دوفصلنامه طبّ جنوب
مرکز پژوهش‌های سلامت خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نهم، شماره ۱، صفحه ۱۹ - ۹ (شهریور ۱۳۸۵)

جداسازی و خالص‌سازی فراکسیون‌های سمی زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس

دکتر منیژه کدخدائی الیادرانی[۱]، حسین حنیفی[۲]، زهره آموزگاری[۳]

[۱] استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور
[۲] دانش آموخته بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور
[۳] کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

چکیده

زمینه: عقرب مزوبوتوس اپیوس (**Mesobuthus eupeus**) از عقرب‌های خانواده بوتیده (**Buthidae**) بومی ایران به ویژه در منطقه خوزستان می‌باشد. زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده از ترکیبات فعال بیولوژیکی مختلف از جمله انواع توکسین‌ها تشکیل شده است. این توکسین‌ها انواع مختلفی از کانال‌های یونی بدن حشرات و یا پستانداران را تحت تأثیر قرار می‌دهند. جهت مطالعه اجزاء سمی در زهر عقرب ابتدا لازم است این اجزاء خالص شوند، لذا در این مطالعه فراکسیون‌های سمی زهر عقرب جداسازی و سمی‌ترین آنها خالص شدند.

روش‌کار: اجزاء سمی زهر خام عقرب مزوبوتوس اپیوس به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس **G-۵۰** در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار **pH=۴/۷** جداسازی شد. سپس اجزاء سمی‌ترین فراکسیون بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی جدا شد و خلوص آنها بوسیله الکتروفورز مورد تائید قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین زهر خام که روی ستون سفادکس **G-۵۰** برده شد، ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین در ۶ فراکسیون تفکیک شده بدست آمد. فراکسیون‌های **III** و **IV** برای موش‌ها اثر سمی داشتند و **LD۵۰** (**Lethal Dose 50**) آنها به ترتیب ۰/۴۰ و ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد. فراکسیون سوم به ۲۰ زیرفراکسیون تفکیک شد، که با بررسی سمیت آنها بر روی موش‌ها مشخص گردید که زیرفراکسیون‌های **III.14** تا **III.19** دارای اثر سمی بودند. از ۲۵۰ میلی‌گرم پروتئین فراکسیون **III** که روی ستون برده شد، ۲۴۲/۷۵ میلی‌گرم (۹۷ درصد) در زیرفراکسیون‌های تفکیک شده بدست آمد. زیرفراکسیون **III.14.2**، **III.14.3** و **III.14.4** برای موش‌ها سمی بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه سه توکسین به صورت خالص بدست آمد. توکسین **III.14.4** با **LD۵۰** برابر با ۰/۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، بیشترین سمیت را دارا بود. از این سه توکسین خالص می‌توان در تحقیقات بعدی در تهیه آنتی سرم و یا مطالعه خصوصیات ساختمانی و اثرات فیزیولوژی فارماکولوژی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: مزوبوتوس اپیوس، زهر، عقرب، توکسین

دریافت مقاله: ۸۴/۷/۷ - پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۱

* اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

Email: kadkhodaeim@hotmail.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

مقدمه

به طور کلی عقرب‌های ایران متعلق به دو خانوادهٔ بوتیده و اسکورپیونیده می‌باشند. عقرب مزوبوتوس اپیوس (Mesobuthus eupeus) متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده است. این عقرب یکی از فراوان‌ترین عقرب‌های موجود در خوزستان است. عقرب زدگی یکی از مشکلات عمدهٔ پزشکی در بسیاری از کشورهای گرمسیری است. اکثر عقرب زدگی‌ها عمدتاً ناشی از عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشند. در خوزستان حدود ۴۵ درصد عقرب گزیدگی‌ها مربوط به مزوبوتوس است (۱ و ۲). ترکیبات تشکیل دهندهٔ زهر عقرب و مقدار آنها به نوع عقرب بستگی دارد. زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس، اولیگوپپتیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آمینه و انواع توکسین‌ها تشکیل شده است. این توکسین‌ها به ویژه کانال‌های یونی سدیم و پتاسیم وابسته به ولتاژ در غشای سلول‌های عصبی را مورد هدف قرار می‌دهند (۳ و ۴). این عمل باعث طولانی شدن پتانسیل عمل و یا تحریک پی‌درپی سلول‌های عصبی و تجمع یون‌های کلسیم یا سدیم در سلول می‌شود که نتیجه نهایی آن آزاد شدن غیر فعال نروترانسمیترها از بافت‌های تحت تأثیر قرار گرفته، است (۵). زهر عقرب‌ها به ویژه عقرب‌های خانواده بوتیده حاوی انواع مختلفی از توکسین‌ها می‌باشند. توکسین‌های زنجیره بلند با ۷۰-۶۰ توالی اسید آمینه و چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای عمدتاً بر روی کانال‌های سدیمی عمل می‌کنند (۶). توکسین‌های زنجیره کوتاه از ۴۰-۳۰ توالی اسید آمینه عمدتاً با سه پیوند دی سولفیدی تشکیل شده‌اند که عمدتاً بر روی کانال‌های کلر و پتاسیم عمل می‌کنند (۷ و ۸). عقرب مزوبوتوس اپیوس یکی از عقرب‌هایی است که در ایران به ویژه در مناطق کویری و گرمسیری از جمله خوزستان به فراوانی یافت می‌شود و دارای اهمیت بالینی می‌باشد. تا کنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اجزای تشکیل دهنده زهر این نوع عقرب انجام نشده است. برای این که مکانیسم‌های بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی تأثیر توکسین‌های موجود در زهر عقرب‌ها مشخص شوند، باید این توکسین‌ها شناسایی و تخلیص گردند و اثرات هر یک بطور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرد. در این تحقیق تعدادی از توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس توسط روش کروماتوگرافی ستونی جدا شد و سمیت آنها مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق می‌تواند زمینه‌ای برای انجام مطالعات گسترده بعدی در بررسی ساختمان توکسین‌ها و مکانیسم عمل هر یک از آنها بر روی پستانداران باشد.

مواد و روش‌ها

زهر خام لیوفیلیزه عقرب مزوبوتوس اپیوس از مؤسسه رازی اهواز تهیه گردید. این زهر به روش تحریک الکتریکی تهیه شده بود. سفادکس G-۵۰ و CM-Sephadex C-25 از شرکت Pharmacia، فولین سیوکالتو، استات آمونیوم، تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین (TEMED)، آمونیوم پرسولفات و آلبومین سرم گاوی از شرکت Sigma، گلیسرول و تریس از شرکت Merck، اکریل آمید و بیس اکریل آمید از شرکت BIO-RAD خریداری گردیدند.

جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس

تمام مراحل جداسازی در ۴ درجه سانتی‌گراد و به روش آنجلینا (Angelina) صورت گرفت (۹). یک گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید، سپس محلول حاصل به مدت ۱۲ دقیقه با دور g ۱۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و قسمت محلول (محلول رویی) از قسمت نامحلول جدا گردید. قسمت رویی حاوی پپتیدها و پروتئین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

رویی پس از تغلیظ شدن در حجم ۵ میلی‌لیتر که حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-۵۰ به ابعاد (۲/۷×۱۰۰ cm) در تعادل با بافراستات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار (pH=۴/۷) شد. بعد از این که نمونه جذب ژل گردید بافر فوق با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد. محلول خروجی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتری بطور مجزا توسط دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌ها بلافاصله در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS) قرائت شد و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های مختلف در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. هر یک از فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با سطح برش کمتر از ۱۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغلیظ گردیدند. سمیت هر یک از فراکسیون‌ها با تزریق ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش و با مشاهدهٔ علائم مسمومیت از قبیل افزایش ضربان قلب و فلج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD۵۰ فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین فراکسیون‌ها بر اساس روش لوری (Lowry) اندازه‌گیری گردید (۱۰). از بین فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون فراکسیون سوم به علت داشتن خاصیت سمی قوی‌تر برای جداسازی اجزاء آن توسط کروماتوگرافی ستونی تعویض یون کاتیونی با زمینه CM-Sephadex C-25 انتخاب گردید. بدین منظور ۷ میلی‌لیتر از فراکسیون سوم حاوی ۲۵۰mg پروتئین وارد ستونی از CM-Sephadex C-25 به ابعاد (۱×۴۰cm) در تعادل با بافر استات آمونیوم۲۰ میلی‌مولار (pH=۴/۷) گردید بعد از این‌که نمونه جذب ژل شد، ستون ابتدا با بافراستات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. محلول خارج شده به وسیله دستگاه جمع کننده اتوماتیک در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر درهر لوله جمع آوری گردید. پس از این که پروتئین‌هائی که جذب ستون نشده بودند از ستون خارج شدند بلافاصله ستون توسط یک گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر شسته شد. پس از آن ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱ مولار کلرور سدیم شستشو داده شد تا پروتئین‌های خارج نشده از ستون جدا شده و خارج شوند. جذب نوری محلول خروجی در هر یک از لوله‌ها به وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS) در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید و هر یک از زیرفراکسیون‌ها در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. زیرفراکسیون‌های جمع‌آوری شده به ترتیب از III.1 تا III.20 نام گذاری شدند. سپس هر یک از این زیر فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با سطح برش کمتر از ۱۲۰۰ در مقابل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند و تغلیظ گردیدند. سمیت هر یک از فراکسیون‌ها با تزریق ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش و با مشاهده علائم مسمومیت از قبیل افزایش ضربان قلب و فلج عضلات مشخص گردید و سپس مقادیر LD۵۰ فراکسیون‌های سمی اندازه‌گیری شد.

زیرفراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند و بین آنها زیرفراکسیون III.14 بیشترین سمیت را داشت که برای خالص سازی اجزای آن در مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای خالص سازی اجزای زیرفراکسیون III.14، مقدار ۱۷ میلی‌گرم پروتئین از این زیرفراکسیون در حجم ۵ میلی‌لیتر وارد ستونی از CM-sephadex C-25 به ابعاد (۱×۴۰ سانتی‌متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ گردید پس از جذب نمونه در ژل، ستون ابتدا با بافر استات

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ و با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد و نمونه‌ها در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر در هر لوله جمع‌آوری شدند. پس از این‌که پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند خارج شدند، ستون توسط یک گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ در حجم کلی ۵۰۰ میلی‌لیتر شسته شد. پس از تمام شدن گرادیان، ستون با بافر استات آمونیوم حاوی ۱ مولار کلرور سدیم شستشو داده شد. جذب نوری محلول خروجی در هر یک از لوله‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب برحسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های جمع آوری شده دیالیز و تغلیظ شدند.

الکتروفورز زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی:

از نمونه‌های بدست آماده در مراحل مختلف کروماتوگرافی الکتروفوروز روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد در حضور سدیم دودسیل سولفات (PAGE-SDS) طبق روش لائملی (Laemmli) انجام گردید (۱۱).

اندازه‌گیری LD۵۰ (Lethal dose 50):

برای بررسی سمیت و مقایسه کشندگی فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی، LD۵۰ زهر خام و فراکسیون‌های سمی در موش‌های سوری ۱۸ تا ۲۰ گرمی با استفاده از روش آماری اسپیرمان کاربر (Spearman Karber) بر اساس روش فینی (Finney) تعیین گردید (۱۲ و ۱۳)، بدین صورت که هر نمونه در دوزهای مختلف تهیه و هر دوز به چهار موش تزریق شدند. برای انتخاب دوزهای مناسب ابتدا از هر نمونه چند دوز مختلف تهیه و هر کدام به دو موش تزریق شد، تا حدود کشندگی (حداکثر و حداقل) بدست آید. سپس بر این اساس دوزها به صورتی انتخاب شدند که در اولین دوز هیچ موشی نمیرد و در آخرین دوز همهٔ موش‌ها بمیرند. با مشخص شدن اولین دوز عدد اول را در ضریب فواصل دوزها (۱/۲۵) ضرب شد تا دوز بعدی بدست آید. بعد از این که دوزهای مختلف برای هر نمونه تهیه شد، ۲ میلی‌لیتر از هر دوز به چهار موش (به هر موش ۰/۵ میلی‌لیتر) که قبلاً علامت‌گذاری شده و در قفس‌های جداگانه قرار داده شده بودند، به طریق زیر جلدی (Subcutaneous) تزریق شد. سپس مرگ و میر موش‌ها طی ۲۴ ساعت ثبت گردید و LD۵۰ هر نمونه با استفاده از روش ذکر شده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$m = x_{100} \pm \frac{d}{n}\left(\sum r - \frac{n}{2}\right)$$

m برابر است با log LD50

X100 برابر است با log دوزی که صددرصد کشندگی داشته باشد.

n تعداد موش‌های استفاده شده در هر دوز

r تعداد موش‌های مرده در هر دوز

d برابر است با log ضریب فواصل دوزها یعنی log 1/25 و حدود ثابت (Fidacial limits) برای LD۵۰ از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$V(m) = \frac{d^2}{n^2(n-1)}\sum[r(n-r)]$$

$$\text{Fidacial limits} = anti\log(m \pm t0.05\sqrt{v(m)}$$

t 0.05 برای $\sum n - 1$ درجه آزادی

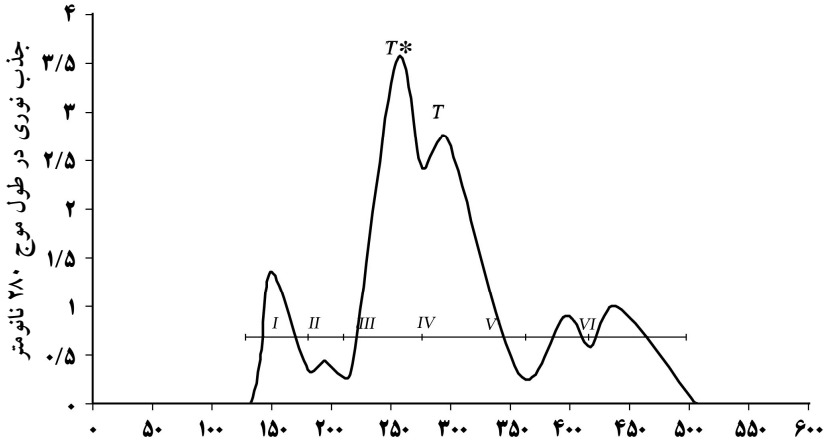
$\sum n$ جمع تعداد موش‌های استفاده شده در دوزهایی به جز دوزهایی که صفر درصد و صددرصد کشندگی دارند می‌باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

یافته‌ها

جداسازی توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس:

نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون سفادکس G-۵۰ در نمودار ۱ نشان داده شده است. توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از زهر خام مزوبوتوس اپیوس ۶ فراکسیون حاصل گردید که به ترتیب P I، P II، P III، P IV، P V و PVI نام‌گذاری شدند. با بررسی سمیت فراکسیون‌ها مشخص شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند که به ترتیب LD۵۰ فراکسیون سوم ۰/۴ و فراکسیون چهارم ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید.



نمودار۱: نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۱۰۰×۲/۷ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ و سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت.

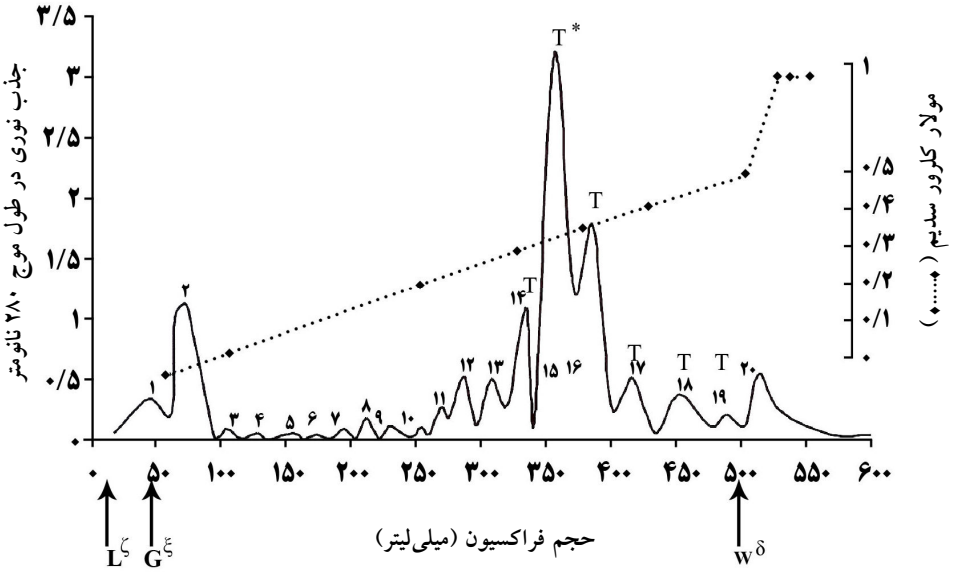
T* = سم

فراکسیون III به علت دارا بودن سمیت بالا جهت جداسازی اجزای آن توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی انتخاب گردید. نتیجه کروماتوگرافی تعویض کاتیونی ۲۵۰ میلی‌گرم پروتئین فراکسیون III در نمودار ۲ نشان داده شده است. در این مرحله ۲۰ فراکسیون از فراکسیون سوم (III.1-III.20) جدا شده است. سمیت فراکسیون‌های حاصل در این مرحله مشخص شد.

فراکسیون‌های III.14 تا III.19 برای موش‌ها سمی بودند که در نمودار با علامت T نشان داده شده‌اند، فراکسیون III.14 با LD۵۰ برابر با ۰/۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش سمی‌تر بود که برای جداسازی و خلوص بیشتر اجزای آن مجدداً توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با تغییر pH از ۴/۷ در مرحله قبل به ۶ انتخاب گردید.

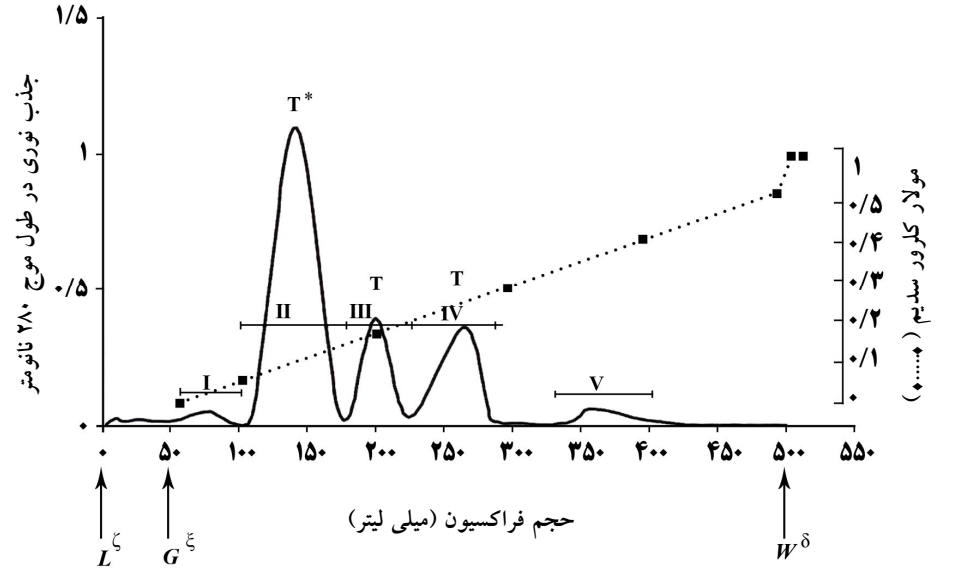
نتیجه حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون فراکسیون III.14 (حاوی ۱۷ میلی‌گرم پروتئین) در نمودار ۳ نشان داده شده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]



نمودار۲: کروماتوگرافی تعویض کاتیونی فراکسیون سوم حاصل از مرحله ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۴۰×۱ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵–۰ مولار کلرور سدیم در بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH =۴/۷ ، ۱۰۰ میلی‌لیتر استات آمونیوم حاوی یک مولار کلرور سدیم به ترتیب در سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت.

* T = سم، ζ L = افزایش نمونه، ξ G = گرادیان آغازی، δ W= شستشو با کلرور سدیم – آمونیوم استات یک مولار



نمودار ۳: نتیجه جداسازی اجزای زیرفراکسیون سمی III.14 بر روی ستون CM-sephadex C-25 به ابعاد (۴۰×۱ سانتی‌متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم و گرادیان نمکی ۰/۵–۰ مولار کلرور سدیم در بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH =۶ در سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت.

* T = سم، ζ L = افزایش نمونه، ξ G = گرادیان آغازی، δ W= شستشو با کلرور سدیم – آمونیوم استات یک مولار

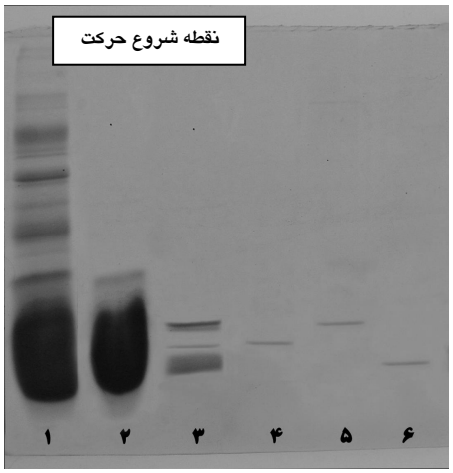
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

در این مرحله زیرفراکسیون III.14 به پنج جزء تفکیک گردید که پس از بررسی سمیت آنها بر روی موش‌ها مشخص گردید که فراکسیون‌های III.14.2، III.14.3، III.14.4 برای موش‌ها سمی بودند. سنجش پروتئین، بازده، سمیت و مقادیر LD۵۰ در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. به طور کلی یک گرم زهر خام حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود که بعد از بردن روی ستون سفادکس G-۵۰ مقدار ۸۱۵ میلی‌گرم پروتئین از فراکسیون‌های مختلف بدست آمد که بازده کار ۹۹/۸۷ درصد بود. نتایج الکتروفورز زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج سنجش پروتئین، سمیت و بازده توکسین‌های خالص شده از فراکسیون III.14*

مرحله خالص سازی	فراکسیون	سمیت	توتال پروتئین (mg)	بازده (٪)	LD50 (mg/kg) mouse
CM-Sephadex C-25	**III.14**	سمی	۱۷	۱۰۰	۰/۳۲
	III.14.1	غیرسمی	۰/۵۱	۳	--
	III.14.2	سمی	۸/۳۳	۴۹	۰/۵۳
	III.14.3	سمی	۳/۹۱	۲۳	۰/۴۲
	III.14.4	سمی	۳/۵۷	۲۱	۰/۱۱
	III.14.5	غیرسمی	۰/۲۵	۱/۵	--
	بازده کل			۹۷/۵	

* مقدار ۱۷ میلی گرم پروتئین از این زیرفراکسیون در حجم ۵ میلی‌لیتر وارد ستونی از CM-Sephadex به ابعاد (۴۰ × ۱ سانتی متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۶ گردید.



شکل ۱: الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE): به ترتیب (۱) سم خام، (۲) فراکسیون III حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، (۳) فراکسیون III.14 حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، (۴) فراکسیون سمی III.14.2، (۵) فراکسیون سمی III.14.3 و (۶) فراکسیون سمی III.14.4. خلوص فراکسیون‌های سمی جدا شده در ردیف‌های ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

همانطور که قبلاً اشاره شد از زیرفراکسیون III.14 سه توکسین که تأثیر سمی بر روی موش‌ها داشتند خالص گردید. آزمایش الکتروفورز خلوص آنها را نشان می‌دهد و همانطور که در شکل دیده می‌شود این سه توکسین حرکت الکتروفورزی متفاوتی دارند.

بحث

آزمایش‌هایی که در ارتباط با فعالیت بیولوژیکی زهر عقرب‌ها بر روی موش‌ها و حشرات صورت گرفته ثابت کرده است که تأثیرات زهر عقرب‌ها عمدتاً مربوط به پلی‌پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین است که توکسین نامیده می‌شوند (۱۴). بر طبق این آزمایشات توکسین‌های مختلفی از زهر خام جدا شده که به طور مستقیم پستانداران یا حشرات را مورد هدف قرار می‌دهند (۱۵). مطالعه زهر عقرب‌ها و خالص سازی توکسین‌ها به ویژه برای تهیه سرم و برای حل مشکلات پزشکی کمک کننده بوده است (۱۴ و ۱۶)، هر چند که امروزه مهمترین جنبه‌های مورد علاقه استفاده از توکسین‌های خالص شده برای مطالعه مکانیسم مولکولی عمل آنها بر روی غشاءهای تحریک پذیر و برای جداسازی کانال‌های یونی هستند (۱۷). زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته است، یکی از شش نوع عقربی است که در ایران دارای اهمیت بالینی بوده و ایجاد ناراحتی‌های عصبی می‌کند و جهت تهیه سرم پلی والان ضد عقرب‌زدگی در مؤسسه سرم‌سازی رازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این عقرب متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشد که در ایران به ویژه در مناطق کویری و گرمسیری از جمله خوزستان به فراوانی یافت می‌شود و مسئول ۴۵ درصد از عقرب‌زدگی‌ها در این استان می‌باشند (۴). از آنجایی که سموم عقرب‌های خانواده بوتیده برای انسان‌ها سمی هستند ویژگی‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی آنها نسبت به سموم عقرب‌ها از خانواده‌های دیگر بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. زهر عقرب‌های خانواده بوتیده عمدتاً از پلی پپتیدهای نروتوکسیک و پپتیدهای کوچک دیگری با عملکردهای نامعلوم تشکیل شده‌اند (۱۸). با توجه به این که مطالعات زیادی در ارتباط با زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس انجام نشده است، هدف این پروژه، جداسازی فراکسیون‌های سمی زهر این عقرب بود. زهر خام عقرب مزوبوتوس اپیوس به طور لیوفیلیزه از موسسه رازی تهیه گردید. این سم به روش شوک الکتریکی تهیه و لیوفیلیزه شده بود. زهر عقرب‌ها حاوی موکوپروتئین می‌باشد که مقدار آن، بسته به روش سم‌گیری متفاوت است. سم‌گیری به روش تحریک الکتریکی و یا تحریک فیزیولوژیک عقرب نسبت به روش سایش غده‌ها مناسب‌تر است، زیرا در این حالت کمترین میزان موکوپروتئین‌ها در زهر خام ترشح می‌شود. ماهیت پروتئینی عوامل توکسیک از زهر عقرب در سال ۱۹۰۴ توسط ویلسون مطرح شد ولی خالص‌سازی نهایی توکسین‌های عقرب توسط پروفسور فرانکویس میراندا (Francois Miranda) در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد شد و روش عمومی خالص سازی نروتوکسین‌های سموم حیوانات سمی از قبیل مار و عقرب را ارائه نمود. عمل خالص‌سازی توکسین‌ها به وسیله فیلتراسیون روی Sephadex G-۵۰ و به دنبال آن چندین مرحله کروماتوگرافی تعویض یون بر روی رزین‌های مختلف از جمله CM-sephadex C50 ،Amberlit CG-50 و DEAE-Sephadex A-50 انجام پذیرفت (۱۹). استفاده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G-۵۰ در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

مرحله اول جداسازی اجزای زهر عقرب‌ها یک متد عمومی می‌باشد که در ابتدا توسط پروفسور میراندا در سال ۱۹۷۰پیشنهاد شد (۱۹). با استفاده از تکنیک ژل فیلتراسیون یک جداسازی اولیه صورت می‌گیرد و عوامل غیرسمی از عوامل سمی جدا می‌شوند. پس از ارائه این طرح کلی در خالص‌سازی توکسین‌ها، محققین زیادی با انجام مراحل فوق و با تغییراتی جزئی در مراحل کار سعی در خالص سازی توکسین‌های سموم عقرب‌های سایر گونه‌ها کردند. بیشتر تلاش‌ها در کشف پپتیدهای جدید در زهر عقرب‌ها که مؤثر بر کانال‌های یونی بوده‌اند متمرکز شده است. با این وجود در سال‌های اخیر پپتیدهایی با ساختمان و عملکرد جدید در زهر عقرب‌ها یافت شده‌اند. برای مثال پپتیدهای فاقد اسید آمینه سیستئین که خانوادهٔ جدید جالبی از ترکیبات زهر می‌باشند. اخیراً یک پپتید از همین نوع، از زهر Buthus martensi Karsch با نام Bmkbpp خالص شده است (۲۰). هم چنین توکسین‌های آنتی میکرو بیال جدا شده از زهر چند گونه عقرب متعلق به خانواده پپتیدهای بدون پیوندهای دی‌سولفیدی هستند. بعنوان مثال هادرورین (Hadrurin) از عقرب Hadrurus aztecus (۲۱)، پارابوتوپورین (Parabutoporin) از عقرب آفریقای جنوبی Parabuthus schlechteri (۲۲) و پاندینین ۱ و پاندینین ۲ از Pandinus imperator (۲۳) جداسازی شده‌اند. تحقیقات زیادی در ارتباط با خالص سازی اجزای زهر عقرب‌ها شده است. یک توکسین با زنجیره کوتاه از زهر عقرب بوتوس تامولوس در ناحیه هندوستان با استفاده از کروماتوگرافی یونی جدا شد و مشخص شد که از ۳۵ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۷۹۶Da تشکیل شده است و کانال‌های یونی را مهار می‌کند (۲۴). در تحقیقی، زهر عقرب مزوبوتوس تامولوس توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با CM-52 جداسازی شده و اثر آن در متابولیسم گلوتامیک اسید نشان داده شد که فعالیت گلوتامیک دهیدروژناز را مهار می‌کند و دآمینه شدن گلوتامیک کاهش می‌یابد (۲۵). در سال ۲۰۰۵ دو توکسین با نامهای T3 و T4 از همین زهر این عقرب شناسایی گردید که علاوه بر داشتن خاصیت نروتوکسیکی باعث ادم ریوی در افراد عقرب گزیده می‌شود (۲۶). همچنین یک نوع آلفا توکسین جدید از زهر عقرب Buthotus juaicus جداسازی و تعیین توالی گردید و مشخص شد که بر روی کانال‌های سدیمی حشرات مؤثر است (۲۷). در سال ۲۰۰۴ یک نوع توکسین با نام BmBKTx1 از عقرب آسیایی Buthus martensi Karsch خالص سازی گردید که یک نوع از کانال‌های پتاسیمی موجود در حشرات و انسان را بلوک می‌کند (۲۸). در ارتباط با توکسین‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اطلاعاتی در دست نیست، لذا در این تحقیق جداسازی توکسین‌های زهر این نوع عقرب انجام شد و سمی‌ترین توکسین به طور خالص جدا شد. در مرحله اول از تکنیک ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-50 برای جداسازی فراکسیون‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس استفاده گردید. بدین ترتیب اجزای زهر خام بر اساس اختلاف وزن مولکولی جدا شدند. در این مرحله از ۵ میلی‌لیتر محلول زهر خام که حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود، شش فراکسیون بدست آمد و مشاهده شد که فراکسیون‌های III و IV برای موش‌ها سمی بودند. LD50 فراکسیون‌های III و IV به ترتیب ۰/۴ و ۰/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تعیین گردید. نتایج سنجش پروتئین نشان داد که بازده نهایی ژل فیلتراسیون زهر خام ۹۹/۸۷ درصد بود که

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

بازده بسیار خوبی می‌باشد. فراکسیون‌های III و IV حدود ۶۸/۴ درصد مقدار پروتئین اولیه زهر خام را که بر روی ستون برده شد در بر می‌گیرند. با توجه به جداسازی زهر عقرب مزوبوتوس توسط سفادکس G-50 مولکول‌های پپتیدی که خاصیت سمی دارند از نظر وزن مولکولی حد متوسطی را در بین سایر مولکول‌های زهر دارند. در مرحله دوم زیرفراکسیون‌های فراکسیون سوم که سمی‌ترین فراکسیون حاصل از جداسازی با روش ژل فیلتراسیون بود، با استفاده از ستون CM-Sephadex C-25 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷ و گرادیان خطی تا ۰/۵ مولار کلرور سدیم در همان بافر جدا گردید. رزین CM-Sephadex C-25 یک رزین تعویض یونی کاتیونی است. اجزاء فراکسیون III حاصل از ژل فیلتراسیون توسط کروماتوگرافی ستونی CM-Sephadex C-25 به بیست زیر فراکسیون تفکیک گردید. مطالعه سمیت آنها بر روی موش‌ها نشان داد که زیرفراکسیون‌های III.14 تا III.19 اثر سمی دارند. نتایج سنجش مقدار پروتئین نیز نشان می‌دهد که بازده کل حاصل از جداسازی در این مرحله، ۹۷ درصد می‌باشد که از این مقدار ۶۹/۰۴ درصد متعلق به فراکسیون‌های سمی و ۲۸/۰۶ درصد متعلق به فراکسیون‌های غیرسمی است. در بین زیرفراکسیون‌های سمی، زیرفراکسیون III.14، بیشترین سمیت را نشان داد. جداسازی اجزای این زیرفراکسیون سمی نیز با استفاده از رزین CM-Sephadex C-25 صورت گرفت با این تفاوت که بافر مورد استفاده دارای pH=۶ می‌باشد. تغییر pH در این مرحله باعث جدا شدن سه توکسین مختلف شد. نتایج آزمایش الکتروفورز خلوص این توکسین‌ها را تائید نمود. بنابراین در این تحقیق توانستیم توکسین‌های سمی را از زهر عقرب جدا نمائیم و از بین آنها سه توکسین را که سمی‌ترین اثر را بر موش داشتند به طور خالص جدا کنیم. توکسین‌های خالص شده در تحقیقات آینده جهت تهیه آنتی‌سرم و همچنین مطالعه اثرات فیزیولوژیک و پاتولوژی مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

تشکر و قدردانی

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۶۲ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می‌باشد که در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی انجام شده است. مجری طرح بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه که هزینه انجام این پروژه را تأمین نمود، تشکر و قدردانی می‌نماید.

References:

۱. کمالی ک. معرفی عقربهای مهم خوزستان و اطلاعاتی درباره بیولژی عمومی عقربها، روش درمان عقرب زدگی و مبارزه با آنها. مجله علمی کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز ۱۳۶۳؛ تک نگاشت شماره ۱: ۳۴-۱.

2. The medical and social significance of scorpionism in the southern provinces of Iran. Arachnodata. The Arachnological Information and Consulting Agency (at: http://www.arachnodata.ch/frameset2.htm).

3. Garcia ML, Gao Y, McManus OB, et al. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. Toxicon 2001; 39: 739-48.

4. Cestele S, Qu Y, Rogers JC, et al. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. Neuron 1998; 21:919-31.

5. Hill RG. The status of naloxone in the identification of pain control mechanisms operated by endogenous opioids. Neurosci Lett 1981; 21: 217-22.

6. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]

scorpion Buthus martensi Karsch. Toxicon 2002; 40:1239-58.
7. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. Curr Opin Struct Biol 2000; 10:456-61.
8. Miller C. An overview of the potassium channel family. Genome Biol 2000; 1: REVIEWS0004.
9. Ramirez AN, Gurrola GB, Martin BM, et al. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon 1988; 26:773-83.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-5.
12. Finney DJ. The median lethal dose and its estimation. Arch Toxicol 1985; 56: 215-8.
13. Possani LD, Fletcher PL Jr., Alagon AB, et al. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon 1980; 18:175-83.
14. Legros C, Kaabi H, El Ayeb M, et al. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. Vaccine 2001; 20:934-42.
15. Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. Adv Cytopharmacol 1979; 3: 325-34.
16. Possani LD, Fernandez de Castro J, et al. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (Centruroides noxius Hoffmann) venom. Toxicon 1981; 19: 323-9.
17. Cestele S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 2000; 82: 883-92.
18. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon 1998; 36: 823-46.
19. Miranda F, Kupeyan C, Rochat H, et al. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions Androctonus australis hector, Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Eur J Biochem 1970; 16: 514-23.
20. Zeng XC, Li WX, Peng F, et al. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion Buthus martensii Karsch. IUBMB life 2000; 49: 207-10.
21. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, et al. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion Hadrurus aztecus. Eur J Biochem 2000; 267:5023-31.
22. Verdonck F, Bosteels S, Desmet J, et al. A novel class of pore-forming peptides in the venom of Parabuthus schlechteri Purcell (Scorpions: Buthidae). Cimbebasia 2000; 16: 247–60.
23. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion Pandinus imperator. Biochem J 2001; 359:35-45.
24. Dhawan RD, Joseph S, Sethi A, et al. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion Buthus tamulus. FEBS Lett 2002; 528: 261-6.
25. Lokanatha V, Rajendra W. Fractionation of scorpion (Mesobuthus tamulus) venom and the impact of specific fractions on glutamate metabolism. J Biochem Mol Biol Biophys 2002; 6:167-70.
26. Deshpande SB, Alex AB, Jagannadham MV, et al. Identification of a novel pulmonary oedema producing toxin from Indian red scorpion (Mesobuthus tamulus) venom. Toxicon 2005; 45: 735-43.
27. Arnon T, Potikha T, Sher D, et al. BjalphaIT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool. Insect Biochem Mol Biol 2005; 35: 187-95.
28. Xu CQ, Brone B, Wicher D, et al. BmBKTx1, a novel Ca2+-activated K+ channel blocker purified from the Asian scorpion Buthus martensi Karsch. J Biol Chem 2004; 279:34562-9.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-09-21]