

Vero Cell Culture as a Model for Evaluating the Effects of *Macrovipera lebetina* Venom

Mehranoush Saffarpour¹, Nooshin Sohrabi²,
Delavar Shahbazzadeh³, Aliraza Gholami^{4*}

1. Ph.D. Student, Department of Biology, Faculty of science, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of science, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Biotechnology Research Center, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: Apr. 28, 2020 - Accepted: Dec. 25, 2021)

Abstract

Among Iranian venomous snakes, the most important groups causing envenomation are *Naja Naja Oxiana*, *Echis*, *Vipera albicornuta*, *Vipera latifi Mertens*, *pseudocerastes peersicus* and *Vipera lebetina*. Many researchers believe natural snake venom toxins are containing several pharmacologically active components that could be of potential therapeutic value. In the past, studies have shown that some neurotoxic fractions of snake venom interfere with some infectious and non-infectious diseases such as cancer. We purified snake venom of *V. lebetina* by fast protein liquid chromatography (FPLC) using Sephadex S-200 hr column. The fractions collected and evaluated by SDS-PAGE analysis. The cytotoxicity effect of crude venom and fractions on Vero cells were demonstrated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and adhesion assay. The aim of this study is to investigate the effects of *Macrovipera lebetina* (one of the native snakes of many parts of Iran), in order to create an appropriate animal cell culture model to evaluate the effects of protein complexes on diseases such as viral infections.

Keywords: FPLC, *Macrovipera lebetina* venom, Vero cells.

مقاله پژوهشی: کشت سلول جانوری Vero به عنوان مدلی برای بررسی اثرات زهر مار افعی گرزه

مهرانوش صفارپور^۱, نوشین سهرابی^۲, دلاور شهباززاده^۳, علیرضا غلامی^{۴*}

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بخش بیومولکول های درمانی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. استادیار، بخش ویروس‌شناسی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۴)

چکیده

مارهای زهری ایران اغلب کبرا، جعفری، افعی زنجانی، افعی دماوندی، مار شاخدار و گرزه مار می‌باشند. امروزه زهر مار مورد توجه پژوهشگران بسیاری قرار گرفته است، به طوری که با مراعات اصول فنی به تهیه بعضی فراورده‌های داروئی اقدام کرده‌اند. در گذشته مطالعاتی مبنی بر مداخله ترکیبات برخی فراکسیون‌های نوروتوکسیک زهر مار با برخی بیماری‌های عفونی و غیر عفونی نظیر سلطان انجام شده است. به منظور انجام این *Macrovipera lebetina* پژوهش سم خالص افعی گرزه مار ایرانی *Macrovipera lebetina* را با روش کروماتوگرافی مایع سریع با عملکرد (FPLC) با استفاده از ستون سفافکریل S200 جadasازی نموده و پس از لیوپلیزه با استفاده از روش ژل الکتروفورز بررسی شد. به منظور بررسی اثرات سمیت فراکسیون‌ها بر مدل کشت سلولی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide از روش (diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات فراکسیون‌های زهر افعی گرزه (یکی از مارهای بومی بسیاری از نقاط ایران)، بر سلول‌های کشت یافته Vero به منظور ایجاد مدل کشت سلول جانوری مناسب جهت ارزیابی تأثیرات اجزای پروتئینی فراکسیون‌ها بر بیماری‌ها از جمله عفونت‌های ویروسی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زهر افعی گرزه سلول Vero, کروماتوگرافی مایع سریع، مار ایرانی.

مقدمه

و برخی دیگر موجب تخریب تارهای ماهیچه‌ای می‌شوند. در دید کلی، زهر مار باعث افزایش مرگ سلولی ناشی از برهم‌خوردن هوموستاز سلول‌های زنده می‌شود (Tasoulis & Isbister, 2017). مطالعات دهه گذشته نشان داده است که اجزای زهر مار کبرا می‌تواند در درمان بیماری‌های مربوط به سیستم عصبی و ماهیچه‌ای یا بیماری صرع مؤثر باشند. شباهت بین توالی اسیدهای آمینه گلیکوبروتئین ویروس هاری که عامل اصلی عفونت‌زایی ویروس است و نوروتوکسین nAChR زهرمار کبرا که لیگاند قوی برای اتصال به دارد، نیز نشان داده شده است (Farzad *et al.*, 2020). زهر مار می‌تواند به عنوان نوروتوکسیک یا هموتوکسیک طبقه‌بندی شود، اگرچه برخی از گونه‌های مار وجود دارند که هر دو نوع توکسین را در زهر خود دارند (Tasoulis & Isbister, 2017). اثر زهر موجود در انواع مارها روی نسوج زنده متفاوت است، ممکن است یک یا چند خاصیت زهری در زهر یک نوع مار وجود داشته باشد (Clemetson *et al.*, 2005). همچنین از مجموعه‌ای شامل، پروتئین‌های زهری مانند نوروتوکسین، مواد کاربیوتوكسین و سیتوتوکسین‌ها، میوتوكسین‌ها، مواد منعقدکننده و ضدائعادی و آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، اکسیدازها، فسفولیپازها و غیره تشکیل شده است که در بین تمام زهرهای طبیعی، بیشترین پیچیدگی را دارد. هرچند توکسین‌های اصلی زهر مار که بر روی سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارند، نوروتوکسین‌ها و دندروتوکسین‌ها هستند (Armugam *et al.*, 2006)، ترکیبات غیرآلی مانند کاتیون‌های معدنی از قبیل روی، کلسیم، پتاسیم، سدیم، منیزیوم نیز در آن وجود دارد (Tasoulis & Isbister, 2017).

از میان گیرنده‌های سلولی، گیرنده‌های نیکوتینیک استیل کولین توسط برخی از سوموم خزندگان به نام نوروتوکسین‌ها نیز شناسایی می‌شوند. گیرنده‌های استیل کولین پروتئین‌های پتامر غشایی می‌باشند که متعلق به خانواده بزرگ کانال‌های یونی وابسته به لیگاند هستند. این گیرنده‌ها سایت‌های اتصال متعددی برای ترکیبات

در دنیا حدود ۳۵۰۰ گونه مار وجود دارد که به نظر می‌رسد حدود ۱۰ درصد از آنها برای انسان خطرناک باشند (Kasturiratne Wickremasinghe *et al.*, 2008). این موضوع بیانگر ۱۲۵۰۰۰ مرگ به دنبال ۵۴۰۰۰۰ گزش مار است. به طور متوسط استرالیا تنها یک نیش مار کشنه در هر سال دارد، در حالی که در هند، در هرسال ۲۵۰ هزار مارگزیدگی ثبت می‌شود که از این تعداد ۵۰ هزار مورد منجر به مرگ می‌شود. مارهای زهری به دو گروه بزرگ خانواده مارهای مرجانی (شامل مار مرجانی، کبرا، ماها و غیره) و خانواده افعی‌ها (از جمله افعی، مار زنگی وغیره) تقسیم می‌شوند (Rita, Animesh *et al.*, 2011). مارهای زهری ایران، معمولاً از انواع کبرا، جعفری، افعی زنجانی، افعی دماوندی، مار شاخدار و گرزه مار می‌باشند. از بین مارهای سمنی، مارهای خانواده‌های افعی گودال (crotalidae)، کفچه مار (elapidae) و گرزه مار (viperidae) مهمترین گروه‌هایی هستند که موجب ورود سم به بدن جاندار دیگر می‌شوند (Dehghani, Mehrpour *et al.*, 2014).

زهر مارها، مخلوطی از مواد بیولوژیک مشکل از پلی‌پیتیدهای آنزیمی و غیر آنزیمی است که عملشان در انسان موجب بروز مسمومیت‌های ناشی از مارگزیدگی می‌شود. زهر مار در حقیقت نوع تغییریافته بزاق دهان مار است که از غدد بزاقی ترشح و از طریق دندان‌های توخالی جلوی دهان مار به بدن جاندار تزریق می‌شوند. زهر مار خاصیت اسیدی دارد و حدود ۲۶ نوع آنزیم از قبیل فسفولیپاز A2 و متالوپروتئیناز در آن وجود دارد. هر یک از این اجزا نه تنها باعث ویژگی منحصر به فرد آن می‌باشد، بلکه در عین حال ویژگی عملی خاصی را به زهر مار می‌دهند. در حدود ۹۰-۹۲ درصد از وزن خشک زهر را مواد پروتئینی تشکیل می‌دهند. زهرها خواص بیولوژیک گوناگونی دارند. برخی از زهرها روی دستگاه عصبی تأثیر می‌گذارند، برخی از آنها سبب تغییر تراوایی غشاء یاخته می‌شود

مهرکننده پروتئیناز PIVL Kunitz-type که به نام نام‌گذاری شده است و از سم افعی گرزوه تونسی خالص Morjen شده است اثرات ضد توموری را نشان می‌دهد (Morjen et al., 2012). همچنین فسفولیپاز A₂ سم مار، مهاجرت و اتصال سلول‌های IGR39 و سلول‌های فیروسارکومای HT1080 را با غیرفعال کردن اینتگرین‌های α5β1 و αv-containing (Bazaa et al., 2009) اینتگرین‌های گرزوه می‌کند. بر این اساس به نظر می‌رسد که در کنار مطالعات انجام‌شده بر روی مارهای دیگر نقاط جهان، انجام مطالعات بیشتر و دقیق‌تر بر روی خواص درمانی زهر مارهای بومی ایران نتایج علمی خوبی را به همراه داشته باشد. با توجه به مطالب ذکر شده، مطالعه حاضر ارزیابی اثرات فراکسیون‌های حاصل از جداسازی تفکیک اجزای پروتئینی زهر مار افعی گرزوه ایرانی (*Macrovipera lebetina*) به وسیله تکنیک کروماتوگرافی با استفاده از FPLC در مدل کشت سلولی را مد نظر قرار داده است تا با ایجاد یک مدل مناسب زیستی راه را برای بررسی برخی بیماری‌ها از جمله عفونت‌های ویروسی هموار نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه زهر افعی

زهر افعی گرزوه در بخش تحقیقات و نووم انسٹیتو پاستور ایران قبل از مارهای بومی ایران تهیه، غلظت پروتئینی آن تعیین شده، به شکل لیوفیلیزه در اختیار این مطالعه قرار داده شد.

تفکیک فراکسیون‌های پروتئینی زهر افعی

زهر لیوفیلیزه شده به میزان ۳۰ میلی‌گرم در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطّر تزریقی حل شد و اجزای پروتئینی آن به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با دستگاه FPLC Akta purifier10CG (FPLC) (آمریکا) تفکیک شد. برای انجام کروماتوگرافی از بافر استات آمونیوم (شرکت سیگما) با غلظت ۲۰ میلی مولار در آب دوبار تقطیر و pH معادل ۷/۵ و رزین سفاکریل

مختلف از جمله پیتیدها دارند. نوروتوکسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پروتئینی با ساختارهای ساده می‌باشند. در میان نوروتوکسین‌های موجود در زهر (venom) مارها، α-نوروتوکسین‌ها بیش از بقیه مورد مطالعه قرار گرفته اند که به گیرنده‌های سلولی نیکوتینیکی استیل کولین متصل می‌شوند. α-نوروتوکسین‌ها با اتصال کامل به گیرنده‌های موجود در غشاها پس‌سیناپسی و اعصاب مانع از انتقال پیام عصبی می‌شوند و به این ترتیب منجر به مرگ به وسیله خفگی در اثر ورود زهر مار به بدن قربانی می‌شود (Tsetlin & Hucho, 2004; Farzad et al., 2004). اختصاصیت بالای نوروتوکسین‌ها برای این گیرنده‌ها به عنوان ابزاری در درک ساختار و عملکرد Tipton & Dajas, (1994). هرچند مارها خطرناک‌ترین و زهری‌ترین حیوانات در سراسر جهان Adukauskienė et al., (2011). با این وجود، در طول دهه اخیر، تحقیقات زیست‌پژوهشی متشرشده که در آن‌ها اجزای زهر به دلیل توانایی‌های بالقوه به عنوان عوامل درمانی جدید مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Armugam et al., 2006). زهر مار یک منبع زیستی طبیعی است که دارای چندین جزء بالرژش درمانی بالقوه است. زهر در درمان طیفی از شرایط پاتوفیزیولوژیکی در هومئوپاتی و طب سنتی استفاده می‌شود. امروزه زهر مار مورد توجه پژوهش‌گران بسیاری قرار گرفته است، به طوری که با مراعات اصول فنی به تهیه بعضی فرآورده‌های داروئی اقدام کرده‌اند که برای ورود سم بی‌عوارضی از نوع خونریزی‌های شدید و برطرف کردن دردهای عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yang et al., 2009). با پیشرفت زیست‌فناوری و با تخلیص و تعیین خصوصیات درمانی اجزای زهر مار، کارایی این قبیل درمان‌ها بهبود داده شده است. تأثیر زهر مار در شرایط دیستروفی عصبی با علل اختصاصی و غیراختصاصی بیش از همه مورد مطالعه قرار گرفته است (Gomes et al., 2002; Armugam et al., 2006).

مدت زمان یک ساعت با جریان ۳۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شد. جهت رنگ‌آمیزی ابتدا ژل در محلول تثبیت حاوی ۵۰ درصد اتانول، ۱۰ درصد اسید استیک و آب قرار گرفته، پس از گذشت یک ساعت، ژل از محلول تثبیت خارج و با آب فوق خالص شستشو داده شد. سپس ژل داخل محلول رنگ طبق پروتکل مربوطه با کوماسی بلو (R250 BioRad Coomassie BioSafe) کوماسی بلو، شامل ۲ درصد اسید فسفویریک، ۱۰ درصد آمونیوم سولفات، ۱/۰ درصد کوماسی بلو G-۲۵۰ و ۲۰ درصد متانول) در طول یک شب قرار داده شد. سپس، رنگ‌زدایی با محلول ۱۰ درصد اسید استیک در آب طی چند مرحله با تعویض محلول و تا ظهور نوارهای پروتئین انجام شد.

کشت سلول‌های Vero

سلول‌های Vero با منشأ کلیه میمون (اهدایی از واحد تولید واکسن هاری انسانی انتیتو پاستور ایران)، نوعی سلول وابسته به اتصال می‌باشد که برای تکثیر نیازمند به چسبیدن به سطوح کشت مانند فلاسک‌های کشت سلول از جنس پلی استایرن است. برای کشت این سلول‌ها از محیط Dulbecco Modified (DMEM) (Eagle's Medium) شرکت Gibco، حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله (FBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO₂ استفاده شد. برای تکثیر سلول‌ها با استفاده از تریپسین اقدام به جدامودن آن از سطح فلاسک و شمارش و تعیین درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش تریپان بلو انجام شد.

مطالعه سمیت فراکسیون‌های زهر بر روی کشت

سلول جانوری به روش MTT

برای تهیه محلول ذخیره MTT Dimethylthiazol-2-Yl-2,5-(Diphenyltetrazoliu Bromide) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم از پودر MTT (شرکت سیگما) در ۱ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات PBS (pH: ۸/۳) حل

S-200 استفاده شد. برای بررسی و آنالیز کروماتوگرام از نرمافزار Unicorn استفاده شد.

لیوفیلیزه کردن فراکسیون‌ها

پس از جداسازی فراکسیون‌های به دست آمده از کروماتوگرافی، با دستگاه Alpha 1-2 (Freeze dryer) شرکت Christ LD plus سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۴ اتمسفر به مدت ۲۴ ساعت فراکسیون‌ها لیوفیلیزه شد. نمونه‌های لیوفیلیزه شده تا زمان استفاده در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین غلظت فراکسیون‌ها

در زمان استفاده، هر یک از اجزای لیوفیلیزه شده زهر با مقادیر مشخص آب مقطور تزریقی مجدد حل شده، با روش بیسینکونیک‌اسید (شرکت Tran با شماره کاتالوگ DQ111) و براساس دستورالعمل کیت برای میکروپلیت تعیین غلظت انجام شد. به طور خلاصه، در این روش از رقت‌های آلومین سرم گاو به عنوان منحنی استاندارد استفاده شده، سپس به ازای هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محلول A، ۴ میکرولیتر از محلول B به شکل دو بار تکرار آماده کرده و هر فراکسیون را با غلظت ۱ به ۴ رقیق کرده و به هر چاهک ۵ میکرولیتر اضافه کرده پس از ۳۰ دقیقه گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب نوری را در طول موج ۵۶۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (Bio tech کشور آمریکا) خوانده و با مقایسه با منحنی استاندارد غلظت فراکسیون‌ها تعیین شد.

الکتروفورز فراکسیون‌های پروتئینی زهر

جهت بررسی کیفیت زهر جمع‌آوری شده، الکتروفورز SDS-PAGE فراکسیون‌های پروتئینی زهر به روش Laemmli، ۱۹۷۰ انجام شد (Laemmli, 1970). در این روش، مقدار ۵ میلی‌گرم از زهر در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطور تزریقی حل و بعد از آماده‌سازی در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۵ درصد در

ماورای بنسن (۲۸۰ نانومتر)، ۵ ناحیه بر روی این نمودار قابل تشخیص است که در شکل شماره‌گذاری شده است. محلول خروجی از ستون مطابق در این ناحیه‌ها در ظروف جداگانه جمع آوری شد.

تعیین غلظت به روش ژل الکتروفوروز

بررسی فراکسیون‌های پروتئینی زهر جداسازی شده با کروماتوگرافی با الکتروفوروز به روش SDS-PAGE انجام و نتایج پس از رنگ‌آمیزی به روش کلوئیدال کوماسی در ژل ظاهر شد (شکل ۲). تفاوت الگوی پروتئینی در فراکسیون‌های مختلف در مقایسه با زهر خام اولیه به خوبی در ژل دیده می‌شود. با توجه به ماهیت رزین مورد استفاده، وزن‌های مولکولی بالاتر در فراکسیون‌های ابتدا و پروتئین‌های سبک‌تر در فراکسیون‌های بعدی از ستون خارج شده‌اند. با توجه به وجود پروتئین‌های سبک‌تر در منحنی‌های ۴ و ۵، فراکسیون ۵ که حاوی سبک‌ترین پروتئین‌ها بود برای ادامه کار بر روی کشت سلول در نظر گرفته شد.

بررسی تأثیر زهر افعی بر مرفولوژی سلول‌ها تأثیر غلظت‌های متفاوت پنج فراکسیون زهر افعی گرزو مار بر سلول، در زمان ۲۴ ساعت پس از مجاورت، به روش مشاهده میکروسکوپی مورفولوژی ارزیابی شد. تغییر مورفولوژیکی ویروس در غلظت‌های بالاتر زهر به صورت افزایش جذب سلولی تریپان بلو $0.04\text{--}0.05$ و همچنین گردشدن و جداشدن سلول از کف ظرف کشت بود. نتایج نشان داد که افزایش غلظت زهر تأثیر بسیار مهم تری بر سلول (نسبت به افزایش زمان مجاورت) دارد (شکل ۳). مجاورت سلول با رقت‌های مختلف زهر نشان‌دهنده تظاهرات متفاوتی از زندمانی در مقابل زهر و فراکسیون‌های آن است (نمودار ۱ و جدول ۱)، به‌گونه‌ای که F1 در محدوده رقت‌های مورداستفاده کمترین سمیت را از خود نشان داده است. در سایر فراکسیون‌ها میزان زندمانی سلول‌ها متناسب با رقت‌های زهر و فراکسیون‌های آن تغییر نشان داده است.

و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. به تعداد 5×10^3 از سلول کشت شده را به‌ازای هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده، با غلظت‌های متفاوت زهر در مدت ۲۴ ساعت در کنار سلول سالم به عنوان شاهد مجاورت داده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره MTT به سلول‌ها اضافه شده، به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO_2 گرمخانه گذاری شد. برای انحلال بلور فورمازان تشکیل شده در سلول، از ۲۰۰ میکرولیتر (DMSO) (از شرکت Biotech به شماره کاتالوگ DC-DMSO100) به‌ازای هر چاهک استفاده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان جذب توسط دستگاه Bio-plate reader (Microplate reader) (tech، کشور آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با مقایسه میزان جذب نمونه‌های مجاورشده با زهر و نمونه‌های شاهد، نتایج به دست آمده محاسبه شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری

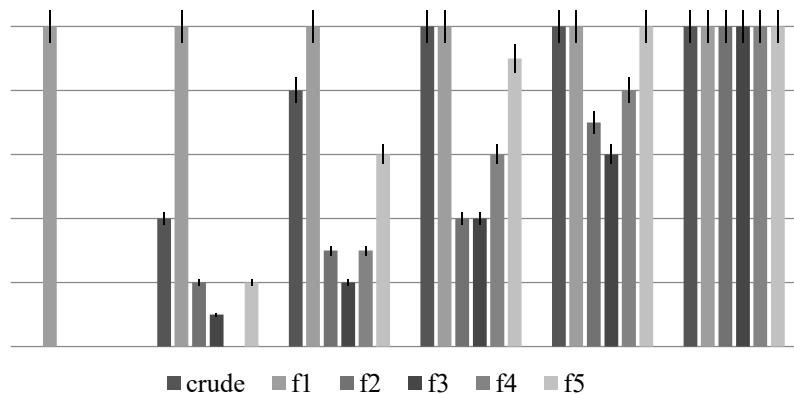
در تمام موارد، داده‌ها به صورت درصدی از مقادیر مشاهده شده در سلول‌های کنترل تیمار نشده بیان می‌شوند و هر مقدار متوسطی از انحراف معیار دو یا سه تکرار ($n=3 \pm \text{S.D.}$) را نشان می‌دهد. اختلاف‌های مهم و معنی‌دار بین گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار شده با استفاده از آزمون Student's t-test unpaired با محاسبه شده، مقادیر P (P-values) کمتر از ۰.۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

FPLC فراکسیون‌های سم حاصل از روش تفکیک اجزای پروتئینی زهر مار گرزو با انجام کروماتوگرافی و رسم نمودار مربوطه با نرم‌افزار Unicorn منحنی خروج پروتئین‌ها از ستون را ارائه نمود (شکل ۱). در نمودار ذکر شده، همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، بر اساس منحنی حاصل از جذب اشعه

غلظت‌های مختلف هر فراکسیون را نشان داد. جذب نوری فورمازان حاصله در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب نمونه‌های مجاور شده با زهر و نمونه‌های شاهد در نمودار ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است.

بررسی سایتوتوکسیتی فراکسیون‌های زهر افعی بر سلول‌ها با استفاده از روش MTT نتیجه آزمایش MTT بر روی سلول‌های مجاور شده با فراکسیون‌های زهر افعی، تفاوت تأثیر پذیری سلول در مجاورت با این ترکیبات و همچنین در مجاورت



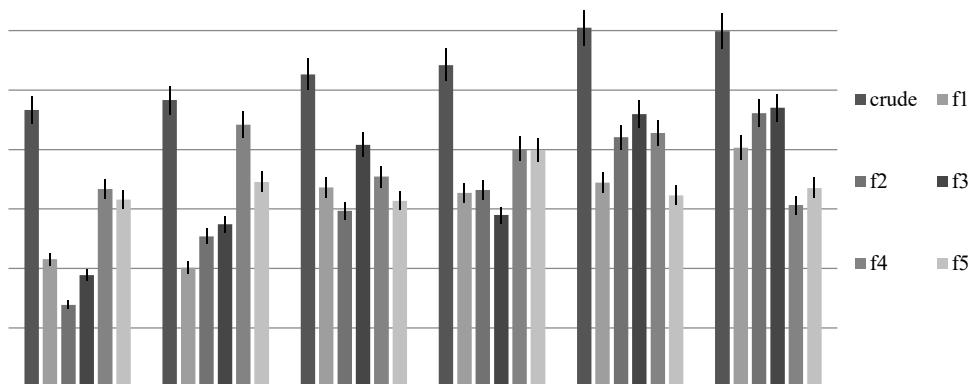
نمودار ۱. تأثیر زهر افعی گرزه مار بر زنده‌مانی سلول‌های Vero. نمودار درصد سلول‌های زهر (محور عمودی) و فراکسیون‌های افعی گرزه (محور افقی) را نشان می‌دهد.

جدول ۱. درصد زنده‌مانی سلول Vero در غلظت‌های مختلف فراکسیون‌های سم مار

	Crude	f1	f2	f3	f4	f5
5 ug	0	100	0	0	0	0
3.5 ug	40	100	20	10	0	20
2.5 ug	80	100	30	20	30	60
2 ug	100	100	40	40	60	90
1.5 ug	100	100	70	60	80	100
1 ug	100	100	100	100	100	100

هر ستون نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده و هر ردیف نشان‌دهنده رقت استفاده شده در کشت سلول براساس میکروگرم در میلی لیتر ($\mu\text{g}/\text{ml}$) است.

MTT

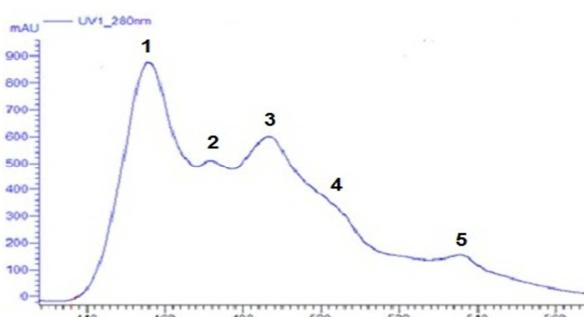


نمودار ۲. نتایج آزمایش MTT پس از اثر دادن زهر افعی گرزه مار بر روی سلول‌های Vero در محیط کشت. نمودار سمت راست میزان OD در طول موج ۵۷۰ نانومتر (OD_{570}) را در ارتباط با رقت‌های زهر (محور عمودی) و فراکسیون‌های افعی گرزه (محور افقی) را نشان می‌دهد.

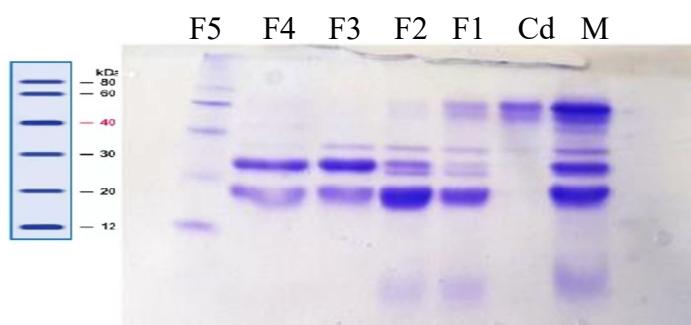
جدول ۲. مقدار عددی OD₅₇₀ را برای زهر و فراکسیون‌های آن

	Crude	f1	f2	f3	f4	f5
5 ug	0.93	0.43	0.28	0.38	0.67	0.63
3.5 ug	0.97	0.40	0.51	0.55	0.88	0.69
2.5 ug	1.05	0.67	0.59	0.82	0.71	0.63
2 ug	1.08	0.65	0.66	0.58	0.80	0.80
1.5 ug	1.21	0.69	0.84	0.92	0.86	0.65
1 ug	1.20	0.81	0.92	0.94	0.61	0.67
شاهد	1.41					

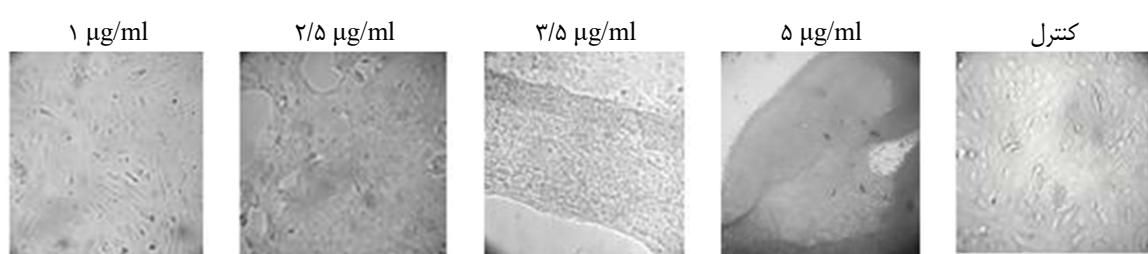
مقدار عددی OD₅₇₀ را برای زهر و فراکسیون‌های آن و ردیفها نیز رقت زهر استفاده شده در کشت سلول براساس میکروگرم در میلی لیتر ($\mu\text{g}/\text{ml}$) را نشان می‌دهند. در نمونه‌ی شاهد هیچ‌گونه زهر به محیط کشت اضافه نشده است.



شکل ۱. نمودار جداسازی فراکسیون‌های سم افعی گرزوه مار به روش FPLC. پروتئین‌های زهر مار افعی گرزوه با استفاده از ستون حاوی رزین S-200 جداسازی و در پنج بخش جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار داده شد. محور عمودی میزان جذب اشعه ماورای بنفش و محور افقی زمان خروج پروتئین از ستون را نشان می‌دهد. قله منحنی‌های جداسازی شده با شماره‌های ۱ تا ۵ نشانه‌گذاری شده است.



شکل ۲. بررسی بخش‌های سم گرزوه مار بدست‌آمده از کروماتوگرافی، در ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریلامید محتوی سدیم دودسیل سولفات (PAGE) پس از رنگ‌آمیزی به روش کلوئیال کوماسی بلو. نمونه‌ها در ژل از راست به چپ شامل زهر خام اولیه Cd، پنج فراکسیون (۱ تا ۵) و در انتهای مارکر وزنی M می‌باشند. مارکر وزنی M در تصویر کنار ژل مشاهده می‌شود.



شکل ۳. شمای میکروسکوپی سلول Vero تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فراکسیون F5 سم مار (با بزرگنمایی X ۱۰) تأثیر فراکسیون سم مار پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در شرایط سانتی گراد و CO₂ ۳۷ درصد را در زیر میکروسکوپ نشان می‌دهد. بالاترین و کمترین غلظت زهر افزوده بترتیب ۵ و ۱ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. تصاویر از راست به چپ، گروه کنترل شامل سلول سلول با فراکسیون سم، مرگ کامل (۱۰۰ درصد) سلول‌ها پس از مجاورت با بالاترین غلظت سم (۵ $\mu\text{g}/\text{ml}$)، تلفات ۸۰ درصد سلول‌ها (۳/۵ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ، مرگ سلولی ۴۰ درصد (۲/۵ $\mu\text{g}/\text{ml}$) و مجاورت سلول‌ها با کمترین غلظت سم (۱ $\mu\text{g}/\text{ml}$) که تقریباً همه سلول‌ها زنده هستند. درصدهای تعیین شده با شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو به دست آمده است.

عصبی مرکزی را آلوده نموده و یا از طریق تغییرات ژنتیکی از سیستم ایمنی فرار می‌کنند، مؤثر باشد (Wunner, 2003). در همین راستا Farzad *et al.* (2020) مطالعه‌ای بر تأثیر فراکسیون‌های زهر کبری ایرانی (*Naja naja oxiana*) بر ویروس هاری انجام داده‌اند و نتایج حاصله نشان داد که یکی از فراکسیون‌های این سم تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر کاهش ورود ویروس بدلیل رقابت این فراکسیون با ویروس هاری بر ورود و اتصال ویروس داشته است. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که بخشی از زیرواحد آلفای گیرنده استیل کولینی ماهیچه محل اتصال نوعی زهر به نام α -bungarotoxin (زهر کفچه مار) می‌باشد که دارای توالی مشترک با گلیکوپروتئین ویروس هاری است. همچنین مطالعات نشان داده است که زهر مذکور با اتصال به محل پیوند استیل کولین به گیرنده (یا در نزدیکی آن) قادر به کاهش اتصال ویروس به گیرنده استیل کولین تا ۵۰ درصد می‌باشد (Barchan *et al.*, 1992; Lafon, 2005).

زهرهای خواص بیولوژیک گوناگونی دارند. برخی از زهرهای روی دستگاه عصبی تأثیر می‌گذارند، برخی از آنها سبب تغییر تراوایی غشای یاخته می‌شود و برخی دیگر موجب تخریب تارهای ماهیچه‌ای می‌شوند. در دید کلی، زهر مار باعث افزایش مرگ سلولی ناشی از برهم‌خوردن هوموستاز سلول‌های زنده می‌شود (Russell, 1980; Bawaskar & Bawaskar, 1980). در پژوهش حاضر نشان داده شد که برخی از ترکیبات زهر در غلظت‌های مختلف اثرات کمتر و برخی دیگر اثرات شدیدتری روی کشت سلول جانوری دارا هستند. سلول Vero نوعی سلول با چسبندگی اجباری در سطح کشت سلولی است (شکل ۳). این سلول در پژوهش‌ها و همچنین فرایندهای محصولات زیستی موارد استفاده زیادی دارد (Ammerman, 2008). پیداکردن مکانیسم اثرگذاری فراکسیون‌های زهرمار بر روی این سلول می‌تواند امکان مداخلات در موارد پیش‌گفته را برای

نتیجه‌گیری و بحث

مواد بیولوژیک تشکیل‌دهنده زهر مارها از پلی‌پپتیدهای آنزیمی و غیر آنزیمی تشکیل شده است که سمیت آنها در انسان و سایر موجودات ناشی از عملکرد بیولوژیک این ترکیبات است (Kang *et al.*, 2011) این ترکیبات که تعداد آنها به ده‌ها پروتئین مشتمل می‌شود (Mackessy, 2010)، پس از ورود به بدن قربانی از طریق گزش مار، فعالیت‌های خاصی را انجام می‌دهند که نتیجه آنها باعث بروز نتایج کشنده می‌شود. با این وجود، ویژگی‌های منحصر به فرد اجزای زهر به صورت جداگانه و با کمیت مشخص توانسته است خواص مفیدی در درمان برخی بیماری‌ها از خود نشان بدهد (Fatima & Fatah, 2014). در این مطالعه توانستیم با ارزیابی فراکسیون‌های حاصل از جداسازی و تفکیک اجزای پروتئینی زهر مار افعی گرزوه ایرانی (*Macrovipera lebetina*) به وسیله تکنیک کروماتوگرافی، نشان دهیم که بخش‌های مختلف این ترکیبات در مدل کشت سلولی اثرات غیریکسانی در کشنندگی سلول از خود نشان می‌دهند (نمودارهای ۱ و ۲ و جدول‌های ۱ و ۲). به عنوان مثال در همین ارتباط در پژوهش‌های گذشته نشان داده شده که آلفانوروتوكسین جداشده از زهر مار و waglerin افعی، مسدودکننده‌های قوی گیرنده‌های استیل کولین عضلانی هستند که با میل ترکیبی بالا ($K_D=10^{-9}-10^{-11}$) به زهر خانواده الپیده و Dutertre *et al.*, 2017). مشابه همین اثر بر گیرنده استیل کولین توسط بخشی از گلیکوپروتئین ویروس هاری نیز نشان داده شده است. اثربخشی ترکیبات زهر را در بیماری‌ها می‌توان با مطالعه اختصاصی‌تر بررسی و تعیین نمود. به عنوان مثال، شناخت بخشی از گلیکوپروتئین ویروس هاری که در اتصال به گیرنده استیل کولین نقش دارد و نیز شناخت محل اتصال آن بر روی این گیرنده می‌تواند در دستیابی به استراتژی‌های جدید درمانی، به ویژه در مورد ویروس‌هایی که سیستم

پژوهش نشان داده شد که ایجاد یک مدل مناسب کشت سلولی می‌تواند بررسی اثر بخشی زهرمار بر عفونت‌های ویروسی و همچنین ارزیابی خواص درمانی آن را هموار نماید.

سپاسگزاری

از آقایان رضا فرزاد و اشکان علمداری، خانم نرگس میانده‌ی و آقای محمد رضا زارع‌نژاد به خاطر همکاری‌های ارزنده در این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Adukauskienė, D.; Varanauskienė, E.; Adukauskaitė, A. (2011). Venomous snakebites. *Medicina*; 47(8): 461.
- Amberman, N. C.; Beier-Sexton, M.; Azad, A.F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*; 11(1): A-4E.
- Barchan, D.; Kachalsky, S.; Neumann, D.; Vogel, Z.; Ovadia, M.; Kochva, E.; Fuchs, S. (1992). How the mongoose can fight the snake: the binding site of the mongoose acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 89(16): 7717-7721.
- Bawaskar, H.S.; Bawaskar, P.H. (2015). Snake bite poisoning. *Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences*; 20(1): 5.
- Bazaa, A. ; Luis, J. ; Srairi-Abid, N. ; Kallech-Ziri, O. ; Kessentini-Zouari, R. ; Defilles, C. ; ... Marrakchi, N. (2009). MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biology*; 28(4): 188-193.
- Dehghani, R.; Mehrpour, O.; Shahi, M.P.; Jazayeri, M.; Karrari, P.; Keyler, D.; Zamani, N. (2014). Epidemiology of venomous and semi-venomous snakebites (Ophidia: Viperidae, Colubridae) in the Kashan city of the Isfahan province in Central Iran. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*; 19(1): 33.
- Dutertre, S.; Nicke, A.; Tsetlin, V.I. (2017). Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. *Neuropharmacology*; 127: 196-223.
- Farzad, R.; Gholami, A.; Roodbari, N. H.; & Shahbazzadeh, D. (2020). The anti-rabies activity of Caspian cobra venom. *Toxicon*; 186: 175-181.
- Fatima, L.; Fatah, C. (2014). Pathophysiological and pharmacological effects of snake venom components: molecular targets. *J. Clin. Toxicol*; 4(190): 2161-0495.
- Jackson, A.; Rossiter, J. (1997). Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. *Journal of virology*; 71(7): 5603-5607.
- Kang, T.S.; Georgieva, D.; Genov, N.; Murakami, M.T.; Sinha, M.; Kumar, R.P.; ... Vrielink, A. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *The FEBS journal*; 278(23): 4544-4576.
- Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A.R.; de Silva, N.; Gunawardena, N.K.; Pathmeswaran, A.; Premaratna, R.; ...
- پژوهش‌های زیستی یا بهبود فرایندهای تولید فراهم آورد. نکته دیگر دارای اهمیت این است که، در پژوهش حاضر فرآکسیون‌های زهرمار بر اساس وزن مولکولی جداسازی شده‌اند، مطالعات پیشین نشان داده است که وزن‌های مولکولی بالاتر شامل آنزیم‌هایی مانند فسفولیپازها هستند که می‌توانند بر روی غشاء سلول تأثیر بگذارند، در حالی که فرآکسیون‌های انتهایی دارای پیتیدهای کوچک‌تر هستند (شکل ۲)، که در صورت توانایی ورود به سلول قابلیت مداخله در مسیرهای داخل سلولی را داشته باشند. در این

- de Silva, H.J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*; 5(11): e218.
- Koh, D.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*; 63(24): 3030-3041.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 15; 227(5259): 680-5.
- Lafon, M. (2005). Rabies virus receptors. *Journal of neurovirology*, 11(1), 82-87.
- Lentz, T.L. (1991). Structure-function relationships of curaremimetic neurotoxin loop 2 and of a structurally similar segment of rabies virus glycoprotein in their interaction with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*; 30(45): 10949-10957.
- Mackessy, S.P. (2010). The field of reptile toxinology: snakes, lizards and their venoms. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*; 3: 23.
- Morjen, M.; Kallech-Ziri, O.; Bazaar, A.; Othman, H.; Mabrouk, K.; Zouari-Kessentini, R.; ... Luis, J. (2013). PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. *Matrix Biology*; 32(1): 52-62.
- Pal, S.K.; Gomes, A.; Dasgupta, S.; Gomes, A. (2002). Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. *Indian journal of experimental biology*; 40(12): 1353-1358.
- Rita, P.; Animesh, D.K.; Aninda, M.; Benoy, G.K.; Sandip, H.; Datta, K. (2011). Snake bite, snake venom, anti-venom and herbal antidote. A review. *Int J Res Ayurveda pharm*; 2(4): 1060-1067.
- Russell, F.E. (1980). Snake venom poisoning. *Philadelphia*; 18: 139-234.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Malia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150: 76-85.
- Tasoulis, T.; Isbister, G.K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*; 9(9): 290.
- Tipton, K.F.; Dajas, F. (1994). Neurotoxins in Neurobiology. CRC Press.
- Tsetlin, V.; Hucho, F. (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS letters*; 557(1-3): 9-13.
- Wunner, W.H. (2003). Rabies virus. In *Rabies* (pp. 23-77). Academic Press.
- Yang, D. ; Peng, M. ; Yang, H. ; Yang, Q. ; Xu, J. (2009). Expression, purification and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom gloschedobin as Hsp70 fusion protein in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*; 66(2): 138-14.