

اثر فراکشن بدست آمده از زهر مار کبری ایرانی (*Naja naja oxiana*) بر سلولهای سرطان سینه رده ۴T۱

رویا میرزایی^۱، دلاور شهباززاده^۲، کامران پوشنگ باقری^۳

۱- کارشناس ارشد سم شناسی، گروه آموزشی فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران - ایران

۳- دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران - ایران

*نشانی برای مکاتبه: انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، تلفن و نمابر: ۰۷۸۰۶۶۴۸۰، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، Shahbazzadeh@yahoo.com، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: خرداد نود و پنج پذیرش برای چاپ: مرداد نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان علت اصلی مرگ مرتبط با سرطان در زنان است. بسیاری از بیوتوکسین ها به عنوان یک منبع بیولوژیکی مفید دارای ترکیبات فعال دارویی و اثرات ضد توموری هستند. زهر مار مخلوطی پیچیده از مواد دارویی فعال است. ونوم مار سبب مهار تکثیر سلولی و آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ضد سرطانی و سایتوتوکسیک فراکشن های بدست آمده از ونوم مار کبری *Naja naja oxiana* بر روی سلول های سرطان سینه انجام شد.

روش کار: سلول سرطان سینه 4T1 در محیط RPMI با ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. ونوم مار کبری ایرانی با استفاده از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی تخلیص شد. غلظت فراکشن ها تعیین و محدوده وزن مولکولی آنها با روش SDS-PAGE بررسی گردید. اثر ضد چسبندگی و سمیت سلولی فراکشن فعال بر روی سلول های کشت داده شده به ترتیب با استفاده از روش رنگ آمیزی با تریپان بلو و MTT اندازه گیری شد.

یافته ها: از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تعداد ۶ فراکشن جداسازی شد. فراکشن F3 حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، دارای وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون بود که معادل وزن مولکولی پروتئین های دیس اینتگرینی می باشد. لذا فراکشن F3 جهت تخلیص بیشتر بوسیله ی کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شده و ۴ فراکشن جداسازی گردید. فراکشن F2 با وزن مولکولی kDa ۴۷، به عنوان فراکشن فعال انتخاب شد و نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که فراکشن فعال بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی سلول سرطانی 4T1 در مقدار ۰/۳ μg، ۴۵ درصد سمیت داشته و بر روی سلول نرمال HEK293، ۸ درصد اثر سایتوتوکسیک داشت.

نتیجه گیری: فراکشن فعال ونوم مار کبری ایرانی دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول های سرطان سینه می باشد و گزینه ی مناسبی جهت تخلیص کامل تر در انجام مطالعات داروهای ضد سرطانی با منشأ طبیعی می باشد.

واژگان کلیدی: مار کبری ایرانی، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی تعویض یونی، تست MTT، سرطان سینه

مقدمه

عوارض جانبی وجود دارد. یک استراتژی مهم برای توسعه عوامل ضد سرطان مطالعه عوامل ضد سرطان به دست آمده از منابع طبیعی است (۳).

سالیانه منابع زیادی در پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان سرمایه گذاری شده، سازمان های دولتی و غیر دولتی مانند موسسه ملی سرطان آمریکا (NCI)، سازمان اروپایی تحقیقات و درمان سرطان (EORTC) بر توسعه و کشف عوامل ضد سرطان است (۴). شیمی

سرطان یک بیماری پیچیده است که توسط تکثیر سلولی کنترل نشده سلول و فرار از آپوپتوز ایجاد شده و سبب هموار کردن راه های تهاجم سلولی و متاستاز می گردد (۱). سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در همه ی مناطق جهان است و از هر ۴ مورد مرگ در ایالات متحده آمریکا، یک مورد مربوط به سرطان است (۲). بنابراین همیشه یک ضرورت دائمی برای توسعه داروهای جایگزین و داروهای سینرژیک (هم افزا) ضد سرطان با حداقل

ویرانگر در سلول های سرطانی شود (۱۱ ، ۱۰). با توجه به اینکه ونوم مار شامل ترکیبات وسیعی است که سبب آپوپتوز و متاستاز

سلولی می شود، می توان به توسعه ی یک داروی جدید ضد سرطان از ونوم مار در آینده امیدوار بود (۱۲). با توجه به اهمیت جستجوی مواد ضد سرطان از منابع طبیعی، این مطالعه جهت تعیین اثر توکسیسیتی و ضد سرطانی فراکشن های بدست آمده از زهر مار کبری ایرانی بر رده سلولی سرطان سینه انجام شد.

روش کار

زهر لیوفیلیزه در آزمایشگاه ونوم و فرآورده های دارویی انیستیتو پاستور موجود بود. منطقه نمونه برداری مارهای کبری، استان خراسان رضوی بوده به انستیتو پاستور منتقل گردیدند. پس از طی مدت استاندارد، زهر این مار ها در سرپنتاریوم انستیتو پاستور به روش milking طبق توصیه WHO زهرگیری شده و سپس لیوفیلیزه گردید (۱۳).

برای تخلیص فراکشن های زهر به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از ستون سفاکریل Sephacryl S-200 HR HiPrep 16/60 (شرکت GE آمریکا) استفاده شد. ۲۰۰ میلی گرم زهر خام مار کبری ایرانی در ۲ میلی لیتر آمونیوم استات (MERK آلمان) ۲۰ میلی مولار (PH:8.0) حل شده و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور 12470g برای حذف پارتیکل، سانتریفوژ شد. پس از اندازه گیری پروتئین موجود در محلول رویی، زهر آماده سازی شده به دستگاه FPLC (شرکت GE - مدل AKTA10) دارای ستون سفاکریل S200 (طول ۶۰ سانتی متر و قطر ۱/۶ سانتیمتر) تزریق شده و کروماتوگرافی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه انجام گردید. قبل از تزریق زهر، ستون با دو حجم بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار (PH: ۸) به تعادل رسیده بود. فراکشن های بدست آمده به صورت دستی جمع آوری شدند. جذب فراکشن ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شده و تعداد پیک ها مشخص گردید.

جهت تغلیظ فراکشن های به دست آمده از FPLC لیوفیلیزاسیون در دستگاه فریز درایر (شرکت Christ آلمان) استفاده شد. فراکشن ها با ازت مایع به حالت انجماد در آمده و در مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۵°C - و فشار ۰/۰۳ اتمسفر خشک گردیدند. جهت تعیین غلظت، ابتدا فراکشن ها با حجم کمی از آب مقطر تزریقی به حالت مایع درآمده و سپس مقدار پروتئین نمونه ها بر اساس روش BCA اندازه گیری شدند. اساس این تست احیای مس توسط پیوندهای پپتیدی است. در این روش از کیت مخصوص BCA (کمپانی Intronbio کره جنوبی) استفاده شد. به طور خلاصه، جهت تهیه بافر تست، در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر از محلول A (بیسینکونینیکاسید) با ۴ میکرولیتر

درمانی از روش های غالب، در درمان سرطان است. اما اغلب بیماران با شیمی درمانی بهبود نمی یابند و دچار عوارض جانبی شدید می شوند. این امر منجر به تلاش جهت دستیابی به داروهای جدید ضد سرطان شده است. داروهای جدید ضد سرطان بدست آمده از منابع طبیعی ممکن است اثر داروهای شیمی درمانی متعارف و رایج را افزایش دهد.

در حال حاضر بسیاری از محققین در سراسر دنیا ترکیبات ضد سرطانی که اغلب از زهر جانداران سمی گرفته شده اند را شناسایی کرده اند. بیوتوکسین ها توسط بعضی از موجودات زنده تولید شده و قادر به از بین بردن و آسیب رساندن به سایر ارگانیسم ها نیز هستند. (۵).

سرطان پستان به تنهایی ۲۹٪ از کل سرطان های شناسایی شده در میان زنان را به خود اختصاص می دهد این بیماری علت اصلی مرگ مرتبط با سرطان در زنان و مسئول مرگ بیش از ۴۵ هزار نفر در هر سال است. با توجه به گزارش WHO، ۲۰٪ افزایش در تعداد بیماران مبتلا به سرطان پستان گزارش شده است. سرطان پستان، یک بیماری وابسته به جنسیت خاص نیست. فراوانی سرطان پستان در مردان حدود ۱۰۰ برابر کمتر از زنان است و حدود ۲۲۰۰ مرد در هر سال به این بیماری مبتلا خواهد شد (۶). عوارض جانبی سمی و ظهور مقاومت دارویی از مشکلات عمده مواجهه با شیمی درمانی است. گسترش روش های درمان منطقی برای سرطان پستان نیاز به درک درستی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی دارد که منجر به سرطان پستان می شود (۷).

زهر به عنوان یک منبع بیولوژیکی مفید، حاوی چندین ترکیب فعال دارویی بوده و این ترکیبات می توانند ارزش و پتانسیل دارویی داشته باشند. بسیاری از بیو توکسین ها فعالیت ضدتوموری دارند. بعضی مستقیماً سلول های توموری را از بین می برند، و بعضی مانع آنژیوژنز تومور شده و رشد تومور را مهار می کنند (۸).

ونوم مار با مهار تکثیر سلولی و مرگ سلولی توسط القای آپوپتوز در سلول های سرطانی، سبب آسیب به غشای سلولی و پیشگیری از متاستاز می شود (۸ ، ۹). توکسین های گرفته شده از ونوم مار، همچنین به عنوان یک مهار کننده و پیشگیری کننده از متاستاز بررسی شده اند. متاستاز یکی از مهمترین دلایل اصلی مرگ بیماران مبتلا به سرطان است.

استفاده از ونوم برای درمان سرطان در حیوانات آزمایشگاهی برای اولین بار توسط (Calmette, 1993) گزارش شد و مشخص شد که توکسین استخراج شده از ونوم مار *vipera lebetina* *turnica* از آپوپتوز سلول های سرطان تخمدان جلوگیری می کند (۵). سایتوتوکسین های بدست آمده از مار کبری هندی (*Naja atra*) به عنوان سایتوتوکسین به خوبی بر روی رده ی سلولی عمل می کنند. سایتوتوکسین می تواند باعث اثرات پاتولوژیکی

کشت داده شدند. سپس در انکوباتور 5% CO₂ نگهداری و هر ۳ روز یکبار محیط کشت آنها تعویض گردید (۱۶ ، ۱۵).

فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی، از نظر قدرت ضد چسبندگی بر روی سلول های سرطان سینه رده 4T1 بررسی گردید. برای این منظور هنگامی که حداقل ۷۰ درصد سلول های 4T1 موجود در فلاسک کشت به رشد کامل رسیدند ، به کمک تریپسین-EDTA سلول ها از کف فلاسک جدا شده و سانتیفریوژ گردید. پس از شمارش سلول های زنده در سوسپانسون سلولی ، تعداد 20×10^3 سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه منتقل شدو یک گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. مقادیر مختلف از فراکشن ها از ۶ تا ۰/۱۸ میکروگرم به هر یک از چاهک های گروه تست اضافه گردید. بعد از مدت زمان یک الی دو ساعت محلول رویی برداشت شده و سلول های چسبیده شده به کف میکروپلیت و همچنین سلول های محلول رویی به طریق اضافه کردن رنگ تریانبلو شمارش و بررسی گردیدند. فراکشن موثر جهت تست MTT انتخاب گردید.

بررسی اثر سیتوتوکسیته فراکشن کاندید به روش رنگ سنجی، با استفاده از MTT (-2,5-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3-diphenyl-tetrazolium bromide) انجام شد (۱۷). اساس این روش بر پایه ی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهای زنده استواراست، که در این روش محلول زرد رنگ MTT به کریستالهای بنفش رنگ فورمازان تبدیل می شود، و پس از حل کردن در DMSO میتوان آنها را در دستگاه ایلیزا ریدر مورد سنجش قرار داد (۱۸). در این مرحله ابتدا سلول های سرطان سینه رده 4T1 و شاهد رده HEK 293 در فلاسک کشت داده و تکثیر شدند. سپس سلول ها به کمک Tripsin-EDTA از فلاسک جدا شده و بعد از سانتیفریوژ و شمارش، تعداد ۲۰ هزار سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ای منتقل شد و همچنین یک گروه به عنوان کنترل مشخص گردید. بعد از اطمینان از چسبیدن سلول ها به کف میکروپلیت ، غلظت های مختلف از فراکشن ها از ۶ میکروگرم در میلی لیتر تا ۱۸۰ نانوگرم (0.18 میکروگرم) به چاهک های گروه تست اضافه گردید. بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت ، محیط رویی هر چاهک را با دقت خارج و به هر یک از چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 (فاقد فنول رد) و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با میزان CO₂ ۵ درصد، نگهداری گردیدند. سپس به سلول ها ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد. بعد از مخلوط کردن ، میکروپلیت را همراه

محلول B (سولفات مس) به وسیله ی ورتکس مخلوط شد. مقداری از نمونه رقیق شده را با بافر تست مخلوط کرده و در چاهک میکروپلیت ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس جذب هر یک از چاهک ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت نهایی، با استفاده از فرمول خط به دست آمده از منحنی استاندارد که با استفاده از مقادیر مختلف پروتئین استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) بدست آمده بود، محاسبه شد.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید بر اساس روش لاملی (۱۴) در ژل جداکننده (*Resolving*) ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده (*Stacking*) ۴ درصد در شرایط غیراحیا انجام گرفت. ابتدا نمونه های پروتئینی با بافر نمونه مخلوط شده و ۵-۳ دقیقه تیمار حرارتی شده و سپس الکتروفورز شدند. پس از آماده شدن نمونه ها، ۲۰ میکروگرم از آن ها در هر چاهک دستگاه تانک عمودی (*Bio-Rad*) تزریق شده و در جریان ۳۰ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R250 رنگ آمیزی شد.

با توجه به هدف این تحقیق که جستجوی یک پروتئین دیس اینتگرین بود، فراکشن شماره ۳ حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به دلیل دارا بودن پروتئین هایی با طیف وزن مولکولی بین ۴۰ الی ۶۰ کیلوالتون، جهت جداسازی و تخلیص بعدی به وسیله ی کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد (۱).

مقدار یک میلی گرم از پیک شماره ۳، به دستگاه FPLC (شرکت GE - مدل AKTA10) دارای ستون Mono Q (شرکت GE آمریکا - طول ۱۰ سانتی متر و قطر ۱،۶ سانتیمتر) تزریق شده و کروماتوگرافی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه انجام گردید. در این مرحله ابتدا پروتئین هایی که جذب ستون نشده بودند از ستون خارج شده و بعد از اینکه این پروتئین ها کاملاً از ستون خارج شدند، بلافاصله شیب غلظت NaCl از صفر تا ۱ مولار با PH برابر با ۷ به مدت ۶۰ دقیقه اعمال شد. جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب آن ثبت گردید. سپس جهت خارج کردن نمک فراکشن ها، دیالیز توسط لوله فالکن دیالیز (Milli pore) با cut off: 3 kDa انجام شده و سپس و به روش فوق لیوفیلیزه شدند.

اندازه گیری مقدار پروتئین با استفاده از کیت BCA مطابق روش ذکر شده، انجام پذیرفت. الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی (۱۴) انجام شد.

سلولها رده سلول سرطانی 4T1 و سلول نرمال HEK293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و به ترتیب در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) و DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) ، محلول پنی سیلین (100U/ml) - استرپتومایسین (100µg/ml) و ۲ میلی مولار ال -گلوتامین

ثبت گردید. برای هر غلظت از فراکشن کاندید ۳ تکرار تعیین گردید ، درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{بماد درصد سلولی} = \left[1 - \frac{(OD \text{ بلاک} - OD \text{ سلول تیمار شده})}{OD \text{ کنترل} - OD \text{ بلاک}} \right] \times 100$$

مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. میکرو پللیت را سانتریوفوز کرده و محلول رویی به میکروپللیت دیگری منتقل شدو نهایتا میزان آزاد شدن هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی گردید. کنترل مثبت TRITON X100 و کنترل منفی PBS بود. درصد فعالیت همولیتیک طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری نمونه} \\ \text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری کنترل مثبت} \\ \text{درصد همولیز} = 100 \times \frac{\quad}{\quad}$$

فراکشن مشخص مجزا شدند که به ترتیب خارج شدن از ستون F1, F2, F3, F4, F5 و F6 نام گذاری شدند

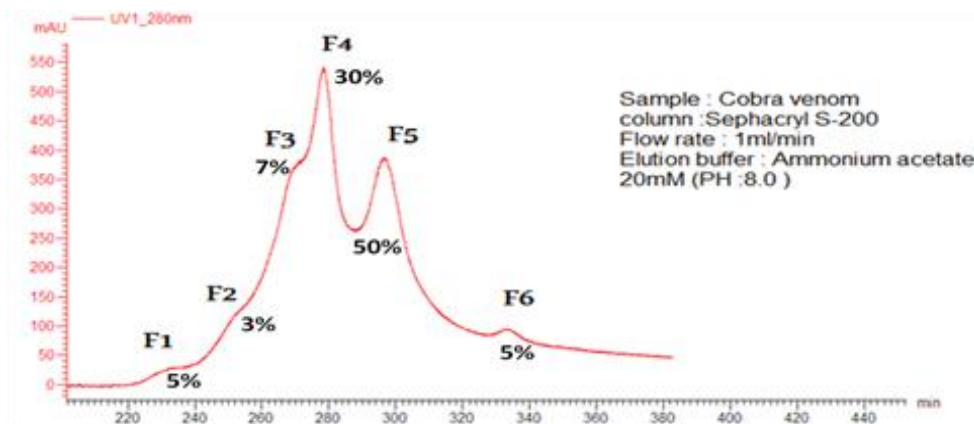
درپوش ضد نور ۱۵ دقیقه درون شیکر قرار داده شد و جذب نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط (دستگاه Epoch شرکت BioTek

غلظت های مختلف فراکشن کاندید که دارای بالاترین اثر سمیت سلولی و ضد چسبندگی بود، به روش رقیق سازی متوالی در میکرو پللیت ۹۶ خانه تهیه گردید. سپس سوسپانسیون ۲ درصد گلبول قرمز انسان به آنها اضافه و به

یافته ها

نتیجه کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۲۰۰ میلی گرم زهر خام مار کبری ایرانی در نمودار ۱ نشان داده شده است. طبق این روش پروتئینهای زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۶

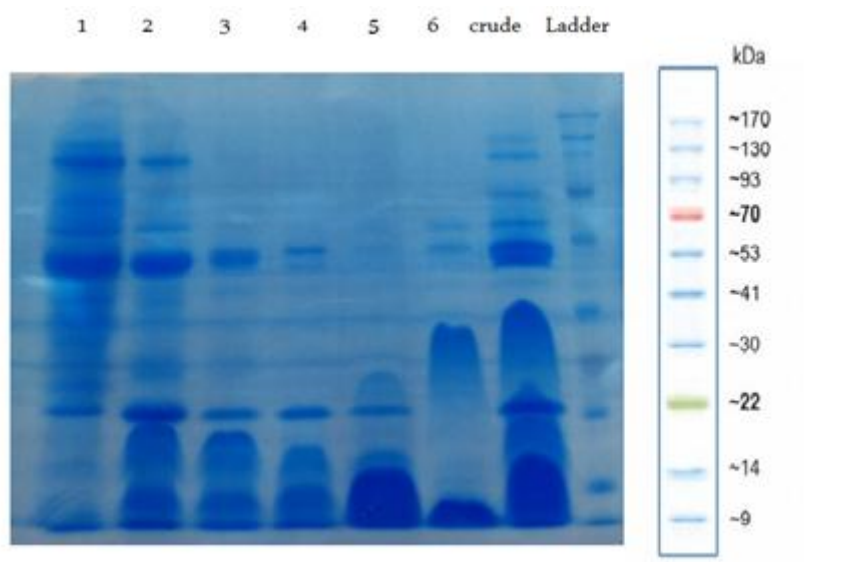
نمودار ۱: کروماتوگرافی زهر خام مار کبری ایران روی سفاکریل S-200. ستون طول ۶۰ سانتی متر ، قطر ۱٫۶ سانتیمتر با بافر استات امونیوم ۲۰ میلی مولار با PH برابر ۸ به تعادل رسیده و با همین بافر با سرعت جریان ۱ میلی -لیتر در دقیقه شستشو داده شد.



شرایط غیر احیا با پلیاکریل امید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند (شکل ۱).

نتایج الکتروفورز SDS- پلیاکریل امید ژل (SDS- PAGE) و تعیین وزن مولکولی فراکشن موثر تخلیص شده و پروتئین استاندارد به کار گرفته شده برای تعیین وزن مولکولی بر روی SDS-PAGE در

شکل ۱- تعیین وزن مولکولی زهر خام مار کبری ایرانی و ۶ فراکشن بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به وسیله SDS-PAGE در شرایط غیر احیاء و ژل پلی اکریل امید ۱۲ درصد



Mono Q برده شد. 250 میکرو لیتر F3 حاوی ۱ میلی گرم

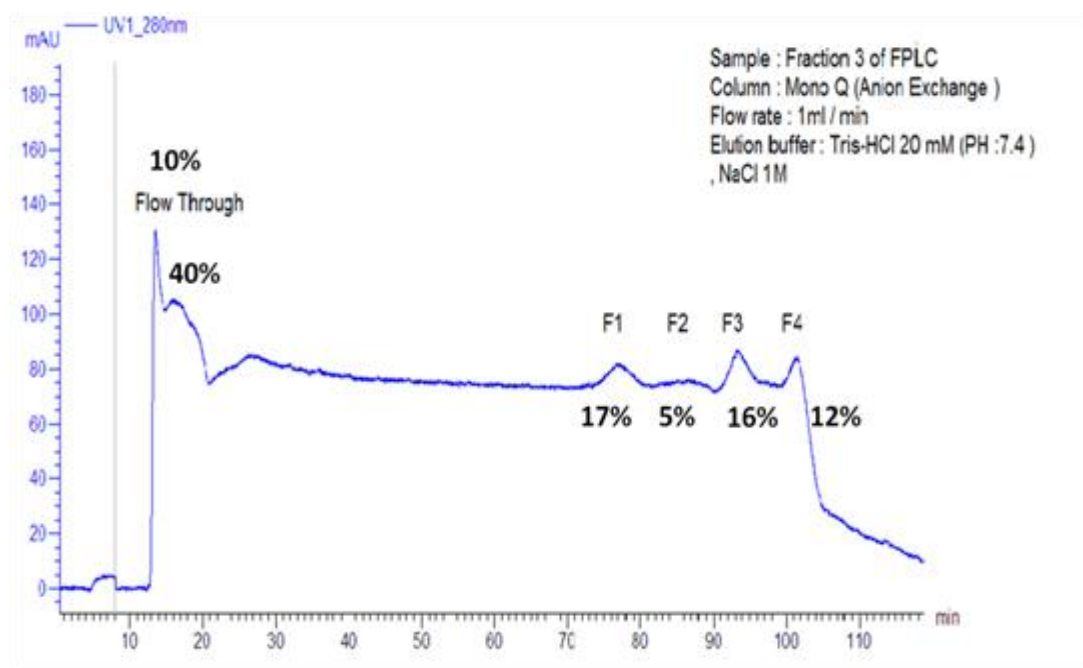
پروتئین بر روی ستون Mono Q برده شد

نتیجه کروماتوگرافی تعویض یونی F3 بر روی ستون Mono Q در

نمودار ۲ نشان داده شده است. F3 به علت داشتن خاصیت

کشندگی سلول های سرطان سینه رده 4T1 بر روی ستون

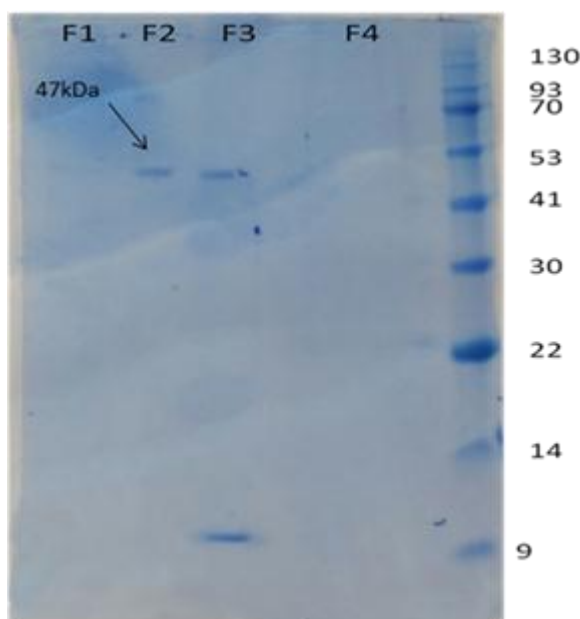
نمودار ۲- کروماتوگرافی تعویض یونی فراکشن F3 بر روی ستون Mono Q (قطر : ۱ mm و طول : ۱۰ cm) . ابتدا ستون با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی مولار به PH:7.4 تعادل رسید. کروماتوگرافی با همین بافر با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه شروع شد. پس از خروج پروتئینهای جذب نشده ، ستون با گرادیانی از بافر نمک NaCl ۱ مولار با PH برابر با ۷ شسته شده و در آخر شستشوی نهایی با شیب غلظت نمک NaCl ۲ مولار انجام شد



مولکولی فراکشن موثر حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص شده در حدود ۴۷ KDa برآورد شد.

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در شکل ۲ نشان داده شده است. وزن

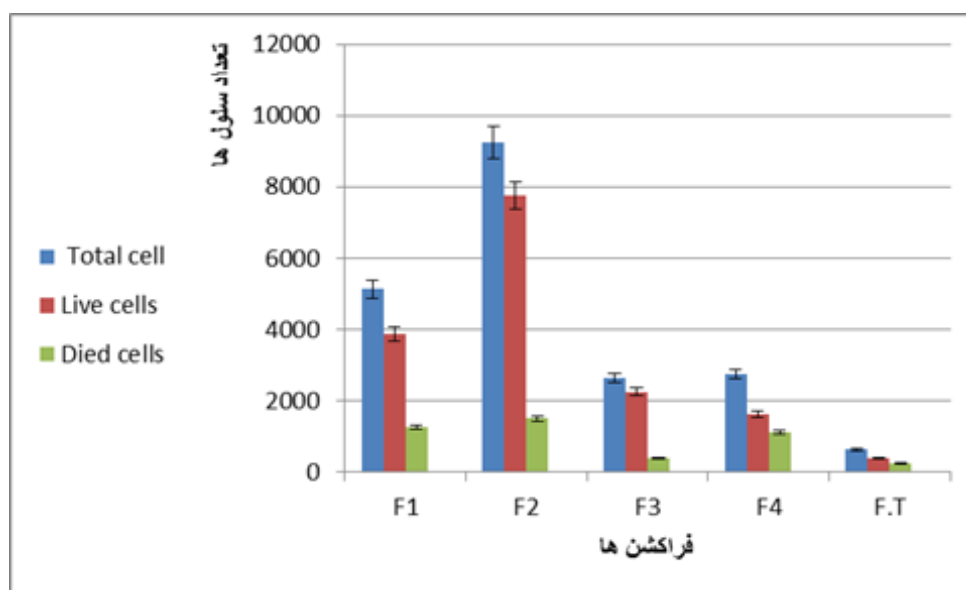
شکل ۲ - الکتروفورز فراکشن موثر حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی. وزن مولکولی فراکشن F2 بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در شرایط غیر احیاء در ژل پلی اکریل امید ۱۲ درصد، حدود ۴۷ کیلودالتون برآورد گردید.



(FT) و F1 و F4 اثر ضد چسبندگی کمتری نسبت به بقیه ی فراکشن ها داشتند. بیشترین اثر ضد چسبندگی مربوط به فراکشن های F2 و F3 بود که از میان این دو ، فراکشن F2 بیشترین اثر را از خود نشان داد (نمودار ۳).

هنگامی که فراکشن ۳ حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون توسط کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص شد، فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی با هدف انتخاب قوی ترین فراکشن دارای بیشترین اثر ضد چسبندگی ، در این تست بررسی شدند. فراکشن های متصل نشده : Flow Through

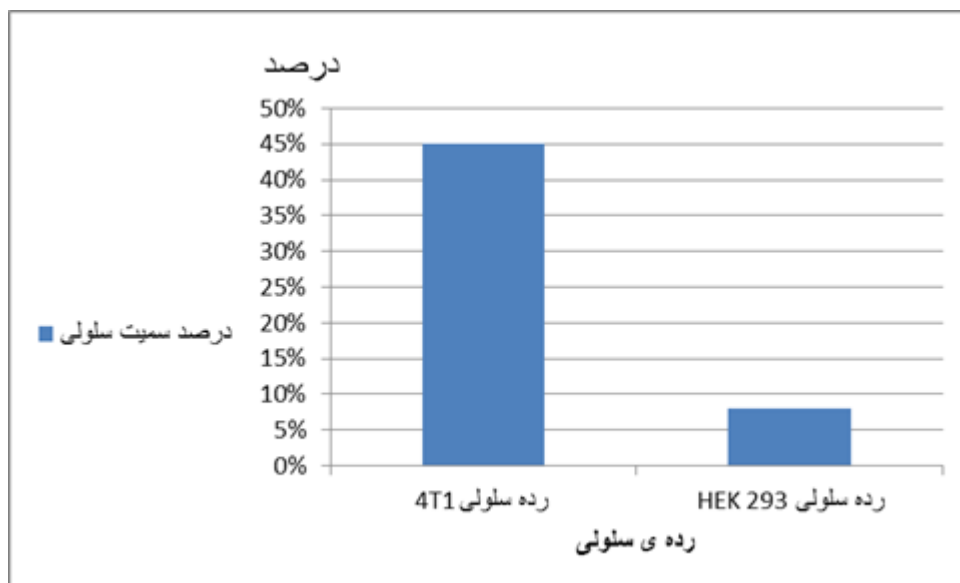
نمودار ۳- بررسی و انتخاب قوی ترین فراکشن ضد چسبندگی حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی فراکشن F3 . با توجه به نتایج، فراکشن F2 دارای بیشترین اثر ضد چسبندگی بود.



سلولی در مقدار ۰/۳ میکروگرم بر رده ی سلول های سرطانی سینه 4T1 مشاهده شد که در همان غلظت برابر از فراکشن F2، اثر سمیت سلولی بر رده ی سلول های شاهد فیبروبلاست HEK-293 ، به میزان ۸ درصد بود (نمودار ۴). با توجه به اینکه OD کنترل منفی با تمام غلظت های مورد آزمایش برابر بود، بنابراین هیچ گونه فعالیت همولیتیک مشاهده نگردید.

نتایج حاصل از بررسی اثر فراکشن F2 حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی F3، در مقادیر مختلف ۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۷، ۰/۰۱۸ میکروگرم بر روی سلول نرمال HEK-293 و سلول های سرطان سینه (4T1) نشان می دهد که فراکشن F2 بر روی سلول های سرطان سینه 4T1 نسبت به سلول های فیبروبلاست نرمال (HEK-293) دارای سمیت سلولی بیشتری می باشد . بر اساس تست MTT، میزان ۴۵ درصد سمیت

نمودار ۴- مقایسه درصد سمیت سلولی فراکشن F2 بر رده سلول سرطانی 4T1 و سلول شاهد فیبروبلاست انسانی در تست MTT. با توجه به نتایج فراکشن F2 دارای سمیت بسیار کمتری بر سلول های رده نرمال داشت.



بحث

به مجموع ۵ فراکشن حاصله از کروماتوگرافی تعویض آنیونی (یک کاتیونی و چهار آنیونی)، فراکشن F2 در محدوده ی آنیونی بیشترین اثر ضد چسبندگی و کشندگی را داشت. اثر ضد چسبندگی فراکشن F2 در مقدار ۰/۳ میکروگرم حدود ۱۰٪ بر آورد گردید و اثر کشندگی این فراکشن بر رده ی سلول های سرطانی 4T1 حدود ۴۵٪ بدست آمد.

نتایج تست همولیز نشان داد که فراکشن F2 هیچ گونه اثر همولیتیکی بر سلول های گلبول قرمز انسان ندارد و اثر سمی آن بر سلول های نرمال ۸٪ بود که بسیار کمتر از سلول های سرطانی بود (۱۹). این فراکشن از اتصال سلول ها جلوگیری کرده و هم دارای اثر کشندگی بسیار سریع بر سلول های سرطانی بود.

در سال ۲۰۱۲ رامار تانگام و همکاران اثر سیتوتوکسیک مار کبری هندی بر روی رده های سلولی سرطان سینه ، ریه ، کبد را مورد بررسی قرار دادند و توانستند به پروتئینی با وزن مولکولی ۶۴ کیلو دالتونکه دارای خاصیت ضد چسبندگی بر روی هر سه رده ی سلول های سرطانی بود ، دست یابند (۱).

در مطالعه ای فرناندا ون پاتن و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر ضد توموری و ضد چسبندگی سم مار *Bothrops pauloensis*

شیمی درمانی از روش های غالب در درمان سرطان است اما اغلب بیماران با شیمی درمانی بهبود نیافته و دچار عوارض جانبی شدید می شوند. کشف عوامل شیمی درمانی امید تازه ای در جامعه پزشکی جهت درمان سرطان بود اما ایجاد عوارض شدید سبب ناامیدی مجدد شده، این امر منجر به تلاش مجدد در محققین جهت دستیابی به داروهای جدید ضد سرطان شده است (۷). یک استراتژی مهم برای توسعه عوامل ضد سرطان، مطالعه ی عوامل ضد سرطان به دست آمده از منابع طبیعی است (۳). ونوم بعضی مار ها حاوی مولکول های ویژه ایست که از چسبندگی و مهاجرت سلول ها جلوگیری کرده و اصطلاحاً به آن ها *Disintegrin* می گویند. دیس اینتگرین ها مولکول هایی با وزن مولکولی متوسط و دارای ویژگی های خاص هستند (۸). وجود این مولکول ها در زهر خانواده مار های کبری ثابت شده و لذا این تحقیق جهت جستجوی یک فراکشن ضد متاستاز با خاصیت ضد سرطانی هدف گذاری شد (۵ ، ۸).

نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از زهر مار کبری ایرانی ، ۶ فراکشن (پیک) بود. فراکشن شماره ۳ (F3) حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با دارا بودن پروتئین هایی با محدوده وزن مولکولی بین ۴۰ الی ۶۰ کیلودالتون، جهت تخلیص با کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد (۱). با توجه

تفاوت که در تحقیق ون پاتر و همکاران ، اثر سم مار بدون انجام کروماتوگرافی بررسی شده است و در مطالعه انجام شده با استفاده از ونوم مار کبری ایرانی، مراحل تخلیص و فراکشن گیری به منظور افزایش خلوص بیشتر و نتایج دقیق تر ، در جهت مطالعات بهتر سم شناسی و دارویی در آینده انجام شده است (۱۹).

اثرات ضد سرطانی به صورت اثر سمیت سلولی و ضد چسبندگی بر روی سلول های سرطان سینه 4T1 می باشد، در حالی که بر سلول های نرمال فیبروبلاست HEK-293 ، دارای حداقل اثرات سمیت سلولی بود.

نتیجه گیری

بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که فراکشن فعال ونوم مار کبری ایرانی دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول های سرطان سینه می باشد و گزینه ی مناسبی جهت تخلیص کامل تر در انجام مطالعات داروهای ضد سرطانی با منشا طبیعی می باشد. همچنین با بررسی نتایج بدست آمده و اثر کشندگی بر سلول های سرطانی می توان امیدوار بود در صورتی که در آینده داروی ضد سرطان از زهر مار کبری ایرانی بدست آید ، با حداقل عوارض در یک دوره کوتاه تر سبب از بین رفتن بافت سرطانی گردد.

را بر روی رده ی سلول های سرطان سینه MDA-MB-231 نشان دادند. در این مطالعه بیان شده است که میزان اثر سمیت سلولی بر رده ی سلولی نرمال بسیار کمتر از سمیت بر رده ی سلول های سرطان سینه بوده است که این نتایج با یافته های حاصل از مطالعه حاضر، هم راستا می باشد. با این

در مطالعه ی دیگری که لین و همکاران بر روی مار Naja atra انجام دادند ، نیز به بررسی اثر CTX 3 از ونوم مار کبری پرداختند که با وجود نقش موثر بر سلول های سرطان لوسمی انسانی K562، به علت نبود رده ی سلولی شاهد در این مطالعه باز هم جامعیت لازم برای تصمیمات پژوهشی در آینده را ندارد (۲۰).

با توجه به مثال های نشان داده شده ، به نظر می رسد که در غالب تحقیقات، از سلول شاهد استفاده نشده است و یا این که نتایج آن گزارش نشده است. اما مطالعه ی حاضر در این زمینه با این دیدگاه آغاز گردید که در صورت وجود اثر فراکشن های بدست آمده بر رده ی سلول های سرطانی سینه 4T1 ، آیا بر سلول های نرمال دارای اثر سمیت می باشد یا خیر؟ خوشبختانه نتایج مطالعه نشان داد که فراکشن بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در مقدار ۰/۳ میکروگرم دارای

REFERENCES

1. RamarThangama,,PalaniGunasekaranb,GnanaiahSridevic,ShenbagamoorthySundarraja,et al., A novel disintegrin protein from Najanaja venom induces cytotoxicity and apoptosis in human cancer cell lines in vitro.Process Biochemistry 47(2012) 1243-1249
2. Rebecca Siegel, Jiemin Ma, ZhaohuiZou, AhmedinJemal, Cancer Statistics, 2014. CA CANCER J CLIN 2014;64:9-29
- 3.RiyasatAli,ZeenatMirza,Ghulam M.D. Ashraf,et al., New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy. Anti cancer Research 32: 2999-3006 (2012)
- 4.Ajit S. Narang ,Divyakant S. Desai, Anticancer Drug Development. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics 2009, pp 49-92

5. Cui-Cui, Hao Yang, Ling-Ling Zhang, Qian Zhang, Bo Chen, Yi Wang, Biotoxins for Cancer Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(12):4753-8.
6. Davis NM¹, Sokolosky M¹, Stadelman K¹, Abrams SL¹, Libra M², Candido S², Nicoletti F, et al. , Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*. 2014 Jul 15;5(13):4603-50.
7. SANCHITA AHLUWALIA*, NAKUL SHAH, ANIMAL VENOM FOR TREATING BREAST CANCER. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN-0975-1491 Vol 6, Issue 9, 2014
8. Vivek Kumar Vyas, Keyur Brahmabhatt, Hardik Bhatt, , Utsav Parmar, Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Feb; 3(2): 156–162.
9. Leonardo A. Calderon, Juliana C. Sobrinho, Kayena D. Zaqueo, Andrea A. de Moura, Amy N. Grabner, Maurício V. Mazzi, Silvana Marcussi, et al. , Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 203639, 19 pages
10. Sardar E Gasanov, Ruben K Dagda, and Eppie D Rael, Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A₂s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *J Clin Toxicol*. 2014 Jan 25; 4(1): 1000181.
11. Ward CM¹, Vinogradov DV, Andrews RK, Berndt MC. , Characterization of mocoarhagin, a cobra venom metalloproteinase from *Naja mocambiquemocambique*, and related proteins from other Elapidae venoms. *Toxicon*. 1996 Oct;34(10):1203-6.
12. Lucena S¹, Castro R¹, Lundin C¹, Hofstetter A¹, Alaniz A², Suntravat M¹, Sánchez EE, Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. *Toxicon*. 2015 Jan;93:136-43.
13. Palefsky JM. Screening to prevent anal cancer: Current thinking and future directions. *Cancer cytopathology*. 2015;123(9):509-10.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-685
15. Feridberg R. An investigation into the antimicrobial and anticancer activities of *Geranium incanum*, *Artemisia afra* and *Artemisia absinthium* (Dissertation). Faculty of Health Science, Nelson Mandela Metropolitan University; 2009; 1-245.

16. Ian A. Cree, M.B. Ch.B., editor .cancer cell culture .New York :Springer ; 2011
17. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-A comparative study. Radiation oncology. 2012;7(1):1
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, 1983, 65: 55-63.
19. Azevedo FVPV, Lopes DS, Gimenes SNC, Ache DC, Vecchi L, Alves PT, et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA 2 homologue from Bothropspauloensis venom. International journal of biological macromolecules. 2016;7-82:671.
20. Yang S-H, Chien C-M, Chang L-S, Lin S-R. Involvement of c-jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by cardiotoxin III (Najanajaatra) in K562 leukemia cells. Toxicon. 2007;74-649(7):96.