مقاله پژوهشی

تاثیر بزاق مار پلنگی (*Hemorrhois ravergieri*) بر میزان بقای سلولی در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF)

فاطمه کمالی روستا[1] و عباس زارع میرک آبادی[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: ۱۳۹۹/۱۱/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۳

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: بسیاری از مارهای خانواده کلوبریده که غیرسمی در نظر گرفته می‌شوند ترشحات سمی تولید می‌کنند که باعث ایجاد علائمی در انسان می‌شود. سمیت بزاق مار پلنگی (*Hemorrhois ravergieri*) بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF) انجام شد.

روش مطالعه: در این پژوهش به بررسی اثرات سمیت ترشحات غده دوورنوی مار پلنگی بر میزان بقا و رشد سلول‌های HDF با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Inverted)، آزمون MTT و سنجش میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) پرداخته شد.

نتایج: سنجش سمیت با آزمون MTT نشان داد 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 ($P<۰/۰۵$). همچنین میزان آزاد سازی LDH با افزایش غلظت بزاق مار افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). همچنین بزاق مار پلنگی می‌تواند ناهنجاری‌های مورفولوژیکی شامل از دست دادن شکل چند وجهی و کاهش تراکم در سلول‌های در معرض بزاق مار ایجاد کند.

نتیجه‌گیری: تاثیر سمیت بزاق مار پلنگی بر روی سلول پوست احتمالا از طریق نکروز می‌باشد همچنین بزاق این مار می‌تواند باعث ایجاد علائم موضعی شود و افرادی که مورد گزش قرار می‌گیرند باید تحت مراقبت درمانی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سیتوتوکسیسیته، MTT، LDH، مار پلنگی، سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF)

مقدمه

یکی از تهدید جدی برای سلامت عمومی انسان‌ها مار گزیدگی است. 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). به طور کلی از نظر اکولوژی قریب سه چهارم مساحت ایران نیمه خشک یا خشک محسوب می‌شود که شامل کوهستان هایی با گیاهان کم و پراکنده و استپ‌های خشک و بیابان است این مناطق خشک وسیع، بخشی از کمربند بیابان بزرگ را تشکیل می‌دهند که از صحرای آفریقا شروع می‌شود و به سمت مشرق تا ماوراء قفقاز، افغانستان و آسیای مرکزی ادامه پیدا می کند بنابراین در ایران انواع جانوران خزنده شناسایی شده‌اند. وضعیت جغرافیایی و آب و هوایی ایران باعث شده که تنوع زیادی در گونه مارهای موجود در

ایران به وجود آید به طوری که تاکنون ۸۳ گونه مار شناسایی شده‌اند که از آن ها ۲۷ گونه سمی، ۱۱ گونه نیمه سمی و ۴۵ گونه غیرسمی است. این تنوع قابل ملاحظه در گونه‌های مار به علت وضع جغرافیایی خاص ایران در بین چند منطقه زیست جغرافیایی مهم است که هر یک از آن‌ها مارهای مخصوص به خود دارند. مارهای ایران در ۸ خانواده طبقه بندی می‌شوند (Dehghani *et al.*, 2014). مارها از نظر داشتن یا نداشتن دستگاه زهری که شامل غده‌های ترشح کنندهی زهر، مجرای انتقال زهر، غده ضمیمه و دندان تزریق کننده زهر است به سه گروه مارهای سمی، نیمه سمی و غیر سمی تقسیم می‌شوند. شکل و موقعیت دندان‌ها در مارهای سمی و غیر سمی با یکدیگر تفاوت دارند. بنابراین، با دقت در آثار دندانی در محل گزش، می‌توان سمی یا غیر سمی بودن مار را تشخیص داد. در مارهای سمی دندان‌های نیش از سایر دندان ها بزرگتر است. محل گزش مار سمی به صورت دو سوراخ است و گاهی نیش ذخیره به کار می‌رود و سه سوراخ مشاهده می‌شود و از محل این حفره‌های کوچک که جای تزریق سم هستند، خونابه خارج می‌شود. در محل گزش مارهای غیرسمی، اثر چهار ردیف دندانی یکسان که به صورت دو قوس آرواره است دیده می‌شود. با دیدن این آثار می‌توان تا حدودی نوع گزش مار سمی از غیر سمی را تشخیص داد. با این وصف، گاهی نشانه‌ها گنگ و گمراه کننده‌اند (Koh *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2014).

مار پلنگی با نام علمی *Hemorrhois ravergieri* در رده خزندگان (Reptilia)، زیر راسته مارها (Serpentes) و خانواده قمچه‌ماران (Colubridae) طبقه‌بندی می‌شود. این مار غیرسمی بوده و در مناطق کوهستانی، دامنه‌ها، دره‌های سنگی، دشت‌ها و مناطق نیمه بیابانی و سنگلاخی دیده می‌شود. علاوه بر این در مناطق مسکونی هم دیده شده است. مار پلنگی ماری فعال و از مارهای غیر سمی بوده که تقلید رفتاری شبیه مارهای سمی را نشان می‌دهد. به طوریکه هنگام خطر به جای گریختن، خشمگینانه حمله می‌کند (Glandt, 2010). پراکنش جهانی این مار در کشورهای ایران اکثر کشورهای آسیای مرکزی همچون قفقاز، ترکیه، ترکمنستان و پاکستان گزارش شده است. در ایران در استان‌های ایلام، فارس، خراسان، مرکزی، تهران، آذربایجان شرقی و غربی، اردبیل، زنجان، مازندران، کرمانشاه، همدان، سیستان و بلوچستان، سمنان، کردستان، خوزستان، اصفهان، لرستان، گیلان، گلستان، قزوین، کرمان و قم دیده شده است. مجموعه غدد دهانی در مارها به شکار موفقیت آمیز طعمه، بلعیدن و هضم کمک می‌کند. به همین دلیل بخشی از سیستم تغذیه‌ای در مارها است. عملکردهای ترشحات دهانی تولید شده توسط غده دوورنوی و غده زهر مارهای واقعا سمی شناخته شده است. اغلب این موارد به عنوان عوامل اولیه کشنده طعمه شناخته شده‌اند. اما طیف گسترده‌ای از نقش‌های بیولوژیکی مدت‌ها پیش پیشنهاد شده است. مانند مرگ سریع طعمه، مهار و جلوگیری از حرکت طعمه، روان‌سازی بلع، هضم و دفاع (McCue, 2005; Mackessy and Saviola, 2016).

زهر مار مایعی روغنی شکل، بر حسب نوع مار دارای رنگ سفید تا زرد و با pH اندکی اسیدی می‌باشد. زهر لیوفیلیزه مار در آب و همچنین در سرم فیزیولوژی حل می‌شود. حساسیت آن بسته به نوع زهر به دما و حتی در حالت محلول به pH محیطی که زهر در آن حل شده است بستگی دارد. از نظر ترکیب، زهر مار مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌های سمی، آنزیم‌ها و مواد غیرپروتئینی می‌باشد. اکثر آنزیم‌های موجود در زهر مار از نوع هیدرولازها می‌باشد که وزن مولکولی بین ۱۳ الی ۱۵۰ کیلو دالتون دارند. ترکیبات با وزن مولکولی کمتر از ۱۵۰۰ دالتون مربوط به مواد غیرپروتئینی است (Goswami *et al.*, 2014). هیچ زهری همه این ترکیبات را با هم ندارد و هر نوع مار، زهری مخصوص به خود دارد که در ترکیب شیمیایی با زهر انواع مارهای دیگر متفاوت است ممکن است ترکیبات موجود در زهر مارها، در گونه ها، زیر گونه‌ها، و یا حتی در یک نمونه واحد بسته به فصل، سن، جغرافیا و رژیم غذایی مار متفاوت باشد (Goswami *et al.*, 2014).

de Aquino Nery و همکاران در سال ۲۰۱۴ قدرت سیتوتوکسیسیته زهر مار P. nattereri که از خانواده کلوبریده و دارای غده دوورنوی می‌باشد را با استفاده از تست MTT بر روی سلول های کلیه MDCK مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از اثرات سیتوتوکسیسیته نشان داد زهر این مار دارای اثرات توکسیک می‌باشد زیرا قابلیت زیستی سلول‌ها به طور معنی‌داری در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ MDCK برروی سلول‌های میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش یافته است (de Aquino Nery *et al.*, 2014).

در مطالعات گذشته کشنده بودن ترشحات غده دوورنوی مارهای خانواده کلوبریده بررسی شده است. در تزریق وریدی ترشحات مار چلیپر (*Natrixtessellata*) مقدار MLD برابر با ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم و مار شتری (*Spalervsophis diadema cliffordi*) مقدار LD۵۰ برابر با ۲/۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم می‌باشد در حالی که این مارها جز مارهای غیرسمی دسته بندی شده‌اند (Kardong, 2002).

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. زهر مارهای خانواده ویپریده، کروتالیده و الاپیده که از مهم ترین مارها از نظر سمیت هستند طیف وسیعی از اثرات سمی و همچنین اثرات فارماکولوژی را ایجاد می‌کنند. لذا در این مطالعه به بررسی اثرات بزاق مار پلنگی (*Hemorrhois ravergieri*) 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 همچنین سنجش میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) پرداخته شد.

روش مطالعه

مواد: بزاق مار پلنگی 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. 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 خریداری 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.

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 پلنگی سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بزاق مار پلنگی تیمار شدند.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها: بررسی مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با سم مار پلنگی 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). برای محاسبه درصد مهار سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر استفاده شد.

درصد مهار سلول ها= [۱ - (OD چاهک های نمونه/ OD چاهک های کنترل)]×۱۰۰

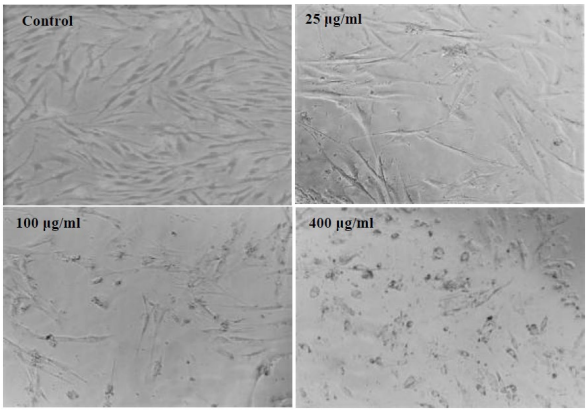
درصد سلول های زنده (Viability٪)= ۱۰۰- درصد مهار سلول ها

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).

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

نتایج

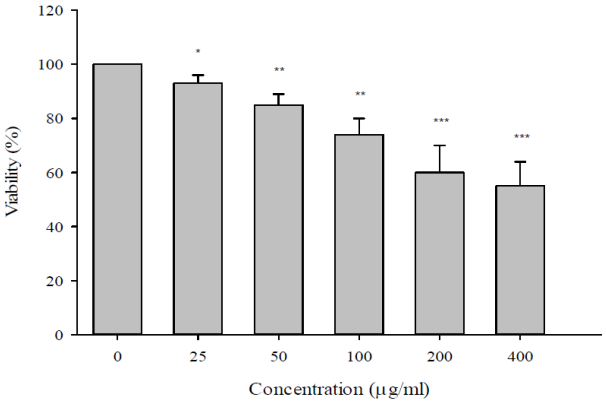
تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها: شکل ۱ تصویر میکروسکوپ اینورت سلول‌های HDF کنترل و پس از تیمار با بزاق مار پلنگی را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود سلول‌های نرمال کشیده و دوکی شکل هستند. سلول‌ها در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریبا مانند سلول‌های کنترل هستند شکل کشیده و دوکی خود را حفظ کرده‌اند و غشا سیتوپلاسمی آن‌ها دچار تخریب قابل وضوحی نشده است، ولی از تراکم آن‌ها کمی کاسته شده است. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییرات مورفولوژیک نشان داد که بزاق مار باعث شده غشا سیتوپلاسمی سلول‌ها دچار فشردگی و چروکیدگی گردد و زوائد و برآمدگی‌هایی در سطح آن‌ها ایجاد شده به طوری که شکل کشیده و دوکی اولیه سلول از بین رفته است و تراکم آن‌ها کم شده است. در غلظت ۴۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر 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 در آمده‌اند. بنابراین مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که اثر سیتوتوکسیک بزاق مار پلنگی بر رشد سلول‌ها وابسته به غلظت می‌باشد.



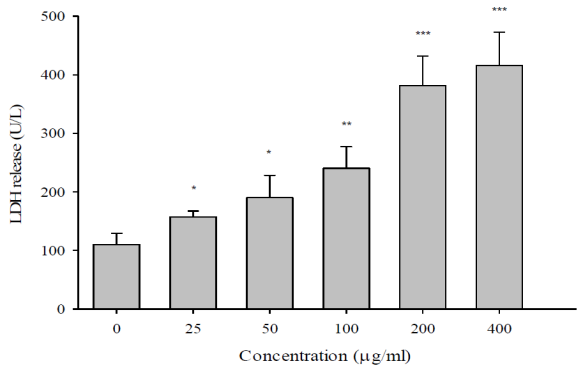
شکل ۱– تغییرات مورفولوژیکی سلول HDF پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار پلنگی

سنجش فعالیت تکثیر سلولی به روش MTT: نتایج سنجش فعالیت تکثیر سلولی به روش MTT در نمودار ۱ نشان داد که درصد بقای زیستی در سلول‌هایی که تحت مجاورت با غلظت‌های مختلف بزاق مار بودند به ترتیب از کمترین غلظت تا بالاترین غلظت برابر با ۹۳، ۸۵، ۷۴، ۶۰ و ۵۰ درصد محاسبه گردید و با افزایش غلظت بزاق بر قدرت مهاری آن افزوده شده است. کمترین میزان از بزاق مار که سبب ایجاد سیتوتوکسیک گردید ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که درصد بقای زیستی سلول ها ۹۳ درصد می‌باشد و این کاهش رشد در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که سلول‌ها در حد قابل قبولی زنده‌اند ولی به تدریج با افزایش غلظت اثر سیتوتوکسیسیته آن بیشتر می‌شوند. به طوری که در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد بقای زیستی سلول‌ها در مقایسه با کنترل برابر با ۵۵ درصد می‌رسد که بیشترین درصد سمیت سلولی را اعمال کرده است. همچنین میزان IC50 (غلظتی از ترکیب که بتواند رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها را مهار کند) در مدت زمان ۲۴ ساعت معادل ۳۷۸±۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. بنابراین نتیجه بر این شد که بزاق مار در مدت زمان ۲۴ ساعت به صورت وابسته به غلظت دارای اثر سیتوتوکسیک معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست HDF می‌باشد.

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 ۲ نشان داده شده است سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف بزاق مار پلنگی تیمار شد. 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 در کمترین غلظت (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بالاترین غلظت (۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) 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 معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بنابراین نتایج بیانگر این است که افزایش سطح آنزیم به مدت ۲۴ ساعت در محیط سلولی احتمالا دارای ترکیباتی است که باعث از هم گسیختگی غشا گردیده و یکپارچگی آن از بین رفته است از این رو بزاق مار پلنگی دارای اثر نکروتیک بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست می‌باشد و مرگ سلولی از طریق مکانسیم نکروز رخ می‌دهد.



نمودار ۱– سنجش سمیت غلظت‌های مختلف بزاق مار پلنگی 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– میزان آزادسازی آنزیم LDH در سلول‌های فیبروبلاست پوست HDF پس از تیمار با غلظت‌های مختلف بزاق مار پلنگی پس از ۲۴ ساعت (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$)

بحث

زهر مارهای خانواده ویپریده، کروتالیده و الاپیده که از مهم‌ترین مارها از نظر سمیت هستند. طیف وسیعی از اثرات توکسیکولوژی و همچنین اثرات فارماکولوژی را ایجاد می‌کنند. اثرات توکسیکولوژیکی مجموعه

پیچیده‌ای از یک سری عوارض موضعی و سیستمیک مانند آسیب سلول‌های اندوتلیال، سیتوتوکسیسیته، نوروتوکسیسیته، هموراژ و میوتوکسیسیته را باعث می‌شوند (Adukauskienė *et al.*, 2011). از جمله توکسین‌ها و آنزیم‌های موجود در زهر این مارها که می‌توانند باعث ایجاد عوارض موضعی و سیستمیک گردند شامل فسفولیپازها، نوکلئوتیدازها، L-آمینواسید اکسیدازها، سرین پروتئازها، متالوپروتئازها و همچنین دیس اینتگرین‌ها و لکتین‌ها می‌باشند (Calvete *et al.*, 2007). مشخص شده بسیاری از مارهای خانواده کلوبریده که غیر سمی در نظر گرفته می‌شوند ترشحات سمی از غده دوورنوی که هومولوگ غده زهر در مارهای سمی است تولید می‌کنند که باعث ایجاد علائم در افراد گزیده شده می‌شوند. علائم شدیدی نیز از گزش کلوبریده‌ها گزارش شده است که علائمی مشابه گزش وبپریده‌ها دارد که شامل ادم، هموراژ، فلج، اختلال تنفسی و مرگ می باشد. (Lemoine and Rodríguez-Acosta, 2003; Lemoine *et al.*, 2004). در این تحقیق سمیت بزاق مار پلنگی که از خانواده کلوبریده و غیرسمی می‌باشد مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی اثرات توکسیکولوژی سموم مار و توکسین‌ها اغلب با استفاده از حیوانات یا بافت‌های حیوانی انجام می‌شوند. اخیرا محققان از سلول به منظور آزمایش برای ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته در زهر استفاده می‌کنند که به عنوان یک راه برای انجام آزمایشات حیوانی می‌باشد (Nalbantsoy *et al.*, 2012).

نتایج این مطالعه نشان داد که بزاق مار پلنگی در غلظت بالا موجب القای مرگ سلولی می‌شود. de Aquino Nery و همکاران در سال ۲۰۱۴ قدرت سیتوتوکسیسیته زهر مار *P. nattereri* که از خانواده کلوبریده و دارای غده دوورنوی می‌باشد را با استفاده از تست MTT بر روی سلول‌های کلیه MDCK مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از اثرات سیتوتوکسیسیته نشان داد زهر این مار دارای اثرات توکسیک می‌باشد زیرا قابلیت زیستی سلول‌ها به طور معنی‌داری در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ MDCK برروی سلول‌های میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش یافته است (de Aquino Nery *et al.*, 2014).

Zare MirakAbadi و Horrieh نشان دادند که 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. اما غلظتی که موجب ایجاد سمیت در سلول‌ها می‌شود بسیار کمتر از مقدار بدست آمده در این مطالعه است (Zare MirakAbadi and Horrieh, 2020).

نتایج حاصل از این مطالعه مشابه نتایج de Aquino Nery و همکاران می‌باشد. زیرا آن‌ها نیز از ترشحات غده دوونوی مار نیمه سمی برای ارزیابی سیتوتوکسیسیته استفاده کردند. مار پلنگی که در تحقیق حاضر بررسی شده است جز مارهای غیر سمی طبقه بندی می‌شوند و ترشحات غده دوورنوی آن نسبت به غده زهر مارهای سمی مقدار پروتئین و تا حتی قدرت سمیت کمتری دارد. اما غلظت سمی بسیار کمتر از غلظت بدست آمده توسط Zare MirakAbadi و همکاران بود. زیرا مارهای مورد بررسی آن‌ها از سمی‌ترین مارها هستند پس زهر این مارها پتانسیل سمیت بالایی دارند در نتیجه در غلظت‌های کمتر اثرات سیتوتوکسیک بیشتری را ایجاد می‌کنند. ولی مار پلنگی که در تحقیق حاضر بررسی شده است جزو مارهای غیر سمی طبقه‌بندی می‌شوند و ترشحات غده دوورنوی آن نسبت به غده زهر مارهای سمی مقدار پروتئین و تا حتی قدرت سمیت کمتری دارد.

در تحقیق حاضر برای بررسی اثر نکروتیک از تست اندازه‌گیری آزاد سازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز استفاده گردید. روش سنجش LDH روشی برای اندازه‌گیری تعداد سلول‌های آسیب دیده از طریق اندازه‌گیری میزان کل LDH سیتوپلاسمی است و به عبارت دیگر بررسی یکپارچگی غشا سلولی به عنوان تابعی از مقدار LDH آزاد شده سیتوپلاسمی به داخل محیط کشت می‌باشد. لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم اکسید و ردوکتاز است که تبدیل پیروات و لاکتات به یکدیگر را کاتالیز می‌کند و در جریان آن NADH به NAD^+ اکسید می‌شود. در نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشخص شد که افزایش سطح فعالیت آنزیم در هر سلول‌های فیبروبلاست پوست که تحت مجاورت با غلظت‌های مختلف از زهر بودند در مقایسه با گروه کنترل تاثیرات معنی‌داری به صورت وابسته به غلظت داشته است ($P<۰/۰۵$). به طوری که افزایش سطح آنزیم به مدت ۲۴ ساعت در محیط سلولی در غلظت‌های بالای بزاق ممکن است بر روی غشا سلول‌ها تاثیر گذاشته و یکپارچگی آن‌ها را از بین برده باشد. از این رو مرگ سلولی توسط ترکیبات موجود در بزاق مار پلنگی دارای اثر نکروتیک بر روی سلول‌ها می باشد و مرگ سلولی احتمالا از طریق مکانیسم نکروز رخ می‌دهد. تاثیر بزاق مار پلنگی بر روی سلول پوست بیشتر از سلول کلیه می‌باشد. در واقع 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. نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با بر هم‌خوردگی توانایی سلول برای نگهداری هومئوستازی شروع می‌شوند. با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی تمام اندامک های 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. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات حاضر ملاحظه می‌گردد که بزاق مار پلنگی با اثر بر آزاد سازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز موجب کاهش سلول‌های زنده در تستMTT احتمالا از طریق مکانیسم نکروز گردیده است. همچنین بزاق باعث شد تراکم سلولی کاهش یابد، غشا سیتوپلاسمی دچار فشردگی و چروکیدگی گردد و زوائد و برآمدگی‌هایی نیز در سطح سلول‌ها به وجود آید. به طوری که شکل چند وجهی اولیه در سلول‌ها از بین رفته است و سلول‌ها از حالت دوکی شکل به صورت گرد درآمدند و نهایتا در غلظت‌های بالا مرگ سلول ها مشهود می‌باشد. نتایج بررسی‌های ما از لحاظ مورفولوژی با گزارشات متعدد منتشر شده از اثر سیتوتوکسیک زهرهای مارهای مختلف بر روی سلول ها مطابقت دارد. نتیجه کلی که از این تحقیق می‌توان گرفت این است که مار پلنگی که جزو مارهای غیر سمی طبقه بندی شده است دارای ترکیبات سمیت خفیف در ترشحات غده دوورنوی خود می‌باشد و همچنین می‌تواند باعث ایجاد علائم موضعی از قبیل ادم، اکیموز، هموراژ و نکروز خفیف گردد. بنابراین افراد گزیده شده توسط این مار باید تحت مراقبت‌های درمانی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

سنجش سمیت با آزمون MTT نشان داد اجزای موجود در براق مار پلنگی باعث ایجاد اثرات سمی در غلظت‌های بالا می‌گردد و مهار تکثیر سلولی احتمالا از طریق فرآیند القا نکروز ایجاد می‌شوند. از آن جایی که این مار غیر سمی در نظر گرفته می‌شوند در درمان و پزشکی توجه کمی به آن می‌شوند. ولی این مار دارای غده دوورنوی که هومولوگ غده زهر در افعی‌ها و کبراها است، می‌باشد و می‌تواند دارای برخی ترکیبات و آنزیم های توکسیک باشد. بنابراین افرادی که مورد گزش این مار قرار می‌گیرند باید تحت مراقبت های درمانی قرار گیرند.

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

Adukauskienė, D., Varanauskienė, E. and Adukauskaitė, A. 2011. Venomous snakebites. Medicina, 47(8): 461.

Calvete, J.J., Juárez, P. and Sanz, L. 2007. Snake venomics. Strategy and applications. Journal of mass spectrometry, 42(11): 1405-1414.

de Aquino Nery, M.D., Alves, N.T.Q., de Souza Alves, R., de Sousa, D.F., de Menezes, D.B., de Aquino Nery, E., de Aquino, H.D., Ribeiro, R.d.T.M. and Monteiro, H.S.A. 2014. The renal effects and initial characterization of venom from philodryas nattereri steindachner, 1870. Toxicology reports, 1: 812-819.

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

Glandt, D. 2010. Taschenlexikon der amphibien und reptilien europas: Alle arten von den kanarischen inseln bis zum ural. Quelle & Meyer.

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.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.

Kardong, K.V. 2002. Colubrid snakes and duvernoy's “venom” glands. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 21(1-2): 1-19.

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.

Lemoine, K., Girón, M.E., Aguilar, I., Navarrete, L.F. and Rodríguez-Acosta, A. 2004. Proteolytic, hemorrhagic, and neurotoxic activities caused by leptodeira annulata ashmeadii (serpentes: Colubridae) duvernoy's gland secretion. Wilderness & Environmental Medicine, 15(2): 82-89.

Lemoine, K. and Rodríguez-Acosta, A. 2003. Haemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by duvernoy's gland secretion from the false coral snake (erythrolamprus bizona jan 1863)(serpentes: Colubridae). Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, 13(5): 371-378.

Mackessy, S.P. and Saviola, A.J. 2016. Understanding biological roles of venoms among the caenophidia: The importance of rear-fanged snakes. Oxford University Press.

McCue, M.D. 2005. Enzyme activities and biological functions of snake venoms. Appl Herpetol, 2(2): 109-123.

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: 208-216.

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.

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.

Zare MirakAbadi, A. and Horrieh, P. 2020. The toxicity induction in human dermal fibroblasts (hdf) cells by saliva of echis carinatus sochureki. Journal of Research in Karyotic Cell &Tissue, 1(1): 1-8.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 2, 2021 Pages 21-27

Research Article

The effects of *Hemorrhois ravergieri* saliva on the viability of human dermal fibroblasts (HDF) cells

Fatemeh Kamali Rousta[1] and Abbas Zare Mirakabadi[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 11st January 2021 Revised 10th June 2021 Accepted 25th July 2021

Abstract

Introduction and Aim: Many colubrid snakes produce toxic oral secretions and some species have caused severe reactions in humans. In this research toxicity of Duvernoy´s gland secretion (DGS) from *Hemorrhois ravergieri* (aglyph) has been studied.

Methods: In this study, the effect of *Hemorrhois ravergieri* saliva on human dermal fibroblasts (HDF) cells growth was determined by the inverted microscope and MTT assay. The integrity of the cell membrane through LDH release was evaluated as well.

Results: The MTT assay and Neutral red assay showed a significant ($p<0.05$) cytotoxic effect of *Hemorrhois ravergieri* salvia on HDF cells growth after 24 h treatment. Additionally, *Hemorrhois ravergieri* venom caused a significant increase in LDH release ($p<0.05$). Numerous morphological abnormalities were observed in cells exposed to the DGS and showed loss of their common polygonal shape, appearing as several roughly rounded cells of variable size.

Conclusion: The *Hemorrhois ravergieri* saliva causes cytotoxic effects on HDF cells by the necrotic mechanism. This colubrid snake bite causes local symptoms, so this research suggests a more careful evaluation of the victims when considering the medical treatment to be adopted.

***Keywords*:** Cytotoxicity, MTT, LDH, *Hemorrhois ravergieri*, Human dermal fibroblasts (HDF)