تعادل بین فعالیت‌های پیش التهابی و ضد التهابی درجه و میزان التهاب را تعیین می‌کند، بنابراین می‌تواند منجر به اثرات مختلف بالینی شود. سایتوکین‌های ضد التهابی با اثرات سایتوکین‌های پیش التهابی خنثی می‌شوند و بنابراین غلظت نسبی سایتوکین به بازدارنده یا آنتاگونیست آن، تأثیر نهایی آن را تعیین می‌کند. عدم تعادل سایتوکین‌ها منجر به ایجاد آسیب و تخریب اعضای بدن در هنگام سپسیس شدید و عقرب‌زدگی می‌شود. التهاب سیستمیک ممکن است به صورت حاد یا مزمن تقسیم شود. در التهاب حاد سیستمیک مانند سپسیس، ضربه، سوختگی و جراحی با افزایش سریع و افزایش سطح پلاسما در سایتوکین‌های پیش‌التهابی مشخص می‌شود. در مقابل، التهاب مزمن تا حدودی با افزایش ملایم اما پایدار در سایتوکین‌ها و واکنش‌دهنده‌های فاز حاد مشخص می‌شود. شواهد بسیاری نقش سایتوکین‌ها در عقرب‌زدگی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که هر دو سطح سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در سندرم سپسیس بیش از حد تولید می‌شوند. اهمیت بالینی و ارزش پیش آگهی آنها مشخص نشده است (۸ و۲۴).

با توجه به وجود گونه‌های متعدد عقرب‌های خانواده بوتیده از جمله آندرکتونوس کراسیکودا، هوتنتوتا سلسئی و زاگروسنسیس، مزوبوتوس اپئوس، آپیستوبوتوس سوسنی در استان خوزستان، مطالعه حاضر با هدف بررسی موضوع عقرب‌زدگی و مطالعه تجربی تاثیر سم عقرب بر پاسخ التهابی و ضدالتهابی در بدن و نشان دادن ارتباط بین ترشح اینترلوکین‌های ۶ و ۱۰ و صدمات بافتی ناشی از آن در حیوانات آزمایشگاهی مورد گزش با در نظر گرفتن علایم ایجاد شده انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

الف- تهیه سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا و تعیین LD۵۰ سم

عقرب‌های گونه آندروکتونوس کراسیکودا از مناطق کوهستانی استان خوزستان زنده‌گیری شده و پس از انتقال به بخش جانوران سمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، با استفاده از الکتروشوک از آنها سم‌گیری به عمل آمد. سم جمع‌آوری شده بوسیله دستگاه فریز درایر خشک و بعد از مشخص کردن LD۵۰ آن با روش Reed & Muench آماده تزریق گردید.

ب- گروه‌بندی حیوانات

در این مطالعه از ۲۴ سرموش صحرایی۲۰۰ گرمی نژاد ویستار در دو گروه جداگانه استفاده شد.

گروه اول: گروه شاهد: در این گروه به ۱۲ عدد موش صحرایی به میزان هم حجم سم تزریقی، فقط سرم فیزیولوژی به صورت زیرجلدی (sc) تزریق گردید.

گروه دوم: در ابتدا موش‌های این گروه شماره‌گذاری شده و بعد از مقید کردن، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت ۱/۳ LD۵۰ سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا رقیق شده با سرم فیزیولوژی به روش زیر جلدی به آنها

تزریق گردید (LD۵۰ ۴۰۰ mg/kg بوده است). سپس بر اساس روش ذکر شده در منابع مورد استفاده، به ترتیب در زمان‌های صفر ،۴، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم، خونگیری به روش مستقیم از قلب حیوانات انجام گردید(۲۸).

مراحل خونگیری به شرح ذیل می‌باشد:

گروه اول: یک هفته قبل از تزریق سرم فیزیولوژی در گروه اول (گروه شاهد) یک مرحله خونگیری از قلب موش به میزان یک تا دو میلی‌لیتر از طریق بین دنده‌ای انجام گردید. یک هفته بعد به حیوانات سرم فیزیولوژی تزریق شد و سپس در زمان های صفر، ۴، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق، به روش بالا و به طور مستقیم از قلب حیوانات به میزان یک تا دو میلی‌لیتر خونگیری به عمل آمد.

گروه دوم: در این گروه که گروه دریافت‌کننده سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا بودند نیز یک هفته قبل از تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا با همان روش بالا خونگیری به عمل آمد(زمان صفر) و سپس یک هفته بعد به آنها به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر سم رقیق شده با آب مقطر به روش زیرجلدی تزریق گردید. در ادامه به ترتیب در زمان‌های صفر، ۴، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم از حیوانات خونگیری به عمل آمد(۲۸).

موش صحرایی۲۰۰ گرمی نژاد ویستار

عقرب سیاه بزرگ یا آندروکتونوس کراسیکودا

خونگیری از حیوانات

در این مطالعه برای انجام خونگیری مستقیم از قلب، ابتدا حیوانات به وسیله اتر بیهوش شده سپس از طریق بین دنده‌های قفسه سینه نیدل سرنگ به قلب حیوان وارد گردید و به میزان ۲ میلی‌لیتر خون تهیه و جهت جداسازی پلاسما در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در دور ۴۰۰۰G سانتریفیوژ و سپس پلاسمای آنها جداسازی و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای انجام تست الایزا آماده شدند.

اندازه‌گیری میزان سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی

برای اندازه‌گیری سطح سرمی سایتوکین‌های IL-10 و IL-6، سرم‌ها را دفریز کرده و به وسیله تکنیک الایزا و طبق دستورالعمل کیت، اندازه گیری‌ها انجام شد.

اندازه‌گیری IL10: برای اندازه‌گیری این سایتوکین ضدالتهابی در پلاسمای حیوانات تحت آزمایش از کیت الایزای مخصوص این اینتر لوکین ساخت شرکت GmbH-ZellBio با شماره کاتالوگ ۱۰۱۳۵C-R۹۷۴۸-ZB استفاده گردید.

اندازه گیری IL6: برای اندازه‌گیری این سایتوکین التهابی در پلاسمای حیوانات تحت آزمایش از کیت الایزای مخصوص این اینتر لوکین ساخت شرکت GmbH-ZellBio با شماره کاتالوگ ۱۰۱۳۵C-R۹۷۴۸-ZB استفاده گردید.

روش اندازه‌گیری بر اساس پروتکل کیت و برای کاهش خطای اندازه‌گیری تست‌ها به صورت دوبلیکیت اندازه‌گیری شدند. سپس با کمک دستگاه الایزا ریدر مدل Accu Reader ساخت تایلند و در طول موج‌های رفرنس واکنش‌های پلیت‌ها با روش دانکن GLM قرائت شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایشات انجام گرفته شده بر روی نمونه خون‌های تهیه شده در یک هفته قبل از تیمار و نمونه خون‌های تهیه شده در بازه‌های زمانی ذکر شده و تعیین سطح سایتوکاین‌ها در دو گروه به شرح زیر می‌باشد.

الف: مقایسه میزان اینترلوکین ۶ در زمان‌های مختلف

الف-۱: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین۶ در گروه کنترل قبل از تزریق سرم فیزیولوژی و بعد از تزریق سرم فیزیولوژی

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار یک و جدول ۱ مشاهده شد که مقدار سطح سرمی اینترلوکین ۶ در زمان‌های مختلف (صفر، ۴ ، ۲۴ و ۷۲ ساعت) بعد از تزریق سرم فیزیولوژی به روش زیر جلدی تغییر چندانی نداشته و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید ($P>0/05$).

الف-۲: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۶ بین زمان صفر و ۴ ساعت بعد از تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲) :

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار یک و جدول ۱

مشاهده شد که در گروه تیمار شده با سم عقرب، مقدارسطح سرمی اینترلوکین ۶ در زمان ۴ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان صفر به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود(P<۰۵/۰).

الف-۳: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۶ بین زمان ۴ و ۲۴ساعت بعد ازتزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲)

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار شماره یک و جدول شماره ۱ مشاهده شد که مقدار سطح سرمی اینترلوکین۶ در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان ۴ ساعت بعد از تزریق سم افزایش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵).

الف-۴: مقایسه میزان اینترلوکین ۶ بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲)

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار یک و جدول ۱ مشاهده شد که مقدار سطح سرمی اینترلوکین ۶ در زمان ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم افزایش یافته ولی این افزایش معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵)

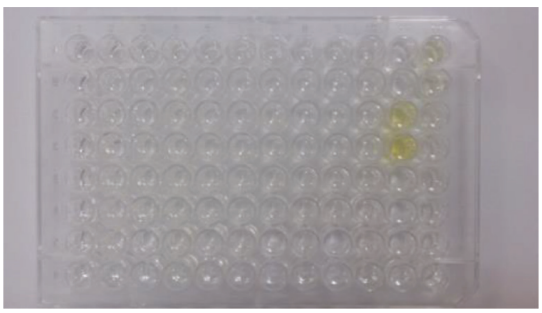
ب: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ (در مقدمه توصیف شده است) در زمان‌های مختلف

ب-۱: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در گروه کنترل قبل از تزریق سرم فیزیولوژی و بعد از تزریق سرم فیزیولوژی

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار دو و جدول ۲ مشاهده شد که مقدار اینترلوکین ۱۰ در زمان‌های مختلف (صفر، ۴، ۲۴ و ۷۲ ساعت) بعد ازتزریق سرم فیزیولوژی به روش زیر جلدی تغییر چندانی نداشته و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید(P>۰/۰۵).

ب-۲: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ بین زمان‌های صفر و ۴ ساعت بعد ازتزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲)

با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار دو و جدول دو



شکل ۱- نتایج بدست آمده از کیت الایزا.

مشاهده شد که در همین گروه مقدار سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در زمان ۴ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان صفر افزایش معنی‌داری یافته بود (P<۰/۰۵).

ب-۳: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ بین زمان ۴ و ۲۴ ساعت بعد تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲)

توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار دو و جدول دو مشاهده شد که مقدار اینترلوکین ۱۰ در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان ۴ ساعت کاهش یافته بود و این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

ب-۴: مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا(گروه ۲)

توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و طبق نمودار دو و جدول دو می‌توان نتیجه گرفت که مقدار اینترلوکین ۱۰ در زمان ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم کاهش یافته و به یک حالت پایدار رسیده، ولی این اختلاف معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های Th۱ مهم‌ترین تولیدکننده سایتوکین پیش‌التهابی و سلول‌های Th۲ عمده‌ترین تولیدکننده سایتوکین ضدالتهابی می‌باشند. تعادل بین سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی برای نگهداشتن هموستاز سیستم ایمنی بدن ضروری می‌باشد. به هم خوردن این تعادل عامل اصلی پاتوژنز عقرب‌زدگی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد. تعادل بین سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در عقرب‌زدگی تعیین کننده درجات و وسعت التهاب است که می‌تواند به علائم کلینیکی از قبیل اختلالات قلبی، ادم ریوی و شوک منتهی شود.

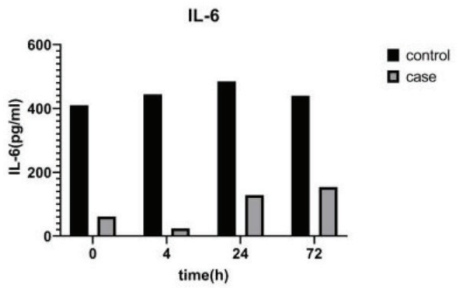
سموم گونه‌های مختلف عقرب باعث تولید سایتوکین پیش‌التهابی و سایتوکین ضدالتهابی توسط سلول‌های Th۱ و سلول‌های Th۲ شده و با ایجاد سندرم پاسخ التهابی، منجر به بروز شوک، پانکراتیت و اختلالات قلبی ریوی می‌گردد(۲۸و۴۸). اینترلوکین ۱۰ به وسیله انواع سلول‌ها از قبیل CD4 و CD 8 و Tcells، ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، B سل‌ها، دندریت سل‌ها و سلول‌های اپیتلیال تولید می‌شود(۳). اینترلوکین ۱۰ یک سایتوکین ضدالتهابی مهم است که توانایی مهار سایتوکین Th۱ از قبیل IFNy، NFα ،IL-8 ، IL-6،IL-2 ،IL-1B و IL-12 را دارد(۳۵و۳). بیماری‌های خودالتهابی IL1B، و TNF-α مهم‌ترین محرک‌های تولید اینترلوکین ۱۰ می‌باشند(۳). اینترلوکین ۱۰ باعث سرکوب آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید فعال از ماکروفاژها می‌گردد و همچنین باعث تولید پروستاگلندین‌ها می‌شود (۱۹).

اینترلوکین ۶ در پاسخ به فاز حاد التهابی تولید می‌شود(۱). عوامل موثر بر پروسه التهابی که بعد از عقرب‌زدگی تولید می‌شوند شامل کینین‌ها، ایکازونوئیدها، فاکتور فعال‌کننده پلاکت‌ها، فاکتورهای افزایش دهنده نفوذپذیری، نیتریک اکسید و سایتوکین‌ها است.

آزادسازی سایتوکین‌ها و دیگرمدیاتورهای التهابی باعث بروز علائم

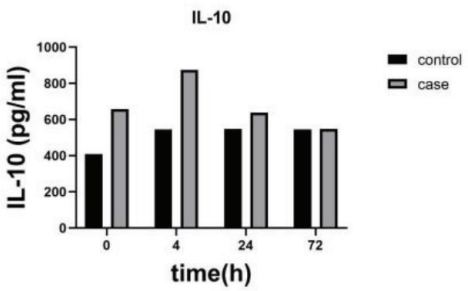
بالینی از قبیل دیسترس حاد تنفسی، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک و نقص در ارگان‌های مختلف می‌شوند. این سایتوکین‌ها تنظیم‌کننده و افزایش‌دهنده پاسخ ایمنی هستند و باعث صدمه بافتی می‌شوند.

در این مطالعه بعد از تزریق سم و در معرض قرار دادن موش‌ها با سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا و در زمان ۴ ساعت بعد از تزریق سم، میزان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ نسبت به زمان صفر افزایش یافته و میزان سطح سرمی اینترلوکین ۶ در مقایسه با گروه کنترل که تغییر چندانی نداشتند، کاهش یافته بود. دلیل این نتایج می‌تواند در روند آزادسازی مدیاتورها در هنگام عقرب‌زدگی باشد. این روند آبشاری شامل اجزای سلولی و آزادسازی مدیاتورهای شیمیایی می‌باشد (۳۴). در مطالعه‌ای که توسط زایرزاده و همکاران انجام شد، به دنبال تزریق سم عقرب مزوبوتوس اپئوس مشاهده کردند که میزان سایتوکین‌های پیش التهابی IL-1 و TNF-α در مدل‌های خرگوشی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۵۴). مهره‌داران در برخورد با آنتی‌ژن از طریق یک سری روندهای درگیر در واکنش‌های سلولی شروع به تولید آنتی‌بادی می‌کنند. ابتدا سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن توسط سلول‌های T شناسایی می‌شوند و بعد از آن B سل‌ها شروع به تولید آنتی‌بادی می‌کنند که به طور اختصاصی می‌تواند آنتی‌ژن را شناسایی کند. در ادامه Tcellها و Bcellها به کمک هم تولید آنتی‌ژن



نمودار ۱- مقایسه میزان اینترلوکین۶ در گروه کنترل و گروه دریافت کننده سم عقرب.

(An:گروه دریافت کننده سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا، Co: گروه کنترل).



نمودار ۲- مقایسه میزان سطح سرمی اینترلوکین۱۰ در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده سم عقرب.

(An: گروه دریافت کننده سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا، Co:گروه کنترل).

و سایتوکین‌ها را تنظیم می‌کنند. Th۱ و Th۲ در عملکرد و نوع تولید سایتوکین با هم تفاوت دارند (۳۴و۳۵). آنچه مسلم است افزایش اینترلوکین ۱۰ و کاهش اینترلوکین ۶ بیانگر این نکته است که اولا" سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا اثرات آشکاری در افزایش اینترلوکین ۱۰ دارد و دوما" اینترلوکین ۱۰ اثرات مهارکنندگی اینترلوکین ۶ را دارد (۱). در مطالعه انجام شده توسط Y.D.M Fukuhara و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشاهده شد که سطح سرمی IL-10 در فرم شدید و متوسط عقرب‌گزیدگی در بیماران افزایش پیدا می‌کند(۵۵) که هم راستای با نتایج حاصل از مطالعه حاضر است. صدمات بافتی که در طی فرآیند التهابی رخ می‌دهد یک فرآیند پیشرفته است که ممکن است منجر به نقص و اختلال در عملکرد ارگان‌ها شود. سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در کنار هم نقش مهمی در بازسازی بافت‌های صدمه دیده چه از نظر عملکردی و چه ساختاری دارند. یکی از نقش‌های مهم اینترلوکین ۱۰ مهار اثرات اینترلوکین ۶ و دیگر فاکتورهای پیش‌التهابی از قبیل اینترلوکین‌های ۸،۲ و۱۲ و همچنین TNFα و IL-1B می‌باشد (۳۵و۳).

این مدیاتورها محصول ماکروفاژها بوده و در پاسخ به پاتوژن‌های داخل سلولی و توکسین‌ها تولید می‌شوند (۳۴). Th2 با القاء IgE و IgA در برابر آنتی ژن‌های خارج سلولی واکنش نشان می‌دهد و انواع سایتوکین‌ها از قبیل(اینترلوکین‌های ۴ و ۵ و ۶ و ۱۳) را تولید می‌کند (۳۴).

سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین -۱ و اینترلوکین -۶ و TNFα در ابتدا برای آغاز دفاع بدن بر علیه پاتوژن‌های خارجی وارد عمل می‌شوند(۳۲و۴۵). در مقابل سایتوکین‌های ضدالتهابی از قبیل اینترلوکین ۴ و ۵ و ۱۰ باعث تنظیم معکوس پروسه‌های مهم دخیل در التهاب می‌گردند که باعث حفظ هموستاز و عملکرد ارگان‌های حیاتی بدن می‌شود. اما افزایش پاسخ‌های ضدالتهابی ممکن است باعث سرکوب عملکرد ایمنی بدن شود(۸). عدم تعادل بین سایتوکین‌ها باعث افزایش صدمات بافتی و مرگ میر در اثر عقرب‌زدگی می‌شود. در عقرب‌زدگی هم سایتوکین‌های پیش‌التهابی و هم ضدالتهابی به مقدار زیاد تولید می‌شوند(۴۱). در مطالعه حاضر همچنین مشاهده شدکه میزان IL-10 در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق به نسبت ۴ ساعت بعد از تزریق کاهش یافته در حالی که میزان IL-6 در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم نسبت به ۴ ساعت بعد از تزریق سم افزایش معنی‌داری داشته است. Monica Mmagalhaesa و همکاران در سال ۱۹۹۹، گزارش کردند که به دنبال عقرب‌گزیدگی توسط *Tityus serrulatus* سطح سرمی IL-6 در بازه‌های زمانی ۱۲، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از عقرب‌زدگی افزایش پیدا می‌کند و در ۷۲ ساعت پس از عقرب‌زدگی به بیشترین میزان خود می‌رسد(۵۶) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر کاملا هماهنگ است. در مطالعات مختلف ثابت شده است که این سایتوکین‌های پیش‌التهابی در مراحل اولیه افزایش می‌یابند و این افزایش بستگی به نوع عقرب و ترکیبات موجود در سم عقرب دارد. احتمالا" سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا در مراحل اولیه گزش باعث افزایش IL-10 می‌شود و از طرفی با توجه به اینکه اینترلوکین ۱۰ اثرات مهارکنندگی بر تولید اینترلوکین ۶(سایتوکین پیش التهابی) دارد، می‌تواند توجیه‌کننده این

اثرات باشد. دلیل دیگر سیستم ایمنی بدن است که تمایل به مقابله با آنتی‌ژن خارجی و جلوگیری از وارد شدن صدمه بیشتر به بدن دارد (۳۳-۵۰-۵۳).

عقرب آندروکتونوس کراسیکودا به طور عمده باعث افزایش تولید IL-1B و IL-4 و IL-10 و TNF-α می‌شود (۵۱).

از طرفی به علت اینکه اینترلوکین ۱۰ یک سایتوکین ضدالتهابی است لذا باعث مهار آزادسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی(از قبیل اینترلوکین ۶) می‌شود. این عمل باعث کاهش اثرات پاتولوژیک سم عقرب می‌گردد. به هر صورت این نتایج و ارزیابی سطح سرمی سایتوکین‌ها بخصوص در موارد شدید و متوسط در درمان اولیه پیش‌آگهی خوبی هستند. استفاده از داروهای مهارکننده تولید سایتوکین‌ها مانند داروهای ضد التهاب از قبیل گلوکوکورتیکوئیدها اثرات مفیدی دارند.

Il-10 نقش مهمی در تنظیم فعالیت مونوسیت‌ها و ماکروفاژها دارد و ممکن است در تنظیم سنتز مونوکین‌ها نقش داشته باشند (۱۲-۳۴).

اندازه‌گیری سطح سایتوکین‌ها در تعیین سطح عقرب‌زدگی و میزان صدمات بافتی نقش دارد. بیماران با افزایش سطح سرمی IL-1α و IL-6 و IFN-g و GM- CS معمولا" پیش‌آگهی بدتری دارند.

در ادامه روند این مطالعه، ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم مقدار سطح سرمی اینترلوکین -۱۰ کاهش یافته و به یک روند ثابت برگشته و به مقدار آن در زمان صفر نزدیکتر شد. ولی این کاهش در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم معنی‌دارنبوده است. از طرفی مقدار اینترلوکین ۶ در مقایسه با اینترلوکین ۱۰ کمی افزایش داشته ولی این افزایش هم در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم معنی‌دار نبوده و به حالت پایدار نزدیک شده بود. هر دو اینترلوکین ۱۰ و ۶ به حالت پایدار و مقدارشان در زمان صفر نزدیک می‌شوند. اختلاف هر دو اینترلوکین در زمان ۷۲ ساعت بعد از تزریق سم و زمان صفر اختلاف معنی‌داری نداشت. در واقع سایتوکین‌ها به یک حالت تعادل نزدیک می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد که مطالعات تکمیلی به شرح زیر انجام شود:

۱- بررسی میزان سطح سرمی دیگر سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در واکنش به تزریق سم عقرب آندروکتونوس کراسیکودا

۲- بررسی مقایسه‌ای میزان سطح سرمی سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در واکنش به تزریق سم دیگر گونه‌های عقرب موجود در منطقه.

۳ -بررسی میزان سطح سرمی سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در سرم بیماران دچار عقرب زدگی.

۴-بررسی مقایسه‌ای میزان آزادسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در واکنش به مصرف داروهای ضدالتهابی در حیوانات آزمایشگاهی.

۵-بررسی اثرات سم عقرب بر روی التهاب ایجاد شده در موش صحرایی پس از تزریق کاراژینان در کف پای موش.

منابع مورد استفاده

1- Adi-Bessalem, S.; Hammoudi-Triki, D.and Laraba-Djebari, F. (2008) “Pathophysiological effects of Androctonus australis hector scorpion venom: tissue damages and inflammatory response,” *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 60, No. 4-5, pp. 373–380.

2- Annane, D.; Sanquer, S.; S´ebille, V. et al., (2000) “Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock,” *The Lancet*, vol. 355, No. 9210, pp. 1143–1148.

3- Asadullah, K.; Sterry, W.and Volk, H. D. (2003)“Interleukin-10 therapy—review of a new approach,” *Pharmacological Reviews*, vol. 55, No. 2, pp. 241–269.

جدول ۱- مقادیراینترلوکین۶(Pg/ml) در زمان های مختلف و در گروه های مختلف تحت آزمایش (An: آندروکتونوس کراسیکودا -C۰: کنترل).

Time	۰	۴	۲۴	۷۲
An(pg/ml)	۶۱,۴۲	۲۴,۲	۱۲۸,۵۵	۱۵۴
Co(pg/ml)	۴۰۹,۷۶	۴۴۴,۳۳	۴۵۸	۴۳۹,۶

جدول ۲- مقادیر اینترلوکین۱۰(Pg/ml) در زمان‌های مختلف و در گروهای مختلف تحت آزمایش (An: آندروکتونوس کراسیکودا -C۰:کنترل).

Time	۰	۴	۲۴	۷۲
An(pg/ml)	۶۵۷,۶۸	۸۷۴,۷۹	۶۳۶,۹۵	۵۴۶,۶۹
Co(pg/ml)	۴۰۹,۷۶	۵۴۵,۳	۵۴۸,۳۳	۵۴۵,۳۳

4- Ashcroft F. M. and Gribble, F. M. (2000) “Tissue-specific effects of sulfonylureas. Lessons from studies of cloned K (ATP) channels,” *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 14, No. 4, pp. 192–196.

5- Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with Bothrops atrox venom. *Mediators of Inflammation*. 1998 ;7 (5):339–346.

6- Barros, V. E. D. ; Ferreira, B. R. ; Livonesi, M.and Figueiredo, L. T. M. (2009)“Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses,” *Revista do Instituto de Medicina Tropical de S˜ao Paulo*, vol. 51, No. 3, pp. 141–147.

7- Barton, B. E. (1997) “IL-6: insights into novel biological activities,”*Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 85, No. 1, pp. 16–20.

8- Bone, R. C. (1996) “Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS),” *Annals of Internal Medicine*, vol.125, No. 8, pp. 680–687.

9- Bosmans, F.; Martin-Eauclaire, M. F. and Tytgat, J. (2007) “Differential effects of five ‘classical’ scorpion β-toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 218, No. 1, pp. 45–51.

10- Caliskan, F., Garcia, B.I., Coronas, F.I., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., 2006.
Characterization of venom components from the scorpion Androctonus crassicauda of Turkey: peptides and genes. *Toxicon* 48, 12e22.

11- Caliskan, F., Quintero-Hernandez, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F.I., Corzo, G., Possani, L.D., 2013. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na-channel a-type toxin peptide (Acra4) from Androctonus crassicauda scorpion venom. *Biochimie* 95, 1216e1222.

12- Catterall, W. A. (1992) “Cellular and molecular biology of voltagegated sodium channels ,” *Physiological Reviews*, vol. 72, No. 4, pp. 515–548.

13- Cest`ele S.; and Catterall, W. A. (2000) “Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels,”*Biochimie*, vol. 82, No. 9-10, pp. 883–892.

14- Dinarello, C.A. (2000) “The role of the interleukin-1—receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1,” *New England Journal of Medicine*, vol. 343, No. 10, pp. 732–734.

15- Dinarello, C. A. (2007) “Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1β secretion and disease activity,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 56, No. 9, pp. 2817–2822.

16- Dinarello, C. A. (2009) “Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family,” *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 519–550.

17- Fukuhara YD, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Donadi EA. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. 2003; 41(1):49–55

18- Gay, J.; Kokkotou, E.; O’Brien, M.; Pothoulakis, C.and Karalis, K. P. (2006) “Interleukin-6 genetic ablation protects from trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice: putative effect of antiinflammatory cytokines,” *NeuroImmunoModulation*, vol. 13, No. 2, pp. 114–121.

19- Goldman, D.; Cho, Y.; Zhao, M. L.; Casadevall, A. and Lee, S. C. (1996) “Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary Cryptococcus neoformans granulomas,” *American Journal of Pathology*, vol. 148, No. 4, pp. 1275–1282.

20- Gordon, D. (1997) “A new approach to insect-pest control—combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity,” *Invertebrate Neuroscience*, vol. 3, No. 2-3, pp. 103–116.

21- Gross, A. and MacKinnon, R. (1996) “Agitoxin footprinting the Shaker potassium channel pore,” *Neuron*, vol. 16, No. 2, pp. 399–406.

22- Heller, N. M.; Qi, X.; Junttila, I. S. et al., (2008) “Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages,” *Science Signaling*, vol. 1, No. 51, p. ra17.

23- Holaday, S. K. Jr. ; Martin, B. M. ; Fletcher Jr., P. L. and Krishna, N. R. (2000)“NMR solution structure of butantoxin,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*,vol. 379, No. 1, pp. 18–27.

24- Howard, M.; Muchamuel, T.; Andrade, S. and Menon, S. (1993) “Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia,”*Journal of Experimental Medicine*, vol. 177, No. 4, pp. 1205– 1208.

25--Ismail, M. (1994) “The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy“. *Toxicon*.; 32(9):1019–102

26- Ismail, M.(1995) “The scorpion envenoming syndrome,” *Toxicon*, vol. 33, No. 7, pp. 825–858.

27- Jain, D., Kumar, S., 2012. Snake venom: a potent anticancer agent. Asian Pac. J.Cancer Prev. 13, 4855e4860.

28- Jalali A, Pipelzadeh MH, Taraz M, Khodadadi A, Makvandi M, Rowan EG. Serum TNF-alpha levels reflect the clinical sever-

cytokine d nitric oxide secretion in mice injected with Tityus serrulatus scorpion venom," *Mediators of Inflammation*, vol. 11, No. 3,pp. 173–180.

41- Petricevich, V. L. (2006) "Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with Centruroides noxius scorpion venom," *Mediators of Inflammation*, vol. 2006, No. 6, Article ID 54273, 11 pages.

42- Petricevich, V. L.; Hern´andez Cruz, A.; Coronas, F. I. V. and Possani, L. D. (2007) "Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages," *Toxicon*, vol. 50, No. 5, pp. 666–675.

43- Petricevich, V. L. ; Reynaud, E.; Cruz, A. H. and Possani, L. D. (2008) "Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from Tityus serrulatus," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 154, No. 3, pp. 415–423.

44- Petricevich, V.L., 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Med Inflamm*. 2010, 903295.

45- Pinsky, M. R.; Vincent, J. L.; Deviere, J. ; Alegre, M. ; Kahn, R. J. and Dupont, E. (1993)"Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality," *Chest*, vol. 103, No. 2, pp. 565–575.

46- Possani, L. D. ; Becerril, B.; Delepierre, M. and Tytgat, J. (1999) "Scorpion toxins specific for Na+-channels," *European Journal of Biochemistry*, vol. 264, No. 2, pp. 287–300.

47- Possani, L. D.; Merino, E. Corona, M.; Bolivar, F.and B. Becerril, (2000) "Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels," *Biochimie*, vol. 82, No. 9-10, pp. 861–868.

48- Radha Krishna Murthy K. Hematological changes in acute myocarditis due to scorpion envenoming syndrome. *Int J Chem LifeSci*. 2014; 3 (2):1274–84.

49- Saadi, Samahir; Assarehzadegan, Mohammad-Ali; Pipelzadeh, Mohammad Hassan; Hadaddezfuli,Reza. "Induction of IL-12 from human monocytes after stimulation with Androctonus crassicauda scorpion venom". *Toxicon* 106 (2015) 117e121.

50- Shichor, I.; Zlotkin, E.; Ilan, N., et al., (2002)"Domain 2 of Drosophila para voltage-gated sodium channel confers insect properties to a rat brain channel," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, No.

11, pp. 4364–4371.

51- Steinman, R. M. (1988) "Cytokines amplify the function of accessory cells," Immunology Letters, vol. 17, No. 3, pp. 197–202.

52- Vijverberg, H. P. M.; Pauron, D. and Lazdunski, M. (1984) "The effect of Tityus serrulatus scorpion toxin γ on Na channels

ity of envenomation following a Hemiscorpius lepturus sting. *Eur Cytokine Netw*. 2011;22 (1):5–10.

29- Khanbashi, S., Khodadadi, A., Assarehzadegan, M.A., et al., 2015. Assessment of immunogenic characteristics of Hemiscorpius lepturus venom and its crossreactivity with venoms from Androctonus crassicauda and Mesobuthus eupeus. *J Immunotoxicol*. 12, 217e222.

30- MacKinnon, R.; Reinhart, P. H. and White, M. M. (1988)"Charybdotoxin block of Shaker K+ channels suggests that different types of K+ channels share common structural features," *Neuron*, vol. 1, No. 10, pp. 997–1001.

31--Magalh˜aesMM, Pereira MES, Amaral CFS, et al. (1999) Serum levels of cytokines in patients envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. ; 37(8):1155–1164.

32- Marty, C.; Misset, B.; Tamion, F.; Fitting, C.; Carlet, J. and Cavaillon, J. M.(1994) "Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin," *Critical Care Medicine*, vol. 22, No. 4, pp. 673–679.

33- Mebs, D. (2002)"Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals," *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 95, No. 3, p. 131.

34- Mosmann T. R. and Coffman, R. L. (1989) "Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells,"*Advances in Immunology*, vol. 46, pp. 111–147.

35- Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (2005) "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins," *Journal of Immunology*, vol. 175, No.1, pp. 5–14.

36- Murthy K.and Krishna, R. (2002)"On scorpion envenoming syndrome: problems of medical ethics and accountability in medical research in India,"*Journal of Venomous Animals and Toxins*,vol.8,No. 1.

37- Ozkan O. and Carhan, A. (2008) "The neutralizing capacity of Androctonus crassicauda antivenom against Mesobuthu seupeus scorpion venom," *Toxicon*, vol. 52, No. 2, pp. 375–379.

38- Pessini, A. C. ; Kanashiro, A. ; Malvar, D. C. et al.,(2008)"Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by Tityus serrulatus scorpion venom injected into rat paws," *Toxicon*, vol. 52, No. 7, pp. 729–736.

39- Petricevich, V. L.(2002) "Effect of Tityus serrulatus venom on cytokine production and the activity of murine macrophages," *Mediators of Inflammation*, vol. 11, No. 1, pp. 23–31.

40- Petricevich V. L. and Pe˜na, C. F. (2002) "The dynamics of

in neuroblastoma cells," *Pflugers Archiv*, vol. 401, No. 3, pp. 297–303.

53- Yatani, A. ; Kirsch, G. E. ; Possani, L. D. and Brown, A. M. (1988) "Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents," *American Journal of Physiology*, vol. 254, No. 3, part 2, pp. H443–H451.

54- Ehsan, Z, et al.,Neutralizing effects of polyvalent scorpion venom against the inflammatory response induced by the scorpion venom of Mesobotus eupeus. *Razi Archive*, 1393. Sixty-ninth year (2): p. 171-177.

55- Fukuhara YD, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Donadi EA. Increased plasma levels of IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α in patients moderately or severely envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. 2003 Jan 1;41(1):49-55.

56- Magalhães MM, Pereira ME, Amaral CF, Rezende NA, Campolina D, Bucaretchi F, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR. Serum levels of cytokines in patients envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. 1999 Aug 1;37(8):1155-64.