

Research Paper

The Effect of Snake Venom (Naja Naja Oxiana) on Proliferation Rate of cancer Cells



Jaber Zafari^{1,2}, Fatemeh Javani Jouni³, Elaheh Shams⁴, *Ali Asghar Rastegari⁵

1. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Laser Application in Medical Sciences Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Health, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Faculty of Medical Sciences and Health Services, Behbahan, Iran.
5. Department of Molecular and Cell Biochemistry, Faculty of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.



Citation Zafari J, Javani Jouni F, Shams E, Rastegari AA. The Effect of Snake Venom (Naja Naja Oxiana) on Proliferation Rate of cancer Cells (Persian). *Internal Medicine Today*. 2022; 28(2): 140-159. <https://doi.org/10.32598/Intern Med Today.28.2.2387.2>

doi <https://doi.org/10.32598/Intern Med Today.28.2.2387.2>



ABSTRACT

Received: 22 Jun 2021

Accepted: 12 Mar 2022

Available Online: 01 Apr 2022

Key words:

Cancer, Doxorubicin, Naja naja oxiana, Proliferation rate, Malondialdehyde

Aims Because cancer is the leading cause of death worldwide, finding a better way to treat it seems essential. Doxorubicin is one of the most common drugs in the treatment of cancer, which has many negative and toxic effects. Therefore, efforts to produce effective anticancer drugs through screening natural compounds, such as animal toxins continue. This study aimed to evaluate the effect of Naja naja oxiana snake venom in comparison with doxorubicin on the proliferation rate and concentration of malondialdehyde in the human cervical cancer cell line (HeLa) and fibroblast cells (HFF).

Methods & Materials HeLa and normal fibroblast cancer cell lines were exposed to different concentrations of snake venom and doxorubicin for 24 and 48 hours. The amplification rate was determined using trypan blue staining and malondialdehyde (MDA) concentration was measured to evaluate the effects of oxidative stress. Data were analyzed using SPSS software, version 19.

Findings The results showed that with increasing concentration and treatment time with snake venom and doxorubicin, the cell proliferation rate decreases, and MDA content increases. The highest decrease in proliferation rate and increase in MDA concentration were observed in the HeLa cancer cell line treated with 500 µg/mL of snake venom for 48 hours.

Conclusion In comparison with doxorubicin, snake venom has a significant inhibitory effect on the HeLa cancer cell line with minimal effect on normal fibroblast cells.

* Corresponding Author:

Ali Asghar Rastegari, PhD.

Address: Department of Molecular and Cell Biochemistry, Faculty of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Tel: +98 (31) 37420134

E-mail: aa.rastegari@iau.ac.ir

English Version

Introduction

Cervical cancer is very common in women. In terms of prevalence, this cancer ranks second after breast cancer in Iran, and in terms of mortality, it ranks second after ovarian cancer [1]. One of the most common methods of cancer treatment is chemotherapy. Chemotherapy drugs have many toxic effects, including digestive, respiratory, nervous, infertility, etc. These effects lead to a decrease in the quality of life (QoL) [2].

Doxorubicin is one of the most powerful and advanced chemotherapy drugs in the anthracycline group [3]. The anticancer drug doxorubicin is an antibiotic with a wide spectrum of antitumor and anticancer activity [4]. It is used to treat many cancers, such as stomach, breast, lung, ovary, bone, Hodgkin's disease, and leukemia [5, 6]. Like other chemotherapy drugs, it has many side effects that can lead to fever, cardiac, and pulmonary toxicity, etc. [7, 8]. The destructive effect of doxorubicin is mainly due to the production of reactive oxygen species [9]. Free radicals produced by doxorubicin attack the fatty acids of membrane lipids and lead to lipid peroxidation and ultimately cell death [10]. Doxorubicin leads to lipid peroxidation and oxidative stress [11].

The interrelationships between oxidative stress and cancer are complex [12]. Changes in the level of oxidative stress can play an important role in the occurrence and progression of cancer [13]. Unsaturated fatty acids are very sensitive to oxidative stress changes and their peroxidation leads to the formation of active aldehydes, such as malondialdehyde (MDA) [14]. MDA is used to measure oxidative stress. MDA has been introduced as a mutagenic and carcinogenic agent by creating lesions in macromolecules, enzymes, and DNA [15]. Taking some anticancer drugs and chemotherapy-radiotherapy courses can stimulate lipid peroxidation [16]. Injection of doxorubicin leads to a clear increase in the level of MDA and a decrease in the activity of antioxidants in different tissues [17]. One of the main problems with the use of chemical drugs, such as doxorubicin is its toxicity on host cells and tissues, and this treatment method is not a suitable treatment due to its numerous systemic side effects. It is a substitute for a less dangerous treatment method considered by researchers [18].

Nowadays, all kinds of medicines, serums, and vaccines can be prepared from saliva or poison [19, 20]. Snake venom is acidic and consists of proteins, such as neurotox-

ins, cardiotoxins, cytotoxins, myotoxins, coagulants, and anticoagulants, and enzymes, such as proteases, oxidases, phospholipases, etc., among all natural poisons. It has the most complexity [21, 22]. Li et al. in 2018 showed the anticancer effect of various snake venoms on the growth and proliferation of cancer cells [23]. Calmet et al. used cobra venom to treat cancer in mice [24].

Naja naja oxiana is a species of cobra in Central Asia. This species belongs to the Elapidae family and affects the nervous system [25]. This poison contains neurotoxin, cytotoxin, and cardiotoxin [26]. Neurotoxin II released from snake venom can induce apoptosis [27].

Considering the therapeutic effects of poison as well as the many side effects of chemotherapy drugs, conducting a study on the anti-cancer effects of this poison seems necessary. The present study was conducted to investigate the effects of Caspian cobra venom (*Naja naja oxiana*) compared to doxorubicin on the proliferation rate and lipid peroxidation rate of human cervical cancer cells (HeLa) and fibroblast cells (HFF).

Materials and Methods

Cell culture: To carry out this applied research, human cervical cancer cells (HeLa, ATCC No.: CCL-2) and fibroblast cells (HFF, NCBI code: C163) were purchased from the cell bank of the Pasteur Institute of Iran (2×10^6 cells) in medium containing 90% FBS and 10% DMSO. These cells were in a medium containing 90% FBS and 10% DMSO. Cells were cultured in sterile conditions, in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 10% fetal bovine serum (FBS), potassium bicarbonate buffer, 1% penicillin, and 1% streptomycin at room temperature at 37°C. Then, they were placed inside the incubator (5% CO₂ at 37°C). It should be noted that in this research, cell treatments with doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA: D1515) and the snake venom *Naja naja oxiana* (Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran) were considered for 24 and 48 hours at the concentrations of 1, 10, 50, 100, and 500 µg/mL [28].

Checking the proliferation rate: The cells were cultured in 96-well plates to check the proliferation rate. After each treatment, cells were washed with PBS and trypsinized, and the cell suspension was prepared from each group. To check the cell proliferation rate, trypan blue staining and cell counting were performed. The number of cells per mL was checked.

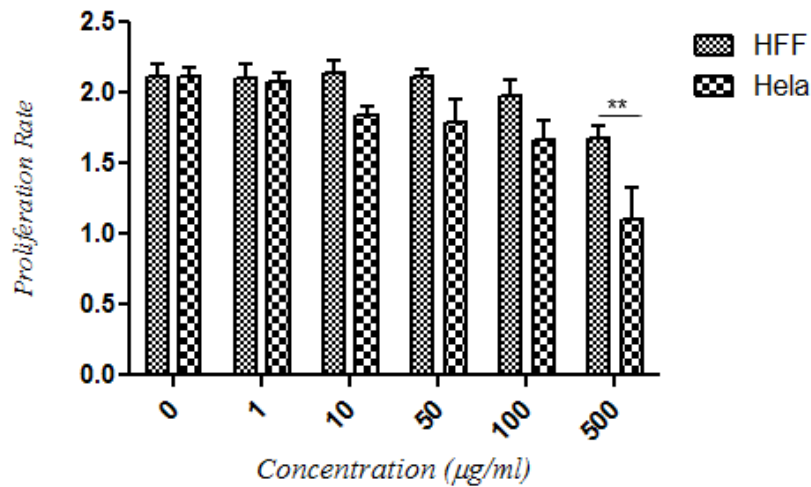


Figure 1. The proliferation rate of doxorubicin on the HeLa cancer Cell Line and HFF normal fibroblast evaluated after 24 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey test.

** P<0.01. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.

Lipid peroxidation assay

MDA is one of the factors that are caused by lipid peroxidation and direct cell damage. Therefore, to measure lipid peroxidation, the concentration of MDA is checked. MDA concentration was measured using the lipid peroxidation assay kit (Kia Bios, Iran) according to the instructions. In this experiment, MDA forms a complex with thiobarbituric acid and is absorbed at the wavelength of 532 nm. The optical absorbance was read by an ELISA reader (ELx808 microplate reader, BioTek, UK). MDA concentration was determined from the standard curve.

Statistical analysis

Statistically, all results were expressed as Mean±Standard error (SEM). Statistical analysis of data was done using SPSS software, version 19. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were performed and the significance level was considered at P≤0.05. Graphs were drawn using Graphpad Prism 5.

Results

The inhibitory effect of doxorubicin on HeLa cancer cell line and normal fibroblast:

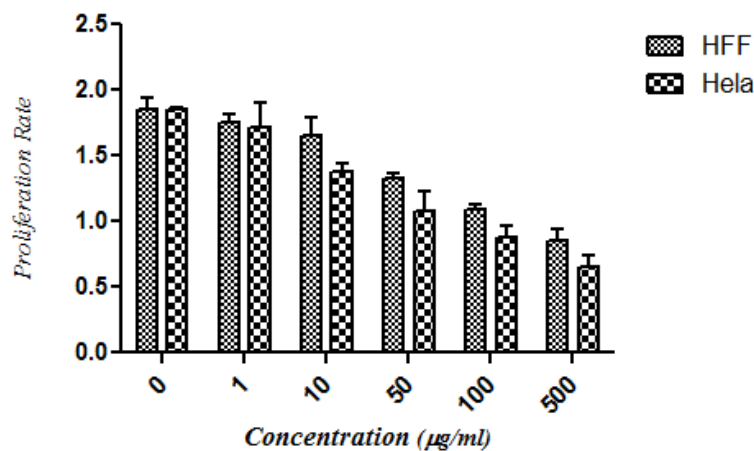
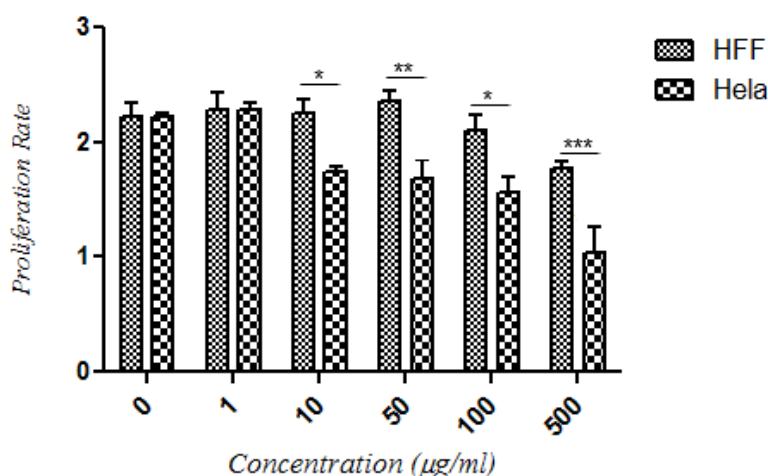


Figure 2. Doxorubicin proliferation rate on the HeLa cancer Cell Line and HFF normal fibroblast after 48 hours evaluated using one-way ANOVA and Tukey test. A significance level of P<0.05 was considered.



Internal Medicine Today

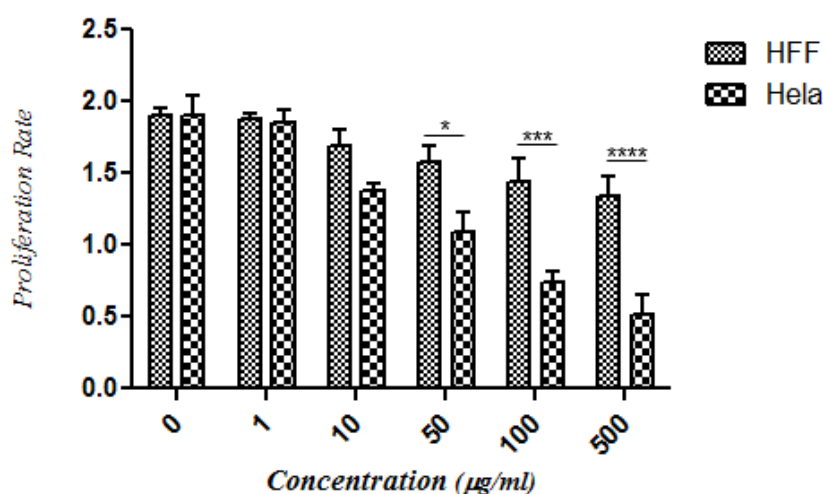
Figure 3. The proliferation rate of *Naja naja oxiana* snake venom on the HeLa cancer Cell Lines and HFF normal fibroblast after 24 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey test.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.

To investigate the effect of doxorubicin on the proliferation rate of the HeLa cancer cell line and normal fibroblast HFF, five concentrations (1, 10, 50, 100, and 500 µg/mL) of the drug were prepared and evaluated at two different times (24 and 48 hours) (Figures 1 and 2). The results obtained from counting cells per milliliter showed that with the increase in the concentration of doxorubicin, the rate of cell proliferation decreases, which was significant at a concentration of 500 µg/mL at 24 hours. The proliferation rate is the result of dividing the number of cells after treatment by the initial number of cells, which has no unit because they are divided by two numbers.

Inhibitory effects of *Naja naja oxiana* venom on HeLa cancer cell line and normal fibroblast

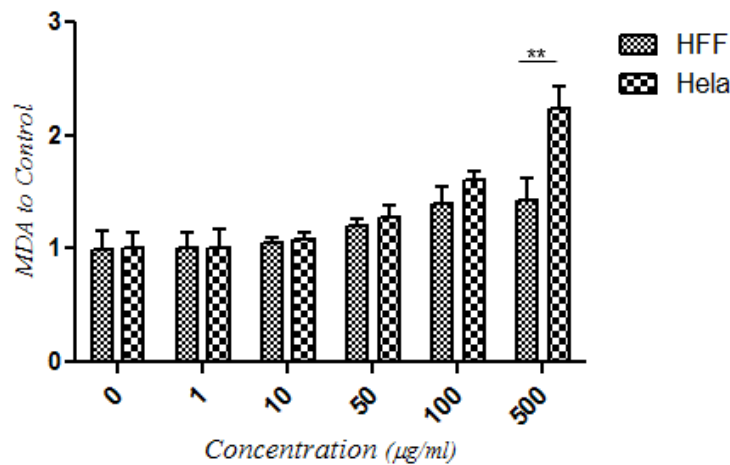
To investigate the proliferation rate of HeLa cancer cells and normal fibroblast HFF treated with snake venom, the concentrations of 1, 10, 50, 100, and 500 µg/mL of the snake venom were prepared and two time points of 24 and 48 hours were considered (Figures 3 and 4). The results showed that, with the increase in snake venom concentration, the rate of cell proliferation decreases, which is significant for HeLa cancer cells, but not significant for normal fibroblast cells. In addition, compared to doxorubicin, snake venom reduced the proliferation rate of cancer cells and had no significant effect on normal fibroblast cells. However, the decrease in



Internal Medicine Today

Figure 4. The proliferation rate of *Naja naja oxiana* snake venom on the HeLa cancer Cell Lines and HFF normal fibroblast after 24 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey test.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.



Internal Medicine Today

Figure 5. Malondialdehyde Concentration in the HeLa cancer cell lines and HFF normal fibroblast treated with different concentrations of doxorubicin for 24 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey Test.

** P<0.01. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.

the proliferation rate of normal fibroblast cells treated with doxorubicin was well observed.

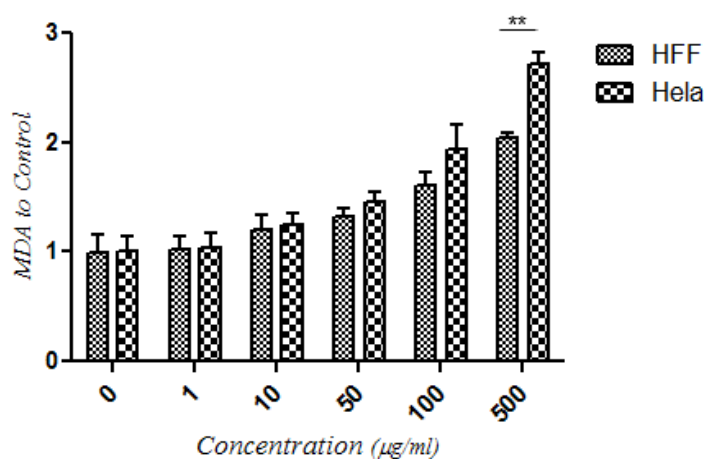
MDA level of the treatment group was divided by the control level; thus, it had no unit [29].

The effect of doxorubicin on HeLa cancer cell line and normal fibroblast in terms of oxidative stress

The effects of *Naja naja oxiana* snake venom on HeLa cancer cell line and normal fibroblast in terms of oxidative stress

MDA content was measured as the final product of lipid peroxidation. The shape and amount of MDA in HeLa cancer cell lines and HFF normal fibroblasts treated with different concentrations of doxorubicin for 24 and 48 hours are displayed in Figures 5 and 6. As shown, MDA concentration increased with increasing concentration and time. The level of MDA at the concentration of 500 µg/mL increased significantly at both time points. The

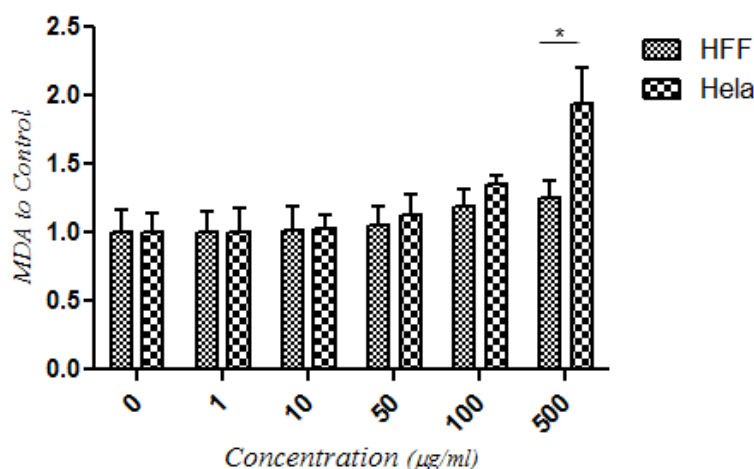
The results obtained from the tests related to the measurement of MDA in HeLa cancer cell lines and normal fibroblast HFF treated with different concentrations (1, 10, 50, 100, 500 µg/ml) of snake venom are shown in Figures 7 and 8. The results clearly showed that the concentration of MDA in the cancer cell line was higher than in the normal cell line. Also, the amount of MDA in



Internal Medicine Today

Figure 6. Malondialdehyde concentration in the HeLa cancer cell lines and HFF normal fibroblast treated with different concentrations of doxorubicin for 24 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey test.

** P<0.01. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.



Internal Medicine Today

Figure 7. Malondialdehyde concentration in the HeLa cancer Cell Lines and HFF normal fibroblast treated with different concentrations of *Naja naja oxiana* for 24 hours evaluated with One-Way ANOVA and Tukey test.

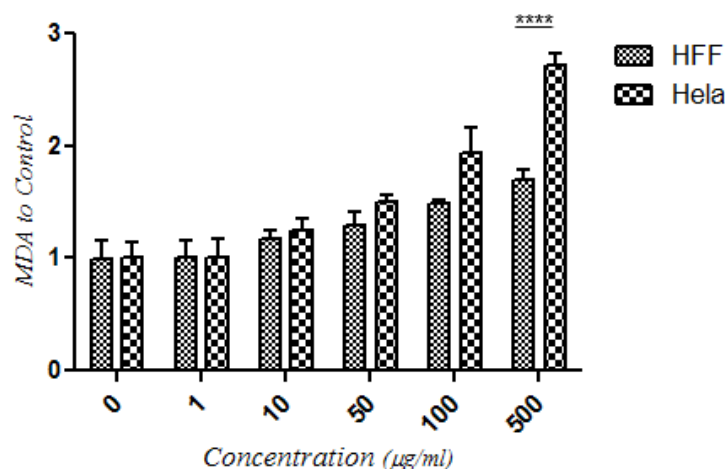
* P<0.05. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.

normal cells treated with snake venom was much lower compared to doxorubicin.

Discussion

Nowadays, there are many treatments for cancer, one of the most common of which is the use of chemical drugs or so-called chemotherapy. One of these drugs is a very effective anthracycline called doxorubicin or adriamycin. This drug is used alone or in combination with other chemical drugs to treat various neoplasms, but, the clinical use of this anticancer drug is limited due to its dose-dependent toxicity [30].

Current anticancer drugs have various side effects and toxicity. Efforts to produce new anticancer agents are ongoing, especially in screening natural compounds [31]. A major source of a variety of bioactive compounds is animal venom [32]. Some of these toxins induce different medicinal effects [33]. It has been found that snake venom leads to cytotoxicity in different types of tumor cells and the use of snake venom can reduce tumor cells [34-36]. Ahn et al. showed that king cobra venom inhibits cell proliferation in fibroblastic sarcoma, ovarian cancer, colon cancer, and stomach [37]. *Naja naja oxiana* snake venom is rich in cytotoxin and cardiotoxin and can induce apoptosis in cancer cells [38, 39]. Feofanov et al. assessed the cytotoxins of Caspian cobra venom and showed that



Internal Medicine Today

Figure 8. Malondialdehyde concentration in the hela cancer cell lines and HFF normal fibroblast treated with different concentrations of *Naja naja oxiana* venom for 48 hours evaluated with one-way ANOVA and Tukey test.

**** P<0.00001. The significance between two cells treated with the same concentration was compared.

cytotoxins I and II easily penetrate living cancer cells and lead to cell death in these cells [40].

In the present study, the effect of *Naja naja oxiana* snake venom against HeLa and fibroblast cancer cells was investigated in comparison with doxorubicin. For this purpose, five concentrations (1, 10, 50, 100, 500 µg/mL) of poison and drug and a duration of 24 and 48 hours were considered. The results showed that the proliferation rate of HeLa cancer cells and fibroblasts treated with snake venom and drugs decreased with increasing concentration and time, and this decrease in HeLa cancer cells was more than that of normal fibroblast cells.

In Derakhshani et al.'s study, cytotoxin extracted from snake venom reduced the proliferation rate of breast cancer cells and had anti-proliferative effects, and can be a promising candidate for breast cancer treatment [41]. NN-32 protein from Indian *Naja naja* snake venom has cytotoxic effects on Ehrlich muscle carcinoma in mice, reduces tumor size, and increases animal survival [42]. Zhang et al. showed that ACTX-6 protein extracted from snake venom can increase the apoptosis of HeLa cells [43]. Cardiotoxic-cytotoxic protein isolated from cobra (*Naja kaouthia*) can significantly inhibit the growth of human leukemia U937 and K562 cells in a dose- and time-dependent manner [44].

Therefore, due to its chemical and biological properties, snake venom has been used to treat various types of cancer. In addition, reports indicate that snake venoms are capable of inducing apoptosis signaling [45]. Defects in the apoptosis process play an important role in cancer development as well as poor response to treatment, such as chemotherapy. These natural treatment methods aim to stimulate apoptosis signaling in the target cells that play an important role in regulating the evolution and development of cancer treatment. Therefore, the induction of apoptosis is a critical strategy for cancer treatment [46]. Various studies have indicated that snake venom induces apoptosis by increasing reactive oxygen species (ROS) and causing oxidative stress [47]. Oxidative stress plays an important role in its regulation by affecting the internal and external pathways of apoptosis. If oxidative stress continues, oxidative damage is caused affecting vital biomolecules and the accumulation of these damages leads to some biological effects, such as changes in message transmission, changes in gene expression, mutation, and cell death [48]. Cells quickly respond to a series of biological responses, such as cell cycle arrest, gene transcription, oxidation imbalance, and regeneration. Most likely, these initial events will determine the fate of the cell, whether the cell will undergo necrosis, senescence, or apoptosis,

or survive and multiply [49]. The level of oxidative stress is very important in regulating the process of apoptosis. The increase in oxidative stress levels in cancer patients is related to the course of the disease, tissue damage, the use of anticancer drugs, and chemo-radiotherapy courses [16]. Some chemotherapy drugs lead to an excessive increase in the level of oxidative stress in tissues, as a result of which healthy tissues are also damaged [50]. It seems that the most important cause of doxorubicin poisoning in the liver and heart tissue is damage caused by free radicals [51]. In other words, treatment with doxorubicin leads to excessive production of free radicals inside the cell and thus causes oxidative stress, which damages the cell by disrupting the balance of oxidants and antioxidants [30]. Hosseini et al. confirmed the negative effects of doxorubicin, such as oxidative stress and tissue damage created in the liver and heart, which were revealed by the imbalance of antioxidant levels and stress proteins in both tissues [52]. Doxorubicin injection leads to a significant increase in MDA levels and a decrease in the activity of antioxidants in different tissues [17]. Hashemi also showed that the MDA index increased in the group treated with doxorubicin [53]. In this regard, Ashrafi et al. showed that DOX induction caused a significant increase in MDA and NO and a significant decrease in SOD activity in the heart and liver tissues [54].

In the present study, an increase in the amount of MDA was observed in HeLa cancer cells and normal fibroblasts treated with doxorubicin compared to the control. The amount of MDA in cancer and normal cell lines that were affected by *Naja naja oxiana* snake venom also increased, and this increase in MDA was more visible in cancer cells.

Fakhri et al. showed that *Naja naja oxiana* snake venom increased the level of ROS in the colon cancer cell line, but it was not observed in healthy cell lines [55]. Ibrahim et al. also stated that *Naja naja oxiana* snake venom is a strong inducer of apoptosis through the oxidative stress cycle in HepG2, MCF7, and DU145 cancer cell lines, which has minimal effects on normal cells [56]. Seydi et al. showed that *Naja naja oxiana* snake venom increased the level of ROS and caused apoptosis [57]. Angji et al. found that the level of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme, which is related to the oxidative cycle, increased after snake venom injection, but this increase was not statistically significant [26].

The results of our research, in line with the results of other studies, confirm the possible anticancer effect of *Naja naja oxiana* snake venom compared to doxorubicin on the HeLa cancer cell line. Therefore, it can be said that this type of treatment can be useful in inhibiting cancer

cells. This method can be used in the treatment of cancer by conducting more extensive research and additional studies on multiple cancer cell lines and also compared to other common chemotherapy drugs, such as cyclophosphamide.

Conclusion

Compared to the common drug doxorubicin, *Naja naja oxiana* snake venom has the highest inhibitory effect on the cancer cell line and the least effect on the normal cell line. By increasing the concentration and duration of treatment of cancer cells with snake venom, the proliferation rate in cells decreases, and the concentration of MDA increases.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research was approved by the ethics committee of the [Islamic Azad University, Flavarjan Branch](#), (IR.IAU.FALA.REC.1398.301).

Funding

This article is taken from the research project of [Islamic Azad University, Falawarjan Branch](#), with project code 301/28367.

Authors' contributions

Statistical analysis: Jaber Zafari; Research: Fatemeh Javani Jouni; Statistical analysis and writing the first version: Elaha Shams; Final review and approval: Ali Asghar Rostagari.

Conflicts of interest

All authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors of this article thank all the officials who helped us in this research.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

اثر سم مار ناجا اکسیانا بر نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی

جابر ظفری^{۱،۲}، فاطمه جوانی جونی^۳، الهه شمس^۴، علی اصغر رستگاری^۵

۱. گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات کاربرد لیزر در علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. گروه مهندسی پزشکی، دانشکده بهداشت، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴. دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بهبهان، بهبهان، ایران.
۵. گروه بیوشیمی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

Use your device to scan
and read the article online



Citation Zafari J, Javani Jouni F, Shams E, Rastegari AA. The Effect of Snake Venom (Naja Naja Oxiana) on Proliferation Rate of cancer Cells (Persian). *Internal Medicine Today*. 2022; 28(2):140-159. <https://doi.org/10.32598/Intern Med Today.28.2.2387.2>

doi <https://doi.org/10.32598/Intern Med Today.28.2.2387.2>

چکیده

اهداف: از آنجاکه سرطان از عوامل اصلی مرگ در سراسر جهان است، یافتن راه بهتری برای درمان آن ضروری به نظر می‌رسد. دوکسوروبیسین یکی از داروهای رایج در درمان سرطان است که اثرات منفی و سمی بسیاری در پی دارد. بنابراین تلاش برای تولید داروهای ضدسرطان مؤثر از طریق غربالگری ترکیبات طبیعی مانند سموم حیوانات ادامه دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر سم مار ناجا اکسیانا در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین بر نرخ تکثیر و میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رده سلولی سرطانی دهانه رحم انسان هلا و سلول‌های فیبروبلاست انجام شد.

مواد و روش‌ها: رده‌های سلولی سرطان هلا و طبیعی فیبروبلاست در معرض غلظت‌های مختلف (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سم مار و داروی دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. نرخ تکثیر با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام و برای بررسی اثرات استرس اکسیداتیو غلظت مالون‌دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت و زمان تیمار با سم مار و دوکسوروبیسین، نرخ تکثیر سلول‌ها کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. بیشترین کاهش نرخ تکثیر و افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رده سلولی سرطان هلا تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم مار به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: سم مار در مقایسه با دوکسوروبیسین اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر رده سلولی سرطانی هلا با حداقل تأثیر بر سلول‌های نرمال فیبروبلاست دارد.

تاریخ دریافت: ۰۱ تیر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۱ اسفند ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

سرطان، دوکسوروبیسین، ناجا، ناجا اکسیانا، نرخ تکثیر، مالون‌دی‌آلدئید

* نویسنده مسئول:

دکتر علی اصغر رستگاری

نشانی: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی سلولی و مولکولی.

تلفن: ۰۱۳۴ ۲۷۴۲۰۳۱۴ (۳۱) ۹۸+

رایانامه: aa.rastegari@iau.ac.ir

مقدمه

امروزه از بزاق یا به عبارتی زهر مارها می‌توان انواع داروها، سرم و واکسن تهیه کرد [۱۹، ۲۰]. زهر مار خاصیت اسیدی دارد و از مجموعه‌ای شامل پروتئین‌ها مانند نوروتوکسین، کاردیوتوکسین، سیتوتوکسین‌ها، میوتوکسین‌ها، مواد منعقدکننده و ضدانعقادی و آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، اکسیدازها، فسفولیپازها و غیره تشکیل شده است که بین تمام زهرهای طبیعی بیشترین پیچیدگی را دارد [۲۱، ۲۲]. مطالعه لی و همکاران، بیانگر اثر ضدسرطانی سموم مختلف مار بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی است [۲۳]. کالمت و همکاران از زهر مار کبری برای درمان سرطان در موش استفاده کردند [۲۴].

ناجا ناچا اکسیانا^۳ گونه‌ای از مار کبری در آسیای مرکزی است. این گونه مختص به خانواده Elapidea و بر سیستم عصبی تأثیر دارد [۲۵]. این سم حاوی نوروتوکسین، سیتوتوکسین و کاردیوتوکسین است [۲۶]. نوروتوکسین ۱۱ آزاد شده از سم مار می‌تواند باعث ایجاد آپوپتوز شود [۲۷]. با توجه به اثرات درمانی زهر و همچنین عوارض جانبی و زیاد داروهای شیمی‌درمانی، انجام مطالعه‌ای در زمینه اثرات ضدسرطانی این سم ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سم مار کبری خزر در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین بر نرخ تکثیر و میزان پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسان (هلا^۴) و سلول‌های فیبروبلاست انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

به منظور انجام این پژوهش کاربردی، سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسانی^۵ و سلول‌های فیبروبلاست^۶ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (۶×۱۰ سلول) در محیط حاوی ۹۰ درصد سرم جنین گاوی^۷ و ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید^۸ خریداری شد. این سلول‌ها در محیط حاوی ۹۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید قرار داشتند. سلول‌ها در شرایط استریل در محیط کشت (DMEM)^۹، سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، بافر بیکربنات پتاسیم و آنتی‌بیوتیک پنسیلین^{۱۰} ۱ درصد و استرپتومایسین^{۱۱} ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. سپس داخل انکوباتور (میزان ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. در این پژوهش، تیمارهای سلولی با

سرطان دهانه رحم در زنان بسیار شایع است. از نظر شیوع در ایران، دومین رتبه پس از سرطان سینه دارد و از نظر مرگ‌ومیر نیز پس از سرطان تخمدان، رتبه دوم را به خود اختصاص داده است [۱]. از معمولی‌ترین روش‌های درمان سرطان، شیمی‌درمانی است. داروهای شیمی‌درمانی اثرات سمی متعددی، از جمله مشکلات گوارشی، تنفسی، عصبی، ناباروری و غیره دارند. این اثرات به کاهش کیفیت زندگی منجر می‌شوند [۲].

دوکسوروبیسین^۱ یکی از قوی‌ترین و پیشروترین داروهای شیمی‌درمانی در گروه آنتراسایکلین است [۳]. داروی ضدسرطانی دوکسوروبیسین آنتی‌بیوتیکی با طیف وسیع از عملکرد ضدتوموری و ضدسرطانی است [۴] و برای درمان بسیاری از سرطان‌ها مانند معده، پستان، ریه، تخمدان، استخوان، بیماری هوجکین و سرطان خون استفاده می‌شود [۵، ۶] و مانند سایر داروهای شیمی‌درمانی، عوارض جانبی زیادی دارد که می‌تواند به تب، مسمومیت قلبی، ریوی و غیره منجر شود [۷، ۸].

اثر مخرب دوکسوروبیسین به‌طور عمده به دلیل تولید گونه‌های اکسیژن فعال است [۹]. رادیکال‌های آزاد تولیدشده با دوکسوروبیسین به اسیدهای چرب لیپیدهای غشایی حمله می‌کنند و به پراکسیداسیون چربی و در نهایت به مرگ سلولی منجر می‌شوند [۱۰]. دوکسوروبیسین به پراکسیداسیون لیپید و استرس اکسیداتیو منجر می‌شود [۱۱].

روابط متقابل بین استرس اکسیداتیو و سرطان پیچیده است [۱۲]. تغییرات سطح استرس اکسیداتیو می‌تواند در بروز و پیشرفت سرطان نقش مهمی داشته باشد [۱۳]. اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به تغییرات استرس اکسیداتیو بسیار حساس هستند و پراکسیداسیون آن‌ها به تشکیل آلدئیدهای فعال از قبیل مالون‌دی‌آلدئید^۲ منجر می‌شود [۱۴]. مالون‌دی‌آلدئید برای اندازه‌گیری استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. مالون‌دی‌آلدئید با ایجاد ضایعاتی در ماکرومولکول‌ها، آنزیم‌ها و دی‌ان‌ای به‌عنوان عاملی جهش‌زا و در نتیجه سرطان‌زا معرفی شده است [۱۵].

مصرف برخی داروهای ضدسرطانی و دوره‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی را تحریک کند [۱۶]. تزریق دوکسوروبیسین به افزایش بارز در سطح مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت‌های مختلف منجر می‌شود [۱۷]. یکی از اصلی‌ترین مشکلات استفاده از داروهای شیمیایی مانند دوکسوروبیسین، سمیت آن بر سلول‌ها و بافت‌های میزبان است و این روش درمانی با توجه به عوارض متعدد و سیستمیک آن از درمان‌های مناسب نبوده و جایگزین روش درمانی کم‌خطرتر مورد توجه پژوهشگران است [۱۸].

3. Naja Naja Oxiana

4. HeLa

5. HeLa, ATCC number: CCL-2

6. HFF, NCBI code: C163

7. Fetal Bovine Serum (FBS)

8. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

9. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

10. Penicillin

11. Streptomycin

1. Doxorubicin

2. Malondialdehyde (MDA)

بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت معنادار بود. نرخ تکثیر^{۱۳} حاصل تقسیم تعداد سلول‌ها بعد از تیمار به تعداد اولیه سلول‌هاست که چون ۲ عدد به هم تقسیم می‌شوند، فاقد واحد است.

اثرات بازدارندگی سم مار ناجا اکسیانا بر رده سلولی سرطانی HeLa و فیبروبلاست نرمال

برای بررسی نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF تیمار شده با سم مار غلظت‌های (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از سم مار تهیه و ۲ مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد (تصویرهای شماره ۳، ۴). نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت سم مار، نرخ تکثیر سلول‌ها کاهش می‌یابد که این کاهش در سلول‌های سرطانی هلا معنادار بود، اما در سلول‌های طبیعی فیبروبلاست معنادار نبود. علاوه بر این، سم مار در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین، نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی را بیشتر کاهش می‌دهد و نیز بر سلول‌های نرمال فیبروبلاست تأثیر چندانی ندارد. در صورتی که کاهش نرخ تکثیر سلول‌های نرمال فیبروبلاست تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین به خوبی مشاهده می‌شود.

تأثیر دوکسوروبیسین بر رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال از نظر استرس اکسیداتیو

محتوای مالون‌دی‌آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری شد. شکل و میزان مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال تیمار شده با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد (تصویرهای شماره ۵، ۶). همان‌طور که مشخص است میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید با افزایش غلظت و زمان افزایش می‌یابد. میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در هر ۲ زمان، به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. مقدار مالون‌دی‌آلدئید گروه تیمار به مقدار کنترل تقسیم شده است؛ بنابراین فاقد واحد است [۲۹].

اثرات سم مار ناجا اکسیانا بر رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال از نظر استرس اکسیداتیو

نتایج به دست آمده از آزمایش‌های مربوط به سنجه مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال تیمار شده با غلظت‌های (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از سم مار در تصویرهای شماره ۷ و ۸ مشخص است. نتایج به وضوح نشان می‌دهد غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رده سلولی سرطانی بیشتر از رده سلولی نرمال است. همچنین میزان مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌های نرمال تیمار شده با سم مار در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین بسیار کمتر است.

داروی دوکسوروبیسین^{۱۴} و نیز سم مار ناجا اکسیانا در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم رازی کرج، ایران با غلظت‌های (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) [۲۸] و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد.

بررسی نرخ تکثیر

برای بررسی میزان نرخ تکثیر، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. بعد از هر تیمار، سلول‌ها با سرم جنین گاوی شسته و تریپسین شدند و سوسپانسیون سلولی از هر گروه آماده شد. برای بررسی نرخ تکثیر سلول، رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول‌ها انجام شد. تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر بررسی شد.

سنجهش پراکسیداسیون لیپیدی

مالون‌دی‌آلدئید یکی از عواملی است که در اثر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب مستقیم سلولی ایجاد می‌شود. بنابراین برای سنجهش پراکسیداسیون لیپیدی، غلظت مالون‌دی‌آلدئید بررسی می‌شود. با استفاده از کیت سنجهش پراکسیداسیون لیپید (کیا زیست، ایران) و باتوجه به دستورالعمل آن، غلظت مالون‌دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد. در این آزمایش مالون‌دی‌آلدئید با تیوباربی‌توریک اسید کمپلکس تشکیل داده، در طول موج نوری ۵۳۲ نانومتر جذب دارد. جذب نوری با دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELx808 mi-croplate reader BioTek, UK) خوانده شد. غلظت MDA از منحنی استاندارد تعیین شد.

تحلیل آماری

از نظر آماری تمام نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها انجام شد. آزمون‌های آنوای یک‌راهه و توکی انجام و معناداری در سطح (P \leq 0/05) در نظر گرفته شد. نمودارها با برنامه Graph-pad Prism 5 ترسیم شد.

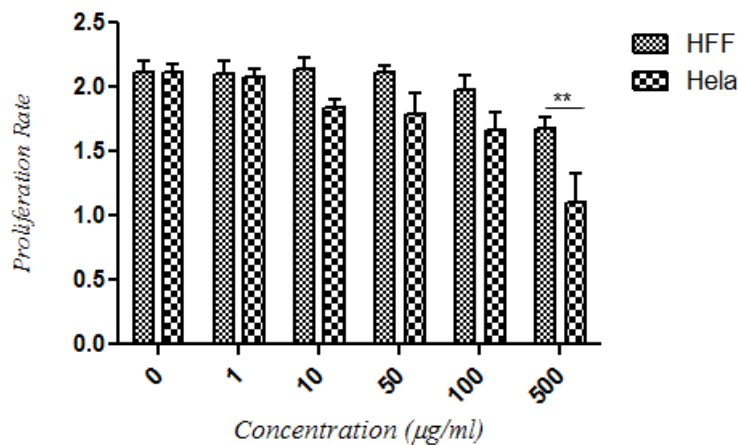
یافته‌ها

تأثیر بازدارندگی داروی دوکسوروبیسین بر رده سلولی سرطانی هلا و نرمال فیبروبلاست: به منظور بررسی تأثیر داروی دوکسوروبیسین بر نرخ تکثیر رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال، ۵ غلظت (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از دارو تهیه شد و در ۲ زمان مختلف (۲۴ و ۴۸ ساعت) ارزیابی شد (تصویرهای شماره ۱، ۲).

نتایج به دست آمده از شمارش سلول‌ها در هر میلی‌لیتر نشان می‌دهد با افزایش غلظت داروی دوکسوروبیسین، نرخ تکثیر سلول‌ها کاهش می‌یابد که این کاهش در غلظت ۵۰۰ میکروگرم

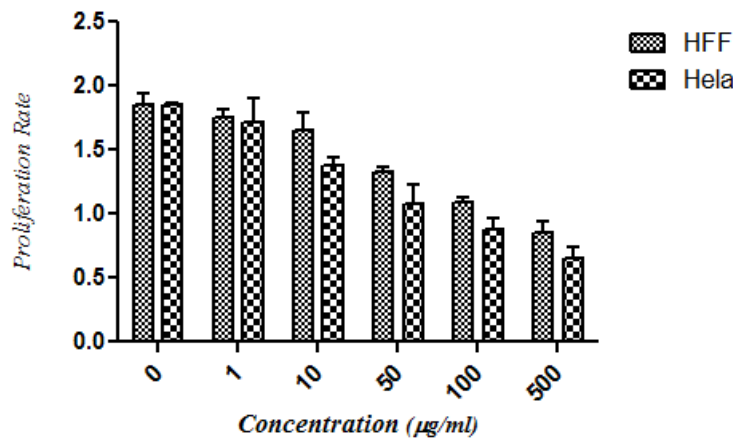
13. Proliferation Rate

12. Sigma-Aldrich, USA: D1515



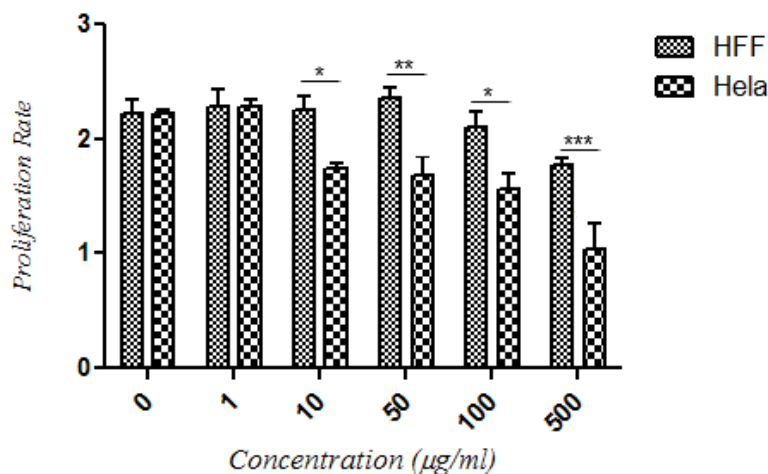
طب داخلی روز

تصویر ۱. نرخ تکثیر داروی دوکسوروبیسین بر رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF در تست ۲۴ ساعته ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. **سطح معناداری $P < 0/01$. مقایسه معناداری بین ۲ سلول در تیمار با غلظت یکسان



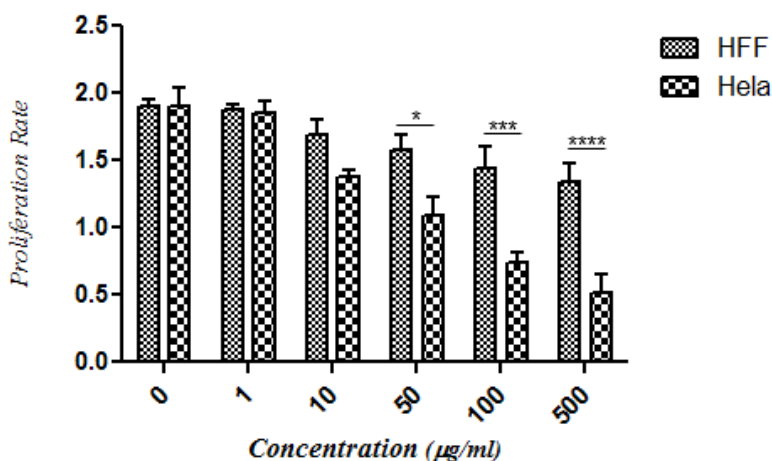
طب داخلی روز

تصویر ۲. نرخ تکثیر داروی دوکسوروبیسین بر رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF در تست ۴۸ ساعته ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. سطح معناداری $P < 0/05$



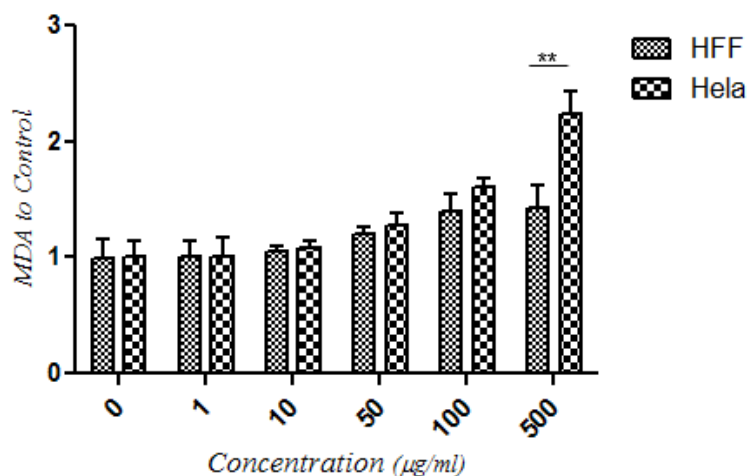
طب داخلی روز

تصویر ۳. نرخ تکثیر سم مار ناجا اکسیانا بر رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF در تست ۲۴ ساعت^۱ ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. *سطح معناداری $P < 0/05$. **سطح معناداری $P < 0/01$. ***سطح معناداری $P < 0/001$. مقایسه معناداری بین ۲ سلول در تیمار با غلظت یکسان



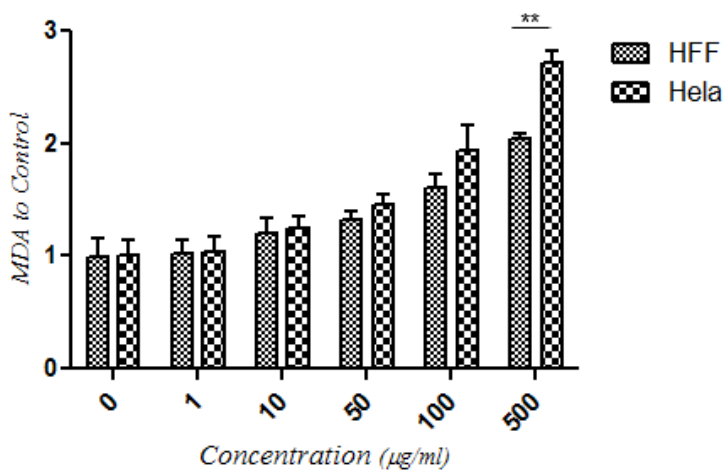
طب داخلی روز

تصویر ۴. نرخ تکثیر سم مار ناچا ناچا اکسیانا بر رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF در تست ۴۸ ساعته ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. * سطح معناداری $P < 0.05$. *** سطح معناداری $P < 0.001$. **** سطح معناداری $P < 0.0001$



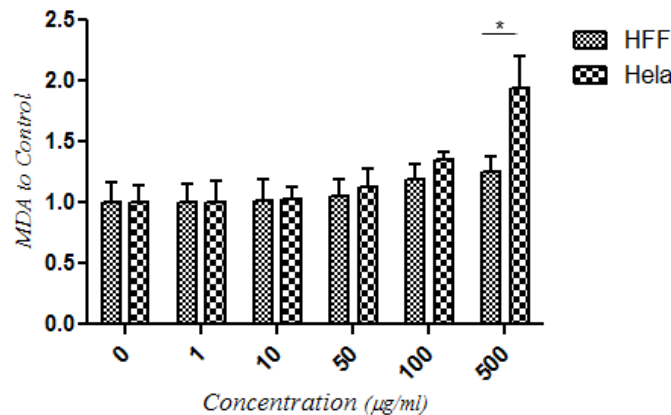
طب داخلی روز

تصویر ۵. میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF تیمار شده با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت. ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. ** سطح معناداری $P < 0.01$. مقایسه معناداری بین ۲ سلول در تیمار با غلظت یکسان



طب داخلی روز

تصویر ۶. میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF تیمار شده با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین در تست ۴۸ ساعته. ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. ** سطح معناداری $P < 0.01$. مقایسه معناداری بین ۲ سلول در تیمار با غلظت یکسان



طب داخلی روز

تصویر ۷. میزان مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF تیمار شده با غلظت‌های مختلف سم مار ناجا اکسیانا در تست ۲۴ ساعته. ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. * سطح معناداری $P < 0.05$. مقایسه معناداری بین ۲ سلول در تیمار با غلظت یکسان

است که سم مار به سمیت سلولی در انواع سلول‌های مختلف توموری منجر می‌شود و استفاده از سم مار می‌تواند سلول‌های تومور را کاهش دهد [۳۴-۳۶].

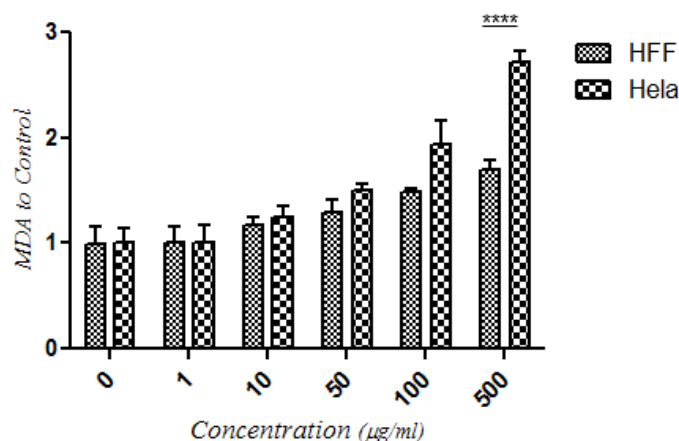
اهن و همکاران نشان دادند سم شاه کبری از تکثیر سلولی در سارکوم فیبروبلاستیک، سرطان تخمدان، سرطان روده بزرگ، معده جلوگیری می‌کند [۳۷]. سم مار ناجا اکسیانا از سیتو و کاردیوتوکسین سرشار است و توانایی ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را دارد [۳۸، ۳۹]. مطالعه فتوفانو و همکاران درباره سیتوتوکسین‌های زهر کبرای خزر نشان داد سیتوتوکسین‌های I و II به راحتی به سلول‌های سرطانی زنده نفوذ می‌کنند و به مرگ سلولی در این سلول‌ها منجر می‌شوند [۴۰].

در مطالعه حاضر، اثر سم مار ناجا اکسیانا علیه سلول‌های سرطانی هلا و فیبروبلاست در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین بررسی شد. بدین منظور ۵ غلظت (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰

بحث

امروزه درمان‌های بسیاری برای سرطان وجود دارد که از شایع‌ترین آن‌ها استفاده از داروهای شیمیایی یا به اصطلاح شیمی‌درمانی است. یکی از این داروها، آنتراسایکلین بسیار مؤثری به نام دوکسوروبیسین یا آدریامایسین است. این دارو به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای شیمیایی برای درمان نئوپلاسم‌های مختلف استفاده می‌شود، اما استفاده بالینی از این داروی ضدسرطانی به علت سمیت وابسته به دز آن محدود شده است [۳۰].

داروهای ضدسرطانی فعلی عوارض جانبی مختلف و سمی دارد. تلاش‌ها برای تولید عوامل ضدسرطان جدید، به ویژه از غربالگری ترکیبات طبیعی ادامه دارد [۳۱]. منبع اصلی برای انواع ترکیبات فعال زیستی، سموم حیوانات است [۳۲]. برخی از این سموم اثرات دارویی مختلفی القا می‌کنند [۳۳]. مشخص شده



طب داخلی روز

تصویر ۸. میزان مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاست نرمال HFF تیمار شده با غلظت‌های مختلف سم مار در مدت زمان ۴۸ ساعته. ارزیابی با آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و توکی. **** سطح معناداری $P < 0.0001$. مقایسه معناداری بین دو سلول در تیمار با غلظت یکسان

اکسیداتیو در تنظیم فرایند آپوپتوز بسیار مهم است. افزایش سطوح استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلابه سرطان با روند بیماری، آسیب بافت‌ها، مصرف داروهای ضدسرطانی و دوره‌های شیمی‌پروتودرمانی ارتباط دارد [۱۶].

برخی داروهای شیمی‌درمانی به افزایش بیش از حد سطح استرس اکسیداتیو در بافت‌ها منجر می‌شوند که در نتیجه آن بافت‌های سالم نیز آسیب می‌بینند [۵۰]. به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین علت مسمومیت دوکسوروبیسین در بافت کبد و قلب، آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد باشد [۵۱]. به‌عبارت‌دیگر، درمان به‌وسیله دوکسوروبیسین به تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در درون سلول منجر شده که از این طریق باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود و با بروز اختلال در موازنه اکسیدانت‌ها و آنتی‌اکسیدانت‌ها به سلول آسیب می‌رساند [۳۰].

یافته‌های مطالعه حسینی و همکاران مؤید اثرات منفی دوکسوروبیسین، از قبیل استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی ایجاد شده در کبد و قلب است که به‌وسیله تعادل نداشتن مقادیر آنتی‌اکسیدانتی و پروتئین‌های استرسی در هر ۲ بافت نمایان شد [۵۲]. تزریق دوکسوروبیسین به افزایش بارز در سطح مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت‌های مختلف منجر می‌شود [۱۷].

مطالعه هاشمی نیز نشان می‌دهد شاخص مالون‌دی‌آلدئید در گروه تیمار شده با دوکسوروبیسین افزایش داشته است [۵۳]. نتایج پژوهش اشرفی و همکاران نیز در همین راستا نشان داد القای دوکسوروبیسین موجب افزایش معنادار مالون دی‌آلدئید و نیتریک اکساید و کاهش معنادار فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در بافت‌های قلب و کبد شد [۵۴].

در مطالعه حاضر نیز افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌های سرطانی هلا و نرمال فیبروبلاست تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین نسبت به کنترل، مشاهده شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید در رده‌های سلولی سرطانی و نرمال که تحت تأثیر سم مار ناجا اکسیانا بودند نیز افزایش داشت که این افزایش مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌های سرطانی نمایان‌تر بود.

یافته‌های مطالعه فخری و همکاران نشان داد سم مار ناجا اکسیانا باعث افزایش سطح گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر در رده سلولی سرطان روده بزرگ می‌شود، اما در رده سلولی سالم مشاهده نشد [۵۵]. ابراهیم و همکاران نیز بیان کردند سم مار ناجا اکسیانا القاکننده قوی آپوپتوز از طریق چرخه استرس اکسیداتیو در رده‌های سلول سرطانی HepG2، MCF7 و DU145 است که حداقل اثرات را بر سلول‌های طبیعی دارد [۲۶].

مطالعه سیدی نشان داد سم مار ناجا اکسیانا باعث افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود و از این طریق آپوپتوز رخ می‌دهد [۵۶]. در مطالعه انگجی و همکاران مشخص شد

میکروگرم بر میلی‌لیتر) از سم و دارو و مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی هلا و فیبروبلاست تیمار شده با سم مار و دارو، با افزایش غلظت و زمان کاهش می‌یابد که این کاهش در سلول‌های سرطانی هلا بیشتر از سلول‌های نرمال فیبروبلاست بود.

در مطالعه درخشانی و همکاران، سیتوتوکسین استخراج شده از سم مار نرخ تکثیر سلول‌های سرطان پستان را کاهش می‌دهد و اثرات ضد تکثیری دارد و می‌تواند نویدبخش کاندیدای درمان سرطان پستان باشد [۴۱]. پروتئین NN-32 از سم مار ناجا اکسیانا هند، اثرات سیتوتوکسیک بر کارسینوما عضلات ارلیچ موش‌ها دارد و اندازه تومور را کاهش داده و بقای حیوانات را افزایش می‌دهد [۴۲].

ژانگ و همکاران نشان دادند پروتئین ACTX-6 استخراج شده نوعی سم مار، می‌تواند آپوپتوز سلول‌های هلا را افزایش دهد [۴۳]. پروتئین کاردیوتوکسیک/سیتوتوکسیک جدا شده از مار کبری^{۱۴} به‌طور قابل توجهی می‌تواند رشد سلول‌های لوسمی U937 و K562 را در انسان به روشی وابسته به دُز و زمان مهار کند [۴۴].

بنابراین از سم مار به‌دلیل خواص شیمیایی و بیولوژیکی برای درمان انواع مختلفی از سرطان استفاده شده است. علاوه بر این، گزارش‌ها نشان می‌دهد سموم مار قادر به القای سیگنالینگ آپوپتوز هستند [۴۵]. نقص در فرایند آپوپتوز در توسعه سرطان و همچنین پاسخ ضعیف به درمان، مانند شیمی‌درمانی نقش مهمی دارد. هدف از این روش‌های درمانی طبیعی، تحریک سیگنالینگ آپوپتوز در سلول‌های هدف است و می‌تواند در تنظیم تکامل و توسعه درمان سرطان نقش مهمی داشته باشد. بنابراین القای آپوپتوز، استراتژی حیاتی برای درمان سرطان است [۴۶].

مطالعات مختلف حاکی از آن است که سم مار با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن^{۱۵} و ایجاد استرس اکسیداتیو به القای آپوپتوز منجر می‌شود [۴۷]. استرس اکسیداتیو با تأثیر بر مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در تنظیم آن نقش مهمی ایفا می‌کند. در صورت ادامه یافتن استرس اکسیداتیو، آسیب‌های اکسیداتیو به بیومولکول‌های حیاتی وارد آمده و تجمع این آسیب‌ها به برخی اثرات بیولوژیکی مانند تغییر در انتقال پیام، تغییر در بیان ژن، جهش و مرگ سلولی منجر می‌شود [۴۸].

سلول‌ها به‌سرعت با مجموعه‌ای از پاسخ‌های بیولوژیکی مانند توقف چرخه سلولی، رونویسی از ژن، عدم تعادل اکسیداسیون و احیا پاسخ می‌دهند. به احتمال زیاد این وقایع اولیه تعیین‌کننده سرنوشت سلول خواهد بود که آیا سلول دچار نکروز، پیری یا آپوپتوز شود یا زنده مانده و تکثیر یابد [۴۹]. میزان سطح استرس

14. Naja kaouthia

15. Reactive Oxidative Species (ROS)

سطح آنزیم لاکتات دهیدروژناز^{۱۶} که با چرخه اکسیداتیو ارتباط دارد به دنبال تزریق سم مار افزایش می‌یابد، اما این افزایش از نظر آماری معنادار نبود [۵۷].

نتایج تحقیق ما نیز در راستای نتایج مطالعات دیگر، تأییدکننده اثر احتمالی ضدسرطانی سم مار ناجا ناجا اکسیانا در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین بر رده سلولی سرطانی هلاست. بنابراین می‌توان بیان کرد این نوع شیوه درمان در مهار سلول‌های سرطانی می‌تواند مفید باشد. با انجام تحقیقات گسترده‌تر و مطالعات تکمیلی بر رده‌های سلولی سرطانی متعدد و نیز در مقایسه با سایر داروهای رایج شیمی‌درمانی مانند سیکلوفسفامید و غیره می‌توان از این روش در درمان سرطان بهره برد.

نتیجه‌گیری

سم مار ناجا ناجا اکسیانا در مقایسه با داروی رایج دوکسوروبیسین بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رده سلولی سرطانی و کمترین میزان تأثیرگذاری را بر رده سلولی نرمال دارد و با افزایش غلظت و زمان تیمار سلول‌های سرطانی با سم مار، نرخ تکثیر در سلول‌ها کاهش و غلظت مالون‌دی‌آلدئید افزایش می‌یابد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با کد IR.IAU.FALA.REC.1398.301 در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تأیید شده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با کد طرح ۳۰۱/۲۸۳۴۷ است.

مشارکت نویسندگان

تحلیل آماری: جابر ظفری؛ پژوهش: فاطمه جوانی جونی؛ تحلیل آماری و نگارش نسخه اولیه: الهه شمس؛ بررسی نهایی و تأیید: علی اصغر رستگاری.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمام مسئولانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یاری‌گر بودند، تشکر می‌کنند.

16. Lactate Dehydrogenase (LDH)

References

- [1] Moradi A, Eivazi Arvanagh N, Chekerzechi A, Hemmati M, Shahmoradi HR. [Melittin inhibit Rac1 expression in cervical cancer cell, hela cell (Persian)]. *Journal of Laboratory & Diagnosis*. 2014; 6(24):40-5. [\[Link\]](#)
- [2] Keskar V, Mohanty PS, Gemeinhart EJ, Gemeinhart RA. Cervical cancer treatment with a locally insertable controlled release delivery system. *Journal of Controlled Release: Official Journal of The Controlled Release Society*. 2006; 15(3):280-8. [\[DOI:10.1016/j.jconrel.2006.08.014\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [3] Chen C, Lu L, Yan S, Yi H, Yao H, Wu D, et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 2018; 29(1):1-9. [\[PMID\]](#)
- [4] Xu M, Sheng L, Zhu X, Zeng S, Chi D, Zhang GJ. Protective effect of tetrandrine on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Tumori Journal*. 2010; 96(3):460-4. [\[DOI:10.1177/030089161009600314\]](#) [\[PMID\]](#)
- [5] Mohammadi M, Arabi L, Alibolandi M. Doxorubicin-loaded composite nanogels for cancer treatment. *Journal of Controlled Release*. 2020; 328:171-91. [\[DOI:10.1016/j.jconrel.2020.08.033\]](#) [\[PMID\]](#)
- [6] Zhao Y, Alakhova DY, Zhao X, Band V, Batrakova EV, Kabanov AV. Eradication of cancer stem cells in triple negative breast cancer using doxorubicin/pluronic polymeric micelles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020; 24:102124. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [7] Ma Z, Xu L, Liu D, Zhang X, Di S, Li W, et al. Utilizing melatonin to alleviate side effects of chemotherapy: A potentially good partner for treating cancer with ageing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020; 2020:6841581. [\[DOI:10.1155/2020/6841581\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [8] Zanuso V, Fregoni V, Gervaso L. Side effects of adjuvant chemotherapy and their impact on outcome in elderly breast cancer patients: A cohort study. *Future Science OA*. 2020; 6(9):FSO617. [\[DOI:10.2144/fsoa-2020-0076\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [9] Ertekin MV, Koçer I, Karslıoğlu I, Taysi S, Gepdiremen A, Sezen O, et al. Effects of oral Ginkgo biloba supplementation on cataract formation and oxidative stress occurring in lenses of rats exposed to total cranium radiotherapy. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2004; 48(5):499-502. [\[PMID\]](#)
- [10] Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins & cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2010. [\[Link\]](#)
- [11] Rezaeyan A, Haddadi G H, Hosseinzadeh M. [Evaluating superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and the histological changes of the lung tissue after γ -Irradiation in Rats (Persian)]. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*. 2016; 6(2):235-45. [\[Link\]](#)
- [12] Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*. 2012; 2012:137289. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [13] Kruk J. Overweight, obesity, oxidative stress and the risk of breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(22):9579-86. [\[PMID\]](#)
- [14] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; 2014:360438. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [15] Gonenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2001; 26(2):141-4. [\[DOI:10.1046/j.1365-2710.2001.00334.x\]](#) [\[PMID\]](#)
- [16] Abdel-Salam O, Youness E, Hafez H. The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*. 2011; 1(3):29-35. [\[DOI:10.4236/ojmip.2011.13005\]](#)
- [17] Blech DM, Borders CL. Hydroperoxide anion, HO₂⁻, is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,Zn superoxide dismutase: Modification of one histidine per subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983; 224(2):579-86. [\[DOI:10.1016/0003-9861\(83\)90245-X\]](#)
- [18] Hashemipour M, Mehrabzadeh-Honarmand H, Falsafi F, Rajabalian S, Hosseini R. [Cytotoxic effects of Cyclooxygenase enzyme inhibitor drugs (COX1, COX2) on KB cell line: An in-vitro study (Persian)]. *Journal of Iranian Dental Association*. 2009; 21(3):171-80. [\[Link\]](#)
- [19] Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity & Disease*. 2009; 19(1 Suppl 1):S1-42-6. [\[PMID\]](#)
- [20] Haji R. *Venomous snakes and snake bite*. Gravenhurst: Zoocheck Canada Inc; 2000. [\[Link\]](#)
- [21] Bailey P, Wilce J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emergency Medicine*. 2001; 13(1):28-36. [\[PMID\]](#)
- [22] Williams D, Welton R. The composition and actions of Papua New Guinean snake venoms. In Williams D, Jensen SD, Winkel KD, editors. *Clinical management of snakebite in Papua New Guinea*. Melbourne: Australian Venom Research Unit; 2000. [\[Link\]](#)
- [23] Li L, Huang J, Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future. *Toxins*. 2018; 10(9):346. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [24] Pal SK, Gomes A, Dasgupta SC, Gomes A. Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2002; 40(12):1353-8. [\[PMID\]](#)
- [25] Jamunaa A, Vejjayan J, Halijah I, Sharifah S, Ambu S. Cytotoxicity of Southeast Asian snake venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012; 18(2):150-6. [\[DOI:10.1590/S1678-91992012000200004\]](#)
- [26] Ebrahim K, Vatanpour H, Zare A, Shirazi FH, Nakhjavani M. Anti-cancer activity of Caspian cobra (Naja naja Oxiana) snake venom in human cancer cell lines via induction of apoptosis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2016; 15(Suppl):101-12. [\[PMID\]](#)
- [27] Strizhkov BN, Blishchenko EY, Satpaev DK, Karelin AA. Both neurotoxin II from venom of Naja naja oxiana and its endogenous analogue induce apoptosis in tumor cells. *FEBS Letters*. 1994; 340(1-2):22-4. [\[DOI:10.1016/0014-5793\(94\)80165-7\]](#)
- [28] Soleimani S, Azarnia M, Sharifi Z, Soleimani H, Zamanian M. [Evaluation of the Hemiscorpius lepturus scorpion venom on cell viability of K-562 cell line (Persian)]. *Complementary Medicine Journal*. 2016; 5(4):1364-74. [\[Link\]](#)
- [29] Tajvidi E, Nahavandizadeh N, Pournaderi M, Pourrashid AZ, Bossaghzadeh F, Khoshnood Z. Study the antioxidant effects of blue-green algae Spirulina extract on ROS and MDA production in human lung cancer cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2021; 28:101139. [\[PMID\]](#)
- [30] Nagai K, Fukuno S, Oda A, Konishi H. Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses. *Anticancer Drugs*. 2016; 27(1):17-23. [\[PMID\]](#)

- [31] Liu CC, Yang H, Zhang LL. Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(12):4753-8. [PMID]
- [32] Andreotti N, Jouirou B, Mouhat S, Mouhat L, Sabatier JM. Therapeutic value of peptides from animal venoms. *Comprehensive Natural Products II*. 2010; 5:287-303. [DOI:10.1016/B978-008045382-8.00114-3]
- [33] Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon*. 2010; 56(6):855-67. [PMID]
- [34] Chaim-Matyas A, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a cytotoxin P4 from the venom of *Naja nigricollis nigricollis* preferentially active on tumor cells. *Biochemistry International*. 1991; 24(3):415-21. [PMID]
- [35] Stevens-Truss R, Messer WS Jr, Hinman CL. Heart and T-lymphocyte cell surfaces both exhibit positive cooperativity in binding a membrane-lytic toxin. *The Journal of Membrane Biology*. 1996; 150(1):113-22. [DOI:10.1007/s002329900035] [PMID]
- [36] Chen YH, Hu CT, Yang JT. Membrane disintegration and hemolysis of human erythrocytes by snake venom cardiotoxin (a membrane-disruptive polypeptide). *Biochemistry International*. 1984; 8(2):329-38. [PMID]
- [37] Ahn MY, Lee BM, Kim YS. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997; 29(6):911-9. [DOI:10.1016/S1357-2725(97)00024-1]
- [38] Son DJ, Park MH, Chae SJ, Moon SO, Lee JW, Song HS, et al. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: Induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007; 6(2):675-83. [PMID]
- [39] Thangam R, Gunasekaran P, Kaveri K, Sridevi G, Sundarraj S, Paulpandi M, et al. A novel disintegrin protein from *Naja naja* venom induces cytotoxicity and apoptosis in human cancer cell lines in-vitro. *Process Biochemistry*. 2012; 47(8):1243-9. [DOI:10.1016/j.procbio.2012.04.020]
- [40] Feofanov AV, Sharonov GV, Astapova MV, Rodionov DI, Utkin YN, Arseniev AS. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. *The Biochemical Journal*. 2005; 390(Pt 1):11-8. [PMID]
- [41] Derakhshani A, Silvestris N, Haji-Asgarzadeh K, Mahmoudzadeh S, Fereidouni M, Paradiso AV, et al. Expression and Characterization of a novel recombinant cytotoxin II from *Naja naja oxiana* venom: A potential treatment for breast cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 162:1283-92. [DOI:10.20944/preprints202005.0098.v1]
- [42] Das T, Bhattacharya S, Halder B, Biswas A, Das Gupta S, Gomes A, et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*. 2011. 57(7-8):1065-72. [PMID]
- [43] Zhang L, Wei LJ. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life Sciences*. 2007; 80(13):1189-97. [PMID]
- [44] Debnath A, Saha A, Gomes A, Biswas S, Chakrabarti P, Giri B, et al. A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon*. 2010; 56(4):569-79. [PMID]
- [45] Shanbhag VKL. Applications of snake venoms in treatment of cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015; 5(4):275-76. [DOI:10.1016/S2221-1691(15)30344-0]
- [46] De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (review). *Oncology Reports*. 2015; 34(3):1087-96. [PMID]
- [47] Sharifi I, Tabatabaie F, Nikpour S, Mostafavi M, Tavakoli Oliaee R, Sharifi F, et al. The effect of *Naja naja oxiana* snake venom against leishmania tropica confirmed by advanced assays. *Acta Parasitologica*. 2021; 66(2):475-86. [PMID]
- [48] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology: CB*. 2014; 24(10):453-62. [PMID] [PMCID]
- [49] Khoshtabati L, Mahdavi M. [The role of oxidative stress in proliferation and cell death (Persian)]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2015; 25(127):130-45. [Link]
- [50] Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrão AI, Rocha-Rodrigues S, et al. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion*. 2015; 20:22-33. [PMID]
- [51] Yap MY, Lo YL, Talbot K, Ong WY. Oxidative stress reduces levels of dysbindin-1A via its PEST domain. *Neurochemistry International*. 2014; 79:65-9. [DOI:10.1016/j.neuint.2014.10.001] [PMID]
- [52] Sadat Hoseini SK, Dabidi Roshan V. [The effect of six weeks of voluntary wheel running exercise on hepatic superoxide dismutase levels and apoptosis-inducing factor after doxorubicin administration in aging model rats (Persian)]. *Fez*. 2018; 22(3):267-73. [Link]
- [53] Hashemi-Chashmi SZ, Dabidiroshan V. [The effect of pretreatment of aerobic training on some of the pulmonary stress indices against the toxicity of doxorubicin (Persian)]. *Journal of Isfahan Medical School*. 2019; 37(559):1422-7. [Link]
- [54] Ashrafi J, Dabidi Roshan V, Mahjoub S. Cardioprotective effects of aerobic regular exercise against doxorubicin-induced oxidative stress in rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 6(31):2380-8. [Link]
- [55] Fakhri A, Omranipour R, Fakhri S, Mirshamsi M, Zangeneh F, Vatanpour H, et al. *Naja naja oxiana* venom fraction selectively induces ros-mediated apoptosis in human colorectal tumor cells by directly targeting mitochondria. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017; 18(8):2201-8. [PMID]
- [56] Seydi E, Babaei S, Fakhri A, Pourahmad J. Selective toxicity of Caspian cobra (*Naja oxiana*) venom on liver cancer cell mitochondria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017; 7(5):460-5. [DOI:10.1016/j.apjtb.2017.01.021]
- [57] Angajia SA, Houshmandia A, Zare Mirakabadib A. Acute effects of the Iranian snake (*Naja naja oxiana*) venom on heart. *Biomacromolecular Journal*. 2016; 2(2):97-101. [Link]

This Page Intentionally Left Blank