مقاله پژوهشی

القای مرگ سلولی در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF) پس از تیمار با بزاق مار جعفری زیرگونه ایرانی (*Echis carinatus sochureki*)

عباس زارع میرک آبادی[1*] و پروین حریه[1]

۱- گروه حیوانات سمی تولید پاد زهر، موسسه سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران

*نویسنده مسئول: عباس زارک میرک آباد، دکتری تخصصی بیوشیمی، abbas.zare8@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۹/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: مارهای جعفری دارای اندازه کوچک هستند و جزو مارهای مهاجم بسیار گزنده محسوب می‌شوند. زهر مار نوع تغییر شکل یافته بزاق دهان مار است که از طریق غدد بزاقی تغییر شکل یافته ترشح می‌شود و در کیسه سم ذخیره می‌شود. از مشکلات جوامع بشری به ویژه در مناطق روستایی گزش توسط مارهای سمی است که به طور صحیح و به موقع درمان نمی‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی میزان سمیت مار جعفری ایرانی بر رشد سلولی و مکانیسم دخیل در آن است.

روش مطالعه: در این پژوهش به بررسی اثرات سمیت زهر مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) بر میزان بقا و رشد رده سلولی فیبروبلاست پوست انسانی (HDF) با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Inverted)، آزمون MTT و نوترال رد (NR) و همچنین سنجش میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) پرداخته شد.

نتایج: سنجش سمیت با آزمون MTT و نوترال رد نشان داد غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتراز بزاق مار بقای سلول‌های HDF در مقایسه با کنترل کاهش می‌دهد و با افزایش غلظت بزاق مار میزان سمیت سلولی افزایش می‌یابد که وابسته به غلظت است ($P<۰/۰۰۱$). همچنین میزان آزاد سازی LDH با افزایش غلظت بزاق مار افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$) و تغییرات شاخصی در شکل سلولی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: بزاق مار جعفری در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست موجب القای سمیت می‌گردد و مهار تکثیر سلولی احتمالا از طریق فرآیند القا نکروز می‌باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق برای پژوهش‌های بعدی در این زمینه و همچنین روش‌های درمانی برای مارگزیدگان مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF)، سم مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*)، نکروز، LDH، NR

مقدمه

مار گزیدگی به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت عمومی به شمار می‌رود. سالانه بین ۱/۲ تا ۵/۵ میلیون مارگزیدگی در جهان رخ می‌دهد که بین ۱۹۸۸۶–۹۳۹۴۵ مورد منجر به مرگ می‌شوند (Warrell *et al.*, 2013). اکثر مارگزیدگی‌ها در جنوب و جنوب شرقی آسیا، کشورهای جنوبی صحرای آفریقا و آمریکای مرکزی و جنوبی گزارش شده است (Gutiérrez *et al.*, 2010). از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۱۱ تعداد ۵۳۷۸۷ مورد مارگزیدگی توسط مراکز پزشکی و درمانی ایران گزارش شده است. حدود ۸۵ تا ۹۰٪ مارگزیدگی در بخش روستایی و کشاورزی اتفاق می‌افتد (Dehghani *et al.*, 2014). در جهان بیش از ۳۵۰۰ گونه مار وجود دارد که از مدار قطبی یعنی اسکاندیناوی تا استرالیا پراکنده شده‌اند. مارها به جز نیوزلند و قطبین در همه قاره‌ها، دریاها و ارتفاعات بیش از ۴۹۰۰ متر در هیمالیای آسیا دیده می‌شوند که کمتر از ۱۰ درصد آن‌ها سمی می‌باشند و می‌توانند برای انسان درد سرساز باشند (Dehghani *et al.*, 2014). مارها موجودات مرموزی هستند و

اغلب مردم از آن‌ها وحشت دارند. اغلب مارها روی زمین یا زیر آن زندگی می‌کنند برخی از آن‌ها درختان یا آب را محل زندگی خود انتخاب می‌کنند. کنار باتلاق‌ها و رودخانه‌ها نیز از جمله مکان‌های مورد علاقه برای زندگی این خزندگان می‌باشد (Dehghani *et al.*, 2014). سم مارها یک کوکتل از پروتئین‌های فعال، پلی پپتیدها، ترکیبات غیر پروتئینی و آنزیم‌هایی است که به عنوان یک سلاح مرگبار برای شکار و همچنین دفاع در برابر شکارچیان تکامل یافته است. پروتئین‌های سم مار ممکن است بر فرآیندهای فیزیولوژیک بدن نظیر انتقال عصبی و هموستاز تأثیر گذارند. این مولکول‌های پروتئینی، توکسین نامیده می‌شوند و با توجه به سیستم‌هایی که روی آن‌ها عمل می‌کنند، نامگذاری می‌شوند. زهر مار حاوی انواع زیادی از نوروتوکسین‌ها، کاردیوتوکسین‌ها، میوتوکسینها، هموراژین‌ها، آنزیم‌ها، آمین‌های بیوژنیک، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها است. علائم نشان می‌دهد که زهر مارها بر سیستم‌های مختلف به ویژه سیستم عصبی، سیستم قلبی عروقی، سیستم عضلانی و عروقی تاثیر می‌گذارد. تظاهرات مهم پاتوفیزیولوژیک زهر مارها عبارتند از: فلج خفیف، میولیز سیستمیک، کواگولوپاتی و خونریزی، آسیب کلیوی، کاردیوتوکسیسیتی و آسیب بافت موضعی در محل گزش که می توانند برای انسان خطرناک یا تا حتی مرگبار باشد (Koh *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2014). مارها از نظر داشتن یا نداشتن دستگاه زهری که شامل غده‌های ترشح کننده زهر، مجرای انتقال زهر، غده ضمیمه و دندان تزریق کننده زهر است به سه گروه سمی، غیرسمی و نیمه سمی تقسیم می‌شوند.

مار جعفری با نام علمی *Echis carinatus* در رده خزندگان (Reptilia)، زیر راسته مارها (Serpentes) و خانواده افعی‌ها (Viperidae) طبقه‌بندی می‌شود. از نظر اندازه کوچک هستند و جزو مارهای مهاجم بسیار گزنده محسوب می‌شوند. از دیگر ویژگی‌های این مار پراکنش زیاد و جمعیت‌های انبوه آن است که باعث شده این مار به یکی از خطرناک‌ترین مارهای جهان تبدیل شود. سم مار جعفری، مخلوطی از پروتئین‌ها است که آبشار انعقادی خون را تحت تاثیر قرار داده و موجب عرق کردن طاقت‌فرسا و خونریزی شدید می‌شود. سم مار جعفری علاوه بر متالوپروتئازها دارای سرین پروتئاز نیز می‌باشد که می‌توانند بر روی دیواره رگ‌ها اثر داشته باشند و به آن‌ها آسیب برسانند. سم مارهای جعفری از نظر جغرافیایی با یکدیگر تفاوت دارند که این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در پروتئین‌های موجود در سم مار باشد (Kolde, 2004). اولین بار در سال ۱۹۹۴ دانشمندان توانستند از سم مار جعفری هندی (*Bothrops asper*) فسفولیپاز را توسط کروماتوگرافی و الکتروفورز جداسازی کنند و اجزای فارماکولوژیکی و کاتالیتیکی آن را شناسایی کردند (Gutiérrez *et al.*, 1995). در سال ۱۳۹۲ اثرات آسیبی سم مار جفری ایرانی بر روی بافت‌های کبدی و ششی گونه‌ای از پرنده مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که مار جعفری و ۱۶ عدد مرغ عشق را در قفس‌های مختلف قرار دادند و نمونه توسط مار گزیده می‌شد و پس از از بین رفتن نمونه آن را خارج کرده و بررسی‌های لازم بر روی آن‌ها انجام شد (Garzi *et al.*, 2013). در سال ۲۰۰۸ طی مقاله‌ای گزارش شد که SVMP (Snake venom metalloproteinases) چند زیرواحدی P-III موجود در سم مار قادر به ایجاد اثرات هموراژیک است (Moura-da-Silva *et al.*, 2008). در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است که دو پروتئین به نام‌های ACLH و Jararhagin به ترتیب در سم مارهای *Agkistrodon contortrix laticinctus* و *Bothrops jararaca* وجود دارد که همان SVMPهای هموراژکننده هستند و همچنین بیان، خالص‌سازی و تا خوردگی صحیح پروتئین نوترکیب زیموژن ACLH و همچنین دومین کاتالیتیکی rCDJARA بررسی گردید (Garcıa *et al.*, 2004). در سال ۲۰۱۳ محققان گزارش کردند پروتئینی به نام VaH3 از خانواده متالوپروتئازها P-IIIc در سم مار *Vipera ammodytes* وجود دارد که باعث ایجاد اثرات هموراژی می‌شود (Sajevic *et al.*, 2013).

پراکندگی مارهای جعفری در ایران تاکنون از بیشتر استان‌های مرکزی و جنوبی شامل سمنان، قم، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، خراسان رضوی، سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان، یزد، اصفهان، بوشهر، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان و ایلام گزارش شده است. جمعیت آنها در ایران در حد مطلوب بوده و از جمعیت بالایی برخوردار است. تاکنون ۵ زیرگونه از این گونه مار معرفی و طبقه بندی شده است که در ایران ۲ زیرگونه مشاهده شده است که زیرگونه *Echis carinatus sochureki* در نواحی مرکزی و جنوبی ایران گزارش شده است. سالانه گزارش‌های زیادی از مارگزیدگی منتشر می‌شود. به همین علت شناسایی و بررسی عوامل موجود در بزاق مار از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مورد توجه دانشمندان می‌باشد. لذا در این مطالعه به بررسی اثرات سمیت بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) بر میزان بقا و رشد رده سلولی فیبروبلاست پوست (HDF) با استفاده از بررسی ریخت‌شناسی با میکروسکوپ اینورت (Inverted)، سنجش بقای سلولی با روش MTT و رنگ زیستی نوترال رد (NR) و همچنین سنجش میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) پرداخته شد.

روش مطالعه

مواد: بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) لیوفیلیزه شده از بخش جانوران سمی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. رده سلولی فیبروبلاست پوست انسانی (HDF) از بانک سلولی موسسه سرم سازی رازی تهیه شد. تریپسین (Trypsin-EDTA)، 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium و

Neutral Red از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری شدند. پنی سیلین (Penicilin) و استرپتومایسین (Streptormycine) از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FCS: Fetal calf Serum) از شرکت Gibco-Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. کیت سنجش LDH از شرکت پارس آزمون تهیه شد.

کشت و تیمار سلول‌ها: رده سلولی HDF در فلاسک کشت سلول شامل محیط کشت DMEM محتوی L-glutamine (۲ mM)، FCS (۱۰ درصد)، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین کشت داده شده و در انکوباتور استرلیزه شده با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. جهت بررسی میزان سمیت ایجاد شده توسط بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر از بزاق مار تیمار شدند.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها: بررسی مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با سم مار جعفری ایرانی پس از گذشت ۲۴ ساعت توسط میکروسکوپ اینورت انجام شد و با شکل سلول‌های کنترل مورد مقایسه قرار گرفت.

سنجش مرگ سلولی با آزمون MTT (MTT assay): ابتدا پودر MTT در بافر PBS حل شد و غلظت نهایی آن ۵ mg/ml شد. سپس محلول MTT از خلال فیلتر ۰/۵ میکرومولار، فیلتر شد. ۴ ساعت قبل از پایان انکوباسیون، به هر کدام از چاهک‌های حاوی محیط کشت تازه و کشت داده، ۲۵ میکرولیتر محلول MTT افزوده گردیده و بعد از آن برای مدت ۴ ساعت دیگر در شرایط مشابه انکوبه شدند. در پایان انکوباسیون به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محلولی شامل SDS (۱۰٪) و دی متیل فورمامید (DMF) (۵۰٪) اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. آنگاه دانسیته نوری محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر Multi well Scanning (الایزاریدر) سنجیده شد (Riss *et al.*, 2016; Hekmat *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase release): سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های مختلف از بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) در میکروپلیت قرار داده شد. درون یک لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر از واکنشگر اول ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه (مواد درون چاهک) به آن افزوده شد. بعد از ورتکس و ۱ انکوباسیون، ۲۵۰ میکرولیتر از واکنشگر دوم به آن اضافه شد. سپس دوباره و رتکس شد و درون انکوباتور قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه درون کووت ریخته شد و جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانش شد (Powers *et al.*, 2007).

بررسی میزان قدرت غشایی با استفاده از نوترال رد (Neutral red): نوترال رد (NR) یکی از روش‌های بررسی سمیت است که در آن می‌توان به صورت کمی تعداد سلول‌های زنده درون چاهک‌های پلیت را اندازه‌گیری کرد. این رنگ توسط لیزوزوم‌ها جذب می‌شود. سلول‌های تیمار داده شده با غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری به مدت ۲ ساعت با رنگ نوترال رد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها شسته شد و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپتروفوتومتر خوانده شد.

روش آماری: جهت آنالیز داده‌ها از آزمون Anova استفاده گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

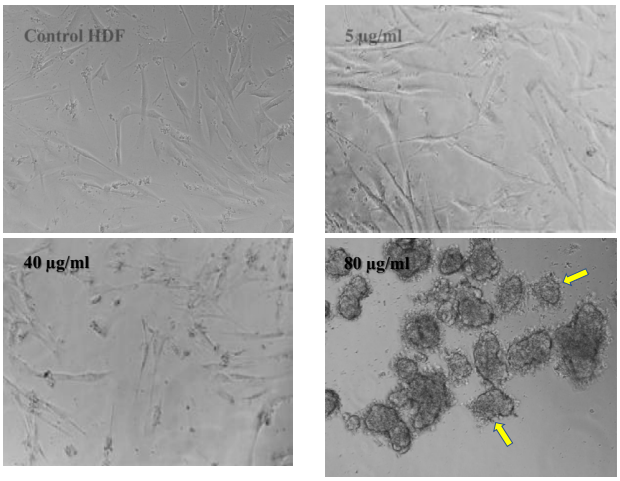
نتایج

تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها: شکل ۱ تصویر میکروسکوپ اینورت سلول‌های HDF کنترل و پس از تیمار با بزاق مار جعفری ایرانی را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود سلول‌های نرمال کشیده و دوکی شکل هستند. اما سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالای بزاق مار جعفری حالت گرانوله شدن دارند و کاهش تعداد سلول‌ها و پلاسمولیز سلول‌ها مشاهده می‌گردد.

سنجش فعالیت تکثیر سلولی به روش MTT: نتایج سنجش فعالیت تکثیر سلولی به روش MTT در نمودار ۱ نشان داد که بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) توانایی تاثیر بر روی سلول‌های HDF از ۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر را دارد. این تاثیر با افزایش غلظت بزاق مار افزایش یافته و در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۴۵ درصد مرگ سلولی رخ داد ($P<0/001$).

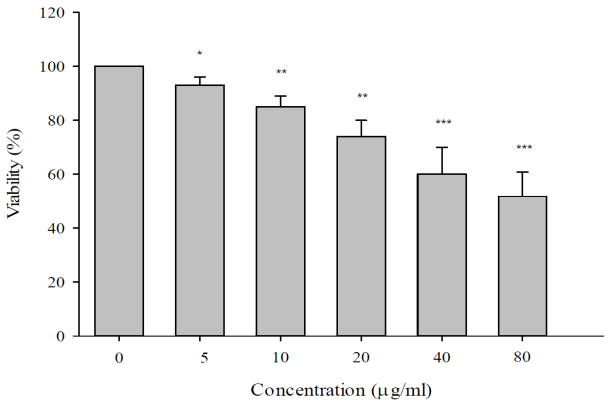
سنجش سمیت با رنگ حیاتی Neutral red: رنگ زیستی NR یک روش رنگ‌سنجی است که میزان زنده بودن سلول‌ها را در شرایط *in vitro* با استفاده از رنگ NR ارزیابی می‌کند. مبنای این آزمون بر توانایی سلول‌های زنده در ورود این رنگ به آن‌ها است. این رنگ به غشا سلولی نفوذ می‌کند و در لیزوزوم‌ها قرار می‌گیرد. با توجه به نمودار ۲ هر چه غلظت بزاق مار افزایش یافت، میزان درصد بقای زیستی سلول‌های HDF کاهش یافت. پس می‌توان نتیجه گرفت میزان القای

سمیت بزاق زهر مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*) وابسته به غلظت است.

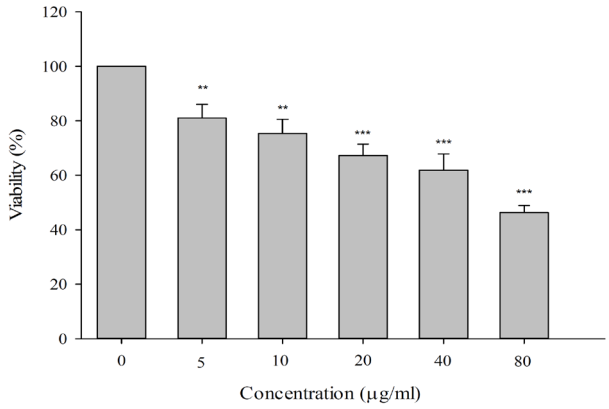


شکل ۱– تغییرات مورفولوژیکی سلول HDF پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*)

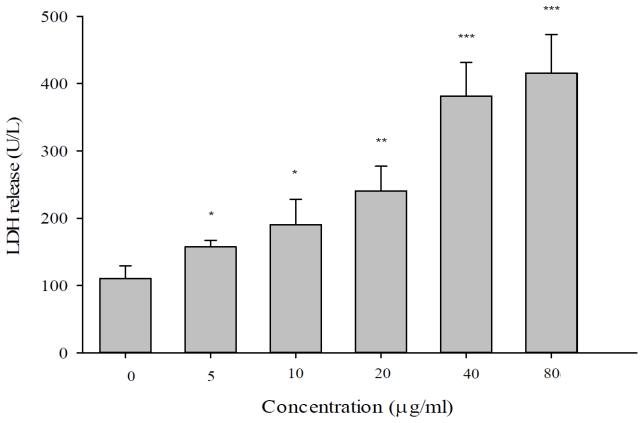
سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH): لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوزولی است که در اغلب سلول‌های یوکاریوت حضور دارد و از غشای پلاسمایی سلول‌های مرده و آسیب دیده (نکروزی) آزاد می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز متناسب با تعداد سلول‌های لیز شده در سوپرناتانت است. همانگونه که در نمودار ۳ نشان داده شده است سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) تیمار شد. سلول‌های کنترل منفی میزان کمی آنزیم لاکتات دهیدروژناز به محیط وارد می‌کنند. اما با افزایش غلظت زهر مار میزان تخریب سلولی افزایش یافته و میزان بیشتری آنزیم لاکتات دهیدروژناز به محیط وارد شده است.



نمودار ۱– سنجش سمیت غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست HDF پس از ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$)



نمودار ۲– سنجش سمیت غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست HDF پس از ۲۴ ساعت با استفاده از روش NR (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$)



نمودار ۳– میزان آزادسازی آنزیم LDH در سلول‌های فیبروبلاست پوست HDF پس از تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار جعفری پس از ۲۴ ساعت (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$)

بحث

سالانه گزارش‌های زیادی از مارگزیدگی منتشر می‌شود. به همین علت شناسایی و بررسی عوامل موجود در سم مار از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مورد توجه دانشمندان می‌باشد. در این مطالعه سلول‌های HDF پس از تیمار با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) تقریبا مانند سلول‌های کنترل بودند و شکل کشیده و دوکی خود را حفظ کردند و غشا سیتوپلاسمی آن‌ها دچار تخریب قابل وضوحی نشد. اما از تراکم آن‌ها کمی کاسته شد. بررسی ریخت‌شناسی پس از تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بزاق مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*) نشان داد که بزاق مار موجب شده است که غشا سیتوپلاسمی سلول‌ها دچار فشردگی و چروکیدگی گردد و زوائد و برآمدگی‌هایی در سطح آن‌ها ایجاد شود، به طوری که شکل کشیده و

دوکی اولیه سلول از بین رفته است و تراکم آن‌ها کم شده است. در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر از بزاق مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*) نیز تعداد سلول‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافته و همان طور که مشهود است سلول‌ها شکل طبیعی کشیده و دوکی خود را از دست داده‌اند و به صورت چروکیده و گرد درآمده‌اند. بنابراین مشاهدات میکروسکوپی حاکی از اثر سمی بزاق مار جعفری ایرانی بر رشد سلول‌ها وابسته به غلظت می‌باشد. برای سنجش اثر سمی بزاق مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*) بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوستHDF از آزمونMTT استفاده گردید (Hekmat *et al.*, 2013; Riss *et al.*, 2016). درصد سلول‌های زنده با افزایش غلظت بزاق مار کاهش یافته و در مقایسه با کنترل منفی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$). درصد بقای زیستی در سلول‌هایی که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار بودند به ترتیب از کمترین غلظت تا بالاترین غلظت برابر با ۹۳، ۸۵، ۷۴، ۶۰ و ۵۵ درصد محاسبه گردید و با افزایش غلظت بزاق بر قدرت مهاری آن افزوده شد. کمترین میزان از بزاق مار که سبب ایجاد سمیت گردید ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که درصد بقای زیستی سلول‌ها ۹۳ درصد بود و این کاهش رشد در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که سلول‌ها در حد قابل قبولی زنده بودند ولی به تدریج با افزایش غلظت بزاق مار اثر سمیت آن بیشتر نمایان شد. به طوری که در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد بقای زیستی سلول‌ها در مقایسه با کنترل به ۵۵ درصد رسید که بیشترین درصد سمیت سلولی را اعمال کرده است. بنابراین با افزایش غلظت بزاق مار جعفری (*Echis carinatus sochureki*) توان سمیت سلولی افزایش می‌یابد که این افزایش وابسته به غلظت می‌باشد.

سنجش با رنگ حیاتی NR یک تخمین کمی از تعداد سلول‌های زنده در کشت سلول فراهم می‌کند. این روش ارزان‌تر و در پاره‌ای موارد حساس‌تر از سایر آزمون‌های سمیت سلولی نظیر استفاده از نمک‌های تترازولیوم است (Mello *et al.*, 2020). درصد سلول‌های زنده با افزایش غلظت بزاق مار جعفری کاهش یافته و در مقایسه با کنترل منفی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$). درصد بقای زیستی در سلول‌هایی که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار بودند به ترتیب از کمترین غلظت تا بالاترین غلظت برابر با ۸۹، ۷۹، ۷۱، ۶۳ و ۵۱ درصد محاسبه گردید و با افزایش غلظت بزاق بر قدرت مهاری آن افزوده شد. کمترین میزان از بزاق مار که سبب ایجاد سمیت گردید ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که درصد بقای زیستی سلول‌ها ۹۰ درصد بود و این کاهش رشد در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که سلول‌ها در حد قابل قبولی زنده هستند ولی به تدریج با افزایش غلظت بزاق مار اثر سمیت آن بیشتر می‌شود. به طوری که در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد بقای زیستی سلول‌ها در مقایسه با کنترل به ۵۳ درصد می‌رسد که بیشترین درصد سمیت سلولی را اعمال کرده است. بنابراین با افزایش غلظت بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) توان سمیت سلولی افزایش می‌یابد که این افزایش وابسته به غلظت می‌باشد. برای سنجش اثر نکروزی بزاق مار جعفری بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست (HDF) از تست آزادسازی آنزیم LDH استفاده شد. لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوزولی است که در اغلب سلول‌های یوکاریوت حضور دارد و از غشای پلاسمایی سلول‌های مرده و آسیب دیده (نکروتیک) آزاد می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز متناسب با تعداد سلول‌های لیز شده در سوپرناتانت است. با افزایش غلظت بزاق مار، مقدار آزاد سازی آنزیم LDH افزایش یافت که این افزایش وابسته به غلظت بوده و در مقایسه با کنترل منفی از نظر آماری معنی دار بود ($P<۰/۰۰۱$). مقدار آنزیم LDH آزاد شده در سلول‌هایی که تحت مجاورت با غلظت‌های مختلف بزاق مار بودند به ترتیب از کمترین غلظت تا بالاترین غلظت برابر با ۱۵۷، ۱۹۰، ۲۴۰، ۳۸۱ و ۴۱۵ واحد محاسبه گردید. نتایج نشان داد که میزان رهایی آنزیم LDH در کمترین غلظت (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بالاترین غلظت (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از بزاق مار به ترتیب حدود ۱۵۷ و ۴۱۵ واحد افزایش داشته است. افزایش سطح میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در غلظت‌های مختلف بزاق مار در مدت زمان ۲۴ ساعت نیز از لحاظ آماری معنی دار بود. بنابراین به نظر می‌رسد پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های فیبروبلاست پوست با بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) احتمالا از هم گسیختگی غشا ایجاد گردیده و یکپارچگی غشای سلولی از بین رفته است. از این رو بزاق مار جعفری دارای اثر نکروزی بر روی سلول‌های HDF می‌باشد و احتمالا مرگ سلولی از طریق مکانسیم نکروز رخ می‌دهد.

Esmaeili و همکاران در سال ۲۰۱۶ تاثیر زهر افعی گرزه (*Macrovipera lebetina*) که از مارهای بسیار سمی است را با روش اندازه‌گیری سمیت MTT بر روی رده سلولی HEK-293 مورد ارزیابی قراردادند. نتایج آن‌ها نشان داد که تعداد سلول‌های زنده در مدت ۲۴ ساعت مجاورت با غلظت‌های مختلف زهر خام افعی گرزه به شدت کاهش یافت که این کاهش بقای زیستی معنی‌دار و به صورت وابسته به غلظت بود و حداکثر سمیت زهر در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Esmaeili Jahromi *et al.*, 2016). این نتایج با نتایج بدست آمده از MTT این پژوهش تطابق دارد. همچنین آنان پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف بزاق مار افعی گرزه، میزان آزادسازی آنزیم LDH در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت را اندازه‌گیری کردند ولی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. بنابراین آن‌ها اظهار داشتند که غشا سلولی آسیب ندیده و مرگ سلولی با مکانیسم آپوپتوز رخ داده است (Esmaeili Jahromi *et al.*, 2016) که نتایج حاصل از آن تحقیق با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. Balali و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر زهر خام افعی

جعفری (*Echis Carinatus*) که از مارهای بسیار سمی و خطرناک است را برروی یکپارچگی غشا رده سلولی HEK-293 به روش آزادسازی آنزیم LDH بررسی کردند. در این تحقیق مشخص شد که مقدار آنزیم LDH رها شده به درون محیط کشت در مدت زمان ۳ ساعت نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. همچنین در مدت زمان ۲۴ ساعت آنزیم آزاده شده LDH وجود دارد. نتایج آن‌ها حاکی از این بود که غشا سلولی یکپارچگی خود را از دست داده و مرگ سلولی در نتیجه مکانیسم نکروز می‌باشد (Balali Bahadorani and Zare Mirakabadi, 2016) که نتایج آن تحقیق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر کاملا مشابهت دارد. این مشابهت‌ها و تفاوت‌ها نشان می‌دهد که نه تنها گونه‌های مختلف از مارها بلکه زیرگونه‌های آن‌ها در سطوح متفاوت، پتانسیل مختلف سمیت دارند. شاید علت تنوع در نتایج، تفاوت در رده‌های سلولی، تفاوت در مدت زمانی که سلول در مجاورت با زهر قرار می‌گیرد و یا به دلیل تفاوت نوع ترکیبات موجود در زهر و میزان غلظت‌های مورد استفاده باشد (Nalbantsoy *et al.*, 2012).

مرگ سلولی می‌تواند توسط دو فرآیند اصلی نکروز و آپوپتوز ایجاد شود. وقتی که سلول‌ها با عدم تعادل شدید در شرایط فیزیولوژیکی مواجه هستند نکروز رخ می‌دهد و ممکن است در نتیجه آن غشا پلاسمایی آسیب ببیند (Hekmat and Saboury, 2019). نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با بر هم خوردگی توانایی سلول برای نگهداری هومئوستازی شروع می‌شوند. با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی تمام اندامک‌های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم می‌شوند و سپس از هم پاشیدگی غشاء سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می‌گیرد در نهایت با توجه به از کار افتادگی غشا پلاسمایی، اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. از مشخصات اصلی مرگ سلولی از نوع نکروز می‌توان به بزرگ و متورم شدن سلول، تخریب غشاء سلول، قطعه قطعه شدن DNA به طور تصادفی و وقوع واکنش‌های التهابی اشاره کرد. بنابراین در داخل بدن (*in vivo*)، مرگ سلولی نکروزی اغلب در نتیجه یک واکنش التهابی شدید رخ می‌دهد و با یک آسیب بافتی گسترده‌ای همراه است. آپوپتوز نیز یک حالت از مرگ سلولی است که تحت شرایط فیزیولوژیکی رخ می‌دهد و سلول به عنوان یک شرکت کننده فعال در زوال خودش است. آپوپتوز اغلب در طول چرخه سلول نرمال و هومئوستاز بافتی، جنین‌زایی، القا و حفظ تولرانس ایمنی رخ می‌دهد و یا همچنین به دلیل رشد و توسعه سیستم عصبی و آتروفی بافت وابسته به غدد درون ریز ایجاد می‌گردد. مشخصه‌های سلول‌های دستخوش آپوپتوز شامل انقباض سلولی، تورم غشا، تجمع کروماتین، تراکم هسته‌ای و سیتوپلاسمی، تفکیک سیتوپلاسم و هسته‌ها به وزیکول‌های غشایی می‌باشد که شامل تفکیک ریبوزوم‌ها، میتوکندری با مورفولوژی کامل و مواد هسته می‌شوند. در داخل بدن (*in vivo*)، این اجسام آپوپتوتیک به سرعت شناخته شده و توسط هر یک از ماکروفاژها یا سلول‌های اپیتلیال مجاور فاگوسیته می‌شوند. با توجه به این مکانیسم کارآمد در سلول‌هایی که در شرایط *in vivo* در معرض آپوپتوز بودند بدون هیچ گونه پاسخ التهابی استخراج می‌شوند (Ouyang *et al.*, 2012). ترکیبات سمی زهر مارها شامل آنزیم‌های مختلف مانند فسفولیپاز A2، متالوپروتئینازها، سرین پروتئازها می‌باشند و همچنین شامل پروتئین‌های غیرآنزیمی (توکسین‌ها) مانند دیس اینتگرین‌ها، لکتین‌ها و پپتیدها می‌باشند. این ترکیبات در القای آپوپتوز و نکروز سلول‌های سرطانی و نرمال موثر هستند. اثرات سمی زهر مار به طور ویژه به گونه‌های مار، جنس مار و بافت مورد هدف بستگی دارد. بنابراین مارها با توجه به فعالیت‌های پاتوفیزیولوژیکال خود بر روی سلول‌ها گروه‌بندی شده‌اند. مارهای سمی خود به چهار دسته آلاپیده (Elapidae)، ویپریده (Viperalebetina)، کروتالیده (Crotalidae) و هیدروفیده (Hydrophidae) تقسیم می‌شوند که هر گروه علایم ویژه خود را در فرد مار گزیده ایجاد می‌کنند. زهرهای الاپیده باعث تغییرات غیر قابل برگشت بر روی سلول‌ها می‌شوند و کاملا سلول‌ها را از بین می‌برند، زهرهای کروتالیده باعث از بین رفتن قابلیت زیستی سلول‌ها می‌شوند و زهرهای ویپریده باعث تغییرات در تجمع سلول می‌شوند. از این رو ممکن است که بزاق مار جعفری که از خانواده ویپریده می‌باشد از طریق مکانسیم رایج در این خانواده یا همراه دیگر مکانیسم‌ها رشد سلولی را مهار کند (Doley *et al.*, 2011). سیتوتوکسین‌ها با تخریب غشاهای سلول، سلول‌ها را می‌کشند. مکانیسم‌های ایجاد سمیت توسط سیتوتوکسین‌های مارهای مختلف شامل تغییر فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا و همچنین دپلاریزه شدن غشاهای قابل تحریک می‌باشند. دیگر مکانیسم‌ها مثل مهار تجمع پلاکت به وسیله دیس اینتگرین‌ها و القا همولیز و سیتوتوکسیسیته می‌باشند (Feofanov *et al.*, 2005). بسیاری از فعالیت‌های پاتوفیزیولوژیکی سیتوتوکسین‌ها براساس توانایی‌شان برای اتصال به غشاهای سلول رخ می‌دهد که در نهایت منجر به تغییرات در سازمان و عملکرد لیپیدهای دو لایه می‌گردند (Konshina *et al.*, 2011). آن‌ها توانایی مختل کردن لیپوزوم‌هایی که دارای فسفولیپیدهای مختلف هستند مانند فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل سرین و کاردیولیپین را دارند. طبق آخرین دستاوردهای تحقیقاتی، گزارش شده است که سیتوتوکسین‌ها تمایل اتصال بیشتری به کاردیولیپین و سپس به ترتیب به فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل کولین دارند. با توجه به اینکه سیتوتوکسین‌ها، پروتئین‌هایی با پایه آمفی پاتیک قوی هستند و کاردیولیپین یک فسفولیپید غنی در غشا داخلی میتوکندری است از این رو سیتوتوکسین‌ها احتمالا به واسطه ی واکنش دادن با فسفولیپیدهای آنیونی در سطح غشاهای پلاسمایی، به صورت انتخابی می‌توانند لیپیدهای دو لایه‌ای در اندامک‌های درون سلولی

مانند میتوکندری را مورد هدف قرار دهند و باعث تخریب یکپارچگی غشا میتوکندری می‌گردند (Gasanov *et al.*, 2014). مطالعات زیست‌شناسی چند سلول نشان می‌دهد که بعضی سیتوتوکسین‌های مربوط به کبراها با تاثیر بر روی میتوکندری در سلول‌ها می‌توانند باعث متورم شدن، قطعه قطعه شدن و دپلاریزاسیون میتوکندری شوند و همچنین با تاثیر بر روی لیزوزوم‌ها باعث نفوذپذیری لیزوزوم گردند (Gasanov *et al.*, 2014). زهرهای سمی به طور کلی از آنزیم‌های پروتئولیتیک و فاکتورهای انتشار دهنده تشکیل شده است که باعث می‌شوند آسیب موضعی و سیستمیک رخ دهد. اثرات بالینی رایج در نتیجه پیشرفت آسیب موضعی، بعد از درد و ادم، شامل ایجاد اکیموز (خونریزی زیرپوست) و تاول است. همچنین اختلالات خونی شامل دفیبرینیشن همراه با ترومبوسیتوپنی (افزایش خونریزی و کاهش انعقاد) یا بدون آن ممکن است در نتیجه ایجاد سمیت به وجود آید. به طور کلی خونریزی شدید رایج نیست و در مواردی که نکروز آشکار می‌گردد همراه با تیره شدن اطراف نیش آغاز می‌شوند. در ادامه ممکن است تاول ایجاد شود. نکروز معمولا به پوست و بافت زیر پوست محدود است اما ممکن است بسیار گسترده شود (Ownby, 1990; Gasanov *et al.*, 2014). بنابراین مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) دارای ترکیبات سمی شدید در ترشحات بزاق خود می‌باشد و باید این ترکیبات به طور دقیق شناسایی گردند. همچنین بزاق این مار می‌تواند باعث ایجاد علائم موضعی از قبیل نکروز شدید گردد. بنابراین افراد گزیده شده توسط این مار باید به سرعت تحت مراقبت‌های درمانی ویژه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

سنجش سمیت با آزمون MTT و نوترال رد نشان داد غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) درصد بقای زیستی سلول‌های HDF در مقایسه با کنترل کاهش شاخص می‌یابد و با افزایش غلظت بزاق مار توان سمیت سلولی افزایش می‌یابد که این افزایش وابسته به غلظت بزاق مار است. همچنین میزان آزاد سازی LDH با افزایش غلظت بزاق مار افزایش یافت و تغییرات شاخصی در شکل سلولی مشاهده گردید. براساس نتایج به دست آمده در این پژوهش اثر سمی بزاق مار جعفری ایرانی (*Echis carinatus sochureki*) در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی باعث ایجاد اثرات سمی می‌گردد و مهار تکثیر سلولی احتمالا از طریق فرآیند القا نکروز ایجاد می‌شود. نتایج بدست آمده از این تحقیق برای پژوهش‌های بعدی در این زمینه و همچنین روش‌های درمانی برای مارگزیدگان مفید خواهد بود.

تقدیر و تشکر

از کلیه پرسنل محترم بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

Balali Bahadorani, M. and Zare Mirakabadi, A. 2016. Cytopathic effect of snake (echis carinatus) venom on human embryonic kidney cells. Asia Pacific Journal of Medical Toxicology, 5(3): 88-93..

Dehghani, R., Fathi, B., Shahi, M.P. and Jazayeri, M. 2014. Ten years of snakebites in iran. Toxicon, 90: 291-298.

Doley, R., Jackson, K., Madaras, F., Vonk, F., Vidal, N. and Mirtschin, P. 2011. Snake venom: From fieldwork to the clinic. BioEssays, 33(4): 269-279.

Esmaeili Jahromi, H., Zare Mirakabadi, A. and Kamalzadeh, M. 2016. Evaluation of iranian snake 'macrovipera lebetina'venom cytotoxicity in kidney cell line hek-293.

Feofanov, A.V., Sharonov, G.V., Astapova, M.V., Rodionov, D.I., Utkin, Y.N. and Arseniev, A.S. 2005. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. Biochemical Journal, 390(1): 11-18.

Garcıa, L., e Silva, L.P., Ramos, O., Carmona, A., Bersanetti, P. and Selistre-de-Araujo, H. 2004. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 138(1): 23-32.

Garzi, A., Nazari, A. and Abbasi, M. 2013. Deleterious effects of echis carinatus venom on liver and lung tissues of a bird species. Journal of Animal Biology, 5(3): 51-58.

Gasanov, S.E., Dagda, R.K. and Rael, E.D. 2014. Snake venom cytotoxins, phospholipase a2s, and zn2+-dependent metalloproteinases: Mechanisms of action and pharmacological relevance. Journal of clinical toxicology, 4(1): 1000181.

Goswami, P.K., Samant, M. and Srivastava, R.S. 2014. Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. International

Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(5): 4-7.

Gutiérrez, J., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G. and Ovadia, M. 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake bothrops asper (terciopelo). Toxicon, 33(1): 19-29.

Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W. and Warrell, D.A. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. Toxicon, 56(7): 1223-1235.

Hekmat, A., Afrough, M., Hesami Tackallou, S. and Ahmad, F. 2020. Synergistic effects of titanium dioxide nanoparticles and paclitaxel combination on the DNA structure and their antiproliferative role on mda-mb-231cells. Journal of Nanoanalysis: -. DOI 10.22034/jna.2020.1869287.1141.

Hekmat, A. and Saboury, A.A. 2019. Structural effects of the syntheticcobalt–manganese-zinc ferrite nanoparticles ($Co_{0.3}Mn_{0.2}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ NPs) on DNA and its antiproliferative effect on t47dcells. BioNanoScience, 9(4): 821-832.

Hekmat, A., Saboury, A.A., Divsalar, A. and Seyedarabi, A. 2013. Structural effects of tio2 nanoparticles and doxorubicin on DNA and their antiproliferative roles in t47d and mcf7 cells. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 13(6): 932-951.

Koh, D., Armugam, A. and Jeyaseelan, K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 63(24): 3030-3041.

Kolde, H.-J. 2004. Haemostasis: Physiology, pathology, diagnostics. Pentapharm.

Konshina, A.G., Boldyrev, I.A., Utkin, Y.N., Omel'kov, A.V. and Efremov, R.G. 2011. Snake cytotoxins bind to membranes via interactions with phosphatidylserine head groups of lipids. PloS one, 6(4): e19064.

Mello, D.F., Trevisan, R., Rivera, N., Geitner, N.K., Di Giulio, R.T., Wiesner, M.R., Hsu-Kim, H. and Meyer, J.N. 2020. Caveats to the use of mtt, neutral red, hoechst and resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. Chemico-biological interactions, 315: 108868.

Moura-da-Silva, A., Ramos, O., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M. and Tanjoni, I. 2008. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. Biochimie, 90(3): 484-492.

Nalbantsoy, A., Karabay-Yavasoglu, N., Sayim, F., Deliloglu-Gurhan, I., Gocmen, B., Arikan, H. and Yildiz, M. 2012. Determination of in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity of venom from the cypriot blunt-nosed viper macrovipera lebetina lebetina and antivenom production. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 18(2): 208-216.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. and Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell proliferation, 45(6): 487-498.

Ownby, C. 1990. Locally acting agents: Myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Handbook of toxinology. Marcel Dekker New York: pp: 601-654.

Powers, J.L., Kiesman, N.E., Tran, C.M., Brown, J.H. and Bevilacqua, V.L. 2007. Lactate dehydrogenase kinetics and inhibition using a microplate reader. Biochemistry and Molecular Biology Education, 35(4): 287-292.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J. and Minor, L. 2016. Cell viability assays. In: Assay guidance manual [internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Sajevic, T., Leonardi, A., Kovačič, L., Lang-Balija, M., Kurtović, T., Pungerčar, J., Halassy, B., Trampuš-Bakija, A. and Križaj, I. 2013. Vah3, one of the principal hemorrhagins in vipera ammodytes ammodytes venom, is a homodimeric p-iiic metalloproteinase. Biochimie, 95(6): 1158-1170.

Warrell, D.A., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J. and Williams, D. 2013. New approaches & technologies of venomics to meet the challenge of human envenoming by snakebites in india. The Indian journal of medical research, 138(1): 38.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 1, 2020 Pages 1-8

Research Article

The toxicity induction in human dermal fibroblasts (HDF) cells by saliva of *Echis carinatus sochureki*

Abbas Zare Mirakabadi[1,*] and Parvin Horrieh[1]

[1] Department of Venomous animals and Antivenom Production, Karaj Razi Serum Making Institute, Karaj, Iran

*Correspondence to Abbas Zare Mirak Abadi, Ph.D., zareabbas83@gmail.com

Received 13th December 2019 Revised 10th March 2020 Accepted 22nd April 2020

Abstract

Introduction and Aim: *Echis carinatus* are small in size and are considered to be very biting invasive snakes. Snake venom is a type of snake saliva that is secreted through the salivary glands and stored in the venom sac. A problem in human societies, especially in rural areas, is snake bites, which are not treated properly. The aim of this study is evaluation of toxicity of saliva of *Echis carinatus sochureki* on cells growth and the mechanisms involved.

Methods: In this study, the effect of *Echis carinatus sochureki* saliva on human dermal fibroblasts (HDF) cells growth was determined by the inverted microscope, MTT assay, and Neutral red assay. The integrity of the cell membrane through LDH release was also measured.

Results: The MTT assay and Neutral red assay showed a significant ($p<0.001$) cytotoxic effect of *Echis carinatus sochureki* salvia on HDF cells growth after 24 hours treatment. Also, *Echis carinatus sochureki* venom caused a significant ($p<0.001$) increase in LDH release. Various morphological abnormalities were observed in cells.

Conclusion: The *Echis carinatus sochureki* saliva causes cytotoxic effects on HDF cells by the necrotic mechanism. The results of this study will be useful for future research in this field, as well as therapeutic methods for snake bites.

***Keywords*:** Human dermal fibroblasts (HDF), *Echis carinatus sochureki*, Necrosis, LDH, NR assay