

Research Paper

In-Vitro Evaluation of Anticancer and Antibacterial Properties of Pseudocerastes Persicus Snake Venom Fractions



*Jamil Zargan¹ , Majid Mirzaei Nodushan¹ , Hosein Sobati² , Hamidreza Goodarzi³ , Ashkan Haji Noormohammadi¹ , Firuz Ebrahimi¹

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hosein University, Tehran ,Iran.

2. Health and Nutrition Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.

3. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.



Citation Zargan J, Mirzaei Nodushan M, Sobati H, Goodarzi H, Haji Noormohammadi A, Ebrahimi F. [In-Vitro Evaluation of Anticancer and Antibacterial Properties of Pseudocerastes Persicus Snake Venom Fractions (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(1):122-137. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.1846>



<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.1846>



ABSTRACT

Background and Objectives In recent years the isolation of effective molecules from snake venom as drug to treatment of some incurable diseases is considered by many biological research centers. The aim of this investigation was to determine electrophoretic and chromatographic patterns of Pseudocerastes persicus venom and in-vitro study of bactericidal and anti-cancer properties of its fractions in human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2).

Subjects and Methods The fractions of venom were isolated and collected using preparative RP-HPLC. The Bactericidal activity of fractions in 20 μ g/ml of protein concentration was investigated toward Gram-negative and Gram-positive bacteria using MTT and MIC assays. Then, the cytotoxic effects of fractions with higher antibacterial properties were measured by MTT reduction, neutral uptake and comet assays following exposure of HepG2 cancer cells to 20 and 40 μ g/ml of protein concentration.

Results SDS-PAGE pattern of the crude venom revealed 10 major bands with molecular weight ranging from 13.2 to 99.25 kDa and the separation of fractions from the venom by HPLC resulted in collection of 11 different fractions. The results of this study showed that two fractions (4 & 8) have a significant antibacterial activity against Gram-positive as compared to Gram- negative bacteria. The study of the anti-cancer effect of these two fractions also showed that fraction 8 was more toxic in HepG2 cells.

Conclusion We for the first time reported bactericidal and anti cancer effects of isolated fractions of Persian horned viper venom. These properties make components of these fractions a favorable source for isolation of molecule (s) with antibacterial and anti tumor activities.

Keywords:

Snake venom, Pseudocerastes persicus, Anti-bacterial agent, Cytotoxicity, Cancer

*** Corresponding Author:**

Jamil Zargan, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hosein University, Tehran ,Iran.

Tel: +98 (21) 77104938

E-Mail: jzargan@ihu.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

One of the serious problems of the medical community in the treatment of infectious diseases caused by bacterial agents is the resistance of many bacteria to common antibiotics. These bacteria are becoming a serious clinical problem worldwide. This has caused pharmaceutical companies to try to discover new antibacterial drugs or optimize old antibiotics in order to produce new and effective drugs. Today, the venom of poisonous animals has attracted the attention of many researchers as one of the important natural resources for the isolation and identification of molecules with antimicrobial properties, and has received great success. Reports show that despite the contamination of the mouth and teeth of poisonous snakes with a wide range of pathogenic bacteria, a small prevalence of bacterial infection at the bite site is observed in snakebite victims. These observations have led the researchers to the fact that there are antibacterial compounds in snake venom. Studies have shown that the molecular compounds, especially the proteins, in the venom of snakes from Viperidae family have a great diversity. Serine protease, metalloproteinase, phospholipase A2 (PLA2), C-type lectin, acetylcholinesterase, L-amino acid oxidase, and detergents are among the important compounds in the venom of these vipers. Many of these compounds have antimicrobial properties. In this study, for the first time, the antibacterial effects of the protein fractions isolated from the crude venom of the Persian horned snake (*Pseudocerastes persicus*) and the anticancer effects of the fractions with antibacterial properties are investigated.

Methods

In order to prepare venom from the snake, following the safety precautions, the venom of the snake was injected through the poisonous tooth (fang) into the venom collection jar. Non-pathogenic gram-positive bacillus, gram-negative *Escherichia coli*, and pathogenic gram-positive *Staphylococcus aureus* were obtained from the Persian Type Culture Collection (PTCC) and liver cancer cells (HepG2, C158) were obtained from the cell bank of Pasteur Institute of Tehran.

The antibacterial effect of fractions was assessed using MTT assay. This test is a colorimetric method based on the reduction and breaking of yellow tetrazolium crystals by the enzyme succinate dehydrogenase in the cytoplasm and finally the formation of insoluble blue crystals. Based on this method, the survival rate of bacteria was calcu-

lated after contact with different concentrations of venom. The antibacterial effect of the fractions was assessed using the minimum inhibitory concentration (MIC) assay. Based on this method, the inhibition rate due to the effect of venom and standard antibiotics was calculated.

The cytotoxicity of the fractions was assessed using the MTT reduction assay described by Dezian et al and the neutral red uptake (NRU) assay. The MTT reduction test was repeated 3 times and 3 wells were considered for each concentration. The percentage of cell viability after contact with different concentrations of venom was calculated. The procedure of NRU assay was similar to that of MTT assay; however, after incubating the cells adjacent to toxic solution for 23 hours, instead of MTT solution, one microliter of neutral red solution (5 mg/ml) was added to each well. Then, the inhibition rate caused by different concentrations of venom on cell growth was calculated.

The apoptosis induction by fractions was assessed using alkaline comet assay. It is one of the best tests for assessing DNA fragmentation in cells. For each sample, the images of the DNA of at least 100 cells were taken and the results were statistically analyzed in GraphPad software.

Results

In examining the electrophoresis pattern and chromatography of crude venom, the molecular weight of the bands was determined using the standard protein diagram. The results of SDS-PAGE (15% gel) showed the presence of 10 protein bands. Results of MTT assay showed that fractions 3, 4, 7 and 9 had no inhibitory effect on *Escherichia coli* bacteria, while fractions 5, 6, 8 and 10 showed antibacterial effects.

The results of assessing the inhibitory effects (MIC assay) of the isolated fractions with a concentration of 20 µg/ml on the growth of bacteria showed that fractions 3 and 9 had no effect on *Escherichia coli* bacteria, while fractions 4, 5, 6, 7, 8 and 10 had an inhibitory effect.

Results of assessing the cytotoxicity effects (MTT reduction assay) of fractions 4 and 8 isolated from crude venom on the growth of liver cancer cells in two concentrations of 20 and 40 µg/ml showed that the cell viability under the influence of fraction 4 in the two mentioned concentrations was 51.55 and 50.62%, respectively compared to the control. The cell viability increased after contact with fraction 8 in the two concentrations and reached 82.29 and 74.81%, respectively.

The results of NRU assay for the fractions 4 and 8 showed that the cell death rate caused by fraction 4 in two concentrations was 35.19 and 50.93% respectively, while under the influence of fraction 8, it was 82.29 and 74.81%, respectively. They were significant compared to controls.

The results of alkaline comet assay showed that fraction 4 in two mentioned concentrations caused apoptosis in liver cancer cells by 39.31 and 38.97%, and fraction 8 in the two concentrations caused apoptosis by 24.73 and 25.34%, respectively. They were significant compared to controls.

Conclusion

The venom of poisonous snakes includes molecules with different biological activities, which can be of great interest in medical and biological research. Since the proteins and peptides in snake venom have different molecular sizes and biochemical properties, proteome analysis can be very important in identifying and isolating these compounds. The results of protein analysis showed that only 8 fractions out of 11 fractions had proteins. It was found that the crude poison of Persian horned snake had antibacterial properties. The cytotoxicity effects of selected fractions (with antibacterial properties) on liver cancer cells (HepG2) were also investigated. The results showed that fraction 8 induced the least toxicity in the cells. This introduces this fraction as a suitable candidate for isolating effective molecules with antibacterial properties that have the least side effects on human cells. Fraction No. 4 also induced the greatest effect on cancer cells; therefore, this fraction can be a suitable candidate for the discovery of anti-cancer drugs.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Considering that in this study, living beings such as animals, models, etc. were not used; Therefore, no action was taken to obtain the code of ethics.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful for the sincere cooperation of the members of the [Department of Biological Sciences of Imam Hossein University](#) (AS) who helped us in conducting our research.

مقاله پژوهشی

مطالعه اثرات خدسرطانی فراکشن‌های پروتئینی جداشده از سم مار شاخدار ایرانی و بررسی خواص ضدباکتریایی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی

*جميل زرگان^۱، مجید ميرزاي ندوشن^۱، حسين ثباتي^۲، حميدرضا گودرزى^۳، اشكان حاجى نورمحمدى^۱، فيروز ابراهيمى^۱

۱. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

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

۳. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.



Citation: Zargan J, Mirzaei Nodushan M, Sobati H, Goodarzi H, Haji Noormohammadi A, Ebrahimi F. [In-Vitro Evaluation of Anticancer and Antibacterial Properties of Pseudocerastes Persicus Snake Venom Fractions (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(1):122-137. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.1846>



doi: <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.1846>

چکیده

زمینه و هدف در سال‌های اخیر، بسیاری از محققین به استفاده از سم مار جهت درمان برخی از بیماری‌ها توجه کردند. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی پروتئینی و کروماتوگرافی سم خام مار شاخدار ایرانی و بررسی اثرات ضدباکتریایی و سمیت سلولی فراکشن‌های جداشده از آن در شرایط برون‌تنی است.

روش پژوهشی فراکشن‌های سم خام با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس جداسازی و جمع‌آوری شدند. اثرات ضدباکتریایی فراکشن‌ها در غلظت‌های ۲۰ میکروگرم بر میلی‌گرم با استفاده از روش‌های کاهش سمیت مواد موردنظر و تست حداقل غلظت مهاری مطالعه شد. همچنین اثرات سمیت سلولی فراکشن‌هادر غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌گرم با استفاده از روش‌های MTT Assay، رنگ سنجی قرمز خنثی و کامات قلایابی روی سلول سلطانی کبد در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

یافته‌ها الگوی SDS-PAGE نشان‌دهنده وجود ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۹۹/۲۵ تا ۱۳/۲ کیلو دالتون است. در مطالعات کروماتوگرافی، ۱۱ پیک اصلی جداسازی و جمع‌آوری شد. نتایج این تحقیق نشان داد دو فراکشن از فراکشن‌های جداسازی شده بر باکتری‌های آزمایش شده اثر مهاری معنادار دارد و این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری گرم منفی بیشتر است. همچنین نتایج تست‌های سمیت سلولی نشان داد یکی از این فراکشن‌ها قادر اثرات سمیت سلولی است.

نتیجه‌گیری نتایج این بررسی برای اولین بار نشان داد برخی از فراکشن‌های مار شاخدار ایرانی خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی دارد و می‌توان به آن به عنوان منبعی از مولکول/مولکول‌های دارای اثرات ضدباکتری و ضدتوموری توجه کرد.

تاریخ دریافت: ۶ مهر ۱۳۸۹

تاریخ پذیرش: ۵ آذر ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱ فروردین ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

سم مار، مار شاخدار، ایرانی، عوامل ضد باکتری، سمیت سلولی، سرطان

* نویسنده مسئول:

دکتر جمیل زرگان

نشانی: تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی.

تلفن: +۹۸ (۰۲۱) ۷۷۱۰۴۹۳۸

رایانامه: jzargan@ihu.ac.ir

با فشاری مختصر به غده سمی، سم به داخل شیشه تزریق شد. محلول سمی پس از لیوپلیز شدن تا زمان استفاده در آزمایش‌ها در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میکروارگانیسم‌ها و رده سلولی مورد استفاده

باکتری غیربیماری‌زای گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس^۱، باکتری گرم منفی اشرشیاکلی^۲ و سوش گرم مثبت بیماری‌زا استافیلکوکوس اورئوس^۳ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران^۴ و سلول‌های سرطان کبد^۵ از بانک سلولی انتستیتو پاستور تهران تهیه شد.

مطالعه الگوی الکتروفورزیس زهر خام با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید^۶

برای مطالعه الگوی الکتروفورزیس زهر خام افعی شاخدار ایرانی از ژل ۱۵-۱۲ درصد استفاده شد [۱]. به هر چاهک ۱۰-۵ میکرولیتر محلول سمی (دارای ۱۵ تا ۲۰ میکروگرم پروتئین) دناتوره شده با حجم مناسب از بافر نمونه^۷ تزریق شد. جهت تخمین وزن مولکولی باندهای پروتئینی از پروتئین استاندار استفاده شد.

الکتروفورز در ابتدا با ولتاژ ۵۰ ولت شروع شد و پس از عبور رنگ ریدابی^۸ از ژل متراکم کننده، الکتروفورزیس با ولتاژ ۱۵۰ ولت و تا رسیدن رنگ ریدابی به حدود ۱ سانتی‌متری از انتهای کاست ژل ادامه یافت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی بلو و حذف رنگ اضافی از سطح ژل به وسیله محلول رنگ بر وزن مولکولی تخمینی باندهای پروتئینی سم خام تعیین شد.

جدازایی فرآکشن‌های سم خام با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس^۹

فرآکشن‌های زهر خام مار شاخدار ایرانی با استفاده از R- HPLC تهیه و با آشکارساز UV (جذب ۲۲۰ نانومتر)، ستون C18 [۲۵۰ mm × 21, ۲ mm, ۱۲ μm] SUPERCOSIC-۱۸ (۵۹۱۸۵) [۱۰] و برنامه خطی گرادیان [بافر A (استونیتریل ۲۰ درصد حاوی ۱/۰ درصد تری فلورو استیک اسید)^{۱۱}, بافر B (استونیتریل ۸۰ درصد حاوی ۱/۰ درصد تری فلورو استیک اسید)^{۱۰}] و زمان ۷۰ دقیقه‌ای جدازایی شد. در روش فاز معکوس، از یک فاز متحرک

2. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ATCC 6633

3. ATCC 25922 *Escherichia coli*

4. *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923

5. Persian Type Culture Collection (PTCC)

6. HepG2, C158

7. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE)

8. Sample Buffer

9. Tracking Dye

10. High Performance Liquid Chromatography-Reverse Phase (RP-HPLC)

11. Trifluoroacetic acid (TFA)

مقدمه

یکی از مشکلات جدی جامعه پژوهشی در درمان بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی، مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج است. این باکتری‌ها در حال تبدیل شدن به یک مشکل بالینی جدی در سراسر جهان هستند [۱].

این امر سبب تلاش مؤسسات داروسازی جهت کشف داروهای ضدباکتری جدید یا بهینه‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های قدیمی جهت دست‌یابی به تولید داروهای جدید و مؤثر شده است. امروزه زهر جانوران سمی به عنوان یکی از منابع طبیعی مهم جهت جداسازی و شناسایی مولکول‌های با خواص ضدمیکروبی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته و از اقبال زیادی برخوردار شده است.

گزارش‌ها نشان می‌دهد با وجود آلودگی‌های دهان و دندان نیش مارهای سمی به طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زا، شیوع کمی از عفونت باکتریایی در محل گزیدگی در مصدومین ناشی از مارگزیدگی مشاهده می‌شود [۲]. این مشاهدات، محققین را به این موضوع رهنمون کرد که در سم مار ترکیبات ضدباکتری وجود دارد [۳].

اولین گزارش در مورد فعالیت‌های ضدباکتری در سم مارهای خانواده الپیده و ویریده به ترتیب در سال‌های ۱۹۴۸ و ۱۹۶۸ منتشر شد [۴]. اسکارنز نیز در سال ۱۹۷۰ برای نخستین بار فعالیت ضدمیکروبی برخی از آنزیم‌های موجود در سم مار را گزارش کرد [۵]. مطالعات زی و همکاران در سال ۲۰۰۰ به جداسازی پیتیدهایی از سم *Naja Atra* منجر شد که در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری‌های مقاوم مایکو-باکتریوم توپر کلوزیس جلوگیری کردند و فعالیت مهاری از خود نشان دادند [۶]. بررسی‌ها نشان می‌دهد ترکیبات مولکولی بهویژه پروتئین‌های موجود در سم افعی‌های خانواده ویریده از تنوع زیادی برخوردار است. از ترکیبات مهم سوم این افعی‌ها می‌توان پروتئاز سرین، متالوپروتئیناز، فسفولیپاز PLA2_{A₂}، لکتین نوع C-استیل کولینستراز، ال-آمینوکسیداز و دترجنت‌ها را نام برد [۷]. تحقیقات اخیر نشان داد بسیاری از این ترکیبات خواص ضدمیکروبی دارند [۸,۹,۱۰].

در این تحقیق، برای اولین بار اثرات ضدباکتریایی فرآکشن‌های پروتئینی جداده شده از سم خام مار شاخدار ایرانی^۱ و اثرات ضدسرطانی فرآکشن‌های دارای خواص آنتی‌باکتریال مطالعه شد.

روش بررسی

تهیه سم

جهت تهیه سم مار، با رعایت نکات ایمنی دندان سمی یا فنگ مار مستقیماً داخل شیشه جمع‌آوری سم قرار داده شد و

1. *Pseudocerastes Persicus*

۶۰۰ نانومتر دارای جذبی معادل ۰/۰۸ تا ۱/۰ است) رسید [۱۲]، میزان ۵ میکرولیتر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه استریل کشت شد. فراشن‌ها با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از محیط کشت مایع (مولار هینتون براث) به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

در این آزمایش از تراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت، سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان بلانک استفاده شد. پلیت به مدت ۲۳ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به تمام چاهک‌ها ۵ میکرولیتر MTT (غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد. پلیت به مدت ۱ ساعت در شرایط تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به هر چاهک اضافه شد. 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 (۳ بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده مادرن باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۱۳].

$$1. \text{ درصد حیاتی باکتری} = \frac{1}{(a/b)} \times 100$$

جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک = a

جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک = b

بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فراشن‌ها با استفاده از روش حداقل غلظت مهاری [۱۴]

در این تحقیق از روش حداقل غلظت مهاری به منظور تعیین اثرات مهاری سم خام بر باکتری‌ها استفاده شد. مراحل انجام تست حداقل غلظت مهاری [۱۴] مشابه تست MTT Assay بوده، اما پس از انکوبه کردن باکتری با غلظت‌های مختلف سم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و بدون اضافه کردن هیچ‌گونه ماده نشانگر، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش پلیت (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز ۳ بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ بار تکرار) در نظر گرفته شد. درصد مهاری ناشی از تأثیر سم و آنتی‌بیوتیک استاندارد با استفاده از فرمول شماره ۲ محاسبه شد [۱۴].

$$2. \text{ درصد مهاری باکتری} = \frac{1}{(a/b)} \times 100$$

۲. جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک = a

جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک = b

بررسی

17. MIC Assay

قطبی و فاز ساکن غیرقطبی استفاده می‌شود و جداسازی مواد با استفاده از ویژگی هیدروفوبیسیتی انجام می‌شود [۱۱].

برای جداسازی فراشن‌های زهر خام، ۴۰ میلی‌گرم پودر خشک شده آن در ۲۰ میلی‌لیتر از بافر (آب حاوی ۰/۰۱ درصد تری فلورو استیک اسید دارای ۵ درصد استونیتریل) حل و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مواد نامحلول پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ هزار دور در دقیقه [۱۵] و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از سوسپانسیون جدا شد. محلول رویی جهت تهیه الگوی کروماتوگرافی و جداسازی فراشن‌ها توسط روماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۱۶] استفاده شد.

فراشن‌های متناظر با هر پیک در شیشه‌های کاملاً تمیز و عاری از هرگونه آلودگی به پروتئین به صورت دستی جمع آوری و پس از لیوفلیز کردن، در دمای -۸۰- نگهداری شد. زمان خروج هر پیک [۱۷] برای هر کدام از پیک‌ها ثبت شد.

پروتئین سنجی

جهت انجام تست‌های ضدباکتریایی و تست‌های سمیت سلوی مقداری از سم لیوفلیز شده در آب دو بار تقطیر استریل حل شد. میزان پروتئین موجود در محلول سمی با روش برادفورد در سال ۱۹۷۶ تعیین و فراشن‌های فاقد پروتئین از بررسی‌های بعدی حذف شدند.

بررسی خواص ضدباکتریایی

محیط کشت و آنتی‌بیوتیک: جهت کشت باکتری از محیط کشت مایع و جامد مولار هینتون [۱۸] شرکت کیلوب [۱۹] کانادا استفاده شد. جهت مقایسه اثر سم با آنتی‌بیوتیک استاندارد از تراسایکلین (Sigma, USA) با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم استفاده شد.

بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فراشن‌ها با استفاده از MTT Assay

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که براساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژن موجود در سیتوپلاسم و درنهایت، تشکیل کریستال‌های آبی‌رنگ نامحلول انجام می‌شود. این کریستال‌ها با اضافه کردن DMSO به شکل محلول در می‌آیند [۱۲]. باکتری موردنظر در محیط مولار هینتون براث کشت داده شد و پس از ۵ ساعت، هنگامی که به جذبی معادل نیم مکفارلند (در طول موج

12. Revolutions Per Minute (rpm)

13. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

14. Retention Time

15. Mueller hinton

16. Quelab

خواص ضدسرطانی فراکشن‌ها

کشت سلول

جهت از بین بردن آلدگی‌های احتمالی در محلول سمی مورد نیاز تست‌های سلولی، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌آناتی‌مايكوتیک (-In USA) اضافه و پس از یک شب نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آزمایش‌ها استفاده شد. برای کشت سلول HepG2 از محیط کشت (Gibco, USA) ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۸} تهیه شده از شرکت (Gibco, USA) استفاده شد. این سلول‌ها در فلاسک‌هایی با حجم ۵۰-۲۵ میلی‌لیتر مکعب کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. هر ۳-۲ روز یکبار محیط کشت قدیمی 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 لام‌نفویار به کار گرفته شدند.

بررسی میزان سمیت سلولی فراکشن‌ها با روش MTT Redaction

این روش، مطابق روش انجام شده توسط دزیانیان و همکاران انجام شد [۱۹]. به منظور انجام این تست تعداد 2×10^4 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر کشت فاقد سرم کشت داده شد. پس از یک شب^{۱۹} انکوبه کردن در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، رطوبت حدود ۸۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محیط کشت قدیمی تخلیه و محیط کشت جدید فاقد سرم حاوی غلظت‌های مختلف ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فراکشن‌های (دارای خواص ضدباکتریایی) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت حاوی پس از مجاورت دادن با سلول سم، به مدت ۲۳ ساعت در شرایط فوق الذکر انکوبه شد. پس از آن به هر چاهک ۵ میکرولیتر محلول MTT (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد.

پس از تشکیل کریستال آبی تیره (فورمازون) محتویات هر چاهک خارج شد و پس از شستشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه شد. در این تست از محیط کشت به عنوان آزمایش و از محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده شد. چسب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Bioteck, 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 مهاری ناشی از غلظت‌های مختلف سم بر رشد سلول با استفاده از فرمول شماره ^{۲۰} محاسبه شد.

$$\text{درصد حیاتی سلول} = \frac{(a/b)}{a} \times 100$$

۳. چسب نوری نمونه منهای چسب نوری بلانک = a
چسب نوری کنترل منهای چسب نوری بلانک = b

بررسی سمیت سلولی فراکشن‌ها با روش رنگ‌سنگی قرمز خنثی^{۲۱}

مراحل انجام تست رنگ‌سنگی قرمز خنثی [۲۱] مشابه تست MTT Assay بود، اما پس از انکوبه کردن سلول مجاورت داده شده با محلول سمی به مدت ۲۳ ساعت، به جای محلول MTT، یک میکرولیتر از محلول قرمز خنثی (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت تا هنگام تشکیل کریستال قرمز (اتصال قرمز خنثی با سطح لیزوژوم سلول) تحت شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت حدود ۸۰ درصد انکوبه شد.

پس از آن محلول موجود در هر چاهک تخلیه و پس از ۲ بار شستشوی هر چاهک با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر بافر فیکس کننده (فرمالدهید ۳۷ درصد، کلرید کلسیم ۱۰ درصد) به آن اضافه شد. پس از ۱ دقیقه، این بافر تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حل کننده (اسید استیک ۰/۵ درصد) به آن اضافه شد. در ادامه، پلیت به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر، در شرایط تاریکی و در دمای آزمایشگاه انکوبه و چسب 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 مهاری ناشی از غلظت‌های مختلف سم بر رشد سلول با استفاده از فرمول شماره ^{۲۱} محاسبه شد.

$$\text{درصد مرگ‌ومیر سلول} = \frac{(a/b)}{a} \times 100$$

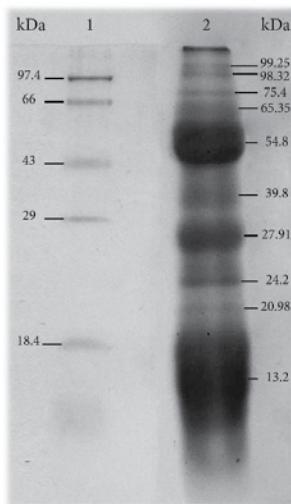
۴. چسب نوری نمونه منهای چسب نوری بلانک = a
چسب نوری کنترل منهای چسب نوری بلانک = b

بررسی القای آپوپتوزیس توسط فراکشن‌ها با استفاده از تست کامت قلیابی^{۲۲}

کامت قلیابی یکی از بهترین تست‌های بررسی DNA fragmentation در سلول است [۲۲]. برای انجام این آزمایش، ابتدا در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای استریل حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم تعداد 12×10^4 سلول کشت داده شد. پلیت به مدت یک شب تحت شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن^{۲۳}، رطوبت ۸۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

20. Neutral Red Uptake Assay
21. Comet Assay (Single-cell Gel ElectroPhoresis)
22. Carbon dioxide (CO_2)

18. Fetal Bovine Serum (FBS)
19. Overnight

محله علمی پژوهشی
جندي شاپور

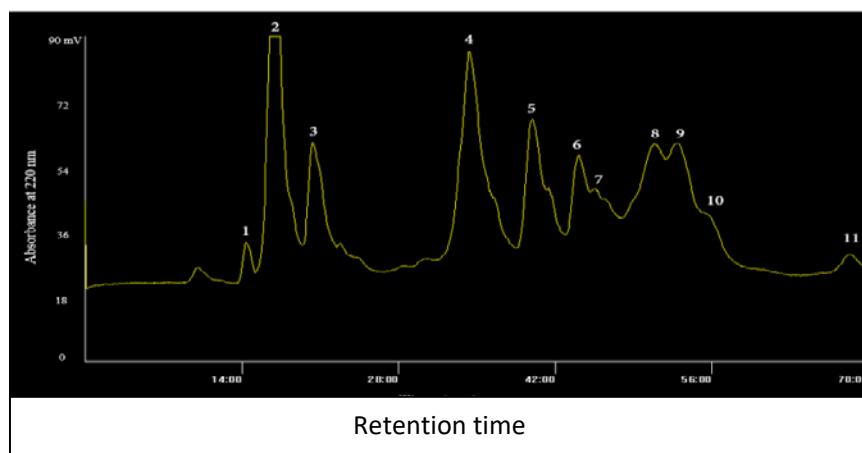
تصویر ۱. الگوی SDS-PAGE (۱۵ درصد) زهر مار شاخ دار ایرانی، ستون ۱. پروتئین استاندارد، ستون ۲. زهر مار شاخ دار ایرانی

سانتی گراد با دور ۱۵۰۰ RPM سانتریفیوز شدند و محلول رویی تخلیه شد. جهت شستشوی سلول‌ها به هریک از لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر PBS (pH=۷/۴) اضافه و پس از سانتریفیوز با شرایط ذکر شده مایع رویی تخلیه شد.

سپس به لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد و با کمک سمپلر و سرنگ انسولین، سلول‌ها از یکدیگر جدا شدند و به صورت منفرد در آمدند. اسلامیدهای مورد نیاز برای تست با آگاروز با نقطه ذوب نرمال (NMA ۱ درصد) پوشش داده شد. سوسپانسیون سلولی با آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMA ۱ درصد) به نسبت ۱ به ۲ مخلوط و روی اسلامیدهای ریخته شد. جهت ایجاد یک لایه سلول روی هر اسلامید، یک لامل روی اسلامید قرار داده شد.

در این تست از محیط کشت به عنوان بلاک و از محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده شد. پس از آن محیط کشت اولیه هر چاهک تست، تخلیه و ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید (افقد سرم) و حاوی غلظت‌های مختلف ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکشن‌های (دارای خواص ضدبacterیایی) به آن اضافه شد. پلیت حاوی سلول به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۸۰ درصد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد.

پس از پایان زمان ذکر شده، سلول‌های هر چاهک با استفاده از تریپسین جدا و در تیوپ ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شدند. میکروتیوپ‌های حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه

محله علمی پژوهشی
جندي شاپور

تصویر ۲. کروماتوگرام زهر خام مار شاخ دار ایرانی بر اساس نتایج حاصل از R-HPLC، فراکشن‌های زهر خام مار شاخ دار ایرانی با استفاده از R-HPLC تهیه با آشکارساز UV (جدب ۲۲۰ نانومتر)، ستون C18 و برنامه خطی گرادیان (افر A: استونیتریل ۰/۱ درصد حاوی ۰/۱ TFA و بافر B: استونیتریل ۸۰ درصد حاوی ۰/۱ TFA) جداسازی شد. فراکشن‌های متناظر با هر پیک به صورت دستی در شبشهای عاری از آلودگی جمع آوری و Retention Time هریک از پیک‌ها ثبت شد. فراکشن‌های جمع آوری شده به ترتیب زمان خروج از ستون به نام‌های F1 تا F11 نام‌گذاری شدند.

جدول ۱. زمان خروج هر یک از اجزاء از ستون

F11	F10	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	زمان شروع و خانمه پیک (دقیقه)
۶۷:۰۶	۵۴:۵۶	۵۱:۵۹	۴۷:۵۰	۴۵:۰۱	۵۲:۵۱	۳۸:۳۷	۳۱:۱۴	۱۹:۲۲	۱۵:۳۶	۱۳:۵۰	شروع
۶۹:۷۸	۵۹:۱۸	۵۴:۵۶	۵۱:۵۹	۴۷:۵۰	۴۵:۰۱	۴۲:۵۱	۳۸:۳۷	۲۲:۳۵	۱۹:۲۲	۱۵:۰۱	پایان

مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

جدول ۲. میزان پروتئین فراکشن‌های جدا شده از زهر مار شاخدار ایرانی

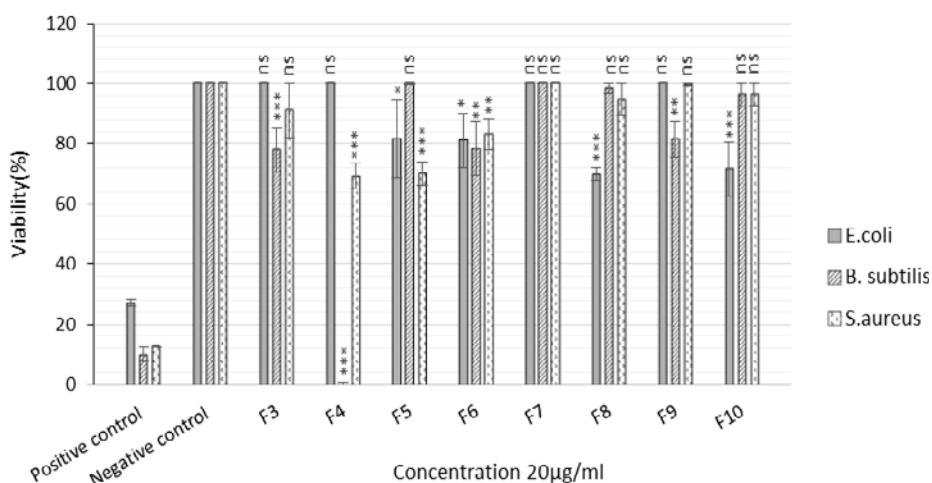
غلاظت پروتئین (میلیگرم در میلیلیتر)											
F11	F10	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	
+	۴/۵	۱۱/۳۵	۱۲/۸۵	۱/۹۳	۶/۲۹	۱۰/۷۷	۱۱/۷۷	۱/۵۵	۰/۰۰۷۵	+	

مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۲۵ و جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام شد. برای خنثی‌سازی محیط بازی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر خنثی‌کننده (Tris 400mM، pH=۷/۵) قرار داده شدند. جهت رنگ آمیزی سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰ میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه و به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از آن اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه با آب ۲ بار تقطیر شسته و توسط میکروسکوپ فلورسنت مطالعه شدند. برای هر نمونه حداقل از ۱۰۰ سلول تصویر، تهیه و نتایج تجزیه و تحلیل آماری شد.

جهت لیز شدن غشاهای سلول و هسته، تمام اسلایدها در بافر لیزکننده (NaCl 2.5M، EDTA 10mM، Tris 10mM، NaOH 0.2M، Triton X-100 pH=۱۰) سرد و تازه به مدت ۱۶-۱۸ ساعت، درون یخچال قرار داده شدند. پس از خارج کردن بافر لیزکننده، اسلایدها ۲۰ دقیقه و در ۲ نوبت با بافر الکتروفورز (EDTA 1mM، NaOH 300mM و pH>13) شسته شو و پس از آن به منظور باز شدن DNA به مدت ۴۰ دقیقه درون بافر الکتروفورز سرد و در یخچال انکوبه شدند.

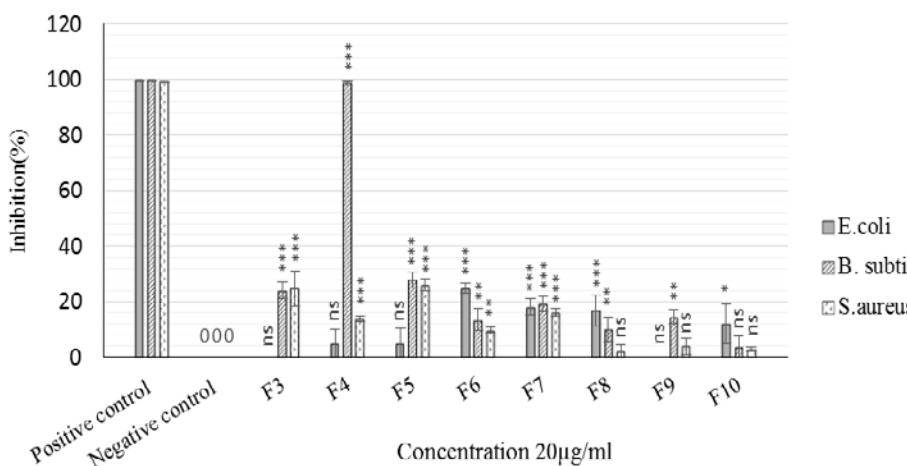
اسلایدها از محلول خارج و درون تانک الکتروفورز حاوی بافر قرار داده شد و الکتروفورز در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی گراد



مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

تصویر ۳. درصد حیاتی باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورنوس پس از تماس با غلظت پروتئینی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فراکشن‌های مختلف زهر خام مار شاخدار ایرانی بر اساس تست MTT، اثر فراکشن‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شده است.
(ns: non-significant), ($P<0.05$), ($P<0.01$), ($P<0.001$), ($P<0.0001$)

MIC assay

مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

تصویر ۴. درصد اثر مهاری فرآکشن‌های پروتئینی (غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی روی باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوكوکوس اورئوس با تست حداقل غلظت مهاری، اثر فرآکشن‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شده است.
(ns: non-significant) ($P < 0.05$), ($P < 0.01$), ($P < 0.001$), ($P < 0.0001$)

دماه ۸۰-نگهداری شد. زمان خروج^۵ محصول متناظر با هر پیک در جدول شماره ۱ ارائه شده است. پروتئین‌سنجد نتایج نشان داد فرآکشن‌های ۱، ۲، ۱۱ و ۱۲ فاقد پروتئین هستند که از بررسی‌های بعدی حذف شدند (جدول شماره ۲).

نتایج بررسی‌های ضدباکتریایی

نتایج بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فرآکشن‌ها با استفاده از MTT Assay

نتایج نشان داد فرآکشن‌های ۳، ۴، ۷ و ۹ بر باکتری اشرشیاکلی اثر مهاری نداشتند، اما فرآکشن‌های ۵، ۶، ۸ و ۱۰ اثرات ضدباکتری از خود نشان دادند، به ترتیبی که درصد حیاتی باکتری با این ترتیب ۱۱/۵۵، ۸۱/۲، ۸۱/۱۵۵ و ۶۹/۸۷ و ۷۱/۴۵ درصد بوده است. با تحلیل آماری انجام شده مشخص شد فرآکشن‌های اخیر بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی (محیط کشت نرمال واجد باکتری) اثر مهاری معنادار ایجاد کردند، اما میزان مرگ و میر ناشی از آن‌ها در مقایسه با تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت معنادار نبود (تصویر شماره ۳).

همچنین نتایج تست در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نشان داد درصد حیاتی آن در محیط کشت حاوی فرآکشن‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به ترتیب ۷۸/۴۱، ۰/۳۵، ۹۹/۹۱، ۰/۲۷، ۹۷/۴۹ و ۸۱/۱۵، ۹۸/۹۴، ۱۰۰ و ۹/۲۵ کیلودالتون را نشان داد (تصویر شماره ۱).

تحلیل آماری

نتایج هر تست به صورت میانگین و انحراف معيار گزارش و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad InStat) تجزیه و تحلیل آماری شد. غلظت‌های مختلف سه نسبت به گروه کنترل و نیز نسبت به یکدیگر با آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه^۳ و آزمون توکی^۴ بررسی شد. $P < 0.05$ به عنوان معنادار بودن نتایج در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار مایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۱۳ انجام گرفت.

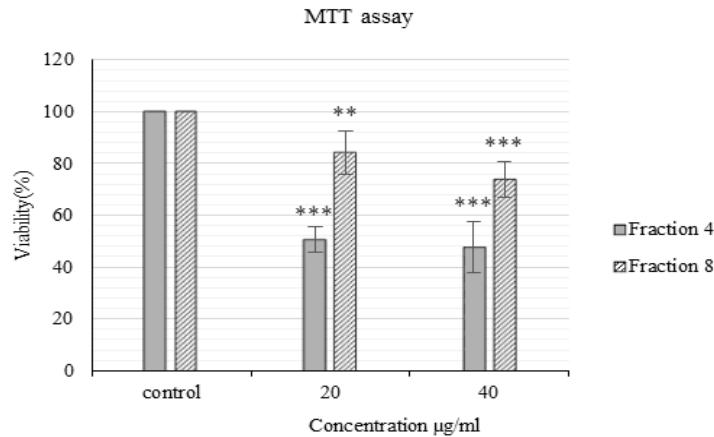
یافته‌ها

نتایج بررسی الگوی الکتروفوروزی و کروماتوگرافی زهر خام وزن مولکولی باندها با استفاده از نمودار پروتئین استاندارد تعیین شد. نتایج SDS-PAGE (زل ۱۵ درصد) وجود ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۳/۲، ۱۹/۶، ۲۴/۲، ۲۷/۹۱، ۳۹/۸، ۵۴/۸ کیلودالتون را نشان داد (تصویر شماره ۱).

نتایج حاصل از جداسازی فرآکشن‌های زهر خام توسط HPLC، وجود ۱۱ پیک مجزا و عده را نشان داد (تصویر شماره ۲). فرآکشن‌های جمع‌آوری شده، به ترتیب زمان خروج از ستون به نام‌های F11 تا F1 تا F11 نام‌گذاری شدند. فرآکشن‌ها متناظر با هر پیک در شیشه‌های تمیز و عاری از هرگونه آلودگی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیز کردن در

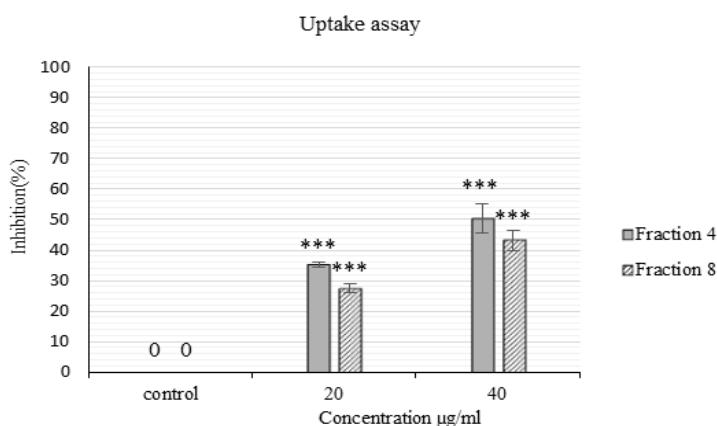
23. One-way Anova

24. Tukey's Method



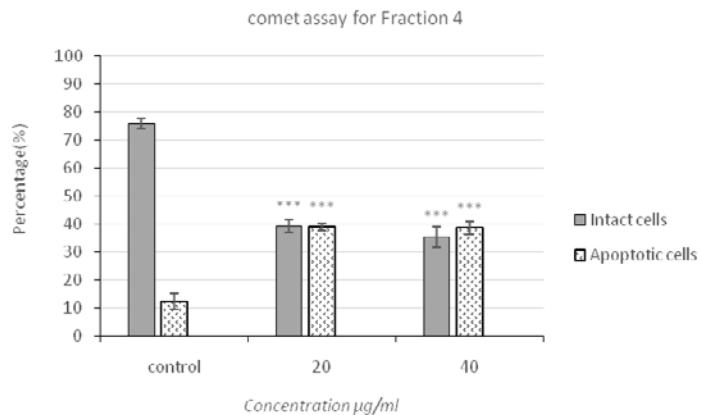
مجله علمی پزشکی
جندي شاپور

تصویر ۵. درصد حیاتی سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس ۲۴ ساعت با غلظت پروتئینی ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر از فراکشن‌های زهر خام مار شاخ دار ایرانی بر اساس تست MTT، اثر ناشی از فراکشن‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شده است. $P<0.01$ ، $P<0.001$ ، $P<0.0001$ ، [Error bar] بیانگر میانگین انحراف معیاراً



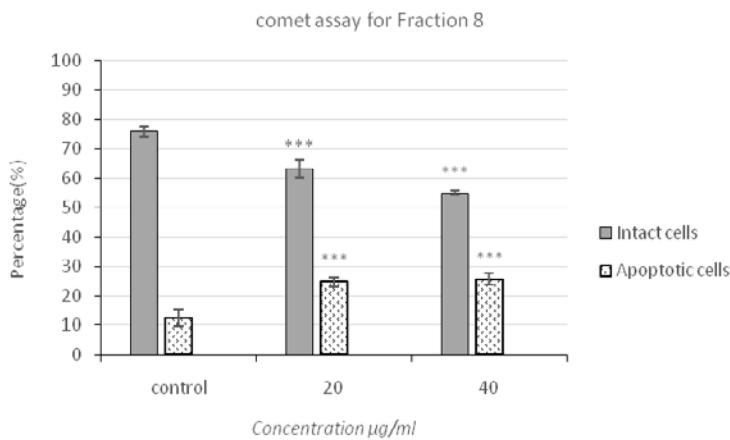
مجله علمی پزشکی
جندي شاپور

تصویر ۶. درصد مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف زهر خام مار شاخ دار ایرانی بر اساس روش رنگ قرمز خنثی مرگ‌ومیر ناشی از تأثیر هریک از غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل مقایسه شده است. $P<0.001$ ، $P<0.0001$ ، [Error bar] بیانگر میانگین انحراف معیاراً



مجله علمی پزشکی
جندي شاپور

تصویر ۷. میزان آپوپتوز ایجادشده توسط فراکشن شماره ۴ مار شاخ دار ایرانی در سلول‌های سرطانی کبد بر اساس نتایج آزمایش کامت قلیایی، اثر هریک از غلظت‌ها نسبت به کنترل ارزیابی شده است. $P<0.001$ ، $P<0.0001$



مجله علمی پژوهشی جندي شاپور

تصویر ۸. میزان آپوپتوز ایجادشده توسط فراکشن شماره ۸ مار شاخ دار ایرانی در سلول های سرطانی کبد بر اساس نتایج آزمایش کامت قلیایی، اثر هریک از غلظتها نسبت به کنترل ارزیابی شده است. (***) ($P < 0.001$)

بازدارندگی معنادار ایجاد کرده که از میان آن ها فراکشن شماره ۴ اثر مهاری بیشتری از آنتی بیوتیک استاندارد (تراسایکلین) داشته است (تصویر شماره ۳).

همچنین با بررسی انجام شده مشخص شد فراکشن های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ بر باکتری در مقایسه با کنترل منفی معنادار بود. در مقایسه با سایر فراکشن ها، اثر مهاری فراکشن ۴ بر رشد این باکتری در مقایسه با کنترل مثبت (تراسایکلین) بسیار بیشتر، اما این اثر معنادار نبود (تصویر شماره ۴).

نتایج بررسی خواص ضدسرطانی فراکشن ها

جمع بندی نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتریایی فراکشن های جدادشده از زهر خام مار شاخ دار ایرانی و تحلیل آماری داده ها نشان دادن فراکشن های ۴ و ۸ در مقایسه با سایر فراکشن ها اثرات مهاری بیشتری بر باکتری های مورد تست القا کردند؛ بنابراین در این مطالعه به اثر ضدسرطانی و میزان سمیت سلولی آن ها توجه شد.

نتایج تست بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT Assay

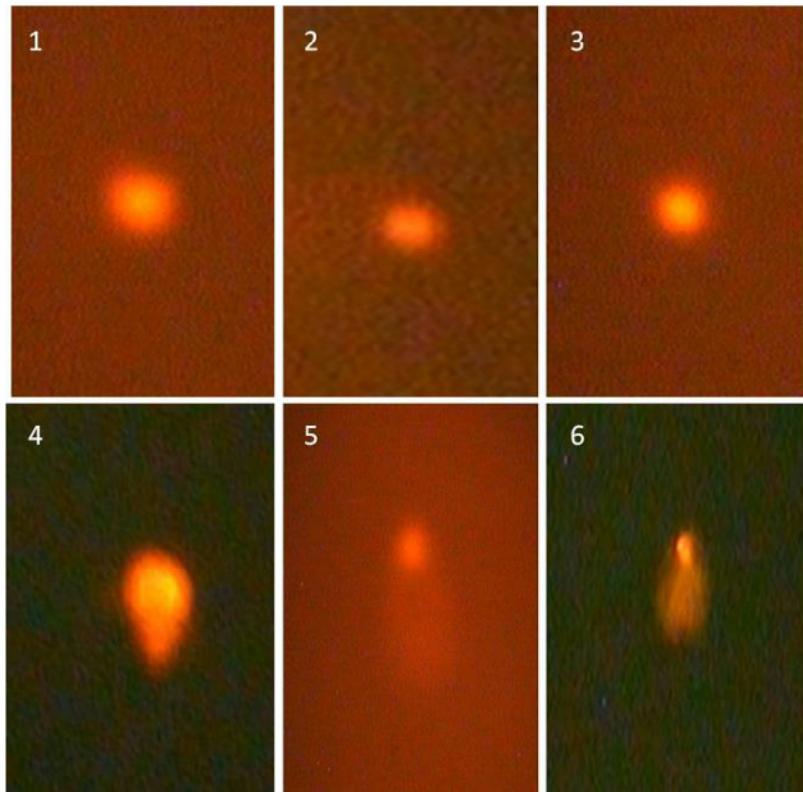
بررسی اثرات سمیت سلولی فراکشن های ۴ و ۸ جدادشده از زهر خام بر رشد سلول های سرطانی کبد در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر بر رشد باکتری ها نشان داد فراکشن های تحت تأثیر فراکشن ۴ در ۲ غلظت ذکر شده در مقایسه با کنترل به ترتیب ۵۱/۵۵ و ۵۰/۶۲ درصد بوده است. این در حالی است که درصد حیاتی سلول پس از تماس با فراکشن ۸ در غلظت های

درصد حیاتی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت حاوی فراکشن های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰، به ترتیب ۹۱/۵۸، ۹۱/۲۳، ۸۱/۴۷، ۷۰/۴۷، ۶۹/۲۳، ۱۰۰، ۲۵/۸۸، ۲۵/۸۵، ۹/۸۵، ۱۵/۸۸ مؤثر بود و به ترتیب ۳۰/۳، ۴/۷۴، ۲/۲۸ درصد اثر مهاری بر آن القا کردند. اثر مهاری فراکشن های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ بر این باکتری در مقایسه با کنترل منفی رشد مهاری معنادار ایجاد کردند. بیشترین اثر مهاری فراکشن های جدادشده از زهر خام به فراکشن شماره ۴ با اثر مهاری حدود ۳۰/۷۷ درصد تعلق داشته که از اثر مهاری تراسایکلین به صورت معناداری کمتر بوده است (تصویر شماره ۳).

نتایج بررسی میزان اثر ضدباکتری فراکشن ها با استفاده از روش حداقل غلظت مهاری

نتایج اثرات مهاری فراکشن های جدادشده با غلظت ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر بر رشد باکتری ها نشان داد فراکشن های ۳ و ۹ بر باکتری اشرشیاکلی بی تأثیر بودند، اما فراکشن های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۱۰ به ترتیب ۵/۲۱، ۲/۴۸، ۲/۲۵، ۱۷/۲۱، ۱۷/۲۱، ۱۷/۲۱ و ۱۳/۰۶ درصد بر رشد باکتری اثر مهاری داشتند. با بررسی آماری انجام شده مشخص شد فراکشن شماره ۶ نسبت به سایر فراکشن ها اثر مهاری بیشتری داشت، اما این اثر در مقایسه با آنتی بیوتیک استاندارد معنادار نبود (تصویر شماره ۴).

یافته ها نشان داد فراکشن های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ در باکتری بسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۲۴/۰۶، ۹۸/۴۶، ۱۲/۳۰، ۱۳/۱۴، ۲۸/۷۷، ۱۷/۸۸، ۱۳/۷۶، ۱۲/۳۰ و ۲/۶۱ اثر مهاری ایجاد کردند. بررسی آماری نشان داد تلفات ناشی از اثر فراکشن های

مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

تصویر ۹. تغییرات مورفولوژیکی DNA (۴۰ \times) سلول‌های سرطانی کبد مجاورت داده شده با فراکشن‌های زهر خام مارشاخ دار ایرانی در مقایسه با سلول‌های کنترل بر اساس آزمایش کامت قلیایی، [۱-۳: تصویر DNA سلول‌های سالم (۴۰ \times)، ۴-۶: تصویر DNA سلول آپوپتوز شده (۴۰ \times)]

۲۴/۷۳ و ۲۵/۳۴ درصد آپوپتوز در سلول سرطانی کبد ایجاد شد که در مقایسه با کنترل معنادار بود (تصاویر شماره ۷، ۸، ۹).

بحث

زهر مارهای سمی، مجموعه‌ای از مولکول‌هایی با فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی است که می‌تواند در تحقیقات پژوهشی و زیست‌شناسی بسیار مورد توجه قرار گیرد [۱۸]. جداسازی پروتئین‌های زهر با استفاده از روش‌های الکتروفورز برای اولین بار بیش از ۴۰ سال پیش توسط محققان انجام شده است [۱۹].

از آنجا که پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در سم مار، دامنه وسیعی از اندازه مولکولی و همچنین خصوصیات بیوشیمیایی دارند، تجزیه و حلیل پروتئوم می‌تواند در شناسایی و جداسازی این ترکیبات بسیار حائز اهمیت باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر، به منظور بررسی مشخصات الگوی پروتئینی زهر از یک استراتژی ترکیبی از روش‌های الکتروفوروزیس و کروماتوگرافی استفاده شده است. بررسی الگوی کروماتوگرافی سم مارشاخ دار ایرانی در سال ۲۰۰۴ توسط مهربار امینی نسب با استفاده از ژل فیلتراسیون Sephadex G-50 مطالعه و تعداد ۶ فراکشن از سم خام جدا شد [۲۱].

فوق افزایش یافته و بهترتبه به ۸۲/۲۹ و ۷۴/۸۱ رسیده است. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثرات فراکشن‌های شماره ۴ و ۵ در مهار رشد سلول در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل معنادار بود، اما اثر مهاری ۲ غلظت هریک از فراکشن‌ها نسبت به یکدیگر معنادار نبود (تصویر شماره ۵).

نتایج بررسی سمتیت سلولی فراکشن‌ها با روش رنگ‌سنگی قرمز خنثی

نتایج حاصل از مطالعه اثر سمتیت سلولی فراکشن‌های ۴ و ۵ با استفاده از تست رنگ قرمز خنثی نشان داد مرگ‌ومیر حاصل از فراکشن شماره ۴ در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول بهترتبه ۳۵/۱۹ و ۵۰/۹۳ درصد و در مورد فراکشن شماره ۸ بهترتبه ۸۲/۲۹ و ۷۴/۸۱ درصد بود که نسبت به کنترل معنادار بود (تصویر شماره ۶).

نتایج بررسی القای آپوپتوزیس توسط فراکشن‌ها با استفاده از تست کامت قلیایی

نتایج بررسی آزمایش کامت قلیایی نشان داد فراکشن شماره ۴ در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بهترتبه ۳۹/۳۱ و ۳۸/۹۷ درصد و فراکشن شماره ۸ در ۲ غلظت فوق بهترتبه

Single Cell MTT Assay، Neutral Red Uptake Assay و Gel Electrophoresis (Comet Assay) بر سلول سرطانی کبد (رده سلولی HepG2) بررسی شد.

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد فراکشن شماره ۸ کمترین سمیت را در سلول القا کرده است. این ویژگی، این فراکشن را یک کاندید مناسب جهت جداسازی مولکول‌های مؤثر با خواص ضدباکتریایی که کمترین اثرات جانبی روی سلول‌های انسانی را دارد، معرفی می‌کند. فراکشن شماره ۴ نیز بیشترین تأثیر را بر سلول‌های سرطانی القا کرد که با توجه به نتایج آزمایش کامت قلیایی این اثرات، بیشتر از طریق القای آپیتوز انجام می‌شود؛ بنابراین با توجه به این نتیجه، این فراکشن کاندیدای مناسبی برای استفاده در جهت کشف داروهای ضدسرطان خواهد بود. مطالعات قبلی در مورد سم خام مارها نیز نشان داده بود سم آن‌ها خواص ضدسرطانی دارد [۳۱].

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت براساس نتایج تحقیق حاضر، فراکشن شماره ۸، قابلیت توسعه مطالعه جهت ارزیابی‌های بیشتر به عنوان آنتی‌بیوتیک و فراکشن شماره ۴ به عنوان یک ماده با اثرات ضدسرطانی را دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

باتوجه به اینکه در این مطالعه از موجود زنده مانند حیوان، مدل وغیره استفاده نشده است؛ لذا برای دریافت کد اخلاق اقدام نشد.

حامی مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه اعضای گروه علوم زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در انجام مراحل تحقیق ما را باری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

در این مطالعه برای بررسی الگوی کروماتوگرافی سم از روش RP-HPLC استفاده شد که درنهایت، ۱۱ فراکشن از آن جداسازی و جمع‌آوری شد. نتایج پروتئین‌سنجه نشان داد تنها فراکشن از فراکشن‌های جداسازی شده پروتئین دارند. به علاوه، یافته‌های ما در این تحقیق وجود ۱۰ بند پروتئینی را در الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) نشان داد. اختلاف موجود در نتایج الگوی الکتروفورزی با الگوی کروماتوگرافی احتمالاً به این علت است که برخی از پروتئین‌ها در محدوده وزنی نزدیکی به هم قرار داشتند و هنگام جداسازی تحت یک فراکشن جمع‌آوری می‌شوند.

در مطالعات قبلی نشان داده شد الگوی الکتروفورز و کروماتوگرافی مارهای مختلف، متفاوت است [۲۶-۲۷]. از طرفی، در بسیاری از این مطالعات با جداسازی اجزای مختلف زهر، پروتئین‌ها و پپتیدهایی جداسازی شده است که خواص درمانی بالایی دارند که می‌تواند پیامدهای گستره‌ای برای پژوهشی داشته باشد [۳۰-۳۱]. رشد نگران کننده بیماری‌های عفونی ناشی از مقاومت‌های باکتریایی باعث تحقیق و بررسی بیشتر دانشمندان در منابع طبیعی و از جمله زهر جانوران سمی مختلف مانند مارها برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر و جدیدتر شده است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مشخص شد سم خام مار شاخ دار ایرانی خواص ضدباکتریایی دارد. همچنین سم خام این مار علیه باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) دارای اثرات مهاری بالا و علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی فقط در بالاترین غلظت مورد استفاده (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اثرات مهاری دارد؛ بنابراین در این قسمت از تحقیق سعی شد اجزای سم خام، جداسازی و میزان فعالیت هر فراکشن علیه باکتری‌های ذکر شده بررسی شود. به این منظور از روش‌های MIC Assay و MTT Redaction استفاده شد.

مطابق با نتایج، فراکشن شماره ۴ بیشترین اثرات مهاری را بر رشد باکتری‌های گرم مثبت دارد. اثر مهاری این فراکشن بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر ۹۹ درصد و در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۳۱ درصد بوده است. فراکشن شماره ۸ با ۳۰ درصد مهار بیشترین اثر مهاری را بر رشد باکتری اشرشیاکلی داشت.

این نتایج در مقایسه با داده‌های به دست آمده از مطالعه اثرات ضدباکتریایی سم خام مار ذکر شده بر این باکتری‌ها کاملاً مطابقت دارد. در صورت انتخاب این فراکشن‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک جهت استفاده در حیوان یا انسان می‌بایست سمیت سلولی آن‌ها بر سلول بررسی می‌شد؛ بنابراین اثرات سمیت سلولی فراکشن‌های انتخابی (دارای خواص ضدباکتریایی) با استفاده از روش‌های

References

- [1] Keshavarz Alikhani H, Zargan J, Bidmeshkipour A, Haji Nour Mohammadi A, Hosseinpour M, Heydari A, et al. Antibacterial activity of the Iranian scorpion's crude venom (*Odontobuthus bidentatus*) on gram-positive and gram-negative bacteria. *Iranian J Toxicol.* 2020; 14(2):105-10. [DOI:[10.32598/ijt.14.2.627](https://doi.org/10.32598/ijt.14.2.627)]
- [2] Zargan J, Mirzaei Nodushan M, Sobati H, Goodarzi H, Haji Noor Mohammadi A, Ebrahimi F. [Anti-cancer and anti-bacterial effects of crude venom of *Pseudocerastes persicus* snake (Persian)]. *Koomesh.* 2020; 22(3):518-28. [DOI:[10.29252/koomesh.22.3.518](https://doi.org/10.29252/koomesh.22.3.518)]
- [3] 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(1):39-47 [DOI:[10.1093/ecam/neh063](https://doi.org/10.1093/ecam/neh063)] [PMID] [PMCID]
- [4] Ferreira S. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother.* 1965; 24(1):163-9. [DOI:[10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x)] [PMID] [PMCID]
- [5] Aloof-Hirsch S, de Vries A, Berger A. The direct lytic factor of cobra venom: Purification and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta.* 1968; 154(1):53-60. [DOI:[10.1016/0005-2795\(68\)90257-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(68)90257-2)] [PMID]
- [6] 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(2):172-4. [DOI:[10.1016/S0924-8579\(03\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00110-9)] [PMID]
- [7] Markland FS. Snake venoms. *Drugs.* 1997; 54(S3):1-10. [DOI:[10.2165/00003495-199700543-00003](https://doi.org/10.2165/00003495-199700543-00003)] [PMID]
- [8] 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(11):2881-6. [DOI:[10.1016/j.bmc.2004.03.049](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049)] [PMID]
- [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 Nat Toxins.* 2002; 11(4):345-52. [PMID]
- [10] Chellapandi P, Jebakumar SRD. Purification and antibacterial activity of indian cobra and viper venoms. *Electronic Journal of Biology.* 2008; 4(1):11-6. [Link]
- [11] Steuten J, Winkel K, Carroll T, Williamson NA, Ignjatovic V, Fung K, et al. The molecular basis of cross-reactivity in the Australian Snake Venom Detection Kit (SVDK). *Toxicon.* 2007; 50(8):1041-52. [DOI:[10.1016/j.toxicon.2007.07.023](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.023)] [PMID]
- [12] Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *J Microbiol Methods.* 2010; 82(3):330-3. [DOI:[10.1016/j.mimet.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.014)] [PMID]
- [13] Hossein Pour M, Zargan J, Honari H, Haji Nour Mohammadi A, Hajizadeh A, Keshavarz Alikhani H, et al. Introduction of Di-anthins: A new promising horizon toward continuous research on breast cancer bulldozing in Iran. *Int J Med Toxicol Forensic Med.* 2019; 9(3):133-40. [DOI:[10.32598/ijmtfm.v9i3.25706](https://doi.org/10.32598/ijmtfm.v9i3.25706)]
- [14] Shebl RI, Mohammed AF, Ali AE, Amin MA. Antimicrobial profile of selected snake venoms and their associated enzymatic activities. *Microbiol Res J Int.* 2012; 2(4):251-63. [DOI:[10.9734/BMRJ/2012/2091](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2012/2091)]
- [15] Dezianian S, Zargan J, Goudarzi HR, Haji Noormohamadi A, Mousavi M, Keshavarz Alikhani H, et al. In-vitro study of hot-tentotta schach crude venom anticancer effects on MCF-7 and vero cell lines. *Iran J Pharm Res.* 2020; 19(1):192-202. [DOI:[10.22037/ijpr.2020.1100957](https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.1100957)] [PMID] [PMCID]
- [16] Kamran MR, Zargan J, Keshavarz Alikhani H, Hajinoormohamadi A. The comparative cytotoxic effects of *apis mellifera* crude venom on MCF-7 breast cancer cell line in 2D and 3D cell cultures. *Int J Pept Res Ther.* 2020; 26:1819-28. [Link]
- [17] Mousavi M, Zargan J, Haji Noor Mohammadi A, Goudarzi HR, Dezianian S, et al. Anticancer effects of the *Latrodectus dahli* crude venom on MCF-7 breast cancer cell line. *Breast J.* 2019; 25(4):781-2. [DOI:[10.1111/tbj.13332](https://doi.org/10.1111/tbj.13332)] [PMID]
- [18] Suntravat M, Nuchprayoon I, Perez JC. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor activator (RVV-X). *Toxicon.* 2010; 56(4):544-53. [DOI:[10.1016/j.toxicon.2010.05.012](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.012)] [PMID] [PMCID]
- [19] Master RWP, Rao SS. Identification of enzymes and toxins in venoms of Indian cobra and Russell's viper after starch gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1961; 236(7):1986-90. [DOI:[10.1016/S0021-9258\(18\)64116-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64116-X)]
- [20] Phizicky E, Bastiaens PIH, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature.* 2003; 422(6928):208-15. [DOI:[10.1038/nature01512](https://doi.org/10.1038/nature01512)] [PMID]
- [21] Amininasab M, Elmi MM, Endlich N, Endlich K, Parekh N, Naderi-Manesh H, et al. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *pseudocerastes persicus*. *FEBS Lett.* 2004; 557(1-3):104-8. [DOI:[10.1016/S0014-5793\(03\)01455-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01455-8)] [PMID]
- [22] Nawarak J, Sinchaikul S, Wu CY, Liau MY, Phutrakul S, Chen ST. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis.* 2003; 24(16):2838-54. [DOI:[10.1002/elps.200305552](https://doi.org/10.1002/elps.200305552)] [PMID]
- [23] Rioux V, Gerbod MC, Bouet F, Menez A, Galat A. Divergent and common groups of proteins in glands of venomous snakes. *Electrophoresis.* 1998; 19(5):788-96. [DOI:[10.1002/elps.1150190531](https://doi.org/10.1002/elps.1150190531)] [PMID]
- [24] Fry BG, Wüster W, Ryan Ramjan SF, Jackson T, Martelli P, Kini RM. Analysis of colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: Evolutionary and toxicological implications. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(18):2047-62. [DOI:[10.1002/rcm.1148](https://doi.org/10.1002/rcm.1148)] [PMID]
- [25] Mehdizadeh-Kashani T, Vatanpour H, Zolfagharian H, Hooshdar-Tehrani H, Heydari MH, et al. Partial fractionation of venoms from two iranian vipers, *echis carinatus* and *cerastes per-*

sicus fieldi and evaluation of their antiplatelet activity. *Iran J Pharm Res.* 2012; 11(4):1183-9. [PMID] [PMCID]

[26] Bhaskar M, Monica K, Amod K. Determination of molecular mass and partial peptide confirmation of short neurotoxins using chromatographic techniques and reverse phase HPLC. *Int J Appl Biol Pharm Technol.* 2011; 2(4):150-7. [Link]

[27] Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2000; 20(9):3415-24. [DOI:10.1523/JNEUROSCI.20-09-03415.2000] [PMID] [PMCID]

[28] Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T. Post-stroke dementia: Nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu N Y Acad Sci.* 2001; 939(1):179-86. [DOI:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03624.x] [PMID]

[29] Marcinkiewicz C, Weinreb PH, Calvete JJ, Kisiel DG, Mousa SA, Tuszyński GP, et al. Obtusatin: A potent selective inhibitor of $\alpha 1\beta 1$ integrin in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 2003; 63(9):2020-3. [PMID]

[30] Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K, et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem J.* 2004; 384(1):119-27. [DOI:10.1042/BJ20040354] [PMID] [PMCID]

[31] Angulo Y, Lomonte B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A2. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66:1993-2000. [DOI:10.1016/S0006-2952(03)00579-3]