بررسی فراکسیون های زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* بومی کاشان.

دکتر روح اله دهقانی[۱]، دکتر سیاوش تیرگری[۲]، دکتر حسن وطن‌دوست[۲]،دکتر میرلطیف موسوی[۳]، جمیل زرگان[۳]
فیروز ابراهیمی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: کژدم *Mesobuthus eupeus* یکی از فراوانترین گونه‌های جنس *Mesobuthus* و متعلق به خانواده *Buthidae* می‌باشد. این کژدم از بیشتر نقاط ایران گزارش شده است و یکی از عوامل اصلی گزیدگی در کشور محسوب می شود. با توجه به این که شناخت فراکسیون‌های زهر کژدم‌ها می‌تواند فاکتور مهمی در درمان اثرات پاتوفیزیولوژیک و شناخت داخل گونه‌ای آنان باشد، این مطالعه به منظور تعیین فراکسیون های زهر کژدم *M.eupeus* در سال ۱۳۸۰ انجام گردید.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر یک مطالعه بنیادی به روش توصیفی می‌باشد. پس از تهیه ژل بزرگ *Tricine - SDS - PAGE* و حرارت دادن نمونه زهر با بافر حاوی مرکاپتواتانول و تزریق حدود ۲۵میلی گرم پروتئین از زهر به هر چاهک، ولتاژ الکتروفورز روی ۸۰ ولت تنظیم و ثابت گردید. پس از اتمام الکتروفورز بعد از ۱۵ساعت، ژل چندین بار شستشو و با متانول فیکس و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی و جهت مقایسه وزن مولکولی پروتئین‌های زهر از مارکر پروتئینی *Sigma ultra low MW* استفاده شد.

یافته ها: زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای ۶باند پروتئینی بود. بالاترین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶/۶ کیلودالتون و پائین ترین باند با وزن مولکولی ۱ کیلو دالتون بود. زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* پروتئین های بیشتری با وزن مولکولی کمتر از مارکر *Sigma ultra low MW* دارد.

نتیجه گیری و توصیه ها: با توجه به این کژدم در بیشتر نقاط ایران و در اقلیم های آب و هوائی گوناگون زندگی می کند، مطالعه زهر کژدم در هر منطقه ،علاوه بر کمک به درمان اثرات پاتوفیزیولوژیک آن و تهیه دقیق‌تر آنتی و نوم بر ضد فراکسیون زهری، می‌تواند تفاوت‌های داخل گونه‌ای را با توجه به نوع رژیم آب و هوایی مشخص نماید که انجام این مطالعه را توصیه می‌کند.

واژگان کلیدی: فراکسیون های زهر کژدم، *Mesobuthus eupeus*.

۱ ـ دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۲ ـ دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳ ـ دانشکده علوم پایه ـ دانشگاه امام حسین (ع)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

مقدمه

کژدم‌ها، به خاطر سازش‌های گوناگون، مرفولوژی، فیزیولوژی،اکولوژی و رفتاری از ٤٥٠ میلیون سال پیش تاکنون می زیسته اند. اعتقادات قدیمی و افسانه ها، کژدم ها را به عنوان عوامل اهریمن معرفی نموده اند و آنها را نشانه تبه‌کاری و گناه دانسته اند (۱). علیرغم این شهرت ناپسند، اکنون کژدم ها، به صورت گسترده ای توسط دانشمندان رشته های مختلف بیولوژی و فارماکولوژی، بیولوژی مولکولی، شیمی، بیوفیزیک و درمانگران، مورد مطالعه قرار گرفته اند (۲). راسته کژدم‌ها، دارای ۲۰ خانواده زنده و حدود ۱۵۰۰ گونه و زیرگونه توصیف شده می باشند (۳). خانواده *Buthidae* با ۷۳ جنس و ۵۲۹ گونه، بزرگترین خانواده کژدم هاست و یکی از جنس های آن *Mesobuthus* است. جنس مزوبوتوس در ایران دارای ٥گونه *M.eupeus*، *Mesbuthus eupeus* *M.tamulus* *M.martensii* *M.gibbosus* و *M.vachon* یکی از فراوانترین و گسترده ترین کژدم های ایران است (٤). کژدم زرد *M.eupeus* توسط *koch* در سال ۱۸۳۹ توصیف شد. این کژدم از کشورهای ایران، افغانستان، ارمنستان، پاکستان، ترکیه،چین، گرجستان، عراق، قزاقسان، قرقیزستان، تاجیکستان، ترکمنستان، ازبکستان، مغولستان و ناحیه آستاراخان روسیه گزارش شده است (٥). این کژدم مجدداً توسط پژوهشگرانی مانند: *Birulla* (۱۹۱۱)، *Pocock*(۱۸۸۹)، *Werner* (۱۹۳٤)، *Vachon*(۱۹٦٦)، *Farzenpey* (۱۹٦۸) و *Habibi*(۱۹۷۱) توصیف گردید (٦).

زهر کژدم‌ها، سمیت زیادی برای حیوانات دارد و به منظور بی‌حرکت کردن شکار و یا علیه دشمنان به کار می رود. زهر کژدم‌ها از ترکیبات پیچیده‌ای تشکیل شده است و مرکب از چند پروتئین با وزن مولکولی کم، موکوس، نمک، الیگوپپتید، نوکلئوئید، اسیدهای آمینه و مواد آلی دیگر است. زهر بیشتر کژدم‌هابدون آنزیم بوده و یا این که مقادیر کمی آنزیم دارند (۱). زهر کژدم‌ها در سطوح بسیار بالایی به طور اختصاصی عمل می کند. زهر بعضی از گونه‌ها، شامل یک توکسین است که ترجیحاً برای حشرات سمی است. یکی دیگر برای سخت پوستان و دیگری برای پستانداران سمی است(۱). وزن یک مولکول بعضی از کژدم‌هاین وروتوکسیک[٥]۱۰ برابر کشنده‌تر از سیانید می‌باشد (۲).

در حال حاضر در برخی از کشورها، تنوع داخل گونه ای ترکیب زهر کژدم ها به صورت گسترده ای اهمیت و کاربرد زیادی در درمان کژدم گزیدگی دارد. هرچند تنوع داخل گونه‌ای زهر کژدم‌ها توسط پژوهشگرانی‌مانند *Hassan Anderspm* و *Polis* مورد بحث قرار گرفته است (۷) ولی با توجه به اهمیت موضوع کوشش های نسبتاً کمی برای بررسی چنین گوناگونی صورت گرفته است(۷). در ایران نیز تاکنون کوشش‌های قابل توجهی در این زمینه صورت نگرفته است.

با توجه به این که کژدم گزیدگی، یکی از مشکلات بهداشتی مناطق گرمسیری و خشک دنیا از جمله کشور ایران می باشد و با توجه به اثرات سوء کژدم گزیدگی که موجب ناراحتی زیادی به ویژه در کودکان می گردد و نظر به این که کژدم *M.eupeus* فراوان ترین کژدم ایران است و مسئول گزش ۷۰ـ٤۰ درصد موارد کژدم گزیدگی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

در ایران می باشد (۹و۸) و به دلیل این که مطالعه و شناسایی فراکسیون های زهری این کژدم در نقاط مختلف کشور، فاکتور مهمی در درمان اثرات پاتوفیزیولوژیک زهر و تهیه سرم ضد زهر به روش دقیق تر می باشد، این مطالعه روی کژدم های بومی منطقه کاشان در سال ۱۳۸۰ انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق بنیادی کاربردی از نوع توصیفی بوده و روی تعداد ۱۱۰ نمونه کژدم **M.eupeus** به شرح زیر انجام گرفت.

روش زهرگیری از کژدم M.eupeus:

نمونه های صید شده **M.eupeus** پس از انتقال به آزمایشگاه به صورت انفرادی و در درجه حرارت ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد، طول روز ۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۷۵-۵۰ درصد نگهداری گردید. هر ۱۲-۷ روز یک بار با استفاده از کرم خاکی، لارو و مگس خانگی و نوع بالغ آن و کرم آرد تغذیه شدند. آب مورد نیاز به وسیله پنبه خیس شده به صورت دائمی در اختیار آنها گذاشته شد. برای تهیه زهر مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی از الکتروشوک استفاده گردید. زهر کلیه کژدم ها در یک محل جمع‌آوری و مخلوط شد. مایع رویی زهر پس از سانتریفوژ با ۱۲-۱۰ هزار دور در دقیقه و به مدت ۱۲ دقیقه،جهت آزمایش به کار گرفته شد.

مطالعه اجزاء پروتئین زهر کژدم M.eupeus

اندازه گیری میزان پروتئین زهر گرفته کژدم **M.eupeus** با استفاده از روش برادفورد (*Bradford*)، انجام گرفت. از *BSA* به عنوان پروتئن استاندارد پروتئین های نمونه، استفاده شد.

روش الکتروفورز پلی اکریلی آمید

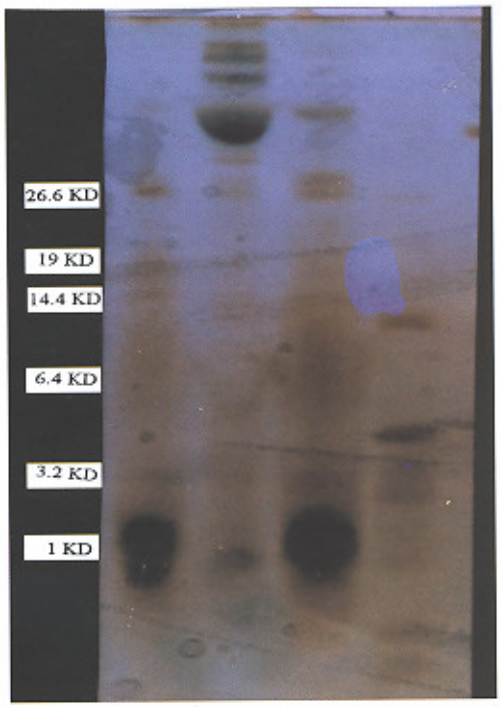
در این روش با استفاده از سیستم *Tricine–PAGE–SDS* که قادر است پروتئین‌های با وزن مولکولی بسیار پائین را نیز نشان دهد اجزای پروتئین زهر کژدم ***M.eupeus*** تعیین شد. برای الکتروفورز زهر کژدم ***M.eupeus*** ابتدا ژل بزرگ (۱۰×۱٤ سانتی متر) *Tricine - SDS - PAGE* با غلظت *C* ۳٪ و *T* ۱٦٪ تهیه شد.

نمونه زهر با بافر نمونه (*Sample buffer*) حاوی بتامرکاپتواتانول در دمای ٦۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از حرارت دادن و سانتریفوژ کوتاه (*Spining*) به هر چاهک حدود ۲۵ میکروگرم پروتئین زهر تزریق شد. ولتاژ الکتروفورز به صورت ثابت روی ۸۰ ولت تنظیم گشت. کار الکتروفورز پس از ۱۵ ساعت به اتمام رسید. پس از جدا کردن، ژل چندین مرتبه در آب شستشو داده شد و با متانول تثبیت(*Fixation*) شد. سپس با استفاده از کوماسی برلیانت بلو *Comassie Brilliant Blue* رنگ‌آمیزی شد. برای محاسبه وزن مولکولی پروتئین های زهر کژدم از یک مارکر پروتئینی به نام *Sigma ultra low Molecular Weight (MW)*استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج پژوهش نشان می‌دهد که در ترکیب باندهای زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* تفاوت هایی وجود دارد. زهر این کژدم پروتئین‌های بیشتری با وزن مولکولی کمتر از مارکر دارد. به عبارت دیگر مارکر دارای فراکسیون های پروتئینی با وزن مولکولی بیشتر می‌باشد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]



عکس ۱- ژل رنگ شده Tricine- SDS- PAGE با غلظت ۳٪C و ۱۶٪T باندهای پروتئین زهر خالص شده کژدم M.eupeus بومی کاشان را در ستون ۱ نشان می دهد.

زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای ٦ باند پروتئینی بود. بالاترین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲٦/٦ کیلو دالتون و پائین ترین باند با وزن مولکولی ۱کیلودالتون بود. جدول شماره ۱ وزن مولکولی باندهای پروتئینی زهر کژدم M..eupeus و مارکر Sigma ultra low MW را نشان می دهد.

جدول ۱: وزن مولکولی باندهای پروتئینی زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* و مارکر استاندارد *Sigma ultra low MW*

باند زهر کژدم *M.eupeus*	وزن مولکولی باند زهر(کیلودالتون)	باندپروتئین مارکر	وزن مولکولی باند مارکر (کیلودالتون)
۱	۲٦/٦	۱	٤۱
۲	۱۹	۲	۳٦
۳	۱٤/٤	۳	۳۵/۷
٤	٦/٤	٤	۲۸
۵	۳/۲	۵	۲۳
٦	۱	٦	۱٤/۱
–	–	۷	۱۰
–	–	۸	۵/۵

بحث

تحقیق نشان داد زهر کژدم **M.eupeus** دارای ٦ باند پروتئینی با وزن مولکولی متفاوت از باندهای مارکر استاندارد می باشد. گونه های زیادی از کژدم‌ها در ایران وجود دارند. **M.eupeus** یکی از فراوان ترین آنها می باشد که در نواحی مختلف ایران موجب گزش افراد محلی می‌شود(۱۱-۸). این کژدم به صورت گسترده ای در قاره آسیا از ترکیه تا مغولستان وجود داشته و دارای زیرگونه‌های متعددی است که ۹ زیرگونه آن از ایران گزارش شده است(٦).رادمنش در سال ۱۳٦۹، گزارش نمود که۷۰ درصد موارد کژدم گزیدگی در اهواز مربوط به **M.eupeus** می باشد(۱۲). همچنین چیت‌نویس و همکاران در سال ۱۳۷٦، ۵۰درصد موارد کژدم گزیدگی فصل بهار در خوزستان را و دهقانی و همکاران در سال ۱۳۷۷، ٦۲درصد کژدم گزیدگی کاشان را مربوط به **M.eupeus** دانسته اند(۱۰و۹).**Hassan** در سال ۱۹۸٦ گزارش کرده است که **LD50** زهر کژدم **M.eupeus** برای موش هایی به وزن ۱۸-۱٦ گرم به میزان ۱/٤۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (۱۳). توکسین **M.eupeus** دارای زنجیره کوتاه با ، ٤۰-۳۵ اسید آمینه است(۱). هدف اولیه زهر این کژدم، کانال های یونی وابسته به ولتاژ الکتریکی می باشد که موجب طولانی‌تر شدن فعالیت نرون می‌شود(۱٤). سیستم عصبی به دلیل افزایش بیشتر تحریکات نرون متأثر می گردد (۱۵) و در نتیجه مقادیر آسیب‌زننده ناقلین عصبی (**neurotransmitters**) افزایش می یابد. توکسین‌های با زنجیرهٔ بلند پلی‌پپتید (۷۰-٦۰ اسیدآمینه)، مستقیماً کانال سدیم و زنجیره‌های کوتاهتر (٤۰-۳۰ اسید آمینه) مستقیماً به کانال های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

پتاسیم هدایت می‌شوند. بعضی از پلی‌پپتیدهای باز زنجیره بلند در جاهای مختلفی روی کانال سدیم مهره‌دار و حشره میل ترکیبی دارند.

پژوهشگران گزارش نموده‌اند که وزن مولکولی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی کوتاه توکسین ۲/۵ تا ۵ کیلودالتون و وزن مولکولی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی زهر بین ۸-٦ کیلودالتون می‌باشد(۸). این بررسی نشان داد که زهر کژدم **Mesobuthus eupeus** دارای ٦باند پروتئینی است که وزن مولکولی این باندها از یک تا ۲٦/٦کیلودالتون متغیر است. می‌توان نتیجه گرفت که زهر کژدم مزبور دارای زنجیره‌های بلند و کوتاه پلی‌پپتیدی است و با توجه به این که زنجیره‌های بلند توکسین روی کانال‌های سدیم و زنجیره‌های کوتاه روی کانال‌های پتاسیم اثر می‌گذارند، می‌توان اینطور نتیجه‌گیری کرد که زهر کژدم **M.eupeus**، روی هر دو کانال سدیم و پتاسیم میزبان تأثیر می‌گذارد.

به دلیل این که **M.eupeus** در بیشتر نواحی ایران پراکندگی داشته و با رژیم‌های آب و هوایی گوناگون سازش کرده است، احتمالاً نسبت هر توکسین به دلیل فشار انتخاب طبیعی و فاکتورهای ژنتیکی متغیر است. این تنوع داخل گونه‌ای ترکیب زهر به لحاظ جغرافیایی ممکن است در چگونگی و نحوه درمان اثرات پاتوفیزیولوژیکی توکسین این کژدم با اهمیت باشد.

پژوهشگران از باندهای پروتئینی زهر در توصیف و تفسیر روابط فیلوژنتیک استفاده نموده‌اند(۸).

با توجه به این موضوع با مطالعه زهر کژدم **M.eupeus** در دیگر نقاط کشور می‌توان تفاوت‌های زیرگونه کژدم **M.eupeus** را بطور دقیق نشان داد و به سردرگمی تعداد زیرگونه‌های این کژدم پایان داد و به اطلاعات دقیق‌تری از پراکندگی آن در سطح کشور دست یافت.

همچنین با شناسایی فراکسیون‌های زهر این کژدم در این بررسی، در تحقیقات بعدی می‌توان قوی‌ترین فراکسیون زهر را که سمیت بیشتری برای انسان و یا حیوانات داشته است، شناسایی کرد و سپس به تهیه سرم ضد زهر مناسب‌تری اقدام نمود.

REFERENCES:

1. Polis GA. The Biology of Scorpion. Stanford University Press, California, usa. 1990: 587.

2. Gwee MCE, Cheah LS, Gopalak K, et al. Studies on venoms from the black Scorpion heterometrus longimanus and some other scorpion species. J Toxicol Toxin Rev 1996; 15(1): 37-57.

3. Lorenco Wilson R. The scorpion, families and other Geographical distribution. Journal Venomous Animal and Toxins 2001;17(1):3 – 23.

4. Farzanpay R. A catalogue of The Scorpions occurring in Iran, up to January 1986. Rev Arachnol 1988; 8:33.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

5. Fet V, Ya. Funa and Zeogeography of Scorpions (Arachnida: Dcorpions) in Turkmensitan. In: Fet, V Ya & Atamuradouv KL (eds). Biogeography and Ecology of Turkmenistan. Netherland: Kluwer Acad. 1994:525-34.

6. Farzanpay R. Mesobuthus eupeus, an indigenous scorpion from Iran; Origin and its geographical distribution. Actas X Congr Int Aracnol Jaca/Espana 1986; 1: 333-35.

7. Omran Mohamad A, Mevean Alistair.Transpecific variation scorpion leiurus quinguestriatus venom collected from Egypt (Sinai and Aswan Deserts). J Toxicol - Toxin Rev 2000; 19(384): 247 – 64.

8. Radmanesh M. Androctonus crassicauda Sting and its clinical study in Iran. J Trop Med Hyg 1990; 93:325-26.

۹. دهقانی روح اله، خادمی محمد رضا، سیاح منصور. بررسی موارد کژدم گزیدگی درکاشان،مجله علمی‌پژوهشی، دانشگاه علـــوم پزشکی و خدمات بهداشت و درمان استان اصفـــهان،۱۳۷۷؛ سال سوم،شـــماره ۲، تابستان ۱۳۷۷، صفحات ۱۳۵-۱۳۲.

۱۰. چیت نویس پاداماگار علی، مراغی شریف، وزیریان زاده بابک. بررسی اپیدمیولوژی و آزمایشگاهی عقرب‌زدگی در خوزستان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گیلان ۱۳۷۲؛ سال دوم، شماره ۸، صفحات ۱۲-۵.

۱۱. رادمنش محمد. بررسی همگانی کژدم گزیدگی. مجله دارو درمان ۱۳۶۹؛ سال هشتم، صفحات ۳۰-۲۶.

۱۲. رادمنش محمد. گزیدگی کژدم مزبوتوس انیوپیوس و بررسی بالینی آن. مجله دارو و درمان. ۱۳۶۹؛ سال هفتم، خرداد ۱۳۶۹.

13. Hassan F. Production of scorpions Antivenom. In: Handbook of Natural Toxins. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984; 577-605.

14. Bosh Sean P, Gerardo Charles. Scorpion Envenomations E Med J2001; 2(9).

15. Zlotkin E, Miranda F, Rochat H. Chemistry and pharmacology of Buthinae Scorpion venoms. In Bettini, SS, ed. Handbook of Experimental Pharmacology Arthropod Venoms. 1978.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]