Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 2, Summer 2023 ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of cytotoxicity of isolated fractions from the venom of Iranian cobra snake on skin cancer cell line, B16F10

Hedieh Farajpoor Moghadam[1], Delavar Shahbazzadeh[2], Roya Mirzaei[3,4]

[1] MSc in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAU), Tehran, Iran

[2]PhD in Medical Biochemistry, Venom and Bio Therapeutics Molecules Laboratory, Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[3]PhD in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAU), Tehran, Iran.

[4]Venom and Bio Therapeutics Molecules Laboratory, Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]

[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

Abstract

Background: Skin cancer is the most common cancer and very high risk of metastasis of cancer. In recent years, proteins derived from natural sources such as poison animals are considered toxic. The aim of this study was purified Iranian cobra venom using chromatography & fractions obtained by examining toxicity and anti-tumor effect on skin cancer cell line.

Materials and methods: B16F10 melanoma cells in RPMI 1640 medium with 10% FBS were cultured. Iranian cobra venom gel filtration chromatography and ion exchange was purified. Molecular weight fractions were analyzed by SDS-PAGE. The effect of anti-adhesion and cytotoxicity of the active fractions using trypan blue staining and MTT was measured on B16F10 cells were cultured and data were analyzed using student t-test.

Results: Six fractions obtained of gel filtration chromatography. The isolated fractions were evaluated anti-adhesion effect and fraction F3 for further purification by ion exchange chromatography was nominated and 4 fractions were separated. The fraction with a molecular weight of about 47 kDa (F2) was nominated. Totally toxicity was calculated as 49% and 8% on skin cancer cell line and HEK-293, respectively ($P \leq 0.05$).

Conclusion: In this study, cytotoxic effect on skin cancer cells B16F10 showed that Iranian cobra venom have a protein with highly valued medicinal properties and could be an option for future research against skin cancer.

Keywords: *Iranian Cobra snake, Chromatography, Skin cancer, MTT assay.*

Cited as: Farajpoor Moghadam H, Shahbazzadeh D, Mirzaei R Evaluation of cytotoxicity of isolated fractions from the venom of Iranian cobra snake on skin cancer cell line, B16F10. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(2): **143-150.**

Correspondence to: Roya Mirzaei
Tel: *+98-2122640051*
E-mail: r.mirzaei@student.iautmu.ac.ir
ORCID ID: 0000-0003-2059-0282
Received: 10 Oct 2022; **Accepted:** 8 Jan 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۴۳ تا ۱۵۰

Original Article

سنجش اثرات سمیت سلولی فراکنش‌های حاصل از زهر مار کبری ایرانی Naja oxiana بر رده سلولی سرطان پوست (ملانوما) B۱۶F۱۰

هدیه فرج پور مقدم[۱]، دلاور شهباززاده[۲]، رویا میرزائی[۳،۴]

[۱] کارشناس ارشد سم شناسی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی (دانشیار)، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] دکتری تخصصی داروسازی- سم شناسی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۴] آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *سرطان پوست یکی از شایع‌ترین انواع سرطان با خطر متاستاز بالا است. با توجه به ساختار شیمیایی سم مار، اثرات دارویی آن در بسیاری از مطالعات بررسی شده است. هدف این تحقیق، تخلیص زهر مار کبری ایرانی به روش کروماتوگرافی و بررسی اثر ضد سرطانی فراکشن های حاصل بر رده سلولی سرطان پوست بود.*

روش بررسی: *رده سلولی B۱۶F۱۰ در محیط RPMI با ۱۰٪ Fetal Bovin Serum کشت داده شد. زهر مار کبری ایرانی به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی تخلیص شد. وزن مولکولی فراکشن با روش SDS-PAGE بررسی گردید. اثر ضد چسبندگی و سمیت سلولی فراکشن فعال با روش رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT اندازه گیری و آنالیز آماری با استفاده از روش student t-test انجام شد.*

یافته‌ها: در این مطالعه، *شش فراکشن حاصل کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بود و اثر ضد چسبندگی آنها بررسی شد و فراکشن F۳ جهت تخلیص با کروماتوگرافی تعویض یونی کاندید و ۴ فراکشن جداسازی شد و فراکشن F۲ با وزن حدود ۴۷ kDa دارای بیشترین اثر ضد چسبندگی به عنوان فراکشن فعال جهت تست MTT انتخاب شد و بر روی سلول (B۱۶F۱۰) و سلول های نرمال HEK۲۹۳ ، به ترتیب دارای ۴۹ ٪ و ۸٪ سمیت بود ($p\leq ۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *اثر سمیت سلولی بر سلول‌های رده B۱۶F۱۰، نشان داد که زهر مار کبری ایرانی دارای پروتئینی ارزشمند با خواص داروئی بالاست که می‌تواند گزینه مناسبی جهت تحقیقات آتی ضد سرطان پوست باشد.*

واژگان کلیدی: *مارکبری ایرانی، کروماتوگرافی، سرطان پوست، تست MTT*

مقدمه

سرطان پوست شامل تغییرات غیرعادی در لایه بیرونی پوست می‌شود (۱، ۲). سرطان ملانوم به طور جهانی حداقل ۴۰ درصد از موارد انواع سرطان را تشکیل می‌دهد (۳). در سراسر جهان در سال ۲۰۱۲ ملانوم در ۲۳۲۰۰۰ نفر دیده شده است و منجر به مرگ ۵۵۰۰۰ نفر شده است (۴، ۵). ملانوما یکی از تومورهای بدخیم پوستی است که در اثر تغییر در ملانوسیت‌ها ایجاد می‌شود. این تومورها ممکن است در زمینه یک پوست به طور کامل سالم و یاحتی در بستر ناخن ایجاد شده و یا در زمینه یک خال خود را نشان می‌دهد. ملانوما علاوه بر پوست،ممکن است در مخاط دهان و چشم نیز ایجاد گردد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه آموزشی فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، رویا میرزائی
(**email**: r.mirzaei@student.iautmu.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0003-2059-0282
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۷/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱//۱۰/۱۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

(۶). مبتلایان به ملانوم ممکن است تحت جراحی، شیمی‌درمانی، درمان بیولوژیک، و یا پرتودرمانی قرار بگیرند (۷). استفاده روز افزون از از عوامل شیمیایی برای درمان و کنترل پیشرفت سرطان عوارض جانبی شدید و تاثیر بسزایی بر دیگر بافتهای بدن دارد. بنابراین همیشه یک ضرورت دائمی برای توسعه داروهای جایگزین و داروهای سینرژیست آنتی کنسر با حداقل عوارض جانبی وجود دارد. یک استراتژی مهم برای توسعه عوامل ضد سرطان، مطالعه عوامل ضد سرطان به دست آمده از منابع طبیعی است (۸). سم مار حاوی فاکتورهای نوروتوکسین، پروتئولیتیک، انعقاد کننده خون، فسفاتازها، کولینسترازها، هیالورونیدازها، امینو اسید اکسیداز و آنزیمهای دیگر می باشد که می توان آنها را مورد مطالعه قرار داد. زهر بعضی مار ها حاوی Disintegrin است که مولکولی با وزن مولکولی کم، با قدرت و ویژگی های خاص هستند که ابتدا از ونوم مارهای Viperidae جداسازی شد و سپس در خانواده‌های دیگر مارها نیز شناسایی شد. برای توسعه و پیشرفت داروهای درمان سرطان از دیس‌اینتگرین‌ها استفاده می‌شود (۹). دیس اینتگرین‌ها با اتصال به اینتگرین سطح سلول‌های سرطانی می‌توانند از حرکت و مهاجرت آنها جلوگیری کرده و به عنوان یک عامل ضد متاستاز مطرح باشند (۱۰). مطالعات متعددی روی خواص آنتی کنسر سموم طبیعی صورت گرفته است، از جمله اینکه آهِن و همکارانش اثر سمیت سلولی اجزاء سم مار کبری گونه های موجود در کره جنوبی را مورد بررسی قرار دادند. تاثیر سمیت سلولی آنزیم L-آمینو اسید اکسیداز خالص شده بر روی سلول‌های سرطان معده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مشاهده شده است که پروتئین‌های مورد بررسی رشد تعداد سلول‌ها را به میزان ۷۴ درصد کاهش داده‌اند (۱۱).کارلا و همکاران اثر سمیت سلولی مار Bothrops moojeni را روی سلول‌های سرطان کلیه مورد بررسی قرار دادند. سم استخراج شده موجب مرگ سلولی و پارگی در غشای سلولی در رده مورد مطالعه شد (۱۲). در سال ۲۰۱۵ لوسنا و همکارانش از دو دیس اینتگرین استخراج شده از ونوم مار برای درمان لوزالمعده استفاده کردند. در نتایج حاصله برخی از جنبه‌های اساسی از فرآیند متاستاز از طریق آپوپتوز مهار شد. این پروتئین نامزد برجسته‌ای برای توسعه این ماده برای درمان سرطان لوزالمعده است (۱۳). بادر و همکارانش فعالیت ضدتوموری ونوم مار را روی رده سلول‌های سرطانی پروستات و پستان مورد مطالعه قرار دادند. مشاهده شد با افزایش القای آپوپتوز و کاهش متاستاز در موش این ونوم ها در درمان گستره وسیعی از سرطان‌ها موثرند (۱۴).

وجود این مولکول‌ها در زهر خانواده مارهای کبری ثابت شده و لذا می‌توان پیش بینی کرد که در آینده بتوان آن را به عنوان عامل ضد سرطان در درمان به کار برد.

مواد و روشها

با توجه به اینکه زهر لیوفیلیزه شده مار کبری ایرانی Naja naja (oxiana) در آزمایشگاه ونوم و فرآورده‌های دارویی انیستیتو پاستور به روش milking بر طبق توصیه سازمان WHO زهر گیری شده بود، از زهر خام (ونوم) موجود در آزمایشگاه برای انجام آزمایش استفاده گردید (۱۵).

ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از ونوم مار کبری ایرانی در ۲ میلی لیتر آمونیوم استات (MERK آلمان) ۲۰ Mm (pH:۸) حل شد و محلول حاصله به جهت حذف پارتیکل اضافی سانتریفوژ گردید (۵ دقیقه، g ۱۳۰۰۰) و سپس میزان پروتئین در محلول رویی اندازه گیری شد. به منظور متعادل سازی ستون سفاکریل با دو حجم بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار شستشو داده شد و زهر آماده ی تزریق به دستگاه FPLC (شرکت GE - مدل AKTA10) شد. ستون مورد استفاده سفاکریل ۱۶/۶۰ Sephacryl HR- HiPrep S -۲۰۰ (شرکت GE آمریکا) (طول ۶۰ سانتی متر و قطر ۱٫۶ سانتیمتر) بود. کروماتوگرافی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه انجام شد. فراکشن های زهر مار کبری ایرانی در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به صورت دستی جمع آوری گردیدند.

تغلیظ فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و عمل لیوفیلیزاسیون در دستگاه فریز درایر (شرکت Christ آلمان) صورت گرفت.

تعیین غلظت فراکشن‌ها و مقدار پروتئین موجود در نمونه‌ها بر اساس روش BCA و با استفاده از کیت مخصوص BCA (کمپانی Intronbio کره جنوبی) اندازه گیری گردید. فراکشن‌ها توسط آب مقطر تزریقی رقیق شدند و بر اساس دستورالعمل کیت با بافرهای موجود در کیت مخلوط شده و درون چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته، سپس در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. عدد جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد (۱۶).

به منظور تعیین محدوده وزنی فراکشن‌های به دست آمده، ابتدا نمونه‌ها را با بافر نمونه مخلوط شده و در مدت زمان ۳-۵ دقیقه حرارت غیر مستقیم داده و در ژل پلی اکریل آمید بر اساس روش لاملی الکتروفورز شدند (۱۷). نمونه‌های پروتئینی آماده سازی شده به مقدار ۲۰ میکروگرم در هر چاهک دستگاه تانک عمودی (Bio-Rad) تزریق شده و در جریان ۳۰ میلی آمپر به مدت ۳

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

ساعت الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با رنگ کوماسی آبی R۲۵۰ صورت گرفت.

در این مرحله برای خلوص بیشتر ، مقدار ۱ میلی گرم از فراکشن شماره ۳، به دستگاه FPLC (شرکت GE – مدل ۱۰ AKTA) و ستون Mono Q (شرکت GE آمریکا – طول و قطر: ۱۰ cm و ۱/۶ cm) تزریق شد (سرعت جریان 1ml/min).

در کروماتوگرافی تعویض یونی در مرحله اولیه، پروتئین‌هایی که جذب ستون آنیونی نشده باشند از ستون خارج شده و پس از خروج کامل این دسته از پروتئین‌ها، با استفاده از شیب غلظت (گرادیان نمک) NaCl از صفر تا ۱ مولار با pH: ۷ در مدت ۶۰ دقیقه، پروتئین‌های متصل بر روی ستون آنیونی از ستون جدا شدند. جذب فراکشن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر و منحنی جذب آن ثبت شد. سپس به منظور نمک زدایی از فراکشن، دیالیز نمونه‌ها توسط لوله فالکن دیالیز (Milli pore) با kDa ۳ : cut off انجام و سپس به روش شرح داده شده فوق لیوفلیزه شد. دوباره اندازه گیری مقدار پروتئین با استفاده از کیت BCA مطابق روش ذکر شده، انجام پذیرفت و الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS- PAGE) بر اساس روش لاملی انجام شد.

جهت کشت و نگهداری رده‌های سلولی، سلول سرطانی ملانوما B۱۶F۱۰ و سلول نرمال HEK ۲۹۳ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (Gibco) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) ، محلول پنی‌سیلین ۱۰۰ U/ml - استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و ۲ mM – L گلوتامین کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه و در مجاورت ۵٪ CO_2 نگهداری شدند و هر سه روز یک بار محیط کشت آنها تازه گردید (۱۹،۱۸).

فراکشن‌های به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی، از نظر قدرت ضد چسبندگی بر روی سلول های رده B۱۶F۱۰ بررسی گردید. برای این منظور تعداد ۲×۱۰^۴ سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه منتقل شد و یک گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. از هر فراکشن از ۶ تا ۰/۱۸ (µg/µl) به هر یک از چاهک های گروه تست اضافه گردید. بعد از طی مدت زمان یک الی دو ساعت محلول رویی برداشت شده و سلول‌های چسبیده شده به کف میکروپلیت و همچنین سلول‌های محلول رویی با اضافه کردن رنگ تریپان بلو شمارش سلولی و بررسی گردید و به این ترتیب فراکشن موثر جهت تست MTT انتخاب گردید.

بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی فراکشن کاندید به روش رنگ سنجی، با استفاده از MTT انجام شد (۲۰). اساس این روش بر پایه فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است، در این روش محلول زرد رنگ MTT به کریستال های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌شود و پس از حل شدن در DMSO می‌توان آنها را در دستگاه الایزا ریدر مورد بررسی و سنجش قرار داد (۲۱).

سلول‌های سرطانی ملانوما رده B۱۶F۱۰ و شاهد رده ۲۹۳ HEK در فلاسک کشت داده و تکثیر شدند. پس از رشد سلول‌ها به کمک Tripsin-EDTA از فلاسک جدا شده و بعد از سانتریفوژ و شمارش، تعداد ۲۰ هزار سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و همچنین یک گروه به عنوان کنترل مشخص گردید. بعد از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف میکروپلیت، غلظت‌های مختلف از فراکشن‌ها از ۶ تا ۰/۱۸ (µg/µl) به هر یک از چاهک‌های گروه تست اضافه گردید. بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط (دستگاه Epoch شرکت BioTek آمریکا) ثبت گردید. 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 (۲۲، ۲۳).

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

در پایان همولیز فراکشن ضد سرطانی را مورد بررسی قرارگرفت. میزان ۲٪ از سوسپانسیون گلبول قرمز انسان به میکروپلیت افزوده و میزان آزاد شدن هموگلوبین در طول موج nm ۵۴۰ را بررسی کردیم. از ۶ تا ۰/۱۸ (µg/µl) از فراکشن۲ F به روش رقیق سازی متوالی در میکرو پلیت ۹۶ خانه را آماده گردید.

کنترل منفی : نرمال سالین و RBC دو درصد

کنترل مثبت: ترایتون ۱۰۰ X- یک درصد و RBC دو درصد

با استفاده از فرمول زیر درصد همولیز محاسبه می‌شود:

درصد همولیز= (جذب نوری کنترل منفی- جذب نوری نمونه) / (جذب نوری کنترل منفی-جذب نوری کنترل مثبت) ۱۰۰x

روش آماری

نتایج بر اساس میانگین± انحراف معیار با استفاده از نرم افزار آماری۱۶ SPSS گزارش شده‌اند. جهت تحلیل آماری داده‌ها از آزمون student t-test استفاده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

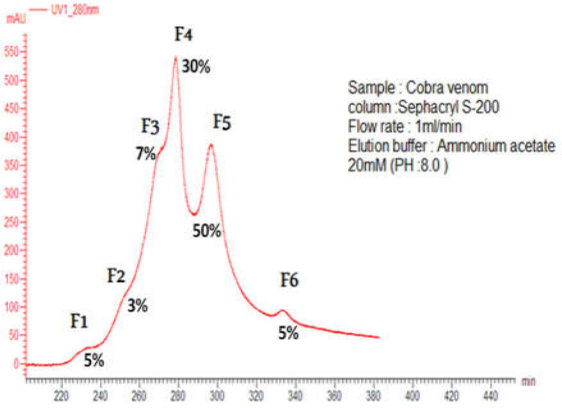
یافته‌ها

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۲۰۰ میلی گرم زهر مار کبری ایرانی در (شکل ۱) نشان داده شده است.

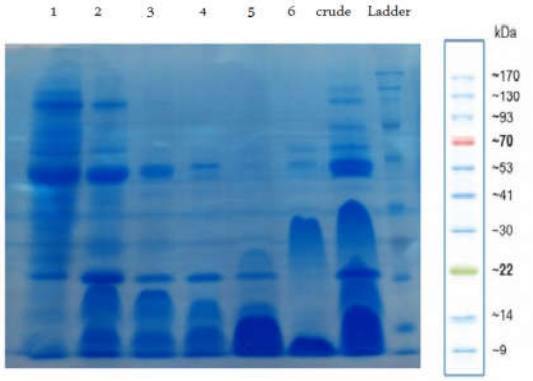
نتایج الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی فراکشن هدف تخلیص شده و پروتئین استاندارد به کار گرفته شده برای

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

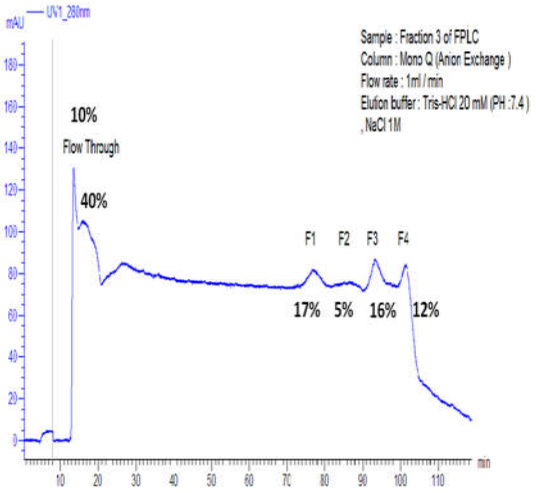
تعیین وزن مولکولی بر روی SDS-PAGE در (شکل ۲) نشان داده شده است.



شکل ۱. فراکشن‌های به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر مار کبری ایرانی. ۶ فراکشن مشاهده و جمع آوری شد.



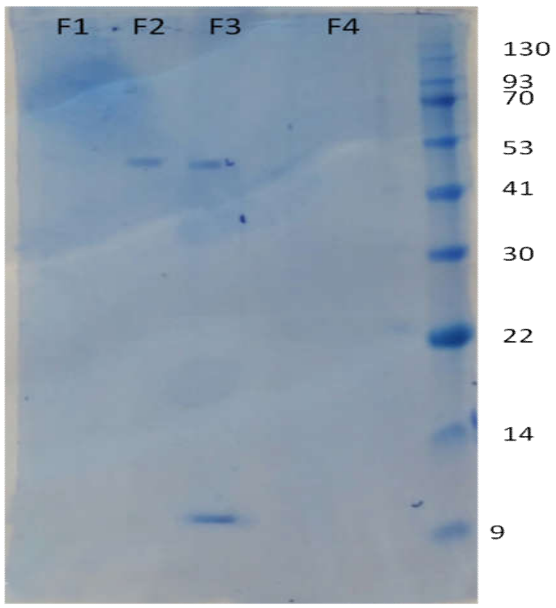
شکل۲. تعیین وزن زهر خام مار کبری ایرانی و فراکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪



شکل ۳. فراکشن‌های به دست آمده با روش کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون Mono Q)

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 ۲۰ الی ۴۰ کیلودالتون، جهت جداسازی و تخلیص بعدی به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد. فراکشن ۳ به علت داشتن خاصیت کشندگی سلول‌های سرطان ملانوما رده ۱۶F۱۰ B جهت کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی ستون Mono Q برده شد که در این مرحله ۲۵۰ میکرولیتر از این فراکشن که حاوی ۱ میلی گرم پروتئین بود به ستون تزریق شد که نتایج حاصل از این کروماتوگرافی در (شکل ۳) قابل مشاهده‌اند.

وزن مولکولی فراکشن هدف از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE در حدود ۴۷ کیلو دالتون بر آورد شد (شکل ۴).



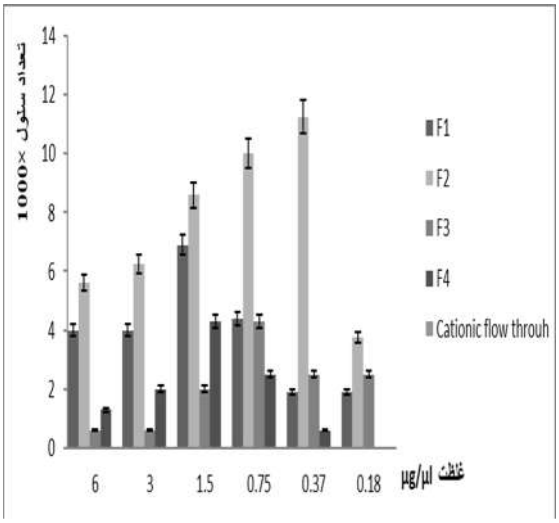
شکل ۴. SDS-PAGE فراکشن۲ F حاصل ازکروماتوگرافی تعویض یونی

نتایج بررسی اثر ضد چسبندگی فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در (شکل ۵) آمده است.

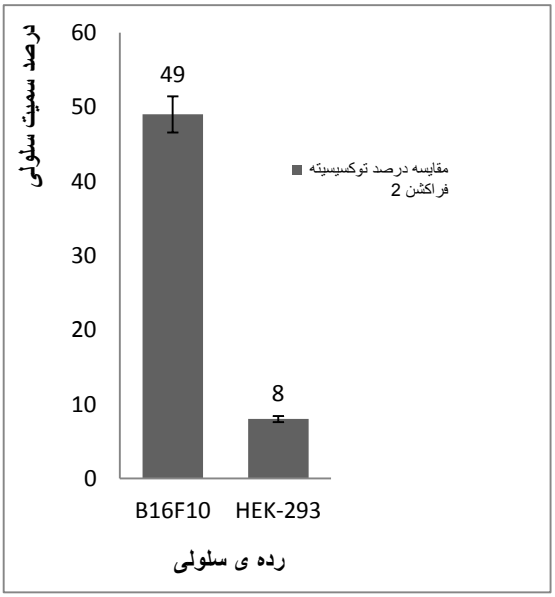
یافته‌های حاصل از ارزیابی اثر فراکشن ۲ F به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی درغلظت‌های مختلف ۶ تا ۰/۱۸ (µg/µl) بر روی سلول نرمال HEK-۲۹۳ و سلول-های سرطان ملانوما رده B۱۶F۱۰ در (شکل ۶) بیانگر

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

این مهم است که فراکشن F۲ بر روی سلول‌های سرطان ملانوما رده B۱۶F۱۰ نسبت به سلول‌های نرمال (HEK-۲۹۳) در غلظت µg/µl ۰/۳۷، دارای اثر سایتوتوکسیسیتی بیشتری بود.



شکل ۵. بررسی و انتخاب قوی‌ترین فراکشن ضد چسبندگی حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی فراکشن ۳ F. بیشترین اثر ضد چسبندگی مربوط به فراکشن‌های ۲ و ۱ بود و فراکشن ۲ بیشترین اثر را از خود نشان داد. مقادیر به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند. ($p\leq ۰/۰۵$)



شکل۶. مقایسه درصد سمیت سلولی فراکشن ۲ F در تست MTT بر رده سلول سرطانی پوست و سلول شاهد HEK- ۲۹۳ انسانی. مقادیر به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند. ($p\leq ۰/۰۵$)

در بررسی فعالیت همولیتیک نیزبا توجه به اینکه OD کنترل منفی با تمام غلظت‌های مورد آزمایش برابر بود، بنابراین هیچ گونه فعالیت همولیتیک مشاهده نشد.

بحث

در سلول‌های سرطانی تنظیم تکثیر سلولی از کنترل خارج شده سلول می‌تواند از روند طبیعی مرگ و آپوپتوز فرار کند. این ویژگی جدید، سبب مهاجرت سلول‌های سرطانی به مناطق نابجا شده و بعد از چسبیدن تکثیر یافته و سبب ایجاد تومور می‌شوند (۲۴). شایع‌ترین نوع سرطان پوست، غیرملانومی است، که حداقل ۲ الی ۳ میلیون نفر در سال به آن مبتلا می‌شوند (۲۶، ۲۵). عوارض شدید شیمی درمانی سبب ناامیدی بیماران شده و تقریبا اکثر مبتلایان، این روش درمانی را با ترس و نگرانی از روند بهبودی قبول می‌کنند. نارضایتی بیماران از روند موجود، منجر به تلاش محققین جهت کشف داروهای ضد سرطان جدید شده است. با کشف مکانسیم‌های مولکولی سرطان از جمله آپوپتوز و متاستاز، مجددا تحقیقات در این زمینه با دقت بیشتر شروع شد. در حال حاضر محققین زیادی در حال بررسی اثر ترکیبات سمی و غیر سمی ضد سرطانی به دست آمده از زهر جانداران سمی هستند (۲۷). دیس اینتگرین‌های موجود در زهر مارها دارای افینیتی بالایی جهت چسبیدن به اینتگرین‌ها هستند. اینتگرین‌ها مولکول‌های پروتئینی هستند که به طور طبیعی در سطح سلول‌های متحرک بدن وجود داشته و ابزار حرکتی آنها هستند. این مولکول‌ها را می‌توان در غشای پلاسمایی نوتروفیل‌ها، مونوسیت، سلول‌های اندوتلیال و سایر سلول‌ها یافت. تجمع اینتگرین بر روی سلول‌های عادی بسیار کمتر از سلول‌های متحرک است. در بعضی از سرطان‌ها بیان ژن اینتگرین‌ها به صورت نابجا افزایش می‌یابد و لذا سلول به صورت غیرطبیعی می‌تواند دارای ویژگی تحرک بوده و از بستر خود جدا شده و به مناطق اطراف مهاجرت کند (۲۹،۲۸). به دلیل اثبات وجود مولکول‌های Disintegrin در زهر خانواده مارهای کبری، این تحقیق جهت یافتن یک فراکشن ضد متاستاز با خاصیت ضد سرطانی هدف گذاری شد (۲۹). لیانگ ژانگ و لیجون وی، مطالعه‌ای بر روی مار Agkistrodonacutus و بررسی روند القای آپوپتوز در سرطان دهانه رحم انجام دادند و به نتایج قابل قبول و اثر مطلوب سم مار بر روند القای آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم دست یافتند. با این حال به دلیل عدم استفاده از سلول نرمال

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

شاهد، نمی‌توان نتیجه‌ای جامع از این تحقیقات به منظور دست یابی به اطلاعات تکمیلی جهت انجام مطالعات فارماکولوژیک به دست آورد (۳۰). در سال ۲۰۱۶، OnsZakraui و همکارانش به بررسی اثر لبئین حاصل از ونوم مار Marcroviperalebetina روی سلول‌های سرطانی کولون انسانی به صورت *in vivo* و *in vitro* پرداختند. در این بررسی نتایج مشابهی مشاهده گردید و لبئین که نوعی دیس اینتگرین است باعث مرگ ۵۶ درصدی سلول و القای آپوپتوز، کاهش چسبندگی و مهاجرت سلولی در سلول‌های LS ۱۷۴ و همچنین مانع گسترش آدنوکارسینومای کولون انسانی در موش گردید (۳۱). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۶ آنتونی ساویولا و همکارانش اثر Tzabcanin استخراج شده از سم مار زنگی آسیای میانه (C.simustzabcan) را روی سلول‌های سرطانی ملانوماA۳۷۵ و ریهA۵۴۹ مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثر سایتوتوکسیسیتی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. Tzabcanin در بروز اثر ضد چسبندگی نیز با شکست مواجه شد، ولی توانست در ممانعت از مهاجرت سلولی موفق عمل کند (۳۲).

نتایج مطالعه ما بر روی زهر مار کبری ایرانی نشان داد که فراکشن‌های به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی دارای اثرات ضد سرطانی به صورت اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطان پوست رده B ۱۶F۱۰ است، در حالی که بر سلول‌های نرمال فیبروبلاست، دارای حداقل اثرات سمیت سلولی است و با توجه به این نتایج می‌توان به بررسی فعالیت ضدسرطانی پروتئین نوترکیب حاصل از فراکشن هدف و همچنین بررسی و انجام مطالعه بیشتر در مرحله *In vivo* در مدل حیوانی بر روی سلول‌های سرطانی رده B ۱۶F۱۰ در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج به دست آمده از پایان نامه دانشجویی خانم هدیه فرج پور مقدم برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته سم شناسی است. بدین وسیله، از انستیتو پاستور تهران به دلیل اجرای پروژه و استفاده از کلیه امکانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور و جناب آقای دکتر کامران پوشنگ باقری به جهت حمایت و راهنمایی ایشان سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2018;68:394-424.

2.Henley SJ, Singh SD, King J, Wilson R, O'Neil ME, Ryerson AB. Invasive cancer incidence and survival—United States, 2011. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015;64:237.

3.Dubas LE, Ingraffea A. Nonmelanoma skin cancer. Facial Plast Surg Clin North Am 2013;21:43-53.

4.Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. A Cancer Journal for Clinicians 2019; 69:7-34.

5.Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliverio S, Carlomosti F, et al. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16–F10 melanoma cells. Life Sci 2010;87:316-24.

6.Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 2017;542:115.

7.DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2014;64:252-71.

8.Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board. Fulfilling the Potential of Cancer Prevention and Early Detection. Curry SJ, Byers T, Hewitt M, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003.

9.Simões M, Sousa J, Pais A. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. Cancer Lett 2015;357:8-42.

10.Vyas VK, Brahmbhatt K, Bhatt H, Parmar U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. Asian Pac J Trop Biomed 2013;3:156-62.

11.Ahn MY, Lee BM, Kim YS. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (Ophiophagus hannah). Int J Biochem Cell Biol 1997;29:911-9.

12.Collares-Buzato CB, Le Sueur LdP, da Cruz-Höfling MA. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by Bothrops moojeni snake venom in cultured renal tubular epithelia. Toxicol Appl Pharmacol 2002;181:124-32.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]

13.Lucena S, Castro R, Lundin C, Hofstetter A, Alaniz A, Suntravat M, et al. Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. Toxicon 2015; 93: 136 -43.

14.Badr G, Al-Sadoon MK, Rabah DM. Therapeutic efficacy and molecular mechanisms of snake (Walterinnesia aegyptia) venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer-and prostate cancer-bearing experimental mouse models. Free Radic Biol Med 2013; 65:175-89.

15.Abubakar M, Sule M, Pateh U, Abdurahman E, Haruna A, Jahun B. In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of Guiera senegalensis. J Ethnopharmacol 2000;69:253-7.

16.Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pt, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350-6.

17.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680.

18.Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: Cree IA, Editor. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Totowa, NJ: Springer; 2011. p. 237-45.

19.Cree IA. Cancer cell culture: methods and protocols. Humana Totowa, NJ: Springer; 2011.

20.Buch K, Peters T, Nawroth T, Sänger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-A comparative study. Radiat Oncol 2012;7:1.

21.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

22.Masters R. Animal cell culture, Cytotoxicity and viability assays. J Immunol Methods 2000; 71:202-3.

23.Shang Z-J, Li Z-B, Li J-R. In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma: a preliminary study. Int J Oral Maxillofac Surg 2006;35:539-43.

24.Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. New York: McGraw-Hill Education; 2017.

25.Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, Coldiron BM. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population, 2012. JAMA Dermatol 2015;151:1081-6.

26.Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. Adv Exp Med Biol. 2008;624:89-103.

27.Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol Ther 2007;115:246-70.

28.Chessum N, Jones K, Pasqua E, Tucker M. Recent advances in cancer therapeutics. Prog Med Chem. 2015;54:1-63.

29.Thangam R, Gunasekaran P, Kaveri K, Sridevi G, Sundarraj S, Paulpandi M, et al. A novel disintegrin protein from Naja naja venom induces cytotoxicity and apoptosis in human cancer cell lines in vitro. Process Biochemistry 2012;47:1243-9.

30.Torii S, Yamane K, Mashima T, Haga N, Yamamoto K, Fox JW, et al. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. Biochemistry 2000;39:3197-205.

31.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. Mol Carcinog 2017;56:18-35.

32.Saviola AJ, Burns PD, Mukherjee AK, Mackessy SP. The disintegrin tzabcanin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells. Int J Biol Macromol 2016; 88:457-64.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.4.8]

[DOI: 10.61186/iau.33.2.143]