خالص سازی پروتئین همولیتیک/درمونکروتیک از ونوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس استان خوزستان

دلاور شهباززاده[1*] ، سیده طاهره عبداللهی [2] ، کامران پوشنگ باقری[3]، محمد حسینی نژاد چافی[4]، فرهنگ ساسانی[5]، فاطمه ترکاشوند[6]، قادر خلیلی[7]، بهروز وزیری[8]

۱ - Ph.D بیوشیمی پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران
۲ - کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه و کشاورزی، دانشگاه پیام نور، واحد تهران
۳ - Ph.D باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران
۴ - کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران
۵ - متخصص پاتولوژی دامپزشکی، بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۶ - کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران
۷ - کارشناسی ارشد ایمنولوژی، مربی بخش ایمنی شناسی، انستیتو پاستور ایران
۸ - Ph.D ایمنی شناسی پزشکی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی- انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** خیابان ۱۲ فروردین جنوبی، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد نود پذیرش برای چاپ: مهر نود

چکیده

سابقه و هدف: *عقرب گزیدگی یکی از مشکلات بهداشتی کشور است. همیسکورپیوس لپتوروس از مهم ترین عقرب های استان خوزستان به شمار می رود و علت ۹۵٪ مرگ ناشی از عقرب گزیدگی می باشد. زهر این عقرب سیتوتوکسیک بوده و فعالیت همولیتیک، درمونکروتیک، نفروتوکسیک، و هپاتوتوکسیک دارد.*

روش کار: *زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس از استان خوزستان بدست آمد. روش RP-HPLC برای تفکیک پروتئین ها و پپتیدهای زهر عقرب انتخاب شد و فراکشن ها پس از جمع آوری خشک گردید و سپس در آب مقطر حل گردید. تست همولیتیک انجام شد و وزن مولکولی فراکشن های همولیتیک تعیین گردید. به منظور تأیید فعالیت درمونکروتیکی فراکشن های حاصل، آزمایش درمونکروتیک بر روی پوست خرگوش انجام شد.*

یافته ها: *تعداد ۱۰۳ فراکشن از زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در RP-HPLC با ستون C18 بدست آمد. تست همولیتیک بر روی آنها انجام شد و ۴ فراکشن با فعالیت شدید همولیتیک انتخاب شد. در آزمایش SDS-PAGE باند مشهود در محدوده KDa ۳۲-۳۵ هویدا شد. غلظت های ۵ و ۲۰ میکروگرم از فراکشن های همولیتیک در آزمایش درمونکروتیک که بر روی پوست خرگوش انجام شد، استفاده شد و میزان جراحت ایجاد شده ارزیابی شد. این فراکشن ها فعالیت درمونکروتیکی متفاوتی از خود نشان دادند که بیشترین میزان فعالیت مربوط به فراکشن با الوشن تایم ۱۵۷/۵۵ دقیقه بود.*

نتیجه گیری: *آنالیز پروتئین های موجود در زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس نشان داد که توکسین های اصلی زهر مربوط به پروتئین هایی با خاصیت همولیتیک/درمونکروتیک می باشد و تفاوت شدت همولیتیک/درمونکروتیک در ۴ پروتئین شناسایی شده به سبب وجود ایزومرهای متفاوت از یک پروتئین اصلی باشد.*

واژگان کلیدی: زهر عقرب، همیسکورپیوس لپتوروس، همولیتیک/درمونکروتیک، خوزستان، RP-HPLC

مقدمه

عقرب گزیدگی به عنوان یکی از مشکلات در سیستم بهداشت عمومی بسیاری از کشورهای دنیا مطرح است. بر اساس برآوردها حدود ۱/۲ میلیارد نفر در دنیا در مناطقی زندگی میکنند که احتمال عقرب گزیدگی وجود دارد و سالیانه ۱/۲ میلیون نفر مورد گزش عقرب قرار می گیرند که حدود ۲۷/. درصد مرگ و میر به همراه دارد(۱). در ایران سالیانه به طور متوسط بیش از ۳۰ هزار نفر دچار عقرب گزیدگی می شوند که از این تعداد حدود هزار نفر در بیمارستان بستری شده و در حدود پنجاه نفر منجر به فوت گزارش شده است(۲،۳). در میان ۲۵ گونه عقرب شناخته شده در ایران، شش گونه شامل Hemiscorpius lepturus, Mesobuthus eupeus , Buthous (Hottentotta) saulcyi , Odonthobuthous droiae , Androctomus crassicauda و Buthous (Hottentotta) schach به لحاظ بهداشتی به عنوان شایع ترین عوامل عقرب گزیدگی در ایران مطرح می باشند. در میان شش گونه، عقرب زرد خوزستان(شکل ۱) با نام علمی همیسکورپیوس لپتوروس (Hemiscorpius lepturus) یکی از شایع ترین و خطرناک ترین عقرب های موجود در ایران است که به زبان محلی "گادیم" نامیده میشود(۲). همیسکورپیوس لپتوروس بیشتر در نواحی گرمتر جنوبی ایران یافت میشود، و درحالی که تنها مسئول ۱۵-۱۰٪ موارد گزارش شده از عقرب گزیدگی در استان خوزستان است، تقریبا ۹۵٪ مرگ میر را باعث می شود(۳،۴).

همیسکورپیوس لپتوروس دارای زهر سیتوتوکسیک بسیار قوی است که زخم های پوستی و التهاب بسیار شدید در ناحیه گزش ایجاد می کند. هم چنین زهر این عقرب دارای فعالیت های همولیتیک، درمونکروتیک، نفروتوکسیک و تا اندازه ای هپاتوتوکسیک نیز است که همگی سبب شده اند تا این عقرب به عنوان یکی از عقرب های کشنده ایران مطرح باشد (۵ ، ۶).مطالعات زیادی در مورد شناسایی آناتومی عقرب در نواحی عقرب خیز انجام شده است. اما بررسی های معدودی مربوط به آنالیز زهر این عقرب و شناسایی توکسین های اصلی آن با استفاده از روش های نوین پروتئین شیمی صورت گرفته است. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی پپتیدها و پروتئین های همولیتیک و درمونکروتیک زهر عقرب خطرناک همیسکورپیوس لپتوروس می باشد.

شکل۱. عقرب نر همیسکورپیوس لپتوروس.

روش کار

این مطالعه از نوع مطالعات کاربردی است که در سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور در قالب طرح شماره ۳۴۸ مصوبه این انستیتو انجام شده است.

زهر استفاده شده در این تحقیق از عقرب گادیم خوزستان بدست آمده است که به روش الکتروشوک و مطابق با پروتکل های سازمان بهداشت جهانی تهیه گردید(۷). زهر عقرب به صورت لیوفیلیزه درآمده و جهت استفاده در آب مقطر استریل مخلوط گردید. برای حذف موکوس و مواد اضافه موجود در زهر، سوسپانسیون با سرعت ۱۳۰۰۰ xg سانتریفوژ شد. محلول شفاف رویی حاوی زهر خام به لوله جدید انتقال یافت و استفاده شد.

مقدار پروتئین زهر به روش برادفورد با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد و تست SDS-PAGE بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۵٪ به مدت ۳ ساعت با جریان ۳۰ mA براساس روش Laemmli در دستگاه الکتروفورز (BIORAD) انجام گردید و سپس با کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد.

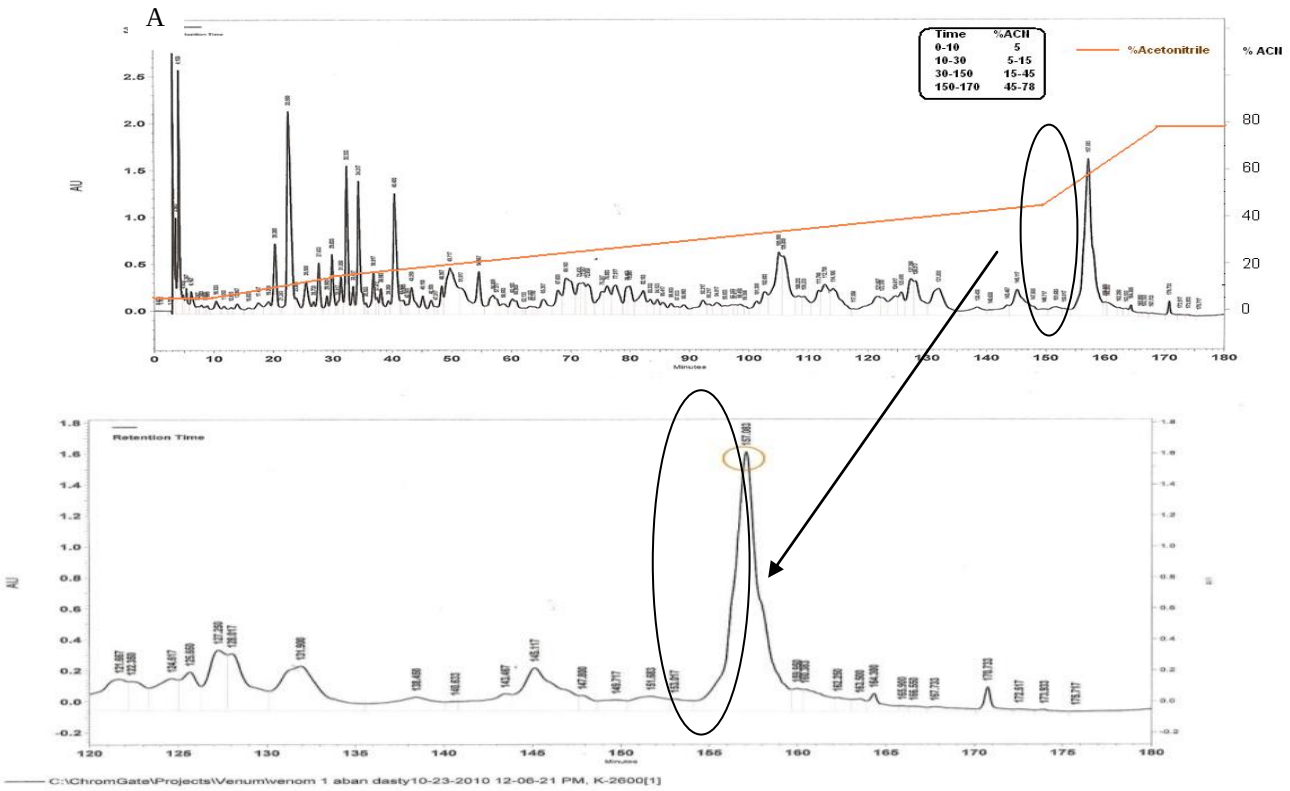
در روش RP-HPLC اجزاء مختلف زهر عقرب جداسازی شد: ابتدا mg ۶ زهر خام لیوفیلیزه در ۱۰۰ میکرولیتر از ۰/۰۵٪ اسید تری فلئورواستات (TFA) و ۵٪ استونیتریل حل گردید و موکوس و مواد اضافه موجود در زهر به روش فوق سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت حاوی پروتئین های زهر خام به سیستم HPLC (Knauver-Germany) تزریق گردید و با استفاده از ستون C18 با سرعت ml/min ۱و گرادیانت خطی ۰/۱ ٪ TFA در آب و گرادیانت افزایشی استونیتریل (۵٪ برای ۱۰ دقیقه، ۱۵-۵٪بمدت ۲۰ دقیقه، ۴۵-۱۵٪ به مدت ۱۲۰ دقیقه، ۷۸-۴۵٪ بمدت ۲۰ دقیقه) آنالیز شد. آشکار سازی پروتئین ها در طول موج ۲۱۵ nm صورت گرفت. فراکشن ها بدست آمده حاصل از تکرار چندین بار تزریق به ستون HPLC براساس پیک خروجی از ستون جمع آوری شد و در دستگاه تغلیظ کننده خشک گردید. فراکشن های لیوفیلیز شده در آب مقطر استریل حل گردید.

برای تست همولیتیک ابتدا غلظت فراکشن ها به روش برادفورد اندازه گیری شد و سپس مقادیر µg ۵-۰ از این فراکشن ها و زهر خام عقرب از ۶۰µg - ۰ به عنوان شاهد تهیه گردید. مقادیر متفاوت از این فراکشن ها و زهر خام با گلبول قرمز تازه ۱٪ انسان در پلیت های الایزا بمدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد مجاور شد و سپس در دمای ۴ ˚C به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ xg سانتریفوژ شدد. میزان همولیز در طول موج nm ۵۴۰ با استفاده دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. کنترل مثبت حاوی ترایتون ۱۰۰× یک دهم درصد و کنترل منفی حاوی محلول PBS بود(۸). تست SDS-PAGE فراکشن ها با فعالیت همولیتیک بر روی مینی ژل پلی اکریل آمید ۱۵٪ به مدت ۳ ساعت با جریان ۳۰ mA انجام گردید و وزن مولکولی آنها مشخص گردید.

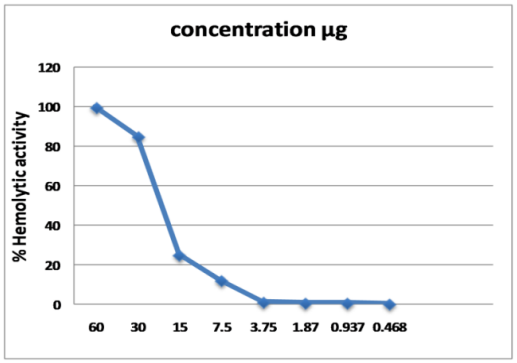
برای تست درمونکروتیک مقادیر µg ۵ و µg ۲۰ از هر فراکشن و زهر خام به عنوان شاهد مثبت و سرم فیزیولوژی به عنوان شاهد منفی به صورت زیر پوستی به خرگوش جوان نر با سن تقریبی دو ماهه تزریق گردید و بعد از ۴۸ ساعت اثر درمونکروتیک بررسی شد. مقاطع بافتی جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی تهیه و در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد و در دستگاه Tissue processor آماده گردید. مقاطع بافتی با هماتوکسین ائوزین رنگ آمیزی و توسط متخصص پاتولوژیست ارزیابی شد (۹).

یافته ها

۱۰۳ فراکشن از زهر خام عقرب همیسکورپیوس لپتوروس از ستون C18 جداسازی شد. ۹ پیک ماژور در نمودار RP-HPLC مشاهده گردید(شکل ۲). فعالیت همولیتیک زهر خام در مقادیر مختلف µg ۶۰-۰/۴۶ از ۰/۴٪ الی ۱۰۰٪ مشاهده گردید(نمودار ۱).

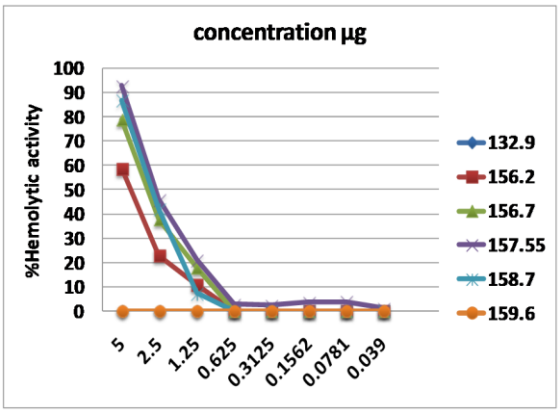


شکل۲. RP-HPLC کامل زهر همیسکورپیوس لپتوروس: (A) محدوده زمانی elution time (۱۸۰ min-۰)، (B) محدوده زمانی(۱۸۰ min-۱۲۰). پیک مربوط به پروتیئن های همولیتیک/درمونکروتیک به صورت بیضی نشان داده شده است.



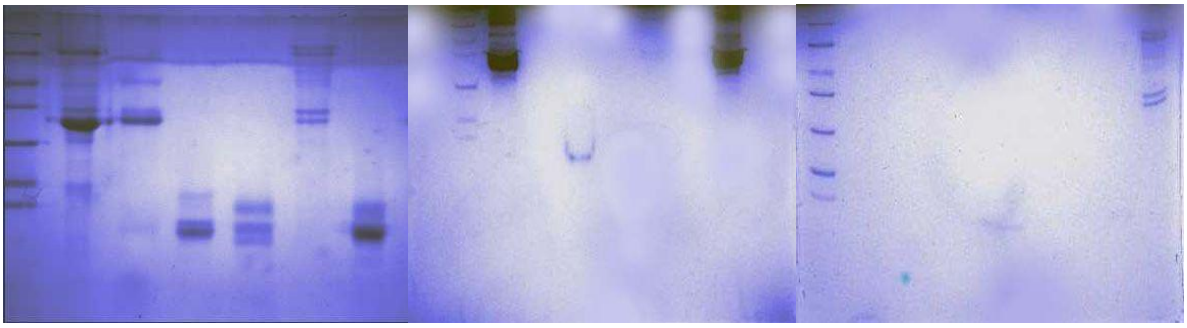
نمودار۱. فعالیت همولیتیک زهر خام عقرب همیسکورپیوس لپتوروس.

چهار فراکشن فعالیت همولیتیک داشتند که همگی در نواحی پیکهای ماژور در تست RP-HPLC بودند (شکل ۳). فراکشن های همولیتیک به ترتیب در مقاطع زمانی ۱۵۶/۲ , ۱۵۶/۷ , ۱۵۷/۵۵ و ۱۵۸/۷ از ستون RP-HPLC جدا گردید. بیشترین فعالیت همولیتیک درمیان دیگر فراکشن ها مربوط به فراکشن ۱۵۷/۵۵ بود که ۸۲٪ فعالیت همولیتیک از خود نشان داد(نمودار۲).



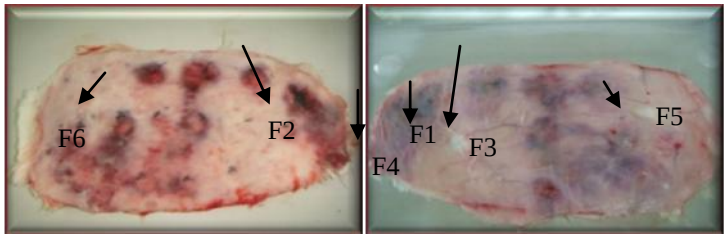
نمودار ۲. فعالیت همولیتیک فراکشن های محدوده ۳۲kDa.

وزن مولکولی فراکشن های حاصل از RP-HPLC با تست SDS-PAGE با شرایط احیاء مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰۳ فراکشن , شش فراکشن درمحدوده ۳۲KDa شناسایی گردید. پنج تا از فراکشن ها جزء ۹ پیک ماژور RP-HPLc بودند. و تعدادی از این پروتئین ها چندین باند در SDS-PAGE از خود بروز دادند(شکل ۳).Retention time فراکشن های دارای وزن ۳۲KDa به ترتیب جداسازی از ستون در واحد دقیقه، F1:۱۳۲/۹ ، ۲ / F2: ۱۵۶ ، F3:۱۵۶/۷، F4 :۱۵۷/۵، F5:۱۵۸/۷ و F6: ۱۵۹/۶ بود.

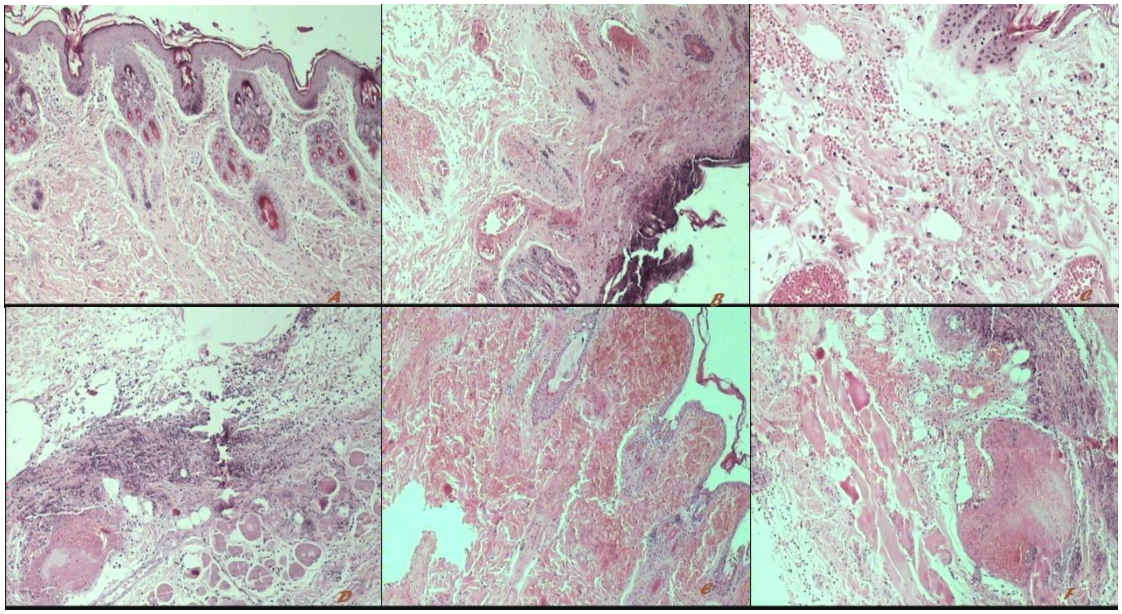


شکل۳. SDS-PAGE ۱۵٪ از فراکشنهای حاصل RP- HPLC بارنگ آمیزی کوماسی بلو R-250 .

(F1:۱۳۲/۹ ، ۲ / ۱۵۶ :F2 ، F3:۱۵۶/۷ ، ۱۵۷/۵ :F4، F5:۱۵۸/۷ و F6: ۱۵۹/۶)از ۶ فراکشن که درمحدوده ۳۲KDa قرار داشتند ۴ فراکشن با هر دو غلظت ۵ و ۲۰ میکروگرم از خود فعالیت درمونکروتیک بر روی پوست خرگوش نشان دادند (شکل ۴). در بررسی های پاتولوژی بافت، شدت های مختلفی از جراحات پوستی مشاهده گردید. جراحات بافتی شامل خونریزی، ترومبوز، ادم، نکروز و درماتیت چرکی بودند. بیشترین شدت جراحات در فراکشن ۱۵۷/۵۵ با غلظت ۲۰ میکروگرم مشاهده گردید (شکل ۵).



شکل ۴ . نمای قدامی و خلفی از پوست خرگوش تزریق شده توسط زهر و فراکشن های خالص شده (به ترتیب از چپ به راست).



شکل ۵ . A :کنترل منفی : پوست نسبتا طبیعی – کمی هیپرکراتوز- سلولهای آماسی به ندرت در درم(Derm).رنگامیزی هماتوکسین ائوزین(H-E) (بزرگنمایی۴ x). B: ونوم خام با غلظت µg ۵: پوستول- در سمت چپ خونریزی دیده میشود. رنگ امیزی هماتوکسین ائوزین(H-E) (بزرگنمایی۴ x) . C: ونوم خام غلظت µg ۲۰ : در هیپودرم پرخونی داخل رگها و خونریزی داخل عروق و رگ به همراه ادم دیده میشود. زهر از غلظت ۵ میکرگرم شدت آسیب بیشتر شده و پرخونی و خونریزی زیر اپیدرم دیده میشود. رنگ امیزی هماتوکسین ائوزین(H-E). بزرگنمایی۱۰x). D: فراکشن ۱۵۷/۵۵ با غلظت µg ۵: ترومبوز در رگ – نفوذ شدید سلولهای التهابی در هیپودرم دیده میشود به نحوی که واکنش التهابی به عضلات هم کشیده است و نکروز درناحیه درم و عضلات هم ایجاد شده است. رنگ امیزی هماتوکسین ائوزین(H-E). بزرگنمایی۴x). E: فراکشن ۱۵۷/۵۵ غلظت µg۲۰: خونریزی شدید در ناحیه پاپیلار درم دیده میشود. رنگ امیزی هماتوکسین ائوزین(H-E). بزرگنمایی۴x). F : فراکشن ۱۵۷/۵۵ غلظت µg۲۰: ترومبوز داخل ورید کوچک به همراه ادم- خونریزی شدید و واکنش التهابی چرکی به همراه نکروزعضلات که درماتیت چرکی و نکروتیک را ایجاد میکند. رنگ امیزی هماتوکسین ائوزین(H-E) (بزرگنمایی۴x).

بحث

عقرب گزیدگی یک مشکل بهداشت عمومی در اغلب کشورهای در حال توسعه دنیا است(۱) در ایران نیز برخی از استان های کشور با این مشکل مواجه بوده و سالیانه ۳۰ هزار نفر توسط عقرب گزیده میشوند(۳,۲). عقرب گزیدگی یکی از مهم ترین مشکلات بهداشتی استان خوزستان می باشد. گزارش های متعددی از عقرب گزیدگی در ایران به ویژه در استان خوزستان وجود دارد(۱۵-۱۱). شهباززاده و همکاران در یک مطالعه اپیدمیولوژیک در سال ۲۰۰۳، ۱۲۱۵۰ مورد عقرب گزیدگی را در شش شهر استان خوزستان گزارش کردند(۲).

تا کنون ۲۳ گونه عقرب در ایران شناسایی شده اند(۱۰) که ازمیان آنها Hemiscorpius lepturus (گادیم) یکی از خطرناک ترین عقرب ها به شمار می آید. علائم بالینی ناشی از گزش با این عقرب شامل زخم و نکروز شدید پوست، همولیز گلبول های قرمز، و اثرات سمی بر سیستم اعصاب مرکزی، تنفسی و قلبی عروقی است. ادم ریوی و نقص عمل کرد قلب یا کلیه از دلایل مرگ دربیماران است (۱۱و۱۲).

دراین تحقیق آنالیز زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس (HL) که سبب ایجاد عوارض پاتولوژی بالینی بخصوص در کودکان که قربانیان اصلی را تشکیل می دهند، مورد نظر قرار گرفت.

در این بررسی زهر همیسکورپیوس لپتوروس برای جداسازی فراکشن ها در ستون C18 تحت RP-HPLC قرار گرفت و ۱۰۳ فراکشن به صورت دستی جمع آوری گردید. در RP-HPLC، ۹ پیک ماژور مشاهده گردید. تست همولیتیک بر روی تمام فراکشن ها با هدف شناسایی فراکشن های همولیتیک انجام گردید. فاکتورهای مختلفی بر روی فعالیت همولیتیک تاثیر میگذارند(۱۷). در همیسکورپیوس لپتوروس فعالیت همولیتیک بستگی به کلسیم دارد و به همین دلیل بجای استفاده از EDTA از خون تازه هپارینه برای آزمایش استفاده گردید. چهار فراکشن از خود فعالیت همولیتیک متفاوت نشان دادند که در محدوده زمانی الوشن (دقیقه) ۱۵۶/۲، ۱۵۶/۷، ۱۵۷/۵۵ و ۱۵۸/۷ RP-HPLC قرار داشتند. فراکشن ۱۵۷/۵ فعالیت همولیتیکی قوی تری از خود نشان داد و حدس زده می شود پروتئین مزبور فعالیت فسفولیپازی داشته باشد. وزن مولکولی فراکشن های موجود در پیک های ماژور RP-HPLC با تست SDS-PAGE بررسی شد و وزن مولکولی همگی آنها در محدوده ۳۲ کیلو دالتون تعیین گردید. تعدادی از این فراکشن ها چندین باند در الکتروفورز از خود نشان دادند که احتمالا ایزوفرم هایی از یک پروتئین اصلی و یا دارای هیدروفوبیسیته مشابهی باشند.

چهار فراکشنی که فعالیت همولیتیک از خود نشان دادند نیز در تزریق زیر پوستی به خرگوش جراحات پوستی در محل تزریق از خود نشان دادند. در بررسی های پاتولوژی بافت پوست خرگوش، خونریزی شدید، ادم، نکروز در ناحیه درم، نفوذ سلولهای نوتروفیل، لنفوسیت و بخصوص ائوزینوفیل و ترومبوز در ناحیه رگ های وریدی، خاصیت سیتوتوکسیک زهر عقرب را اثبات نمود. جراحات پوستی بر روی بافت خرگوش در فراکشن ۱۵۷/۵۵ غلظت ۲۰ میکروگرم در بیشترین شدت ممکن مشاهده گردید و شکل آسیب در برخی از نواحی شبیه سوختگی های شدید در ناحیه فولیکول مو قابل مشاهده بود. روند شدت فعالیت درمونکروتیک فراکشن ها کاملا مشابه با فعالیت همولیتیک آنها بود و بدین ترتیب فعالیت همولیتیک/درمونکروتیک در زهر عقرب اثبات گردید.

مطالعات مهمی جهت شناسایی ژن های کد کننده توکسین های موجود در زهر عقرب ها انجام شده است(۲۳-۱۸). بررسی مقالات نشان داد که مشابهت زیادی ما بین زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با زهر عنکبوت قهوه ای یا انواع Loxoscele وجود دارد. نتایج آزمایش الکتروفورز دو بعدی صورت گرفته بر روی عنکبوت Loxosceles spp. نشان می دهد که یک گروه پروتئین همولیتیک و درمونکروتیک با وزن مولکولی در محدوده ۳۵-۳۲ کیلو دالتونی، مشابه با یافته های بدست آمده درمورد همیسکورپیوس لپتوروس می باشد. جالب توجه آن که از لحاظ pI تفاوت بسیار جزئی از خود نشان دادند و در آزمایشات بیوآسی بر خلاف توکسین ماژور خاصیت همولیتیک کم و یا فاقد آن بوده اند ولی از ایزومرهای توکسین ماژور به شمار می آیند (۲۴). علت این پدیده تا به حال مشخص نشده است اما حدس زده میشود به دلیل مضاعف شدگی ژن همولیتیک و سپس موتاسیون آن باشد.

نتیجه گیری

این اولین تحقیق در ایران مربوط به شناسایی و تخلیص پروتئین ماژور زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس (گادیم) می باشد. نتایج این تحقیق نه تنها می تواند در شناسایی آنتی ژنهای مسئول در سمیت زهر عقرب گادیم کمک نماید بلکه می تواند به بهینه سازی تولید آنتی سرم بر علیه زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در تحقیقات آینده کمک نماید و در نهایت در تشخیص و درمان اصولی و صحیح بیماران عقرب گزیده که از اهداف وزارت بهداشت و درمان است مورد استفاده قرار گیرد . پروتئین های ۳۲ KDa جداسازی و شناسایی شده حاصل از این تحقیق جهت تعیین توالی ناحیه N-Terminal در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

REFERENCES

1. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. Acta Trop.2008; 107(2): 71-9

2. Shahbazzadeh D, Amirkhani A, Djadid ND, Bigdeli S, Akbari A, Ahari H, Amini H, Dehghani R. Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzestan province, Iran (2003). Toxicon. 2009 Mar 15; 53(4):454-9.

3. Pipelzadeh MH, Jalali A, Taraz M, Pourabbas R and Zaremirakabadi A, An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus. Toxicon **50** (2007), pp. 984–992

4. Pipelzadeh MH, Dezfulian AR, Jalali MT, Mansouri AK. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from Hemiscorpious lepturus scorpion. Toxicon 2006;48:93-103.

5. Valavi E, Alemzadeh Ansari MJ. Hemolytic uremic syndrome following Hemiscorpius lepturus (scorpion) sting. Indian J Nephrol 2008;18:166-8

6. RADMANESH M. - Cutaneous manifestations of the Hemiscorpius lepturus sting: a clinical study. Int. J. Derm, 1998, 37: 500-507.

7. World Health organization.Proposed WHO guidlines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. 2008 Oct 13-17. Available from: URL: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/index.html

8. Forrester L J, Barrett J T , Campbell B J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider : The role of sphingomyelinase D. Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 187, Issue 2,30 April 1978, Pages 355-365

9. Borchani L, Sassi A, Shahbazzadeh D, Strub JM, Tounsi-Guetteti H, Boubaker MS, Akbari A, Van Dorsselaer A, El Ayeb M. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. Toxicon. 2011, 58(1):130-9.

10. Kovarik F .Results of Czech Biological Expedition to IRAN part 2. Arachnida: Scorpiones, with description of Iranobuthus krali gen.n.et sp.n and Hottentotta zagrosensis sp.n. (Buthidae). Acta Soc Zool Bohem. (1997). 61: 39-52.

11. Radmanesh M. Clinical study of Hemiscorpion lepturus in Iran. J Trop Med Hyg. 1990 Oct; 93(5):327-32.

12. GUERON, M., ILIA, R. SOFER, S. - The cardiovascular system after scorpion envenomation: a review. J. Toxicol. clin. Toxicol. 1992. 30: 245-258.

13. RAZI, E. MALEKANRAD, E. - Asymmetric pulmonary edema after scorpion sting: a case report. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 2008, 50(6): 347-350.

14. RADMANESH, M. Cutaneous manifestations of the Hemiscorpius lepturus sting: a clinical study. Int. J. Derm, 1998, 37: 500-507.

15. Dehghani R and Khamehchian T. Scrotum Injury by Scorpion Sting. Iranian J Arthropod-Borne Dis, (2008), 2(1): 49-52

16. Nikkhah M, Naderi-Manesh H, Taghdir M, Talebzadeh M, Sadeghi-Zadeh M, Schaller J and. Sarbolouki M. cDNA Cloning, Sequence Analysis and Molecular Modeling of a New Peptide from the Scorpion Buthotus saulcyi Venom. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 39, No. 3, May 2006, pp. 284

17. Bailey PM, BakkerAJ, Seymour JE, Wilce JAA. 2005. Functional comparison of the venom of three Australian jellyfish – Chironex fleckeri, Chiropsalmus sp., and Carybdea xaymacana – on cytosolic Ca2+, haemolysis and Artemia sp. lethality. Toxicon 45, 233–242.

18. Kozminsky-Atias A, Bar-Shalom A, Mishmar D and Zilberberg N. Assembling an arsenal, the scorpion way. BMC Evolutionary Biology 2008, 8:333, 1-13

19. ZHU Shunyi, ZENG Xianchun, LI Wenxin and JIANG Dahe. Molecular characterization of a K+ channel blocker in the scorpion Buthus martensii Karsch. Chinese Science Bulletin 2000, Vol. 45 No. 739-742

20. Hariprasad G, Saravanan K, Baskar Singh S, Das U, Sharma S, Kaur P, Singh T, Srinivasan A. Group III PLA2 from the scorpion, Mesobuthus tamulus: cloning and recombinant expression in E. coli. Electronic Journal of Biotechnology. 2009, 12,3. 1-7

21. DAI L, Jing-Jiang WU, Yi-Hua GU, Zheng-Dao LAN, Min-Hua LING and Cheng-Wu CHI. Genomic organization of three novel toxins from the scorpion Buthus martensi Karsch that are active on potassium channels.Biochem. J. (2000) 346, 805-809

22. Norma A. Valdez-Cruz1, Cesar V F. Batista1, Fernando Z. Zamudio1, Frank Bosmans2, Jan Tytgat2 and Lourival D. Possani. Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion Anuroctonus phaiodactylus. 1. 2004, Eur. J. Biochem. 271, 4753–4761

23. PH. da Silva, RB. da Silveira, MH. Appel, OC. Mangili, W. Gremski, SS. Veiga, Brown spider and loxoscelism, Toxicon 44 (2004) 693e709.

24. Kalapothakisa E, Chatzakia M, Gonc-alves-Dornelasa H, de Castroa CS, Silvestreb FG, Labornea FV, de Mourac JF, Veigac SS, Cha´ vez-Olo´ rteguid C, Graniere, Barbarof KC. The Loxtox protein family in Loxosceles intermedia (Mello-Leita˜ o) venom . Toxicon 50 (2007) 938–946