مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۴، زمستان ۹۰، صفحات ۲۳۸ تا ۲۴۳

Original Article

بررسی سیتوتوکسیسیته ICD-85 (ترکیب پپتیدی مشتق ازسم مار و عقرب) روی سلول سرطانی میلوئیدی HL-60

زهرا شهرام‌یار[۱]، عباس زارع میرک آبادی[۲]، حسن مروتی[۳]

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
[۲] دانشیار، بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
[۳] کارشناس ارشد، بخش کنترل کیفی فراورده های بیولوژیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

چکیده

سابقه و هدف: *مطالعات قبلی روی ICD-85 (پپتید مشتق از زهر مار و عقرب)که توسط محققین موسسه سرم سازی رازی استخراج شده است، اثر مهاری این ترکیب را در گروه سلول‌های سرطانی پستان (MDA-MB 231) نشان داد. این تحقیق به منظور روشن شدن مکانیسم اثر ICD-85 روی سلولهای سرطانی HL-60 صورت گرفته است.*

روش بررسی: *ابتدا سیتوتوکسیسیته ICD-85 روی سلول HL-60 توسط تست MTT تعیین شد و تغییرات مرفولوژیکی حاصل از ICD-85 در سلول‌هایی که به مدت۲۴ ساعت در معرض این ترکیب قرار گرفتند، زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. سپس میزان LDH آزاد شده در محیط سلول‌هایی که تحت تاثیر ICD-85 قرار گرفته بودند، اندازه‌گیری شد.*

یافته‌ها: *مقدار IC_{50} پس از افزودن غلظت‌های مشخص از ICD-85 (۴۰، ۴، ۰/۴، ۰/۰۴، ۰/۰۰۴ تا ... ۴×۱۰^{-۱۵} میکروگرم در میلی-لیتر) به مدت۲۴ ساعت به سلول HL-60 برابر با ۰/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. هم‌چنین این سلول‌ها در مقایسه با سلول-های کنترل که در معرض ICD-85 قرار نگرفته بودند، زیر میکروسکوپ الکترونی تغییرات قابل توجهی از جمله کوچک شدن نسبت هسته به سیتوپلاسم، جمع شدن سیتوپلاسم، متراکم شدن محتویات هسته‌ای، افزایش واکوئول‌های سیتوپلاسمی، تشکیل اجسام آپوپتوتیک و تخریب میتوکندری مشاهده شد. دراندازه‌گیری میزان LDH هیچ تغییر معنی‌داری در میزان LDH آزاد شده در غلظت-های مختلف سم در مقایسه با سلول کنترل مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *تحقیق حاضر اثر ضد رشد ترکیب ICD-85 روی سلول HL-60 را نشان داد.*

واژگان کلیدی: *ICD-85، HL-60، MTT، سیتوتوکسیسیته، IC_{50}.*

مقدمه

نگرانی که باعث شده است امروزه سرطان به عنوان یک معضل در سطح جهان مطرح شود و مبارزه با آن جزو اولویت‌های بهداشتی- درمانی قرار گیرد، رشد رو به افزایش تعداد مبتلایان به این بیماری در سطح جهانی، به ویژه در کشور ما می‌باشد. آپوپتوز مجموعه‌ای از رویدادهای مرگ سلولی است که منجر به ایجاد تغییرات خاص در الگوی مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌شود (۱). عدم وجود آپوپتوز، منجر به تظاهرات مختلفی از قبیل سرطان، بیماری‌های خودایمنی و عفونت‌های ویروسی می‌گردد. سرطان‌هایی مانند لوسمی، لنفوم و لوسمی ناشی از ویروس HTLV1 از موارد شناخته شده نقص در آپوپتوز می‌باشند (۲، ۳) آپوپتوز همان مرگ برنامه‌ریزی شده است که سلول بدون

آدرس نویسنده مسئول: کرج ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، بخش کنترل کیفی، زهرا شهرام‌یار
(**email**: zshahramyar@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۴

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]

از دست دادن غشا و اجزای خود از بین می‌رود ولی شرایط فیزیولوژیکی نرمال است. آپوپتوز توسط اندونوکلئازها انجام می‌گیرد (۳، ۴). یکی از خصوصیات مهم داروهای ضد سرطان اثر سیتوتوکسیک آن روی سلول‌های سرطانی است. تحقیقات مختلف دانشمندان حاکی از آن است که بعضی از عوامل سیتوتوکسیک در زهر جانور ان سمی مانند مار و عقرب وجود دارد (۵، ۶). Kikuchi و همکارانش در سال۱۹۸۳-۱۹۸۲ ثابت کردند ترکیب استخراج شده از Clavularia viridis با نام کلاولون می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی خون (HL-60) که در فاز G1 قرار دارند را متوقف و رشد سلول‌هایی که در فاز S قرار دارند را کاهش دهد و اینها توسط سنجش سیتوتوکسیسیته و آزمایش MTT و و DNA ژل الکتروفورز و روش TUNEL به اثبات رسیده است. Lian – Kun Sun و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به وسیله سم عروس دریایی (cqtx (Chiropsalmus Quadrigatus toxins) توانستند در سلول‌های عصبی و قلبی- عروقی آپوپتوز را القا کنند (۷) .

در سال ۱۹۶۷ ثابت شد زهر مار کبری روی سلول‌های سرطانی اثر سیتوتوکسیک دارد (۵). همچنین در سال ۱۹۹۶ مشخص شد زهر مار *Bothrops jararaca* و *Crotalus durissus terrificus* به طور مستقیم روی سلول‌های توموری تاثیر می‌گذارد (۸).

اثر سیتوتوکسیک و فعالیت کمی و کیفی و بیولوژیکی و دارویی ترکیب پپتیدی ICD-85 در سال ۱۳۸۷ روی سلول سرطان پستان MDA-MB-231 مورد مطالعه قرار گرفت (۹). همچنین در مطالعاتی که در شرایط in vivo صورت گرفت نیز اثر سرکوب تومور پستان در موش‌های آزمایشگاهی توسط ICD-85 تائید شد (۱۰). اما با وجود این تحقیقات همچنان مکانیسم حقیقی ICD-85 تاکنون ناشناخته مانده است، لذا تحقیق حاضر جهت تشخیص مکانیسم اثر ترکیب بر روی سلول سرطان خون HL-60 است.

مواد و روشها

ترکیب ICD-85

بخش فعال ICD-85 ترکیبی از سه پپتید با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون است که از سم مار قهوه‌ای ایرانی (Agkistrodon Halys) و عقرب زرد (Hemiscorpius lepturus) در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی توسط نویسنده (عباس زارع میرک آبادی) در سال ۱۳۸۵ استخراج و تهیه گردید.

کشت سلول

سلول HL-60 کروی و دارای یک هسته درشت، مشخص و به صورت سوسپانسیون بود. زمان دو برابر شدن سلول ۲۴ ساعت بود و پس از رسیدن تعداد سلول‌ها به حد مناسب و رسیدن آنها به فاز لگاریتمی رشد، مورد استفاده قرار گرفت.

سلول در محیط RPMI 1640 با مکمل ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی (FBS) و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، استرپتومایسین و ۲ میکرومول L–گلوتامین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد هوا نگهداری شد (۱۱).

اندازه‌گیری زنده بودن و تکثیر سلول با روش MTT (MTT Assay) و تعیین IC_{50}

ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲۵۰۰۰۰ سلول درمیلی لیتر (cell/ml) در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی ریخته شد و با ۱۰۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف ترکیب ICD-85 (۴۰، ۴، ۰/۴، ۰/۰۴، ۰/۰۰۴ تا ..... $۱۰^{-۱۵}$ × ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون۱۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از MTT به هر چاهک اضافه و در تاریکی انکوبه گردید.

پودر MTT همان ترکیب (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)2,5 diphenyl tetrazolium bromide) است. در جریان آزمایش، آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده، نمک تترارولیوم را می‌شکافد و به کریستال فورمازان بنفش غیر قابل حل تبدیل می‌کند. مقدار فورمازان تولیدی با تعداد سلول‌های زنده حاضر متناسب است (۱۲). این کریستال‌ها در DMSO یا ایزوپروپانول با HCL 0.1N حل می‌شود (اگر احیانا سلول‌ها لیز نشدند، ۱۰ درصد تریتون X-100 به ایزوپروپانول اضافه می‌کنیم). سپس مقدار رنگ یا optical density (OD) به وسیله Elisa reader به صورت کمی در می‌آید. آزمایش MTT به هر دو مورد تعداد سلول‌های موجود و فعالیت میتوکندریایی هر سلول بستگی دارد (۱۱). در انتها IC50 یا غلظتی از دارو که جذبی برابر نصف کنترل تولید می‌کند یا به بیانی دیگر غلظتی از دارو که ۵۰ درصد مهار در رشد سلول ایجاد می‌کند طبق فرمول زیر محاسبه شد.

کنترل OD/ نمونه تصحیح شدهOD) – ۱۰۰ = درصد مهاری (100× تصحیح شده

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]

اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز آزاد شده

سنجش کمی سیتوتوکسیسیته بر اساس آزادسازی LDH استوار است که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ICD-85 (۴۰-۴-۴ ۰/۰ -۴ ۰/۰۰ –..... تا ۴×۱۰^{-۱۵} میکروگرم در میلی‌لیتر) محاسبه شد.

لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوزولی حل شدنی است که در اغلب سلول‌های یوکاریوت حضور دارد و از غشای پلاسمایی سلول‌های مرده و آسیب دیده (نکروتیک) آزاد می‌شود. افزایش فعالیت LDH در سوپرناتانت متناسب با تعداد سلول-های لیز شده است. LDH تبدیل پیروات به لاکتات را کاتالیز می‌کند و در جریان آن NADH به NAD^+ اکسید می‌شود. به دلیل آنکه سرعت کاهش NADH متناسب با فعالیت LDH می‌باشد، تشکیل NADH در واکنش جفت شونده در جایی که نمک تترازولیوم INT به محصول فورمازان قرمز تبدیل می‌شود، به روش کینتیک اندازه‌گیری می‌گردد (۱۳).

$$\text{Pyrovate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactate} + NAD^+$$

بررسی تغییرات سلولی در زیر میکروسکوپ الکترونی

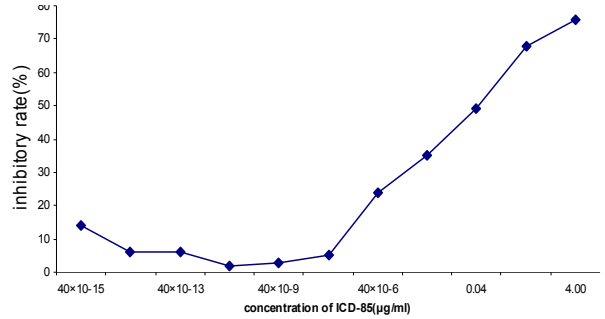
نمونه‌های حاوی سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف ICD-85 انکوبه شد و به وسیله سانتریفوژ پلت و با گلوتارالدئید ۲/۵ درصد و پارافرمالدئید ۲ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار فیکس گردید. سپس مجددا با اسمیوم تتروکسید ۱ درصد فیکس شد و پس از عمل‌آوری و مقطع گیری برای مشاهده زیر میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

یافته‌ها

اثر ICD-85 روی رشد و تکثیر سلول‌های HL-60

اثر ICD-85 روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HL-60 به وسیله آزمایش MTT تعیین شد. ICD-85 به طور معنی‌داری رشد سلولهای سرطانی HL-60 را در غلظت‌های کم مهار کرد و پس از سه بار تکرار این آزمایش، مقدار IC50 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ۰/۰۱۵±۰/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار پایین IC50 نشان دهنده توانایی بالای ضد رشد و تکثیر ICD-85 در سلول سرطانی HL-60 می‌باشد.

همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در غلظت ۴×۱۰^{-۱۵} از ترکیب ICD-85 درصد مهاری رشد ۱۴درصد بود. ازاین غلظت تا غلظت ۴×۱۰^{-۱۱} به دلایل نامشخص به تدریج درصد مهاری رشد کاهش یافت و به حدود صفر رسید و پس از آن مجددا درصد مهاری افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهاری رشد ۱۰۰ درصدمشاهده شد.

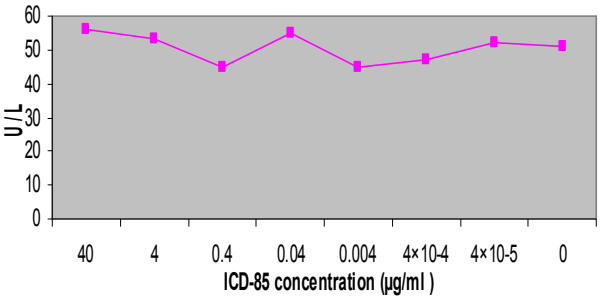


نمودار۱- درصد مهاری غلظت‌های مختلف ICD-85 روی سلول HL-60

اثر ICD-85 در فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)

اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تحت غلظت‌های مختلف سم آشکار کرد که در سطح آنزیم LDH آزاد شده هیچ تغییر معنی‌داری نسبت به سلول کنترل ایجاد نشده است.

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌کنیم میانگین فعالیت آنزیم LDH در همه سلول‌هایی که در معرض ICD-85 قرار گرفتند مانند نمونه کنترل U/L ۵۲±۳/۵۰ اندازه‌گیری شد و هیچ تغییر معنی‌داری در آنها مشاهده نشد. سطح LDH تغییر نیافته می‌تواند به عنوان اندیکاتوری باشد که مرگ سلولی دررده سلولی HL-60 مربوط به شوک نکروتیک نیست.



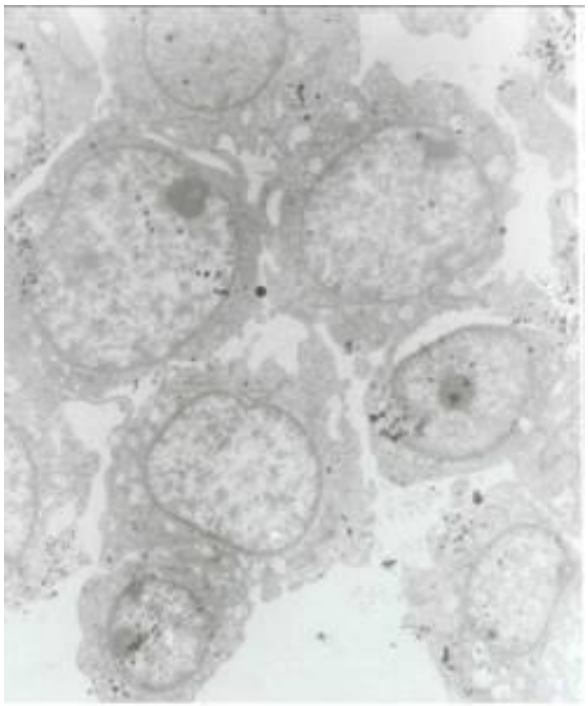
نمودار ۲- میزان LDH آزاد شده از سلول‌های در معرض غلظت‌های مختلف ICD-85

اثر ICD-85 روی مرفولوژی سلول

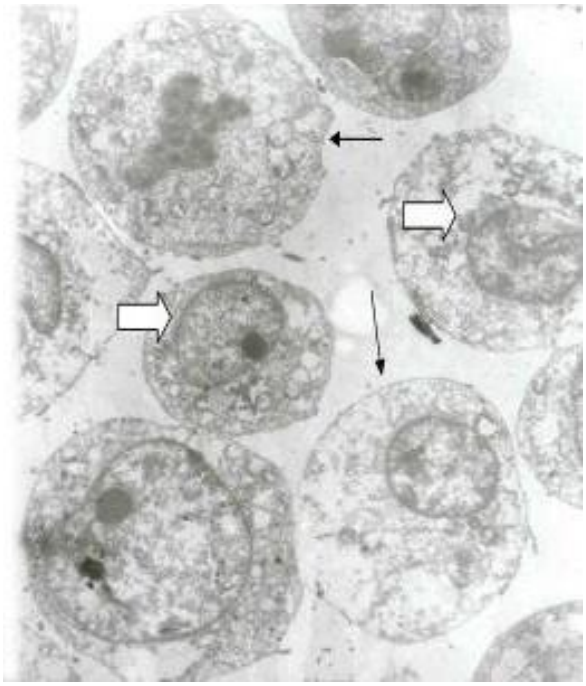
برای تعیین اثرات مرفولوژیکی ICD-85 ،گروهی از سلول‌هایی که ۲۴ ساعت در معرض سم قرار گرفتند، زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده و با گروه کنترل مقایسه گردید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در سلول‌هایی که در معرض سم قرار گرفته‌اند، کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم، افزایش واکوئولهای سیتوپلاسمی، تراکم مواد هسته‌ای، رقت شبکه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]

آندوپلاسمی، کاهش کانال‌های سیتوپلاسمی در مقایسه با سلول کنترل اتفاق افتاده است ولی غشا سالم است. بنابراین این نتایج به این مطلب اشاره می‌کند که ICD-85 قادر است تغییرات مرفولوژیکی مشخص آپوپتوتیک را در سلول HL-60 القا کند.



الف



ب

شکل ۱- نمای میکروسکوپی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ الکترونی. الف- سلول‌های کنترل که در معرض سم قرار نگرفتند؛ ب- سلول‌هایی که در معرض سم قرار گرفتند.

بحث

گزارشات نشان می‌دهند که زهر مار با وجود اجزا و ترکیبات مختلف خود، پتانسیل قوی در درمان بیماری‌های انسانی دارد (۱۴). تعادل بین اثرات دارویی و سمی یک ترکیب، پارامتر مهمی است که توانایی کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند. بنابراین داروهای جدید باید با یک طراحی خوب مورد ارزیابی قرار گیرند تا ویژگی‌های سمی و دارویی آنها به درستی مشخص شود (۱۵).

در تحقیق حاضر از روش MTT جهت بررسی سمیت سلولی استفاده شد. تکنیک MTT به وسیله Mosmann به عنوان روشی سریع و حساس بر اساس سنجش کالریمتریک برای بررسی سیتوتوکسیسیته داروهای ضد سرطان، در محیط In vitro ارائه شد. این روش بسیار سریع، دقیق و مطمئن در بررسی و تعیین درصد سلول‌های زنده در آزمایش‌های مختلف می‌باشد و از طرفی توسط این روش می‌توان به مقاومت دارویی ایجاد شده در افراد سرطانی بعد از شیمی درمانی پی برد و از تجویز بی‌مورد داروهای سیتوتوکسیک که اثرات جانبی زیادی دارند، جلوگیری کرد (۱۷،۱۶) . به وسیله اندازه گیری سیتوتوکسیسیته (Cytotoxicity assay) می‌توان سلول‌ها و اجسام آپوپتوتیکی که در غشای پلاسمایی سالم باقی می‌مانند را مشخص کرد. این تست همچنین جهت تفکیک نکروز و آپوپتوز به کار می‌رود و در این تست سلولی زنده فرض می‌شود که دارای چرخه تنفسی میتوکندریایی و غشای میتوکندریایی سالم باشد (۹).

در تحقیق حاضر ابتدا توسط آزمایش MTT اثر سیتوتوکسیک ICD-85 تائید شد. در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ICD-85 ۱۰۰ درصد مهار رشد و در غلظت ۴۰×۱۰^{-۱۱} میکروگرم در میلی‌لیتر از ICD-85 درصد مهار رشد مانند سلول کنترل و صفر درصد مشاهده شد. IC_{50} (غلظتی از دارو که جذبی برابر نصف کنترل تولید می‌کند یا به بیانی دیگر غلظتی از دارو که ۵۰ درصد مهار در رشد سلول القا می‌کند) برابر با ۰/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. وقتی تعداد سلول‌ها در هر چاهک کمتر از ۲۵۰۰۰ سلول بود، پس از ریختن ایزوپروپانول واکنش‌هایی که منجر به تشکیل رنگ بنفش می‌شد به طور کامل انجام نمی‌گرفت و تفاوت رنگ محسوسی بین چاهک‌ها دیده نمی‌شد و لذا، OD قرائت شده توسط دستگاه Elisa reader قابل قضاوت گذاشته شود. بنابراین ما از تعداد ۲۵۰۰۰ سلول در هر چاهک استفاده کردیم. نکته‌ای که در این تست رعایت شد این بود که پس از

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]

افزودن ترکیب ICD-85 بـه سـلول و گذشـت ۲۴ سـاعت بـه وسیله سانتریفیوژ دارو خـارج شـد و بـه سـلولها بـه مـدت ۴ ساعت اجازه تکثیر داده شد تا بین سلول‌های زنـده همـراه بـا قدرت تکثیر و سلولهای زنده بدون قـدرت تکثیـر تمـایز قائـل شویم.

نتایج اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیـدروژناز سـلول‌هـا، پـس از اینکه ۲۴ ساعت در مجـاورت غلظـت‌هـای مختلـف سـم قـرار گرفتند نشان داد که هیچ افزایش معنـی‌داری در میـزان LDH نسبت به سلول کنتـرل وجـود نـدارد. LDH در شـرایطی آزاد می‌شود که غشای سلول پاره و تخریب شود و آزاد شدن LDH و آسیب غشای پلاسـمایی از اختصاصـات سـلولهای نکروتیـک است (۱۸،۱۳).

سنجش میزان نشت LDH بر اساس آزاد شدن آنزیم به داخل محیط سلول پس از آسیب به غشای سلول می‌باشد، در حـالی که سنجش MTT عمدتا براساس تغییر آنزیمی در میتوکندری است. Karthikeyan و همکارانش اثر سیتوتوکسیک سم مـار را به وسیله سنجش میزان LDH در سـلول هـای Hela و Hep2 پس از اینکـه در معـرض ۴/۱۸ میکروگـرم سـم قـرار گرفتنـد محاسبه کردند و متوجه شدند که در میزان LDH کاهش ۱/۵ درصـدی وجـود دارد. کـاهش LDH آزاد شـده نشـان داد کـه سلول‌ها عملکرد طبیعی دارند، یعنی غشـای پلاسـمایی سـالم است و مکانیسم عمل سم بر علیه سلول سـرطانی بـه صـورت نکـروز نیسـت (۱۸). از ایـن رو سـطح LDH تغییـر نیافتـه، می‌تواند به عنوان اندیکاتوری باشـد کـه مـرگ سـلولی در رده سلولی HL-60 مربوط به شوک نکروتیک نیست.

اگرچه این با مطالعات قبلی که افـزایش سـطح LDH را وقتـی سلول‌های MDA-MB231 در معرض ICD-85 قـرار گرفتنـد، مشاهده شده بود، مغایرت داشت اما شاید علت تنوع در نتایج، تفاوت در رده‌های سلولی، تفاوت درمدت زمانی کـه سـلول در مجاورت سم قرار می‌گیـرد و غلظـت‌هـای مختلـف سـم مـورد استفاده باشد. از طرف دیگر ممکن است افزایش LDH پـس از مـدت طـولانی‌تـری در سـلول آپوپتوتیـک اتفـاق بیفتـد (۳). احتمالا ترکیب ICD-85 در دوزهـای کـم باعـث آپوپتـوز و در دوزهای زیاد باعث نکروزمی‌شود. بنابراین علاوه بر غلظت سـم، فاکتورهای مختلفی تعیین می‌کند که سلول بـه سـمت نکـروز رود یـا آپوپتـوز. برخـی از ایـن فاکتورهـا عبارتنـد از: توانـایی سلول‌ها برای تحمل کردن و پذیرفتن پیچیدگی‌هـای موضـعی غشا و موقعیت متابولیکی سلول‌ها تحت تاثیر پارامترهایی مثل غلظت ATP (۱۹) .

افزایش آگاهی ما در رابطه با پیچیـدگی مـرگ سـلولی توسـط شیمی درمانی می‌تواند چشم‌اندازی برای برنامه‌ریزی‌های آینده درمانی باشـد کـه درآن ممکـن اسـت مـواد سیتوتوکسـیک را همراه با مواد بیولوژیک جهت حمله به مولکول خاص هدف بـه کار برد (۶) .

شاید بتوان در آینـده از ترکیـب پپتیـدی ICD-85 در درمـان بیماران مبتلا بـه لوسـمی اسـتفاده کـرد. داروی ضـد سـرطان ایده‌آل دارویی است که قادر باشد بـه طـور اختصاصـی سـلول سرطانی را بکشد، ولی متاسفانه اغلب داروهای ضد سرطان بـر خلاف داروهای ضـد میکروبـی کـه اثـرات سـمی کمتـری بـر سلول‌های سالم دارند، سلول‌های در حال رشد بدن را نیز مـی کشند. ولی چون زمان دو برابر شدن سلول سالم کوتاه‌تر اسـت و زودتر تقسیم می‌شود، قادر است جای سلول‌های سـرطانی را پر کنند. درمان اساسی سرطان وقتی اتفاق می‌افتد که آخـرین سلول سرطانی موجود قطعا نابود شود. بنابر این درمان سرطان با یک دوره درمان میسر نمی‌شود و نیاز بـه دوره‌هـای متعـدد شیمی درمانی دارد. امروزه تاکید پزشـکان بـر شـیمی درمـانی توام و استفاده از ترکیبات سیتوتوکسیک است تا حداکثر مرگ سلولی ایجاد گردد (۶).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه جناب آقای دکترمحسـن لطـفی مدیریت کنترل کیفی موسسـه تحقیقـات واکسـن و سـرم سـازی رازی و مساعدت ایشان در انجام مراحل تحقیق تشـکر و قـدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Sant Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CGV, Fuly AL, et al. BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from Bothrops jararacussu snake venom. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2008; 151: 443-54.
2. Strydom DJ. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom. Eur J Biochem 1976; 69: 169-76.
3. Barry MA, Eastman A. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca2+ and pH. Biochem Biophys Res Commun 1992; 186: 782-89.
4. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. Stem Cells 1999; 17: 306-13.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]

5. Cancer Control Office, Iranian Ministry of Health. Iranian Annual Cancer Registration Report. Ministry of Health publication; 2005. [In Persian]

6. Elahi M, editor. Chemotherapy in oncology. Tehran: Hamangan publications; 2005. [In Persian]

7. Sun L, Yoshii Y, Hyodo A, Tsurushima H, Saito A, Harakuni T, et al. Apoptosis induced by box jellyfish (Chiropsalmus Quadrigatus) toxin in glioma and vascular endothelial cell lines. Toxicon. 2002; 40: 441-46.

8. Bosmans F, Martin–Eauclaire MF, Tytgat J. The depressant scorpion neurotoxin LqqIT2 selectively modulates the insect voltage –gated sodium channel. Toxicon. 2005; 45: 501-507.

9. Zare Mirakabadi A, Mahdavi S, Koohi MK, Taghavian M. Cytotoxic Effect of ICD-85 (Venom- Derived Peptides) on MDAMB-231 Cell line. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2008; 14: 619-27.

10. Koohi M, Zare Mirakabadi A, Moharrami M, Hablolvarid MH. Anti-cancer effect of ICD-85 (Venom -derived peptides) on MDAMB231 cell line (*in vitro*) and experimental mice with breast cancer (*in vivo*). Int J Vet Res 2009; 3: 49-54.

11. Freshney RI, editor. Culture of animal cells: a manual of Nasic technique. 5th ed. New York: Willey – Liss; 2005

12. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effect of the pH dependence of 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Res 1989; 49: 4435-40.

13. Deker T, Lohmann- Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods 1988; 15: 61-69.

14. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. 2006; 63: 3030–41.

15. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha–toxins. Toxicon 2007; 49: 142-58.

16. Abondanza TS, Olivera CR, Barbosa CM, Pereira FE, Cunha RL, Caires AC, et al. BCL-2 expression and apoptosis induction in human HL-60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium compound RT-04. Food Chem Toxicol 2008; 46: 2540-45.

17. Wan H, Williams RL, Doherty PJ, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. J Mat Sci 1994; 154-59.

18. Karthikeyan R, Karthigayan S, Sri Balasubashini M, Vijayalakshmi S, Somasundaram ST, Balasubramanian T. Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by *Hydrophis spiralis* Sea Snake venom. Int J Cancer Res 2007; 4: 186-90.

19. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med. 1997; 185: 1481-86.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-19]