بررسی اثرات ضد سرطانی و خواص ضد باکتریایی سم خام مار شاخدار ایرانی

جمیل زرگان [۱*](Ph.D)، مجید میرزائی ندو شن [۱](M.Sc)، حسین ثباتی [۲](Ph.D)، حمیدر ضا گودرزی [۳](Ph.D)، ا شکان حاجی نورمحمدی [۱](M.Sc)، فیروز ابراهیمی [۱](Ph.D)

۱- مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (علیه السلام)، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، انیستیتو سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

۳- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۸ jazrgan@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱

چکیده

هدف: مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یکی از مشکلات مهم بهداشت عمومی در جهان گزارش شده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که زهر برخی از مارهای سمی دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد توموری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد باکتریایی زهر مار شاخدار ایرانی بر علیه Escherichia coli، Bacillus subtilis و Staphylococcus aureus، هم‌چنین بررسی اثرات ضد سرطانی غلظت‌های احتمالی دارای بیش‌ترین اثر ضد باکتری از سم این مار بر رشد سلول‌های سرطانی کبد در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: اثرات ضد باکتریایی سم در غلظت‌های ۲۵-۶/۴۰۰ µg/ml با استفاده از روش‌های MTT reduction، MIC assay، Disc diffusion assay و Well diffusion test مورد بررسی قرار گرفت. از تتراسایکلین در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان آنتی‌بیوتیک استاندارد استفاده شد. هم‌چنین اثرات ضد سرطانی سم خام در غلظت‌های ۵۰-۴۰۰ µg/ml با استفاده از روش MTT assay، قرمز خنثی و کامت قلیایی بر روی سلول سرطانی کبد (HepG2) مطالعه گردید.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان می‌دهد که زهر افعی شاخدار ایرانی دارای اثرات ضد باکتری بوده و این اثر بر علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر می‌باشد. هم‌چنین سم خام این افعی با القاء آپاپتوزو نکروز سبب مرگ و میر در سلول‌های سرطانی کبد شده است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که زهر خام افعی شاخدار ایرانی دارای فعالیت ضد باکتری و ضدسرطانی می‌باشد. این نتایج زهر این افعی را به‌عنوان کاندید مناسبی جهت جداسازی مولکول‌های با اثرات ضد باکتریایی و اثرات ضد سرطانی معرفی می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: سم مار، ضد سرطان، سمیت سلولی، ضد باکتری، مار شاخدار ایرانی

مقدمه

در دنیای فارماکولوژی، همزمان با کشف و مصرف آنتی‌بیوتیک‌های جدید، برخی از باکتری‌های بیماری‌زا به‌تدریج نسبت به آن‌ها مقاوم می‌گردند. این امر همواره به‌عنوان یک مشکل فراروی میکروبیولوژیست‌ها قرار داشته و زمینه تحقیق و کشف آنتی‌بیوتیک‌های موثرتر را فراهم کرده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که شناسایی مولکول‌های موثر در درمان بیمارها، از منابع مختلف زیستی مانند گیاهان و جانوران سمی و از جمله مارها مورد توجه بسیاری از مراکز تحقیقاتی قرار گرفته است [۱].

سم مار مخلوطی از مواد بیولوژیکی مختلف و از جمله پروتئین‌های مختلف با خواص آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد [۲] که عموماً حاوی فاکتورهای نروتوکسین، پروتئولیتیک، منعقدکننده خون، فسفولیپازها، کولینسترازها، هیالورونیدازها، آمینو اسید اکسیداز و آنزیم‌های دیگر می‌باشد [۳].

مطالعات منتشر شده نشان می‌دهد که هنگام گزیدگی با مارها و علی‌رغم وجود آلودگی شدید دهان و دندان‌های نیش آن‌ها به طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زا، شیوع کمی از عفونت‌های باکتریایی در محل گزیدگی‌ها مشاهده می‌شود. این موضوع بیان‌کننده حضور مولکول‌های ضد باکتری در سم مارهای سمی است [۴].

گزارشات منتشر شده نشان می‌دهد که مواد موثر موجود در بزاق دهان یا زهر مارهای سمی از دیرباز برای درمان برخی از بیماری‌ها، تولید انواع داروها، سرم‌ها و واکسن‌ها مورد توجه محققین و داروسازان قرار گرفته است [۵].

اولین گزارش‌ها در مورد فعالیت‌های ضد باکتری در سم مارهای سمی خانواده الاپیده و ویپریده در سال ۱۹۴۸و ۱۹۶۸ منتشر شده است [۶]. اسکارنز (Skarnes) نیز در سال ۱۹۷۰ برای نخستین بار فعالیت ضد میکروبی برخی از آنزیم‌ها در سم مار را گزارش کرد [۷]. نتایج مطالعات سم‌شناسی نشان می‌دهد که تاکنون مولکول‌های دارای فعالیت ضد میکروبی زیادی از زهر گونه‌های مختلف مار جداسازی شده است. [۸،۹،۱۰]. مطالعات نشان می‌دهد که تعدادی قابل توجهی از آن‌ها به پپتیدها تعلق دارند [۱۱].

هم‌چنین گزارشات منتشر شده حکایت از آن دارد که برخی از مولکول‌های موجود در سموم مارها دارای فعالیت ضد توموری بوده و از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نمایند [۱۲]. این نتایج زهر مارها را به‌عنوان یک منبع طبیعی مهم برای جداسازی و شناسایی مولکول‌های موثر در درمان بیماری‌های لاعلاج مانند سرطان به دنیای فارماکولوژی معرفی کرده است [۱۲].

مار شاخدار ایرانی (Pseudocerastes persicus) یکی از مارهای سمی خطرناک و یکی از اعضای خانواده افعی‌ها (Viperidae) می‌باشد. این افعی علاوه بر ایران از کشورهای پاکستان، افغانستان، عمان و عراق نیز گزارش شده و در ایران در مناطق شنی، صخره‌ای و بوته‌زارهای استان‌های یزد، خراسان، کرمان، سیستان و بلوچستان ، اصفهان، فارس، سمنان، مرکزی، خوزستان، زنجان، تهران، قم و هرمزگان انتشار دارد [۱۳].

هدف از این مطالعه بررسی اثر سم خام مار شاخدار ایرانی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی و هم‌چنین اثر غلظت‌های احتمالی دارای اثر ضد باکتری زهر مار شاخدار ایرانی بر رشد سلول‌های سرطانی کبد در شرایط in-vitro به منظور ارزیابی امکان جداسازی مواد ضد باکتریایی و ضد سرطانی از اجزای آن بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه زهر و پروتئین سنجی: جهت تهیه زهر از افعی، ضمن رعایت ملاحظات ایمنی و با قراردادن دندان سمی آن در داخل شیشه جمع‌آوری سم و با فشار آوردن مختصر به غدد سمی افعی، زهر موجود در آن‌ها به داخل شیشه تزریق شده و جمع‌آوری گردید [۹]. محلول سمی لیوفیلیز شده و تا زمان استفاده در آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی حدود یک میلی‌گرم زهر پودر شده در ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس هیدروکلرید ۵۰ میلی‌مولار استریل و جهت بررسی سمیت سلولی نیز حدود دو میلی‌گرم از آن سم در ۱۵۰میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل مخلوط گردید. میزان پروتئین موجود در محلول‌های سمی هموژنیزه شده با استفاده از روش برادفورد [۱۴] تعیین شد. جهت از بین بردن آلودگی‌های میکروبی احتمالی در محلول سمی مورد نیاز تست‌های سلولی، ۱٪ آنتی‌بیوتیک- آنتی‌مایکوتیک (Antibiotic – antimycotic: Invitrogen, USA) اضافه و پس از یک شب نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

الف- باکتری و رده سلولی مورد استفاده:

باکتری غیر بیماری‌زا گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس (Bacillus subtilis subsp.spizizenii, ATCC 6633)، باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (Escherichia coli, ATCC 25922) و سوش گرم مثبت بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus, ATCC 25923) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (Persian type culture collection) و سلول‌های سرطان کبد (HepG2) از بانک سلولی انستیتوپاستور تهران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

ب- بررسی خواص ضد باکتریایی زهر خام:

محیط کشت و آنتی‌بیوتیک: جهت کشت باکتری از محیط کشت مایع و جامد مولار هینتون (MH) شرکت Quelab کانادا و جهت مقایسه اثر سم با آنتی‌بیوتیک استاندارد از تتراسایکلین (Sigma, USA) درغلظت ۵۰ µg/ml استفاده شد.

MTT assay

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در سیتوپلاسم و در نهایت تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول انجام می‌شود. این کریستال‌ها با اضافه نمودن DMSO به صورت محلول در می‌آیند [۱۵].

پس از کشت باکتری در محیط مولر هینتون براث، میزان ۵ میکرولیتر از محیط نیم مک فارلند [۱۶] در هر چاهک از پلیت استریل ۹۶ خانه کشت شد. ضمن رساندن حجم نهایی هر چاهک با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هینتون براث) به ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سریال رقت، باکتری در تماس با غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از زهر خام قرار گرفت. در این آزمایش از تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت، محیط کشت حاوی باکتری به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان بلانک استفاده شد.

پلیت به مدت ۲۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به تمام چاهک‌ها ۵ میکرولیتر MTT (غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه و به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به هر چاهک اضافه گردید. پس از ۲ ساعت انکوبه کردن در شرایط تاریکی، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد.

آزمایش فوق ۳ بار انجام و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده ماندن باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۶].

درصد حیاتی باکتری = (a/b) ×۱۰۰

جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک= a

جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک= b

تست۶ حداقل غلظت مهاری (MIC assay)

مراحل انجام تست حداقل غلظت مهاری در پلیت ۹۶ خانه مشابه تست MTT assay بوده لیکن پس قرار دادن باکتری در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف زهر و انکوبه نمودن آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بدون افزودن هیچ‌گونه ماده نشانگر اضافی، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز ۳ بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت ۳ چاهک (۳بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد مهاری ناشی از تاثیر سم و آنتی‌بیوتیک استاندارد بر باکتری‌های تحت تست با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۷].

درصد مهاری باکتری = [۱−(a/b)] ×۱۰۰

جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک= a

جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک= b

تست انتشار در دیسک (Disc diffusion assay)

این آزمایش مطابق روش Bauer و همکاران انجام گرفت [۱۸].

ابتدا باکتری در محیط کشت مایع کشت، و به مدت ۱۸−۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. محیط کشت جامد با ضخامت ۴ میلی‌متر در پلیت‌های شیشه‌ای تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری روی سطح پلیت ریخته و با استفاده از لوپ شیشه‌ای سر کج استریل، کشت چمنی انجام شد. با استفاده از پنس استریل دیسک‌های استریل (تهیه شده از شرکت پادتن طب) حاوی ۴۰ میکرولیتر زهر در غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سطح پلیت قرار گرفت. در این آزمایش جهت مقایسه اثر سم، از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در دیسک به عنوان کنترل مثبت و از تریس هیدروکلراید ۵۰ میلی‌مولار به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴−۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از آن وجود هاله مهاری در بررسی و اندازه آن تعیین گردید. این آزمایش برای هر سوش باکتری به‌صورت دو تکرار، ۳ بار انجام شد.

تست انتشار در چاهک (Well diffusion assay)

این روش مشابه روش انتشار دیسک می‌باشد با این تفاوت که در این تست محلول سمی به جای قرار گرفتن روی دیسک به داخل چاهک ایجاد شده در محیط کشت اضافه گردید [۱۹].

به‌صورت خلاصه پس از انجام کشت چمنی با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی درون محیط کشت و قطعات ژل بریده شده به بیرون منتقل و ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت آگار مایع جهت مسدود نمودن ته چاهک و جلوگیری از نشت و جاری شدن محلول سمی به زیر محیط کشت به درون چاهک ریخته شد. پس از ریختن ۴۰ میکرولیتر زهر خام در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درون، پلیت به مدت ۲۴−۱۸ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مدت زمان ذکرشده وجود هاله در اطراف چاهک‌ها بررسی و قطر آن تعیین شد. این آزمایش نیز برای هر سوش باکتری به‌صورت دو تکرار، ۳ بار انجام گردید.

ج− بررسی خواص ضد سرطانی زهر خام:

کشت سلول:

برای کشت سلول سرطانی کبد (HepG2) از محیط کشت DMEM-F12 (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (Gibco, USA) استفاده شد.

این سلول‌ها در فلاسک‌هایی به حجم ۵۰−۲۵ میلی‌لیتر مکعب کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. هر ۳−۲ روز محیط کشت تعویض و پس از فراهم شدن جمعیت سلولی مورد نیاز برای هر آزمایش با استفاده از Trypsin-EDTA تهیه شده از شرکت (Sigma-Aldrich, USA) از فلاسک جدا و پس از شمارش با استفاده از لام نئوبار مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT (MTT reduction assay):

این آزمایش مطابق روش انجام شده توسط زرگان و همکاران انجام گردید [۲۰].

به منظور انجام این تست تعداد ۳×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم کشت داده شد.

پس از یک شب (Overnight) انکوبه کردن در شرایط ۵٪ CO_2، رطوبت حدود ۸۰٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محیط کشت قدیمی خارج و سلول سرطانی در معرض محیط کشت جدید (فاقد سرم) حاوی غلظت‌های مختلف از زهر (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت.

پس از ۲۴ ساعت، ۵ میکرولیتر محلول MTT (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پس از تشکیل کریستال بنفش (فورمازون) در سلول‌های زنده، محیط کشت هر چاهک خارج و پس از شستشو داخل چاهک با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه گردید. پس از ۴-۳ ساعت انکوبه کردن پلیت در شرایط تاریکی و حل شدن کریستال‌های بنفش در DMSO، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. در این تست از محیط کشت به عنوان بلانک و از محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده گردید.

این آزمایش ۳ بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده ماندن سلول پس از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۷].

$$\text{درصد حیاتی سلول} = (a/b) \times ۱۰۰$$

a= جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک

b= جذب نوری کنترل منهای جذب نوری بلانک

بررسی سمیت سلولی با روش رنگ‌سنجی قرمز خنثی (Neutral red uptake assay)

مراحل انجام آزمایش رنگ‌سنجی قرمز خنثی مشابه MTT assay بوده لیکن پس از انکوبه کردن سلول مجاورت داده شده با محلول سمی به مدت ۲۴ ساعت، به جای محلول MTT، یک میکرولیتر از محلول قرمز خنثی (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پس از اتصال ماده قرمز خنثی با سطح لیزوزوم سلول زنده و تشکیل شدن کریستال قرمز در سیتوپلاسم سلول‌های زنده، محیط کشت حاوی قرمز خنثی هر چاهک تخلیه و پس از دو بار شستشوی هر چاهک با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر بافر فیکس‌کننده (فرمالدهید ۳۷٪، کلرید کلسیم ۱۰٪) به آن اضافه شد. پس از یک دقیقه این بافر را خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حل‌کننده (اسید استیک ۰/۵٪) به آن اضافه گردید. در ادامه پلیت به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر، در شرایط تاریکی و در دمای آزمایشگاه انکوبه و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد.

این آزمایش ۳ بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد مرگ و میر ناشی از غلظت‌های مختلف سم بر روی رشد سلول با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۲۱].

$$\text{درصد مرگ و میر سلول} = [۱-(a/b)] \times ۱۰۰$$

a= جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک

b= جذب نوری کنترل منهای جذب نوری بلانک

بررسی القاء اپوپتوزیس توسط زهر با استفاده از تست کامت قلیایی (comet assay)

این تست یک از بهترین روش‌های مناسب برای بررسی DNA آسیب‌دیده در سلول می‌باشد.

برای انجام این آزمایش ابتدا در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای استریل حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم تعداد ۱۲×۱۰^{۴} سلول کشت داده شد. پلیت به مدت یک شب (Overnight) تحت شرایط ۵٪ CO_2، رطوبت ۸۰٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در این تست از محیط کشت به عنوان بلانک و از محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از آن محیط کشت اولیه هر چاهک، تخلیه و سلول‌ها در معرض ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید (فاقد سرم) حاوی غلظت‌های مختلف زهر (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. پس از انکوبه نمودن سلول به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰٪ و ۵٪ CO_2، سلول‌های هر چاهک با استفاده از تریپسین جداسازی و جمع‌آوری گردید. میکروتیوپ‌های حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۵۰۰ سانترفیوژ و محلول رویی تخلیه گردید. جهت شستشوی سلول‌ها به هر یک از لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر PBS pH=۷/۴ اضافه و پس از سانتریفیوژ با شرایط ذکر شده مایع رویی تخلیه گردید. سپس به لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و با کمک سمپلر و سرنگ انسولین، سلول‌ها از یک‌دیگر جدا و به صورت منفرد در آمدند. در ادامه ضمن پوشاندن اسلایدهای مورد نیاز تست، با آگاروز با نقطه ذوب نرمال (NMA٪۱)، سوسپانسیون سلولی تست و کنترل مخلوط شده با آگارز با نقطه ذوب پایین (LMA٪۱) به نسبت یک به دو بر روی اسلایدها به‌صورت یک

لایه صاف قرار گرفت. جهت لیز شدن غشاء سلول و هسته، تمامی اسلایدها در بافر لیزکننده (NaCl 2.5M، EDTA 100mM، Tris 10mM، NaOH 0.2M، Triton X-100 %1 pH=10) سرد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت، درون یخچال قرار داده شدند. پس از خارج کردن بافر لیزکننده، اسلایدها ۲۰ دقیقه و در ۲ نوبت با بافر الکتروفورز (NaOH %3M، EDTA 1mM و pH>13) شستشو و پس از آن به منظور باز شدن DNA به مدت ۴۰ دقیقه درون بافر الکتروفورز سرد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن اسلایدها از محلول خارج و درون تانک الکتروفورز حاوی بافر قرار گرفته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۲۵ و جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شدند. در مرحله بعدی به منظور خنثی‌سازی محیط بازی، اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر خنثی‌کننده (Tris ۴٪ M، pH=۷/۵) قرار گرفتند. جهت رنگ‌آمیزی سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه و پس از حدود ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه با آب دو بار تقطیر شستشوی آن‌ها انجام شد. DNA سلول‌های هر اسلاید توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفت. برای هر نمونه از موقعیت‌های مختلف اسلاید و حداقل از DNA صد سلول تصویر تهیه و نتایج به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت [۲۲].

آنالیز آماری

نتایج هر تست به صورت Mean±SD گزارش و داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad InStat) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. غلظت‌های مختلف سم نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به یک‌دیگر، با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) و آزمون توکی بررسی گردید. $P<۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Microsoft Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام گرفت.

نتایج

الف- بررسی خواص ضد باکتریایی زهرخام

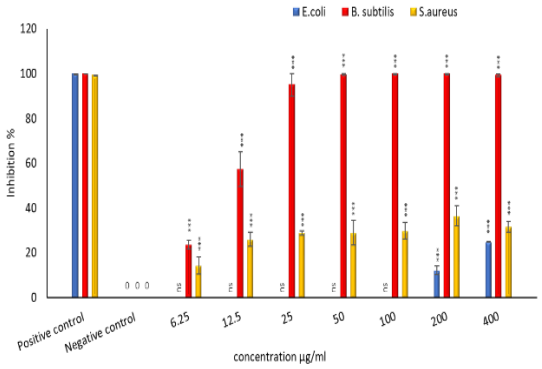
نتایج تست MTT assay. نتایج به‌دست آمده نشان داد که زهر تنها در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل منفی (محیط کشت نرمال واجد باکتری) از رشد باکتری اشرشیاکلی به‌صورت معنادار جلوگیری نموده است. میزان درصد حیاتی این باکتری در غلظت‌های ۵۰-۶/۲۵ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۹۵/۷۹، ۹۶/۲۹ و ۸۳ بوده است (شکل ۱). ضمناً IC_{50} زهر خام برای باکتری اشرشیاکلی حدود ۱/۲۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با توجه به نتایج به‌دست آمده تعیین گردید.

در مورد سوش باسیلوس سوبتیلیس، زهر خام در غلظت ۵-۱۲/۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی اثر مهاری معنادار ایجاد نمود. میزان درصد حیاتی این باکتری در غلظت‌های مختلف زهر ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۸۹/۶۲، ۶۲/۴۹، ۱۳/۷۳، ۶/۵۶، ۲/۱۴، ۱/۶۳ و ۴/۶ بوده است. زهر در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر منفی بر رشد این باکتری داشته ولی این اثر درمقایسه با کنترل منفی معنادار نبود. در غلظت ۴۰۰-۲۵ اثر مهاری زهر خام از کنترل مثبت (تتراسایکلین) بیش‌تر بوده است. آنالیز آماری نشان داد که اثر زهر خام در غلظت ۴۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر این باکتری معنادار ولی در مقایسه با یک‌دیگر معنادار نیست.

با توجه به نتایج به‌دست آمده IC_{50} زهر خام برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس ۱۵/۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که میزان درصد حیاتی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، در غلظت ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زهرخام به ترتیب ۹۵/۱۱، ۸۵/۲۹، ۷۲/۴۸، ۶۲/۲۳، ۵۹/۹۸، ۶۳/۳۱ و ۶۳/۹۶ بوده است.

زهر خام در غلظت۴۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهاری معناداری بر این باکتری نسبت به کنترل منفی ایجاد نمود. زهر در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر منفی بر رشد این باکتری داشته ولی این اثر در مقایسه با کنترل منفی معنادار نبود. بررسی آماری نشان داد که اثر زهر در غلظت‌های مختلف ۲۵-۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل منفی معنادار ولی در مقایسه با یک‌دیگر معنادار نمی‌باشد (شکل ۱) شایان ذکر است میزان IC_{50} زهر خام برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

نتایج تست حداقل غلظت مهاری. زهر افعی در غلظت‌های ۱۰۰- ۶/۲۵ بر رشد باکتری اشرشیاکلی اثر بازدارنده نداشته ولی در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۲/۱۵ و ۲۴/۹۹٪ اثر مهاری القاء نموده است، که در مقایسه با اثر تتراسایکلین غیرقابل توجه بوده و تفاوت تأثیر آن‌ها معنادار می‌باشد (شکل ۲).



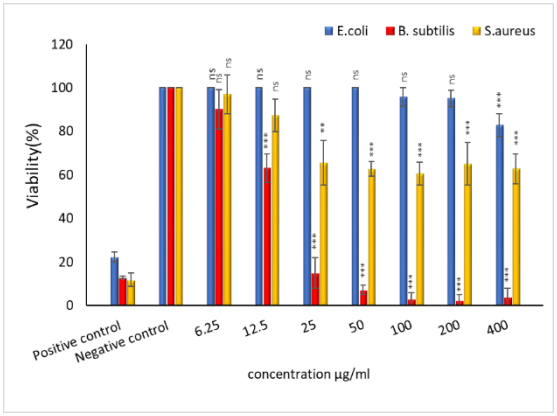
شکل ۱. اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف زهر خام مار شاخدار ایرانی بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست MTT assay. . اثر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل منفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. (ns: non-significant)، (*: $P<0.05$)، (**:$P<0.01$)، (***:$P<0.001$)

میزان اثر مهاری زهر بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۲۳/۲۲، ۵۸/۹۲، ۹۲/۸۰، ۹۹/۴۸، ۹۹/۶۵، ۹۹/۷۱ و ۹۹/۳ بوده است.

آنالیز آماری انجام شده نشان داد که زهر خام در غلظت ۲۵-۶/۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با کنترل منفی اثر مهاری معنادار ایجاد نموده است. اثر مهاری زهر در غلظت ۴۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل منفی معنادار، اما در مقایسه با یک‌دیگر و نسبت با آنتی‌بیوتیک استاندارد معنادار نبود (شکل ۲).

زهر خام بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر بازدارنده داشته و میزان اثر مهار ی القاء شده بر آن در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۳/۹۵، ۲۵/۲۸، ۲۹/۱۳، ۲۷/۳۰، ۳۰/۵۲، ۳۵/۹۱ و ۳۱/۶۹ بوده است.

بررسی آماری نشان داد که زهر خام در غلظت‌های ۴۰۰-۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد این باکتری اثر مهاری معناداری نسبت به کنترل منفی ایجاد نموده است. تلفات ناشی از اثر زهر در غلظت‌های مختلف ۴۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل منفی معنادار ولی در مقایسه با یک‌دیگر معنادار نبود (شکل ۲).



شکل ۲. اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف زهر خام مار شاخدار ایرانی بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست MIC assay. اثر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل منفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. (ns: non-significant)، (*:$P<0.05$)، (**:$P<0.01$)، (***:$P<0.001$).

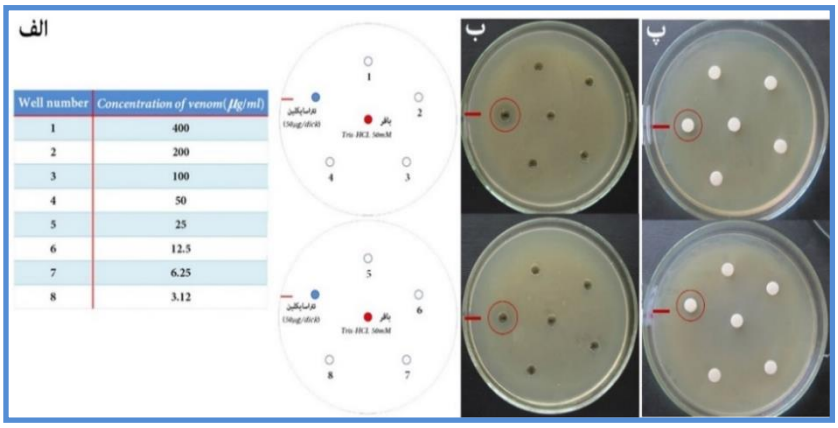
نتایج تست‌های انتشار در دیسک و چاهک. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف زهر در تست انتشار در دیسک و چاهک نشان از تکرارپذیر نبودن نتایج حاصل از این دو تست به‌خصوص در غلظت‌های پایین زهر می‌باشد. با این حال بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که سم این افعی در غلظت‌های فوق بر رشد باکتری اشرشیاکلی اثر مهاری نداشته است (شکل ۳).

نتایج حاصل از این آزمایشات در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نشان داد که زهر خام در غلظت ۴۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری دارای اثرات مهاری بوده اما در غلظت ۲۵- ۶/۵، بر رشد باکتری اثر بازندارنده نداشته است (شکل ۴).

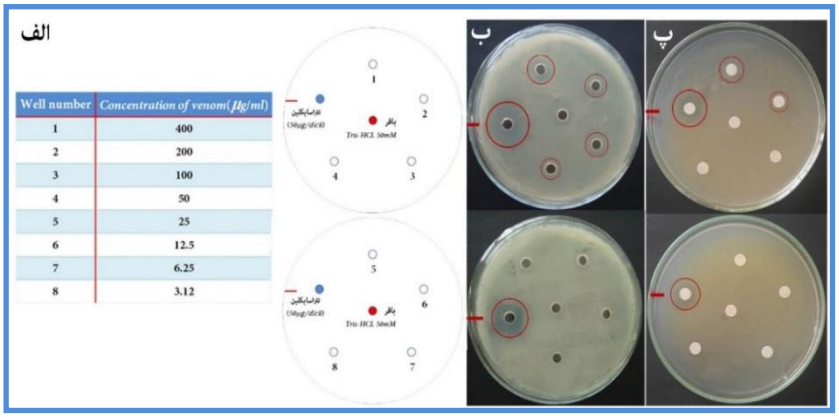
هم‌چنین زهر تنها در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری و در غلظت‌های پایین‌تر اثر مهاری نداشته است (شکل ۵).

ب- بررسی خواص ضد سرطانی زهر خام:

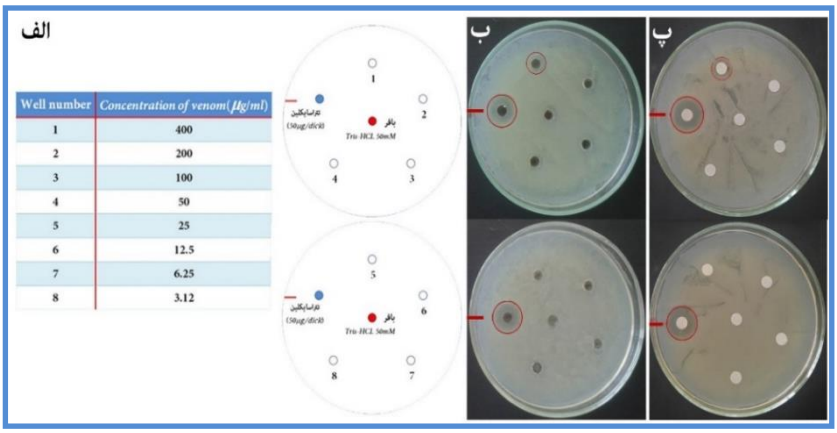
نتایج بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT. زهر در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب مرگ و میر زیادی در سلول‌های سرطانی کبد شده است، به ترتیبی که درصد حیاتی سلول در غلظت‌های فوق به ترتیب به ۱۴/۱۲، ۱۰/۹۷، ۱۰/۴۳ و ۹/۹۶٪ کاهش یافته است. تلفات ایجاد شده در سلول ناشی از غلظت‌های مختلف ذکر شده زهر، معنادار نمی‌باشد (شکل ۶) با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان IC50 سم خام برای رده سلولی سرطانی کبد حدود ۱۵/۸۴ ماکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.



شکل۳. بررسی اثر ضد باکتریایی زهر خام به روش های انتشار در دیسک و چاهک برعلیه رشد باکتری اشرشیا کلی. الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده، ب) تست انتشار چاهک پ) تست انتشار دیسک

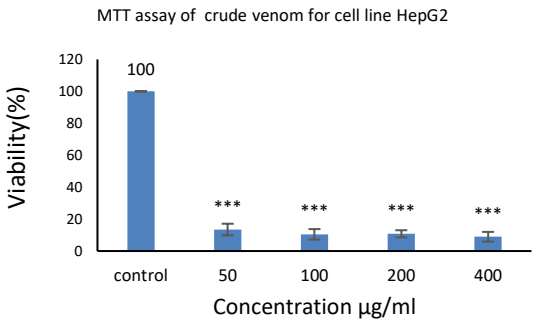


شکل۴. بررسی اثر ضد باکتریایی زهر خام به روش های انتشار در دیسک و چاهک برعلیه رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده ب) تست انتشار چاهک پ) تست انتشار دیسک



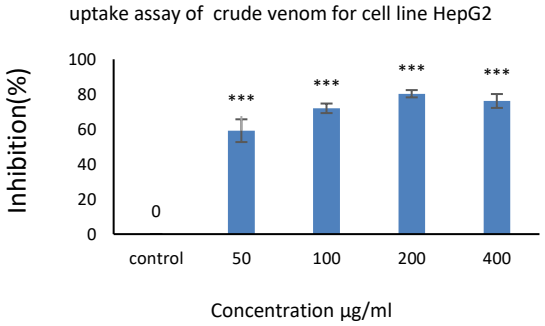
شکل۵. بررسی اثر ضد باکتریایی زهر خام به روش های انتشار در دیسک و چاهک برعلیه رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده ب) تست انتشار چاهک پ) تست انتشار دیسک

نتایج بررسی سمیت سلولی با روش رنگ‌سنجی قرمز خنثی. میزان تلفات سلول‌های سرطانی کبد در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از زهر خام به ترتیب ۶۰/۱۳، ۷۲/۵۸، ۸۱/۶۱ و ۷۷/۴۸ بوده است. زهر در غلظت ۴۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل (حاوی سلول و محیط کشت) دارای اثر مهاری معنادار بوده اما میزان تلفات ناشی از تاثیر غلظت‌ها نسبت به یک‌دیگر معنادار نیست (شکل۷).



شکل۶. درصد حیاتی سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف زهر خام مار شاخدار ایرانی بر اساس روش MTT assay اثر غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفته است.

(***: P 0.001)

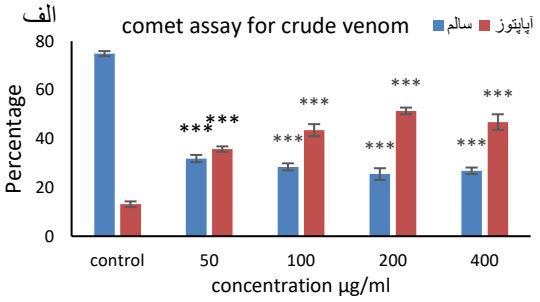


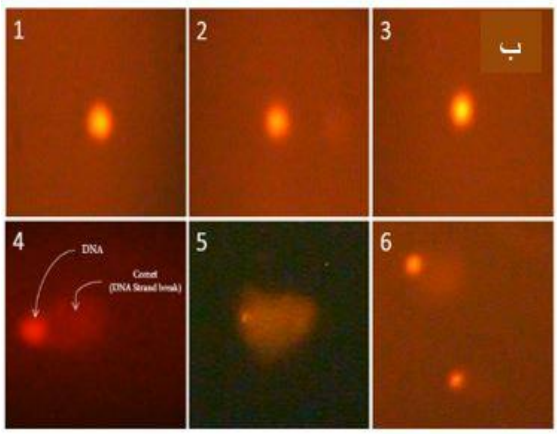
شکل۷. درصد مرگ و میر سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس با غلظت-های مختلف زهر خام مار شاخدار ایرانی بر اساس روش رنگ قرمز خنثی مرگ و میر ناشی از تاثیر هر یک از غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفته است. (***: P 0.001)

نتایج بررسی القاء آپوپتوزیس توسط زهر با استفاده از تست کامت قلیایی. نتایج این مطالعه نشان داد که زهر افعی شاخدار ایرانی با القاء آپوپتوز سبب مرگ و میر در سلول‌های سرطانی کبد می شود. زهر در غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم به ترتیب سبب ۳۶/۶، ۴۳/۲۸، ۵۱/۵ و ۴۷/۱۳٪ آپوپتوز در سلول شده است.

مطالعه مروفولوژیکی سلول‌های تحت تاثیر زهر نیز نشان داد که زهر این افعی علاوه بر آپاپتوز، نکروز را نیز در سلول‌های سرطانی کبد القاء می‌نماید و این اثر از غلظت ۲۰۰ ماکروگرم بر لیتر به بالا از روند صعودی‌تری در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر برخوردار می‌گردد.

این نتایج نشان می‌دهد که مرگ و میر ایجاد شده در سلول‌های سرطانی ناشی از تاثیر مشترک آپوپتوزیس و نکروزیس زهر می‌باشد (شکل۸).





شکل۸. میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط زهر خام مار شاخدار ایرانی در سلولهای سرطانی کبد بر اساس تست کامت قلیایی الف : نمودار تغییر مرفولوژیکی DNA ناشی از تاثیر هر یک از غلظتها نسبت به گروه کنترل (***: P 0.001). ب : تغییرات مورفولوژیکی DNA سلول‌های مجاورت داده شده با زهر خام مار شاخدار ایرانی در مقایسه با سلولهای کنترل [۱-۳: تصویرDNA سلولهای سالم(۴۰×) ، ۴-۶: تصویرDNA سلول آپوپتوز شده(۴۰×)]

بحث و نتیجه‌گیری

طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization (WHO، بیماری های عفونی جزء ۱۰ علت عمده مرگ و میر در دنیا هستند. بررسی‌ها نشان داده است که ظهور سویه‌های مقاوم باکتریایی نسبت به داروهای موجود، خطرات و تهدیدات عفونت‌ها را به طور چشمگیری افزایش داده است. بسیاری از مراکز تحقیقاتی یافتن مولکول‌های جدید با خواص درمانی موثر به ویژه از منابع زیستی طبیعی و از جمله زهر جانوران سمی همانند مارها را در دستور کار خود قرار داده‌اند [۲۳].

مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که زهر مارها منبعی از مولکول‌های ناشناخته از مواد فعال زیستی هستند [۲۴] که می‌توانند به‌عنوان کاندید مناسبی جهت تولید داروهای ضد میکروبی و ضد سرطانی مورد بررسی قرار گیرند.

در این مطالعه برای اولین بار اثرات ضدباکتری و سمیت سلولی سم خام مار شاخدار ایرانی (Pseudocerastes persicus) در شرایط In-vitro به منظور ارزیابی امکان

جدا سازی مولکول‌های با اثرات ضد باکتریایی و سمی جهت سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

برای مطالعه اثرات ضد باکتری زهر خام از روش‌های MTT reduction، MIC assay، Disc diffusion assay و Well diffusion test استفاده شد.

نتایج به‌دست آمده حاصل از آزمایشات MTT reduction و MIC assay نشان داد که زهر خام افعی شاخدار ایرانی بر باکتری ا شر شیاکلی به‌عنوان نماینده باکتری‌های گرم منفی تنها در بالاترین غلظت (۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) دارای اثر مهاری معنادار می‌باشد. در حالی که در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس سم به ترتیب در غلظت‌های ۴۰۰-۱۲/۵ و ۴۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری جلوگیری نموده است.

دلیل تفاوت جزئی در نتایج حاصل از MTT و MIC نا شی از تفاوت محا سبه اثر مهاری سم در دو روش می‌با شد، در روش MIC کدورت ناشی از حضور باکتری‌ها که شامل باکتری های مرده و زنده است در طول موج ۶۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در حالی‌که در روش MTT جذب نوری ذرات فورمازون تشکیل شده در سیتوپلا سم باکتری‌های زنده پس از حل شدن در DMSO در طول موج ۵۹۵ نانومتر [۲۵] تعیین می‌گردد. به نظر می‌رسد آزمایش MTT در مقایسه با روش MIC نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌کند.

هم‌چنین نتایج مطالعه اثرات ضدباکتری سم خام با استفاده از دو روش انتشار در چاهک و دیسک در این تحقیق نشان داد که سم مار بر باکتری گرم منفی فاقد اثر مهاری اما در مورد دو باکتری گرم مثبت اثر ضد باکتری دارد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که این دو روش به صورت کیفی اثرات MTT و MIC را تأیید، اما از لحاظ کمی نتایج تکرار پذیر ایجاد نمی‌کنند. به نظر می‌رسد از جمله دلایل این موضوع در روش تست انتشار از چاهک این است که پروتئین‌ها و پپتیدهای سمی در ته چاهک رسوب نموده و دیواره و اطراف چاهک‌ها نیز همانند صافی عمل کرده و از نفوذ تمام محتویات سم به داخل محیط کشت جامد جلوگیری می‌نماید. در مورد دیسک نیز این احتمال وجود دارد که خود دیسک به عنوان صافی عمل کرده و مانع از خروج و نفوذ کامل اجزای زهر به‌داخل محیط کشت می‌شود.

جذب سریع آب موجود در سطح فوقانی محیط کشت توسط دیسک کاغذی و عدم جذب کامل سوسپانسیون سمی که امکان انتشار ناهمگن در محیط کشت را فراهم می‌نماید نیز از معایب دیگر این روش می‌باشد.

در این مطالعه مشخص شد که زهر افعی شاخدار ایرانی بیش‌تر بر باکتری‌های گرم مثبت موثر است. این فعالیت ضد باکتریایی انتخابی ممکن است به دلیل عوامل مختلفی مانند تفاوت میان گونه‌های باکتریایی از جمله تراکم و ساختار لیپوپلی ساکارید موجود در دیواره باکتری‌های گرم منفی و یا ترکیب چربی در غشای سیتوپلاسمی و پتانسیل الکترواستاتیک در سراسر غشاء در باکتری‌های گرم مثبت باشد [۲۶].

نتایج این مطالعه با گزارشات هوسنیه (۲۰۱۲)، شبل (۲۰۱۲)، استابلی (۲۰۰۴)، استیلز (۱۹۹۱) و هم‌چنین احمدی و همکاران [۲۹] که نشان می‌دهد سم افعی‌ها، بیش‌تر بر باکتری های گرم مثبت اثر دارند [۸،۹،۱۶،۲۷،۲۸] هم‌خوانی دارد.

از طرفی اثر مهاری سم افعی شاخدار ایرانی در بالاترین غلظت برر سی شده در این تحقیق بر باکتری ا شر شیاکلی این احتمال را به‌وجود می‌آورد که جزء موثر بر این باکتری در غلظت بسیار پایینی در زهر این گونه از مارها وجود دارد. نتایج مطالعات چلاپاندی (۲۰۰۸)، بوستیلو (۲۰۰۸)، استاکر و تریانور (۱۹۸۶) نیز احتمال مذکور را تایید می‌نماید [۲،۸،۱۷،۳۰].

سم مار عمدتاً از پروتئین و پپتیدهایی تشکیل شده که دارای از فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی هستند. برخی از این مولکول‌ها در آزمایش‌های بالینی دارای اثرات مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی بوده‌اند و ممکن است در آینده راه خود را به سمت توسعه داروهای ضد سرطان پیدا کنند [۳۱].

در این تحقیق اثرات سمیت سلولی سم خام غلظتی از سم که اثرات ضد باکتری معنا دارای را القا نموده با استفاده از روش‌های MTT assay، Neutral red uptake assay و Single cell gel electrophoresis (Comet assay) بر سلول سرطانی کبد (رده سلولی HepG2) در شرایط In-vitro مورد توجه قرار گرفت. گزارشات موجود مبنی بر وجود اثرات سایتوتوکسیک در سم افعی‌ها باعث گردید که در این تحقیق از سلول HepG2 استفاده شود [۱۳].

نتایج روش MTT assay و Uptak assay نشان داد که سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثرات سیتوتوکسوسیتی بوده و سبب مرگ سلول‌های سرطانی کبد می‌شود. این نتایج با یافته‌های بوسمانس و همکاران (۲۰۰۵)، یانگ و همکاران (۲۰۰۶)، دیپکا و همکاران (۲۰۱۲)، سانگ و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر القاء خواص سیتوتوکسیک توسط زهر اکثر افعی‌ها [۳۱-۳۵]. و هم‌چنین نتایج شبل و همکارانش مبنی بر القاء مرگ و میر در سلول با افزایش غلظت سم مار مطابقت می‌نماید [۲۸].

به منظور بررسی امکان القاء مرگ سلولی توسط سم خام از طریق آپوپتوز در سلول HepG2 در این مطالعه از روش Comet assay استفاده گردید که نتایج نشان داد سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با ایجاد آپوپتوز در سلول سرطانی کبد سبب مرگ آن می شود. همچنین مشخص شد که با افزایش غلظت از ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سم خام میزان آپوپتوز روند صعودی داشته است که این موضوع با گزارشات منتشر شده قبلی مطابقت می‌نماید [۲۳].

در یک جمع‌بندی نتایج این مطالعه نشان داد که زهر خام مار شاخدار ایرانی دارای مولکول‌هایی است که می‌توانند فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطان را القا نمایند. این نتایج، زهر این افعی را به‌عنوان کاندید مناسبی جهت جداسازی، تخلیص و معرفی مولکول‌های ارزشمند دارویی جهت مبارزه با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و همچنین مواد ضد سرطانی معرفی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه اعضای گروه مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (علیه‌السلام) که در انجام مراحل تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Moridikia A, Zargan J, Sobati H, Goodarzi HR, Hajinoormohamaadi A. Anticancer and antibacterial Effects of Iranian Viper (Vipera latifii) Venom; an in-vitro study. J Cell Physiol 2018; 233: 6790-6797.

[2] Chellapandi P, Jebakumar SR. Purification and antibacterial activity of Indian cobra and viper venoms. Electron J Biol 2008; 4.

[3] Sachidananda MK, murari SK, channe gowda D. Characterization of an antibacterial peptide from indian cobra (naja naja) venom. J Venom Anim Toxins Incl 2007; 1678-9199.

[4] Talan DA, Citron DM, Overturf GD, Singer B, Froman P, Goldstein EJ. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. J Infect Dis 1991; 164: 195-198.

[5] Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 2651-2668.

[6] Ferreira S. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of Bothrops jararaca. Br J Pharmacol 1965; 24: 163-169.

[7] Aloof-Hirsch S, de Vries A, Berger A. The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. Biochim Biophys Acta 1968; 22: 53-60.

[8] Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from Pseudechis australis (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon 1991; 29: 1129-1141.

[9] Lu QM, Wei Q, Jin Y, Wei JF, Wang WY, Xiong YL. L-Amino acid oxidase from Trimeresurus jerdonii snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. J Natural Toxins 2002; 11: 345-352.

[10] Xie JP, Yue J, Xiong YL, Wang WY, Yu SQ, Wang HH. In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drugresistant Mycobacterium tuberculosis. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 172-174.

[12] Vyas VK, Brahmbhatt K, Bhatt H, Parmar U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3: 156-162.

[13] Latifi M. Iranian Snakes. Environmental Protection Agency Publications 1379; 444-445. (Persian).

[14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

[15] Johrai B, Zargan J. Simultaneous targeted inhibition of Sox2-Oct4 transcription factors using decoy oligodeoxynucleotides to repress stemness properties in mouse embryonic stem cells. Cell Biol Int 2017; 41: 1335-1344.

[16] Husniye TY, Mehmet OO, Bayram G, Ayse N. Effect of ottoman viper (montivipera xanthine (Gray, 1849)) venom on various cancer cells and on microorganisms. Cytotechnology 2013.

[17] Hosseinpour M, Zargan J, Honari H, Haji Nour Mohammadi A, Ahmad Heidari, Zaman E. Introduction of dianthins: a new promising horizon toward continuous research on breast cancer bulldozing in Iran. Int J Med Toxicol Forensic Med 2019. (Persian).

[18] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45: 493-496.

[19] Torres AF, Dantas RT, Menezes RR, Toyama MH, Filho ED, Oliveira MF, et al. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops leucurus snake venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2010; 16: 614-622.

[20] Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Shakir A, Haider AK. Scorpion (Androctonus crassicauda) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. Exp Mol Pathol 2011; 91: 447-454.

[21] Abdul W, Yamin B, Sobia N, Fayyaz M, Sumaira S, Muhammad Zia. Inhibition of human breast and colorectal cancer cells by Viburnumfoetens L. extracts in vitro. Asian Pac J Trop Dis 2013; 3: 32-36.

[22] Mousavi M, Zargan J, Haji Noor Mohammadi A, Goudarzi HR, Dezianian S, Keshavarz Alikhani H, Johari B. Anticancer effects of the Latrodectus dahli crude venom on MCF-7 breast cancer cell line. Breast J 2019; 25: 781-782.

[23] Ferreira BL, Santos DO, Santos AL, Rodrigues CR, Freitas C, Cabral CL, Castro HC. Comparative analysis of viperidae venoms antibacterial profile: a short communication for proteomicsp. Evid Based Complement Altern Med 2011; 2008: 1-4.

[24] Jorge RJ, Martins AM, Morais IC, Ximenes RM, Rodrigues FA, Soares BM, et al. In vitro studies on Bothrops venoms cytotoxic effect on tumor cells. J Exp Ther Oncol 2011; 9: 249-253.

[25] Senthilraja P, Kathiresan K. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. J Appl Pharmace Sci 2015; 5 080-084. Available http://www.japsonline.com

[26] San TM, Vejayan J, Shanmugan K, Ibrahim H. Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in Malasia. J Appl Sci 2010; 10: 2328-2332.

[27] de Lima DC, Alvarez Abreu P, de Freitas CC, Santos DO, Borges RO, Dos Santos TC, et al. Snake venom: any clue for antibiotics and CAM. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2: 39-47.

[28] Stábeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom. Bioorg Med Chem 2004; 12: 2881-2886.

[29] Jami al ahmadi A, Fathi B, Jamshidi A, Zolfagharian H, Mirakabbadi AZ. Investigation of the antibacterial effect of venom of the Iranian snake echis carinatus. Iran J Veterin Sci Technol 2010; 2: 93-100.

[30] Bustillo S, Leiva CL, Merino L, Acosta O, Kier Joffé EB, Gorodner OJ. Antimicrobial activity of Bothrops alternatus venom from the northeast of argentine. Medigraphic 2008; 50: 79-82.

[31] Deepika J, Sudhir K. Snake Venom: a potent anticancer agent. Asian Pacific J Cancer Prev 2012; 13: 4855-4860.

[32] Bosmans F, Martin–Eauclaire MF, Tytgat J. The depressant scorpion neurotoxin LqqIT2 selectively modulates the insect voltage –gated sodium channel. Toxicon 2005; 45: 501-507.

[33] Cancer Control Office, Iranian Ministry of Health. Iranian annual cancer registration report. Ministry Health Public 2005. (Persian).

[34] Song JK, Jo MR, Park MH, Song HS, An BJ, Song MJ, et al. Cell growth inhibition and induction of apoptosis by snake venom toxin in ovarian cancer cell via inactivation of nuclear factor kappaB and signal transducer and activator of transcription 3. Arch Pharm Res 2012; 35: 867-876.

[35] Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lin YH, Hu XW, Lin SR. Up-regulation of Bax and endonuclease G, and down-modulation of Bcl-XL involved in cardiotoxin III-induced apoptosis in K562 cells. Exp Mol Med 2006; 38: 435-444.

Volume 22, Issue 3 (Summer 2020), 518 - 528

Anti-cancer and anti-bacterial effects of crude venom of Pseudocerastes persicus snake

Jamil Zargan (Ph.D)[*1], Majid Mirzaei nodushan (M.Sc)[1], Hossein Sobati (Ph.D)[2], Hamidreza Goodarzi (Ph.D)[3], Ashkan Haji Noor Mohammadi (M.Sc) [1], Firooz Ebrahimi (Ph.D) [1]

1 - Science Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran, Iran

2 - Health Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, IR Iran

3 – Dept. of Venomous Animals and anti Venom Production, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

* Corresponding author. +98 21 77104938 jazrgan@ihu.ac.ir Received: 9 Jul 2019; Accepted: 23 Oct 2019

Introduction*:* Antibiotic resistance has been reported as one of the world's most critical public health problems.

Recent investigations have demonstrated that venom of some species of snakes have antimicrobial and anticancer activities. In this study, we investigated the antibacterial and anticancer effects of Persian horned viper venom. Antibacterial activity was examined on Escherichia coli, Bacillus subtilis and *Staphylococcus aureus* bacteria and antitumor effect was analyzed on human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2).

Materials and Methods*:* Bactericidal-activity of crude venom in concentrations of 6.25-400 µg/ml was performed using MTT reduction, minimum inhibitory concentration (MIC), agar-well diffusion and disc diffusion methods. Tetracycline (50 µg/ml) was used as standard antibiotic. Cytotoxic effect in HepG2 cell were measured by MTT reduction assay and confirmed with neutral uptake assay following exposure of cells with different concentrations of venom (50-400 µg/ml). Apoptotic effect was investigated using comet assay.

Results: Our findings demonstrated that venom displays higher inhibitory effects against Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative. Furthermore, venom showed anticancer activity on HepG2 cell line through induction of apoptosis and necrosis.

Conclusion: This study showed that raw venom of Iranian horned viper has antibacterial and anti-cancer activity. These properties make venom of this viper a potential source for isolation of effective molecule(s) having antibacterial and antitumor activity.

Keywords*:* Snake Venom, Antineoplastic Agents, Anti-Bacterial Agents, Pseudocerastes Persicus.