

فرشید غلامی^۱، جمیل زرگان^{۲*}، حمیدرضا گودرزی^۳،
اشکان حاجی نورمحمدی^۴، حسین ثباتی^۵

^۱ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۲ دکتری سم شناسی، دانشیار مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۳ دکتری نانوبیوتکنولوژی، استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران.

^۴ کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۵ 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

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

چکیده

زمینه: به دلیل مقاوم شدن برخی از میکروارگانیسم های بیماری زا به آنتی بیوتیک های رایج، درمان عفونت های ناشی از آن ها به طور چشم گیری 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 غلظت های مختلف سم خام افعی زنجانی بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کولی و باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از روش های MIC assay، MTT assay، انتشار در دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی سمیت سلولی سم خام سلول های HepG2 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سم خام تیمار شدند و با استفاده از روش های MTT reduction و Neutral red uptake درصد بقا و با روش Comet Assay نوع مرگ سلولی تعیین شد.

یافته ها: بر اساس نتایج، سم خام بر روی باکتری اشیریشیا کولی فاقد اثر ضد باکتریایی بوده اما بر روی باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس دارای اثر ضد باکتریایی معنی دار می باشد. همچنین نتایج نشان داد سم خام افعی زنجانی در دوزهای ۵۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از طریق القای آپوپتوز و نکروز سبب از بین رفتن سلول ها می شود. **نتیجه گیری:** بر اساس یافته های این مطالعه نشان داده شد که سم خام افعی زنجانی دارای اثرات ضد باکتری و سایتوتوکسیک است و می تواند جهت مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

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

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 آنتی‌بیوتیک‌های 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 (۴ و ۳). 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 می‌کنند (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 ال-آمینواسید اکسیدازها (۷ و ۳)، فسفولیپازهای A2 (۱۰ و ۹)، لکترین (۱۱) و پپتیدها (۱۴-۱۲) می‌باشد.

افعی زنجانی (*Vipera albicornuta*) یکی از مارهای سمی ایران و جزو خانواده وپریده و جنس وپرا 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^۲ (PTCC) 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^۳ (MH) 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 ۵-۶ 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

^۲ Persian Type Culture Collection^۳ Mueller-Hinton^۱ Fang

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 میلی لیتر بر روی دیسک ها ریخته شد. در این آزمایش جهت مقایسه اثر سم، از آنتی بیوتیک 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 ۱۸-۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمای گذاری شدند و پس از طی دوره گرمای گذاری، در صورت وجود هاله مهاری قطر آن اندازه گیری گردید. این آزمایش برای هر باکتری ۳ بار تکرار شد.

تست انتشار در چاهک

این روش مشابه روش انتشار در دیسک می باشد با این تفاوت که در این تست محلول سمی به جای قرار گرفتن روی دیسک به داخل چاهک ایجاد شده در محیط کشت ریخته می شود (۲۰). کشت چمنی مطابق روش قبل انجام گرفت و با استفاده از انتهای پیت پاستور استریل، چاهک ها 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 چاهک ها ریخته شد. در این مرحله ۴۰ میکرولیتر از سم خام ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در چاهک های تعیین شده ریخته و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از زمان ذکر شده در صورت وجود هاله مهاری قطر آن اندازه گیری گردید. این آزمایش برای هر باکتری ۳ بار تکرار شد.

بررسی سمیت سلولی سم خام

سلول های 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 CO₂ کشت و پاساژ داده شدند. پس از چهار بار پاساژ دادن و تراکم در حدود ۸۰٪ سلول ها 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 نتوبار، مورد استفاده قرار گرفتند.

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

خام با غلظت های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به چاهک ها افزوده و با استفاده از محیط کشت مولر هیتون حجم نهایی چاهک ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در این آزمایش از تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) 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 ۱۸-۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (برای باسیلوس سوبتیلیس شیکر انکوباتور) گرمای گذاری گردید. سپس، ۵ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر) به تمامی چاهک ها افزوده شد و پلیت در شرایط تاریکی تا زمان تشکیل کریستال های بنفش رنگ فورمازان (حدود ۱ ساعت)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به چاهک ها اضافه شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه، جذب نوری چاهک ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Biotek 110, USA) اندازه گیری شد. آزمایش فوق ۲ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده ماندن باکتری ها بعد از تماس با غلظت های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

تست MIC assay: آزمایش MIC با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد و اثر غلظت های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سم خام بر روی رشد باکتری ها بررسی شد (۱۸). مراحل انجام این تست مشابه MTT assay بوده ولی پس از اضافه کردن غلظت های مختلف سم خام و انکوباسیون به مدت ۱۸-۲۴ ساعت، جذب نوری چاهک ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر (Biotek, USA) اندازه گیری 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 غلظت های مختلف سم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

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

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:

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

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 اندازه‌گیری فرگمنته شدن DNA در سلول‌های منفرد می‌باشد (۲۴).

ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی $10^4 \times 12$ 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 گاز کربنیک انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون، با استفاده از تریپسین و PBS عمل جداسازی سلول‌ها از کف چاهک انجام شد. محتوای چاهک‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور 1500 rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر PBS به میکروتیوب‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور 1500 rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی تخلیه گردید. به میکروتیوب‌ها 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 (۱٪ NMA) بر روی اسلایدها (لام‌ها) قرار داده شد و سوسپانسیون سلولی با محلول یک درصد آگاروز با نقطه ذوب پایین (۱٪ LMA) به نسبت یک به دو مخلوط و روی اسلایدهای تهیه شده با ۱٪ NMA ریخته شد. جهت ایجاد یک لایه سلول

تعداد $10^4 \times 3$ 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 محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به چاهک‌ها افزوده و پلیت به مدت یک تا دو ساعت در شرایط تاریکی به منظور تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ (فورمازان) انکوبه گردید. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و پس از دو مرتبه شستشوی چاهک‌ها با محلول PBS، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۲-۴ 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) اندازه‌گیری گردید.

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

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

اندازه‌گیری سیتوتوکسیسیته سم خام با روش رنگ

سنجی قرمز خنثی: تست رنگ سنجی قرمز خنثی بر مبنای جذب رنگ توسط لیزوزوم‌های 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 کریستال‌های قرمز رنگ (حدود ۲-۴ 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 سلول‌ها، 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

مقایسه با کنترل مثبت تفاوت معنی داری نداشت. علاوه بر این در دوز ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اثر مهاری سم خام از کنترل مثبت (تتراسایکلین با دوز ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) 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 میلی لیتر سم خام به ترتیب ۵۷/۹۴، ۵۱/۸۷، ۴۶/۲۶، ۳۹/۷۲، ۲۱/۴۹ و ۲۵/۷۰ بود است. سم خام در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با کنترل منفی رشد مهاری معنی دار ایجاد نمود. درصد زنده ماندن غلظت‌های مختلف سم خام در مقایسه با کنترل مثبت (تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) به صورت معنی داری 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 اشیریشیا کولی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس با روش MIC در میکروپلیت نشان داد هیچ کدام از غلظت‌های سم خام بر باکتری اشیریشیا 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 غلظت‌های بیشتر از ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر سم خام در مقایسه با کنترل منفی که حاوی محیط کشت و باکتری بود، معنی دار می باشد و درصد مهار غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به کنترل مثبت تفاوت معنی دار نشان نداد (نمودار ۵).

نتایج غلظت‌های مختلف سم خام در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر 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 غلظت‌های سم در مقایسه با کنترل مثبت معنی دار مشاهده شد.

نتایج تست‌های انتشار در دیسک و چاهک: در این مطالعه اثرات غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سم خام بر رشد باکتری‌های اشیریشیا 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 اشیریشیا کولی بوده (شکل ۱) در حالی که غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثرات مهاری بر رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس می باشد (شکل ۲). همچنین مشخص شد سم خام در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم میلی لیتر اثرات مهاری بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد (شکل ۳).

روی هر اسلاید یک لامل قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد 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 میلی آمپر انجام شد. الکتروفورز در شرایط دمایی زیر ۲۰ درجه و محیط تاریک صورت گرفت. جهت خنثی سازی pH قلیایی، اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در بافر خنثی کننده (Neutralization buffer) قرار داده شدند. جهت رنگ آمیزی سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر 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

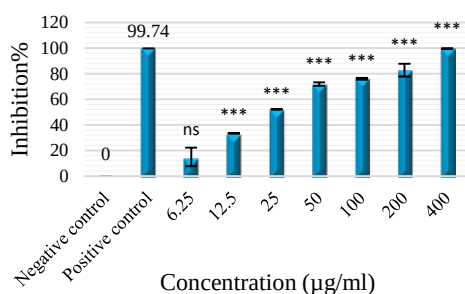
تمامی داده‌های به دست آمده به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی دار آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام گرفت.

یافته‌ها

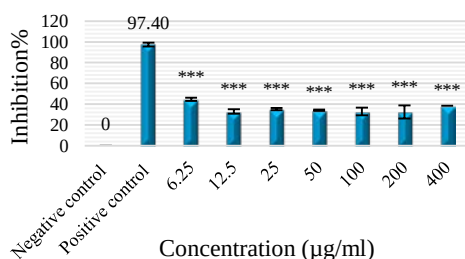
نتایج مطالعه اثرات ضد باکتریایی سم خام با استفاده از MTT assay:

بررسی اثرات ضد باکتریایی سم خام در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بر روی باکتری اشیریشیا کولی مشخص نمود که هیچ کدام از غلظت‌های 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 میلی لیتر بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب برابر با ۸۵/۶۳، ۸۱/۲۲، ۴۹/۷۲، ۳۷/۰۹، ۳۶/۳ و ۳۷/۳ می باشد که تمامی این درصدها بجز در غلظت‌های ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به کنترل منفی معنی دار بود. لازم به ذکر است درصد زنده ماندن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در



نمودار ۵: اثر مهاري غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: $P > 0.05$) و ($***: P < 0.001$).

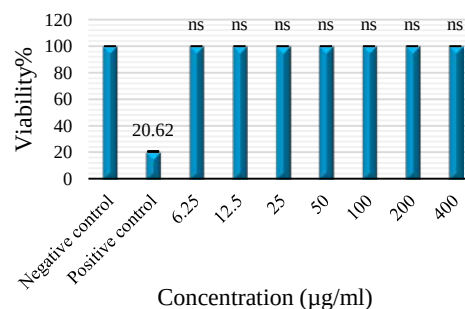


نمودار ۶: اثر مهاري غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند ($***: P < 0.001$).

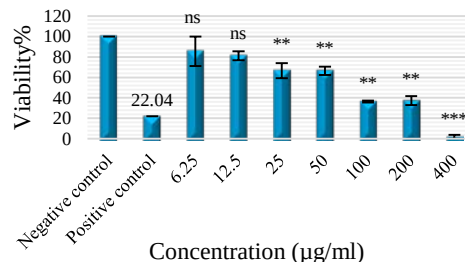
در این بررسی سمیت سلولی سم خام با روش‌های MTT assay، Neutral red uptake assay و Alkaline Comet assay بر روی سلول HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در زیر آمده است.

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 مهاري 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).

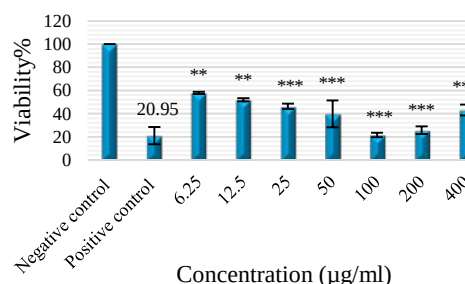
نتایج اثرات مهاري سم خام بر روی HepG2 با assay Neutral red uptake: نتایج آزمایش assay سم خام بر روی سلول‌های HepG2 در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد درصد مهاري سلول‌ها در غلظت‌های فوق به ترتیب برابر با ۷۰/۴۵، ۸۲/۹۵، ۹۳/۷۵ و ۸۵/۲۳ درصد می‌باشد. درصد مهاري در این غلظت‌ها نسبت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



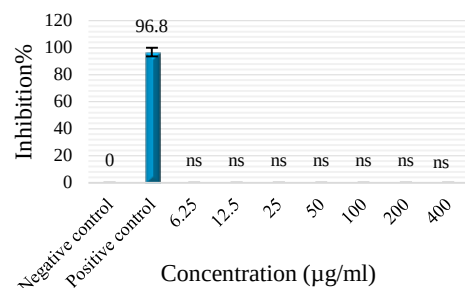
نمودار ۱: اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری اشریشیا کولی با استفاده از تست MTT. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: $P > 0.05$).



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 ($***: P < 0.001$) و ($** : P < 0.01$)، ($ns: P > 0.05$).



نمودار ۳: 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 ($***: P < 0.001$)، ($** : P < 0.01$)، ($ns: P > 0.05$) و ($***: P < 0.001$).



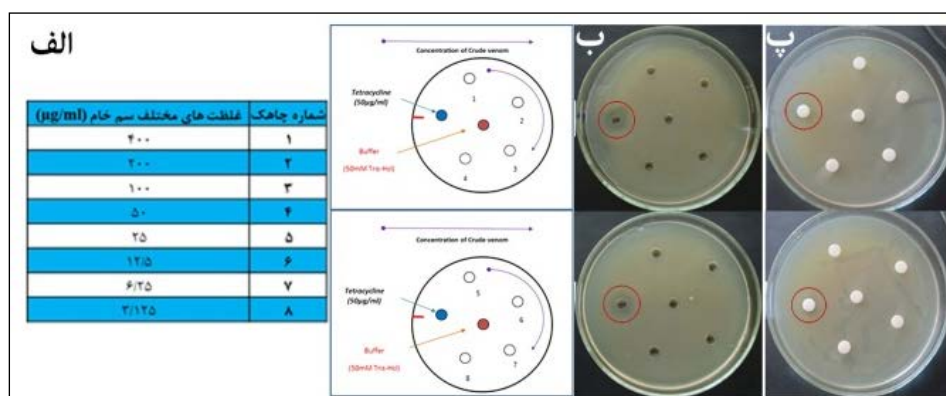
نمودار ۴: اثر مهاري غلظت‌های مختلف سم خام بر روی باکتری اشریشیا کولی با استفاده از تست MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (ns: $P > 0.05$).

مورفولوژیکی نشان داد که سم خام علاوه بر آپتوز، 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 آپتوز و نکروز را در سلول به صورت معنی‌دار القاء نموده و در این غلظت‌ها میزان آپتوز و نکروز تقریباً ثابت بوده است (نمودار ۹) (شکل ۴ و ۵).

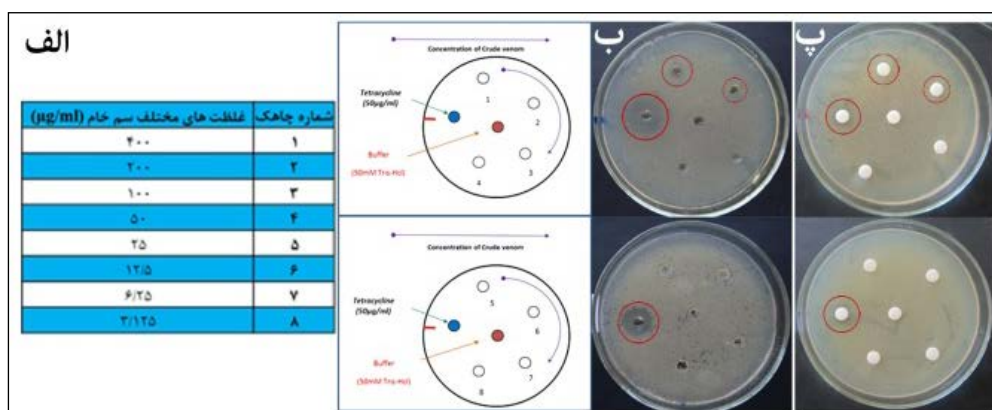
میکروگرم در میلی‌لیتر که در مقایسه با غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌دار تفاوت داشت (نمودار ۸).

نتایج تست کامت قلیایی (Alkaline Comet assay)

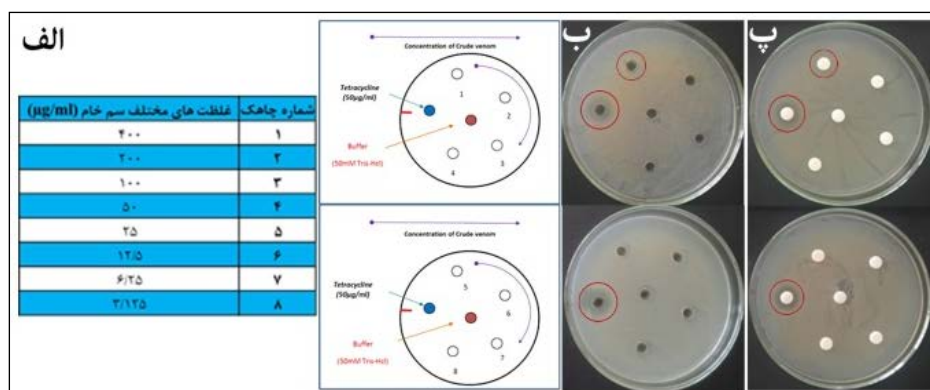
برای بررسی اثر سمیت سم خام بر رشد سلول HepG2: نتایج نشان داد که میزان القاء آپتوز سم خام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۶۲/۷، ۶۱/۸۱، ۶۵/۸۷ و ۶۱/۰۵ بوده است. نتایج مطالعات



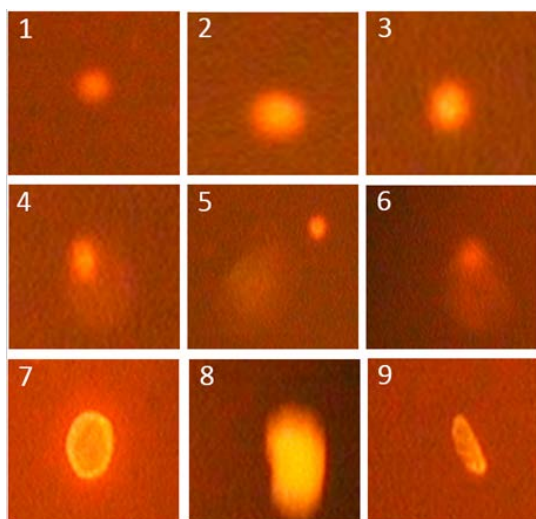
شکل ۱: بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام با روش‌های انتشار در دیسک و چاهک بر رشد باکتری اشریشیا کولی. (الف) نقشه و غلظت‌های مورد استفاده، (ب) تست انتشار در چاهک، (پ) تست انتشار در دیسک



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

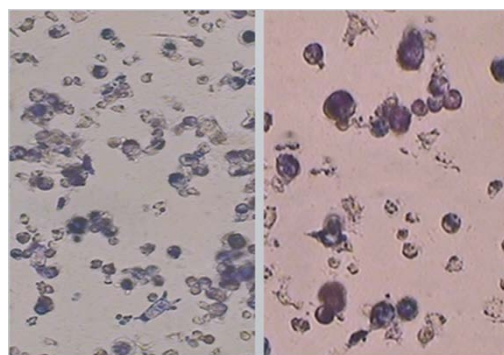


شکل ۵: مطالعه تغییرات مورفولوژیکی هسته سلولی القاء شده توسط سم خام به وسیله آزمایش کامت قلیایی.
۱-۳: DNA سلول سالم (Intact cell)
۴-۶: DNA سلول آپوپتوز شده
۷-۹: DNA سلول نکروز شده

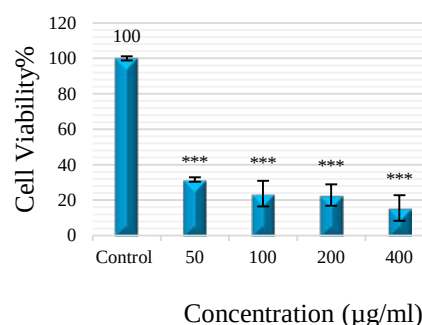
بحث

به دلیل مقاوم شدن برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا 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 موتی‌ویپرا 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 (۱۷ و ۲۵).

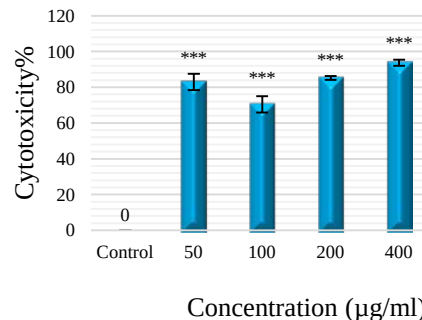
نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی سم خام افعی زنجانی با روش‌های MTT assay و MIC assay در مطالعه‌ی اخیر نشان داد، سم بر روی باکتری نماینده گرم منفی (اشریشیا کولی) فاقد اثر مهاری بوده، درحالی‌که در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس سم به ترتیب در غلظت‌های ۲۵-۴۰۰ و ۶/۲۵-۴۰۰ میکروگرم 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



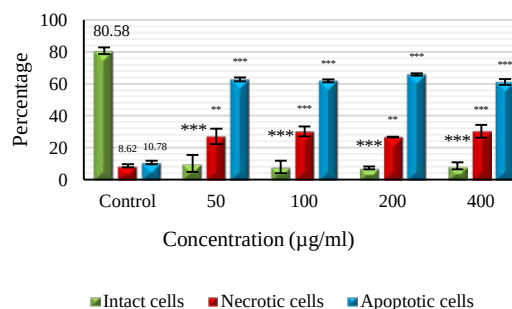
شکل ۴: کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در سلول‌های سالم HepG2 بعد از اضافه کردن MTT.



نمودار ۷: بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف سم خام با روش MTT reduction. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند. Error bar بیانگر Mean±SD است (***: $P < 0.001$).



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 (***: $P < 0.001$).



نمودار ۹: 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 (***: $P < 0.001$) و (**: $P < 0.01$).

۴ *Montivipera xanthina*

۵ *Pseudechis australis*

۶ *Naja nigricollis*

۷ *Naja naja*

۸ *Bothrops jararacussu*

۹ *Bothrops moojeni*

سان (San) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که سم افعی‌ها بر استافیلوکوکوس اورئوس اثر مهاري معنی‌داری دارد درحالی‌که بر روی اشريشيا کولی فاقد اثر مهاري معنی‌دار بودند (۲۸). مقاومت باکتری‌های گرم منفی ممکن است به دلیل غشای خارجی آن‌ها باشد زیرا غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی لیپوپولی-ساکارید است. بار لیپوپولی-ساکاریدهای غشا می‌تواند پپتیدهای ضد باکتری را جذب کند و در نتیجه موجب مقاوم شدن باکتری نسبت به این پپتیدها شود (۱۸ و ۲۸). 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 سائیتوتوکسیک 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 می‌دهد که سم افعی‌ها دارای اثرات سائیتوتوکسیک بوده در نتیجه 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 لقاء مرگ و میر در سلول سرطانی پستان با افزایش غلظت سم را گزارش کردند، مطابقت می‌نماید (۳۲).

به منظور بررسی امکان لقاء 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 لقاء

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

دلیل تفاوت جزئی در نتایج حاصل از MTT assay و assay MIC ناشی از تفاوت محاسبه اثر مهاري 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 دقیق‌تر 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 اشريشيا کولی فاقد اثر مهاري 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 (۱۸ و ۲۶) 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

۱۰ *Echis carinatus*

۱۱ *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

شناسایی ترکیبات ضد باکتری موجود در سم خام افعی زنجانی انجام گیرد و سمیت ترکیبات نیز بررسی گردد.

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

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد که سم خام افعی زنجانی دارای اثرات مهارى معنی داری بر دو سویه گرم مثبت مورد مطالعه دارد و از طریق القای آپوپتوز سبب از بین رفتن سلول های HepG2 می گردد. پیشنهاد می شود تحقیقات دیگری به منظور جداسازی و

تقدیر و تشکر

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

منابع

- Vargas LJ, Londoño M, Quintana JC, Rua C, Segura C, Lomonte B, et al. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from Porthidium nasutum snake venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2012;161(4):341-7.
- 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.
- 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.
- Nair DG, Fry BG, Alewood P, Kumar PP, Kini RM. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprins family of snake venom proteins. *Biochem J* 2007;402(1):93-104.
- 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.
- Glaser HR. Bactericidal activity of *Crotalus* venom in vitro. *Copeia* 1948:245-7.
- 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.
- 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 matogrosensis* pitviper venom. *PLoS One* 2012;7(3):e33639.
- Samel M, Vija H, Kurvet I, Künnis-Beres K, Trummel 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Latifi M. The Snakes of Iran. 3rd ed. Department of the Environment, Tehran, Iran. 2000; pp. 478.
- 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.
- 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.
- Yalcin 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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, Khaw O, Chulasugandha P, et al. The Effects of *Cryptelytropis albolabris*, *Calloselasma rhodostoma* and *Daboia siamensis* Venoms on Human Cancer Cells. *Asian Journal of Biological and Life Science* 2013;2(1):50-3.