

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

دکتر روح اله دهقانی^۱، دکتر سیاوش تیرگری^۲، دکتر حسن وطن دوست^۲، دکتر میرلطیف موسوی^۳، جمیل زرگان^۳

فیروز ابراهیمی^۳

چکیده

سابقه و هدف: کژدم *Mesobuthus eupeus* یکی از فراوانترین گونه های جنس *Mesobuthus* و متعلق به خانواده *Buthidae* می باشد. 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 فراکسیون های زهر کژدم ها می تواند فاکتور مهمی در درمان اثرات باتوفیزیولوژیک و شناخت داخل گونه ای آنان باشد، این مطالعه به منظور تعیین فراکسیون های زهر کژدم *M. eupeus* در سال ۱۳۸۰ انجام گردید.

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

یافته ها: زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای ۶ باند پروتئینی بود. بالاترین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶/۶ کیلودالتون و پائین ترین باند با وزن مولکولی ۱ کیلودالتون 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 هوایی گوناگون زندگی می کند، مطالعه زهر کژدم در هر منطقه، علاوه بر کمک به درمان اثرات باتوفیزیولوژیک آن و تهیه دقیق تر آنتی و تویم بر ضد فراکسیون زهری، می تواند تفاوت های داخل گونه ای را، با توجه به نوع رژیم آب و هوایی مشخص نماید که انجام این مطالعه را توصیه می کند.

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

۱ - دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲ - دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳ - دانشکده علوم پایه - دانشگاه امام حسین (ع)

مقدمه

کژدم‌ها، به خاطر سازش‌های گوناگون، مرفولوژی، فیزیولوژی، اکولوژی و رفتاری از ۴۵۰ میلیون سال پیش تاکنون می‌زیسته‌اند. اعتقادات قدیمی و افسانه‌ها، کژدم‌ها را به عنوان عوامل اهریمن معرفی نموده‌اند و آنها را نشانه تبه‌کاری و گناه دانسته‌اند (۱). علیرغم این شهرت ناپسند، اکنون کژدم‌ها، به صورت گسترده‌ای توسط دانشمندان رشته‌های مختلف بیولوژی و فارماکولوژی، بیولوژی مولکولی، شیمی، بیوفیزیک و درمانگران، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲). راسته کژدم‌ها، دارای ۲۰ خانواده زنده و حدود ۱۵۰۰ گونه و زیرگونه توصیف شده می‌باشند (۳). خانواده *Buthidae* با ۷۳ جنس و ۵۲۹ گونه، بزرگترین خانواده کژدم‌هاست و یکی از جنس‌های آن *Mesobuthus* است. جنس *Mesobuthus* در ایران دارای ۵ گونه *M. eupeus*، *Mesobuthus eupeus* و *M. tamulus*، *M. martensii*، *M. gibbosus* و *M. vachon* یکی از فراوان‌ترین و گسترده‌ترین کژدم‌های ایران است (۴). کژدم زرد *M. eupeus* توسط *koch* در سال ۱۸۳۹ توصیف شد. این کژدم از کشورهای ایران، افغانستان، ارمنستان، پاکستان، ترکیه، چین، گرجستان، عراق، قزاقستان، قرقیزستان، تاجیکستان، ترکمنستان، ازبکستان، مغولستان و ناحیه آستاراخان روسیه گزارش شده است (۵). این کژدم مجدداً توسط پژوهشگرانی مانند: *Birulla* (۱۹۱۱)، *Pocock* (۱۸۸۹)، *Werner* (۱۹۳۴)، *Vachon* (۱۹۶۶)، *Farzenpey* (۱۹۶۸) و *Habibi* (۱۹۷۱) توصیف گردید (۶).

زهر کژدم‌ها، سمیت زیادی برای حیوانات دارد و به منظور بی‌حرکت کردن شکار و یا علیه دشمنان

به کار می‌رود. 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 کژدم‌ها بدون آنزیم بوده و یا این که مقادیر کمی آنزیم دارند (۱). زهر کژدم‌ها در سطوح بسیار بالایی به طور اختصاصی عمل می‌کند. 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 کژدم‌های وروتوکسیک 10^5 برابر کشنده‌تر از سیانید می‌باشد (۲).

در حال حاضر در برخی از کشورها، تنوع داخل گونه‌ای ترکیب زهر کژدم‌ها به صورت گسترده‌ای اهمیت و کاربرد زیادی در درمان کژدم‌گزیدگی دارد. هرچند تنوع داخل گونه‌ای زهر کژدم‌ها توسط پژوهشگرانی مانند *Hassan Anderspm* و *Polis* مورد بحث قرار گرفته است (۷) ولی با توجه به اهمیت موضوع کوشش‌های 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 کژدم‌گزیدگی، یکی از مشکلات بهداشتی مناطق گرمسیری و خشک دنیا از جمله کشور ایران می‌باشد و با توجه به اثرات سوء کژدم‌گزیدگی که موجب ناراحتی زیادی به ویژه در کودکان می‌گردد و نظر به این که کژدم *M. eupeus* فراوان‌ترین کژدم ایران است و مسئول گزش ۷۰-۴۰ درصد موارد کژدم‌گزیدگی

پروتئین زهر کژدم *M.eupeus* تعیین شد. برای الکتروفورز زهر کژدم *M.eupeus* ابتدا ژل بزرگ (۱۴×۱۰ سانتی متر) *Tricine - SDS - PAGE* با غلظت ۳٪ C و ۱۶٪ T تهیه شد.

نمونه زهر با بافر نمونه (Sample buffer) حاوی بتامرکاپتواتانول در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از حرارت دادن و سانتیفوژ 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* رنگ آمیزی شد. برای محاسبه وزن مولکولی پروتئین های زهر کژدم از یک مارکر پروتئینی به نام *Sigma ultra low Molecular Weight* (MW) استفاده شد.

یافته ها

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

در ایران می باشد (۸ و ۹) 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 روش ها

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

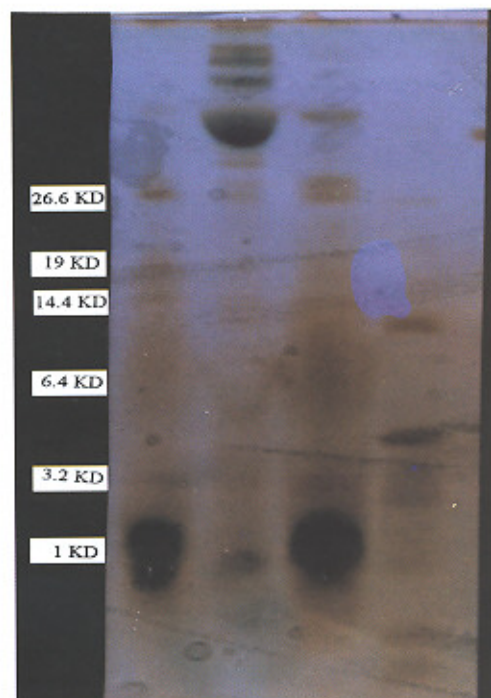
روش زهرگیری از کژدم *M.eupeus*: نمونه های صید شده *M.eupeus* پس از انتقال به آزمایشگاه به صورت انفرادی و در درجه حرارت ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد، طول روز ۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۷۵-۵۰ درصد نگهداری گردید. هر ۷-۱۲ روز یک بار با استفاده از کرم خاکی، لارو و مگس خانگی و نوع بالغ آن و کرم آرد تغذیه شدند. آب مورد نیاز 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 جمع آوری و مخلوط شد. مایع رویی زهر پس از سانتیفوژ با ۱۰-۱۲ 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 پروتئین استاندارد پروتئین های نمونه، استفاده شد. روش الکتروفورز پلی اکریلی آمید در این روش با استفاده از سیستم *Tricine-PAGE-SDS* که قادر است پروتئین های با وزن مولکولی بسیار پائین را نیز نشان دهد اجزای

بحث

تحقیق نشان داد زهر کژدم *M.eupeus* دارای ۶ باند پروتئینی با وزن مولکولی متفاوت از باندهای مارکر استاندارد می باشد. گونه های زیادی از کژدم ها در ایران وجود دارند. *M.eupeus* یکی از فراوان ترین آنها می باشد که در نواحی مختلف ایران موجب گزش افراد محلی می شود (۸-۱۱). این کژدم به صورت گسترده ای در قاره آسیا از ترکیه تا مغولستان وجود داشته و دارای زیرگونه های متعددی است که ۹ زیرگونه آن از ایران گزارش شده است (۶). رادمنش در سال ۱۳۶۹، گزارش نمود که ۷۰ درصد موارد کژدم گزیدگی در اهواز مربوط به *M.eupeus* می باشد (۱۲). همچنین چیت نویس و همکاران در سال ۱۳۷۶، ۵۰ درصد موارد کژدم گزیدگی فصل بهار در خوزستان را و دهقانی و همکاران در سال ۱۳۷۷، ۶۲ درصد کژدم گزیدگی کاشان را مربوط به *M.eupeus* دانسته اند (۹ و ۱۰). Hassan در سال ۱۹۸۶ گزارش کرده است که LD50 زهر کژدم *M.eupeus* برای موش هایی به وزن ۱۶-۱۸ گرم به میزان ۱/۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم است (۱۳). توکسین *M.eupeus* دارای زنجیره کوتاه با ۴۰-۳۵ اسید آمینه است (۱). هدف اولیه زهر این کژدم، کانال های یونی وابسته به ولتاژ الکتریکی می باشد که موجب طولانی تر شدن فعالیت نرون می شود (۱۴). سیستم عصبی به دلیل افزایش بیشتر تحریکات نرون متأثر می گردد (۱۵) و در نتیجه مقادیر آسیب زننده ناقلین عصبی (neurotransmitters) افزایش می یابد. توکسین های با زنجیره بلند پلی پپتید (۷۰-۶۰ اسید آمینه)، مستقیماً کانال سدیم و زنجیره های کوتاه تر (۴۰-۳۰ اسید آمینه) مستقیماً به کانال های



عکس ۱- ژل رنگ شده

Tricine- SDS- PAGE با غلظت ۳C و ۱۶T باند های پروتئین زهر خالص شده کژدم *M.eupeus* بومی کاشان را در ستون ۱ نشان می دهد.

زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای ۶ باند پروتئینی بود. بالاترین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶/۶ کیلو دالتون و پائین ترین باند با وزن مولکولی ۱ کیلو دالتون 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			
وزن مولکولی باند	باند پروتئین مارکر	وزن مولکولی باند زهر (کیلو دالتون)	باند زهر کژدم <i>M.eupeus</i>
۴۱	۱	۲۶/۶	۱
۳۶	۲	۱۹	۲
۳۵/۷	۳	۱۴/۴	۳
۲۸	۴	۶/۴	۴
۲۳	۵	۳/۲	۵
۱۴/۱	۶	۱	۶
۱۰	۷	-	-
۵/۵	۸	-	-

ژنتیکی متغیر است. این تنوع داخل گونه ای 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 نموده اند (۸).

با توجه به این موضوع با مطالعه زهر کژدم *M. eupeus* در دیگر نقاط کشور می توان تفاوت های زیرگونه کژدم *M. eupeus* را بطور دقیق نشان داد و به سردرگمی تعداد زیرگونه های این کژدم پایان داد و به اطلاعات دقیق تری از پراکندگی آن در سطح کشور دست یافت.

همچنین با شناسایی فراکسیون های زهر این کژدم در این بررسی، در تحقیقات بعدی می توان قوی ترین فراکسیون زهر را که سمیت بیشتری برای انسان و یا حیوانات داشته است، شناسایی کرد و سپس به تهیه سرم ضد زهر مناسب تری اقدام نمود.

پتاسیم هدایت می شوند. بعضی از پلی پپتیدهای باز زنجیره بلند در جاهای مختلفی روی کانال سدیم مهره دار و حشره میل ترکیبی دارند.

پژوهشگران گزارش نموده اند که وزن مولکولی زنجیره های پلی پپتیدی کوتاه توکسین ۲/۵ تا ۵ کیلودالتون و وزن مولکولی زنجیره های پلی پپتیدی زهر بین ۸-۶ کیلودالتون می باشد (۸). این بررسی نشان داد که زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای ۶ باند پروتئینی است که وزن مولکولی این باندها از یک تا ۲۶/۶ کیلودالتون متغیر است. می توان نتیجه گرفت که زهر کژدم مزبور دارای زنجیره های بلند و کوتاه پلی پپتیدی است و با توجه به این که زنجیره های بلند توکسین روی کانال های سدیم و زنجیره های کوتاه روی کانال های پتاسیم اثر می گذارند، می توان اینطور نتیجه گیری کرد که زهر کژدم *M. eupeus* روی هر دو کانال سدیم و پتاسیم میزبان تأثیر می گذارد.

به دلیل این که *M. eupeus* در بیشتر نواحی ایران پراکندگی داشته و با رژیم های آب و هوایی گوناگون سازش کرده است، احتمالاً نسبت هر توکسین به دلیل فشار انتخاب طبیعی و فاکتورهای

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. Lorenzo 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.

5. Fet V, Ya. Funa and Zeogeography of Scorpions (Arachnida: Dcorpions) in Turkmenistan. In: Fet, V Ya & Atamuradov 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 در کاشان، مجله علمی پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشت و درمان استان اصفهان، ۱۳۷۷؛ سال سوم، شماره ۲، تابستان ۱۳۷۷، صفحات ۱۳۵-۱۳۲.
۱۰. چیت نویس پادامآگار علی، مراغی شریف، وزیریان زاده بابک. بررسی اپیدمیولوژی و آزمایشگاهی عقرب زدگی 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 انیوپپوس 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.