

شناسایی تأثیرات بیوشیمیایی و هماتولوژیک اجزاء پروتئینی جداسازی و تخلیص شده از سم عقرب گادیم (همی اسکورپیوس لپتوروس) در موش سوری

محمد رضا بیگدلی*، احمد تقوی مقدم**

چکیده

هدف: به منظور مطالعه تأثیرات بیوشیمیایی و هماتولوژیک اجزاء پروتئینی سم عقرب گادیم از حدود ۱۰ هزار عقرب به روش شوک الکتریکی سم گیری بعمل آمد و پس از جداسازی فار محلول و فعال سم به روش خشک کردن در انجماد، خشک و به کمک کروماتوگرافی ستونی توسط ژل سفادکس G-۵۰ باندهای پروتئینی بر اساس جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر جدا شده و از ۴ فراکسیون حاصله محلولهایی با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ساخته و به ۵ گروه ۱۰ تایی موش سوری ۱۸-۲۰ گرمی هر یک مقدار ۱ میلی لیتر سم از طریق ورید دم تزریق و پس از ۲ ساعت تأثیرات بیوشیمیایی و هماتولوژیک ایجاد شده در میزان قند، اوره، کراتینین، تری گلیسرید، کلسترول، پروتئین تام و همچنین میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت، نوتروفیل، لمفوسیت، منوسیت، ائوزینوفیل و تعداد گلبولهای سفید و قرمز مورد اندازه گیری قرار گرفتند. تا علاوه بر شناسایی تأثیرات هر جزء سم امکان استفاده از نتایج در مسئله ساخت آنتی سرم ضد عقرب گزیدگی اختصاصی تر و درمان عوارض ایجاد شده در بیماران عقرب زده نیز بررسی گردد.

یافته ها: آنالیز آماری نتایج به روش آنوا انجام شد و نتایج زیر بدست آمد.

نتیجه گیری: فراکسیون ۱: باعث افزایش میزان معنی دار ($P < 0/05$) در میزان قند، اوره، کراتینین، تری گلیسرید و درصد لمفوسیتها شد.

فراکسیون ۲: باعث کاهش معنی داری ($P < 0/05$) در میزان اوره، کراتینین، کلسترول، پروتئین تام و افزایش نسبی درصد لمفوسیتها شد ولی در سایر پارامترها تأثیری نداشت.

فراکسیون ۳: باعث کاهش معنی دار ($P < 0/05$) در میزان قند، کلسترول، تری گلیسرید، درصد لمفوسیتها و افزایش معنی دار درصد نوتروفیلها شد.

فراکسیون ۴: بر پارامترهای بیوشیمیایی کاهش معنی دار ($P < 0/05$) ایجاد کرد ولی بر پارامترهای هماتولوژیک تأثیری نداشت. سم خام: به جز در مورد قند که بدون تأثیر بود بر سایر پارامترهای بیوشیمیایی و درصد نوتروفیلها افزایش معنی داری ($P < 0/05$) ایجاد کرد.

کلید واژه گان: عقرب، گادیم، فراکسیون، همی اسکورپیوس لپتوروس، تأثیرات پاراکلینیکی

مقدمه

سمی وجود دارد که در این میان عقرب گادیم (همی اسکورپیوس لپتوروس) خطرناک ترین عقرب بوده و در اولویتهای بعدی، عقرب سیاه بزرگ (آندوکتونوس کراسیکودا) و توسن (مزوبوتس اپئوس) قرار دارند (۴). سم عقرب گادیم در انسان در مراحل حاد منجر به ایجاد

عقرب گزیدگی یکی از معضلات بهداشتی کشور و خصوصاً استان خوزستان بوده (۱ و ۲) و در بعضی مناطق فقیرنشین استان، چهارمین عامل مرگ و میر پس از گاسترو آنتریت، عفونت مجاری تنفسی و سوء تغذیه در اطفال می باشد (۳) در این استان بیش از ۱۰ نوع عقرب

*مربی گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

**استادیار گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

۱- نویسنده مسئول

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۷/۲۱ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۲/۱۰ اعلام قبولی: ۱۳۸۵/۲/۱۸

همولیز شدید، نارسایی حاد و ثانوی کلیه‌ها، آشفتگی فیزیولوژیک سیستم عصبی مرکزی و پمپاژ قلب، اختلالات عروقی و سیتوتوکسیته شدید می‌شود. (۵). مرگ بیمار ممکن است به دلیل نارسایی حاد کلیوی و یا ایست قلبی، تنفسی که همراه با نشانه‌های شدید سیستم عصبی مرکزی هستند، باشد. لذا این تحقیق با هدف شناسایی تأثیرات سمی عقرب گادیم و بررسی عوامل گلیکوپروتئینی موجود در سم و مقایسه تأثیرات ایجاد شده توسط این فراکسیونها با سم خام که تاکنون ناشناخته باقی مانده، صورت گرفت تا امکان استفاده از فراکسیونهای سمی بجای سم خام در ساخت آنتی‌سرمهای اختصاصی تر ضد عقرب گزیدگی بررسی گردد و همچنین آثار توکسیکولوژیک ایجاد شده در موش سوری نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

روش بررسی

پس از خرید و جمع‌آوری حدود ۱۰ هزار عقرب، ابتدا عقربها را مورد سرشماری و جداسازی جنس‌های مختلف و انواع نابالغ قرار داده و عقربهای بالغ گادیم را در اتاقکهای شیشه‌ای تا زمان سم‌گیری نگهداری نمودیم. از آنجا که همونوخوااری بین عقربها شایع است، سعی شد تا بلافاصله عمل سم‌گیری با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی (دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز) با ولتاژ ۶-۱۲ ولت انجام شود. پس از هر نوبت سم‌گیری، سموم استحصال شده در دمای ۲۰°C- (فریزر پارس - ایران) نگهداری شدند تا سم تمامی عقربها جمع‌آوری شود. (۷) با توجه به کوچکی جثه و غده سمی عقربها، میزان سم استحصال شده از هر عقرب 0.05 ± 0.15 میلی‌گرم بود. به منظور جداسازی ذرات موکوسی نامحلول و مواد ناخالص، سم را در غشاء نیمه تراوا (کیسه سلوفان، یونیون کار بایدا-امریکا) قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز نموده و روز بعد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچالدار (هلیوس -

آلمان) در دور ۱۰ هزار در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه فاز نامحلول موکوسی سم را جدا و دور ریخته و فاز محلول را که همان فاز فعال سم است به کمک دستگاه خشک‌کننده در خلاء (اشنایدر-آلمان) خشک نمودیم (۹). در زمان کروماتوگرافی پس از آماده‌سازی ستون ژل سفادکس G-۵۰ (فارماسیا - سوئد) مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم سم خشک را درون ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، حل و روی ستون تزریق نموده، سپس ستون را به مخزن با فراستات $PH = 6$ متصل و مایع خروجی از ستون را بر اساس جذب نوری به کمک اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش (بوش ولامب امریکا) در طول موج ۲۸۰ نانومتر جمع‌آوری نمودیم. مجموعاً ۴ نوع منحنی جذبی متعلق به ۴ فراکسیون پروتئینی از سم جدا گردید. این فراکسیونها به کمک دستگاه خشک‌کننده در خلاء (اشنایدر-آلمان) خشک شدند. و از هر یک از آنها و سم خام محلولی حاوی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و به ۵ گروه ۱۰ تایی موش سوری سفید ۲۰-۱۸ گرمی (هر موش ۱ میلی‌لیتر محلول سم یا ۲۰۰ میکروگرم سم) تزریق شد و پس از ۲ ساعت به روش خونگیری مستقیم از قلب، از موشها خونگیری بعمل آمد از ۵ گروه ۱۰ تایی موش سوری نیز بدون تزریق بعنوان شاهد خونگیری بعمل آمد. سرم خونهای فوق جدا شده و برای آزمایشات بیوشیمیایی که عبارتند از قند خون (روش ارتوتولوئیدین)، اوره (روش استیل منوکسیم)، کلسترول و تری‌گلیسیرید (روش آنزیمی)، پروتئین (روش بیوره) (۴) و پارامترهای هماتولوژیک شامل میزان هموگلوبین (روش دراب کینز)، هماتوکریت (میکروسانتریفیوژ)، شمارش گلبولهای سفید و قرمز و درصد انواع گلبولهای سفید (روش میکروسکوپی) مورد استفاده قرار گرفتند. از روش آماری آنوا جهت مقایسه اثر فراکسیونهای سمی و سم خام با شاهد استفاده شد و میزان ($P < 0.05$) معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تزریق فراکسیونهای سم و سم خام در مقایسه با شاهد به شرح زیر می‌باشد.

۱- فراکسیون ۱ باعث افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) در میزان قند، اوره، کراتینین، تری‌گلیسرید و درصد لمفوسیتها شد.

۲- فراکسیون ۲ باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) در میزان اوره، کراتینین، کلسترول و پروتئین تام و افزایش نسبی درصد لمفوسیتها شد ولی بر سایر پارامترها تأثیر نداشت.

۳- فراکسیون ۳ باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) در میزان قند کلسترول تری‌گلیسرید درصد لمفوسیتها و افزایش معنی‌دار درصد نوتروفیلها شد.

۴- فراکسیون ۴ باعث کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) پارامترهای بیوشیمیایی شد ولی بر پارامترهای هماتولوژیک تأثیر نداشت.

۵- سم خام بجز در مورد قند که بدون تأثیر بود بر سایر پارامترهای بیوشیمیایی و درصد نوتروفیلها افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) داشت.

جدول ۱: تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی پس از تزریق فراکسیونهای جدا شده از سم عقرب گادیم و سم خام در مقایسه با شاهد (بدون تزریق).

گروه	پارامتر شاهد	قند میلی‌گرم %	اوره میلی‌گرم %	کراتینین میلی‌گرم %	کلسترول میلی‌گرم %	تری‌گلیسرید میلی‌گرم %	پروتئین تام گرم %
شاهد		۱۱۵ ± ۱۰	۱۵ ± ۲	۰/۷ ± ۰/۲	۷۳ ± ۷	۹۰ ± ۵	۳/۵ ± ۰/۲
فراکسیون ۱		↑ ۱۵۹	↑ ۴۳/۲	↑ ۱/۷	۹۸	↑ ۱۹۶	۴
فراکسیون ۲		۱۱۵	↓ ۸	↓ ۰/۴	↓ ۱۸	۸۵	↓ ۱
فراکسیون ۳		↓ ۷۳	۱۴/۲	۰/۷	↓ ۵۲	↓ ۴۸	۳
فراکسیون ۴		↓ ۷۰	↓ ۱۱/۱	↓ ۰/۶	↓ ۵۳	↓ ۵۴	↓ ۳/۳
سم خام		۱۱۲	↑ ۱۷/۳	↑ ۰/۹	↑ ۱۰۹	↑ ۱۲۵	↑ ۴/۱

جدول ۲: تغییرات پارامترهای هماتولوژیک بر اثر تزریق ۴ فراکسیون استحصال شده از عقرب گادیم و سم خام در مقایسه با شاهد (بدون تزریق).

گروه‌ها	پارامتر	هموگلوبین %g	هماتوکریت %	نوتروفیل	لمفوسیت	منوسیت	اوتوزینوفیل
شاهد		۱۳/۲ ± ۰/۳	۳۹ ± ۵	۲۲ ± ۳	۷۵ ± ۳	۳ ± ۱	-
فراکسیون ۱		۱۳/۱	۴۰	۱۹	↑ ۸۰	۱	-
فراکسیون ۲		۱۳/۳	۴۱	۱۲	۸۸	-	-
فراکسیون ۳		۱۲/۹	۴۰	↑ ۳۳	↓ ۶۶	۱	-
فراکسیون ۴		۱۳	۳۹	۱۹	۸۰	۱	-
سم خام		۱۱	۳۲	۵۳	۴۷	-	-

بحث

آن برطرف گردد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در سم عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس ۴ فراکسیون پروتئینی با تأثیرات پاراکلینیکی مختلف وجود دارد که میتوان در تحقیقات آتی از هر یک از این فراکسیونها جهت هیپرایمن سازی اسب یا بز و تولید آنتی سرم بصورت پیلوت استفاده نمود. و با خواص آنتی سرمهای موجود در بازار مقایسه نمود. از آنجا که در این تحقیق مدت ۲ ساعت پس از تزریق فراکسیونهای سم و سم خام به این دلیل انتخاب گردید تا شباهتی به حالت بیماران مراجعه کننده به بیمارستان داشته باشد زیرا در تحقیق آماری که توسط مجریان طرح بین بیماران عقرب گزیده (حدوداً ۵۰۰۰ نفر) انجام شده بود زمان تقریبی مراجعه بیماران به بیمارستان حدوداً دو ساعت بوده و چنانچه جهت تکمیل نتایج این طرح نمونه گیری در زمانهای بعدی نیز صورت گیرد قطعاً نتایج کاملتر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

از مقامات محترم دانشگاه آزاد اسلامی - اهواز به دلیل حمایت های بیدریغ مالی از این طرح و ریاست محترم انستیتو رازی اهواز که امکان این تحقیق را فراهم نمودند. از صمیم قلب سپاسگزاریم.

محققین سراسر دنیا علاقه ی ویژه ای به عقربهای سمی، اجزای سم آنها و عوارض کلینیکی و پاراکلینیکی ایجاد شده، نشان می دهند که این امر از یک سو بدلیل اهمیت در داروسازی و شناسایی رسپتورهای عصبی و از سوی دیگر در ساخت آنتی سرمهای اختصاصی تر در درمان عقرب گزیدگی حائز اهمیت می باشند (۱ و ۴). به عنوان نمونه می توان از سم گونه ای عقرب بنام آندرتکنونوس استرالیس هکتور نام برد که از آن فراکسیون بدست آمده که در درمان سرطان مغزگلیوما بکار می رود (۹)، همچنین، سم گونه ای عقرب بنام بوتوس تامولوس در هندوستان مورد مطالعه ی وسیع قرار گرفته و بدلیل ایجاد شوک هیپرگلیسمیک و بالا بردن شدید میزان قند خون، در درمان عقرب گزیدگی توسط این عقرب از انسولین استفاده می شود.

با توجه به اینکه استان خوزستان از مناطق عقرب خیز ایران و جهان می باشد و از آنجا که حدود ۲۰ درصد از گزشها بوسیله عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس (۵ و ۴) می باشد و همچنین کشور ایران از سازندگان آنتی سرم می باشد، بدیهی است که تحقیقاتی از این قبیل به اطلاعات علمی موجود در این زمینه افزوده و راه را برای دستیابی به آنتی سرمهای اختصاصی و فاکتورهای از سموم مختلف که کاربر دارویی دارند، هموار خواهد کرد. بدینوسیله می توان امیدوار بود که معضل قدیمی استان خوزستان یعنی عقرب گزیدگی و مرگ و میرهای ناشی از

منابع

- 1-ADAM K R C SOME ASPECTS OF THE PHARAMACOLOGY OF THE VENOM MED IMS OF BUTANTHEN 1986;; 33 603
- 2-DIANUS S DE KOPEYANCINDUCNG TOXIN FROFM BUTHINE SCORPION VENOM. TOXICOY 1987; 23; 731-41.
- 3-BAUER JD. CLINICAL LABORATOY METHODS :Mosby;1982.
- 4-MARTIN M F, ROCHK HP. URIFICATION OF B TOXINS ACTIVE ON MICE FROM VENOM OF NORTH AFRICAN BURTHUS. TOXINCON 1984;; 22 27

5-MARTIN NI, Fo ROCHAT. ALARGE SCALE PURIFICATION FROM THE VENOM OF SCORPION ANDROCAUTIONUS AUSTRILIS HECTOR. TOXICOY 1986; 2(5); 11-2 , 131-7.

6-RADMANESH, M. STUDY OF HEMISCORPION LEPTURUS IM. IRAN J OF TROP 1990; 93 327-35.

7-Tietz N W. Fundamental of clinal chemistry. Saunders; 1982.

8-Zare A. Scorion venom and insulin thrapy. Toxicon 1988; 2: 220-5.

۹- رادمنش محمد. بررسی عقرب گزیدگی. دارو و درمان اردیبهشت ۱۳۶۵؛ (۲۶): ۱۹-۱۲.

۱۰- رادمنش محمد. بررسی همگانی کژدم گزیدگی. دارو و درمان اردیبهشت ۱۳۶۹؛ (۷۶): ۳۰-۲۶.

۱۱- فرزانی رضا. عقرب شناخت. تهران: مرکز نشر دانشگاهی؛ ۱۳۶۶.

Archive of SID