

## مطالعه آزمایشگاهی اثرات ضد باکتریایی و سمیت سلولی فراکسیون‌های جدا شده از زهر افعی زنجانی

جمیل زرگان<sup>۱\*</sup>، فرشید غلامی<sup>۱</sup>، حسین ثباتی<sup>۲</sup>، حمیدرضا گودرزی<sup>۳</sup>، اشکان حاجی نورمحمدی<sup>۱</sup> و محمدباقر صالحی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه جامع امام حسین (علیه السلام)، دانشکده علوم پایه، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، انیستیتو سبک زندگی، مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه

<sup>۳</sup> ایران، کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

### چکیده

در این بررسی اثرات ضد باکتریایی و سمیت سلولی فراکسیون‌های جدا شده از زهر افعی زنجانی در شرایط آزمایشگاهی مطالعه گردید. فراکسیون‌های زهر خام افعی زنجانی با استفاده از RP-HPLC و پس از تزریق به ستون C-18، جداسازی، و سپس جمع‌آوری شدند. میزان پروتئین موجود در هر فراکسیون با استفاده از روش برادفورد تخمین و اثرات ضدباکتری آن‌ها در غلظت ۲۰ µg/mL با استفاده از روش‌های سنجش MIC و MTT، علیه باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه گردید. سپس سمیت سلولی مؤثرترین فراکسیون‌های دارای اثرات ضدباکتریایی، با استفاده از روش‌های سنجش MTT و Neutral red uptake بر روی سلول HepG2 بررسی شد و اثر آنها بر القا آپوپتوز به کمک آزمایش کامت تعیین گردید. نتایج نشان داد که اثرات ضدباکتریایی فراکسیون‌ها علیه باکتری‌های مورد بررسی متفاوت بود، بترتیبی که فراکسیون شماره ۲ روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، فراکسیون‌های شماره ۲ و ۹ روی باکتری *اشریشیا کولی* و فراکسیون‌های شماره ۵، ۷ و ۹ روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین اثر را داشته‌اند. فراکسیون شماره ۲ در غلظت ۲۰ µg/mL و شماره ۵ در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین سمیت سلولی را داشته در حالی که فراکسیون شماره ۷ کمترین سمیت را ایجاد کرده است بنابر نتایج، نوع مرگ سلولی القا شده توسط فراکسیون‌ها به صورت وابسته به غلظت از نوع آپوپتوز و نکروز بود. داده‌های این مطالعه برای اولین بار نشان داد که فراکسیون‌های جدا شده از زهر افعی زنجانی اثرات ضد باکتری و ضد سرطانی دارند.

واژگان کلیدی: ضد باکتریایی، سمیت سلولی، سلول HepG2، زهر، افعی زنجانی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۷۷۱۰۴۹۳۸، پست الکترونیکی: [jazrgan@ihu.ac.ir](mailto:jazrgan@ihu.ac.ir)

### مقدمه

عملکرد سم مارها در نتیجه‌ی ترکیب عملکرد پروتئین‌های متعدد با عملکرد آنزیمی و یا غیرآنزیمی می‌باشد. (۱۶). تاکنون حدود ۲۶ نوع آنزیم مختلف از سم مار جداسازی شده که از جمله آن‌ها فسفولیپاز A (Phospholipase A) و یا ترکیبی از آن می‌باشد. بعضی از فسفولیپازها نسبتاً غیر سمی و برخی دیگر به شدت سمی بوده و دارای خواص

زهر مارهای سمی مخلوطی از مواد پیچیده پروتئینی با خواص سمی و آنزیمی و مواد غیر پروتئینی از قبیل یون‌های مختلف فلزی، انواع چربی‌ها (کلسترول و لسیتین و...)، کربوهیدرات‌ها (گالاکتوز و گلوکز)، نمک‌های مختلف فلزی و شبه فلزی، مواد رنگی، ریبوفلاوین، آب، فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌ها می‌باشد (۲). اعتقاد بر این است که تقریباً تمامی

افعی زنجانی یکی از مارهای سمی ایران است. این مار متعلق به خانواده وپیریده و جنس وپیرا بوده و از نواحی کوهستانی، علفزارها و مناطق بیلاقی مناطق شمالی ایران گزارش شده و در استان‌های گیلان، زنجان، آذربایجان شرقی و قزوین انتشار دارد (۹).

### مواد و روشها

این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. به این صورت که ابتدا اثرات ضد باکتریایی فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از زهر خام افعی زنجانی و سپس اثرات سمیت سلولی آن‌ها (مؤثرترین فراکسیون‌های دارای خواص ضد باکتریایی) بررسی شد.

**تهیه زهر:** برای این منظور با رعایت نکات ایمنی دندان نیش مار درون شیشه مخصوص جمع‌آوری زهر قرار گرفت، سپس با فشاری مختصر به غده سمی، زهر به داخل شیشه تزریق شد. محلول سمی لیوفیلز شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**مطالعه الکتروفورتیکی پروتئین‌های زهر خام با روش SDS-PAGE:** در این مطالعه بمنظور تعیین الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های زهر خام از ژل ۱۵ درصد پلی آکریل آمید استفاده گردید (۵).

پس از انجام الکتروفورز، ژل با کوماسی بریلیانت بلو R-250 رنگ‌آمیزی شد. و متعاقب آن تخمین وزن مولکولی باندهای پروتئینی انجام گرفت. برای محاسبه وزن مولکولی هر باند، طول مهاجرت هر باند بر طول ژل (فاصله خط Tracking Buffer پایین ژل که نتیجه حرکت کوماسی بلو است تا ابتدای ژل جداکننده) تقسیم گردید تا فاکتور تاخیر (Rf) تعیین شود. سپس منحنی استاندارد که لگاریتم وزن مولکولی هر باند از مارکر پروتئینی در محور Y ها و Rf محاسبه شده‌ی باندهای مارکر در محور X ها قرار داشت رسم گردید. سپس با استفاده از معادله خط و با

نوروتوکسیک (Neurotoxic) و میوتوکسیک (Myotoxic) هستند. زهر اغلب افعی‌ها دارای اندوپپتیداز (Endopeptidase) و آرژنین استرهدرولاز (Arginine esterhydrolase) می‌باشد که در کاهش فشارخون، خونریزی و نکروز نقش دارند (۹).

مطالعات سم‌شناسی نشان داده است که زهرمارها بعنوان یک منبع طبیعی مهم برای جداسازی و شناسایی مولکول‌های موثر در درمان بیماری‌های لاعلاج مانند سرطان، مورد توجه بسیاری از محققین جامعه پزشکی قرار گرفته است (۲۳). این بررسی‌ها نشان می‌دهد که تاکنون مولکول‌های ضد میکروبی زیادی از زهرگونه‌های مختلف مار جداسازی و به دنیای فارماکولوژی معرفی شده اند (۱۱، ۲۱ و ۲۲).

بر این اساس، اطلاعات منتشر شده حکایت از آن دارد که زهر گونه‌های مختلف مارها نتایج امیدوارکننده‌ای علیه باکتری‌های شایع عفونی مثل: استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیا کولی، سودوموناس آئروجینوسا، باسیلوس سوبتیلیس، پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس و ایتروباکتر آئروژنز می‌باشند (۱۵).

همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی از مولکول‌های موجود در سموم مارها دارای فعالیت ضدتوموری بوده و از رشد و تکثیر سلولهای سرطانی جلوگیری می‌نمایند (۲۴). بررسی‌ها نشان داده است زهر گونه‌های مختلف مارها نتایج امیدوارکننده‌ای علیه باکتری‌های شایع عفونی مثل: استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیا کولی، سودوموناس آئروجینوسا، باسیلوس سوبتیلیس، پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس و ایتروباکتر آئروژنز می‌باشند (۱۵).

در این مطالعه برای اولین بار خواص ضد باکتریایی فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از زهر افعی زنجانی و تعیین سمیت سلولی مؤثرترین فراکسیون‌ها بررسی گردید.

میکروارگانسیم‌ها، لوله های محتوی فراکسیون‌ها به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

توجه به RF نمونه مجهول، وزن مولکولی هر باند محاسبه شد.

جدول ۱- برنامه شیب خطی حلال جهت جداسازی فراکسیون‌های زهر افعی زنجانی

سرعت جریان (mL/min)	محلول %B	محلول %A	زمان (دقیقه)
۸	۱۰	۹۰	۰:۰۰
۸	۱۰	۹۰	۲:۰۰
۸	۹۵	۵	۵۵:۰۰
۸	۹۵	۵	۶۰:۰۰
۸	۱۰	۹۰	۷۰:۰۰

جدول ۲- برنامه شستشوی ستون کروماتوگرافی

سرعت جریان	محلول %B	محلول %A	زمان (دقیقه)
۸	۵	۹۵	۰:۰۰
۸	۹۰	۱۰	۱۵:۰۰

جهت از بین بردن آلودگی‌های احتمالی در محلول سمی مورد نیاز تست‌های سلولی، ۱ درصد آنتی بیوتیک- آنتی- میکوتیک (Invitrogen, USA. CatNo: A5955) به لوله های حاوی فراکسیون‌ها اضافه شد (۲۷).

**باکتری‌ها و رده سلولی مورد مطالعه:** سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی غیر بیماری زا می باشند که از گرم منفی های مورد استفاده به *Bacillus subtilis*, ATCC (6633) و *Escherichia coli*, ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) بودند که از مرکز منطقه‌ای قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC) (Persian Type Culture Collection) خریداری شدند. رده‌ی سلولی سرطان کبد (HepG2) از بانک سلولی موسسه انستیتو پاستور ایران (کد C158) خریداری گردید.

**جداسازی فراکسیون‌های زهر با HPLC:** برای جداسازی و جمع‌آوری فراکسیون‌های زهر افعی زنجانی از ستون تهیه‌ای C-18 و کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography) (RP-HPLC) استفاده شد (۶). بدین صورت که، مقدار ۴۰ میلی‌گرم از زهر خام در ۲۰ میلی‌لیتر بافر [آب دو بار تقطیر- ۰/۱٪ تری فلوروآستیک اسید (TFA) دارای ۵ درصد استونیتریل] حل نموده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای جداسازی اجزاء مختلف زهر مورد استفاده قرار گرفت. برای جداسازی از دو محلول A و B و برنامه شیب خطی حلال مندرج در جدول ۱ استفاده شد. محلول A شامل ۲۰ درصد استونیتریل و ۰/۱ درصد TFA و محلول B از ترکیب ۸۰ درصد استونیتریل و ۰/۱ درصد TFA تشکیل شده بود. پس از شستشوی ستون (جدول ۲)، نمونه با حجم ۱ میلی‌لیتر (غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از بافر حاوی زهر به ستون تزریق و فراکسیون متناظر با هر پیک در ظروف عاری از هر گونه آلودگی جمع‌آوری گردید (۲۸).

**حل کردن فراکسیون‌ها و پروتئین‌سنجی آن‌ها:** با توجه به این که بافر مناسب انتخابی جهت تهیه سوسپانسیون ماده سمی می‌بایست برای برای باکتری و سلول غیر سمی باشد، بر این اساس محلول ۵۰ mM Tris-HCl جهت تست های ضد باکتریایی و محیط کشت DMEM استریل به عنوان گزینه مناسب برای تهیه سوسپانسیون فراکسیون‌ها برای سمیت سلولی انتخاب شد. پروتئین‌سنجی به روش برادفورد (۳) در طول موج ۵۹۵ انجام شد و برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده شد. برای جلوگیری از رشد

۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت در شرایط تاریکی تا زمان تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان (حدود ۱ ساعت)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بمنظور حل شدن کریستال‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در محیط بدون نور و دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر (۸) توسط دستگاه خواننده الایزا (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۳ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. درصد زنده ماندن باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف زهر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۰):

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

**مطالعه اثرات ضد باکتری فراکسیون‌ها با روش MIC assay** (minimum inhibitory concentration): در این آزمایش اثرات ضد باکتریایی فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از زهر خام با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رشد باکتری‌ها با استفاده از پلیت ۹۶ خانه بررسی شد (۱). مراحل انجام این آزمایش مشابه تست سنجش MTT بوده ولی پس از ریختن فراکسیون‌ها در چاهک‌ها و انکوبه کردن به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. آزمایش فوق ۳ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر فراکسیون ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد و درصد مهارت باکتری‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۴):

$$\text{درصد مهارت باکتری} = \left( 1 - \frac{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی تیمار شده}}{\text{OD سوسپانسیون باکتریایی}} \right) \times 100$$

**بررسی سمیت سلولی موثرترین فراکسیون‌های دارای خواص ضدباکتریایی:** کشت سلول: سلول‌های HepG2

**مطالعه اثرات ضد باکتریایی: محیط کشت و آنتی بیوتیک:** جهت کشت باکتری‌ها و انجام آزمایش‌های ضد باکتریایی از محیط کشت مولر هیتتون (MH) مایع شرکت (CatNo.249892) (QueLab (کانادا) استفاده شد. بمنظور مقایسه خواص ضد باکتریایی زهر از تتراسایکلین (Sigma, USA. CatNo:T3258) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده گردید.

**بررسی خواص ضد باکتریایی فراکسیون‌ها به روش MTT** (3-(4,5-Dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-Diphenyl-) (tetrazolium bromide):

روش MTT یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس اندازه‌گیری تنفس میتوکندریایی استوار است. طی واکنش، نمک زرد رنگ MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی در میتوکندری‌ها است شکسته شده و به کریستال‌های آبی رنگ نامحلول فورمازان تبدیل می‌شود. این کریستال‌ها با اضافه نمودن DMSO به صورت محلول در می‌آیند (۷). بمنظور انجام این تست ابتدا از باکتری‌ها کشت تازه تهیه شد. پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای جذب معادل ۰/۱) (۲۵). مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. سپس فراکسیون‌های پروتئینی با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (معادل IC<sub>50</sub> زهر خام مار افعی زنجانی بر علیه باکتری های گرم مثبت) به آن‌ها اضافه و با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هیتتون برات) حجم چاهک‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در این آزمایش از سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی، تتراسایکلین (غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به عنوان بلانک استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای باسیلوس سوبتیلیس شیکر انکوباتور) انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، ۵ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت

بنفش رنگ فورمازان (۲-۱ ساعت) در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به انکوبه گردید. در این مرحله محتویات چاهک‌ها تخلیه و چاهک‌ها دو مرتبه با محلول PBS شستشو داده شد. بمنظور حل نمودن کریستال‌های فورمازان، از محلول DMSO به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و بعد از انکوباسیون تحت شرایط تاریکی به مدت ۲ تا ۴ ساعت در دمای اتاق، جذب در ۵۷۰ نانومتر (۷) با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد.

این تست ۳ مرتبه تکرار و در هر مرتبه برای هر غلظت ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. سپس از داده‌ها میانگین گرفته و درصد زنده ماندن سلول‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد (۷):

$$\text{درصد حیاتی سلول} = \frac{\text{OD بلاک} - \text{OD تست}}{\text{OD کنترل منفی} - \text{OD بلاک}} \times 100$$

**مطالعه سیتوتوکسیسیته فراکسیون‌ها با روش رنگ سنجی قرمز خشتی (Neutral red uptake assay):** این روش بر مبنای جذب رنگ قرمز خشتی 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 (۱).

مراحل رنگ سنجی قرمز خشتی مشابه تست MTT بوده اما پس از ریختن غلظت‌های مختلف فراکسیون‌ها درون چاهک‌ها و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت، به جای محلول MTT، ۵ میکرولیتر از محلول قرمز خشتی (با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و تا زمان تشکیل کریستال‌ها (حدود ۲-۴ ساعت)، پلیت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه گردید. پس از این مدت، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و با دو مرتبه شستشو با PBS ماده قرمز خشتی جذب نشده توسط سلول از چاهک‌ها خارج گردید. جهت فیکس شدن سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فیکس کننده

در محیط کشت (DMEM-F12 (Gibco CatNo:12400-016) Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین (Sigma-Aldrich, USA. CatNo:15140-122) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت و پاساژ داده شدند. پس از چهار بار پاساژ دادن و تراکم در حدود ۸۰٪ سلول‌ها در داخل بستر فلاسک، سلول‌ها با استفاده از Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA. CatNo:097K2393) از کف فلاسک جدا و پس از شمارش با استفاده از لام هموسیتومتر مورد استفاده قرار گرفتند.

**آزمون MTT جهت بررسی سمیت سلولی فراکسیون‌ها:** در این مطالعه سمیت سلولی فراکسیون‌ها (مؤثرترین فراکسیون‌های پروتئینی دارای خواص ضد باکتریایی) در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی سلول HepG2 بررسی شد. این آزمون مطابق روش زرگان و همکاران انجام گردید (۲۸).

ابتدا تعداد ۳×۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده و حجم چاهک‌ها با محیط کشت (فاقد سرم) به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و پلیت به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه گردید. پس از انکوباسیون محیط کشت قدیمی تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (فاقد سرم) حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فراکسیون‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک کنترل با محیط کشت فاقد سرم تعویض گردید. از محیط کشت فاقد سلول به عنوان بلانک و محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل استفاده شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور تحت شرایط ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (بافر آن PBS) به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت تا زمان تشکیل کریستال‌های

کربنیک انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون، با استفاده از تریسین 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 rpm ۱۵۰۰ 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 rpm ۱۵۰۰ 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 (1NMA) (-Normal Melting) (Agaros) بر روی اسلایدها (لام‌ها) قرار داده شد و سوسپانسیون سلولی با محلول یک درصد آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMA1%) (Low Melting-Agaros) به نسبت یک به دو مخلوط و روی اسلایدهای تهیه شده با NMA1% ریخته شد. جهت ایجاد یک لایه سلول روی هر اسلاید یک لامل قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۱۰ دقیقه لامل آن‌ها برداشته شد و بمنظور لیز شدن غشا و همچنین تخریب هسته سلول، اسلایدها در بافر لیز کننده سرد و تازه تهیه شده به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خارج کردن بافر لیز کننده، اسلایدها ۲۰ دقیقه و در ۲ نوبت با بافر الکتروفورز شستشو داده شدند. بمنظور 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 میلی‌آمپر 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 خنثی‌کننده (Neutralization buffer) قرار داده شدند. جهت رنگ آمیزی

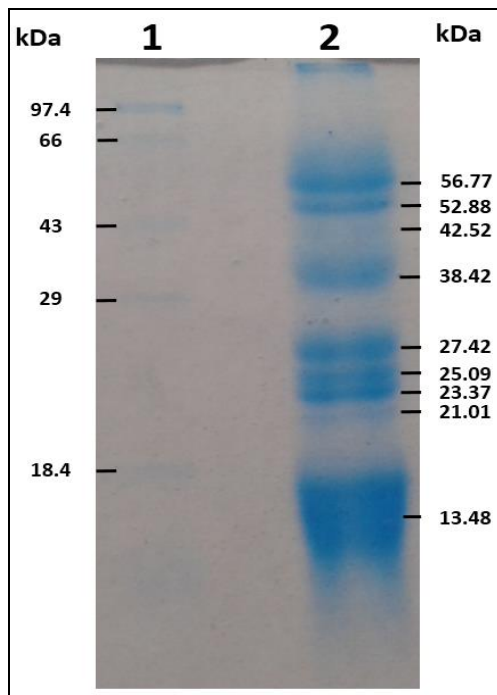
(Fixing solution) (کلریدکلسیم و فرمالدئید) در چاهک‌ها ریخته شد و پس از مدت ۱ دقیقه خارج گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده (Sulobilize solution) (اسید استیک و اتانول) به چاهک‌ها اضافه و پلیت در شرایط تاریکی بر روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا (Biotek, USA) اندازه‌گیری گردید. در این تست محیط کشت بدون سلول به عنوان بلانک و محیط کشت حاوی سلول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. 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 شد:

$$\text{درصد مهار سلولی} = \left( 1 - \frac{\text{OD بلاک} - \text{OD تست}}{\text{OD کنترل منفی} - \text{OD بلاک}} \right) \times 100$$

مطالعه آسیب‌های DNA سلولی فراکسیون‌ها با روش کامت قلیایی (Alkaline Comet assay): در این مطالعه جهت تعیین نوع مرگ سلولی (آپتوز یا نکروز) ناشی از اثرات سایتوتوکسیک فراکسیون‌ها از روش کامت قلیایی استفاده شد (۲۰). این روش در مقایسه با سایر روش‌های سنجش آسیب DNA در سلول یوکاریوت، یک روش بسیار حساس، آسان، کم هزینه و سریع جهت اندازه‌گیری فرگمته شدن DNA در سلول‌های منفرد می‌باشد (۱۸). 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 درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد  $\text{CO}_2$  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 ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فراکسیون‌ها به آن‌ها افزوده شد. پلیت برای ۲۴ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد گاز

و ۱۰ فاقد پروتئین بوده و بر این اساس در بررسی‌های بعدی مورد توجه قرار نگرفتند.



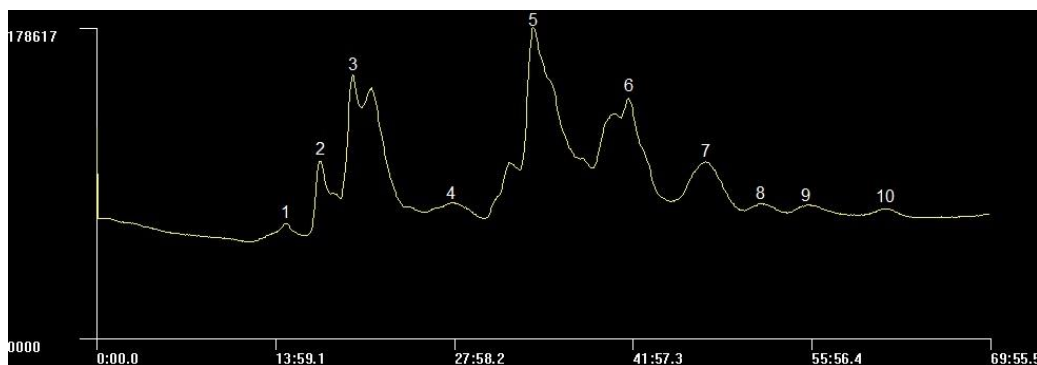
شکل ۱- الگوی الکتروفورزی زهر افعی زنجانی در ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE. چاهک ۱- استاندارد وزنی پروتئین چاهک ۲- زهر افعی زنجانی

سلول‌ها به هر اسلاید ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید با ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه با آب دوبار 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:** داده‌های به دست آمده با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One-Way of Variance Analysis) و آزمون توکی بررسی شدند و در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

**نتایج مطالعه الگوی الکتروفورزی و کروماتوگرافی زهر خام و جداسازی فراکشن‌های مرتبط:** در مطالعه الکتروفورزی زهر خام افعی که با استفاده از ژل SDS-PAGE انجام شد، ۹ باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۳ الی ۵۷ کیلو دالتون مشاهده شد. (شکل ۱) پروتئین سنجی فراکسیون‌ها نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۱، ۸



شکل ۲- کروماتوگرام سم افعی زنجانی

میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی (محیط کشت نرمال واجد باکتری) اثر مهاری معنی‌دار ایجاد نموده و درصد زنده ماندن فراکسیون شماره ۹

**نتایج اثر ضد باکتریایی با استفاده از MTT assay:** نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی فراکسیون‌ها با روش سنجش MTT بر روی باکتری *شریشیا کولی* نتایج نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۲ و ۹ در غلظت ۲۰

نسبت به کنترل مثبت (تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌دار نداشت.

جدول ۳ - زمان شروع و پایان هر پیک در HPLC و میزان غلظت پروتئین آن

فراکشن‌ها	FR 1	FR 2	FR 3	FR 4	FR 5	FR 6	FR 7	FR 8	FR 9	FR 10
زمان شروع پیک (دقیقه)	۱۲:۲۷	۱۶:۲۹	۲۰:۴۶	۲۵:۵۶	۳۰:۲۷	۳۸:۴۶	۴۵:۱۴	۵۰:۳۹	۵۴:۰۲	۶۰:۰۱
زمان پایان پیک (دقیقه)	۱۶:۰۵	۲۰:۲۸	۲۵:۱۹	۳۰:۱۴	۳۸:۴۵	۴۴:۴۴	۵۰:۱۹	۵۳:۳۹	۵۸:۴۷	۶۳:۱۴
میزان پروتئین (μg/μL)	۰	۰/۱۴۹	۱/۷۶۵	۱/۴۵۹	۱۱/۵۹	۱۳/۹۶	۹/۱۳۹	۰	۱/۴۲۵	۰

سوتیلیس در مقایسه با کنترل منفی به صورت معنی‌دار تفاوت داشته اما در مقایسه با کنترل مثبت اثر مهاري معنی‌دار نبود. فراکسیون شماره ۵ نسبت به سایر فراکسیون‌ها اثر مهاري بیشتری از خود نشان داد.

فراکسیون‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۷ و ۹ با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به کنترل منفی رشد مهاري معنی‌دار ایجاد نموده اما میزان مرگ و میر ناشی از آن‌ها در سوش مورد اشاره در مقایسه با کنترل مثبت (تتراسایکلین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بسیار کم و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴).

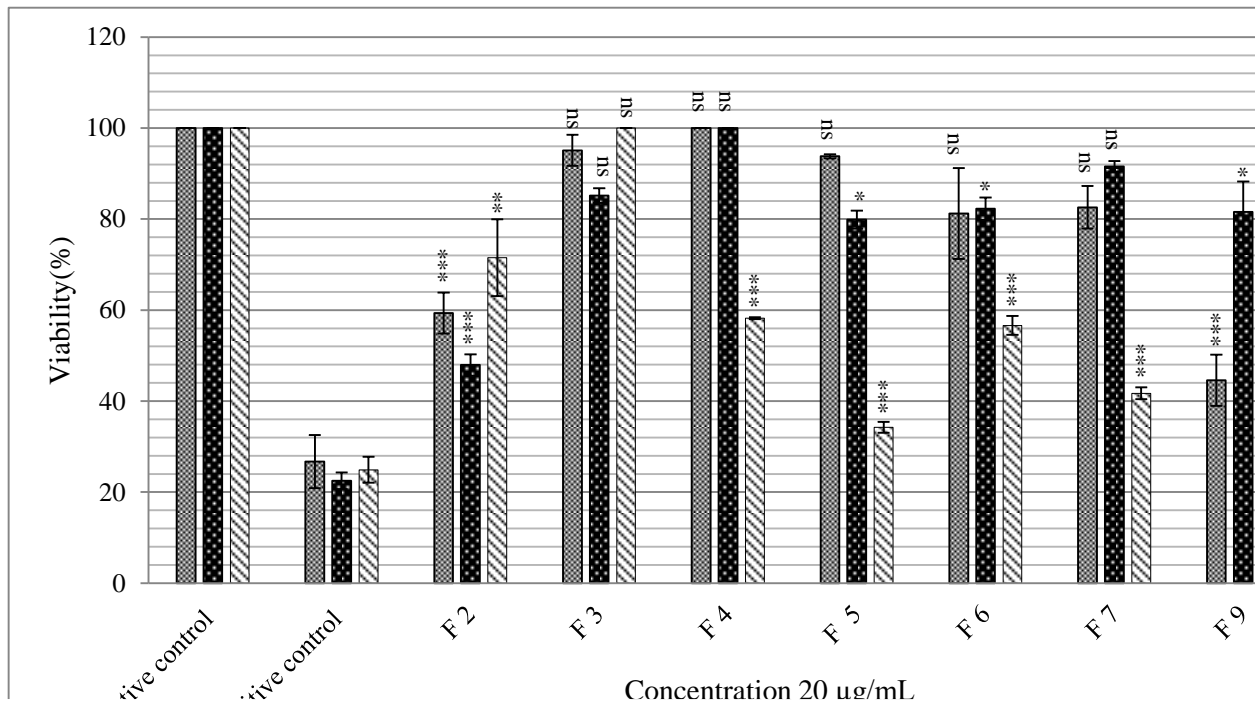
**نتایج سمیت سلولی بر روی رده سلولی HepG2 با استفاده از MTT assay:** مطالعه اثرات سمیت سلولی فراکسیون‌های دارای خواص ضد باکتریایی شامل فراکسیون‌های شماره ۲، ۵، ۷ و ۹ جدا شده از زهر خام، بر رشد سلول‌های سرطانی HepG2 در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد که فراکسیون ۲ در دو غلظت ذکر شده درصد زنده ماندن سلول‌ها را در مقایسه با کنترل به ۷۹/۱۵ و ۳۵ درصد کاهش داد. این در حالی است که درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از تماس با فراکسیون شماره ۵ در غلظت‌های فوق‌ترتیب ۷۲/۶۵ و ۶۶/۰۵ بوده است.

بررسی درصد زنده ماندن فراکسیون‌های جدا شده از زهر بر روی باکتری *باسیلوس سوتیلیس* نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۲، ۵، ۶ و ۹ در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی اثر مهاري معنی‌دار داشتند. بیش‌ترین اثر مهاري فراکسیون‌های جدا شده از زهر خام به فراکسیون شماره ۲ با اثر مهاري حدود ۴۲ درصد تعلق داشته و از اثر مهاري تتراسایکلین به صورت معنی‌داری کمتر بوده است.

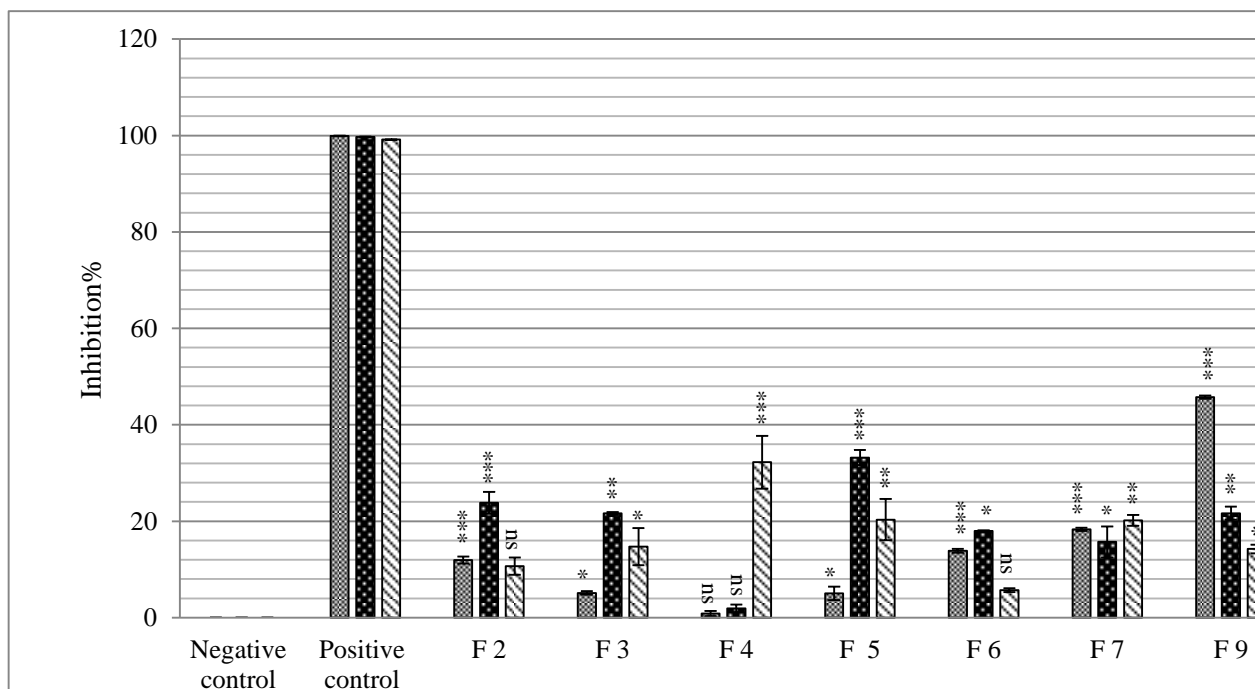
در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شد که درصد زنده ماندن در فراکسیون‌های شماره ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۹ بترتیب ۷۱/۵۲، ۵۸/۲۲، ۳۴/۲۲، ۵۶/۶۲، ۴۱/۷۱ و ۴۷/۲۹ بود که نسبت به کنترل منفی معنی‌دار بودند. فراکسیون‌های شماره ۵ و ۷ نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد تفاوت معنی‌دار نداشتند (شکل ۳).

**نتایج حداقل غلظت مهاري (سنجش MIC) فراکسیون‌های جدا شده از زهر:** نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی فراکسیون‌ها با روش سنجه MIC مشخص کرد که فراکسیون‌های شماره ۲، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل منفی اثر مهاري معنی‌دار اما نسبت به کنترل مثبت اثر مهاري معنی‌دار نداشتند. نتیجه این مطالعه نشان داد که فراکسیون شماره ۹ در مقایسه با سایر فراکسیون‌ها اثر مهاري بیشتری داشته است.

اثرات مهاري فراکسیون‌های شماره ۲، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری *باسیلوس*



شکل ۳- اثر ضد باکتری فراکسیون‌های جدا شده از زهر خام با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از سنجش MTT. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند. شایان ذکر است تیمار با تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. (۰/۰۵ <math>P</math>): (\*\*\*)  $P < 0.001$  و (\*\*\*)  $P < 0.001$ ، (\*):  $P < 0.05$ ، (ns):  $P > 0.05$ .

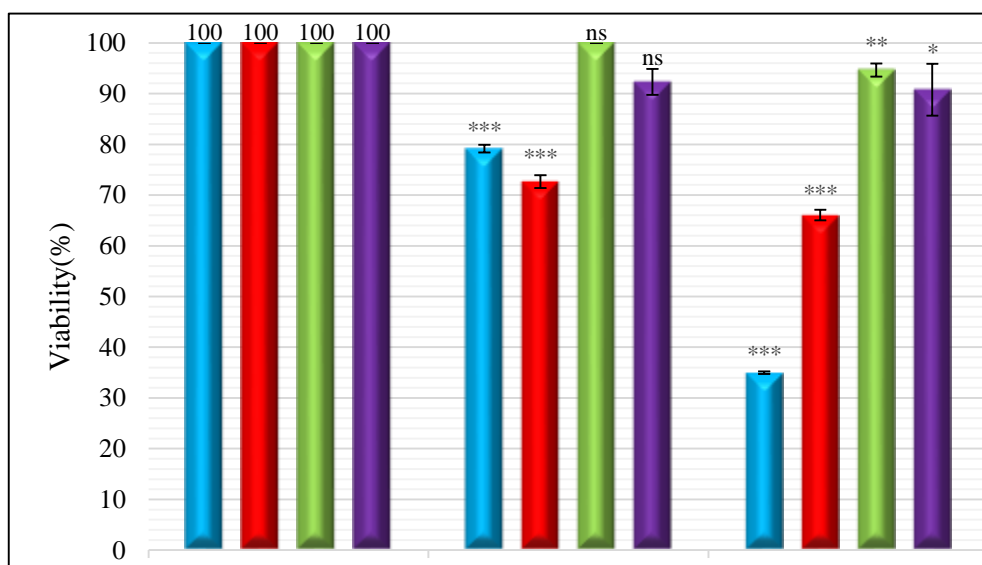


شکل ۴- اثر ضد باکتری فراکسیون‌های جدا شده از زهر خام با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از سنجش MIC. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند شایان ذکر است تیمار با تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. (۰/۰۵ <math>P</math>): (\*\*\*)  $P < 0.001$  و (\*\*\*)  $P < 0.001$ ، (\*):  $P < 0.05$ .

میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل معنی‌دار نبوده، لیکن این اثر در غلظت ۲۰ میکروگرم در مقایسه با غلظت ۱۰ میکروگرم و همچنین کنترل معنی‌دار بوده است. همچنین درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از تماس با فراکسیون شماره ۹ در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل معنی‌دار اما در غلظت پایین‌تر معنی‌دار نبود. (شکل ۵).

درصد زنده ماندن فراکسیون شماره ۷ در غلظت‌های ذکر شده بترتیب ۱۰۰ و ۹۴/۶۵ درصد بوده ولی در مورد فراکسیون ۹ به ۹۲/۳۰ و ۹۰/۷۶ درصد کاهش یافت.

اثرات فراکسیون‌های شماره ۲ و ۵ در مهار رشد سلول با دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل و همچنین در مقایسه با یکدیگر معنی‌دار بود. اثر مهاری فراکسیون شماره ۷ بر رشد سلول‌ها در غلظت ۱۰

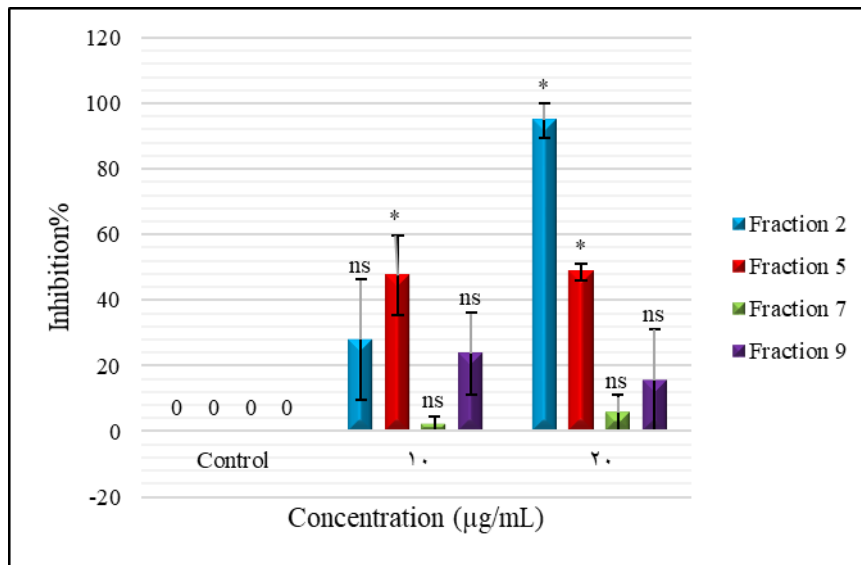


شکل ۵- بررسی اثرات فراکسیون‌های جدا شده از زهر خام بر سلول سرطانی کبد با استفاده از سنجش MTT. فراکسیون‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند (ns:  $P > 0/05$ ), (\*:  $P < 0/05$ ), (\*\*:  $P < 0/01$ ) و (\*\*\*:  $P < 0/001$ ).

است. درصد مهار سلول پس از تیمار با فراکسیون ۷ در غلظت‌های ذکر شده بترتیب ۲/۲۵ و ۵/۶۰ درصد بوده درحالی‌که درصد مهار فراکسیون ۹ در دو غلظت بالا به ۲۳/۶۵ و ۱۵/۵۶ کاهش یافته است.

بررسی نتایج و آنالیز داده‌ها نشان داد درصد مهار فراکسیون شماره ۲ در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل معنی‌دار اما در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل معنی‌دار مشاهده نشد، همچنین درصد مهار این غلظت‌ها نسبت به هم معنی‌دار و قابل توجه بود.

**نتایج اثرات مهاری بر روی رده سلولی HepG2 با استفاده از Neutral red uptake assay:** اثرات مهاری فراکسیون‌های دارای خواص ضد باکتریایی (فراکسیون‌های شماره ۲، ۵، ۷ و ۹) در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رده سلولی HepG2 به روش سنجش Neutral red uptake بررسی شد که نتایج آن در شکل شماره ۶ آمده است. درصد مهار در فراکسیون ۲ در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بترتیب ۲۷/۹۴ و ۹۴/۸۰ درصد بوده است. این در حالی است که فراکسیون ۵ در غلظت‌های فوق بترتیب ۴۷/۵۹ و ۴۸/۵۵ درصد، سلول‌ها را مهار کرده



شکل ۶- بررسی اثرات فراکسیون‌های زهر خام بر سلول سرطانی کبد با استفاده از سنجش Uptake assay. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند (ns:  $P > 0.05$ ) و (\*:  $P < 0.05$ ).

میزان القاء آپوپتوز و نکروز فراکسیون شماره ۲ در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بترتیب ۵۵/۸ و ۲۴/۲ درصد بوده است. در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکسیون شماره ۵، درصد القاء آپوپتوز بترتیب ۲۵/۶۱ و ۴۱/۷۰ و میزان القاء نکروز بترتیب ۷/۷۸ و ۱۳/۹ بوده است. میزان القاء آپوپتوز فراکسیون شماره ۷ در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بترتیب ۱۰ و ۳۴/۲۱ درصد بوده درحالی‌که میزان نکروز در غلظت‌های مورد اشاره بترتیب ۱۰/۸۲ و ۱۹/۴۹ درصد است. همچنین در مورد فراکسیون ۹ در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد القاء آپوپتوز بترتیب ۲۰/۸۹ و ۳۳/۵۹ بوده درحالی‌که میزان القاء نکروز بترتیب ۱۱/۹۴ و ۲۱/۱۷ می‌باشد.

بررسی نتایج و آنالیز داده‌ها نشان داد که فراکسیون شماره ۲ با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل اثر آپوپتوتیک معنی‌داری ایجاد نمود (شکل ۷). اثر آپوپتوتیک در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراکسیون شماره ۵، نسبت به کنترل و هم نسبت به یکدیگر معنی‌دار بود (شکل ۸).

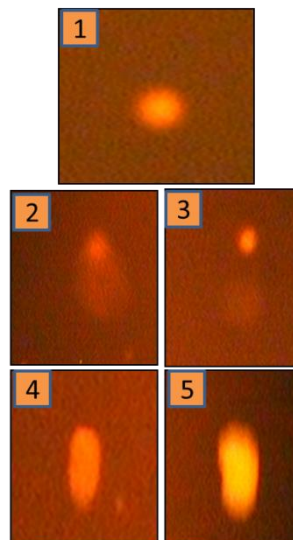
فراکسیون شماره ۵ در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل که حاوی سلول و محیط کشت بوده، اثر مهارتی معنی‌داری داشته اما این دو غلظت نسبت به هم اثر مهارتی معنی‌دار و قابل‌توجه ایجاد ننمودند. فراکسیون‌های شماره ۷ و ۹ در غلظت‌های فوق در مقایسه با کنترل و در مقایسه با یکدیگر اثر مهارتی معنی‌دار نشان ندادند. قابل ذکر است بررسی‌های آماری نشان داد که نتایج بدست آمده از آزمایش Neutral red uptake با نتایج سنجش MTT مطابقت داشته و آن را تایید نمود.

نتایج سنجش کامت قلیایی (Alkaline Comet assay) برای بررسی اثر سمیت فراکسیون‌های جدا شده از آن بر سلول HepG2: در این مطالعه از سنجش کامت بمنظور بررسی آسیب‌های DNA توسط فراکسیون‌های دارای خواص ضد باکتری (فراکسیون‌های شماره ۲، ۵، ۷ و ۹) در سلول HepG2 استفاده گردید. فراکسیون‌های شماره ۵، ۷ و ۹ در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و فراکسیون شماره ۲ به دلیل اینکه مقدار آن کم بود فقط در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که:

گردد. هر چند روش‌های رایج در درمان این بیماری مانند پرتودرمانی و شیمی‌درمانی از طریق القاء آپوپتوز و یا مهار تکثیر سلول‌های سرطانی از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌نمایند، لیکن مقاومت برخی از انواع سرطان‌ها به اینگونه درمان‌ها و همچنین عوارض جانبی آنها (مانند آسیب‌رسانی به بافت و سلول‌های سالم) سبب ترغیب محققین به مطالعه روش‌های جایگزین شده است (۴). گزارشات نشان می‌دهد که برخی از پروتئین‌های موجود در سموم جانوران سمی، از جمله مار دارای اثرات ضد باکتریایی بوده و از رشد سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌نمایند (۱۲). در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی و ضد سرطانی فراکشن‌های زهر خام افعی زنجانی بررسی گردید.

برای انجام این بررسی ابتدا الگوی الکتروفورزی زهر خام افعی تهیه و سپس فراکسیون‌های زهر خام افعی زنجانی با استفاده از RP-HPLC و پس از تزریق به ستون C-18، جداسازی، جمع‌آوری و لیوفیلیز شدند. میزان پروتئین موجود در هر فراکسیون با استفاده از روش برادفورد تخمین و اثرات ضد باکتری آن‌ها در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از روش‌های MIC و MTT، علیه باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه گردید. سپس سمیت سلولی مؤثرترین فراکسیون‌های دارای اثرات ضد باکتریایی، با استفاده از روش‌های سنچس MTT، Neutral red uptake و کامت بر روی سلول سرطانی HepG2 بررسی گردید.

در مطالعه الکتروفورزی زهر خام افعی ۹ بانده پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۵۷-۱۳ کیلو دالتون مشاهده شد. در مطالعه انجام شده توسط طاهریان و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۲) وجود ۱۰ باند پروتئینی در ژل الکتروفورزی (۱۲ درصد) گزارش شده است.

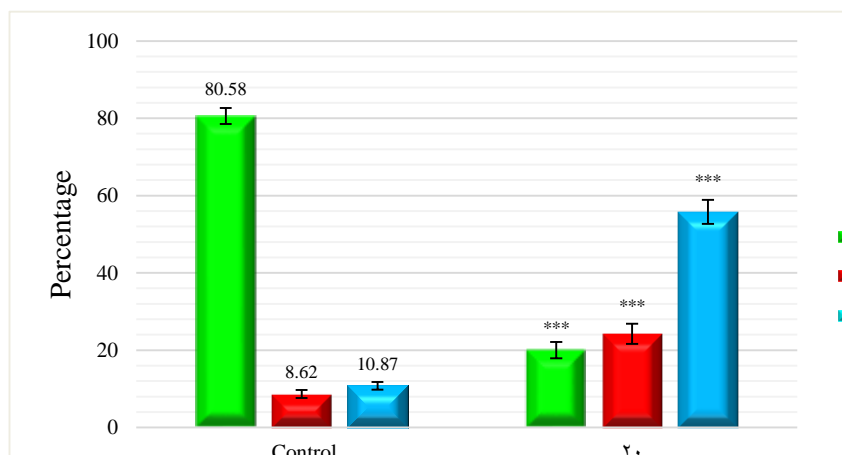


شکل ۷- مطالعه تغییرات مورفولوژیکی هسته سلولی القاء شده توسط فراکشن‌های ۲، ۵ جداسازی شده از زهر خام افعی زنجانی در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر به وسیله آزمایش کامت قلیایی. ۱: DNA سلول سالم 20X ۳-۲: DNA سلول آپوپتوزی شده 20X (شکل ۲: سلول آپوپتوزی در اثر فراکشن شماره ۲) (شکل ۳: سلول آپوپتوزی در اثر فراکشن شماره ۵). ۴-۵: DNA سلول نکروزی 20X (شکل ۴: سلول نکروزی در اثر فراکشن شماره ۲) (شکل ۵: سلول نکروزی در اثر فراکشن شماره ۵)

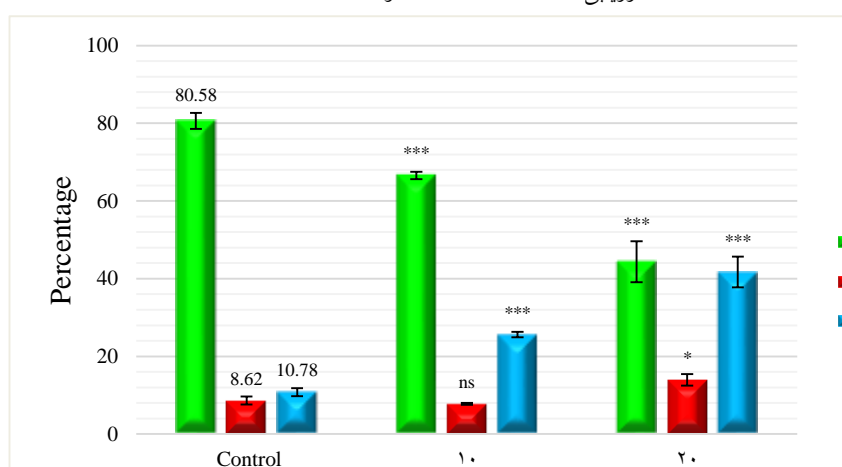
درصد آپوپتوز القا شده فراکسیون شماره ۷ با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت اما در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار داشته و همچنین تفاوت غلظت‌های این فراکسیون نسبت به هم معنی‌دار بوده است (شکل ۹). آنالیز داده‌ها نشان داد درصد آپوپتوز فراکسیون شماره ۹ در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هم در مقایسه با کنترل معنی‌دار و همچنین نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌دار و قابل توجه دارد (شکل ۱۰).

## بحث

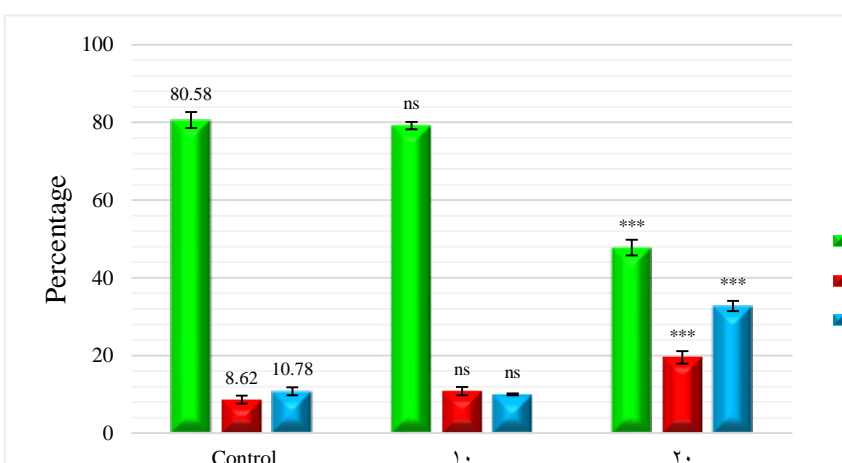
بدلیل مقاوم شدن برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمان عفونت‌های ناشی از آنها به یک مشکل مهم بهداشتی تبدیل شده است (۱۳). از طرفی سرطان یکی از بیماری‌های بسیار مهم جامعه بشری است که سالیانه سبب مرگ و میر تعداد زیادی از مبتلایان می-



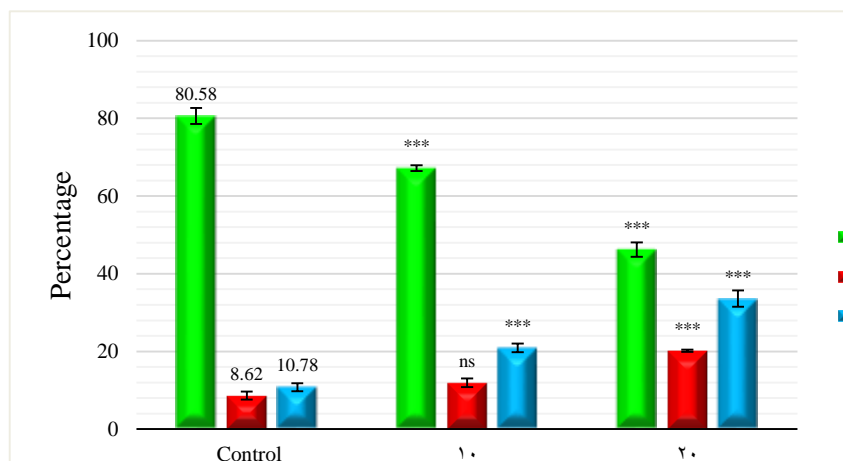
شکل ۸- میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده توسط فراکسیون شماره ۲ در سلول سرطان کبد با استفاده از سنجش کامت. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند (ns:  $P > 0/05$ ) و (\*\*\*:  $P < 0/001$ ).



شکل ۹- میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده توسط فراکسیون شماره ۵ در سلول سرطان کبد با استفاده از سنجش کامت. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند (ns:  $P > 0/05$ )، (\*:  $P < 0/05$ ) و (\*\*\*:  $P < 0/001$ ).



شکل ۱۰- میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده توسط فراکسیون شماره ۷ در سلول سرطان کبد با استفاده از سنجش کامت. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند (ns:  $P > 0/05$ ) و (\*\*\*:  $P < 0/001$ ).



شکل ۱۱- میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده توسط فراکسیون شماره ۹ در سلول سرطان کبد با استفاده از سنجش کامت. غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل ارزیابی شدند ( $P > 0.05$ ) و ( $P < 0.001$ : \*\*\*).

نشان داده است زهر افعی *Vipera latifii* روی باکتری گرم منفی اثر قابل توجهی نداشته است مطابقت دارد.

بررسی اثرات ضد باکتریایی فراکشن‌های دارای پروتئین نشان داد که فراکسیون‌های ۲، ۵، ۷ و ۹ بیش‌ترین اثرات ضد مهاری را بر رشد باکتری‌های مورد آزمایش از خود نشان دادند. لذا اثرات سمیت سلولی آن‌ها بر سلول سرطانی کبد (HepG2) به دلیل داشتن اثرات سایتوتوکسیک زهر مارها (۱۲) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه با استفاده از روش‌های سنجش MTT، Neutral red uptake و کامت انجام گردید.

نتایج نشان داد که فراکسیون شماره ۲ و ۵ در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بترتیب با ۷۹/۹۸ و ۵۵/۶۵ درصد مرگ و میر، بیش‌ترین سمیت را در مقایسه با سایر فراکسیون‌ها از خود نشان داده و مرگ سلولی القا شده توسط آنها بیشتر از نوع آپوپتوز بوده است. این در حالی است که فراکسیون شماره ۷ کمترین سمیت را داشته است.

در یک جمع‌بندی، نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان می‌دهد که پروتئین/پروتئین‌های موجود در برخی از فراکشن‌های زهر افعی زنجانی می‌توانند از رشد باکتری‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی جلوگیری نموده و بر رشد سلول‌های سرطانی اثر بازدارنده داشته باشند. این ویژگی‌ها

دلیل تفاوت در تعداد باندهای گزارش شده ممکن است ناشی از درصد ژل مورد استفاده و یا نوع تغذیه، روش سم گیری، فصل سم گیری و عوامل دیگر باشد که در ترکیب زهر جانوران سمی تاثیر غیر قابل انکار دارد. (۲۶).

جداسازی زهر خام منجر به جداسازی ۱۰ فراکسیون شد. نتایج بررسی‌های بیولوژیکی نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۲ و ۹ بر روی باکتری *اشریشیا کولی*، فراکسیون شماره ۲ بر روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و فراکسیون‌های شماره ۵، ۷ و ۹ بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین اثر مهاری را در مقایسه با کنترل منفی ایجاد کردند. همچنین مشخص شد که فراکسیون‌های دارای پروتئین جدا شده از زهر مار بر باکتری‌های گرم مثبت اثر مهاری بیشتری را در مقایسه با باکتری گرم منفی القاء نموده و در *استافیلوکوکوس اورئوس* این مهار از شدت بیشتری نسبت به *باسیلوس سوبتیلیس* برخوردار بوده است. بنظر می‌رسد که مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی در مقابل سمیت ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار غشای خارجی آن‌ها نسبت به باکتری‌های گرم مثبت باشد (۱۸). این نتایج با مطالعات گذشته صورت گرفته توسط پرومال و همکاران و لیما و همکاران در سال ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ (۱۵،۱۰) و نیز همچنین گزارش مریدی کیا و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۱۳) که

بدین وسیله از همکاری مسئولان محترم مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی و دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (علیه السلام) که شرایط انجام این تحقیق را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

فراکشن‌های فوق را بعنوان یک کاندید مناسب احتمالی جهت جداسازی عوامل ضد باکتریایی و ضد سرطانی معرفی می‌نماید.

تقدیر و تشکر

## منابع

1. Abdul W, Yamin B, Sobia N, Fayyaz M, Sumaira S, Muhammad Zia. 2013. Inhibition of human breast and colorectal cancer cells by *Viburnumfoetens L. extracts* in vitro. *Asian Pac J Trop Dis*; 3(1): 32-36.
2. Badr G, Al-Sadoon M, M El-Toni A, Daghestani M. 2012 "Walterinnesia aegyptia venom combined with silica nanoparticles enhances the functioning of normal lymphocytes through PI3K/AKT, NF\_B and ERK signaling", *Lipids in Health and Disease* , Vol 11, NO. 27.
3. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72(1): 248-54.
4. M Barati F Davoudi Dahaghani. Winter 2018. Evaluation of toxicity and anticancer activity of isolated fraction from the venom of Iranian cobra snake on acute lymphoblastic leukemia cells (Jurkat E6.1). *Journal of cell and tissue* Volume 8, Issue 3. Pages 250-260.
5. Chellapandi P, Jebakumar SRD. 2008. Purification and Antibacterial Activity of Indian Cobra and Viper Venoms. *Electronic Journal of Biology*; 4(1): 11-16.
6. Herrera M, Fernández J, Vargas M, Villalta M, Segura Á, León G, et al. 2012. Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: Role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *journal of proteomics* 75: 2128 – 2140.
7. Hosseinpour M, Jamil Zargan, Hossein Honari, Ashkan Haji Nour Mohammadi. 2019. Introduction of Dianthins: A New Promising Horizon Toward Continuous Research on Breast Cancer Bulldozing in Iran. *International journal of medical toxicology and forensic medicine*. Volume 9, Number 3.
8. Kamran MR, Zargan J, Keshavarz alikhani H, Hajinoormohamadi A. 2019. The Comparative Cytotoxic Effects of *Apis mellifera* Crude Venom on MCF-7 Breast Cancer Cell Line in 2D and 3D Cell Cultures. *International Journal of Peptide Research and herapeutics* .
9. Latifi M. 2001. Iranian Snakes. Environmental Protection Agency Publications; 444-445.
10. Lima D.C and et all, 2005, "Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM", *eCAM*, Vol. 2, NO. 1, pp 39-47.
11. Lu QM, Wei Q, Jin Y, Wei JF, Wang WY, Xiong YL. 2002. L-Amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. *J Natural Toxins*; 11: 345-52.
12. Mirzaee nadoshan M. 2014. Study of anticancer effects and antibacterial of venom of *Pseudocerastes persicus* snake. For MsC degree. Imam Hossein comprehensive university.
13. Moridikia A, Zargan, Sobati H, Goodarzi H-R, Hajinoormohammadi A. 10 January 2018. Anticancer and antibacterial Effects of Iranian Viper (*Vipera latifii*) Venom; an in-vitro study. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.26428>.
14. Mousavi M, Zargan J, Hajinoormohammadi A et al. May-Jun, 2019. Investigating antibacterial effects of *Latrodectus Dalhi* crude venom on *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Medical Laboratory Journal*; Vol 13: No 3.
15. Phua CS, Vejjayan J, Ambu S, Ponnudurai G, Gorajana A. 2012. Purification and antibacterial activities of an L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*(jvattdd); 18(2): 198-207.
16. Rostami M, Amoozgari Z, Noorbehbahani M. 2011 . Studying alkaline phosphatase activity in isolation fractions from Iranian snake *Vipera*

- lebetina* venom. Jentashapir Health Research, Volume:1 Issue:2 Page:20.
17. Samel M, Vija H, Kurvet I, Künnis-Beres K, Trummal K, Subbi J, et al. 2013. Interactions of PLA2-s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* Venom with Platelets, Bacterial and Cancer Cells. *Toxins*; 5: 203-223.
  18. Samy RP, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, et al. 2007. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *Journal of Applied Microbiology*; 102: 650-659.
  19. San TM, Vejayan J, Shanmugan K, Ibrahim H. 2010. Screening Antimicrobial Activity of Venoms from Snakes Commonly Found in Malaysia. *Journal of Applied Sciences*; 10: 2328-2332.
  20. Shebl RI, Mohamed AF, Ali AE, Amin MA. 2012. Antimicrobial Profile of Selected Snake Venoms and Their Associated Enzymatic Activities. *British Microbiology Research Journal*; 2(4): 251-263.
  21. Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*; 29: 1129-41.
  22. Stocker JF, Traynor JR. 1986. The action of various venoms on *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol*; 61:383-8.
  23. Taherian M, Yaghoobib H and Bandehpourc M. 2016. Evaluation of the Coagulant Effect of the *Zanjani* and *Latifi Viper* Venom Endemic in Iran. *friends in Peptide and Protein Sciences* Vol. 1, No. 1, 27-30
  24. Vyas V.K, Brahmabhatt K, Bhatt H, Parmar U. 2013. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives, *Asian Pac J Trop Biomed*. Vol 3, NO. 2, 156-162.
  25. Yalcin HT, Ozen MO, Gocmen B, Nalbantsoy A. 2013. Effect of Ottoman Viper (*Montivipera xanthine* (Gray, 1849)) Venom on Various Cancer Cells and on Microorganisms. *Cytotechnology*.v.66(1); 2014 Jan.
  26. J zargan. 2011. Antiproliferation and apoptotic effects of scorpion venomes and their characterization. tehsis submitted for PhD degree. Hamdard university, India.
  27. Zargan J, et al. 2011 Dec; Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicol In Vitro*. 25(8):1748-56.
  28. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Shakir A, Haider AK. 2011. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and Molecular Pathology* 91 (2011) 447-454

## ***In-vitro* study of antibacterial and cytotoxic effects of *Vipera Albicornuta* venom fractions**

Zargan J.<sup>1\*</sup>, Gholami F.<sup>1</sup>, Goodarzi H.R.<sup>2</sup>, Sobati H.<sup>3</sup>, HajiNourMohammadi A.<sup>1</sup> and Salehi M.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Science Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran , I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Venomous Animals And Anti Venom Production, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Health Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University Of Medical Sciences, Tehran, Ir I.R. of Iran.

### **Abstract**

This study was performed to determine antibacterial and cytotoxic effects of fractionated venom of *Vipera albicornuta* snake under *in-vitro* condition. Different fractions of *Vipera Albicornuta* venom were isolated using RP-HPLC and C18 column, followed by lyophilizing operation. Protein content of each fraction was estimated by Bradford method. Bactericidal-activity of each fractions in 20 µg/mL concentration toward *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains was performed using MTT reduction and MIC and tetracycline (50 µg/ml) was used as standard antibiotic. Moreover, the cytotoxicity effect of fractions with most antibacterial effects on HepG2 cells was investigated using MTT reduction test and confirmed with neutral red uptake assay following exposure of cells with different protein concentrations of each fractions (10-20 µg/mL) and apoptosis effect was evaluated by Comet assay. Our findings demonstrated that venom fractions of snake display different antibacterial effects against various tested bacteria. Based on the results, fractions No. 2 on *B.subtilis*, fractions 2 and 9 on *E.coli* and fractions 5, 7 and 9 on *S.aureus* shown the most effects. In addition, the results of this study confirmed that fractions Nos. 2 and 5 of venom produced the highest cytotoxicity on HepG2 cell line after 24 h treatment through induction of apoptosis and necrosis. In addition, this study confirmed that fractions No.2 and 5 produced the highest cytotoxicity on HepG2 cell line after 24 h of apoptosis and necrosis. The results of study showed that isolated fractions of *V.albicornuta* venom have antibacterial and anti-cancer effects.

**Keywords:** Antibacterial, Cytotoxicity, HepG2 Cell Line, *Vipera Albicornuta*, Snake venom