Archive of SID

مقاله تحقیقی

بررسی اثرات سمیت سلولی و ضد باکتریایی سم خام افعی زنجانی در شرایط آزمایشگاهی

فرشید غلامی[1]، جمیل زرگان[2*]، حمیدرضا گودرزی[3]، اشکان حاجی نورمحمدی[4]، حسین ثباتی[5]

[1] کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران،ایران.

[2] دکتری سم شناسی، دانشیار مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران،ایران.

[3] دکتری نانوبیوتکنولوژی، استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، کرج، ایران.

[4] کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران،ایران

[5] دکتری انگل شناسی، مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، انستیتو سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز علم و فناوری زیست شناسی.

نشانی الکترونیک:

jzargan@yahoo.com

چکیده

زمینه: به دلیل مقاوم شدن برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها به طور چشم‌گیری مشکل شده است. این امر توجه محققان را به استفاده از داروهای ضد باکتری استخراج یافته از منابع طبیعی به ویژه جانوران سمی همانند مارها جلب کرده است. در این مطالعه، برای اولین بار اثرات ضد باکتریایی و سمیت سلولی سم خام افعی زنجانی (*Vipera albicornuta*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف سم خام افعی زنجانی بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولی و باسیلوس سوبتیلس با استفاده از روش‌های MTT assay، MIC assay، انتشار در دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی سمیت سلولی سم خام سلول‌های HepG2 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم خام تیمار شدند و با استفاده از روش‌های MTT reduction و Neutral red uptake درصد بقا و با روش Comet Assay نوع مرگ سلولی تعیین شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، سم خام بر روی باکتری اشریشیا کولی فاقد اثر ضد باکتریایی بوده اما بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس دارای اثر ضد باکتریایی معنی‌دار می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد سم خام افعی زنجانی در دوزهای ۵۰ تا۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق القای آپوپتوز و نکروز سبب از بین رفتن سلول‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته های این مطالعه نشان داده شد که سم خام افعی زنجانی دارای اثرات ضد باکتری و سایتوتوکسیک است و می‌تواند جهت مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ضد باکتری، سمیت سلولی، سم مار، افعی زنجانی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پس از شش دهه استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، پاتوژن‌های باکتریایی با منشأ انسانی و حیوانی به طور فزاینده‌ای در برابر بسیاری از عوامل ضد میکروبی مقاوم شده‌اند(۱). از این رو تحقیق برای یافتن مولکول‌های جدید با خواص ضد باکتریایی به ویژه از منابع زیستی طبیعی و از زهر جانوران سمی همانند مارها از اقبال زیادی در مراکز داروسازی برخوردار شده تا با معرفی آنتی‌بیوتیک-های جدید به جوامع انسانی، درمان بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروهای رایج تسهیل گردد (۳-۱).

زهر مارها کمپلکس پیچیده‌ای از پروتئین‌ها و پپتیدها می‌باشد که دارای اثرات بیولوژیکی سودمند متعددی بوده و از آن‌ها می‌توان در درمان برخی از بیماری‌های انسانی استفاده کرد (۴و۳). از میان تمام این اثرات، فعالیت ضد میکروبی سم مارها مورد توجه بسیاری از مراکز تحقیقاتی جهان قرار گرفته است (۴) .

با وجود آلودگی‌های شدید دهان و دندان نیش مارها[۱]، گزش مارهای سمی به ندرت با ایجاد عفونت‌های باکتریایی در محل گزش در مصدومین مارگزیده و یا طعمه مورد استفاده همراه است. این مشاهدات به این فرضیه منجر شد که سم مار دارای مواد ضد باکتری بوده که پس از خوردن طعمه‌ی آلوده از مار محافظت می-کنند.(۵). در سال ۱۹۴۸ برای اولین بار گزارش شد که سم مار دارای اثرات ضد باکتریایی است(۶). بررسی‌ها نشان داده که سم مارها حاوی برخی از ترکیبات ضد باکتری از جمله اِل- آمینواسید اکسیدازها (۸و۷و۳)، فسفولیپازهای A2 (۱۰و۹)، لکتین (۱۱) و پپتیدها (۱۴-۱۲) می‌باشد.

افعی زنجانی (*Vipera albicornuta*) یکی از مارهای سمی ایران و جزو خانواده ویپریده و جنس ویپرا می‌باشد و تنها در مناطق شمالی ایران و استان‌های گیلان، زنجان، آذربایجان شرقی و قزوین انتشار دارد (۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد باکتریایی و سمیت سلولی سم خام افعی زنجانی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش کار

در این پژوهش تجربی، ابتدا اثرات ضد باکتریایی سم خام افعی زنجانی و سپس اثرات سمیت سلولی آن مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه سم: به منظور تهیه سم مار، با رعایت نکات ایمنی ابتدا دندان نیش مار را داخل شیشه مخصوص جمع‌آوری سم قرار داده، سپس با فشاری مختصر به غده سمی، سم به داخل شیشه تزریق شد. محلول سمی، لیوفیلیز شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای انجام تست‌های ضد باکتری، مقداری از سم لیوفیلیز شده در ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلراید ۵۰ میلی‌مولار (pH =۷/۴) و برای انجام تست‌های سمیت سلولی مقداری از سم در ۱۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شد. میزان پروتئین موجود در هر دو محلول سمی با روش برادفورد تعیین شد (۱۵).

جهت از بین بردن آلودگی‌های احتمالی در محلول سمی مورد نیاز تست‌های سلولی، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک-آنتی‌میکوتیک (Invitrogen, USA) به محلول سمی اضافه و پس از یک شب نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

باکتری‌ها و رده سلولی مورد مطالعه:

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی غیر بیماری‌زا باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 6633) و اشریشیا کولی (ATCC 25922) و باکتری گرم مثبت بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) از مرکز منطقه‌ای قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC)[۲] خریداری شد.

رده‌ی سلولی سرطان کبد (HepG2) از بانک سلولی موسسه انستیتو پاستور ایران (کد C158) خریداری گردید.

مطالعه اثرات ضد باکتریایی

جهت کشت باکتری‌ها و انجام آزمایش‌های ضد باکتریایی از محیط‌های کشت مولر هینتون (MH)[۳] مایع و جامد (حاوی آگار) شرکت Quelab (کانادا) استفاده شد.

از تتراسایکلین (Sigma Co., USA) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان آنتی‌بیوتیک استاندارد جهت مقایسه‌ی خواص ضد باکتریایی استفاده گردید.

تست MTT assay: این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که طی آن محلول زرد رنگ MTT تحت تأثیر این آنزیم شکسته شده و به کریستال‌های نامحلول بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. این کریستال‌ها با استفاده از حلال‌های آلی مانند DMSO به صورت محلول در می‌آیند (۱۶).

باکتری‌ها در محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند و پس از ۶-۵ ساعت هنگامی که به جذبی معادل جذب نیم مک فارلند (در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای جذبی معادل ۰/۱) رسیدند(۱۷)، مقدار ۵ میکرولیتر از آن در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سم

۱ Fang

۲ Persian Type Culture Collection

۳ Mueller-Hinton

www.SID.ir

Archive of SID

خام با غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده و با استفاده از محیط کشت مولر هینتون حجم نهایی چاهک‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در این آزمایش از تتراسایکلین (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 ۲۴–۱۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای باسیلوس سوبتیلیس شیکر انکوباتور) گرما گذاری گردید. سپس، ۵ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و پلیت در شرایط تاریکی تا زمان تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان (حدود ۱ ساعت)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در شرایط تاریکی و دمای۳۷ درجه، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Biotek 110, USA) اندازه‌گیری شد. آزمایش فوق ۲ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده ماندن باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد حیاتی باکتری} = \frac{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی تیمار شده} - \text{OD بلانک}}{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی} - \text{OD بلانک}} \times 100$$

تستMIC assay : آزمایش MIC با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد و اثر غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم خام بر روی رشد باکتری ها بررسی شد(۱۸). مراحل انجام این تست مشابه MTT assay بوده ولی پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف سم خام و انکوباسیون به مدت ۲۴–۱۸ ساعت، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز ۲ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. درصد مهاری باکتری ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار باکتری} = (1 - \frac{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی تیمار شده} - \text{OD بلانک}}{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی} - \text{OD بلانک}}) \times 100$$

تست انتشار در دیسک

این آزمایش مطابق روش Bauer و همکاران انجام گرفت(۱۹). ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (غلظت نیم مک فارلند) روی سطح پلیت ریخته و با استفاده از لوپ شیشه ای سر کج استریل، به روش کشت چمنی در تمام سطح پلیت به طور یکنواخت پخش شد. پس از کشت باکتری ها مدت ۱۰–۵ دقیقه صبر کرده تا سوسپانسیون حاوی باکتری کاملاً جذب محیط کشت شود، سپس با استفاده از پنس دیسک های بلانک استریل (تهیه شده از شرکت پادتن طب) روی سطح محیط کشت گذاشته و ۴۰ میکرولیتر از سم خام با غلظت های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی دیسک ها ریخته شد. در این آزمایش جهت مقایسه اثر سم، از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در دیسک به عنوان کنترل مثبت و از تریس– هیدروکلراید ۵۰ میلی مولار به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴–۱۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند و پس از طی دوره گرما گذاری، در صورت وجود هاله مهاری قطر آن اندازه‌گیری گردید. این آزمایش برای هر باکتری ۳ بار تکرار شد.

تست انتشار در چاهک

این روش مشابه روش انتشار در دیسک می‌باشد با این تفاوت که در این تست محلول سمی به جای قرار گرفتن روی دیسک به داخل چاهک ایجاد شده در محیط کشت ریخته می‌شود (۲۰).

کشت چمنی مطابق روش قبل انجام گرفت و با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل، چاهک‌ها در محیط کشت ایجاد شده و به آرامی قطعات بریده شده خارج شدند. برای جلوگیری از نشت سوسپانسیون سم به کف پلیت مقدار ۲۰ میکرولیتر از محیط آگار مایع در کف همه ی چاهک‌ها ریخته شد. در این مرحله ۴۰ میکرولیتر از سم خام ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در چاهک های تعیین‌شده ریخته و به مدت ۲۴–۱۸ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از زمان ذکر شده در صورت وجود هاله مهاری قطر آن اندازه‌گیری گردید. این آزمایش برای هر باکتری ۳ بار تکرار شد.

بررسی سمیت سلولی سم خام

سلول‌های HepG2 در محیط کشت DMEM-F12 (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد سرم آلبومین گاوی (Fetal Bovin Serum) و ۱ درصد پنی سیلین– استرپتومایسین-(Sigma-Aldrich Co.) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 کشت و پاساژ داده شدند. پس از چهار بار پاساژ دادن و تراکم در حدود ۸۰٪ سلول‌ها در داخل بستر فلاسک، سلول ها با استفاده از Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich Co.) از کف فلاسک جدا و پس از شمارش با استفاده از لام نئوبار، مورد استفاده قرار گرفتند .

آزمون MTT reduction جهت مطالعه سمیت سلولی سم خام: این آزمون بر اساس روش زرگان و همکاران انجام گردید (۲۱).

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد ۳×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و حجم چاهک‌ها با محیط کشت (فاقد سرم) به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و پلیت به مدت یک شب (Overnight) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. سپس محیط کشت قدیمی خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (فاقد سرم) حاوی غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از سم خام به چاهک‌ها اضافه گشت. محیط کشت فاقد سلول به عنوان بلانک و محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور تحت شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۵ میکرولیتر از محلولMTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده و پلیت به مدت یک تا دو ساعت در شرایط تاریکی به منظور تشکیل کریستال های بنفش رنگ (فورمازان) انکوبه گردید. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و پس از دو مرتبه شستشوی چاهک‌ها با محلولPBS ، ۱۰۰میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۴-۲ ساعت در دمای اتاق و تحت شرایط تاریکی انکوبه شد و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Biotek 110, USA) اندازه گیری گردید.

تمام مراحل آزمایش ۳ مرتبه تکرار و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. سپس از داده ها میانگین گرفته و مقدار درصد زنده ماندن طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد حیاتی سلول} = \frac{\text{OD بلانک} - \text{OD تست}}{\text{OD بلانک} - \text{OD کنترل منفی}} \times 100$$

اندازه‌گیری سیتوتوکسیسیته سم خام با روش رنگ سنجی قرمز خنثی : تست رنگ سنجی قرمز خنثی بر مبنای جذب رنگ توسط لیزوزوم های سلول استوار است که پس از لیز شدن غشای سیتوپلاسمی سلول، رنگ جذب شده خارج شده و میزان رنگ جذب شده اندازه‌گیری می‌شود(۲۲). مراحل انجام این تست مشابه تست MTT assay بوده ولی پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف سم خام به چاهک‌ها و انکوباسیون برای ۲۴ ساعت، به جای محلول MTT، ۵ میکرولیتر از محلول قرمز خنثی (با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر) به هر چاهک افزوده شد. سپس پلیت تا زمان تشکیل کریستال های قرمز رنگ (حدود ۴-۲ ساعت)، درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. پس از این مدت، محیط کشت موجود در چاهک‌ها تخلیه شد و چاهک‌ها دو مرتبه با PBS شستشو داده شدند. به منظور فیکس شدن سلول ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فیکس کننده (کلرید کلسیم و فرمالدئید) به هر چاهک افزوده شد و پس از مدت ۱ دقیقه تخلیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده (اسید استیک و اتانول) به چاهک‌ها اضافه و پلیت در شرایط تاریکی بر روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Biotek 110, USA) اندازه‌گیری گردید. در این تست از محیط کشت بدون سلول به عنوان بلانک و از محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده گردید. این تست ۳ مرتبه تکرار و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. درصد مهار سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار سلولی} = (1 - \frac{\text{OD بلانک} - \text{OD تست}}{\text{OD بلانک} - \text{OD کنترل منفی}}) \times 100$$

بررسی آسیب های DNA سلولی سم خام با روش کامت قلیایی (Alkaline Comet Assay): در این مطالعه جهت تعیین نوع مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) ناشی از اثرات سایتوتوکسیک سم خام از روش کامت قلیایی استفاده شد(۲۳). این روش در مقایسه با سایر روش‌های سنجش آسیب DNA در سلول یوکاریوت، یک روش بسیار حساس، آسان، کم هزینه و سریع جهت اندازه گیری فرگمنته شدن DNA در سلول‌های منفرد می باشد (۲۴).

ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی ۱۲×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته شد. پلیت به مدت یک شب (Overnight) درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و حدود ۸۰ درصد رطوبت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد و ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید (بدون سرم) حاوی غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از سم خام به آن‌ها افزوده شد. پلیت برای ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد گازکربنیک انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون، با استفاده از تریپسین و PBS عمل جداسازی سلول‌ها از کف چاهک انجام شد. محتوای چاهک‌ها به میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر PBS به میکروتیوب ها اضافه و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی تخلیه گردید. به میکروتیوب ها ۲۰۰ میکرولیتر PBS افزوده شد و با استفاده از سمپلر و سرنگ انسولین سلول‌ها از یکدیگر جدا شده و به صورت منفرد در آمدند. سپس پوشش نازکی از محلول یک درصد آگاروز با نقطه ذوب نرمال (NMA٪۱) بر روی اسلایدها (لام ها) قرار داده شد و سوسپانسیون سلولی با محلول یک درصد آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMA 1%) به نسبت یک به دو مخلوط و روی اسلایدهای تهیه شده با NMA1% ریخته شد. جهت ایجاد یک لایه سلول

www.SID.ir

Archive of SID

روی هر اسلاید یک لامل قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۱۰ دقیقه لامل آن‌ها برداشته شد و به منظور لیز شدن غشا و همچنین تخریب هسته سلول، اسلایدها در بافر لیز کننده سرد و تازه به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خارج کردن بافر لیز کننده، اسلایدها ۲۰ دقیقه و در ۲ نوبت با بافر الکتروفورز شستشو داده شدند. به منظور باز شدن DNA، اسلایدها به مدت ۴۰ دقیقه درون بافر الکتروفورز سرد و تازه درون یخچال گذاشته شدند و پس از آن الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۲۵ ولت و جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام شد. الکتروفورز در شرایط دمایی زیر ۲۰ درجه و محیط تاریک صورت گرفت. جهت خنثی‌سازی pH قلیایی، اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در بافر خنثی‌کننده (Neutralization buffer) قرار داده شدند. جهت رنگ‌آمیزی سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه با آب دو بار تقطیر شستشو داده و با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت بررسی شدند. از هر نمونه حداقل ۱۰۰ تصویر تهیه شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

آنالیز آماری

تمامی داده‌های به دست آمده به صورت Mean±SD بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی ها سطح معنی دار آزمون ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام گرفت.

یافته ها

نتایج مطالعه اثرات ضد باکتریایی سم خام با استفاده از MTT assay:

بررسی اثرات ضد باکتریایی سم خام در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری اشریشیا کولی مشخص نمود که هیچ‌کدام از غلظت های سم خام بر باکتری اثر مهاری نداشتند (نمودار ۱).

درصد زنده ماندن سم خام در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب برابر با ۸۵/۶۳، ۸۱/۲۲، ۴۹/۷۲، ۳۷/۰۹، ۳۶/۳، ۳۷/۳ و ۱/۹۷ می‌باشد که تمامی این درصدها بجز در غلظت‌های ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل منفی معنی دار بود. لازم به ذکر است درصد زنده ماندن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل مثبت تفاوت معنی داری نداشت. علاوه بر این در دوز ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهاری سم خام از کنترل مثبت (تتراسایکلین با دوز ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بیشتر بود (نمودار ۲).

میزان درصد زنده ماندن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم خام به ترتیب ۵۷/۹۴، ۵۱/۸۷، ۴۶/۲۶، ۳۹/۷۲، ۲۱/۴۹، ۲۵/۷۰ و ۴۳/۰۷ بوده است. سم خام در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با کنترل منفی رشد مهاری معنی دار ایجاد نمود. درصد زنده ماندن غلظت های مختلف سم خام در مقایسه با کنترل مثبت (تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به صورت معنی‌داری تفاوت داشت (نمودار ۳).

نتایج اثرات ضد باکتریایی سم خام با روش MIC در میکروپلیت:

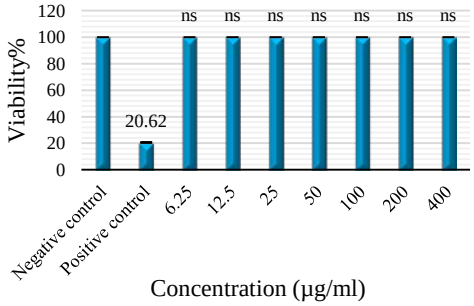
مطالعه اثرات ضد باکتریایی سم خام بر روی سه باکتری اشریشیا کولی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس با روش MIC در میکروپلیت نشان داد هیچ‌کدام از غلظت های سم خام بر باکتری اشریشیا کولی اثر مهاری ندارد (نمودار ۴). در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس سم خام در تمامی غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ دارای اثر مهاری است اما آنالیز آماری مشخص کرد که درصد مهار غلظت های بیشتر از ۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سم خام در مقایسه با کنترل منفی که حاوی محیط کشت و باکتری بود، معنی دار می‌باشد و درصد مهار غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل مثبت تفاوت معنی دار نشان نداد (نمودار ۵).

نتایج غلظت های مختلف سم خام در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که در غلظت های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهاری داشته و این درصد مهار نسبت به کنترل منفی معنی دار اما نسبت به هم معنی دار نبود (نمودار شماره ۶). همچنین این اثر مهاری در تمامی غلظت های سم در مقایسه با کنترل مثبت معنی دار مشاهده شد.

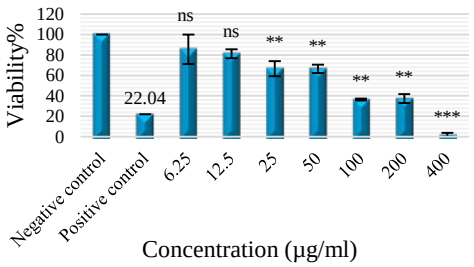
نتایج تست های انتشار در دیسک و چاهک: در این مطالعه اثرات غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم خام بر رشد باکتری‌های اشریشیا کولی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های انتشار در دیسک و چاهک در شرایط In-vitro مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سم خام فاقد اثر مهاری بر رشد باکتری اشریشیا کولی بوده (شکل ۱) درحالی‌که غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثرات مهاری بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس می باشد (شکل ۲). همچنین مشخص شد سم خام در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم میلی‌لیتر اثرات مهاری بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد (شکل ۳).

www.SID.ir

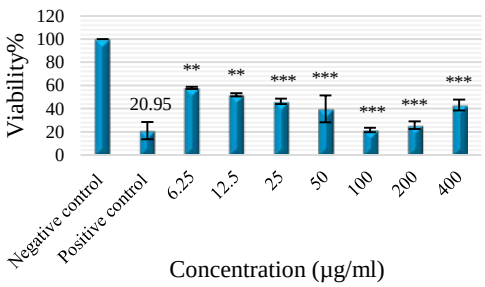
Archive of SID



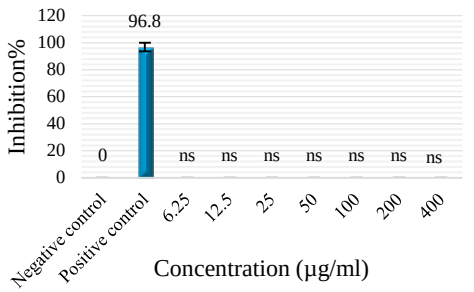
نمودار ۱: اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری *اشریشیا کولی* با استفاده از تست MTT. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: P> ۰/۰۵).



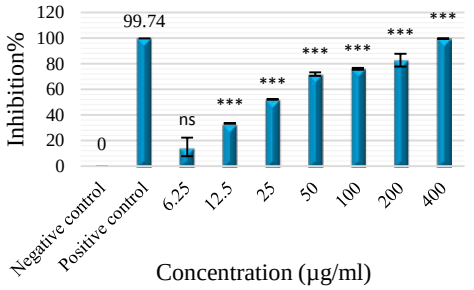
نمودار ۲: اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از تست MTT. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: P> ۰/۰۵)، (**: P< ۰/۰۱) و (***: P< ۰/۰۰۱).



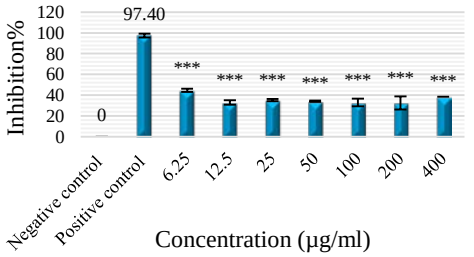
نمودار۳: اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست MTT. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: P> ۰/۰۵)، (**: P< ۰/۰۵)، (**: P< ۰/۰۱) و (***: P< ۰/۰۰۱).



نمودار۴: اثر مهاری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری اشریشیا کولی با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: P> ۰/۰۵).



نمودار۵: اثر مهاری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: P> ۰/۰۵) و (***: P< ۰/۰۰۱).



نمودار ۶: اثر مهاری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (***: P< ۰/۰۰۱).

در این بررسی سمیت سلولی سم خام با روش‌های MTT assay، Neutral red uptake assay و Alkaline Comet assay بر روی سلول HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در زیر آمده است.

نتایج بررسی اثر سمیت سم خام بر رشد سلول HepG2 به روش MTT reduction: درصد زنده ماندن سلول‌های HepG2 در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم خام، به ترتیب ۳۱/۶۴، ۲۳/۶۰، ۲۲/۷۹ و ۱۵/۵۶ بدست آمد. اثر مهاری سم خام در غلظت‌های ۴۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل (حاوی سلول و محیط کشت) معنی‌دار اما نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبود (نمودار ۷).

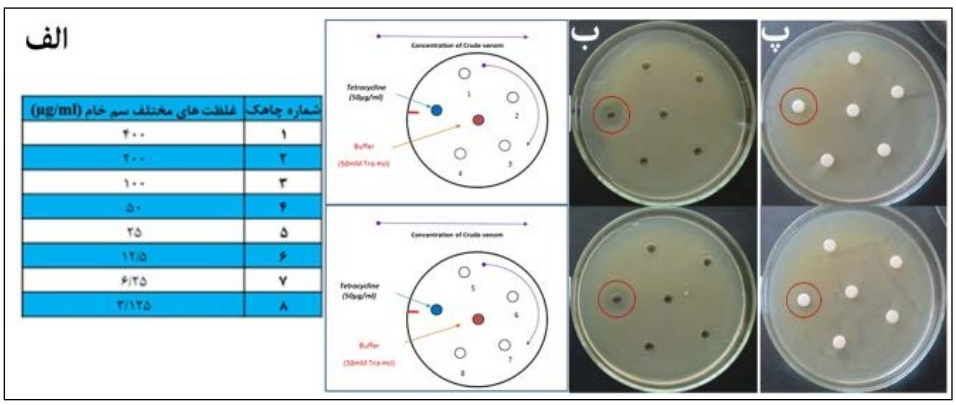
نتایج اثرات مهاری سم خام بر روی HepG2 با assay Neutral red uptake: نتایج آزمایش Neutral red uptake assay سم خام بر روی سلول‌های HepG2 در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد درصد مهاری سلول‌ها در غلظت‌های فوق به ترتیب برابر با ۸۲/۹۵، ۷۰/۴۵، ۸۵/۲۳ و ۹۳/۷۵ درصد می‌باشد. درصد مهاری در این غلظت‌ها نسبت به کنترل که حاوی سلول و محیط کشت بود، در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار اما نسبت به هم معنی‌دار نبود بجز غلظت ۱۰۰

www.SID.ir

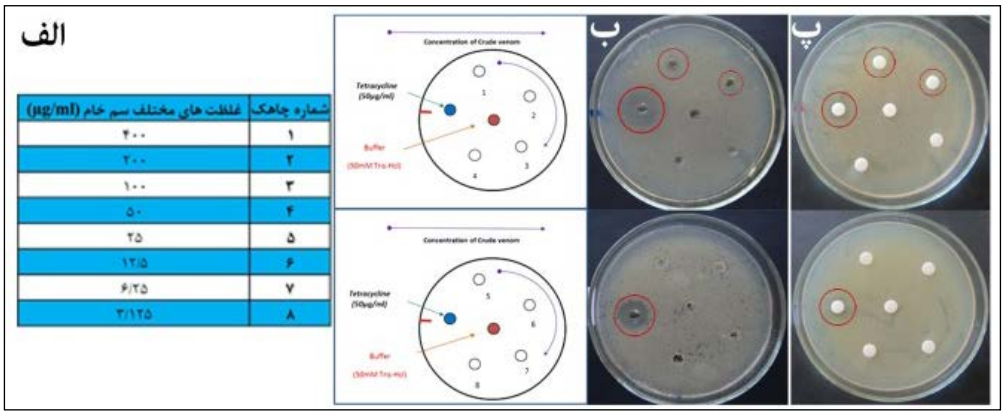
Archive of SID

میکروگرم در میلی‌لیتر که در مقایسه با غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌دار تفاوت داشت (نمودار ۸).

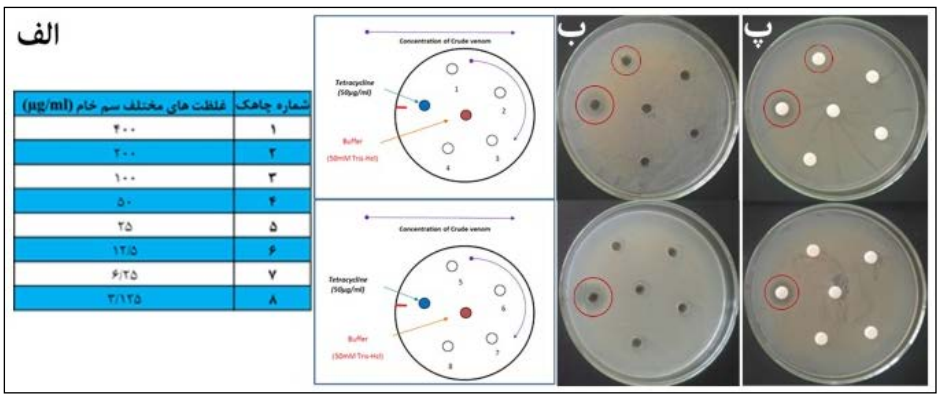
نتایج تست کامت قلیایی (Alkaline Comet assay) برای بررسی اثر سمیت سم خام بر رشد سلول HepG2: نتایج نشان داد که میزان القاء آپوپتوز سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۶۲/۷، ۶۱/۸۱، ۶۵/۸۷ و ۶۱/۰۵ بوده است. نتایج مطالعات مورفولوژیکی نشان داد که سم خام علاوه بر آپوپتوز، نکروز را نیز القاء نموده که درصد این اثر در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۲۷/۰۷، ۳۰/۱۷، ۲۶/۶۹ و ۳۰/۳۲ بوده است. همچنین نتایج نشان داد سم خام در غلظت‌های فوق آپوپتوز و نکروز را در سلول به صورت معنی‌دار القاء نموده و در این غلظت‌ها میزان آپوپتوز و نکروز تقریباً ثابت بوده است (نمودار ۹) (شکل ۴ و ۵).



شکل ۱: بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام با روش‌های انتشار در دیسک و چاهک بر رشد باکتری اشریشیا کولی.
الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده،ب) تست انتشار در چاهک، پ) تست انتشار در دیسک



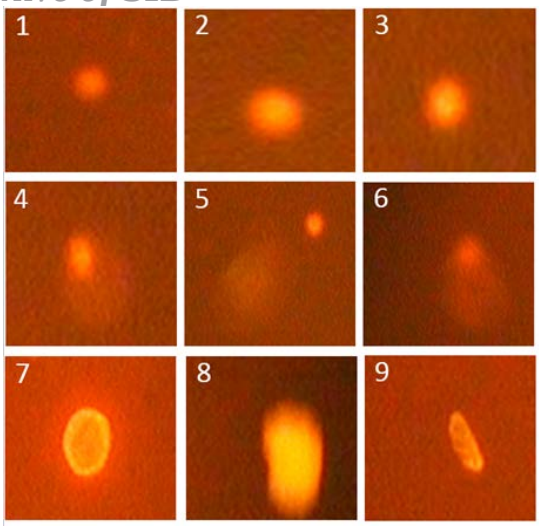
شکل ۲: بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام با روش‌های انتشار در دیسک و چاهک بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس.
الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده، ب) تست انتشار در چاهک، پ) تست انتشار در دیسک



شکل ۳: بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام با روش‌های انتشار در دیسک و چاهک بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.
الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده، ب) تست انتشار در چاهک، پ) تست انتشار در دیسک

www.SID.ir

Archive of SID

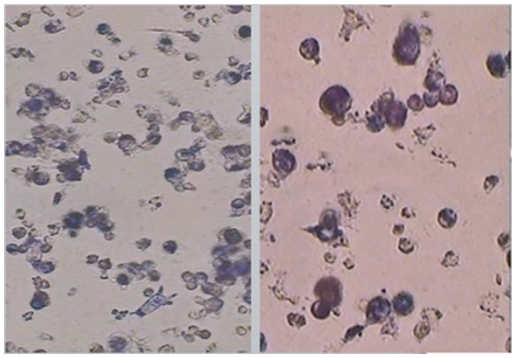


شکل ۵: مطالعه تغییرات مورفولوژیکی هسته سلولی القاء شده توسط سم خام به وسیله آزمایش کامت قلیایی.
۱-۳: DNA سلول سالم (Intact cell)
۴-۶: DNA سلول آپوپتوز شده
۷-۹: DNA سلول نکروز شده

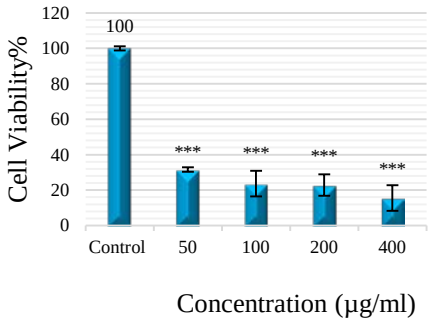
بحث

به دلیل مقاوم شدن برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها به طور چشم‌گیری مشکل شده است. این امر محققین را به سمت جداسازی و شناسایی مواد ضد میکروبی از سموم طبیعی و معرفی آنتی‌بیوتیک‌های جدید رهنمون کرده است. بررسی‌ها نشان داده است که سم مارها دارای اثرات بیولوژیکی مفید متعددی بوده که از آن‌ها می‌توان در درمان برخی از بیماری‌های انسانی استفاده کرد. مطالعات نشان می‌دهد که سم مارهای مونتی‌ویپرا زانتینا[۴]، سودکیس اوسترالیس[۵]، ناجا نیگریکولیس[۶]، ناجا ناجا[۷]، بتروپس جاراراکاسو[۸] و بتروپس موجنی[۹] علیه سویه‌های مختلف باکتری مؤثر بوده و اثر مهاری بر رشد آن‌ها القاء می‌نمایند.(۲۵و۱۸و۱۷) .
نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام افعی زنجانی با روش‌های MTT assay و MIC assay در مطالعه‌ی اخیر نشان داد، سم بر روی باکتری نماینده گرم منفی (اشریشیا کولی) فاقد اثر مهاری بوده، درحالی‌که در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس سم به ترتیب در غلظت‌های ۴۰۰-۲۵ و ۴۰۰-۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری به صورت معنی‌دار جلوگیری نمود. قابل‌ذکر است که اثر مهاری سم خام بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

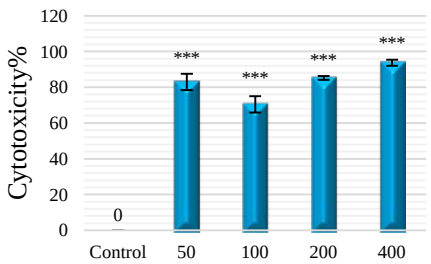
۴ *Montivipera xanthina*
۵ *Pseudechis australis*
۶ *Naja nigricollis*
۷ *Naja naja*
۸ *Bothrops jararacussu*
۹ *Bothrops moojeni*



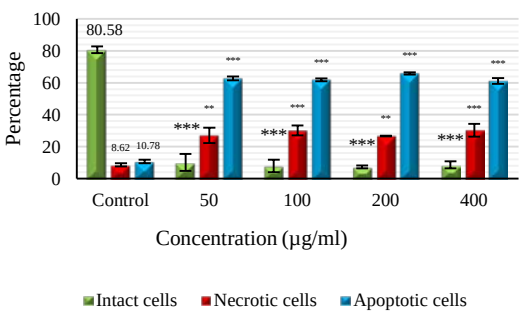
شکل۴: کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در سلول‌های سالم HepG2 بعد از اضافه کردن MTT.



نمودار۷: بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف سم خام با روش MTT reduction. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند. Error bar بیانگر Mean±SD است (***: P< ۰/۰۰۱).



نمودار ۸: میانگین درصد مهاری غلظت‌های مختلف سم خام با روش Neutral red uptake assay. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند. Error bar بیانگر Mean±SD است (***: P< ۰/۰۰۱).



نمودار۹: میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده توسط سم خام در سلول HepG2 با استفاده از تست Comet assay. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند. Error bar بیانگر Mean±SD است (**: P< ۰/۰۱) و (***: P< ۰/۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد (تتراسایکلین با دوز ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌دار نداشت. همچنین نتایج نشان داد که اثر مهاری سم خام بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس به طور وابسته به دوز بوده است.

دلیل تفاوت جزئی در نتایج حاصل از MTT assay و MIC assay ناشی از تفاوت محاسبه اثر مهاری سم در دو روش می‌باشد. در روش MIC کدورت ناشی از حضور باکتری‌ها که شامل باکتری‌های مرده و زنده است در طول موج ۶۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود درحالی‌که در روش MTT جذب نوری ذرات فورمازان تشکیل‌شده در سیتوپلاسم باکتری‌ها پس از حل شدن در DMSO در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. به نظر می‌رسد نتایج MTT از نتایج MIC دقیق تر بوده و به همین علت در آزمایشگاه‌های معتبر این روش به عنوان یک روش استاندارد جهت مطالعات ضد باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نتایج مطالعه اثرات ضد باکتریایی سم خام با استفاده از دو روش Disk diffusion assay و Well diffusion test در این مطالعه نشان داد که سم مار بر باکتری گرم منفی اشریشیا کولی فاقد اثر مهاری اما در مورد دو باکتری گرم مثبت فوق‌الذکر اثر ضد باکتریایی دارد. نتایج بدست آمده نشان داد که این دو روش به صورت کیفی اثرات MTT و MIC را تأیید، اما از لحاظ کمی نتایج تکرارپذیر ایجاد نمی‌کنند.

به نظر می‌رسد از جمله دلایل این موضوع در مورد Well diffusion test رسوب شدن محتویات ماده سمی در ته چاهک و عدم امکان آن برای نفوذ در محیط کشت و همچنین فیلتری عمل کردن دیواره چاهک برای جلوگیری از نفوذ ذرات درشت موجود در سم به داخل محیط کشت جامد ارتباط دارد. به نظر می‌رسد در مورد Disk diffusion assay جذب سریع آب موجود در سطح فوقانی محیط کشت و عدم جذب کامل سوسپانسیون سمی که امکان انتشار ناهمگن در محیط کشت را فراهم می‌کرد و همچنین جذب ماده سمی به دیسک که سبب عمل فیلتری شدن سم و عدم امکان عبور ذرات درشت آن را فراهم می‌نمود از عوامل محدودکننده آن محسوب می‌گردد.

این نتایج با مطالعات گذشته صورت گرفته در مورد سم خام مارها که تأیید کرده سم افعی‌ها بیشتر بر باکتری‌های گرم مثبت اثر دارد (۲۶و۱۸) مطابقت دارد. این نتایج همچنین با مطالعه‌ی ضد باکتریایی سم افعی جعفری که توسط جامی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شده، مطابقت دارد(۲۷). آن‌ها فعالیت ضد باکتریایی سم مار جعفری ایران[۱۰] را بر روی شش باکتری بررسی و گزارش کردند که سم مار جعفری ایران دارای اثر ضد باکتریایی بوده و بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین[۱۱] به طور معنی‌داری مؤثر می‌باشد. همچنین سان (San) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که سم افعی‌ها بر استافیلوکوکوس اورئوس اثر مهاری معنی‌داری دارد درحالی‌که بر روی اشریشیا کولی فاقد اثر مهاری معنی دار بودند (۲۸). مقاومت باکتری‌های گرم منفی ممکن است به دلیل غشای خارجی آن‌ها باشد زیرا غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی لیپوپلی-ساکارید است. بار لیپوپلی‌ساکاریدهای غشا می‌تواند پپتیدهای ضد باکتری را جذب کند و در نتیجه موجب مقاوم شدن باکتری نسبت به این پپتیدها شود (۲۸و۱۸). علاوه بر این، مشاهده شده که باکتری‌های گرم منفی، زمانی که با EDTA تماس داده می‌شوند در معرض عوامل ضد باکتری از جمله Bronchochin قرار می‌گیرند زیرا EDTA غشای خارجی سلول تیمار شده به آن را مختل می‌کند. اگرچه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده شده که مکانیسم ضد باکتری سم مار از طریق پدیده Blebbing غشاء سطح سلول (گشادشدن فضای غشای سلولی) و به دنبال آن نشت محتویات سلول رخ می‌دهد، اما مکانیسم دقیق این اختلال در غشای سلولی که منجر به مرگ سلولی می‌شود، هنوز هم کاملاً مشخص نیست (۲۸).

سم مار یک ترکیب سایتوتوکسیک طبیعی است که در سال‌های اخیر برای درمان انواع تومور بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲۹) و مشاهده و بررسی چشم‌انداز جهان داروسازی نشان می‌دهد که سم مار می‌تواند موجب گشایش دوره‌ی جدیدی از تحقیقات و تهیه داروها جهت درمان سرطان گردد (۳۰). گزارشات نشان می دهد که سم افعی‌ها دارای اثرات سایتوتوکسیک بوده درنتیجه در این مطالعه از سلول HepG2 استفاده شد (۳۱).

نتایج MTT reduction نشان داد که درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از تماس ۲۴ ساعته با سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۳۱/۶۴، ۲۳/۶۰، ۲۲/۷۹ و ۱۵/۵۶ بوده که در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌دار نشان دادند. این نتایج با داده‌های بدست آمده از آزمایش رنگ سنجی قرمز خنثی مطابقت نموده و اختلافات جزئی بین دو روش معنی‌دار نمی‌باشد. این نتایج با مطالعات قبلی انجام شده توسط شبل (Shebl) و همکارانش در سال ۲۰۱۲ که القاء مرگ و میر در سلول سرطانی پستان با افزایش غلظت سم را گزارش کردند، مطابقت می‌نماید (۳۲).

به منظور بررسی امکان القاء مرگ سلولی توسط سم خام از طریق آپوپتوز در سلول HepG2 در این مطالعه از روش Comet assay استفاده شد. نتایج نشان داد سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آپوپتوز و نکروز را به صورت معنی‌دار در سلول ایجاد می‌کند. همچنین مشخص شد که با افزایش غلظت از ۵۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سم خام میزان آپوپتوز و نکروز تقریباً روندی ثابت داشته است. در یک مطالعه Khunsap و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اثرات سمیت سلولی و همچنین القاء

۱۰ *Echis carinatus*

۱۱ *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

www.SID.ir

Archive of SID

آپوپتوز را بر روی چند رده سلول سرطانی از جمله HepG2 گزارش کردند(۳۳).

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که سم خام افعی زنجانی دارای اثرات مهاری معنی‌داری بر دو سویه گرم مثبت مورد مطالعه دارد و از طریق القای آپوپتوز سبب از بین رفتن سلول‌های HepG2 می‌گردد. پیشنهاد می‌شود تحقیقات دیگری به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات ضد باکتری موجود در سم خام افعی زنجانی انجام گیرد و سمیت ترکیبات نیز بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مدیریت و اعضای محترم مرکز علم وفناوری زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Vargas LJ, Londoño M, Quintana JC, Rua C, Segura C, Lomonte B, et al. An acidic phospholipase A_2 with antibacterial activity from Porthidium nasutum snake venom. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2012;161(4):341-7.
2. Ferreira BL, Santos DO, Santos AL, Rodrigues CR, de Freitas CC, Cabral LM, et al. Comparative analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: a Short Communication for Proteomics. Evid Based Complement Alternat Med 2008;2011:20.
3. Phua CS, Vejayan J, Ambu S, Ponnudurai G, Gorajana A. Purification and antibacterial activities of an L-amino acid oxidase from king cobra (Ophiophagus hannah) venom. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2012;18(2):198-207.
4. Nair DG, Fry BG, Alewood P, Kumar PP, Kini RM. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. Biochem J 2007;402(1):93-104.
5. Talan DA, Citron DM, Overturf GD, Singer B, Froman P, Goldstein EJ. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. J Infect Dis 1991;164(1):195-8.
6. Glaser HR. Bactericidal activity of Crotalus venom in vitro. Copeia 1948:245-7.
7. Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from Pseudechis australis (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon 1991;29(9):1129-41.
8. Okubo BM, Silva ON, Migliolo L, Gomes DG, Porto WF, Batista CL, et al. Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from Bothropoides mattogrosensis pitviper venom. PLoS One 2012;7(3):e33639.
9. Samel M, Vija H, Kurvet I, Künnis-Beres K, Trummal K, Subbi J, et al. Interactions of PLA2-s from Vipera lebetina, Vipera berus berus and Naja naja oxiana venom with platelets, bacterial and cancer cells. Toxins (Basel) 2013;5(2):203-23.
10. Perumal Samy R, Pachiappan A, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Hian YE, Chow VT, et al. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against Burkholderia pseudomallei. BMC Infect Dis 2006;6:100.
11. Nunes Edos S, de Souza MA, Vaz AF, Santana GM, Gomes FS, Coelho LC, et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2011;159(1):57-63.
12. Wang Y, Hong J, Liu X, Yang H, Liu R, Wu J, Wang A, et al. Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics. PLoS One 2008;3(9):e3217.
13. 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.
14. Latifi M. The Snakes of Iran. 3rd ed. Department of the Environment, Tehran, Iran. 2000; pp. 478.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
16. 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.
17. Yalcın HT, Ozen MO, Gocmen B, Nalbantsoy A. Effect of Ottoman Viper (Montivipera xanthina (Gray, 1849)) Venom on Various Cancer Cells and on Microorganisms. Cytotechnology 2014;66(1):87-94.
18. Shebl RI, Mohamed AF, Ali AE, Amin MA. Antimicrobial profile of selected snake venoms and their associated enzymatic activities. Microbiology Research Journal International 2012:251-63.
19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45(4):493-6.
20. Torres AF, Dantas RT, Menezes RR, Toyama MH, Oliveira MF, Nogueira NA, et al. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops leucurus snake venom. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2010;16:614-22.
21. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (Androctonus crassicauda) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. Exp Mol Pathol 2011;91(1):447-54.
22. Waheed A, Bibi Y, Nisa S, Chaudhary F, Sahreen S, Zia M. Inhibition of human breast and colorectal cancer cells by Viburnum foetens L. extracts in vitro. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2013;3(1):32-6.
23. Sajad M, Zargan J, Zargar MA, Sharma J, Umar S, Arora R, et al. Quercetin prevents protein nitration and glycolytic block of proliferation in hydrogen peroxide insulted cultured neuronal precursor cells (NPCs): Implications on CNS regeneration. Neurotoxicology 2013;36:24-33.
24. Etebari M, Sajjadi SE, Jafarian-Dehkordi A, Panahi M. Antigenotoxic Effects of Methanolic and Aqueous Extracts of Kelussia Odoratissima Mozaffarian against Damage Induced by Methyl Methanesulfonate. Journal of Isfahan Medical School 2013;30(215): 2062-71.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Mosca RC, Do Nascimento N. An in vitro preliminary study on the growth inhibition of oral microflora by snake venom. Journal of Dentistry and Oral Hygiene 2011;3(9):114-8.
26. Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TK, Bow H, Yap EH, et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. J Appl Microbiol 2007;102(3):650-9.
27. Jami AA, Fathi B, Jamshidi A, Zolfagharian H, Zare MA. Investigation of the antibacterial effect of venom of the Iranian snake Echis carinatus. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology 2010; 2(2): 93-100.
28. San TM, Vejayan J, Shanmugan K, Ibrahim H. Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in malaysia. Journal of applied sciences 2010;10(19):2328-32.
29. Shaikh DM, Jokhio R. Effect of snake venom on nucleic acids and total proteins in various normal and cancerous animal tissues. Pakistan Journal of Physiology 2005;1(1-2).
30. Aarti C, Khusro A. Snake venom as anticancer agent current perspective. Int J Pure Appl Biosci 2013;1(6):24-9.
31. Joseph B, Justin Raj S, T Edwin B, Sankarganesh PP. Biochemical Properties of Certain Biomarkers in Snake Venom. Asian J Biol Sci 2011;4(4):317-24.
32. Shebl RI, Mohamed AF, Ali AE, Amin MA. Cerastes cerastes and Vipera lebetina snake venoms apoptotic–stimulating activity to human breast cancer cells and related gene modulation. J Cancer Sci Ther. 2012;4:317-23.
33. Khunsap S, Buranapraditkun S, Suntrarachun S, Puthong S, Khow O, Chulasugandha P, et al. The Effects of Cryptelytrops albolabris, Calloselasma rhodostoma and Daboia siamensis Venoms on Human Cancer Cells. Asian Journal of Biological and Life Science 2013;2(1):50-3.

www.SID.ir