

ارزیابی اثرات توکسیستی و ضد سرطانی فراکشن‌های حاصل از زهر مار کبری ایرانی

Naja naja oxiana بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Jurkat E6.1)

معصومه براتی، *M.Sc.، فاطمه داوودی دهاقانی، Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، دانشکده علوم پایه، گروه آموزشی بیوشیمی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m65660@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۱

چکیده

هدف: سرطان یک بیماری تهدید کننده زندگی که توسط تمایز کنترل نشده و تکثیری تعیین شده است. شیمی درمانی روش معمول در درمان سرطان است، اما تومورها اغلب به شیمی درمانی که منجر به عوارض جانبی بسیاری نیز می‌شود مقاومت نشان می‌دهند. بسیاری از سموم بیولوژیکی دارای ترکیبات فعال با فعالیت ضد توموری می‌باشند. این مطالعه جهت جستجوی یک عامل ضد سرطان از زهر مار کبری ایرانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا زهر مار کبری ایرانی (*Naja naja oxiana*) لیوفیلیزه و سپس با استفاده از روش BCA تعیین غلظت شد. از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (FPLC) و تعویض یونی، SDS-PAGE، جهت تخلیص زهر استفاده شد. فعالیت ضد سرطانی فراکشن‌ها توسط تست MTT بر روی سلول (Jurkat E6.1) بررسی شد.

نتایج: پیک سوم از کروماتوگرام FPLC دارای بیشترین اثر سمیت بود و جهت کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد. چهار پیک آنیونی و یک پیک کاتیونی جمع آوری شد. پیک دوم از کروماتوگرافی تعویض آنیونی دارای اثر سمی 43 ± 1 درصد در مقدار ۱/۵ میکروگرم بود. این فراکشن در سلول نرمال سمیتی حدود 8 ± 1 درصد از خود نشان داد ($p \leq 0.05$).

نتیجه گیری: ترکیبات ضد سرطان طبیعی مشتق شده از سم *Naja naja oxiana* می‌تواند در مبارزه با سرطان کمک کننده باشد. این اولین گزارش از فراکشن ضد سرطان از مار کبری ایرانی با اثر سمیت بر روی سلول Jurkat E6.1 و اثر سمیت کمتر بر روی ی نرمال است.

واژگان کلیدی: زهر مار کبری ایرانی، لوسمی، تست MTT

مقدمه

سالیانه منابع زیادی در پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان سرمایه گذاری شده و تمرکز اصلی بسیاری از شرکت‌های داروسازی بر توسعه و کشف عوامل ضد سرطان است در حال حاضر بسیاری از محققین در سراسر دنیا ترکیبات ضد سرطانی متنوعی را شناسایی کرده اند که از سموم زیستی جدا شده اند (۱).

سرطان خون علت اصلی مرگ مرتبط با سرطان در کودکان است، میزان بروز این نوع سرطان ۳۴/۳ مورد در هر یک میلیون نفر می باشد (۲). گزینه‌های درمان سرطان خون (لوسمی حاد) به‌طور اختصاصی در درجه‌ی اول شامل، شیمی درمانی است و گاهی و از پرتو درمانی هم به‌عنوان مکمل استفاده کرد. داروهایی که برای شیمی درمانی استفاده می‌شود علاوه بر ی بدخیم، ی سالم را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد و بیش از همه بر روی بافت‌های فعال و در حال رشد مانند مغز استخوان اثر زیان بخش می‌گذارد (۳). عوارض جانبی سمی و ظهور مقاومت دارویی از مشکلات عمده مواجهه با شیمی درمانی است. بسیاری از بیو توکسین‌ها فعالیت ضدتوموری دارند. بعضی مستقیماً سلول توموری را از بین می‌برند و بعضی مانع آنژیوژنز تومور شده و رشد تومور را مهار می‌کنند (۱). این پروتئین‌ها می‌توانند سمی یا غیرسمی باشند. زهر مار در *In vivo* و *In vitro* اثر مهاری بر روی تومور داشته و ممکن است در درمان سرطان کاربرد داشته باشد (۱ و ۴).

الفای آپوپتوزیس مهم‌ترین مکانیسم بسیاری از عوامل ضد سرطان است (۴). با توجه به اینکه ونوم مار شامل ترکیبات وسیعی است که سبب آپوپتوزیس و متاستاز سلولی می‌شود، می‌توان به توسعه‌ی یک داروی جدید ضد سرطان از ونوم مار در آینده امیدوار بود (۱ و ۴).

Disintegrin (یک گروه از پروتئین‌های متصل شونده به اینتگرین) که در ونوم بعضی از مارها یافت شده اند در پروسه‌ی کشندگی سلولی و مهاجرت آن‌ها دخالت کرده و در درمان سرطان و مهار متاستاز نقش دارند (۵). هدف از

این تحقیق جداسازی اجزای زهر مار کبری ایرانی به‌روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی و بررسی اثر ضد سرطانی فراکشن‌های به‌دست آمده بر رده سلولی سرطان خون Jurkat E6.1 می‌باشد و اثر فراکشن خالص تر بر تکثیر ی سرطانی نیز بررسی می‌شود. رده سلولی شاهد HEK-293 بوده و محدوده وزن مولکولی فراکشن موثر با SDS-PAGE مشخص خواهد شد.

مواد و روش‌ها

زهر لیوفیلیزه شده‌ی مار کبری ایرانی در آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی انستیتو پاستور موجود بود که به‌روش milking بر طبق توصیه سازمان WHO زهرگیری انجام شده بود (۶).

به‌منظور تخلیص زهر مار کبری ایرانی به‌روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از زهر خام در ۲ میلی لیتر آمونیوم استات (MERK آلمان) ۲۰ mM (pH:۸) حل شد و محلول به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ جهت حذف پارتيكل‌ها سانتریفوژ شد و مقدار پروتئین محلول اندازه‌گیری شد. متعادل سازی ستون سفاکریل ۱۶/۶۰ Sephacryl ۲۰۰-HiPrep (شرکت GE آمریکا) (طول ۶۰ سانتی‌متر و قطر ۱.۶ سانتی‌متر) از طریق شستشو با بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار انجام شد و زهر به دستگاه FPLC (شرکت GE - مدل AKTA10) تزریق شد. کروماتوگرافی با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. فراکشن‌های زهر مار کبری ایرانی در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به صورت دستی جمع آوری شدند.

تغلیظ و لیوفیلیزاسیون فراکشن‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی در دستگاه فریز درایر (شرکت Christ آلمان) صورت گرفت.

تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش BCA و با استفاده از کیت مخصوص BCA (کمپانی Intronbio کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. فراکشن‌های تغلیظ شده

کشت و نگهداری رده سلولها رده سلول سرطانی Jurkat E6.1 و سلول نرمال HEK-293 از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco) حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS)، محلول پنسیلین 100 U/ml - استرپتومایسین (100 µg/ml) و 2 mM L-گلوتامین کشت داده شدند. سپس در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد و در مجاورت CO₂ پنج درصد نگهداری و هر سه روز محیط کشت آن‌ها تعویض شد (9 و 10).

اثر سمیت سلولی فراکشن‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی (ژل فیلتراسیون و تعویض یونی) بر روی سرطانی Jurkat E6.1 و شاهد رده HEK-293 بررسی شد. برای این منظور هنگامی که حداقل 70 درصد سرطانی Jurkat E6.1 رده‌ی شاهد در فلاسک کشت به رشد کامل رسیدند، به کمک تریپسین-EDTA از کف فلاسک جدا شده و سانتریفوژ شد. پس از شمارش ی زنده در سوسپانسیون سلولی توسط لام نئوبار، تعداد 2 × 10⁴ سلول به هر چاهک میکروپلیت 96 خانه منتقل شد و یک گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. مقادیر مختلف از هر فراکشن کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی به ترتیب (125-97/0) و (6-0/04) میکروگرم به هر یک از چاهک‌های گروه تست اضافه شد پس از انکوباسیون 24 ساعته جذب فراکشن‌ها در طول موج 570 نانومتر توسط (دستگاه Epoch شرکت BioTek آمریکا) ثبت شد و به این ترتیب فراکشن موثر و دارای بیشترین اثر سیتوتوکسیک انتخاب شد.

بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی فراکشن کاندید به‌روش رنگ سنجی، با استفاده از MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) انجام شد (20). اساس این روش بر پایه‌ی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی زنده استوار است، که در این روش محلول زرد رنگ MTT به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌شود و

توسط آب مقطر تزریقی رقیق شد و با بافرهای موجود در کیت مخلوط کرده و درون چاهک‌های میکروپلیت 96 خانه ریخته و در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد. سپس عدد جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج 562 نانومتر قرائت شد (7).

جهت تعیین محدوده‌ی وزنی فراکشن‌های به‌دست آمده، ابتدا فراکشن‌ها را با بافر نمونه مخلوط شده و در مدت زمان 3 تا 5 دقیقه حرارت غیر مستقیم داده و در ژل پلی‌اکریل آمید با ژل (Resolving) 12 درصد و ژل (Stacking) 4 درصد، بر اساس روش لاملی الکتروفورز شدند (8). پس از آماده‌سازی نمونه‌های پروتئینی، مقدار 20 میکروگرم از نمونه در هر چاهک دستگاه تانک عمودی (Bio-Rad) تزریق شده و در جریان 30 میلی آمپر به مدت 3 ساعت الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل با رنگ کوماسی آبی R 250 صورت گرفت.

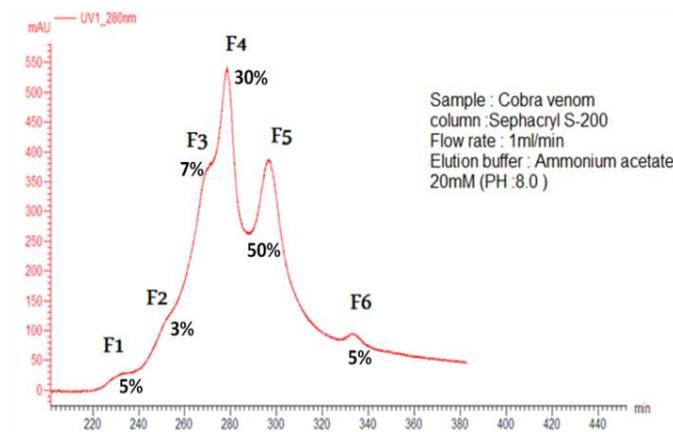
به‌منظور تخلیص بیشتر، مقدار یک میلی گرم از فراکشن شماره 3، به دستگاه FPLC (شرکت GE - مدل 10 AKTA) و ستون Mono Q (شرکت GE آمریکا - طول 10 سانتی‌متر و قطر 1/6 سانتی‌متر) تزریق شد. در این روش از کروماتوگرافی ابتدا پروتئین‌هایی که جذب ستون آنیونی نشده بودند، از ستون خارج شده و بعد از اینکه این پروتئین‌ها کاملاً خارج شدند، بلافاصله شیب غلظت (گرادیان نمک) NaCl از صفر تا 1 مولار با pH:7 به مدت 60 دقیقه اعمال شد. جذب فراکشن‌ها در طول موج 280 نانومتر قرائت و منحنی جذب آن ثبت شد. کروماتوگرافی نیز با سرعت-جریان 1 میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. به‌منظور نمک زدایی از فراکشن‌های به‌دست آمده، از لوله فالکن دیالیز (Milli pore) استفاده و سپس به‌روش فوق لیوفلیزه شد. همچنین اندازه‌گیری مقدار پروتئین با استفاده از کیت BCA مطابق روش ذکر شده، انجام پذیرفت و الکتروفورز (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی انجام شد.

آنالیز آماری

نتایج بر اساس میانگین \pm انحراف معیار با استفاده از از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ گزارش و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون student t-test استفاده شد ($p < 0.05$)

نتایج

در مرحله اول تخلیص، نتایج کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۲۰۰ میلی گرم زهر مار کبری ایرانی در (شکل ۱) نشان داده شده است. به این صورت که ۶ فراکشن مجزا به ترتیب وزن مولکولی در مدت زمان ۱۳۰ دقیقه از ستون خارج و جمع آوری شدند (شکل ۱).



شکل ۱: فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر مار کبری ایرانی. ۶ فراکشن با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه مشاهده و جمع آوری شد. ستون مورد استفاده سفاکریل (S-200) و بافر آمونیوم استات 20 mM بود.

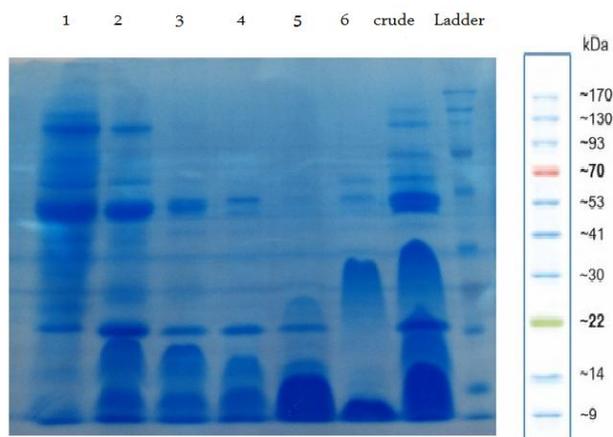
درصد در (شکل ۲) نشان داده شده است. فراکشن های اول دارای وزن مولکولی بیشتر و فراکشن انتهایی دارای وزن مولکولی کمتر نشان دهنده این مهم بود که پروتئین و پپتیدهایی با وزن مولکولی متفاوت در ساختار ونوم مار کبری وجود داشت (شکل ۲).

پس از حل کردن در DMSO می توان آن ها را در دستگاه الیزا ریدر مورد سنجش قرار داد (۱۱). برای هر غلظت از فراکشن کاندید، ۳ تکرار انجام شد و درصد سمیت سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه صورت گرفت (۱۲ و ۱۳).

= درصد سمیت سلولی

$$\left[1 - \frac{(\text{OD بلانک} - \text{OD سلول تیمار شده})}{\text{OD بلانک} - \text{OD کنترل}} \right] \times 100$$

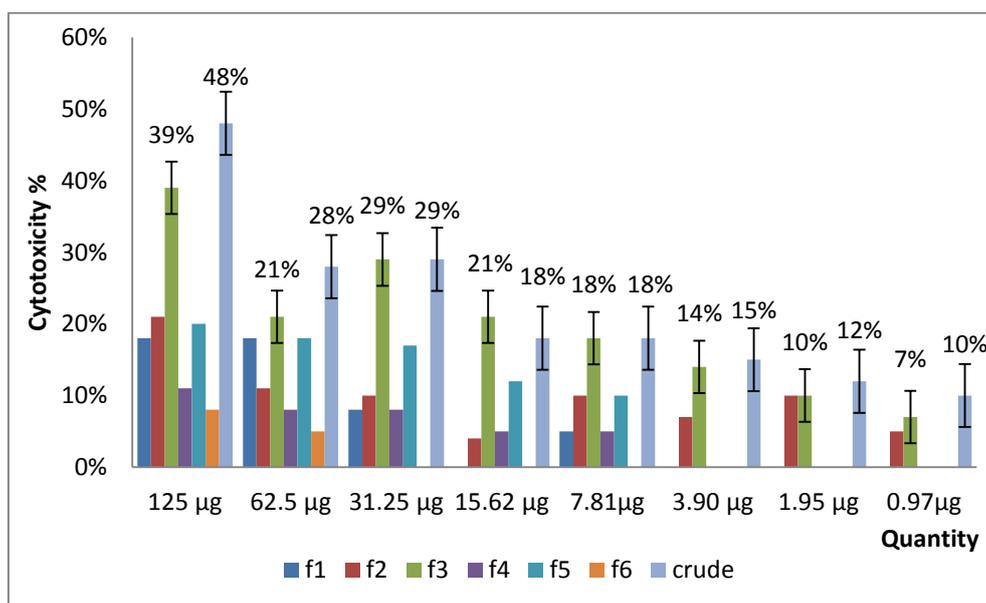
نتیجه ای الکتروفورز (SDS-PAGE) و تعیین وزن مولکولی فراکشن هدف تخلیص شده و پروتئین استاندارد به کار گرفته شده در محدوده وزنی ۹ تا ۱۷۰ کیلو دالتون جهت تعیین وزن مولکولی با استفاده از ژل ۱۲



شکل ۲: تعیین وزن زهر خام مار کبری ایرانی و فراکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در مقدار ۱۲۵ میکروگرم دارای بیشترین اثر سمیت بر روی رده سلولی Jurkat E6.1 کشت داده شده بود (شکل ۳).

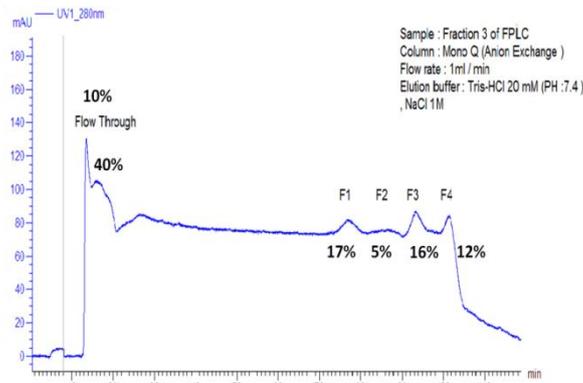
بررسی اثر سمیت سلولی فراکشن‌های به دست آمده از FPLC با استفاده از تست MTT در (شکل ۳) قابل مشاهده است. در این تست فراکشن شماره ۳ حاصل از



شکل ۳: بررسی اثر سمیت فراکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و زهر خام مار کبری ایرانی به روش MTT را نشان می‌دهد. فراکشن ۳ (F3) دارای بیشترین میزان اثر سمی نسبت به دیگر فراکشن‌ها بر روی رده سلولی Jurkat E6.1 بود. مقادیر موجود در نمودار معادل Mean ±SD است. ($p \leq 0.05$)

پس از بررسی تست سمیت فراکشن سوم حاصل از FPLC، تخلیص مجدد با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و ستون Mono Q انجام شد و نتایج در شکل ۴

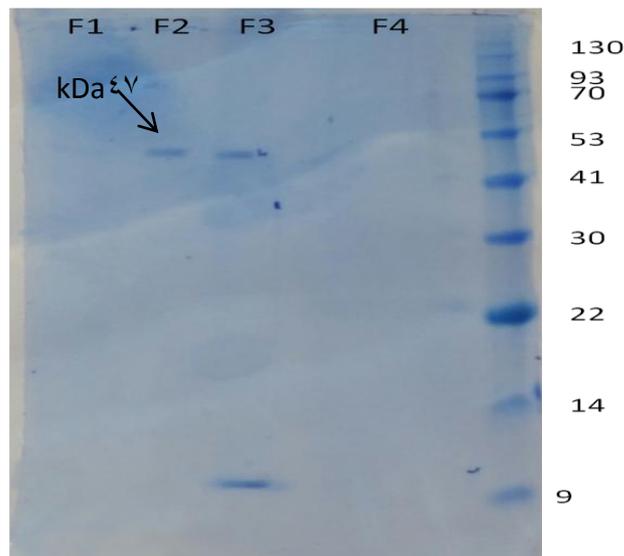
نشان داده شده است. در این مرحله ۴ فراکشن در محدوده ی آنیونی مشاهده و جمع آوری شد. پیک های محدوده ی کاتیونی نیز جدا سازی شد.



شکل ۴: فراکشن های به دست آمده با روش کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون Mono Q) در مدت زمان ۱۰۰ دقیقه و با استفاده از بافر Tris-HCl 20Mm و NaCl 1M جمع آوری شدند.

الکتروفورز SDS-PAGE وزن مولکولی فراکشن هدف (F2) در حدود ۴۷ کیلو دالتون بر آورد شد و به صورت باند تک در شکل ۵ قابل مشاهده است.

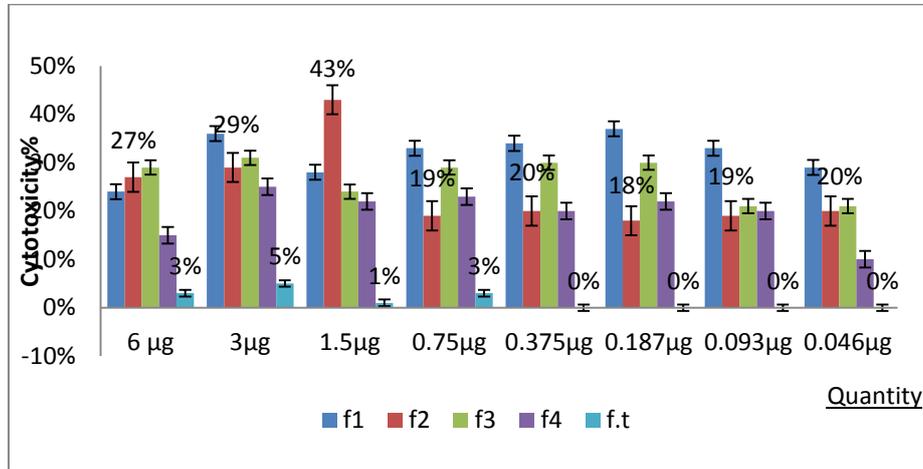
پس از جدا سازی فراکشن های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی و انجام لیوفیلیزاسیون، با استفاده از روش



شکل ۵: الکتروفورز SDS-PAGE فراکشن F2 حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد را نشان می دهد.

مقدار ۱/۵ میکروگرم بیشترین اثر را بر روی رده‌ی سلولی Jurkat E6.1 داشت. نتایج در شکل ۶ آمده است.

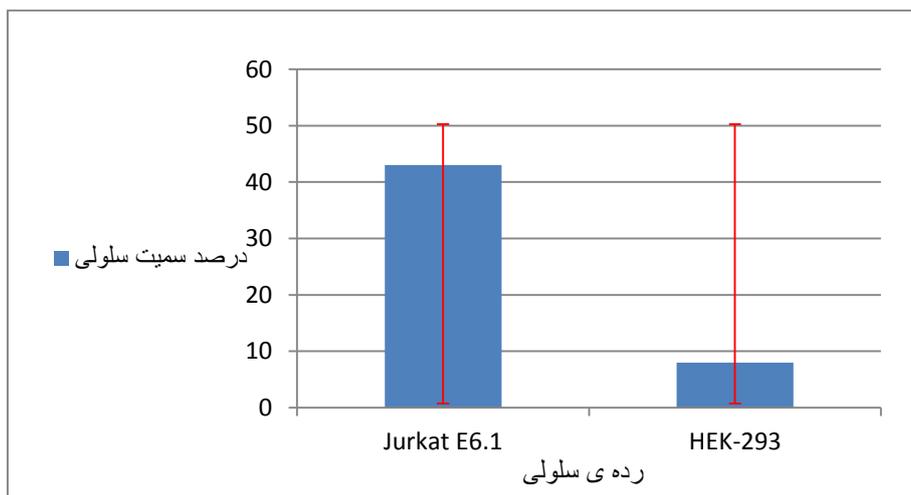
اثر سمیت سلولی فراکشن‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی نشان داد که فراکشن F2 در



شکل ۶: نتایج تست بررسی اثر سمیت سلولی (MTT) فراکشن‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی فراکشن F۳ بر روی سلول‌های سرطانی رده Jurkat E6.1. فراکشن ۲ (F2) در مقدار ۱/۵ میکروگرم بیشترین اثر را از خود نشان داد. داده‌های موجود در نمودار معادل Mean \pm SD ($P \leq 0.05$) است.

شکل ۷ آمده است. در این بررسی مشخص شد که فراکشن F2 دارای کمترین اثر سمی به میزان ۸ درصد بر روی رده‌ی سلولی شاهد بود.

بررسی اثر سمیت سلولی (توکسیسیته) فراکشن F2 به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی بر رده‌ی سلولی شاهد HEK-293 و رده‌ی سلولی Jurkat E6.1 در



شکل ۷: مقایسه درصد سمیت سلولی فراکشن F۲ در تست MTT بر رده سلول سرطانی Jurkat E6.1 و سلول شاهد HEK-293 انسانی. اطلاعات موجود در نمودار معادل Mean \pm SD ($p \leq 0.05$) است.

دارای اثر سمی بر سلول های سرطانی بودند اما مشکل این تحقیقات این بود که این فراکشن های پپتیدی یا پروتئینی دارای اثر سمی بر سلول های نرمال بدن بودند. این ویژگی زهر، تحقیقات مرتبط با سرطان را با چالش مواجه کرد و کیفیت تحقیقات در این زمینه را کاهش داد. ونوم بعضی مارها حاوی مولکول Disintegrin است که دارای ساختارهای مختلف و ویژگی های خاص هستند که ابتدا از ونوم مارهای Viperidae جدا شد و بعدها در ونوم مارهای دیگر نیز دیده شد (۵ و ۲۰). Disintegrin های موجود در زهر مارها دارای افینیتی بالایی جهت چسبیدن به اینتگرین ها می باشند. اینتگرین ها مولکول های پروتئینی هستند که به طور طبیعی در سطح سلول های متحرک بدن وجود داشته و ابزار حرکتی آنها می باشند. این مولکول ها را می توان در غشای پلاسمایی نوتروفیل، مونوسیت، سلول های اندوتلیال و سایر سلول ها یافت. تجمع اینتگرین بر روی سلول های عادی بسیار کمتر از سلول های متحرک است. در بعضی از سرطان ها بیان ژن اینتگرین ها به صورت نابه جا افزایش می یابد و لذا سلول به صورت غیرطبیعی می تواند دارای ویژگی تحرک بوده و از بستر خود جدا شده و به مناطق اطراف مهاجرت کند (۲۲ و ۲۳). وجود این مولکول ها در زهر خانواده کبری ثابت شده و لذا این تحقیق جهت جستجوی یک فراکشن ضد متاستاز با خاصیت ضد سرطانی هدف گذاری شد. مریم کاکنج و همکاران (۱۷) در دانشگاه شهید بهشتی مطالعاتی را بر روی سم گرز مار انجام دادند. در این مطالعه با استفاده از تست MTT مشخص شد که سم خالص گرز مار بر روی سلول های بند ناف ورید اندوتلیال انسانی (HUVECS) اثر کشندگی دارد. در حالی که در مطالعه ی حاضر با استفاده از تست MTT بر روی سلول نرمال (شاهد) اثر کشندگی دیده شد و بر روی سلول های سرطانی خون Jurkat E6.1 تا مقدار ۰/۰۴ میکروگرم دیده شد. همچنین در این مطالعه که بر روی سلول های

یافته های حاصل از ارزیابی اثر فراکشن F2 حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی در مقادیر مختلف ۶ تا ۰/۱۸ میکروگرم بر روی سلول نرمال HEK- ۲۹۳ و سرطانی Jurkat E6.1 در شکل ۷ بیانگر این مهم است که فراکشن F2 بر روی سلول های سرطانی Jurkat E6.1 در مقدار ۱/۵ میکروگرم، دارای اثر سایتوتوکسیسیتی قوی تر و به میزان ۴۳ درصد بود.

بحث

سرطان تقسیم نا متقارن سلول های بدن است. سلول های سرطانی از ساز و کارهای عادی تقسیم و رشد سلول ها جدا می افتند. سرطان پس از آسیب ژنتیکی به DNA گسترش می یابد. این آسیب ژنتیکی بر روی عملکرد طبیعی سلول از جمله تکثیر سلولی مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس) و ترمیم DNA تاثیر می گذارد و در نهایت منجر به تولید تومور می شود که آن قسمت را از کار می اندازد و به قسمت های دیگر نیز متاستاز می دهد (۱۴). آمارهایی که توسط NCI و انجمن سرطان آمریکا در سال ۲۰۱۵ برآورده شده است، سالانه ۲/۵ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا به سرطان لوسمی حاد می شوند که از این میزان درصد ابتلا جنس مذکر نسبت به مونث ۵۲ درصد در مقابل ۴۸ درصد می باشد. میزان شیوع سرطان ALL در آمریکا و اقیانوسیه بیشتر از مناطق آسیایی و شرق اروپا می باشد (۱۵ و ۱۹).

محققین در پی رسیدن به ترکیبات و فرمولاسیون هایی هستند که بتواند جایگزین این نوع داروهای شیمیایی و کاهش عوارض جانبی آنها شوند. یک استراتژی مهم جهت توسعه داروهای ضد سرطان، مطالعه عوامل ضد سرطان به دست آمده از منابع طبیعی است (۱۶ و ۲۱). از گذشته به طور سنتی بشر می داند که از زهر جانوران سمی از جمله مار می تواند دارو تهیه کند. پژوهشگران در چند دهه اخیر دست به تحقیقات مختلفی جهت دست یابی به فراکشن خالص ضد سرطانی زده اند. اکثر این فراکشن ها

(C.simustzabcan) را روی سلول‌های سرطانی ملانوما A-3۷۵ و ریه A-۵۴۹ مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثر سایتوتوکسیسیتی قابل ملاحظه ای مشاهده نشد. Tzabcanin در بروز اثر ضد چسبندگی نیز با شکست مواجه شده ولی توانست در ممانعت از مهاجرت سلولی موفق عمل کند.

نتایج مطالعه‌ی ما بر روی زهر مار کبری ایرانی نشان داد که فراکشن‌های به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی دارای اثرات ضد سرطانی به‌صورت اثر سمیت سلولی و کشندگی بر روی سلول‌های سرطان خون Jurkat E6.1 است، در حالی که بر سلول‌های نرمال، دارای حداقل اثرات سمیت سلولی است و با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌شود که فعالیت ضد سرطانی و القای آپوپتوزیس پروتئین نوترکیب حاصل از فراکشن هدف و همچنین انجام مطالعه در مرحله‌ی *In vivo* و اثر فراکشن فعال بر روی مدل حیوانی در ادامه‌ی فرآیند بررسی شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج نشان داده شده از سمیت ۴۳ درصدی بر روی سلول‌های سرطان Jurkat E6.1 و اثر سمیت کم (۸ درصد) فراکشن F۲ حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی بر رده‌ی سلول‌های شاهد، می‌توان بیان داشت که فراکشن به‌دست آمده دارای اثر سیتوتوکسیک و کشندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی سلول Jurkat E6.1 بوده است. بنابراین در شرایطی که بتوان داروی ضد سرطان از زهر مار کبری ایرانی به‌دست آورد با کمترین عارضه و در یک دوره درمانی مناسب می‌تواند موجب نابودی سلول‌های سرطانی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی (بخش بیوتکنولوژی) انستیتو پاستور ایران انجام شده

(HUVECS) انجام دادند تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. در حالی که در تحقیق حاضر، این تغییرات مشاهده نشد. همچنین در طی مطالعه‌ی ای که توسط کولیپارا و همکاران (۱۸) صورت گرفت و اثرات NK cells های فعال شده توسط سم را بر روی سل‌لاین‌های A549 و NCI-H 460 سرطان ریه صورت گرفت که سبب مهار قابل توجهی در رشد سلول‌های سرطانی ریه و ممانعت از اتصال به DNA و آزاد سازی سایتوکاین‌ها و گرانول‌ها که منجر به جلوگیری از پرولیفراتیو سلول‌ها و آپوپتوزیس می‌شود را نشان داد لیکن به‌دلیل عدم استفاده از سلول نرمال شاهد نمی‌توان نتیجه‌ای جامع از این تحقیقات به‌منظور دست‌یابی به اطلاعات دست‌یابی به اطلاعات تکمیلی جهت انجام مطالعات فاوماکولوژیک به‌دست آورد.

لیانگ ژانگ و لیجون وی (۲۴)، مطالعه‌ی ای بر روی مار *Agkistrodonacutus* و بررسی روند القای آپوپتوزیس در سرطان دهانه‌ی رحم انجام دادند و به نتایج قابل قبول و اثر مطلوب سم مار بر روند القای آپوپتوزیس بر سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم دست یافتند. با این حال به‌دلیل عدم استفاده از سلول نرمال شاهد، نمی‌توان نتیجه‌ای جامع از این تحقیقات به‌منظور دست‌یابی به اطلاعات تکمیلی جهت انجام مطالعات فارماکولوژیک، به‌دست آورد.

OnsZakraui و همکاران (۲۵) به بررسی اثر لبئین حاصل از ونوم مار *Marcroviperalebetina* روی سلول‌های سرطانی کولون انسانی به‌صورت *In vivo* و *In vitro* پرداختند. در این بررسی نتایج مشابهی مشاهده شد و لبئین که نوعی دیس اینتگرین می‌باشد باعث مرگ ۵۶ درصدی سلول و القای آپوپتوزیس، کاهش چسبندگی و مهاجرت سلولی در سلول‌های LS ۱۷۴ و همچنین مانع گسترش آدنو کارسینومای کولون انسانی در موش شد.

در پژوهشی دیگر آنتونی ساویولا و همکاران (۲۶) اثر Tzabcanin استخراج شده از سم مار زنگی آسیای میانه

12. Masters R. Animal cell culture cytotoxicity and viability assays. New York: Oxford University Press; 2000.

13. Shang ZJ, Li ZB, Li JR. In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma: a preliminary study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006; 35(6): 539-43.

14. Holland-Frei Cancer Medicine 8th eds. People's Medical Publishing House USA. Brown, KM, Keats JJ, Sekulic A et al; 2012.

15. Katz AJ, VM, Schooven WM et al. *Cancer Causes Control*. 2015; 26: 1627.

16. Riyasat Ali, Zeenat Mirza, Ghulam MD, Ashraf, et al. *New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy*. *Anticancer research*. 2012; 32: 2999-3006.

17. Kakanj M, Ghazi-Khansari M, Abbas Zare Mirakabadi, Bahram Daraei and Hossein Vatanpour. Cytotoxic Effect of Iranian Vipera lebetina Snake Venom on HUVEC cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015; 14 (Supplement): 109-114.

18. Cui-Cui, Yang H, Zhang L, Zhang, Bo Chen Q, Wang Y. biotoxins for Cancer Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(12): 4753-8.

19. *International Journal of Cancer*. Ferlay, J; Shin HR, Bray F et al. (December 2010)

20. Leonardo A. Calderon, Juliana C. Sobrinho, Kayena D. Zaqueo, Andrea A. de Moura, Amy N. Grabner, Maurício V. Mazzi, Silvana Marcussi, et al. Heloisa S. Selistre-de-Araujo,* Carmen L. S. Pontes, Cyntia F. Montenegro, and Ana Carolina B. M. Martin, Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins (Basel)*. 2010; 2(11): 2606–2621.

21. Mirzaei R, Shahbazzadeh D, Pooshang Bagheri K, [Anti-cancer Activity of Fractions Derived from Venom of Iranian Cobra Snake (*Naja naja oxiana*) on Breast Cancer Cell Line 4T1], *Iranian Journal of Infectious Diseases*. 2016; 74: 7-19 (Text in Persian).

22. Chessum N, Jones K, Pasqua E, Tucker M. *Recent Advances in Cancer Therapeutics, Progress in Medicinal Chemistry*. 2015; 54: 1–63.

23. Thangam R, Gunasekaran P, Kaveri K, Sridevi G, et al. A novel disintegrin protein from *Naja naja* venom induces cytotoxicity and apoptosis in human cancer cell lines in vitro. *Process Biochemistry*. 2012; 47(8): 1243-9.

است. بدین وسیله از راهنمایی و حمایت جناب آقای دکتر کامران پوشنگ باقری و سرکار خانم رویا میرزایی دانشجوی دکتری سم شناسی قدردانی می شود.

منابع

1. Ajit S. Narang , Divyakant S. Desai, *Anticancer Drug Development. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. 2009; 45: 49-92.

2. Murray & Nadel's *Textbook of Respiratory Medicine*. 5th eds. Alberg AJ, Samet JM; 2010; Chapter 46." Saunders Elsevier.

3. Heloisa S. Selistre-de-Araujo, Carmen L. S. Pontes, Cyntia F. Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins (Basel)*. 2010; 2(11): 2606–2621.

4. Kumar Vyas V, Brahmabhatt K, Bhatt H, Parmar U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(2): 156–162.

5. Lucena S, Castro R, Lundin C, Hofstetter A, et.al. Contortrostatin, a snake venom disintegrin with anti-angiogenic and anti-tumor activity. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005; 34(4-5): 169-76.

6. Abubakar M, Sule M, Pateh U, Abdurahman E, et al. In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. *Journal of ethnopharmacology*. 2000; 69(3): 25.

7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J Biol chem*. 1951; 193(1): 265-75

8. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.

9. Freidberg R. An investigation into the antimicrobial and anticancer activities of *Geranium incanum*, *Artemisia afra* and *Artemisia absinthium*: Nelson Mandela Metropolitan University; 2009. 13: 1-245.

10. Ian A, Cree MB, Ch B. editor. *cancer cell culture*. New York :Springer ; 2011.

11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

24. Zhang L , Wei LJ, Fox JW, Naito M, Tsuruo T., *Molecular cloning and functional analysis of*

- apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*. 2000; 39(12):3197-205
25. Zakraoui O, Marcinkiewicz C, Aloui Z, Othman H, Grépin R, Haoues M, et al. Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. *Molecular carcinogenesis*. 2016.
26. Saviola AJ, Burns PD, Mukherjee AK, Mackessy SP. The disintegrin tzabcanin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells. *International journal of biological macromolecules*. 2016; 457: 64-88.

Evaluation of toxicity and anticancer activity of isolated fraction from the venom of Iranian cobra snake on acute lymphoblastic leukemia cells (Jurkat E6.1)

Barati M, M.Sc*, Davoudi Dahaghani F, Ph.D

-Department of Biology, Faculty of Basic Science, Biochemistry, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: m65660@yahoo.com

Received: 2 Aug. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

Abstract

Aim: Cancer is a life threatening disease determined by uncontrolled differentiation and proliferation of cells. Chemotherapy is the conventional method in treatment of cancer, but the tumor often will be resistant to chemotherapy regimen leading to crucial side effects. Many bio-toxins are biologically active compounds with anti-tumor activity. This study was aimed to find an anti-cancer agent from the venom of Iranian cobra snake.

Material and methods: The process of collection, lyophilisation of Iranian cobra (*Naja naja oxiana*) venom. Protein concentration of Iranian cobra venom was determined by BCA assay. Fast protein liquid chromatography (FPLC), SDS-PAGE, Anion exchange chromatography were used for purification of Iranian cobra venom. Standard cell biology methods were employed to characterize Iranian cobra venom abilities (in vitro) to inhibit Platelet aggregation, adhesion, migration and invasion of tumor cells. Its anti-cancer activity in (Jurkat E6.1) (in vitro) was tested by MTT assay.

Results: Peak 3 of FPLC was active on cell lines and selected for anion exchange chromatography. Four anionic and one cationic fractions collected for anticancer activity. Peak 2 of anion exchange chromatography had the most toxic activity as $43\% \pm 1$ at 1.5 micrograms. This fraction showed about $8\% \pm 1$ toxicity on fibroblast cells. (P -value ≤ 0.05)

Conclusion: Natural anti-cancer compounds derived from the *Naja naja oxiana* venom, can fight against cancer. It is the first report of an anticancer fraction from Iranian cobra with toxicity on Jurkat E6.1 cell line with less toxicity to normal cells.

Keywords: Iranian cobra snake venom, Leukemia, MTT assay