

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 Scientific Medical Journal*. 2022; 21(1):122-137. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.1846>

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



Received: 28 Sep 2019

Accepted: 25 Nov 2020

Available Online: 01 Mar 2022

Keywords:

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

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 20µg/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 µg/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.

*** 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 (*Pseudoceraastes 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 Dezanian 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 ضدسرطانی فراکشن‌های پروتئینی جداشده از سم مار شاخ‌دار ایرانی و بررسی خواص ضدباکتریایی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی

*جمیل زرگان^۱، مجید میرزایی ندوشن^۱، حسین ثباتی^۲، حمیدرضا گودرزی^۳، اشکان حاجی نورمحمدی^۱، فیروز ابراهیمی^۱

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

۲. مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، انستیتوی 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 Scientific Medical Journal*. 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 بررسی: 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 مهارتی مطالعه شد. همچنین اثرات سمیت سلولی فراکشن‌ها در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌گرم با استفاده از روش‌های MTT Assay، رنگ سنجی قرمز خنثی و کامت قلبیایی روی سلول سرطانی کبد در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

یافته‌ها: الگوی SDS-PAGE نشان‌دهنده وجود ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳/۲ تا ۹۹/۲۵ 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 مهارتی 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 فاقد 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 به‌عنوان منبعی از مولکول‌ها/مولکول‌های دارای اثرات ضدباکتری و ضدتوموری توجه کرد.

تاریخ دریافت: ۰۶ مهر ۱۳۸۹

تاریخ پذیرش: ۰۵ آذر ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۰۱ 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: ۰۴۹۳۸۰۷۷۱ (۰۲۱) ۹۸+

رایانامه: jzargan@ihu.ac.ir

مقدمه

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

میکروارگانسیم‌ها و رده سلولی مورد استفاده

باکتری غیربیماری‌زای گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس^۲، باکتری گرم منفی اشرشیاکلی^۳ و سوش گرم مثبت بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس^۴ از مرکز کلکسیون فارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران^۵ و سلول‌های سرطان کبد^۶ از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شد.

مطالعه الگوی الکتروفورزیس زهر خام با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل آمید^۷

برای مطالعه الگوی الکتروفورزیس زهر خام افعی شاخ‌دار ایرانی از ژل ۱۲-۱۵ درصد استفاده شد [۱۰]. به هر چاهک ۵-۱۰ میکرولیتر محلول سمی (دارای ۱۵ تا ۲۰ میکروگرم پروتئین) دناتوره شده با حجم مناسب از بافر نمونه^۸ تزریق شد. جهت تخمین وزن مولکولی باندهای پروتئینی از پروتئین استاندارد استفاده شد.

الکتروفورز در ابتدا با ولتاژ ۵۰ ولت شروع شد و پس از عبور رنگ ردیابی^۹ از ژل متراکم‌کننده، الکتروفورزیس با ولتاژ ۱۵۰ ولت و تا رسیدن رنگ ردیابی 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.

جداسازی فراکشن‌های سم خام با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس^{۱۰}

فراکشن‌های زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی با استفاده از R-HPLC تهیه و با آشکارساز UV (جذب ۲۲۰ نانومتر)، ستون C18 SUPELCOSIC-18 (۵۹۱۸۵) ۲۵۰mmx21, ۲mm, ۱۲μm] [TM Pcc و برنامه خطی گرادیان [بافر A (استونیتریل ۲۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد تری فلورو استیک اسید^{۱۱})، بافر B (استونیتریل ۸۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد تری فلورو استیک اسید)] و زمان ۷۰ دقیقه‌ای جداسازی شد. در روش فاز معکوس، از یک فاز متحرک

یکی از مشکلات جدی جامعه پزشکی 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 به‌عنوان یکی از منابع طبیعی مهم جهت جداسازی و شناسایی مولکول‌های با خواص ضد میکروبی 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 الاید و ویپریده به ترتیب در سال‌های ۱۹۴۸ و ۱۹۶۸ منتشر شد [۴]. اسکارنز نیز در سال ۱۹۷۰ برای نخستین بار فعالیت ضد میکروبی برخی از آنزیم‌های موجود در سم مار را گزارش کرد [۵]. مطالعات زی و همکاران در سال ۲۰۰۰ به جداسازی پپتیدهایی از سم Naja Atra منجر شد که در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری‌های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جلوگیری کردند و فعالیت مهاری از خود نشان دادند [۶]. بررسی‌ها نشان می‌دهد ترکیبات مولکولی به‌ویژه پروتئین‌های موجود در سم افعی‌های خانواده ویپریده از تنوع زیادی برخوردار است. از ترکیبات مهم سموم این افعی‌ها می‌توان پروتئاز سرین، متالوپروتئیناز، فسفولیپاز A₂ (PLA₂)، لکتین نوع C- استیل کولینسترز، ال-آمینوآکسیداز و دترجنت‌ها را نام برد [۷]. تحقیقات اخیر نشان داد بسیاری از این ترکیبات خواص ضد میکروبی دارند [۸، ۹].

در این تحقیق، برای اولین بار اثرات ضدباکتریایی فراکشن‌های پروتئینی جدا شده از سم خام مار شاخ‌دار ایرانی^۱ و اثرات ضدسرطانی فراکشن‌های 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. Pseudocercariae Persicus

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 Gelpolyacrylamide Gel (SDS-PAGE)

8. Sample Buffer

9. Tracking Dye

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

11. Trifluoroacetic acid (TFA)

۶۰۰ نانومتر دارای جذبی معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱ است) رسید [۱۳]، میزان ۵ میکرولیتر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه استریل کشت شد. فراکشن‌ها با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هینتون برات) به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

در این آزمایش از تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت، سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان 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 ماندن باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۱۳].

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

جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک = a
جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری بلانک = b

بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فراکشن‌ها با استفاده از روش حداقل غلظت مهاری^{۱۷}

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].

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

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 هیدروفوبیسیته انجام می‌شود [۱۱].

برای جداسازی فراکشن‌های زهر خام، ۴۰ میلی‌گرم پودر خشک‌شده 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^{۱۲} و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از سوسپانسیون جدا شد. محلول رویی جهت تهیه الگوی کروماتوگرافی و جداسازی فراکشن‌ها توسط روماتوگرافی مایع با کارایی بالا^{۱۳} استفاده شد.

فراکشن‌های متناظر با هر پیک در شیشه‌های کاملاً تمیز و عاری از هرگونه آلودگی به پروتئین به‌صورت دستی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیز کردن، در دمای ۸۰- نگهداری شد. زمان خروج هر پیک^{۱۴} برای هر کدام از پیک‌ها ثبت شد.

پروتئین سنجی

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

بررسی خواص ضدباکتریایی

محیط کشت و آنتی‌بیوتیک: جهت کشت باکتری از محیط کشت مایع و جامد مولر هینتون^{۱۵} شرکت کیولب^{۱۶} کانادا استفاده شد. جهت مقایسه اثر سم با آنتی‌بیوتیک استاندارد از تتراسایکلین (Sigma, USA) با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم استفاده شد.

بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فراکشن‌ها با استفاده از MTT Assay

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که براساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیموم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در سیتوپلاسم و در نهایت، تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. این کریستال‌ها با اضافه کردن DMSO به شکل محلول درمی‌آیند [۱۲]. باکتری موردنظر در محیط مولر هینتون برات 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

درصد حیاتی سلول = $(a/b) \times 100$
 ۳. جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلاک = a
 جذب نوری کنترل منهای جذب نوری بلاک = b

بررسی سمیت سلولی فراکشن‌ها با روش رنگ‌سنجی قرمز خنثی^{۲۰}

مراحل انجام تست رنگ‌سنجی قرمز خنثی [۱۶] مشابه تست MTT Assay بود، اما پس از آنکوبه کردن سلول مجاورت داده‌شده 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 لیزوزوم سلول) تحت شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن و رطوبت حدود ۸۰ درصد آنکوبه شد.

پس از آن محلول موجود در هر چاهک تخلیه و پس از ۲ بار شست‌وشوی هر چاهک با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر بافر فیکس‌کننده (فرمالدهید ۳۷ درصد، کلرید کلسیم ۱۰ درصد) به آن اضافه شد. پس از ۱ دقیقه، این بافر تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حل‌کننده (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 آنکوبه 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 مهاری ناشی از غلظت‌های مختلف سم بر رشد سلول با استفاده از فرمول شماره ۴ محاسبه شد.

درصد مرگ‌ومیر سلول = $[1 - (a/b)] \times 100$
 ۴. جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلاک = a
 جذب نوری کنترل منهای جذب نوری بلاک = b

بررسی القای آپوپتوزیس توسط فراکشن‌ها با استفاده از تست کامت قلیایی^{۲۱}

کامت قلیایی یکی از بهترین تست‌های بررسی DNA Frag-mentation در سلول است [۱۷]. برای انجام این آزمایش، ابتدا در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای استریل حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم تعداد 1×10^4 سلول کشت داده شد. پلیت به مدت یک شب تحت شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن^{۲۲}، رطوبت ۸۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد.

جهت از بین بردن آلودگی‌های احتمالی در محلول سمی مورد نیاز تست‌های سلولی، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌آنتی‌مایکوتیک (In-vitrogen, USA) اضافه و پس از یک شب نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آزمایش‌ها استفاده شد. برای کشت سلول HepG2 از محیط کشت DMEM-F12 (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۸} تهیه‌شده از شرکت (Gibco, USA) استفاده شد. این سلول‌ها در فلاسک‌هایی با حجم ۲۵-۵۰ میلی‌لیتر مکعب کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. هر ۲-۳ روز یک‌بار محیط کشت قدیمی تعویض و پس از فراهم شدن جمعیت سلولی مورد نیاز برای هر آزمایش با استفاده از Trypsin-EDTA تهیه‌شده از شرکت (Sigma-Aldrich, USA) از فلاسک جدا و پس از شمارش با استفاده از لام نوبار به کار گرفته شدند.

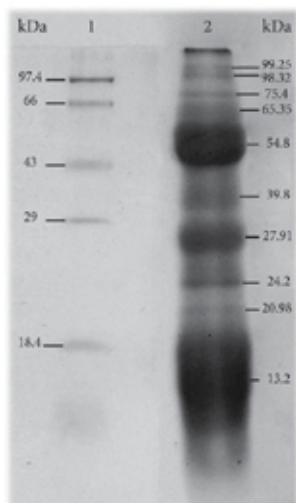
بررسی میزان سمیت سلولی فراکشن‌ها با روش MTT Redaction

این روش، مطابق روش انجام‌شده توسط دزیانان و همکاران انجام شد [۱۵]. 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} آنکوبه کردن در شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، 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 فوق‌الذکر آنکوبه 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 شست‌وشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه شد. در این تست از محیط کشت به‌عنوان آزمایش و از محیط کشت حاوی سلول به‌عنوان کنترل استفاده شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ 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 زنده ماندن سلول پس از تماس با غلظت‌های مختلف سم به کمک فرمول شماره ۳ محاسبه شد [۱۴].

20. Neutral Red Uptake Assay
 21. Comet Assay (Single-cell Gel ElectroPhoresis)
 22. Carbon dioxide (CO₂)

18. Fetal Bovin Serum (FBS)
 19. Overnight



جندی شاپور

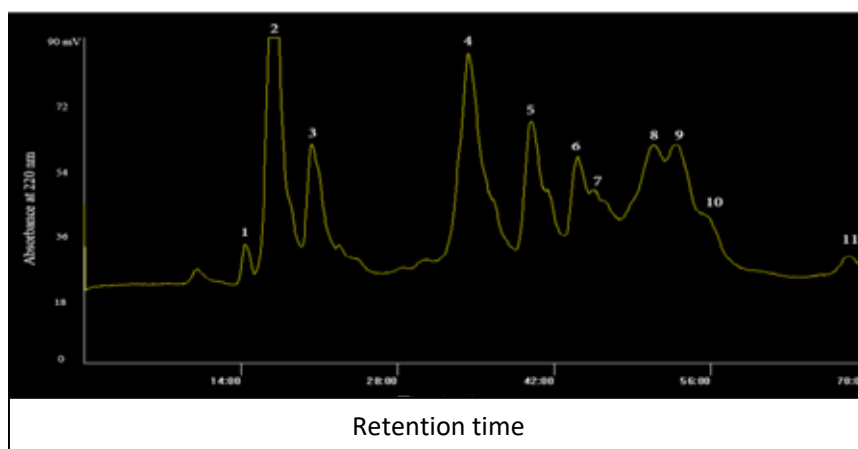
تصویر ۱. الگوی SDS-PAGE (۱۵ درصد) زهر مار شاخدار ایرانی، ستون ۱. پروتئین استاندارد، ستون ۲. زهر مار شاخدار ایرانی

سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند و محلول رویی تخلیه شد. جهت شست‌وشوی سلول‌ها به هریک از لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر PBS (pH=۷/۴) اضافه و پس از سانتریفیوژ 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 درآمدند. اسلایدهای مورد نیاز برای تست با آگاروز با نقطه ذوب نرمال (۱ NMA درصد) پوشش داده شد. سوسپانسیون سلولی با آگارز با نقطه ذوب پایین (۱ LMA درصد) به نسبت ۱ به ۲ مخلوط و روی اسلایدها ریخته شد. جهت ایجاد یک لایه سلول روی هر اسلاید، یک لامل روی اسلاید قرار داده شد.

در این تست از محیط کشت به‌عنوان بلانک و از محیط کشت حاوی سلول به‌عنوان کنترل استفاده شد. پس از آن محیط کشت اولیه هر چاهک تست، تخلیه و ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید (فاقد سرم) و حاوی غلظت‌های مختلف ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فراکشن‌های (دارای خواص ضدباکتریایی) به آن اضافه شد. پلیت حاوی سلول به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 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 میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. میکروتیوپ‌های حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه در دمایی ۴ درجه



جندی شاپور

تصویر ۲. کروماتوگرام زهر خام مار شاخدار ایرانی بر اساس نتایج حاصل از R-HPLC، فراکشن‌های زهر خام مار شاخدار ایرانی با استفاده از R-HPLC تهیه با آشکارساز UV (جذب ۲۲۰ نانومتر)، ستون C18 و برنامه خطی گرادیان (بافر A: استونیتریل ۲۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد TFA و بافر B: استونیتریل ۸۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد TFA) جداسازی شد. فراکشن‌های متناظر با هر پیک به صورت دستی در شیشه‌های عاری از آلودگی جمع‌آوری و Retention Time هریک از پیک‌ها ثبت شد. فراکشن‌های جمع‌آوری‌شده به ترتیب زمان خروج از ستون به نام‌های F1 تا F11 نام‌گذاری شدند.

جدول ۱. زمان خروج هر یک از اجزاء از ستون

فراکشن‌ها											زمان شروع و خاتمه پیک (دقیقه)
F11	F10	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	
۶۷:۰۶	۵۴:۵۶	۵۱:۵۹	۴۷:۵۰	۴۵:۰۱	۵۲:۵۱	۳۸:۲۷	۳۱:۱۴	۱۹:۲۲	۱۵:۲۶	۱۳:۵۰	شروع
۶۹:۷۸	۵۹:۱۸	۵۴:۵۶	۵۱:۵۹	۴۷:۵۰	۴۵:۰۱	۴۲:۵۱	۳۸:۲۷	۳۴:۳۵	۱۹:۲۲	۱۵:۰۱	پایان

مجله علمی پزشکی
جنیدی شاپور

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

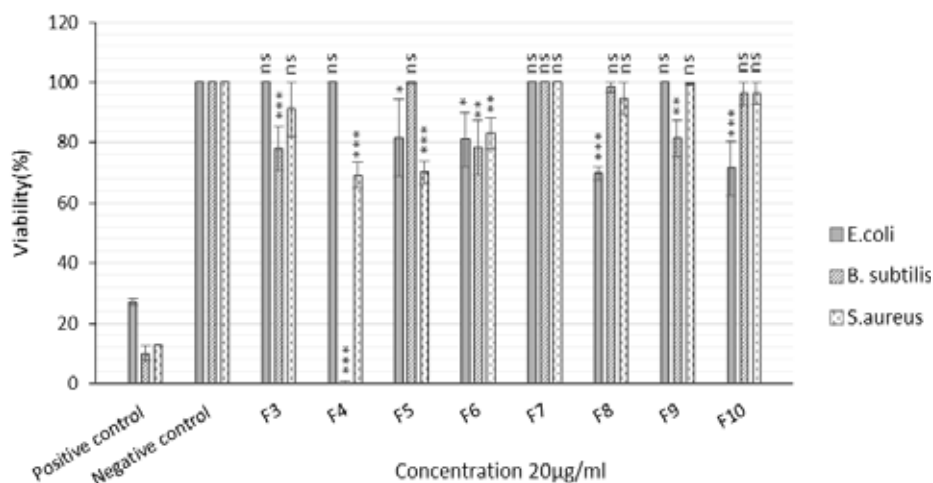
غلظت پروتئین (میلیگرم در میلیلیتر)										
F11	F10	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1
۰	۴/۵	۱۱/۳۵	۱۲/۸۵	۱/۹۳	۶/۲۹	۱۰/۷۷	۱۱/۷۷	۱/۵۵	۰/۰۰۷۵	۰

مجله علمی پزشکی
جنیدی شاپور

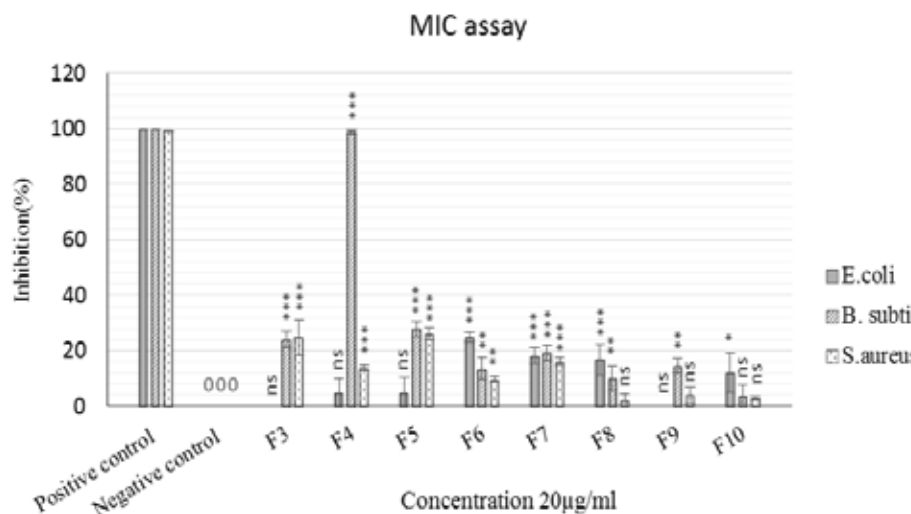
به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۲۵ و جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام شد. برای خنثی‌سازی محیط بازی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر خنثی‌کننده (Tris 400mM، pH=۷/۵) قرار داده شدند. جهت رنگ‌آمیزی سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اتیديوم بروماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه و به مدت زمان ۱۰ دقیقه 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 DNA 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 100mM، Tris 10mM)، NaOH 0.2M، Triton X-100 و یک درصد (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 (NaOH 300mM، EDTA 1mM، pH>13) شست‌وشو 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 سانتی‌گراد

مجله علمی پزشکی
جنیدی شاپور

تصویر ۳. درصد حیاتی باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس 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<۰/۰۰۱)***, (P<۰/۰۱)**, (P<۰/۰۵)*



جندی شاپور

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

دمای ۸۰- نگهداری شد. زمان خروج^{۲۵} محصول متناظر با هر پیک در جدول شماره ۱ ارائه شده است. پروتئین‌سنجی نتایج نشان داد فراکشن‌های ۱، ۲ و ۱۱ فاقد پروتئین هستند که از بررسی‌های بعدی حذف شدند (جدول شماره ۲).

نتایج بررسی‌های ضدباکتریایی

نتایج بررسی میزان اثر ضدباکتریایی فراکشن‌ها با استفاده از MTT Assay

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

همچنین نتایج تست در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نشان داد درصد حیاتی آن در محیط کشت حاوی فراکشن‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به ترتیب ۷۸/۴۱، ۰/۳۵، ۹۹/۹۱، ۸۱/۲۷، ۱۰۰، ۹۸/۹۴، ۸۱/۱۵ و ۹۷/۴۹ درصد بوده است. فراکشن‌های ۴، ۶ و ۹ بر رشد این باکتری در مقایسه با کنترل منفی رشد

تحلیل آماری

نتایج هر تست به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش و داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad InStat) تجزیه و تحلیل آماری شد. غلظت‌های مختلف سم نسبت به گروه کنترل و نیز نسبت به یکدیگر با آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه^{۲۳} و آزمون توکی^{۲۴} بررسی شد. $P < 0.05$ به‌عنوان 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

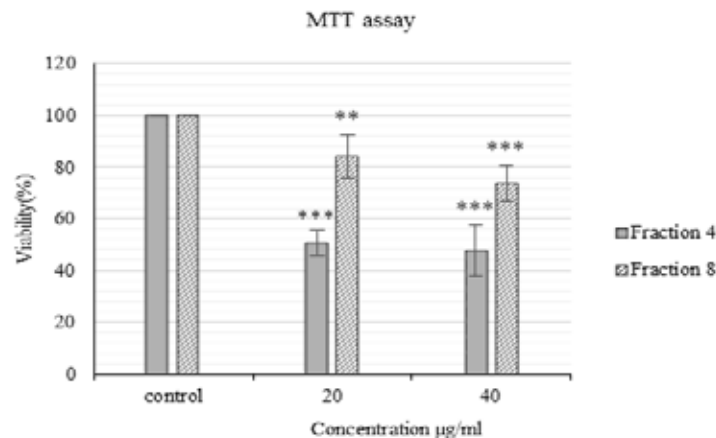
وزن مولکولی باندها با استفاده از نمودار پروتئین استاندارد تعیین شد. نتایج SDS-PAGE (ژل ۱۵ درصد) وجود ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۳/۲، ۱۹/۶، ۲۴/۲، ۲۷/۹۱، ۳۹/۸، ۵۴/۸، ۶۵/۳۵، ۷۵/۴، ۹۸/۳۲ و ۹۹/۲۵ کیلوالتون را نشان داد (تصویر شماره ۱).

نتایج حاصل از جداسازی فراکشن‌های زهر خام توسط HPLC، وجود ۱۱ پیک مجزا و عمده را نشان داد (تصویر شماره ۲). فراکشن‌های جمع‌آوری‌شده، به ترتیب زمان خروج از ستون به نام‌های F۱ تا F۱۱ نام‌گذاری شدند. فراکشن‌ها متناظر با هر پیک در شیشه‌های تمیز و عاری از هرگونه آلودگی جمع‌آوری و پس از لیوفیلیز کردن در

23. One-way Anova

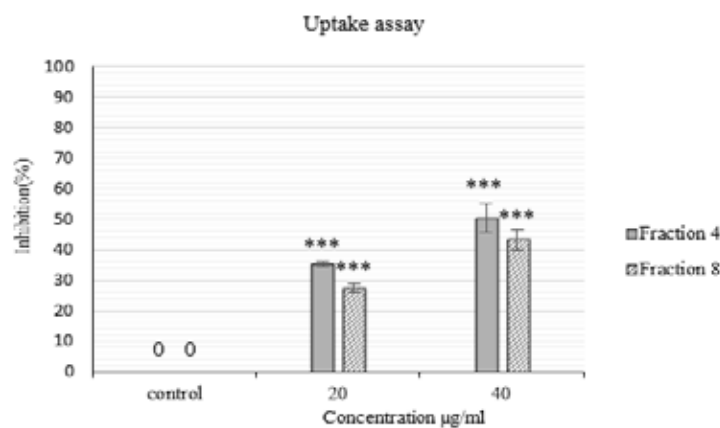
24. Tukey's Method

25. Retention Time



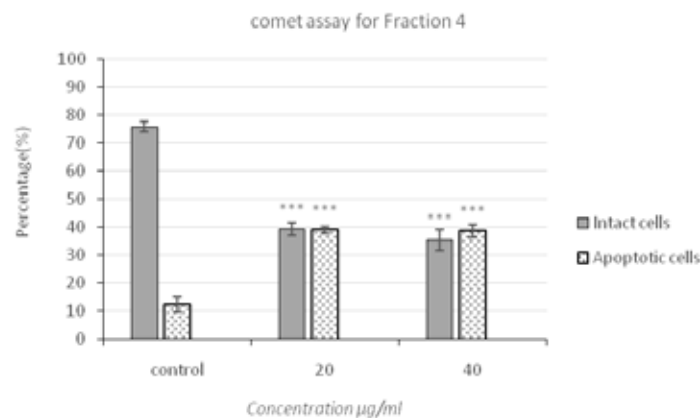
مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۵. درصد حیاتی سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس ۲۴ ساعت با غلظت پروتئینی ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فراکشن‌های زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی بر اساس تست MTT، اثر ناشی از فراکشن‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شده است. $(P < 0.001)$ (**), $(P < 0.001)$ (***) Error bar بیانگر میانگین انحراف معیار]



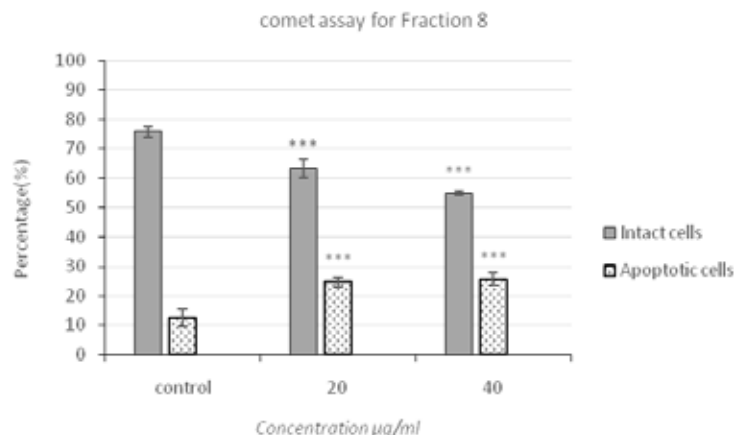
مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۶. درصد مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی کبد پس از تماس ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی بر اساس روش رنگ قرمز خنثی مرگ‌ومیر ناشی از تأثیر هر یک از غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل مقایسه شده است. $(P < 0.001)$ (***) Error bar بیانگر میانگین انحراف معیار]



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۷. میزان آپوپتوز ایجادشده توسط فراکشن شماره ۴ مار شاخ‌دار ایرانی در سلول‌های سرطانی کبد بر اساس نتایج آزمایش کامت قلیایی، اثر هر یک از غلظت‌ها نسبت به کنترل ارزیابی شده است. $(P < 0.001)$ (***)



جندی شاپور

تصویر ۸. میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط فراکشن شماره ۸ مار شاخ‌دار ایرانی در سلول‌های سرطانی کبد بر اساس نتایج آزمایش کامت قلیایی، اثر هر یک از غلظت‌ها نسبت به کنترل ارزیابی شده است. *** ($P < 0.001$)

۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ بر باکتری در مقایسه با کنترل منفی معنادار بود. در مقایسه با سایر فراکشن‌ها، اثر مهاری فراکشن ۴ بر رشد این باکتری در مقایسه با کنترل مثبت (تتراسایکلین) بسیار بیشتر، اما این اثر معنادار نبود (تصویر شماره ۴).

همچنین با بررسی انجام شده مشخص شد فراکشن‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر بود و به ترتیب ۲۵/۴۶، ۱۳/۸۵، ۲۵/۸۸، ۹/۸۵، ۱۵/۸۸، ۲/۲۸، ۴/۷۴ و ۳/۰۳ درصد اثر مهاری بر آن القا کردند. اثر مهاری فراکشن‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ بر این باکتری در مقایسه با کنترل منفی معنادار، اما نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد معنادار نبود (تصویر شماره ۴).

نتایج بررسی خواص ضدسرطانی فراکشن‌ها

جمع‌بندی نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتریایی فراکشن‌های جدا شده از زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی و تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند فراکشن‌های ۴ و ۸ در مقایسه با سایر فراکشن‌ها اثرات مهاری بیشتری بر باکتری‌های مورد تست القا کردند؛ بنابراین در این مطالعه به اثر ضدسرطانی و میزان سمیت سلولی آن‌ها توجه شد.

نتایج تست بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT Assay

بررسی اثرات سمیت سلولی فراکشن‌های ۴ و ۸ جدا شده از زهر خام بر رشد سلول‌های سرطانی کبد در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد درصد حیاتی سلول‌ها 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 غلظت‌های

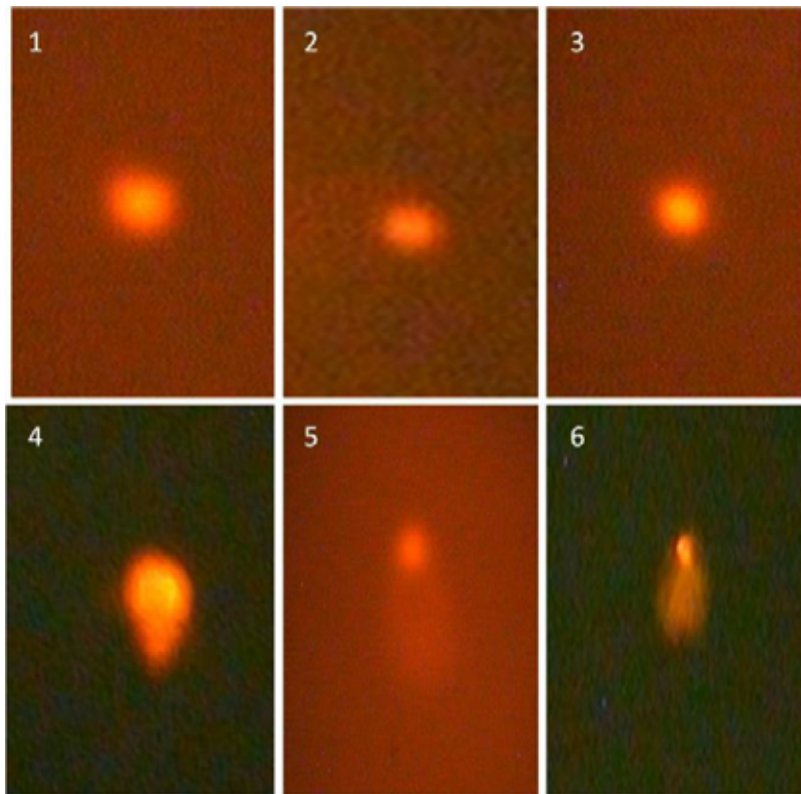
بازدارندگی معنادار ایجاد کرده که از میان آن‌ها فراکشن شماره ۴ اثر مهاری بیشتری از آنتی‌بیوتیک استاندارد (تتراسایکلین) داشته است (تصویر شماره ۳).

درصد حیاتی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت حاوی فراکشن‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰، به ترتیب ۹۱/۵۸، ۶۹/۲۳، ۷۰/۴۷، ۸۱/۳۸، ۱۰۰، ۹۶، ۹۹/۷۶ و ۹۵/۷۶ بوده است. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد فراکشن‌های ۴، ۵ و ۶ بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی رشد مهاری معنادار ایجاد کردند. بیشترین اثر مهاری فراکشن‌های جدا شده از زهر خام به فراکشن شماره ۴ با اثر مهاری حدود ۳۰/۷۷ درصد تعلق داشته که از اثر مهاری تتراسایکلین به صورت معناداری کمتر بوده است (تصویر شماره ۳).

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

نتایج اثرات مهاری فراکشن‌های جداسازی شده با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری‌ها نشان داد فراکشن‌های ۳ و ۹ بر باکتری اشرشیاکلی بی‌تأثیر بودند، اما فراکشن‌های ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ به ترتیب ۵/۲۱، ۳/۴۸، ۲۵/۲، ۱۷/۷۱، ۱۷/۸ و ۱۳/۰۶ درصد بر رشد باکتری اثر مهاری داشتند. با بررسی آماری انجام شده مشخص شد فراکشن شماره ۶ نسبت به سایر فراکشن‌ها اثر مهاری بیشتری داشت، اما این اثر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد معنادار نبود (تصویر شماره ۴).

یافته‌ها نشان داد فراکشن‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ و ۱۰ در باکتری باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۲۴/۰۶، ۹۸/۴۶، ۲۸/۷۷، ۱۳/۱۴، ۱۷/۸۸، ۱۲/۳۰، ۱۳/۷۶ و ۲/۶۱ اثر مهاری ایجاد کردند. بررسی آماری نشان داد تلفات ناشی از اثر فراکشن‌های



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۹. تغییرات مورفولوژیکی DNA (×۴۰) سلول‌های سرطانی کبد مجاورت داده‌شده با فراکشن‌های زهر خام مار شاخ‌دار ایرانی در مقایسه با سلول‌های کنترل بر اساس آزمایش کامت قلیایی، [۳-۱: تصویر DNA سلول‌های سالم (×۴۰)، ۴-۶: تصویر DNA سلول آپتوز شده (×۴۰)]

۲۴/۷۳ و ۲۵/۳۴ درصد آپتوز 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 پزشکی 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 دارد، تجزیه و تحلیل 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 الکتروفورز و کروماتوگرافی استفاده شده است. بررسی الگوی کروماتوگرافی سم مار شاخ‌دار ایرانی در سال ۲۰۰۴ توسط مهریار امینی‌نسب با استفاده از ژل فیلتراسیون Sephadex G-50 مطالعه و تعداد ۶ فراکشن از سم خام جدا شد [۲۱].

فوق افزایش یافته و به ترتیب به ۸۲/۲۹ و ۷۴/۸۱ رسیده است. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثرات فراکشن‌های شماره ۴ و ۸ در مهار رشد سلول در ۲ غلظت ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل معنادار بود، اما اثر مهاری ۲ غلظت هر یک از فراکشن‌ها نسبت به یکدیگر معنادار نبود (تصویر شماره ۵).

نتایج بررسی سمیت سلولی فراکشن‌ها با روش رنگ‌سنجی قرمز خنثی

نتایج حاصل از مطالعه اثر سمیت سلولی فراکشن‌های ۴ و ۸ 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 به ترتیب ۳۵/۱۹ و ۵۰/۹۳ درصد و در مورد فراکشن شماره ۸ به ترتیب ۸۲/۲۹ و ۷۴/۸۱ درصد بود که نسبت به کنترل معنادار بود (تصویر شماره ۶).

نتایج بررسی القای آپتوزیس 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 به ترتیب ۳۹/۳۱ و ۳۸/۹۷ درصد و فراکشن شماره ۸ در ۲ غلظت فوق به ترتیب

Single Cell و 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 باتوجه به نتایج آزمایش کامت قلیایی این اثرات، بیشتر از طریق القای آپاپتوز انجام می‌شود؛ بنابراین باتوجه 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 به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و فراکشن شماره ۴ به‌عنوان 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 و غیره 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 یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

در این مطالعه برای بررسی الگوی کروماتوگرافی سم از روش RP-HPLC استفاده شد که در نهایت، ۱۱ فراکشن از آن جداسازی و جمع‌آوری شد. نتایج پروتئین‌سنجی نشان داد تنها ۸ فراکشن از فراکشن‌های جداسازی شده پروتئین دارند. به‌علاوه، 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 [۲۲-۲۶]. 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 گسترده‌ای برای پزشکی داشته باشد [۲۷-۳۰]. رشد نگران‌کننده 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 مؤثرتر و جدیدتر شده است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مشخص شد سم خام مار شاخ‌دار 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 MTT Redaction و MIC Assay 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 مهاری بیشترین اثر مهاری را بر رشد باکتری اشرشیاکلی داشت.

این نتایج در مقایسه با داده‌های به‌دست آمده از مطالعه اثرات ضدباکتریایی سم خام مار ذکر شده بر این باکتری‌ها کاملاً مطابقت دارد. در صورت انتخاب این فراکشن‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک جهت استفاده در حیوان یا انسان می‌بایست سمیت سلولی آن‌ها بر سلول بررسی می‌شود؛ 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]
- [2] Zargan J, Mirzaei Nodushan M, Sobati H, Goodarzi H, Haji Nour 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]
- [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] [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] [PMID] [PMCID]
- [5] Alooof-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] [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 drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 22(2):172-4. [DOI: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] [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] [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] [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] [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. [10.32598/ijmtfm.v9i3.25706]
- [14] Shebl RI, Mohamed 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]
- [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] [PMID] [PMID]
- [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 Nour 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] [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] [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]
- [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] [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] [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] [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] [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] [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 persicus*

- sis field 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. Obtustatin: 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]