بررسی اثرات توکسیسیتی و ضد سرطانی فراکشن های حاصله از زهر گرزه مار ایرانی *Macrovipera lebetina* بر رده سلولی سرطان ریه رده TC-۱

رقیه مولائیان[۱] ،رویا میرزایی[۲]، دلاور شهباززاده[۲]*، کامران پوشنگ باقری[۲]*

۱- گروه آموزشی فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی. تهران - ایران
۲ - آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور

***نشانی برای مکاتبه:** آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران. تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۰۷۸۰، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، k_bagheri@pasteur.ac.ir و Shahbazzadeh@yahoo.com

دریافت مقاله: آبان نود و پنج پذیرش برای چاپ: بهمن نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *سرطان ریه شایع ترین دلیل مرگ و میر مربوط به سرطان در بین زنان و مردان به شمار می آید و۱۹/۴درصد از کل سرطان ها را به خود اختصاص میدهد. بیوتوکسین ها یک منبع بیولوژیکی مفید با اثر ضد توموری می باشند، که از این جمله می توان به سموم مارها اشاره کرد. هدف از این تحقیق تخلیص زهر گرزه مار به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی و بررسی اثر توکسیسیتی و ضد سرطانی فراکشن های بدست آمده بر رده سلولی سرطان ریه بود.*

روش کار: *سلول سرطان ریه **TC- ۱** در محیط DMEM با ۱۰٪ FBS (Fetal Bovin Serum) کشت داده شد. زهر گرزه مار ایرانی به طریق کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یونی تخلیص شد. محدوده وزن مولکولی فراکشن ها با روش SDS-PAGE بررسی گردید. با استفاده از روش رنگ آمیزی با تریپان بلو و MTT اثر ضد چسبندگی و سمیت سلولی فراکشن فعال بدست آمده بر روی سلول های کشت داده شده **TC- ۱** اندازه گیری شد. آنالیز آماری با روش student t-test جهت مقایسه سمیت فراکشن کاندید بین سلول های سرطانی و نرمال انجام شد.*

یافته ها: *با توجه به نتایج حاصله از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، تعداد ۶ فراکشن جداسازی شد. فراکشن های تخلیص شده از لحاظ قدرت ضد چسبندگی بررسی گردیدند و فراکشن F۵ تا مقدار ۷/۵ میکروگرم بالاترین قدرت ضد چسبندگی را دارا بود. فراکشن ۵ F۵دارای پروتئین هایی با وزن مولکولی در محـدوده ی وزنـی ۱۲ الی ۳۰ کیلودالتون بود. به همین منظور فراکشن F۵ جهت خالص سازی بیشتر بوسیله ی کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شده و در این مرحله ۴ فراکشن جداسازی گردید. از چهار فراکشن بدست آمده، فراکشنF۳ دارای بیشترین اثر ضد چسبندگی بود که این اثر تا مقدار ۳/۷۵ میکروگرم به میزان ۳±۳۱ درصد مشاهده گردید. فراکشنF۳ دارای وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون بود. فراکشن F۳ در سلولهای سرطانی با وزن مولکولی ۲۰ کیلو دالتون به عنوان فراکشن فعال جهت تست MTT کاندید شد و نتایج تست MTT نشان داد که فراکشن F۳ بر روی سلول سرطانی TC-۱ در مقدار ۰/۳۷ µg ، دارای ۲±۲۴ درصد سمیت و بر روی سلول نرمالHEK۲۹۳ ، ۱±۱۴ درصد اثر سایتوتوکسیک داشت. آزمون t-test با p value = ۰/۰۰۳ تفاوت اثر سمی معنی داری را بین سلول های سرطانی و نرمال نشان داد.*

نتیجه گیری: *با توجه به اثر سمیت کم فراکشن F۳ بر سلولهای نرمال انسان می توان حدس زد که فراکشن بدست آمده، یک پروتئین بسیار با ارزش با خواص داروئی می باشد، که دارای اثر ضد چسبندگی خوبی بر سلولهای سرطانی بود. با توجه به مشاهده ی اثرات کشندگی ۲۴ درصدی بر روی سلول های سرطانی ریه، این پروتئین می تواند تعیین توالی شده و اثرات آن در مدل موشی سرطان ریه مورد بررسی قرار گیرد.*

واژگان کلیدی : گرزه مار ایرانی، کروماتوگرافی، تست MTT، سرطان ریه، سلول رده TC-۱

مقدمه

سرطان تقسیم نا متقارن سلولهای بدن است که در پی آسیب DNA رخ میدهد و منجر به اختلال در تقسیم، آپوپتوز و ترمیم میشود. گاهی سلولهای سرطانی از بافت اولیه جدا و از طریق خون یا لنف به دیگر اعضای بدن متاستاز می دهند (۱). امروزه سرطان به عنوان یک معضل در سطح جهان مطرح و مبارزه با آن جزء اولویت های بهداشتی و درمانی است (۲). به دلیل عوارض بالینی شدید ناشی از شیمی درمانی ضرورت دستیابی به ترکیباتی با اثرات هم افزایی با داروهای ضد سرطان وکاهش عوارض جانبی آنها، مطالعه بر روی عوامل ضد سرطان بدست آمده از منابع طبیعی یک استراتژی مهم در این راستا می باشد (۳). سازمانهای دولتی وخصوصی زیادی چون موسسه ملی سرطان آمریکا (NCI) جهت پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان مبالغ زیادی را سرمایه گذاری می کنند (۴). با توجه به هزینه های بالای شیمی درمانی و عوارض آن و عدم بهبودی بسیاری از بیماران و با علم اینکه بشر از دیرباز از زهر جانوران سمی جهت تهیه دارو استفاده میکرده، تلاش محققین در دستیابی به داروهای ضد سرطانی از بیوتوکسین ها که دارای اثرات فارماکولوژیک و توکسیک هستند، بیشتر شده است (۵).

طبق بررسی ها و آمارهای بدست آمده سرطان ریه از لحاظ مرگ و میر شایع ترین سرطان در سراسر دنیا است و سرطان های سینه، پروستات و کولورکتوم در رتبه های بعدی قرار دارند (۶). سرطان ریه بر اساس بافت شناسی به دو رده تقسیم بندی می شوند. یک رده، کارسینوم ریه سلول غیر کوچک (**NSCLC**) که ۸۵٪ سرطانهای ریه از این نوع بوده و رده دیگر کارسینوم ریه سلول کوچک (**SCLC**) است که حدود ۱۵٪سرطانهای ریه را به خود اختصاص میدهند (۶،۷). سرطان ریه شایع ترین دلیل مرگ و میر مربوط به سرطان در بین زنان و مردان به شمار می رود و مسئول مرگ ۱۳۸۰۰۰۰ نفر در هر سال است (۸). شایع ترین علت سرطان ریه، استعمال دخانیات است. در حدود ۹۰٪ و ۱۰٪ هم در پی عوامل ژنتیکی، گاز رادون، آزبست و آلودگی هوا رخ می دهند (۱،۲). گسترش روشهای درمان منطقی برای سرطان ریه نیاز به درک درستی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی دارد که منجر به سرطان ریه می شود (۹). سلول های سرطانی از طریق تغییر و یا جهش در رسپتورهای آپوپتوز، از تخریب شدن توسط سیستم ایمنی جلوگیری می کنند، بر این اساس بسیار مهم است که علل و فاکتور هایی که باعث افزایش گیرنده های آپوپتوز در سلول های سرطانی می شوند مورد شناسایی قرار گیرند (۹).

طبق مطالعات متعدد انجام شده بر روی زهر مارها در کشت سلول سرطانی، بسیاری از بیوتوکسین ها فعالیت ضد سرطانی دارند که برخی مستقیما سایتوتوکسیک اند و سلولهای توموری را نابود کرده و بعضی ضد رگ زایی و متاستاز بوده و در مقابله با سرطان و تومور ها قابل استفاده اند (۵). استفاده از ونوم جانوران برای اولین بار توسط (Calmette,) درسال ۱۹۹۳ جهت درمان سرطان در حیوانات آزمایشگاهی گزارش شد و از ونوم مار Vipera lebentina turnica جهت القای آپوپتوز سلول های سرطان تخمدان استفاده شد (۱۰). همچنین سم مار Vipera lebetina turnica در سال ۲۰۱۵ توسط (Lee & et.al) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد سم این مار از طریق مهار فعالیت PRDX۶ به واسطه تداخل در رونویسی فاکتور AP-۱ و افزایش بیان پروتئین های پیش ساز آپوپتوز و القای آپوپتوز سبب مهار رشد سلولهای سرطان ریه می شود (۱۱). از آنجا که زهر مار ها حاوی ترکیبات پیچیده ای است که منجر به آپوپتوز و مهار متاستاز می شود، می توان به تحقیق جهت دست یابی به یک داروی جدید ضد تومور خوش بین بود (۱۲).

با توجه به اهمیت کشف مواد ضد توموری و ضد سرطانی از بیوتوکسین ها، این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات توکسیسیتی و ضد سرطانی فراکشن های حاصله از زهر گرزه مار ایرانی بر رده سلولی سرطان ریه هدف گذاری گردید.

روش کار

زهر گرزه مار ایرانی لیوفیلیزه در آزمایشگاه ونوم و فرآورده های دارویی انیستیتو پاستور موجود بود که به روش milking بر طبق توصیه سازمان WHO زهر گیری انجام شده بود (۱۳).

تخلیص زهر گرزه مار ایرانی ابتدا با استفاده از ستون سفاکریل ۱۶/۶۰ Sephacryl ۲۰۰- HR- HiPrep S (شرکت GE آمریکا) انجام گرفت. ۲۰۰ میلی گرم زهر خام گرزه مار ایرانی در ۲ میلی لیتر آمونیوم استات (MERK آلمان) ۲۰ mM (pH: ۸) حل گردید و محلول بدست آمده به منظور حذف پارتیکل به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس میزان پروتئین در محلول رویی اندازه گیری شد. به منظور متعادل سازی ستون با دو حجم بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار شستشو داده شد و زهر آماده ی تزریق به دستگاه FPLC (شرکت GE – مدل AKTA ۱۰) شد. ستون مورد استفاده سفاکریل S۲۰۰ (طول ۶۰ سانتی متر و قطر ۱/۶ سانتیمتر) بود. کروماتوگرافی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه انجام گردید. فراکشن های حاصله در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به صورت دستی جمع آوری شدند.

به منظور تغلیظ فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، عمل لیوفیلیزاسیون در دستگاه فریز درایر (شرکت Christ آلمان) صورت گرفت. فراکشن ها ابتدا با ازت مایع منجمد و در دمای ۵۵ - °C و فشار ۰/۰۳ اتمسفر خشک گردیدند.

تعیین غلظت فراکشن ها و مقدار پروتئین نمونه ها بر اساس روش BCA اندازه گیری گردید. در این روش از کیت مخصوص BCA (کمپانی Intronbio کره جنوبی) استفاده شد. نمونه‌ی رقیق شده توسط آب مقطر تزریقی را با بافر تست مخلوط کرده و در یکی از چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه به

مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. عدد جذب هر چاهک در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد.

برای تعیین وزن ملکولی به روش الکتروفورز SDS- PAGE ابتدا فراکشن های بدست آمده با بافر نمونه مخلوط شده و در مدت زمان ۳- ۵ دقیقه حرارت داده و الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید با ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد، بر اساس روش لاملی انجام شد (۱۴). پس از آماده سازی نمونه های پروتئینی در هر چاهک دستگاه تانک عمودی (Bio-Rad) ۲۰ میکروگرم تزریق شده و در جریان ۳۰ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با رنگ کوماسی آبی R۲۵۰ صورت گرفت.

برای تخلیص فراکشن شماره ۵ زهر گرزه مار ایرانی به روش کروماتوگرافی تعویض یونی مقدار یک میلی گرم از فراکشن شماره ۵، به دستگاه FPLC (شرکت GE – مدل ۱۰ AKTA) 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 کاملا" از ستون خارج شدند، بلافاصله شیب غلظت NaCl از صفر تا ۱ مولار با pH: 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 نمودن نمک فراکشن ها، دیالیز توسط لوله فالکن دیالیز (Milli pore) با cut off: ۳ kDa استفاده شده و سپس به روش فوق لیوفلیزه شدند. اندازه گیری مقدار پروتئین با استفاده از کیت BCA مطابق روش ذکر شده، انجام پذیرفت. الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی انجام شد.

کشت و نگهداری رده سلولها رده سلول سرطانی TC- ۱ و سلول نرمال HEK ۲۹۳ از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) ، محلول پنیسیلین ۱۰۰ U/ml- استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و۲ mM L –گلوتامین کشت داده شدند. سپس در انکوباتور۳۷ درجه و در مجاورت ۲ CO پنج درصد نگهداری شدند و هر سه روز یک بار محیط کشت آنها تعویض گردید(۱۵،۱۶).

فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی، از نظر قدرت ضد چسبندگی بر روی سلول های سرطان ریه رده TC- ۱ بررسی گردید. برای این منظور هنگامی که حداقل ۷۰ درصد سلول های TC- ۱ موجود در فلاسک کشت به رشد کامل رسیدند، به کمک تریپسین-EDTA سلول ها از کف فلاسک جدا شده و سانتریفوژ گردید. پس ازشمارش سلولهای زنده در سوسپانسیون سلولی توسط لام نئوبار، تعداد ۲۰×۱۰^{۳} سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه منتقل شد و یک گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. مقادیر مختلف از هر فراکشن از ۶ تا ۰/۱۸ میکروگرم 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 به طریق اضافه کردن رنگ تریپان بلو شمارش سلولی و بررسی گردید و به این ترتیب فراکشن موثر جهت تست MTT انتخاب گردید.

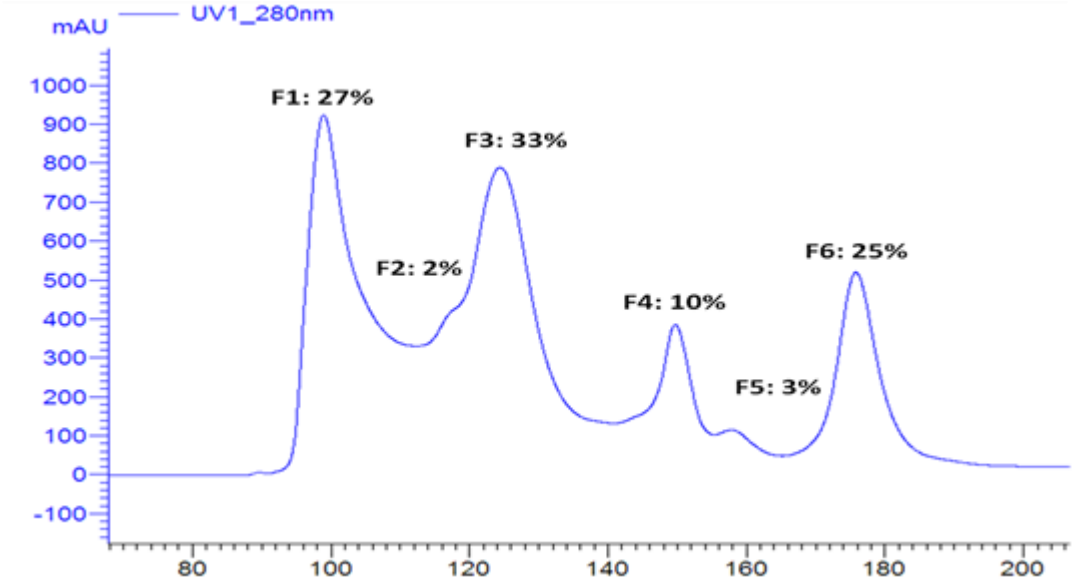
بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی فراکشن کاندید به روش رنگ سنجی، با استفاده از MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) انجام شد (۱۷). اساس این روش بر پایه ی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهای زنده استواراست، که در این روش محلول زرد رنگ MTT به کریستالهای بنفش رنگ فورمازان تبدیل می شود و پس از حل کردن در DMSO میتوان آنها را در دستگاه الایزا ریدر مورد سنجش قرار داد (۱۸). در این مرحله ابتدا سلول های سرطان ریه TC- ۱ و شاهد رده HEK ۲۹۳ در فلاسک کشت داده و تکثیر شدند. سپس سلول ها به کمک Tripsin-EDTA از فلاسک جدا شده و بعد از سانتریفوژ 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 (۰/۱۸ میکروگرم) به هر یک از 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 چاهکها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت۱۶۴۰ RPMI (فاقد فنول رد) و ۵۰ میکرو لیتر محلولMTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور و در مجاورت ۲ CO پنج درصد، نگهداری گردیدند. سپس به سلول ها ۵۰ میکرولیترمحلول DMSO اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، میکروپلیت را ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد و جذب نمونه ها 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(۲۲و ۲۳).

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

نتایج بر اساس میانگین± انحراف معیار با استفاده از از نرم افزار آماری SPSS گزارش شده اند. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون student t-test استفاده شد.

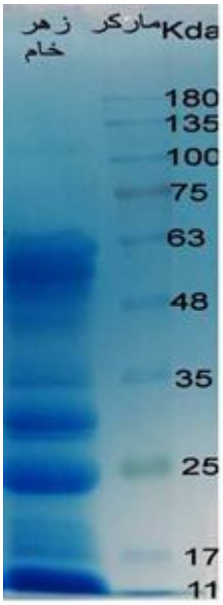
یافته ها

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۲۰۰ میلی گرم زهر خام گرزه مار ایرانی در (شکل-۱) نشان داده شده است. در این روش پروتئین های زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۶ فراکشن مشخص تفکیک شدند که به ترتیب خارج شدن از ستون: F۱، F۲، F۳، F۴، F۵، F۶ نام گذاری گردید.

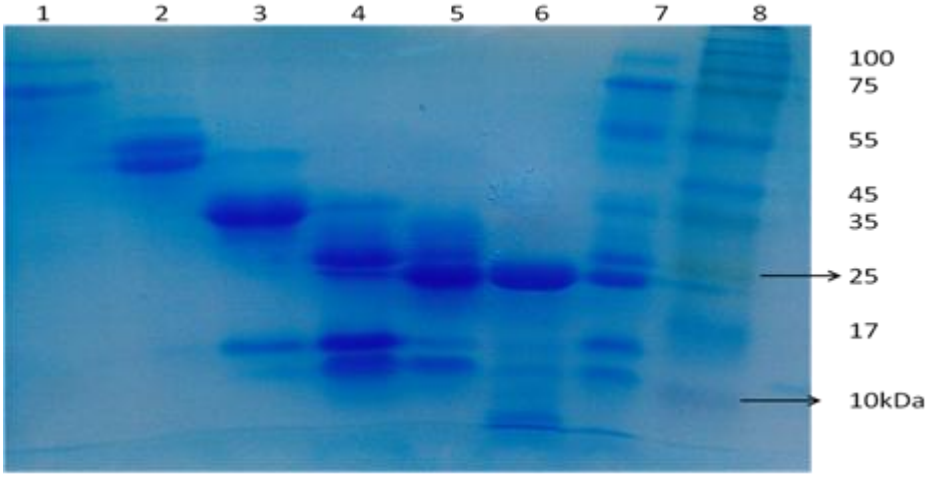


شکل ۱- نمودار فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر گرزه مار. ۶ فراکشن مشاهده و جمع آوری گردید.

نتایج الکتروفورز SDS -پلی اکریل امید ژل (SDS- PAGE) و تعیین وزن مولکولی فراکشن هدف تخلیص شده و پروتئین استاندارد به کار گرفته شده برای تعیین وزن مولکولی بر روی SDS-PAGEدر شرایط غیر احیا با پلی اکریل امید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند که نتایج در (شکل-۲ و شکل-۳) نشان داده شده است.

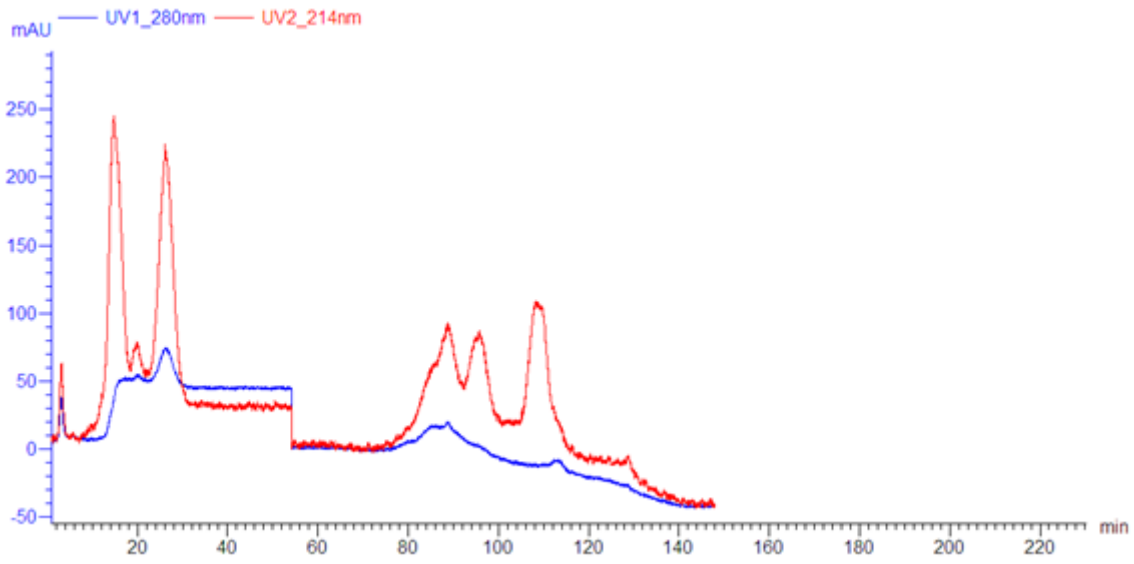


شکل۲- تعیین وزن نسبی زهر خام به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید۱۲ درصد



شکل۳- تعیین وزن فراکشن های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر گرزه مار به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصدی

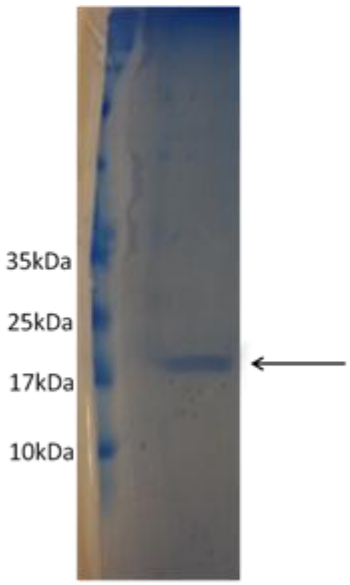
با توجه به هدف این تحقیق که جستجوی یک پروتئین دیس اینتگرین بود، فراکشن شماره ۵ حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به دلیل دارا بودن پروتئین هایی با طیف وزن مولکولی بین ۲۰ الی ۴۰ کیلو دالتون، جهت جداسازی و تخلیص بعدی به وسیله ی کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد. این فراکشن به علت داشتن خاصیت کشندگی سلولهای سرطان ریه رده۱ -TC جهت کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی ستون Mono Q برده شد که در این مرحله ۲۵۰ میکرولیتر از این فراکشن که حاوی یک میلی گرم پروتئین بود به ستون تزریق شد که نتایج حاصل از این کروماتوگرافی در(شکل-۴) قابل مشاهده اند.



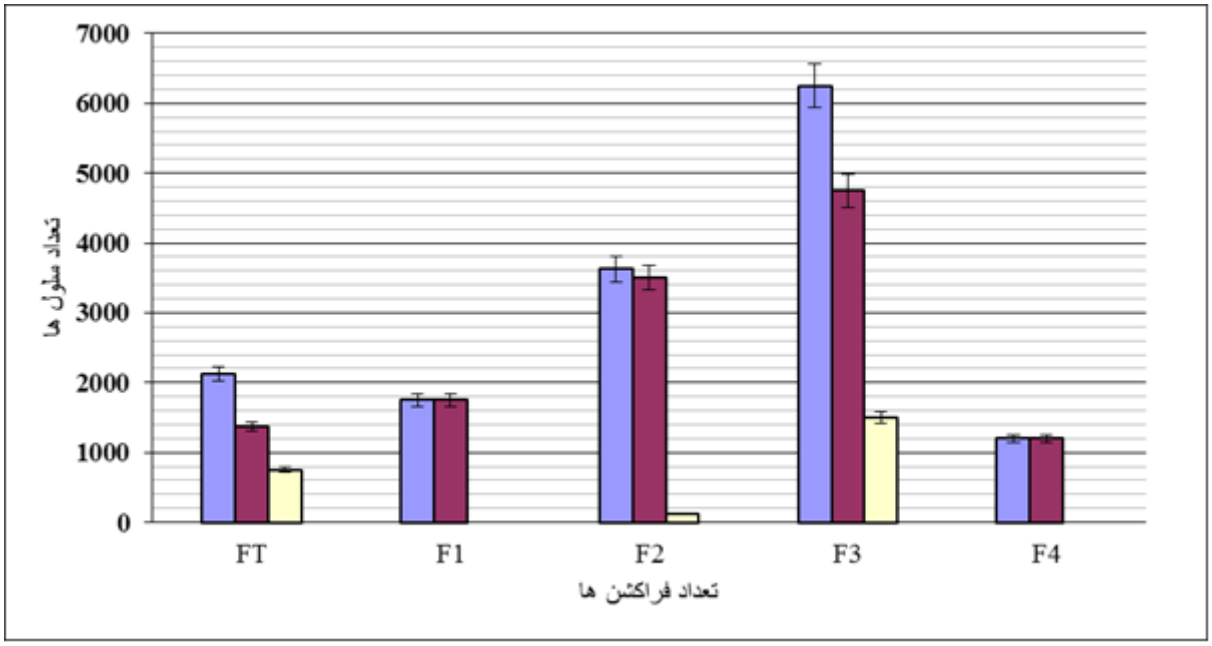
شکل۴

- فراکشن های بدست آمده با روش کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون Mono Q)

وزن مولکولی فراکشن هدف از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از الکتروفورزSDS-PAGE در حدود ۲۰ کیلو دالتون بر آورد شد. (شکل- ۵). پس از تخلیص فراکشن ۵ به روش کروماتوگرافی تعویض یونی، فراکشن های به دست آمده از این روش با هدف انتخاب قوی ترین فراکشن که دارای بیشترین اثر ضد چسبندگی است، در این تست مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده مشخص کرد که فراکشن های (Flow Through: FT) و F۱ و F۴ اثر ضد چسبندگی کمتری نسبت به بقیه ی فراکشن ها داشتند. بیشترین اثر ضد چسبندگی مربوط به فراکشن های ۲ و ۳ بود که از میان این دو ، فراکشن ۳ بیشترین اثر را از خود نشان داد و این فراکشن تا مقدار ۱/۵ میکروگرم اثرات ضد چسبندگی را دارا بود (شکل - ۶).

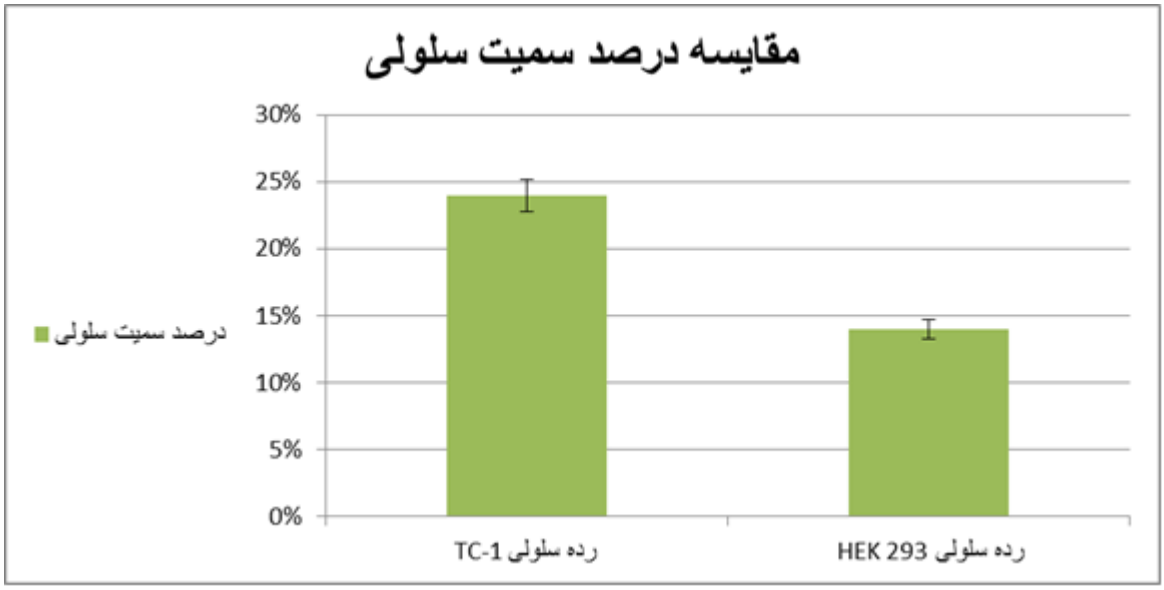


شکل ۵- SDS-PAGE فراکشن۳ حاصل ازکروماتوگرافی تعویض یونی



شکل۶- بررسی و انتخاب قوی ترین فراکشن ضد چسبندگی حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی فراکشن ۵ F. بیشترین اثر ضد چسبندگی مربوط به فراکشن های ۲ و ۳ بود و فراکشن ۳ بیشترین اثر را از خود نشان داد. مقادیر ارایه شده معادل Mean±SD می باشند.

نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر فراکشن F۳ حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی در مقادیر مختلف ۶، ۳ ، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۳۷، ۰/۱۸ میکروگرم بر روی سلول نرمال۲۹۳ -HEK و سلول های سرطان ریه (۱ -TC) بیانگر این مهم بود که فراکشن F۳ بر روی سلول های سرطان ریه ۱ -TC نسبت به سلولهای نرمال (HEK-۲۹۳) دارای اثر سایتوتوکسیسیتی بیشتری می باشد و بر اساس تست MTT، میزان ۲± ۲۴ درصد سمیت سلولی در مقدار ۰/۳۷ میکروگرم بر رده ی سلول های سرطانی ریه ۱ -TC مشاهده گردید. همچنین در همان غلظت برابر از فراکشن F۳، اثر سایتوتوکسیسیتی بر رده ی سلول های شاهد HEK-۲۹۳، به میزان ۱±۱۴ در صد بود (شکل-۷). نتایج آزمون t-test نشان داد که تفاوت معنی داری در اثر سمی فراکشن ۳ بین سلول های سرطانی و نرمال وجود دارد ($P < ۰/۰۰۳$).



شکل۷- مقایسه درصد سمیت سلولی فراکشن F۳ در تست MTT بر رده سلول سرطانی ۱ -TC و سلول شاهد مقادیر ارایه شده معادل Mean±SD می باشند.

بحث

اغلب بیماران دچار عوارض شدید ناشی از شیمی درمانی شده و گاهی به شیمی درمانی تومورها مقاوم می شوند. تقریبا اکثر بیماران این روش درمانی را با ترس و اکراه قبول می کنند و همین موضوع سبب شده تمایل به استفاده از این روش درمانی کم شده و محققین در پی رسیدن به ترکیبات و فرمولاسیون هائی هستند که بتوانند جایگزین این نوع داروهای شیمیائی کرده و عوارض جانبی درمان سرطان را کم کرده یا از بین ببرند (۱،۵). تنوع زیستی جانوران سمی در ایران به عنوان یک کشور نیمه بیابانی بسیار زیاد است و انواع مختلفی از مار ها، عقرب ها و سایر جانداران در ایران وجود دارند که تا به حال مطالعات کمی از نظر وجود عوامل ضدسرطانی در مورد آن ها انجام شده است که یک استراتژی مهم جهت توسعه داروهای ضد سرطان، مطالعه عوامل ضد سرطان بدست آمده از منابع طبیعی است (۲).

بطور سنتی بشر می داند که از زهر جانوران سمی از جمله مار می تواند دارو تهیه کند. زهر بعضی مار ها حاوی مولکول های ویژه ای است که از چسبندگی و مهاجرت سلول ها جلوگیری کرده و اصطلاحا به آن ها Disintegrin می گویند. دیس اینتگرین ها با اتصال به اینتگرین سطح سلول های سرطانی می توانند از حرکت و مهاجرت آن ها جلوگیری کرده و به عنوان یک عامل ضد متاستاز مطرح می باشند (۵). وجود این مولکول ها در زهر خانواده مار های افعی ثابت شده و لذا این تحقیق جهت جستجوی یک فراکشن ضد متاستاز با خاصیت ضد سرطانی هدف گذاری شد (۵،۸).

Hye Lim Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در کشور کره طی تحقیقاتی دریافتند که سم مار *Vipera lebetina turnica* می تواند عملکرد۶ PRDX را که یکی از اجزای پروکسیداز است و به عنوان یک محرک رشد سلولهای سرطان ریه شناخته شده است را مهار کند. این تحقیقات روی سم خالص (crude) و بدون کروماتوگرافی صورت گرفته است در صورتیکه در این تحقیق سم مار گرزه ایرانی جهت افزایش خلوص و نتایج دقیق تر کروماتوگرافی و تخلیص انجام شد (۱۱).

همچنین در سال ۲۰۱۴ در طی مطالعه ای که توسط کولیپارا و همکارانش صورت گرفت و اثرات NK cells های فعال شده توسط سم را بر روی سل لاینهای۵۴۹ A و۴۶۰ NCI-H سرطان ریه صورت گرفت که سبب مهار قابل توجهی در رشد سلولهای سرطانی ریه و ممانعت از اتصال به DNA و آزاد سازی سایتوکاینها و گرانولها که منجر به جلوگیری از پرولیفراتیو سلولها و آپوپتوز می شود را نشان داد. لیکن به دلیل عدم استفاده از سلول نرمال شاهد نمی توان نتیجه ای جامع از این تحقیقات به منظور دست یابی به اطلاعات تکمیلی جهت انجام مطالعات فاوماکولوژیک بدست آورد (۱۹).

در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۴ توسط J.M conlon و همکارانش صورت گرفت و نشان داده شد که سم مارهای سبز مناطق گرمسیری شرقی (Eastern Green Mamba) بر رده سلولی A۵۴۹ در سرطان NSCLC اثرات قابل ملاحظه ای در ایجاد القا آپوپتوز و مهار رشد سلولهای سرطانی دارد، لیکن باز از سلول نرمال شاهد استفاده نشده بود و این سبب می شود که این مطالعه از جامعیت کامل جهت استفاده در مطالعات داروسازی و سم شناسی در آینده برخوردار نمی باشد (۲۰).

این تحقیق با این دیدگاه شروع شد که در صورت وجود فراکشن های ضد سرطانی آیا این فراکشن ها روی سلولهای نرمال اثر سمی دارند یا خیر. خوشبختانه نتایج بیانگر این نکته بود که فراکشن های حاصله از کروماتوگرافی تعویض یونی دارای اثر ضد سرطانی به صورت اثر ضد چسبندگی و سمی روی سلولهای سرطان ریه رده TC-۱ ، بوده و همچنین دارای حداقل اثر سمی بر روی سلولهای نرمال شاهد می باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان امیدوار بود که پروتئین خالص در تحقیق بعدی در مدل حیوانی سرطان ریه اثر قابل توجهی داشته باشد. می توان حدس زد و پیش بینی کرد که اثرات درمانی فراکشن بدست آمده ضد متاستاز بوده و همچنین با یک روند آهسته اثر کشندگی بر سلولهای سرطانی دارد. لذا می توان پیش بینی کرد که در صورتیکه در آینده داروی ضد سرطان از زهر گرزه مار بدست آید، با حداقل عوارض و در یک دوره طولانی سبب از بین رفتن بافت سرطانی گردد.

با توجه به اینکه سرطان ریه عمدتا بدون علائم بوده و دیر تشخیص داده شده و ماهیت متاستاتیک دارد، در شرایطی که زود تشخیص داده شود، استفاده از این نوع درمان می تواند ریسک جراحی را به حداقل رسانده و از متاستاز، رشد و بزرگ شدن تومور هم جلوگیری کرده و به این ترتیب عوارض کمتری هم متوجه بیمار می شود (۷).

با توجه به اینکه پروتئینهای اینتگرین در اکثر سلولهای سرطانی بصورت نابجا و به تعداد زیاد وجود دارند (۲۱). لذا میتوان پیشنهاد کرد که این تحقیق بر روی رده های سلولهای سرطانی دیگر از جمله تومور خوش خیم همانژیوما، سرطان پروستات، انواع مهاجم سرطان هایی مثل سرطان پستان، سرویکس، سرطانهای دستگاه گوارش از جمله آدنوکارسینوم و کارسینوم مری، معده ،کلون و همچنین ملانوما انجام شود.

نتیجه گیری

با توجه به اثر سمیت کم فراکشنF۳ بر سلولهای نرمال انسان می توان حدس زد که فراکشن بدست آمده، یک پروتئین بسیار با ارزش با خواص داروئی می باشد، که دارای اثر ضد چسبندگی خوبی بر سلولهای سرطانی بود. با توجه به مشاهده ی اثرات کشندگی ۲۴ درصدی بر روی سلول های سرطانی ریه، این پروتئین می تواند تعیین توالی شده و اثرات آن در مدل موشی سرطان ریه مورد بررسی قرار گیرد.

REFERENCES

1. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S. J. Jameson J, Loscalzo J. Harrison Principles of Internal Medicine. Mc Graw Hill; 2012

2. Rebecca Siegel, Jiemin Ma, Zhaohui Zou, Ahmedin Jemal, Cancer Statistics, 2014. CA CANCER J CLIN 2014;64:9–29

3. Riyasat Ali,Zeenat Mirza,Ghulam M.D. Ashraf,et al., New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy. Anticancer reserch 2012;32: 2999-3006

4.Ajit S. Narang , Divyakant S. Desai, Anticancer Drug Development. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics.Springer US, 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. Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leighl NB. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. Frontiers in oncology. 2014; 4:204-208

7. Matthew G Oser MD, Matthew J Niederst PhD, Lecia V Sequist MD, Dr Jeffrey A Engelman MD.Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin.The Lancet Oncology.2015;16(4):165-172

8. Anthony J. Alberg, PhD, MPH; Malcolm V.Brock, MD; Jean G.Ford, MD, NPH, FCCP; Jonathan M. Samet, MD, FCCP; Simon D. Spivack, MD, MPH. Epidemiology of Lung cancer: diagnosis and Management of Lung cancer, 3rd ed: American college of chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines.Chest.2013;143(5): 1-29
9. Heloisa S. Selistre-de-Araujo,* Carmen L. S. Pontes, Cyntia F. Montenegro, and Ana Carolina B. M. Martin, Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. Toxins (Basel). 2010 Nov; 2(11): 2606–2621
10. Mi Hee Park . Miran Jo .Dohee Won. Ho Sueb Song . Min Jong Song . Jin Tae Hong. Snake venom toxin from Vipera lebetina turanica sensitizes cancer cell to TRAIL through ROS-and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins.springer.2012; 17(12):1316-1326
11. Hye Lim Lee, Mi Hee Park, Dong Ju Son, Ho Sueb Song, Jung Hyun Kim2, Seong Cheol Ko. Anti-cancer effect of snake venom toxin through down regulation of AP-1 mediated PRDX6 expression.oncotarget.2015;6(26):22139-22151
12. Lucena S[1], Castro R[1], Lundin C[1], Hofstetter A[1], Alaniz A[2], Suntravat M[1], Sánchez EE, Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. Toxicon. 2015 Jan;93:136-43.
13.M.S Abubakar,M.I Sule,U.U Pateh, E.M Abdurahman,A.k Haruna.B.M Jahun.In vitro snak venom detoxifying action of the leaf extractof Guiera senegalensis.Journal of Ethnopharmacology.2000;69(3):254-257
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, Sänger 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 Immunollogical Methods.1983;65:55-63
19. Pushpa Saranya Kollipara , Do Hoo Won,Chul Ju Hwang ,Yu Yeon Jung ,Heui Seoung Yoon.Enhanced Anti-Cancer Effect of Snak Venom Activated NK Cell on Lung Cancer Cell by Inactivation of NF-KB.Biomolecules&Therapeutics.2014;22(2):106-113
20. CColon JM , Prajeep M,Mechka M,Arafat K, Attoub S,Adem A, Pla D,Calvete JJ.Peptides with in vitro anti-tumor activity from the venom of the Eastern green mamba , Dendroaspis anguticeps(Elapidae).J Venom Res.2014;5:16-21.
21. Laetitia Seguin,Jay S. Desgrosellier, Sara M. Weis, David A. Cheresh.Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. ScienceDirect. 2015;25(4):234-240
22. Masters R. Animal cell culture cytotoxicity and viability assays. New York: Oxford University Press; 2000
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. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2006;35(6):539-43.