

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

دکتر روح الله 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 *Buthidae* و متعلق به خانواده *Buthidae* می‌باشد. این کژدم از پیشتر نشاط ایران گزارش شده است و یکی از عوامل اصلی گزیدگی در کشور محسوب می‌شود. 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 فراکسیون‌های زهر کژدم *M. eupeus* در سال ۱۳۸۰ انجام گردید.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر یک مطالعه بنیادی به روش توصیفی می‌باشد. پس از تهیه ۵ لیترگ میکرونیزه از زهر به هر چاهک، ولتاژ الکتروفورز روی ۸۰ ولت تنظیم و ثابت گردید. پس از اتمام الکتروفورز بعد از ۱۵ ساعت، ۵ لیتر چندین بار شستشو و با میکرونیزه از مولکولی پروتئین‌های زهر از مارکر پروتئینی *Sigma ultra low MW* استفاده شد.

یافته‌ها: زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* دارای آبیند پروتئینی بود. بالاترین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶/۶ کیلو Dalton و یافته‌نیزین باند با وزن مولکولی ۱ کیلو Dalton بود. زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* پروتئین‌های بیشتری با وزن مولکولی کمتر از مارکر *Sigma ultra low MW* دارد.

نتیجه گیری و توصیه‌ها: با توجه به این کژدم در پیشتر نقاط ایران و در اقلیم‌های آب و هوایی گوناگون زندگی می‌کند، مطالعه زهر کژدم در هر منطقه، علاوه بر کمک به درمان اثرات پاتوفیزیولوژیک آن و تهیه دقیق‌تر آنتی و نوم بر ضد فرماکسیون زهری، می‌تواند تفاوت‌های داخل گونه‌ای را، با توجه به نوع رژیم آب و هوایی مشخص نماید که اتحام این مطالعه را توصیه می‌کند.

وازگان کلیدی: فرماکسیون‌های 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)

به کار می رود. زهر کژدمها از ترکیبات پیچیده‌ای تشکیل شده است و مرکب از چند پروتئین با وزن مولکولی کم، موکوس، نمک، الیگوپیتید، نوکلئوتید، 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 10^5 برابر کشنده‌تر از سیانید می باشد (۲).

در حال حاضر در برخی از کشورها، تنوع داخل گونه ای ترکیب زهر کژدمها به صورت گستره ای اهمیت و کاربرد زیادی در درمان کژدم گزیدگی دارد. هرچند تنوع داخل گونه‌ای زهر کژدمها توسط پژوهشگرانی مانند *Polis Hassan Anderspm* و *Farzenpey* 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 کژدم گزیدگی، یکی از مشکلات بهداشتی مناطق گرسیری 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 ۴۰٪ درصد موارد کژدم گزیدگی

مقدمه
کژدم‌ها، به خاطر سازش‌های گوناگون، مرفولوزی، فیزیولوزی، اکولوزی و رفتاری از ۴۰ میلیون سال پیش تاکنون می زیسته اند. اعتقدات قدیمی و افسانه‌ها، کژدم‌ها را به عنوان عوامل اهریمن معرفی نموده اند و آنها را نشانه تبهکاری و گناه دانسته اند (۱). علیرغم این شهرت ناپسند، اکنون کژدم‌ها، به صورت گستره‌ای توسط دانشمندان رشته‌های مختلف بیولوزی و فارماکولوزی، بیولوزی مولکولی، شیمی، بیوفیزیک و درمانگران، مورد مطالعه قرار گرفته اند (۲). راسته کژدم‌ها، دارای ۲۰ خانواده زنده و حدود ۱۵۰ گونه و زیرگونه توصیف شده می باشند (۳). خانواده *Butidae* با ۷۳ جنس و ۵۲۹ گونه، بزرگترین خانواده کژدم‌هاست و یکی از جنس‌های آن *Mesobuthus* است. جنس *M.eupeus*، *Mesobuthus eupeus* و *M.tamulus* *M.martensii* *M.gibbosus* *M.vachon* یکی از فراوانترین و گستره‌ترین 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، قرقاسان، قرقیزستان، تاجیکستان، ترکمنستان، ازبکستان، مغولستان و ناحیه آستاناخان روسیه گزارش شده است (۵). این کژدم مجدداً توسط پژوهشگرانی مانند: *Pocock* (۱۸۸۹)، *Birulla* (۱۹۱۱)، *Farzenpey* (۱۹۶۶)، *Vachon* (۱۹۳۴)، *Werner* (۱۹۶۸) و *Habibi* (۱۹۷۱) توصیف گردید (۶). زهر کژدم‌ها، سمیت زیادی برای حیوانات دارد و به منظور بی حرکت کردن شکار و یا علیه دشمنان

بروتین زهر کژدم *M.eupeus* تعیین شد. برای الکتروفورز زهر کژدم *M.eupeus* ابتدا ژل بزرگ *Tricine - SDS - PAGE* (۱۰×۱۴ سانتی متر) با غلظت *C* ۳٪ و *T* ۱۶٪ 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 سانتریفیوژ کوتاه (*Spining*) به هر چاهک حدود ۲۵ میکروگرم پروتین 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 ثبیت (*Fixation*) شد. سپس با استفاده از کوماسی بریلیانت بلو *Comassie Brilliant Blue* رنگ آمیزی شد. برای محاسبه وزن مولکولی پروتین های زهر کژدم از یک مارکر بروتینی به *Sigma ultra low Molecular Weight* نام (*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 پروتین های بیشتری با وزن مولکولی کمتر از مارکر دارد. به عبارت دیگر مارکر دارای فراکسیون های بروتینی با وزن مولکولی بیشتر می باشد.

در ایران می باشد (۹۰۷) 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 ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد، طول روز ۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۵۰-۷۵ 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 الکتروشوك استفاده گردید. زهر کلیه کژدم ها در یک محل جمع آوری و مخلوط شد. مایع رویی زهر پس از سانتریفیوژ با ۱۰-۱۲ هزار دور در دقیقه و به مدت ۱۲ دقیقه، جهت آزمایش به کار گرفته شد.

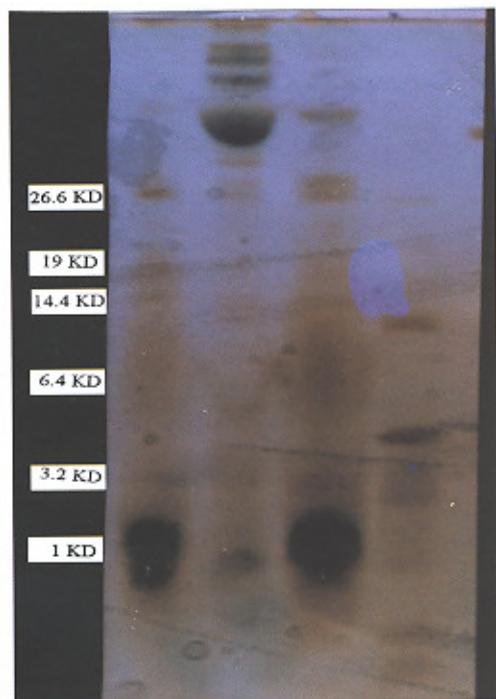
مطالعه اجزاء پروتین زهر کژدم *M.eupeus*

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

در این روش با استفاده از سیستم *-Tricine PAGE-SDS* که قادر است پروتین 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 می‌باشد. گونه‌های زیادی از کژدم‌ها در ایران وجود دارند. *M.eupeus* یکی از فراوان ترین آنها می‌باشد که در نواحی مختلف ایران موجب گزش افراد محلی می‌شود(۱۱-۱۲). این کژدم به صورت گسترشده‌ای در قاره آسیا از ترکیه تا مغولستان وجود داشته و دارای زیرگونه‌های متعددی است که ۹ زیرگونه آن از ایران گزارش شده است(۱۳). رادمنش در سال ۱۳۶۹، گزارش نمود که ۷۰ درصد موارد کژدم گزیدگی در اهواز مربوط به *M.eupeus* می‌باشد(۱۴). همچنین چیتنویس و همکاران در سال ۱۳۷۶، ۵۰ درصد موارد کژدم گزیدگی فصل بهار در خوزستان را و دهقانی و همکاران در سال ۱۳۷۷، ۶۲ درصد *M.eupeus* کژدم گزیدگی کاشان را مربوط به ۱۹۸۶ دانسته‌اند(۱۵). Hassan در سال ۱۹۸۶ گزارش کرده است که LD₅₀ زهر کژدم *M.eupeus* برای موش‌هایی به وزن ۱۶-۱۸ گرم به میزان ۱/۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (۱۶). توکسین *M.eupeus* دارای زنجیره کوتاه با، ۳۵-۴۰ اسید آمینه است(۱). هدف اولیه زهر این کژدم، کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ الکتریکی می‌باشد که موجب طولانی‌تر شدن فعالیت نرون می‌شود(۱۷). سیستم عصبی به دلیل افزایش بیشتر تحريكات نرون متأثر می‌گردد (۱۸) و در نتیجه مقادیر آسیب‌زننده ناقلين عصبی (neurotransmitters) افزایش می‌یابد. توکسین‌های با زنجیره بلند پلی‌پپتید (۶۰-۷۰ اسید آمینه)، مستقیماً کانال سدیم و زنجیره‌های کوتاهتر (۳۰-۴۰ اسید آمینه) مستقیماً به کانال‌های



عکس ۱- ژل رنگ شده

Tricine- SDS- PAGE با غلظت ۳٪ و T/۱۶C

باندهای پروتئین زهر خالص شده کژدم *M.eupeus* بومی کاشان را در ستون ۱ نشان می‌دهد.

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 Sigma ultra low MW و مارکر *M..eupeus*

را نشان می‌دهد.

جدول ۱: وزن مولکولی باندهای پروتئینی زهر کژدم *Mesobuthus eupeus* و مارکر استاندارد

Sigma ultra low MW

وزن مولکولی باند مارکر	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
۲۰/۷	۳	۱۴/۴	۳
۲۸/۰	۴	۷/۴	۴
۲۳	۵	۳/۲	۵
۱۴/۱	۶	۱	۶
۱۰	۷	-	-
۵/۰	۸	-	-

ژنتیکی متغیر است. این تنوع داخل گونه‌ای ترکیب زهر به لحاظ جغرافیایی ممکن است در چگونگی و نحوه درمان اثرات پاتوفیزیولوژیکی توکسین این کزدم با اهمیت باشد.

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

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

همچنین با شناسایی فراکسیون‌های زهر این کزدم 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.

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

پژوهشگران گزارش نموده‌اند که وزن مولکولی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی کوتاه توکسین ۲/۵ تا ۵ کیلو Dalton و وزن مولکولی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی زهر بین ۶-۸ کیلو Dalton می‌باشد(۸). این بررسی *Mesobuthus eupeus* نشان داد که زهر کزدم دارای ۶ باند پروتئینی است که وزن مولکولی این باندها از یک تا ۲۶/۶ کیلو Dalton متغیر است. می‌توان نتیجه گرفت که زهر کزدم 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 پتاسمی اثر می‌گذارند، می‌توان اینطور نتیجه گیری کرد که زهر کزدم *M.eupeus* روی هر دو کانال سدیم و پتاسمی 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

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. Lorenc 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: Dscorpions) 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 leurus 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 الله، 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 ۱۳۲-۱۳۵.

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

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

۱۲. رادمنش محمد. گزیدگی کژدم مزبتوس انتیبیوس 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.