

## اثر سمیت سلولی فرکشن های سم مار کبری ایرانی بر سرطان ریه

سیده نرجس سادات<sup>۱</sup>، کامران پوشنگ باقری<sup>۲</sup>، حسین مقصودی<sup>۳</sup>، فاطمه شهبازی<sup>۴</sup>، دلاور شهباززاده<sup>۵</sup>\*

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه پیام نور شهری

۲- استادیار آزمایشگاه ونوم و بیومولکولهای درمانی انستیتو پاستور ایران

۳- استادیار دانشگاه پیام نور شهری

۴- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور تهران شرق

۵- دانشیار آزمایشگاه ونوم و بیومولکولهای درمانی انستیتو پاستور ایران

\*نشانی برای مکاتبه: تهران- میدان پاستور -خیابان پاستور شرقی- خیابان ۱۲ فروردین- انستیتو پاستور ایران- آزمایشگاه ونوم و بیومولکولهای درمانی) ،  
shahbazzadeh@yahoo.com

دریافت مقاله: آذر نود و نه پذیرش برای چاپ: بهمن نود و نه

### چکیده

**سابقه و هدف:** سرطان ریه یکی از شایع ترین سرطان ها است. به رغم روش های درمانی متعدد، هنوز شیمی درمانی روش اصلی به حساب می آید که اغلب بیماران دچار عوارض جانبی شدید می شوند. این امر منجر به تلاش جهت دستیابی به داروهای جدید از منابع طبیعی شده است. هدف این پروژه تعیین اثر سمیت سلولی فراکشنهای بدست آمده از زهر مار کبری ایرانی بر سلولهای سرطان ریه رده A549 است.

**روش کار:** ابتدا سم مار به روش ژل فیلتراسیون تخلیص و اثر سمیت فرکشنهای حاصل بر سلولهای سرطان ریه با انجام آزمایش MTT بررسی و فرکشن منتخب به روش تعویض یونی تخلیص گردید سپس اثر سمیت فرکشنها بر سلولها بررسی گردید. اثر سمیت فرکشن منتخب بر سلولهای نرمال بررسی و همچنین آزمایش مربوط به تکثیر سلولی و در نهایت تست *Real Time PCR* سلولهای تیمار شده انجام شد.

**یافته ها:** فرکشن ۶ از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بیشترین اثر سمیت سلولی را داشت و برای تخلیص بیشتر توسط کروماتوگرافی تعویض یونی انتخاب شد که فراکشن ۵ بیشترین اثر سمیت سلولی را داشت همچنین سمیت فراکشن منتخب بر سلولهای نرمال به مقدار قابل توجهی کاهش و نتایج حاصل از تست تکثیر سلولی نیز با نتایج MTT مطابقت داشت. در نهایت تست *Real Time PCR* افزایش قابل توجه بیان ژن کاسپاز ۹ را در سلولهای تیمار شده نشان داد.

**نتیجه گیری:** در پایان می توان نتیجه گرفت فراکشن ۵ حاصل از دو مرحله تخلیص زهر مار کبری ایرانی اثر سابتوتوکسیک در رده سلولی سرطان ریه A549 دارد و گزینه مناسبی جهت مطالعات دارویی با منشأ طبیعی می باشد.

**واژگان کلیدی:** سرطان ریه- سم مار- سمیت سلولی- آپوپتوز

### مقدمه

اغلب منجر به مرگ بیمار می شود(۱) سرطان ریه عامل اصلی مرگ مرتبط با سرطان در جهان است(۲) در حدود ۱،۶۰۰،۰۰۰ مورد سرطان ریه هر سال در سراسر جهان تشخیص داده می شود که سالانه ۱،۴۰۰،۰۰۰ مورد مرگ را ایجاد می کند(۳). این سرطان معمولاً در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود و پیش بینی آن

سرطان به گروهی از بیماریهایی گفته میشود که شامل رشد کنترل نشده و گسترش غیرطبیعی سلول ها است. چنین سلول هایی دستخوش تغییراتی برای رسیدن به تکثیر نامتناهی می شوند و سپس به اندام های دیگر منتقل و موجب بدخیمی می شوند. عدم تنظیم سلولی یا عدم جلوگیری از گسترش این سلولهای سرطانی

## روش کار

مار کبرا از استان خراسان رضوی توسط مارگیر شکار شده و به انستیتو پاستور منتقل گردیده است. پس از طی مدت استاندارد زهر این مارها به روش milking طبق توصیه WHO زهرگیری شده و سپس لیوفیلیزه گردید (۱۸).

برای آماده کردن زهر، ابتدا مقدار ۳۰mg زهر را با ۱ میلی لیتر آب مقطر تزریقی حل کرده ، سپس آن را ۲-۱ دقیقه ورتکس کرده تا خوب مخلوط شود. سپس میکروتیوب حاوی زهر را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ برای حذف پارتنیکل ها سانتریفوژ شد. محلول رویی که حاوی سم خالص و پروتئین ها است از رسوب جدا شد تا سم آماده تزریق گردید.

جهت جداسازی فراکشن های زهر با کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از ستون سفاکریل Sephacryl S-200 HR-Hipep FPLC akta 1.6/60 استفاده شد. دستگاه مورد استفاده GE purifier10 آمریکا و نرم افزار مورد استفاده UNICORN/ست. ستون را با بفر بررسی و آنالیز کروماتوگرام، ستون را با بفر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار به تعادل رسانده و مقدار ۳۰ میلی گرم از زهر را طبق روشی که قبلا گفته شد آماده و به ستون تزریق می کنیم. جذب فرکشن ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و تعداد پیک ها مشخص گردید. فراکشن ها به صورت دستی با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه در عرض ۴ ساعت بر اساس وزن مولکولی به ترتیب از بزرگ به کوچک جداسازی می گردند.

در مرحله بعد هدف غلیظ کردن فراکشن های جدا شده به منظور انجام مراحل بعدی آزمایش است. برای لیوفیلیزه کردن نمونه ها از دستگاه فریز درایر (شرکت christ آلمان) استفاده شد. جهت لیوفیلیزه کردن نمونه ها باید منجمد باشد برای اینکار لوله های فالفون حاوی نمونه را در داخل ظرف حاوی ازت قرار می دهیم که بلافاصله یخ می زند. سپس لوله ها را در داخل دستگاه فریز درایر با دمای  $55^{\circ}\text{C}$  - و فشار ۰/۰۳ اتمسفر می گذاریم. بعد از ۲۴ ساعت نمونه کاملا خشک می شود. سپس نمونه های خشک شده را با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل می کنیم (نمونه های خشک شده حلالیت بالایی دارند). سپس غلظت پروتئین فرکشن ها توسط کیت BCA که براساس احیای مس توسط پیوندهای پپتیدی است اندازه گیری شد.

ما در این آزمایش از کیت BCA (کمپانی Intronbio کره جنوبی) استفاده کردیم. این کیت دارای دو محلول A و B می باشد. در یک میکروتیوب 200 میکرولیتر از محلول A را با 4 میکرولیتر از محلول B مخلوط و ورتکس شد سپس از نمونه، ۱۰ میکرولیتر برداشتیم و با مخلوط محلول A و B در چاهک میکروپلیت ریخته سپس میکروپلیت را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر، میکروپلیت

دراز مدت و بسیار سخت می باشد. مصرف سیگار عامل اصلی ابتلا به سرطان ریه است که ۹۰ درصد از سرطان های ریه تشخیص داده شده را شامل می شود (۴).

زیرگروه های اصلی بافت سرطان ریه ( سلول های کوچک SCLC و سلول های غیر کوچک NSCLC ) دارای ویژگی های مختلف بالینی می باشند که نشان دهنده تفاوت در سرطانزا شدن هستند (۵).

اگر چه گزینه های درمانی مختلف از جمله جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی، ایمونوتراپی، و درمان هدفمند پایه گذاری شده است (۶). اما نتایج آن در دوره هایی فاقد پیشرفت است و به طور کلی بقا در بسیاری از انواع سرطان هنوز رضایت بخش نیست (۷) به طور معمول شایع ترین محدودیت در شیوه های درمانی موجود، عوارض جانبی شدید و توسعه مقاومت دارویی می باشد (۸،۹). بنابراین، نیاز به توسعه عوامل جدید با مکانیسم های جدید برای درمان سرطان وجود دارد (۷) ترکیبات جدا شده از منابع طبیعی مختلف، کاندیدهای نوید دهنده ای برای توسعه داروهای ضد سرطان جدید هستند، همانطور که قبلا هم نشان داده شده است (۱۰).

سالیانه روی منابع زیادی در پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان سرمایه گذاری شده است یکی از منابع طبیعی که در سال های اخیر توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است عوامل ضد سرطانی به دست آمده از زهر جانداران به ویژه مارها می باشد (۱۱،۱۲). سم مار یک منبع غنی متشکل از بسیاری از پروتئین ها، پپتید ها، ماکرومولکول ها و بسیاری از سیتوتوکسین ها، نوروتوکسین ها، کاردیوتوکسین ها، میوتوکسین ها، دندرتوکسین ها، هموئوتوکسین ها، آنزیم های فیبرینولیتیک، فسفولیپاز A2 و غیره است (۱۳). Calmette و همکاران (۱۴) در سال ۱۹۳۳ برای اولین بار گزارش دادند که سم مار دارای فعالیت ضد سرطان است و پس از آن ترکیبات زیادی از سم مارهای مختلف شناسایی شدند که خواص درمانی را نشان می دهند. گروهی از پلی پپتید ها (۷۰-۶۰ باقی مانده اسید آمینه) به نام سیتوتوکسین ها یا کاردیوتوکسین های موجود در خانواده ای از مارهای اپیید (کبرا) دارای انواع مختلفی از فعالیت های دارویی هستند و گرایش به آسیب رساندن به سلول های وسیعی از جمله سلول های سرطانی را دارند (۱۵،۱۶). با توجه به اینکه سم مار شامل ترکیبات وسیعی است که سبب آپوپتوز و پیشگیری از متاستاز سلولی می شود، می توان به توسعه ی یک داروی جدید ضد سرطان از سم مار درآینده امیدوار بود (۱۷).

این تحقیق برای تعیین اثر ضد سرطانی و سمیت فرکشن های بدست آمده از زهر مار کبری ایرانی بر سلول های سرطانی ریه رده سلولی A549 انجام گردید.

ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و درصد سمیت سلولی با توجه به جذب نوری بدست آمده از تست MTT به صورت ذیل محاسبه شد.

$$\text{Toxicity} = \left[ 1 - \frac{(OD \text{ sample} - OD \text{ blank})}{(OD \text{ control} - OD \text{ blank})} \right] \times 100$$

سپس برای خلوص بیشتر فرکشن ها کروماتوگرافی تعویض یونی انجام می دهیم. دستگاه مورد استفاده ( FPLC akta purifier10) ونرم افزار مورد استفاده جهت مشاهده کروماتوگرام UNICORN می باشد. بعد از اتصال ستون Mono Q به دستگاه FPLC ابتدا ستون Mono Q را با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی مولار به مدت ۳۰ دقیقه سپس با محلول NaCl ۲m به مدت ۳۰ دقیقه می شویم تا پروتئین های باقیمانده در ستون از آن خارج شوند. در نهایت می گذاریم با بافر Tris-HCl ستون متعادل شود. بعد از متعادل سازی برنامه گرادینت را به دستگاه می دهیم و سپس فراکشن انتخاب شده را به ستون تزریق می کنیم. ابتدا پروتئین های متصل نشده به ستون (Flow-Through) جمع آوری می شوند و بعد از آن فراکشن های آنیونی از ستون بیرون می آیند و جمع آوری می شوند. بعد از جمع آوری فراکشن های بدست آمده، به دلیل حضور نمک NaCl در روند کروماتوگرافی، فراکشن های بدست آمده باید نمک زدایی (Desalting) شود. به همین منظور از لوله فالکن های دیالیز با Cut off :3kDa استفاده شد. غلظت فراکشن های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی با کیت BCA سنجیده شد. سپس سمیت فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی بر سلول های سرطانی ریه با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. سمیت فراکشن حاصل از تعویض یونی بر سلول های نرمال HEK293 (شاهد) نیز با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت در این مرحله همانند روش تست MTT بر روی رده سلول های سرطانی، عمل کرده و جذب نوری نمونه ها در مجاورت غلظت های مختلف فراکشن در طول موج ۵۷۰ نانومتر را قرائت می کنیم. در این طرح ما تکثیر سلولهای سرطانی را تحت تاثیر فرکشن های حاصل نیز مورد بررسی قرار دادیم به این ترتیب که سلولها به کمک تریپسین از فلاسک جدا شد و بعد از شمارش، تعداد ۱۵۰۰۰ عدد سلول به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل شد و غلظتهای مختلف از فراکشنها به آنها اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت سلولهای موجود در هر چاهک با تریپسین برداشته شد و زیر لام نئوبار بررسی و شمارش شدند.

به منظور بررسی اثر فراکشن ها بر میزان بیان ژن های دخیل در آپوپتوز سلولی از تست PCR Real Time استفاده شد. این تست با استفاده از کیت شرکت ویراژن انجام شد. فرکشن منتخب در غلظت ۴µg در سلولهای سرطانی ریه A549 و سلولهای نرمال HEK293 تیمار شد و mRNA آنها استخراج شد. در این تست

را در دستگاه Micro plate spectrophotometer قرار داده و جذب آن در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت نهایی با استفاده از فرمول خط به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید، برای جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی انجام گردید. ژل الکتروفورز شامل دو بخش یا دو قسمت Stacking و Resolving است (۱۹). در هر چاهک می توان تقریباً ۳۰-۲۰ میکروگرم از نمونه را تزریق کرد. قبل از اضافه کردن نمونه آن را به مدت ۳-۵ دقیقه در آب جوش روی شعله قرار داده می شود. (این کار برای بر هم زدن ساختمان پروتئین و خطی شدن آن ها صورت می گیرد) و بعد نمونه درون چاهک تزریق می شود. اختلاف پتانسیل روی ۱۳۰ ولت و جریان روی ۳۰ میلی آمپر تنظیم و نمونه ها الکتروفورز می شوند. پس از آن ژل را از دستگاه جدا کرده و آن را درون رنگ کوماسی G250 به مدت یک روز قرار می دهیم تا باندهای ایجاد شده کامل رنگ بگیرند، سپس ژل را ۱۰-۸ ساعت در محلول Destain قرار داده و بعد از رنگ بری باندها به وضوح قابل مشاهده اند.

به منظور بررسی اثر سمیت فراکشن ها، سلول های سرطانی ریه رده A549 که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شده بود، در اتاق کشت در شرایط استریل دفریز گردید. سپس زیر هود لامینار، به سلول ها در فلاسک های کشت سلولی، محیط کشت RPMI و ۱۰٪ FBS و به منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی محیط کشت سلولی، ۱٪ Pen/Strep (آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین) اضافه شد و جهت رشد و تکثیر سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با میزان CO2، ۵٪ قرار داده شد (۲۰،۲۱)

آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیائی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (۲۲) بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود. ابتدا بایستی تعداد مناسبی سلول (۱۵۰۰۰ سلول) را در هر یک از چاهک ها کشت داده و اجازه داد تا سلولها به کف پلیت چسبیده و بحالت پایدار خود درآیند. سپس غلظت های مختلفی فراکشن های تخلیص شده ونوم به چاهک های تست اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت، در انکوباتور قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی را دور ریخته، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه نموده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO2 در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. کریستال های فومازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط

مرجع می‌باشد. بیان این ژن‌ها ثابت است که با مقایسه نمونه تیمار شده با شاهد و کنترل داخلی می‌توان کاهش یا افزایش بیان را مشاهده کرد.

استخراج RNA با استفاده از محلول RNX-plus انجام شد و سپس مراحل سنتز cdNA با استفاده از کیت شرکت ویراژن انجام شد. توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۳).

بیان ژن کاسپاز ۹ مورد بررسی قرار گرفت. این ژن واقع در کروموزوم ۱ انسانی یکی از کاسپازهای آغازگر است که توسط ژن CASP9 کُد می‌شود. کاسپاز ۹ با فرایند «مرگ میتوکندریایی» مرتبط است و در جریان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فعال می‌شود. در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای ۵' یا ۳' استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روش‌های الکتروفورز انجام می‌دهد. همچنین برای حذف نوسانات مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای عملکرد دستگاه‌ها و فرد از استانداردهای داخلی استفاده می‌شود. بدین منظور از کنترل بیان ژن GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) استفاده شد که از ژن‌های

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real time PCR

| ژن هدف    | Forward                      | Reverse                      |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| Caspase-9 | 5'-CCAGAGATTCGCAAACCAGAGG-3' | 5'-GAGCACCGACATCACCAAATCC-3' |
| GAPDH     | 5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3' | 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'  |

#### یافته ها

اثر سمیت سلولی فراکشن‌های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض آنیونی بر رده ی سلول‌های سرطانی ریه رده A549 به وسیله تست MTT مورد بررسی قرار گرفت با توجه به نتایج حاصله فرکشن ۶،۵،۴ بیشترین خاصیت سمی را بر سلولهای سرطانی داشت که در این میان فرکشن ۵ بیشترین اثر سمی را از خودش نشان داد.

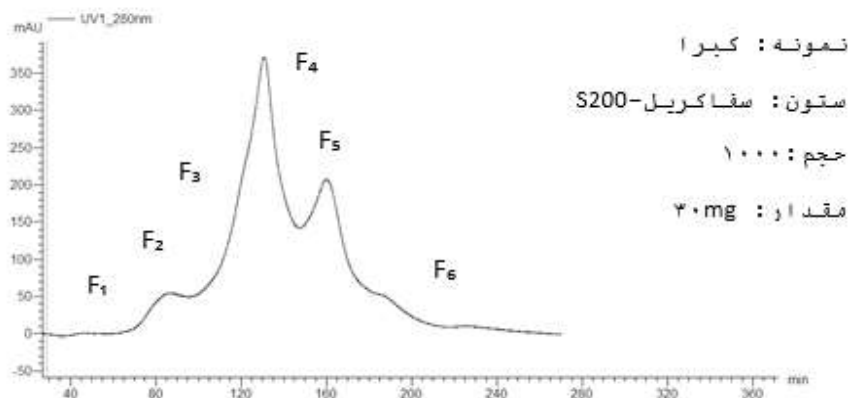
اثر سمیت سلولی فراکشن سمی حاصل از تعویض یونی بر رده ی سلول‌های سرطان ریه A549 و سلول‌های نرمال HEK293 در شرایط برابر زمانی و غلظتی نشان داد که سمیت سلولی بر سلولهای نرمال به مقدار قابل توجهی کاهش پیدا کرد (نمودار ۱)

نتایج حاصل از بررسی تکثیر سلولی با نتایج تست MTT کاملا مطابقت داشت به این صورت که فرکشن منتخب در غلظت ۲ میکروگرم، حدود ۷۰ درصد اثر سمیت سلولی داشت به طوریکه از ۱۵۰۰۰ سلول موجود در چاهک فقط ۴۵۰۰ سلول زنده شمارش شدند. فرکشن منتخب در غلظت ۴µg در سلولهای سرطانی ریه A549 و سلولهای نرمال HEK293 تیمار شد و mRNA آنها استخراج شد. نتیجه تست Real time PCR نشان از بیان بالای ژن کاسپاز ۹ دخیل در مسیر آپوپتوز داشت. همچنین از ژن مرجع GAPDH به منظور ژن کنترل داخلی استفاده شد. داده های حاصل از Real Time PCR نرمالیزه گردید. (نمودار ۲)

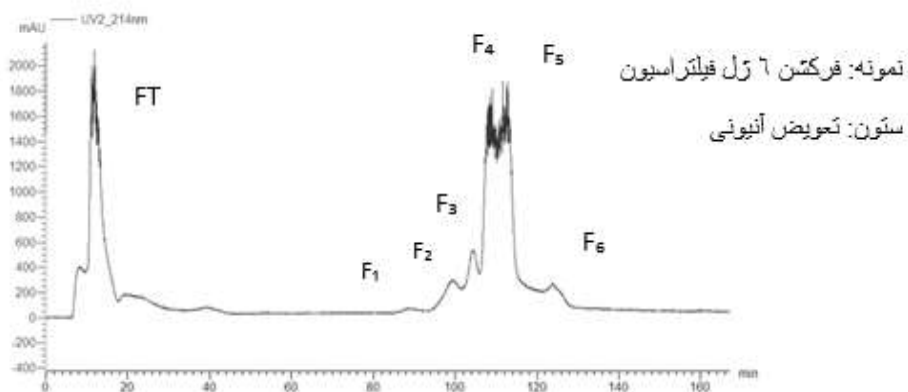
بر اساس نتایج بدست آمده از ژل فیلتراسیون ۳۰ میلی گرم زهر خام مار کبرا تعداد ۶ فراکشن بر اساس وزن مولکولی به ترتیب از بزرگ به کوچک در مدت زمان ۲۶۰ دقیقه از ستون خارج شدند (شکل ۱)

الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط غیر احیا و ژل پلی آکریل امید ۱۲ درصد برای تعیین وزن مولکولی فرکشن‌های مورد نظر انجام شد باندهای مشاهده شده در محدوده وزنی ۹-۱۷۰ کیلودالتون بودند (شکل ۲)

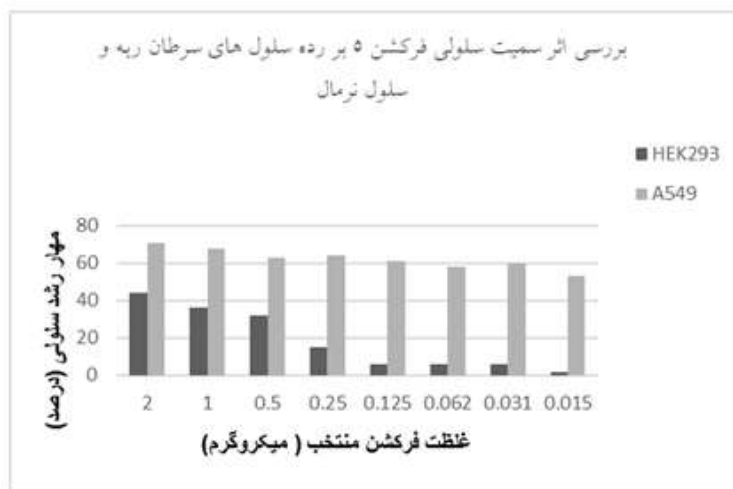
نتایج بدست آمده از تست MTT شش فرکشن حاصل از کروماتوگرافی بر سلولهای سرطانی ریه نشان داد که F6 بیشترین خاصیت سمی را بر سلولهای سرطانی ریه رده A549 داشت. در کروماتوگرافی تعویض یونی از ستون Mono Q استفاده شد. یک میلی گرم پروتئین از فرکشن سمی حاصل از مرحله قبل بر روی ستون مورد نظر برده شد بعد از انجام کروماتوگرافی تعداد ۶ فراکشن بعلاوه پپتیدهای کاتیونی که در غالب یک فراکشن بود جمع آوری گردید. فراکشن جمع آوری شده بر اساس قدرت یونی از ستون خارج شدند (شکل ۳)



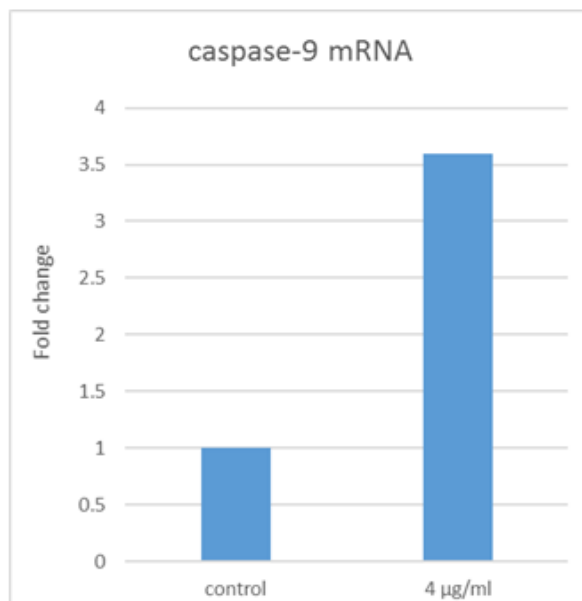
نمودار ۱- کروماتوگرام حاصل از نمونه زهر مار کبری ایرانی توسط دستگاه FPLC با ستون Sephacryl S200 در طول موج ۲۸۰ نانومتر



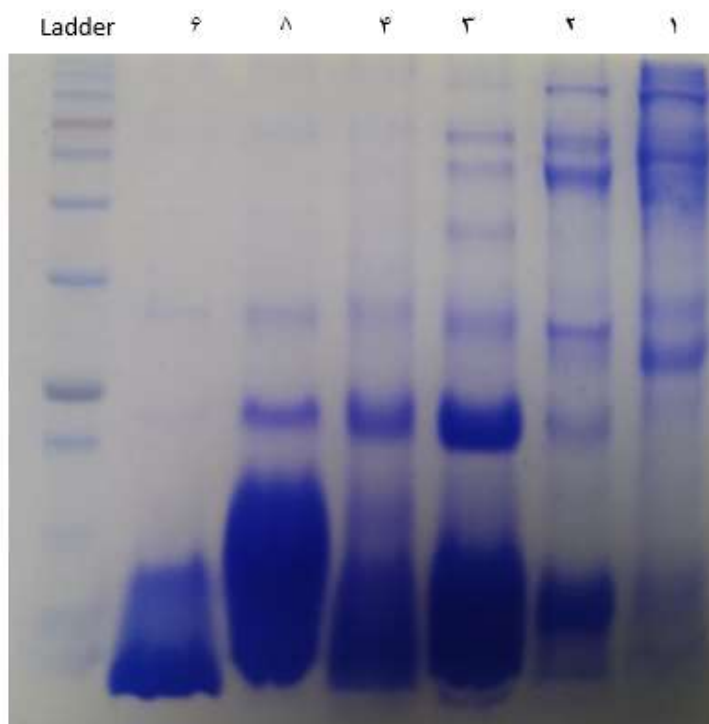
نمودار ۲- کروماتوگرام حاصل از نمونه فرکشن ۶ سمی محصول ژل فیلتراسیون توسط دستگاه FPLC با ستون Mono Q در طول موج ۲۱۴ نانومتر



نمودار ۳- بررسی اثر سمیت سلولی فرکشن منتخب بر رده ی سلول های سرطان ریه و نرمال



نمودار ۴- نتایج بررسی داده های حاصل از Real Time PCR سلولهای سرطانی ریه تیمار شده با فراکشن منتخب



شکل ۱- الکتروفورز فراکشن های به دست آمده از FPLC

## بحث

MTT را برای بررسی سمیت فراکشن منتخب بر سلول های نرمال با همان شرایط مشابه سلول های سرطانی انجام دادیم و مشاهده شد که این فراکشن دارای اثر سمیت بسیار کمتری بر سلول های نرمال نسبت به سلولهای سرطانی است. همچنین تست تکثیر سلولی نیز برای بررسی اثر سمیت فراکشن منتخب بر سلول های سرطانی انجام شد که نتایج حاصل از آن با نتایج تست MTT کاملا همخوانی داشت و هیچگونه تکثیری مشاهده نشد. و در نهایت تست Real Time PCR سلولهای تیمار شده انجام شد که نتایج حاصل نشان از بیان بالای ژن کاسپاز ۹ در سلولهای تیمار شده با فرکشن منتخب داشت.

در مطالعاتی که توسط Antohony J.Saviola و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی tzbacnanin دیس اینتگرین جدا شده از سم مار *Crotalus simus tzbacnan* انجام شد نشان از اثر ضد سرطانی و ضد چسبندگی این ترکیب بر سلول های سرطانی کولون و پستان می داد، که با نتایج بدست آمده ما همخوانی دارد، با این تفاوت که در این مطالعه تاثیر ترکیب مورد نظر روی سلول های نرمال بررسی نشده بود (۳۱).

در مطالعه ی دیگری که لین و همکارانش بر روی مار *Naja najaatra* انجام داده اند، نیز به بررسی اثر کاردیوتوکسین CTX 3 از ونوم مار کبری پرداختند که با وجود نقش موثر بر القای توقف چرخه سلولی در مراحل G2/M سلولهای سرطان لوسمی انسانی K562، به علت نبود رده ی سلولی شاهد در این مطالعه باز هم جامعیت لازم برای تصمیمات پژوهشی در آینده را ندارد (۳۲).

در طی تحقیقاتی که وزن پاتن و همکارانش در سال ۲۰۱۶ به منظور بررسی اثر ضد توموری و ضد چسبندگی وابسته به دوز از سم مار *Bothrops pauloensis* بر روی رده ی سلول های سرطان سینه MDA-MB-231 و همچنین رده ی سلول های غیر توموری (نرمال) انجام داده اند بیان شده است که میزان اثر سمیت سلولی بر رده ی سلولی نرمال بسیار کمتر از سمیت بر رده ی سلول های سرطان سینه بوده است، همچنین در تحقیق وزن پاتن و همکاران، اثر سم مار بدون انجام کروماتوگرافی بررسی شده است ولی در مطالعه انجام شده با استفاده از ونوم مار کبری ایرانی، مراحل تخلیص و فراکشن گیری به منظور افزایش خلوص بیشتر و نتایج دقیق تر، در جهت مطالعات بهتر سم شناسی و دارویی در آینده انجام شده است (۳۳).

با توجه به نتایج بدست آمده می توان امیدوار بود که پروتئین خالص سازی شده در تحقیقات بعدی، در مدل حیوانی سرطان ریه، اثر قابل توجهی از خود نشان دهد و پس از طی مراحل بعدی، دارویی ارزشمند با حداقل عوارض بر سلولهای نرمال جهت درمان سرطان ریه به کار برده شود.

در حال حاضر درمان اصلی سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی است که در این میان شیمی درمانی به طور گسترده ای در کلینیک به دلیل روند ساده و راحت آن انجام می شود (۲۴،۲۵). با این حال هنوز محدودیت های قابل توجهی در درمان سرطان با استفاده از شیمی درمانی وجود دارد. داروهای شیمی درمانی به طور غیراختصاصی در بدن توزیع می شوند. و مستعد ابتلا به مقاومت چند دارویی، مهار غیر موثر رشد تومور، متاستاز و عود مجدد در طی درمان هستند (۲۶،۲۷). این امر منجر به تلاش جهت دستیابی به داروهای جدید ضد سرطان بدست آمده از منابع طبیعی شده است. تحقیق درباره درمان سرطان با استفاده از منابع طبیعی قرن هاست که تحت آزمایش است و استفاده از مواد شیمیایی خالص برای درمان سرطان هنوز ادامه دارد (۲۸).

کشور ایران دارای تنوع زیستی فراوانی از لحاظ وجود جانوران سمی بوده و انواع مختلفی از مارها، عقربها 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 سم حیوانات مختلف (مار، عقرب، عنکبوت و.....) و ترکیبات فعال موجود در آنها دارای خواص ذاتی ضد سرطان هستند (۲۹).

سم مار مخلوطی پیچیده از مواد دارویی فعال است که شامل پروتئینها، پپتیدها، آنزیمها، توکسینها و اجزای غیرپروتئینی است. برخی از اجزای پروتئینی آن شامل فسفولیپاز، نوکلئوتیداز، L-آمینوآسید اکسیداز، هیالورونیداز، سرین پروتئاز، متالوپروتئاز، دیس اینتگرین و لکتین است (۳۰). پروتئین ها و پپتیدها حدود ۹۵٪-۹۰٪ وزن خشک ونوم را به خود اختصاص می دهند.

با توجه به نتایج حاصله در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ما ۶ فراکشن استخراج کردیم الکتروفورز فراکشن های بدست آمده با استفاده از ژل پلی آکرلید آمید، نشان داد که کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با کیفیت مناسبی انجام شده. اثر سمیت سلولی فراکشن های بدست آمده با استفاده از تست MTT بررسی شد و درصد سمیت فرکشن های مختلف بر سلولهای سرطانی ریه مشخص شد.

با توجه به اینکه هدف این مطالعه بررسی اثر سمیت سلولی فراکشن هایی با درجه خلوص بالا تر بود، به همین منظور فراکشن سمی برای کروماتوگرافی تعویض یونی، انتخاب شد. در کروماتوگرافی تعویض یونی، تعداد شش فراکشن آنیونی با توجه به قدرت اتصال یونی به ترتیب از ستون خارج شد.

فراکشن های بدست آمده برای تغلیظ بیشتر با فاکون های دیالیز با Cut off: 3 kDa نمک زدایی شدند.

از آنجایی که در این تحقیق هدف دستیابی به فراکشنی با اثرسمی به نسبت کمتری بر سلول های نرمال بود به همین منظور تست

## REFERENCE

---

---

1. Ashim K. M, Vibhuti A, Abhirup M, Kishore Ch, Chandramouli N, Sujay Sh, et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2015; 219: 248-268
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *American cancer society*. 2015; 65(2): 87-108.
3. Marshall AL, Christiani DC, Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel? *Carcinogenesis*. 2013 Mar; 34(3): 487-502.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) What Are the Risk Factors for Lung Cancer? Available from: [http://www.cdc.gov/cancer/lung/basic\\_info/risk\\_factors.htm](http://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm). Accessed January 11, 2016.
5. Maria N.T, Rayjean J.H, Thorunn R, David C.Ch, John K.F, Heike B, et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. *Hum Mol Genet*. 2012 Nov 15; 21(22): 4980-4995.
6. Miller K.D, Siegel R.L, Lin C.C, Mariotto A.B, Kramer J.L, Rowland J.H, Stein K.D, Alteri R, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *a Cancer Journal for Clinicians*. 2016 Jul; 66(4): 271-89.
7. Fojo T, Mailankody S, Lo A. Unintended consequences of expensive cancer therapeutics-the pursuit of marginal indications and a me-too mentality that stifles innovation and creativity: The john conley lecture. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2014 Dec;140(12):1225-36.
8. Heffeter P, Jungwirth U, Jakupec M, Hartinger C, Galanski M, Elbling L, et al. Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities. *Drug Resist. Updates*. 2008;11(1-2):1-16.
9. Wu D, Wang D.C, Cheng Y, Qian M, Zhang M, Shen Q, Wang X. Roles of tumor heterogeneity in the development of drug resistance: A call for precision therapy. *Semin. Cancer Biol*. 2017; 42:13-19.
10. Chin Y.W, Balunas M.J, Chai H.B, Kinghorn A.D. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*. 2006 Apr 14; 8(2): E239-53.
11. de Castro D, Stefanie N, Leonardo Puchetti P, Anna Paula B, Natália Borges B, Luciana Z, Patrícia M S-C et al. "The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line." *Toxicon*. 2014; 90: 299-307.



12. Decker T, Lohmann-Matthes M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods*. 1988 Nov 25;115(1):61-9.
13. Debnath A, Saha A, Gomes A, Biswas S, Chakrabarti P, Giri B, et al. A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon*. 2010; 56:569-579.
14. Calmette A, Saenz A, Costil L. Effets du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontané (adeno-carcinoma) de la souris. *CR Acad Sci*. 1933; 197:205-209.
15. Dufton MJ, Hider RC. Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol Ther*. 1988;36(1):1-40.
16. Feofanov AV, Sharonov GV, Astapovo MV, Radionov DI, Utkin YN, Arseniev AS. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. *Biochem J*. 2005;390:11-18.
17. 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 Jan; 93: 136-143.
18. Palefsky JM. Screening to prevent anal cancer: Current thinking and future directions. *Cancer Cytopathol*. 2015 Sep;123(9):509-10.
19. LAEMMLI U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15; 227(5259): 680-5.
20. Freidberg R. An Investigation Into the Antimicrobial and Anticancer Activities of *Geranium Incanum*, *Artemisia Afra* and *Artemisia Absinthium*. Nelson Mandela Metropolitan University. 2009; 1-245.
21. Ian A. Cree M.B. Ch.B. cancer cell culture. New York: Springer; 2011
22. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sängler M, Schmidberger H, and Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiat Oncol*. 2012 Jan 3; 7: 1.
23. Maqsood A, Mohd Javed A, Maqsood A.S, Javed A, Javed M, Abdulaziz A Al-K, Mohamad S.A, Salman A.A. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*. 2011 May 10;283(2-3):101-8.
24. Chen Q, Ke H, Dai Z, Liu Z. Nanoscale theranostics for physical stimulus-responsive cancer therapies. *Biomaterials*. 2015; 73: 214-230.
25. Jardim G, Lima D, Valença W, Lima D, Cavalcanti B, Pessoa C, et al. Synthesis of Selenium-Quinone Hybrid Compounds with Potential Antitumor Activity via Rh-Catalyzed C-H Bond Activation and Click Reactions. *Molecules*. 2017 Dec 30;23(1):83.
26. Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett*. 2014;347:159-166.
27. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2015;93:52-79.

28. David J.N, and Gordon M.C. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 2007 Mar;70(3):461-77.

29. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas A.K, Dasgupta, S.C, Giri B, Debnath A, et al. Anticancer poten of animal venoms and toxins. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2010 Feb; 48(2): 93-103.

30. Vonk FJ, Jackson K, Doley R, Madaras F, Mirtschin PJ, Vidal N. Snakevenom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. *Bioessays*. 2011 Apr; 33(4): 269-79.

31. Sadjadi A, Zahedi MJ, Darvish-Moghadam S, Nourai M, Alimohamadian M, Ghorbani A, et al. The first population-based cancer survey in Kerman province of Iran. *Iran J Public Health*. 2007; 36(4): 26-34.

32. Xie Q, Tang N, Wan R, Qi Y, Lin X, Lin J. Recombinant snake venom cystatin inhibits the growth, invasion and metastasis of B16F10 cells and MHCC97H cells in vitro and in vivo. *Toxicon*. 2011; 57(5):704-11.

33. Azevedo FVPV, Lopes DS, Gimenes SNC, Achê DC, Vecchi L, Alves PT, et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA 2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *International journal of biological macromolecules*. 2016 Jan; 82: 671-7.