

کشت سلول

سلول HL-60 کروی و دارای یک هسته درشت، مشخص و به صورت سوسپانسیون بود. زمان دو برابر شدن سلول ۲۴ ساعت بود و پس از رسیدن تعداد سلول‌ها به حد مناسب و رسیدن آنها به فاز لگاریتمی رشد، مورد استفاده قرار گرفت. سلول در محیط RPMI 1640 با مکمل ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی (FBS) و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، استرپتومایسین و ۲ میکرومول L-گلوتامین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد هوا نگهداری شد (۱۱).

اندازه‌گیری زنده بودن و تکثیر سلول با روش MTT (MTT Assay) و تعیین IC₅₀

ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲۵۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر (cell/ml) در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی ریخته شد و با ۱۰۰ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف ترکیب ICD-85 (۰/۴، ۰/۰۴، ۰/۰۰۴ تا ۰/۱۵ × ۴ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی گرم در میلی لیتر از MTT به هر چاهک اضافه و در تاریکی انکوبه گردید.

پودر MTT همان ترکیب (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)2,5 diphenyl tetrazolium bromide) در جریان آزمایش، آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده، نمک تترارولوم را می‌شکافد و به کریستال فورمازان بنفش غیر قابل حل تبدیل می‌کند. مقدار فورمازان تولیدی با تعداد سلول‌های زنده حاضر متناسب است (۱۲). این کریستال‌ها در DMSO یا ایزوپروپانول با HCL 0.1N حل می‌شود (اگر احیاناً سلول‌ها لیز نشدند، ۱۰ درصد تریتون X-100 به ایزوپروپانول اضافه می‌کنیم). سپس مقدار رنگ یا optical density (OD) به وسیله Elisa reader به صورت کمی در می‌آید. آزمایش MTT به هر دو مورد تعداد سلول‌های موجود و فعالیت میتوکندریایی هر سلول بستگی دارد (۱۱). در انتها IC₅₀ یا غلظتی از دارو که جذبی برابر نصف کنترل تولید می‌کند یا به بیانی دیگر غلظتی از دارو که ۵۰ درصد مهار در رشد سلول ایجاد می‌کند طبق فرمول زیر محاسبه شد.

کنترل OD / نمونه تصحیح شده (OD) - ۱۰۰ = درصد مهار (100 × تصحیح شده

از دست دادن غشا و اجزای خود از بین می‌رود ولی شرایط فیزیولوژیکی نرمال است. آپوپتوز توسط اندونوکلیازها انجام می‌گیرد (۳، ۴). یکی از خصوصیات مهم داروهای ضد سرطان اثر سیتوتوکسیک آن روی سلول‌های سرطانی است. تحقیقات مختلف دانشمندان حاکی از آن است که بعضی از عوامل سیتوتوکسیک در زهر جانور ان سمی مانند مار و عقرب وجود دارد (۵، ۶). Kikuchi و همکارانش در سال ۱۹۸۳-۱۹۸۲ ثابت کردند ترکیب استخراج شده از *Clavularia viridis* با نام کلاولون می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی خون (HL-60) که در فاز G1 قرار دارند را متوقف و رشد سلول‌هایی که در فاز S قرار دارند را کاهش دهد و اینها توسط سنجش سیتوتوکسیسته و آزمایش MTT و DNA ژل الکتروفورز و روش TUNEL به اثبات رسیده است. Lian - Kun Sun و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به وسیله سم عروس دریایی (*Chiropsalmus Quadrigatus toxins*) سلول‌های عصبی و قلبی - عروقی آپوپتوز را القا کنند (۷).

در سال ۱۹۶۷ ثابت شد زهر مار کبری روی سلول‌های سرطانی اثر سیتوتوکسیک دارد (۵). همچنین در سال ۱۹۹۶ مشخص شد زهر مار *Bothrops jararaca* و *Crotalus durissus terrificus* به طور مستقیم روی سلول‌های توموری تاثیر می‌گذارد (۸).

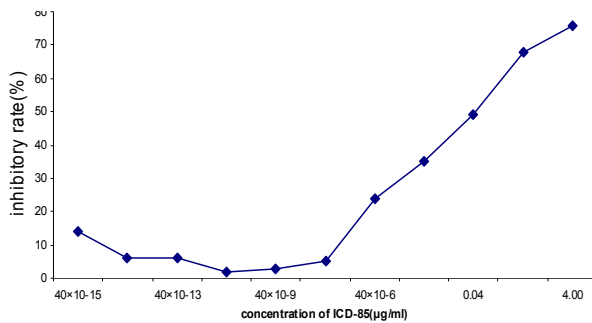
اثر سیتوتوکسیک و فعالیت کمی و کیفی و بیولوژیکی و دارویی ترکیب پپتیدی ICD-85 در سال ۱۳۸۷ روی سلول سرطان پستان MDA-MB-231 مورد مطالعه قرار گرفت (۹). همچنین در مطالعاتی که در شرایط *in vivo* صورت گرفت نیز اثر سرکوب تومور پستان در موش‌های آزمایشگاهی توسط ICD-85 تأیید شد (۱۰). اما با وجود این تحقیقات همچنان مکانیسم حقیقی ICD-85 تاکنون ناشناخته مانده است، لذا تحقیق حاضر جهت تشخیص مکانیسم اثر ترکیب بر روی سلول سرطان خون HL-60 است.

مواد و روشها

ترکیب ICD-85

بخش فعال ICD-85 ترکیبی از سه پپتید با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون است که از سم مار قهوه‌ای ایرانی (*Hemiscorpius Agkistrodon Halys*) و عقرب زرد (*lepturus*) در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی توسط نویسنده (عباس زارع میرک آبادی) در سال ۱۳۸۵ استخراج و تهیه گردید.

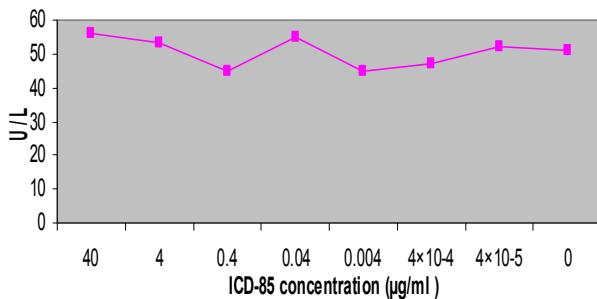
غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهارى رشد ۱۰۰ درصد مشاهده شد.



نمودار ۱- درصد مهارى غلظت‌های مختلف ICD-85 روی سلول HL-60

اثر ICD-85 در فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)
اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تحت غلظت‌های مختلف سم آشکار کرد که در سطح آنزیم LDH آزاد شده هیچ تغییر معنی‌داری نسبت به سلول کنترل ایجاد نشده است.

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌کنیم میانگین فعالیت آنزیم LDH در همه سلول‌هایی که در معرض ICD-85 قرار گرفتند مانند نمونه کنترل $52 \pm 3/50$ U/L اندازه‌گیری شد و هیچ تغییر معنی‌داری در آنها مشاهده نشد. سطح LDH تغییر نیافته می‌تواند به عنوان اندیکاتوری باشد که مرگ سلولی در درده سلولی HL-60 مربوط به شوک نکروتیک نیست.



نمودار ۲- میزان LDH آزاد شده از سلول‌های در معرض غلظت‌های مختلف ICD-85

اثر ICD-85 روی مرفولوژی سلول

برای تعیین اثرات مرفولوژیکی ICD-85، گروهی از سلول‌هایی که ۲۴ ساعت در معرض سم قرار گرفتند، زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده و با گروه کنترل مقایسه گردید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در سلول‌هایی که در معرض سم قرار گرفته‌اند، کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم، افزایش واکوئول‌های سیتوپلاسمی، تراکم مواد هسته‌ای، رقت شبکه

اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز آزاد شده

سنجش کمی سیتوتوکسیسیته بر اساس آزادسازی LDH استوار است که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ICD-85 (۴۰-۴-۰/۰۴-۰/۰۰۰۰۰۰۰۰ تا 4×10^{-15} میکروگرم در میلی‌لیتر) محاسبه شد.

لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوزولی حل شدنی است که در اغلب سلول‌های یوکاریوت حضور دارد و از غشای پلاسمایی سلول‌های مرده و آسیب دیده (نکروتیک) آزاد می‌شود. افزایش فعالیت LDH در سوپرناتانت متناسب با تعداد سلول‌های لیز شده است. LDH تبدیل پیرووات به لاکتات را کاتالیز می‌کند و در جریان آن NADH به NAD^+ اکسید می‌شود. به دلیل آنکه سرعت کاهش NADH متناسب با فعالیت LDH می‌باشد، تشکیل NADH در واکنش جفت شونده در جایی که نمک تترازولیوم INT به محصول فورمازان قرمز تبدیل می‌شود، به روش کینتیک اندازه‌گیری می‌گردد (۱۳).



بررسی تغییرات سلولی در زیر میکروسکوپ الکترونی

نمونه‌های حاوی سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف ICD-85 انکوبه شد و به وسیله سانتریفوژ پلت و با گلوئوتارالدئید ۲/۵ درصد و پارافمالدئید ۲ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار فیکس گردید. سپس مجدداً با اسمیوم تتروکسید ۱ درصد فیکس شد و پس از عمل‌آوری و مقطع‌گیری برای مشاهده زیر میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

یافته‌ها

اثر ICD-85 روی رشد و تکثیر سلول‌های HL-60

اثر ICD-85 روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HL-60 به وسیله آزمایش MTT تعیین شد. ICD-85 به طور معنی‌داری رشد سلول‌های سرطانی HL-60 را در غلظت‌های کم مهار کرد و پس از سه بار تکرار این آزمایش، مقدار IC_{50} پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون 0.15 ± 0.04 میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار پایین IC_{50} نشان دهنده توانایی بالای ضد رشد و تکثیر ICD-85 در سلول سرطانی HL-60 می‌باشد.

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در غلظت 10^{-15} از $40 \times$ ترکیب ICD-85 درصد مهارى رشد ۱۴ درصد بود. از این غلظت تا غلظت 40×10^{-11} به دلایل نامشخص به تدریج درصد مهارى رشد کاهش یافت و به حدود صفر رسید و پس از آن مجدداً درصد مهارى افزایش یافت، به طوری که در

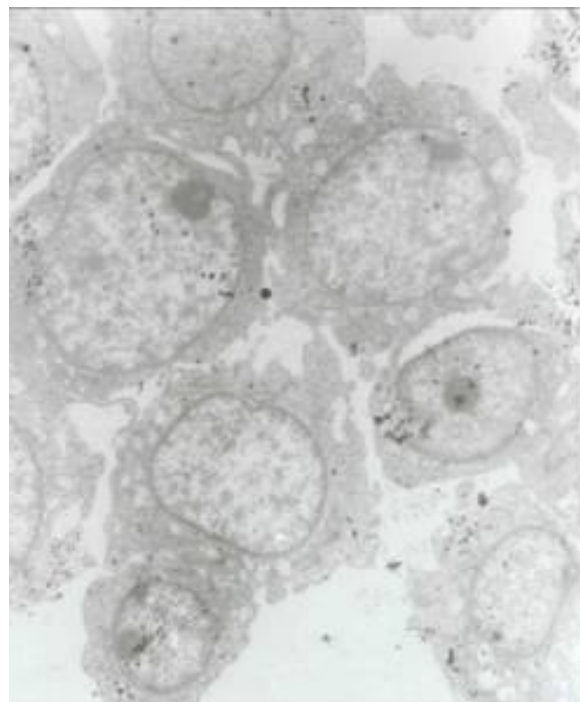
بحث

گزارشات نشان می‌دهند که زهر مار با وجود اجزا و ترکیبات مختلف خود، پتانسیل قوی در درمان بیماری‌های انسانی دارد (۱۴). تعادل بین اثرات دارویی و سمی یک ترکیب، پارامتر مهمی است که توانایی کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند. بنابراین داروهای جدید باید با یک طراحی خوب مورد ارزیابی قرار گیرند تا ویژگی‌های سمی و دارویی آنها به درستی مشخص شود (۱۵).

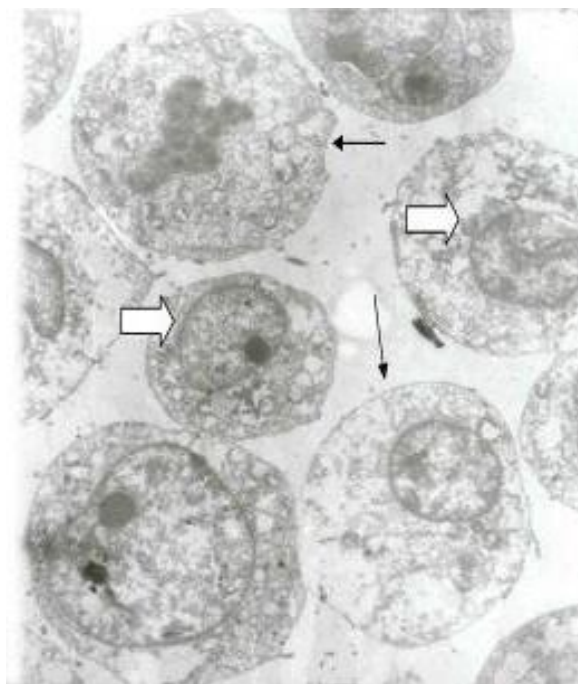
در تحقیق حاضر از روش MTT جهت بررسی سمیت سلولی استفاده شد. تکنیک MTT به وسیله Mosmann به عنوان روشی سریع و حساس بر اساس سنجش کالریمتریک برای بررسی سیتوتوکسیسیته داروهای ضد سرطان، در محیط *In vitro* ارائه شد. این روش بسیار سریع، دقیق و مطمئن در بررسی و تعیین درصد سلول‌های زنده در آزمایش‌های مختلف می‌باشد و از طرفی توسط این روش می‌توان به مقاومت دارویی ایجاد شده در افراد سرطانی بعد از شیمی درمانی پی برد و از تجویز بی‌مورد داروهای سیتوتوکسیک که اثرات جانبی زیادی دارند، جلوگیری کرد (۱۶، ۱۷). به وسیله اندازه‌گیری سیتوتوکسیسیته (Cytotoxicity assay) می‌توان سلول‌ها و اجسام آپوتوتیکی که در غشای پلاسمایی سالم باقی می‌مانند را مشخص کرد. این تست همچنین جهت تفکیک نکروز و آپوتوز به کار می‌رود و در این تست سلولی زنده فرض می‌شود که دارای چرخه تنفسی میتوکندریایی و غشای میتوکندریایی سالم باشد (۹).

در تحقیق حاضر ابتدا توسط آزمایش MTT اثر سیتوتوکسیک ICD-85 تأیید شد. در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ICD-85 ۱۰۰ درصد مهار رشد و در غلظت 4×10^{-11} میکروگرم در میلی‌لیتر از ICD-85 درصد مهار رشد مانند سلول کنترل و صفر درصد مشاهده شد. IC_{50} (غلظتی از دارو که جذبی برابر نصف کنترل تولید می‌کند یا به بیانی دیگر غلظتی از دارو که ۵۰ درصد مهار در رشد سلول القا می‌کند) برابر با $0/04$ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. وقتی تعداد سلول‌ها در هر چاهک کمتر از ۲۵۰۰۰ سلول بود، پس از ریختن ایزوپروپانول واکنش‌هایی که منجر به تشکیل رنگ بنفش می‌شد به طور کامل انجام نمی‌گرفت و تفاوت رنگ محسوسی بین چاهک‌ها دیده نمی‌شد و لذا، OD قرائت شده توسط دستگاه Elisa reader قابل قضاوت گذاشته شود. بنابراین ما از تعداد ۲۵۰۰۰ سلول در هر چاهک استفاده کردیم. نکته‌ای که در این تست رعایت شد این بود که پس از

آندوپلاسمی، کاهش کانال‌های سیتوپلاسمی در مقایسه با سلول کنترل اتفاق افتاده است ولی غشا سالم است. بنابراین این نتایج به این مطلب اشاره می‌کند که ICD-85 قادر است تغییرات مرفولوژیکی مشخص آپوتوتیک را در سلول HL-60 القا کند.



الف



ب

شکل ۱- نمای میکروسکوپی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ الکترونی. الف- سلول‌های کنترل که در معرض سم قرار نگرفتند؛ ب- سلول‌هایی که در معرض سم قرار گرفتند.

دوزهای زیاد باعث نکروز می‌شود. بنابراین علاوه بر غلظت سم، فاکتورهای مختلفی تعیین می‌کند که سلول به سمت نکروز رود یا آپوپتوز. برخی از این فاکتورها عبارتند از: توانایی سلول‌ها برای تحمل کردن و پذیرفتن پیچیدگی‌های موضعی غشا و موقعیت متابولیکی سلول‌ها تحت تاثیر پارامترهایی مثل غلظت ATP (۱۹).

افزایش آگاهی ما در رابطه با پیچیدگی مرگ سلولی توسط شیمی درمانی می‌تواند چشم‌اندازی برای برنامه‌ریزی‌های آینده درمانی باشد که در آن ممکن است مواد سیتوتوکسیک را همراه با مواد بیولوژیک جهت حمله به مولکول خاص هدف به کار برد (۶).

شاید بتوان در آینده از ترکیب پپتیدی ICD-85 در درمان بیماران مبتلا به لوسمی استفاده کرد. داروی ضد سرطان ایده‌آل دارویی است که قادر باشد به طور اختصاصی سلول سرطانی را بکشد، ولی متاسفانه اغلب داروهای ضد سرطان بر خلاف داروهای ضد میکروبی که اثرات سمی کمتری بر سلول‌های سالم دارند، سلول‌های در حال رشد بدن را نیز می‌کشند. ولی چون زمان دو برابر شدن سلول سالم کوتاه‌تر است و زودتر تقسیم می‌شود، قادر است جای سلول‌های سرطانی را پر کنند. درمان اساسی سرطان وقتی اتفاق می‌افتد که آخرین سلول سرطانی موجود قطعاً نابود شود. بنابر این درمان سرطان با یک دوره درمان میسر نمی‌شود و نیاز به دوره‌های متعدد شیمی درمانی دارد. امروزه تاکید پزشکان بر شیمی درمانی توام و استفاده از ترکیبات سیتوتوکسیک است تا حداکثر مرگ سلولی ایجاد گردد (۶).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر محسن لطفی مدیریت کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و مساعدت ایشان در انجام مراحل تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

افزودن ترکیب ICD-85 به سلول و گذشت ۲۴ ساعت به وسیله سانتریفیوژ دارو خارج شد و به سلول‌ها به مدت ۴ ساعت اجازه تکثیر داده شد تا بین سلول‌های زنده همراه با قدرت تکثیر و سلول‌های زنده بدون قدرت تکثیر تمایز قائل شویم.

نتایج اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز سلول‌ها، پس از اینکه ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف سم قرار گرفتند نشان داد که هیچ افزایش معنی‌داری در میزان LDH نسبت به سلول کنترل وجود ندارد. LDH در شرایطی آزاد می‌شود که غشای سلول پاره و تخریب شود و آزاد شدن LDH و آسیب غشای پلاسمایی از اختصاصات سلول‌های نکروتیک است (۱۳، ۱۸).

سنجش میزان نشت LDH بر اساس آزاد شدن آنزیم به داخل محیط سلول پس از آسیب به غشای سلول می‌باشد، در حالی که سنجش MTT عمدتاً بر اساس تغییر آنزیمی در میتوکندری است. Karthikeyan و همکارانش اثر سیتوتوکسیک سم مار را به وسیله سنجش میزان LDH در سلول‌های Hep2 و Hela پس از اینکه در معرض ۴/۱۸ میکروگرم سم قرار گرفتند محاسبه کردند و متوجه شدند که در میزان LDH کاهش ۱/۵ درصدی وجود دارد. کاهش LDH آزاد شده نشان داد که سلول‌ها عملکرد طبیعی دارند، یعنی غشای پلاسمایی سالم است و مکانیسم عمل سم بر علیه سلول سرطانی به صورت نکروز نیست (۱۸). از این رو سطح LDH تغییر نیافته، می‌تواند به عنوان اندیکاتور باشد که مرگ سلولی در رده سلولی HL-60 مربوط به شوک نکروتیک نیست.

اگرچه این با مطالعات قبلی که افزایش سطح LDH را وقتی سلول‌های MDA-MB231 در معرض ICD-85 قرار گرفتند، مشاهده شده بود، مغایرت داشت اما شاید علت تنوع در نتایج، تفاوت در رده‌های سلولی، تفاوت در مدت زمانی که سلول در مجاورت سم قرار می‌گیرد و غلظت‌های مختلف سم مورد استفاده باشد. از طرف دیگر ممکن است افزایش LDH پس از مدت طولانی‌تری در سلول آپوپتوتیک اتفاق بیفتد (۳). احتمالاً ترکیب ICD-85 در دوزهای کم باعث آپوپتوز و در

REFERENCES

1. Sant Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CGV, Fuly AL, et al. BjuusuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from Bothrops jararacussu snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2008; 151: 443-54.
2. Strydom DJ. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Eur J Biochem* 1976; 69: 169-76.
3. Barry MA, Eastman A. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca²⁺ and pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 782-89.
4. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells* 1999; 17: 306-13.

5. Cancer Control Office, Iranian Ministry of Health. Iranian Annual Cancer Registration Report. Ministry of Health publication; 2005. [In Persian]
6. Elahi M, editor. Chemotherapy in oncology. Tehran: Hamangan publications; 2005. [In Persian]
7. Sun L, Yoshii Y, Hyodo A, Tsurushima H, Saito A, Harakuni T, et al. Apoptosis induced by box jellyfish (*Chiropsalmus Quadrigatus*) toxin in glioma and vascular endothelial cell lines. *Toxicon*. 2002; 40: 441-46.
8. Bosmans F, Martin-Eauclaire MF, Tytgat J. The depressant scorpion neurotoxin LqqIT2 selectively modulates the insect voltage-gated sodium channel. *Toxicon*. 2005; 45: 501-507.
9. Zare Mirakabadi A, Mahdavi S, Koohi MK, Taghavian M. Cytotoxic Effect of ICD-85 (Venom-Derived Peptides) on MDAMB-231 Cell line. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2008; 14: 619-27.
10. Koohi M, Zare Mirakabadi A, Moharrami M, Hablolvarid MH. Anti-cancer effect of ICD-85 (Venom-derived peptides) on MDAMB231 cell line (*in vitro*) and experimental mice with breast cancer (*in vivo*). *Int J Vet Res* 2009; 3: 49-54.
11. Freshney RI, editor. Culture of animal cells: a manual of Nasic technique. 5th ed. New York: Willey – Liss; 2005
12. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 1989; 49: 4435-40.
13. Deker T, Lohmann- Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 15: 61-69.
14. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63: 3030-41.
15. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* 2007; 49: 142-58.
16. Abondanza TS, Olivera CR, Barbosa CM, Pereira FE, Cunha RL, Caires AC, et al. BCL-2 expression and apoptosis induction in human HL-60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium compound RT-04. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2540-45.
17. Wan H, Williams RL, Doherty PJ, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mat Sci* 1994; 154-59.
18. Karthikeyan R, Karthigayan S, Sri Balasubashini M, Vijayalakshmi S, Somasundaram ST, Balasubramanian T. Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by *Hydrophis spiralis* Sea Snake venom. *Int J Cancer Res* 2007; 4: 186-90.
19. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997; 185: 1481-86.