Anti-proliferative and Apoptosis Induction effect of Iranian Snake Venom (*Vipera Raddei Kurdistanica*) on Human Breast Cancer (MCF-7) and Normal Breast (MCF-10a) Cell Lines

Parsa Amirian[1], Kaveh Shahveisi[2], Mona Pazhouhi[3], Cyrus jalili[4]

1 Student, Student Research Committee of Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7517-0739

2 Assistant Professor, Sleep Disorders Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6779-869X

3 Researcher, Department of Anatomical Sciences, Medical School, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7076-7539

4 Professor, Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, Corresponding author,Tel:09188317220, Mail: cjalili@yahoo.com. ORCID ID:0000-0002-0999-08434

ABSTRACT

Background and Aim: Breast cancer is the second leading cause of death among women worldwide. Despite recent advances in cancer treatment, this disease remains one of the leading causes of death. Snake venom is a mixture of various molecules such as carbohydrates, nucleosides, amino acids, lipids, proteins and peptides. Previous studies have shown that the venom of some snakes have anti-cancer effects on human cell lines. In the present study, the effect of *Vipera raddei kurdistanica* venom on breast cell lines was investigated.

Materials and Methods: The effect of increasing concentrations of snake venom on breast cells viability was investigated using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide assay and lactate dehydrogenase measurement. Apoptotic cell death was evaluated by fluorescent dye staining and DNA fragmentation assay. Changes in the expression levels of some apoptotic-related genes were investigated by using real time PCR. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results: After 24, 48, 72 and 96 hours treatment, cell viability was significantly decreased in a time and dose dependent manner ($P < 0.05$). The effect of venom was significantly less on normal breast cells than on cancer cells ($P < 0.05$). Apoptotic cell death was significantly increased ($P < 0.05$) in a dose dependent manner. Results of real time PCR confirmed the increase in apoptotic cell death due to venom treatment.

Conclusion: These data indicated that snake venom of *Vipera raddei kurdistanica* had anti-cancer properties through apoptosis cell death induction specifically *in breast cancer cells*.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer, Cell culture, *Vipera raddei kurdistanica*, Snake venom

Received: Oct 28, 2019 **Accepted:** Oct 3, 2020

How to cite the article: Parsa Amirian, Kaveh Shahveisi, Mona Pazhouhi, Cyrus jalili. Anti-proliferative and Apoptosis Induction effect of Iranian Snake Venom (*Vipera Raddei Kurdistanica*) on Human Breast Cancer (MCF-7) and Normal Breast (MCF-10a) Cell Lines. SJKU 2021;26(7):1-10.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر ضد تکثیری و القا کننده آپوپتوز زهر مار ایرانی (*Vipera raddei kurdistanica*) بر روی رده های سلولی سرطانی (MCF-7) و نرمال (MCF-10a) پستان انسان

پارسا امیریان[۱]، کاوه شاه ویسی[۲]، مونا پژوهی[۳]، ، سیروس جلیلی[۴]

[۱] دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد اکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۷۵۱۷-۰۷۳۹

[۲] استادیار، مرکز اختلالات خواب، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد اکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۶۷۷۹-۸۶۹X

[۳]پژوهشیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۰۷۶-۷۵۳۹

[۴] استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۰۹۷-۷۹۷۴

نویسنده مسئول: دکتر سیروس جلیلی

تلفن: ۰۹۱۲۸۳۱۷۲۲۰ فکس: ۰۸۳۳۴۲۷۶۴۷۷

ایمیل: cjalili@yahoo.com

چکیده

هدف و زمینه: سرطان پستان دومین علت مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. با وجود پیشرفت های اخیر در زمینه درمان سرطان، این بیماری یکی از علل مرگ و میر باقی مانده است. زهر مار ترکیبی از مولکول های مختلف مانند کربوهیدرات ها، نوکلئوزیدها، اسیدهای آمینه، چربی ها، پروتئین ها و پپتیدها است. مطالعات قبلی نشان می دهد که زهر برخی از مارها اثرات ضد سرطانی را بر روی رده های سلولی انسان نشان داده اند. در مطالعه حاضر، تأثیر زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* بر رده های سلولی پستان بررسی شده است.

مواد و روش ها: تأثیر غلظت های افزاینده زهر مار بر زنده ماندن سلول های پستان با استفاده از سنجش 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide و اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز بررسی شد. مرگ سلولی آپوپتوز با رنگ آمیزی فلورسنت و سنجش قطعه قطعه شدن DNA ارزیابی شد. تغییر سطح بیان دو ژن مرتبط با مسیر مرگ آپوپتوز با استفاده از PCR Real time بررسی شد. داده ها به روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه و سپس آزمون توکی آنالیز شدند و سطح معنی دار بودن تفاوت ها، $P< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها: پس از تیمار ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ ساعت، میزان زنده ماندن سلول ها بطور معنی دار وابسته به زمان و دوز کاهش یافت ($P< ۰/۰۵$). تاثیر زهر بر روی سلول های طبیعی پستان نسبت به سلول های سرطانی بطور معنی داری کمتر بود ($P<۰/۰۵$) . مرگ سلولی آپوپتوز به طور قابل توجهی بصورت وابسته به دوز زهر افزایش یافته بود ($P<۰/۰۵$) . داده های Real time PCR افزایش آپوپتوز سلول تحت درمان با زهر را تأیید کرد.

نتیجه گیری: این داده ها حاکی از آن است که زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* با القای اختصاصی مرگ سلولی آپوپتوز در سلول های سرطانی پستان، خاصیت ضد سرطانی را نشان می دهد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، سرطان پستان، کشت سلول، *Vipera raddei kurdistanica*، زهر مار

وصول مقاله:۹۸/۸/۶ اصلاحیه نهایی:۹۹/۴/۱۶ پذیرش:۹۹/۷/۱۲

مقدمه

سرطان دومین تهدید عمده برای سلامت عمومی بعد از بیماری های قلبی عروقی است (۱). سرطان پستان، شایعترین سرطان در بین زنان، ۲۹٪ از کل سرطان های تشخیص داده شده و ۱۵٪ مرگ و میر ناشی از سرطان را تشکیل می دهد (۲). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی افزایش چشمگیری در میزان شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان پستان در آینده پیش بینی می شود (۳). استراتژی فعلی مورد استفاده در معالجه سرطان پستان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و هدفمند درمانی است (۴). اما بیشتر این روش ها با هدف قرار دادن غیر اختصاصی سلول ها و آسیب رساندن به سلول های سالم عوارض جانبی نامطلوبی را ایجاد می کنند (۵). علاوه بر این، توسعه مقاومت در برابر دارو یکی از مهمترین موانع درمان موثر سرطان است (۶).

ماده ای که توسط مار در هنگام شکار یا دفاع در برابر تهدیدات ترشح می شود (زهر مار)، پتانسیل سمیت بالایی دارد که آن را برای تحقیقات ضد سرطان جذاب می کند. زهر ها ترکیبی از آنزیم ها، پپتیدها، کربوهیدرات ها، مواد معدنی و پروتئین ها با جرم مولکولی کم و با فعالیت های شیمیایی و بیولوژیکی خاص می باشند. برخی از مطالعات پتانسیل عالی زهر مارها را در معالجه سرطان نشان می دهند. فسفولیپاز A2، L-آمینو اسید اکسیداز (LAAO)، متالوپروتئیناز، ***دیس اینتگرین*** (disintegrin) و سایر پپتیدهای موجود در زهر مار دارای سمیت نسبت به سلول های سرطانی هستند (۷). *Vipera raddei kurdistanica* (*Montivipera raddei*) یک گونه مار سمی است که در ارمنستان، ترکیه، ایران، جمهوری آذربایجان و عراق یافت می شود (۸، ۹). هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص ضد سرطان زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* بر روی سلول های پستان است.

مواد و روش ها

کشت سلول:

برای این مطالعه تجربی که در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام شده است، رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و رده سلولی اپیتلیال پستان طبیعی انسان (MCF-10a) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. سلول های رده پستان در محیط RPMI-1640 با ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین به صورت تک لایه در فلاسک های کشت سلول رشد داده شدند. سلول ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد مجهز به ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ نگهداری و پس از رسیدن به تراکم مناسب توسط محلول ۰/۲۵٪ تریپسین/EDTA از کف فلاسک جدا و در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس با هموسایتومتر شمارش شدند. حدود $۱۰^۴$ × ۱/۵ و $۱۰^۴$ × ۷ عدد سلول به ازای هر چاهک به ترتیب در پلیت های ۹۶ و ۲۴ چاهکی کشت داده شد. زهر لیوفیلیزه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی تهیه و در محیط کشت فاقد سرم حل شد. سلول ها با غلظت های ۰/۶۲، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر زهر تیمار شدند. تمام آزمایشات به صورت سه گانه انجام و حداقل سه بار به طور مستقل تکرار شدند.

زنده ماندن و سنجش سمیت سلولی:

پس از چسبیدن سلول ها به بستر پلیت، چاهک ها با محیط کشت فاقد سرم و حاوی غلظت های مختلف زهر به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوبه شدند. سنجش MTT همانطور که قبلاً شرح داده شده است، انجام شد (۱۰). به طور مختصر، محیط کشت چاهک ها حذف و ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت، محصول تولید شده در ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO حل شد و چگالی نوری (OD) هر نمونه با استفاده از یک دستگاه خواننده

ELISA در ۵۷۰ و ۶۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. سمیت زهر با استفاده از روش اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در محیط کشت سلولی تعیین شد. پس از تیمار با زهر، ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت هر چاهک به پلیت جدید منتقل شد. فعالیت LDH با استفاده از کیت تشخیص سمیت (Roche Chemical) مطابق دستورالعمل تولیدکننده اندازه گیری شد (۱۱).

سنجش آپوپتوز:

درصد آپوپتوز با روش TUNEL و استفاده از کیت تشخیص مرگ سلول an In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche Diagnostics; Germany) و طبق دستورالعمل سازنده اندازه گیری شد. بطور مختصر بعد از تیمار به مدت ۴۸ ساعت با غلظت های ذکر شده از زهر در یک پلیت ۹۶ چاهک، سلول ها استفاده از پارافرمالید ۴٪ به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و با استفاده از محلول Triton X-100 نفوذپذیر شدند. سپس با ۵۰ میکرولیتر از محلول TUNEL در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. برای رنگ آمیزی افتراقی سلول ها محلول PI (propidium iodide) به مدت ۴ دقیقه اضافه شد. سرانجام، سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام مراحل ذکر شده در شرایط تاریکی انجام شد.

در صد قطعه قطعه DNA پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نیز با استفاده از رنگ آمیزی دی فنیل آمین اندازه گیری شد. بطور مختصر، بعد از تیمار، تعداد $10^6 \times 5$ عدد سلول در ۱ میلی لیتر از بافر Tris-tris(hydroxymethyl)methylamino]propanesulfonic acid - Ethylenediaminetetraacetic acid به حالت سوسپانسیون درآمدند و در ۲۰،۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس کروماتین دست نخورده (رسوب) از DNA آسیب دیده (سوپرناتانت) جدا شد. سوپرناتانت ها به لوله های جدید (نمونه A) منتقل شدند و رسوب ها در ۱ میلی لیتر بافر Tris-TAPS-EDTA به اضافه ۱ میلی لیتر ۲۵٪ تری کلرو استیک اسید به حالت تعلیق درآمد و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس نمونه ها دوباره سانتریفیوژ شدند. به منظور برش DNA، ۱۶۰ میلی لیتر از ۵ درصد تری کلرو استیک به هر رسوب اضافه شد. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد گرم شدند، سپس ۳۲۰ میکرولیتر از محلول تازه تولید دی فنیل آمین به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (نمونه B). سرانجام، جذب نمونه های A و B در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

Real-time PCR

تأثیر غلظت های مختلف زهر بر میزان بیان BCL2 Associated X (BAX) (تنظیم کننده القا آپوپتوز) و BCL-2 (تنظیم کننده ضد آپوپتوز) توسط Real PCR time سنجیده شد. به طور مختصر RNA کل از سلول ها توسط کیت جداسازی RNA کل DENAzist (تهران، ایران) استخراج شد و سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز Vivantis cDNA (مالزی) انجام شد. Real time PCR با استفاده از SYBR Premix Ex Taq شرکت Takara Bio (ژاپن) انجام شد. گلیسیرالدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر بود:

BAX Forward: 5´-CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAACT-3´
Reverse: 5´-CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC-3´
BCL-2 Forward: 5´-TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG-3´
Reverse: 5´-GGTGCCGGTTCAGGTACTCAGTCA-3´

GAPDH Forward: 5´-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3´
Reverse: 5´-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3´

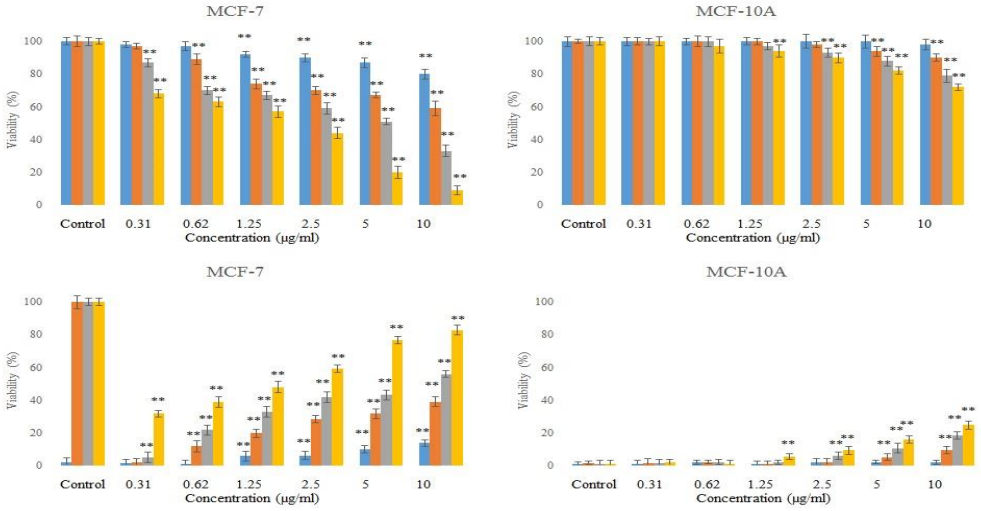
تحلیل آماری:

تمام داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه آزمایش مستقل ارائه شده است. ارزیابی آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد و اختلاف آماری در سطح $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی دار تلقی شد.

یافته ها

زنده ماندن سلول ها:

اثر سمیت سلولی زهر با استفاده از روش MTT و LDH (شکل ۱) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت مهاری نیمه (IC_{50}) زهر با استفاده از نرم افزار (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) برآورد شد. مقادیر IC_{50} برای تیمارهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ۱۸/۵۳، ۸/۹۶، ۲/۱۴ و ۰/۹۸ میکروگرم بر میلی لیتر برای MCF-7 و ۲۴۳/۴۴، ۲۴۰/۱۳، ۱۱۱/۶۷ و ۳۷/۰۹ میکروگرم بر میلی لیتر برای MCF-10a بود. نتایج نشان داد که رده های سلولی به صورت وابسته به دوز و زمان به زهر پاسخ دادند. سلول های سرطانی MCF-7، با IC_{50} پایین تر به زهر حساس تر هستند. بنابراین، زهر سمیت سلولی انتخابی با مقادیر پایین تر IC_{50} را برای سلول های سرطانی به نشان داده است. فعالیت ضد تکثیر زهر همچنین با استفاده از روش اندازه گیری LDH ارزیابی شد. این روش یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول را نشان می دهد. فعالیت LDH در محیط کشت سلولی با افزایش غلظت زهر افزایش یافته است. بنابراین، سمیت سلولی زهر با آسیب غشای پلاسما همراه بوده است.



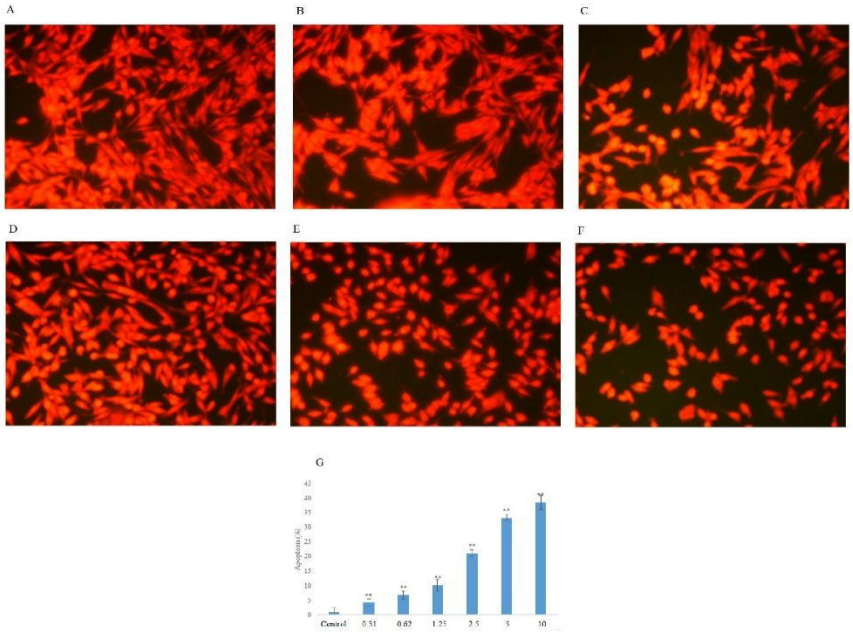
شکل ۱ تأثیر زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* بر روی سلول های MCF-7 و MCF-10a. سلول ها با غلظت مشخص شده زهر به مدت ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. زنده ماندن سلول ها با استفاده از روش MTT همانطور که در بخش روش ها شرح داده شد، تعیین شد. سمیت سلولی زهر با اندازه گیری فعالیت LDH تعیین شد. سلول های کنترل با مقدار معادل محیط کشت تیمار شدند. داده ها بصورت درصد نسبت به سلول های کنترل به عنوان میانگین ± SD بیان شدند. (نشان دهنده $P < ۰/۰۱$ می باشد)**

آپوپتوز:

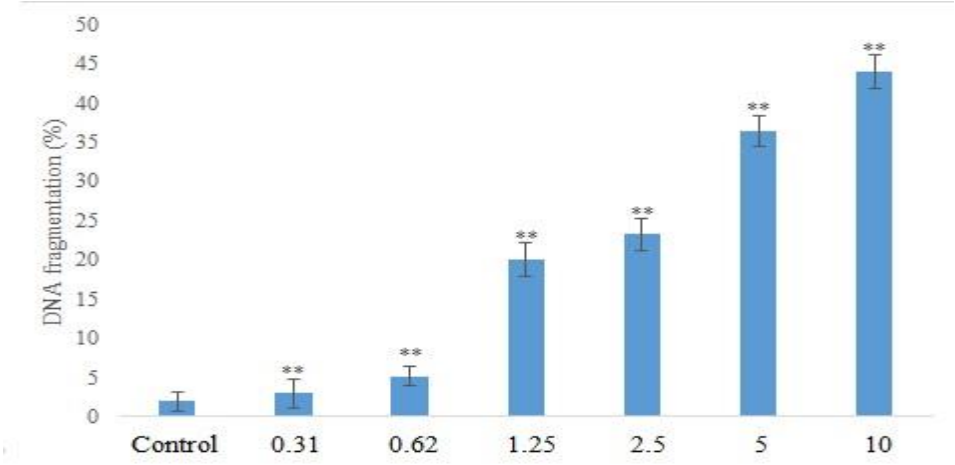
القا آپوپتوز بوسیله زهر با استفاده از روش Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر ضد تکثیری و سمیت از طریق مکانیزم های مرتبط با آپوپتوز رخ می دهد. آپوپتوز ناشی از زهر به صورت وابسته به غلظت (شکل ۲) می باشد. همچنین، درصد قطعه قطعه شدن DNA در سلول ها با استفاده از روش طیف سنجی محا سبه شد. همانطور که در نمودار شکل ۳ مشاهده می شود، پس از تیمار با غلظت های ۰، ۰/۶۲، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت، تکه تکه شدن DNA به میزان ۰/۹۲، ۲/۷۱، ۱۴/۹، ۲۰/۲۴، ۳۴/۳۳ و ۴۹/۱۸ درصد افزایش یافته است.

بیان ژن های مرتبط به مسیر آپوپتوز

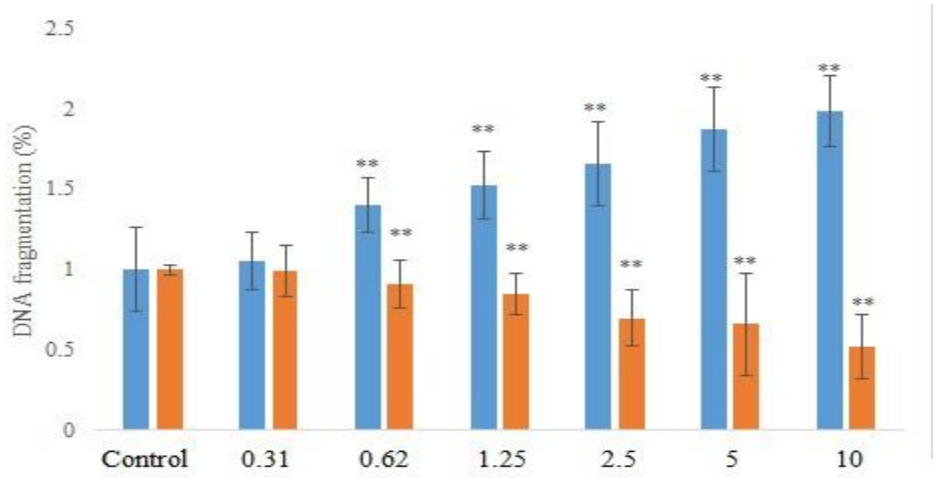
بیان دو ژن مرتبط با مسیر آپوپتوز با استفاده از Real PCR time ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، نتایج حاکی از کاهش بیان B-cell lymphoma 2 و افزایش بیان BCL2 Associated X پس از ۴۸ ساعت تیمار است. در گروه کنترل، ۰/۶۲ ، ۱/۲۵ ، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از غلظت زهر مار نسبت BAX به BCL-2 به میزان ۱/۰۱، ۱/۶۴، ۲/۲۱، ۳/۲۶ ۷/۰۳ بود. بنابراین، نسبت BAX / BCL-2 به طور قابل توجهی افزایش یافته است.



شکل ۲ اثر زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* بر مرگ سلولی آپوپتوز در سلول های MCF-7 . الف) گروه کنترل؛ ب) در حضور ۰/۶۲؛ ج) ۱/۲۵؛ د) ۲/۵؛ ه) ۵؛ f) ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر زهر به مدت ۴۸ ساعت؛ و g) ستون ها میانگین درصد سلول های آپوپتوزی از سه آزمایش مستقل است که به صورت سه گانه انجام شدند. سلول های کنترل با محیط بدون FBS تحت تیمار قرار گرفتند. مقادیر P با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تعیین شد. (نشان دهنده P < ۰/۰۱ می باشد)**



شکل ۳ تأثیر زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* بر یکپارچگی DNA سلول های سرطانی پستان. سلول ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سلول های کنترل با مقدار معادل محیط کشت تیمار شدند. داده ها بصورت درصد سلول های کنترل به عنوان میانگین مقادیر ±SD بیان شدند. (نشان دهنده P < ۰/۰۱ می باشد)**



شکل ۴ بیان نسبی دو ژن آپوپتوزی در سلول های سرطان پستان پس از تیمار با زهر مار *Vipera raddei kurdistanica*. (نشان دهنده P < ۰/۰۱ می باشد)**

بحث

نتایج مطالعه حا ضر ن شان داد که زهر مار *Vipera raddei kurdistanica* دارای اثر سمیت در رده سلولی سرطان پستان به صورت وابسته به دوز و زمان ا ست. مقادیر IC_{50} به دست آمده نشان داد که سلول های MCF-7 نسبت به فعالیت زهر حساس هستند، در حالی که سلول های طبیعی پستان انسان، حساسیت کمتری به زهر دارند. کشف عوامل جدید برای در مان سر طان یکی از مهمترین ا هداف در صنعت داروسازی است. اکثر عوامل شیمی درمانی بین سلول های طبیعی و سرطانی تمایز قائل نمی شوند و بطور کلی سلول های

تکثیر شـونده را از بین می برند و باعث عوارض جانبی جدی مانند سـرکوب مغز اسـتخوان می شـوند (۱۲). بنابراین، معرفی عوامل ضـد سـرطان که قادر به تفکیک سـلول های طبیعی و سرطانی باشد، چالش بزرگی در طراحی و کشف عوامل جدید شیمی درمانی است.

نتایج آز مایش MTT و سـنجش LDH فعالیت ضـد نئوپلاستیک بیشتر زهر در رده سلولی سرطان را در مقایسه با سلول های طبیعی پستان نشان داد.

همانطور که قبلاً ذکر شـد، زهر مار مخلوط پیچیده ای از پروتئین ها و پپتیدها است که حدود ٪۹۵ از وزن خشک آن را تشکیل می دهند (۱۳). اولین شواهد از خواص ضد سرطانی زهر مار در دهه ۱۹۳۰ گزارش شـد. از آن زمان تا کنون، مطالعات جامعی بر روی اثرات ضـد سـرطان زهر مارها انجام شده است. ترکیبات دارای فعالیت ضد توموری جدا شده از زهر مارها شامل عوامل ضد آنژیوژنز و القاء کننده آپوپتوز می باشد (۸).

Disintegrinهـا (از جـمـلـه leucurigin, contortrostatin, obtustatin, adinbitor, salmosin) خانواده ای از پروتئین های بازدارنده اینتگرین با فعالیت ضد آنژیوژنز می باشند که از زهر مارهای مختلف جدا شده اند. leucurigin فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی را در برابر تومور Ehrlich در موش ها نشان داده است. همچنین اثر ضـد آنژیوژنز آن با اسـتفاده از مدل کاشـت اسـفنج در موش بررسـی و تأیید شـده اسـت. Contortrostatin که از زهر مار Agkistrodon Contortrix Contortrix جدا شده است، فعالیت ضد آنژیوژنز در برابر تومور اولیه سرطان پستان انسان القا شده در موش ها را نشان داده است. Obtustatin که از زهر مار Vipera lebetina obtusa جدا شده است، اندازه تومور در مدل موشی سرطان ریه را کاهش داده و مهار فعالیت آنژیوژنز را نشان میدهد. Adinbitor جدا شده از زهر مار Agkistrodon halys brevicaudus stejneger، تکثیر ناشـی از basic fibroblast growth factor در سـلول های ECV304 را مهار می کند، و فعالیت ضـد آنژیوژنز را هم در *In vitro* و هم در *in vitro* نشـان می دهد. Salmosin خالص شـده از زهر مار Agkistrodon halys brevicaudus، از تکثیر سـلول هـای انـدوتلیـال مویرگی گاوی ناشـی از bFGF جلوگیری می کند. همچنین به طور قابل توجهی رشـد تومور متاسـتاتیک و جامد را در سرطان ریه زنوگرافت در موش را سرکوب کرد (۸).

برای مطالعه بیشـتر در مورد مسـیرهای مرگ سـلولی ناشـی از زهر، درصـد آپوپتوز با اسـتفاده از روش های TUNEL و قطعه قطعه شـدن DNA مورد بررسـی قرار گرفت. تکه تکه شـدن DNA به عنوان یکی از شـاخص های وقوع آپوپتوز مورد پذیرش اسـت. نتایج نشـان داد که پتانسـیل القاء آپوپتوز وابسته به غلظت زهر است. سلول های سرطانی در بیشتر موارد برای حفظ تکثیر کنترل نشده خود مقاومت در برابر آپوپتوز را نشـان می دهند و بنابراین، هر عامل القا کننده آپوپتوز به عنوان یک عامل درمانی برای سرطان مطلوب است (۱۴و۱۵). برخی از پروتئین های زهر مار دارای ویژگی القا آپوپتوز می باشـند. در سال ۱۹۹۳، مشخص شد که برخی زهرها باعث القا آپوپتوز در سـلول های اندوتلیال عروقی می شـوند LAAO، بدسـت آمده از زهر مارهای Agkistrodon halys pallas، A. halys V. berus berus، Vipera berus berus باعث القا آپوپتوز در بعضی از سلول های سرطانی می شود. همچنین برخی از disintegrin ها فعالیت های القای آپوپتوز را نشـان دادند. یک disintegrin جدا شـده از زهر مار کبرا هندی (Naja naja)، دارای فعالیت ضـد سـرطانی اسـت و باعث از بین رفتن سلول های MCF-7 ، A549 و HepG2 می شود. VAP و VAP2، دو پروتئین از خانواده متالوپروتئاز / disintegrin، خالص شـده از سـم Crotalus atrox، فعالیت های القا کننده آپوپتوز ویژه برای سـلول های اندوتلیال

را نشـــان می دهد. Stejnitin در زهر مار Trimeresurus stejnegeri، باعث آپوپتوز در ســـلول های ECV304 می شود (۸). در مطالعه حاضر برای اولین بار خاصیت ضد تکثیری و الـقـا کـنـنـده آپـوپـتـوز زهـر مـار *Vipera raddei kurdistanica* بر سلول های سرطانی پستان انسان گزارش شد.

مطالعه ما همچنین نشـــان داد که آپوپتوز ناشـــی از زهر مار در سلول های سرطان پستان با دخالت پروتئین های تنظیم کننده آپوپتوز از خـانواده BCL-2 و افزایش نسـبـت BAX / BCL-2 انجام می شود.

نتیجه گیری

داده های ما شواهدی را برای اولین بار ارائه دادند که نشان می دهد زهر مار ایرانی *Vipera raddei kurdistanic* با القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی از طریق افزایش نسبت BAX / BCL-2 باعث مرگ سـلول های سـرطان پسـتان می شـود. اطلاعات ارائه شده در اینجا پیشنهاد کننده بررسی های بیشتر و آزمایشات بالینی زهر این مار برای درمان سرطان پستان است.

تشکر و قدردانی

پژوهش فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب ۱۶ اسفند ماه سال ۱۳۹۹ دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد ۴۰۰۰۰۵۰ است که در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گـــرفـــتـــه اســـــت. کـــد اخـــلاق طـــرح IR.KUMS.REC.1399.1182 می با شد. دانشگاه علوم پزشـکی کرمانشـاه حامی مالی این مقاله می باشـد. هیچ گونه تعارض منافع بین نویســندگان وجود ندارد. نویســندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه اعلام می دارند.

منابع

1. Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. J Thorac Dis. 2017; 9(3): 448-451.
2. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci. 2017;13(11):1387-1397.
3. Power EJ, Chin ML, Haq MM. Breast Cancer Incidence and Risk Reduction in the Hispanic Population. Cureus. 2018;10(2):e2235.
4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Biol Res. 2017;50(1):33.
5. Gewirtz DA, Bristol ML, Yalowich JC. Toxicity issues in cancer drug development. Curr Opin Investig Drugs. 2010; 11(6):612-4.
6. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. Cancers (Basel). 2014; 6(3): 1769–1792
7. Shanbhag VKL. Applications of snake venoms in treatment of cancer. Asian Pac J Trop Biomed.2015; 5(4): 275-276.
8. Li L, Huang J, Lin Y. Snake Venoms in Cancer Therapy: Past, Present and Future. Toxins (Basel). 2018; 10(9): 346.
9. Nalbantsoy A, Hempel BF, Petras D, Heiss P, Göçmen B, Iğci N, Yildiz MZ, Süssmuth RD. Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the Radde's mountain viper (Montivipera raddei) and Mount Bulgar Viper (Montivipera bulgardaghica) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells. Toxicon. 2017; 135: 71-83.

10.Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Koulen P. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. Curr Protoc Toxicol. 2017; 72: 2.26.1-2.26.10.
11.Pan Y, Ma S, Cao K, Zhou S, Zhao A, Li M, Qian F, Zhu C. Therapeutic approaches targeting cancer stem cells. J Cancer Res Ther. 2018; 14(7): 1469-1475.
12.Gold BS, Dart RC, Barish RA. Bites of venomous snakes. N Engl J Med. 200; 347(5): 347-56.
13.Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, et.al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. Semin Cancer Biol. 2015; 35: S78-S103.
14.Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2020; 17(7): 395-417.