

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

دکتر روح اله دهقانی^۱، دکتر سیاوش تیرگری^۲، دکتر حسن وطن دوست^۳، 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 تسهیه ژل بسزرگ *Tricine - SDS - PAGE* و حرارت دادن نمونه زهر با بافر حاوی مرکاپتوانانول و تزیق 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 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 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 نوم 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

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 کژدم‌ها بدون 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 مـولکول بعضی از کژدم‌ها این وروتوکسیک^{۱۰۵} برابر کشنده‌تر از سیانید می باشد (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 گونه ای زهر کژدم‌ها توسط پژوهشگرانی مانند *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 کوشش های 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 ۷۰-۴۰ درصد موارد کژدم گزیدگی

کژدم‌ها، به خاطر سازش‌های گوناگون، مرفولوژی، فیزیولوژی، اکولوژی و رفتاری از ۴۵۰ 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 تبه کاری 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 مـزوبوتوس در ایران دارای ۵ گونه *M. eupeus*، *Mesbuthus eupeus* و *M. tamulus* *M. martensii* *M. gibbosus* یکی از فراوانترین و گسترده ترین کژدم های 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، قزاقسان، 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 بی حرکت کردن شکار و یا علیه دشمنان

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 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* 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 سانتریفوژ با ۱۲-۱۰ هزار دور در دقیقه و به مدت ۱۲ دقیقه، جهت آزمایش به کار گرفته شد.

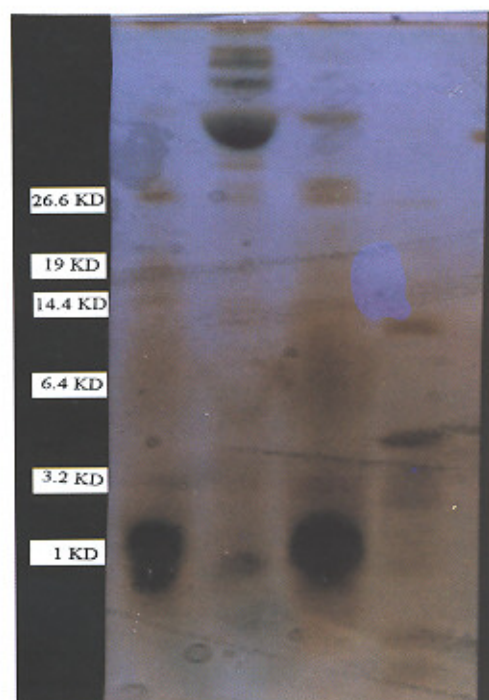
مطالعه اجزاء پروتئین زهر کژدم *M.eupeus*

اندازه گیری میزان پروتئین زهر گرفته کژدم *M.eupeus* با استفاده از روش برادفورد (Bradford)، انجام گرفت. از *BSA* به عنوان 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 کژدمها 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 زنده 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 (۳۰-۴۰ 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 مارکر (کیلو دالتون) | 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 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.

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 ۶-۸ کیلودالتون می‌باشد (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. 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

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 & 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.
9. 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 پادامگار 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 انیوپوس 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.