

## Research Paper:

# Assessing Anti-malaria Effect of Naja Naja Oxiana Snake Venom by Real-time Polymerase Chain Reaction Method



Fateme Hajjalani<sup>1</sup>, Sedigeh Sadeghi<sup>2</sup>, Delavar Shahbazzadeh<sup>3</sup>, \*Fateme Tabatabaie<sup>4</sup>, \*Zahra Zamani<sup>2</sup>

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, International Campus, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



**Citation:** Hajjalani F, Sadeghi S, Shahbazzadeh D, Tabatabaie F, Zamani Z. [Evaluation of Anti-plasmodium Effect Iranian Snake Venom by Real-time PCR (Persian)]. Complementary Medicine Journal. 2021; 11(1):68-81. <https://doi.org/10.32598/cmja.11.1.1049.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/cmja.11.1.1049.1>



### Article Info:

Received: 03 Jan 2021

Accepted: 28 Feb 2021

Available Online: 01 Apr 2021

### Keywords:

Plasmodium falciparum, Inhibitory concentration 50, Snake venom, Malaria, Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)

## ABSTRACT

**Objective** Malaria is one of the most important parasitic diseases and one of the important health issues especially in tropical and subtropical countries. The importance of this disease is due to its high prevalence and mortality, as well as drug resistance and side effects of common drugs used for its treatment. Snake venom is a complex mixture of active pharmaceutical ingredients. The present study aims to investigate the anti-Plasmodium falciparum activity of the purified fractions isolated from the venom of Iranian cobra snake (Naja Naja Oxiana) by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

The importance of this disease is due to its high prevalence, significant mortality, as well as drug resistance and, side effects of current drugs in treatment. Venom is a complex mixture of active pharmaceutical ingredients. The purpose of this study was to investigate the anti-Plasmodium falciparum activity of the purified fraction of Iranian cobra snake venom by Real-time PCR.

**Methods** After preparation and purification of lyophilized venom for determining the parasitic load, different fractions obtained from the venom of Naja Naja Oxiana put in different plates adjacent to Plasmodium falciparum (3D7) strain in the ring stage. The degree of parasitemia was determined by real-time PCR. Finally, the effective fraction with anti-malaria properties was identified.

**Results** The active fraction with a half maximal inhibitory concentration of 0.026 µg/mL was the most effective fraction on Plasmodium falciparum in vitro (P<0.001).

**Conclusion** The active fraction of Naja Naja Oxiana venom at the mentioned concentration has anti-malaria effect. This results can motivate the continuation of further research in this field.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

Malaria mortality has dropped worldwide due to the worldwide malaria eradication program and the use of artemisinin-based combination therapy and some

medications. However, the prevalence of Plasmodium falciparum strains that are resistant to standard drugs such as chloroquine has increased in many parts of the world. In recent years, one of the main causes of death from malaria has been reported to be increased drug resistance; hence, scientists are looking for new drugs to control the disease.

### \* Corresponding Author:

Fateme Tabatabaie, PhD.

**Address:** Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Tel:** +98 (21) 86703220

**E-mail:** tabatabaie59@gmail.com

Zahra Zamani, PhD.

**Address:** Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

**Tel:** +98 (21) 86703220

**E-mail:** tabatabaie59@gmail.com

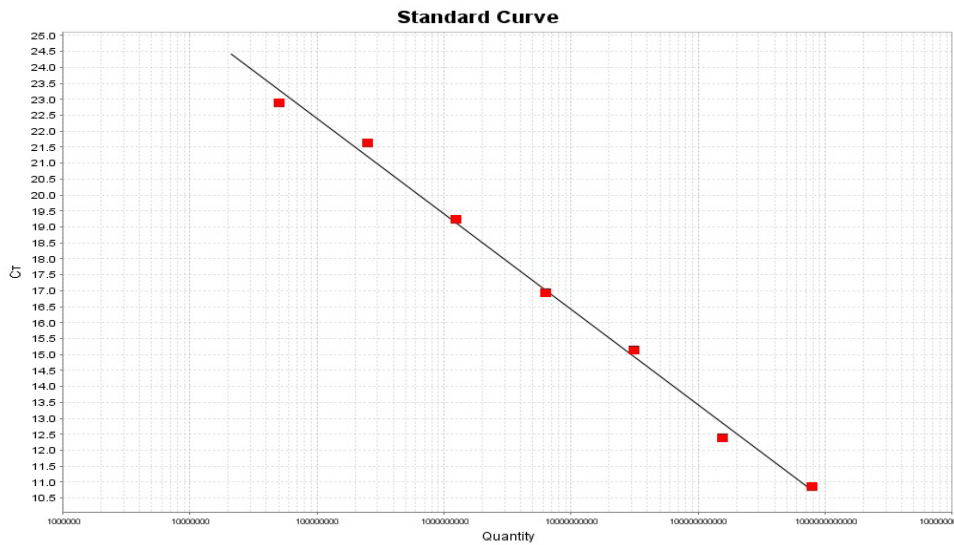


Figure 1. Standard curve of 18s rRNA gene synthesized in vitro

With the advancement of medical science and related sciences, many studies have been conducted on the chemical properties of various toxins. Today, snake venom can be used to prepare various drugs, serums and vaccines. In recent years, researchers have been investigated the properties of snake venoms for increasing the drug resistance to *Plasmodium falciparum*. Their results have shown that the venom of *Bothrops asper* snake and South American rattlesnake have cell penetrating, antifungal and antiparasitic properties. Iranian cobra (*Naja Naja Oxiana*) is a snake from the family Elapidae that is found in large areas in

northeastern Iran. The aim of this study was to investigate the anti-malaria effect (in the ring stage) of the active fraction isolated from Iranian cobra venom by determining the parasitic load using Real-time PCR.

## 2. Materials and Methods

After determining the effective dose of active fraction, the materials were first mixed slowly and on ice with a sampler in two vials of 0.2 cc. For all primers used in the Real-time PCR, 10% stocks were prepared from the initial

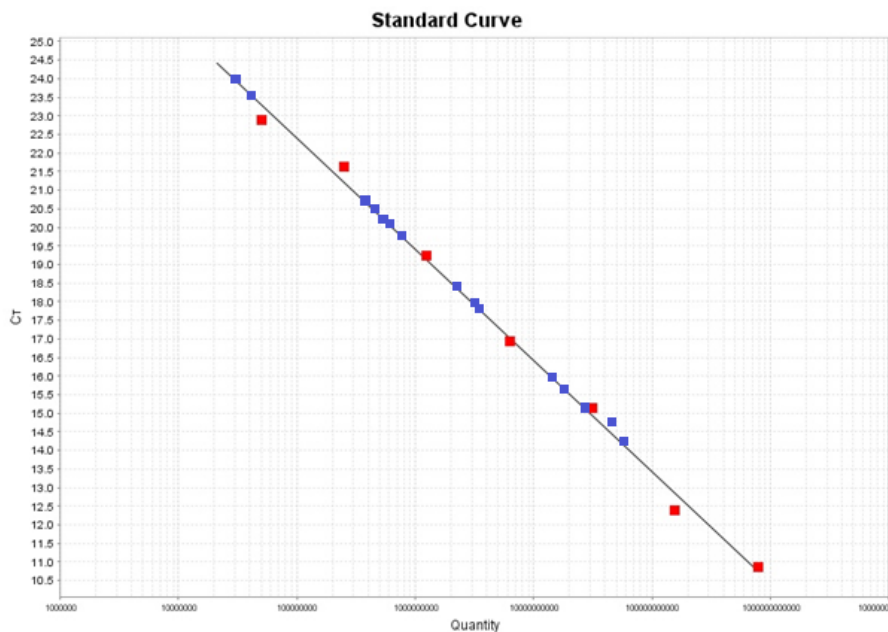
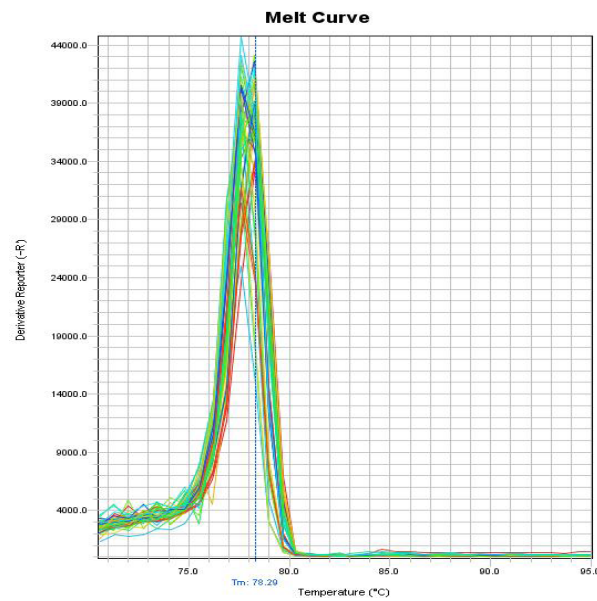


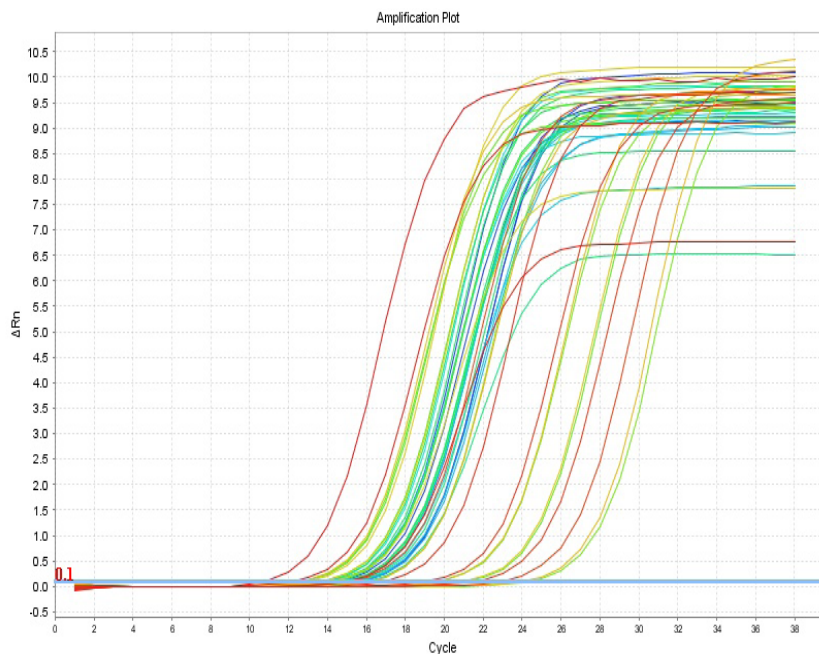
Figure 2. Standard curve of synthesized 18s rRNA gene and samples extracted from *Plasmodium falciparum* in culture medium adjacent to active fraction for IC50 testing in vitro



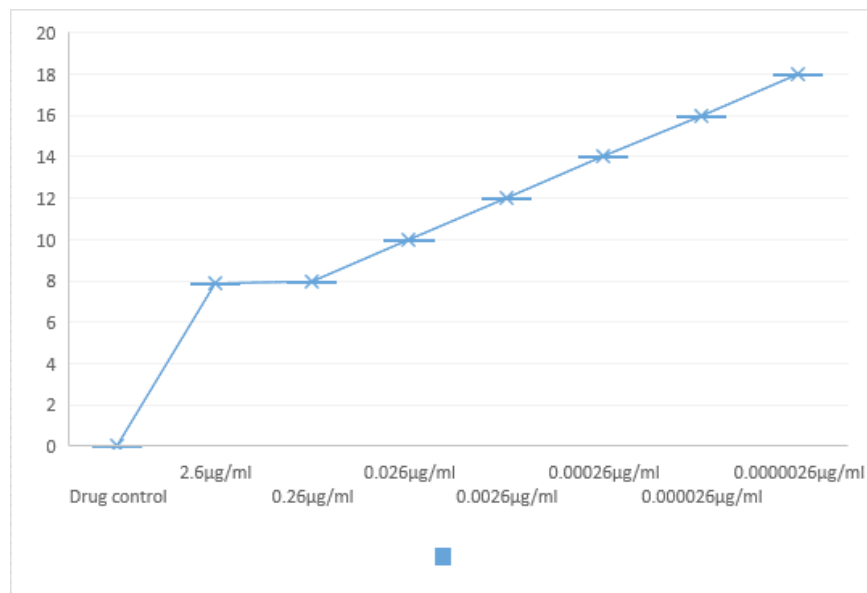
**Figure 3.** Melting curve of 18s rRNA gene synthesized in vitro

stock of 100  $\mu$ l and then the required volumes of primers were added to 15  $\mu$ L of PCR reaction. There were 15 ng samples in each  $\mu$ L of DNA. After a spin of 5 seconds, we finally transferred the strips to the Real-time PCR device to operate under the determined settings. In this method, a DNA sample with a specific concentration was used to draw a standard curve. The standard DNA concentration was determined with a 260-nm spectrophotometer and then converted to the number of copies based on the molecular weight of the sample. The 18s rRNA gene was sequenced

and then sent to Takapouzi company for synthesis. After synthesis, serial dilution was prepared from the standard samples and placed in real-time PCR device with the target sample. Using the Ct (Threshold Cycle) value for each dilution, we drew a curve in which X axis showed the dilution or the number of copies of the gene and Y represented the expected Ct value. The length of the gene sequence was 234 bp. When the lyophilized state was liquefied by adding 100  $\mu$ l of injected distilled water, its concentration was measured with a nanodrop.



**Figure 4.** Amplification curve of 18s rRNA gene synthesized for IC50 testing in vitro



**Figure 5.** Determination of IC<sub>50</sub> value of active fractions obtained from ion exchange chromatography using Real-time PCR method

### 3. Results

For quantitative analysis of gene expression, information obtained from 18 s rRNA gene expression was synthesized and cloned with the results of the standard curve of 18s rRNA gene and normalized in PUC57. With the help of amplification diagrams, the CT value of the samples was determined, and the presence of non-specific products and primer dimers was determined with the help of melting curve. Figures 1, 2, 3, 4, and 5 plot the standard, amplification, and melting curves of the 18s rRNA gene. They showed the specificity of real-time PCR conditions for this gene.

### 4. Conclusion

The obtained results showed that the anti-Plasmodium effect of the active fraction of snake venom is quite apparent. These promising results motivate further research in this area; Therefore, according to the obtained results, it will not be far-fetched to develop new effective antimalarial drugs after systematic research in this field.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

This research observed the ethical principles according to Declaration of Helsinki, and obtained its ethical approval

from Iran University of Medical Sciences (Code: IR.IUMS.REC1395.9223651202).

#### Funding

This research was supported by the research project (No. IR.IUMS.REC1395.9223651202), Funded by the Iran University of Medical Sciences.

#### Authors' contributions

All authors contributed equally in preparing this article.

#### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Iran University of Medical Sciences and Pasteur Institute of Iran for funding and cooperation in conducting specialized tests.

This Page Intentionally Left Blank

## مقاله پژوهشی:

# بررسی اثر ضد پلاسمودیومی سم مار کبرای ایرانی با روش مولکولی Real-time PCR

فاطمه حاجی‌علیانی<sup>۱</sup>، صدیقه صادقی<sup>۲</sup>، دلاور شهباززاده<sup>۳</sup>، فاطمه طباطبایی<sup>۴</sup>، زهرا زمانی<sup>۵</sup>

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲. گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۴. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

## چکیده

**هدف:** مالاریا از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی و یکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها، به‌خصوص کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا است. اهمیت این بیماری به خاطر شیوع زیاد، مرگ‌ومیر قابل توجه آن، همچنین مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای رایج در درمان است. سم مار، مخلوط پیچیده‌ای از مواد فعال دارویی است. هدف ما از این تحقیق بررسی اثر ضد پلاسمودیوم فالسیپاروم فراکشن فعال جداشده از سم مار کبرای ایرانی با روش Real-time PCR بود.

**روش‌ها:** پس از تهیه و تخلیص زهر لیوفیلیزه به منظور تعیین بارانگلی، در پلیت رقت‌های مختلف فراکشن‌های مختلف به‌دست‌آمده از سم مار کبرای ایرانی با انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم (3D7) در مرحله رنگ مجاور شدند و میزان پارازیمی به روش Real-time PCR تعیین شد و در انتها فراکشن مؤثر دارای خاصیت آنتی‌پلاسمودیومی مشخص شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که فراکشن فعال با غلظت  $C_{50}$  برابر  $0.026 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.001$ ) مؤثرترین فراکشن روی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج با توجه به مشهود بودن اثر ضد پلاسمودیومی فراکشن فعال سم مار کبرای ایرانی در غلظت یادشده، امیدوارکننده بود و انگیزه را برای ادامه تحقیقات پیشرفته در این زمینه ایجاد کرد.

## اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴ دی ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

## کلیدواژه‌ها:

پلاسمودیوم فالسیپاروم، غلظت مهار میانه، سم مار، مالاریا، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

## مقدمه

شدت تحلیل می‌برد و باعث کاهش شدید فعالیت هایبیمار در دوران بیماری می‌شود، موجب تضعیف بهداشت و رفاه عمومی در خانواده‌ها شده، حیات افراد، مخصوصاً با ضعف، سیستم ایمنی را به مخاطره می‌اندازد و باعث فرسودگی بیش از حد جامعه و منابع انسانی کشورها می‌شود.

به دلیل سهولت مسافرت و تبادل جمعیتی با مناطق مالاریاخیز، امکان مشاهده بیمار مبتلا به مالاریا و بازگشت بیماری در تمام مناطق جغرافیایی کشور حتی در مناطق پاک وجود دارد و خطر بروز همه‌گیری‌های گسترده در مناطق دارای پتانسیل انتقال همواره مطرح است [۱، ۲].

به دلیل برنامه حذف مالاریا در جهان و استفاده از درمان ترکیبی آرتیمیزین و داروهای دیگر، مرگ‌ومیر مالاریا در جهان

مالاریا از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی است که توسط تک‌یاخته‌ای از جنس پلاسمودیوم ایجاد می‌شود. این بیماری به وسیله گونه‌های به‌خصوصی از پشه‌های آنوفل ماده منتقل می‌شود.

در سال ۲۰۱۸، ۲۲۸ میلیون مورد از بیماری مالاریا در دنیا گزارش شد که در مقایسه با ۲۳۱ میلیون مورد بیماری در سال ۲۰۱۷ سیر نزولی دارد. موارد مرگ‌ومیر هم در سال ۲۰۱۸، ۴۰۵ هزار مورد بوده است که نسبت به سال ۲۰۱۷ و گزارش ۴۱۶ هزار مورد سیر نزولی داشته است.

این بیماری علاوه بر اینکه طی حملات خود نیروی بیمار را به

\* نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه طباطبایی

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی.

تلفن: +۹۸ (۲۱) ۸۶۷۰۳۲۲۰

پست الکترونیکی: tabatabaie59@gmail.com

دکتر زهرا زمانی

نشانی: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی.

تلفن: +۹۸ (۲۱) ۸۶۷۰۳۲۲۰

پست الکترونیکی: tabatabaie59@gmail.com

## مواد و روش‌ها

### تعیین دُز مؤثر فراکشن فعال مرحله دوم یا (IC<sub>50</sub>) با روش Real-time PCR

برای انجام این مطالعه تجربی ابتدا زهر لیوفیلیزه را از در انستیتو پاستور آزمایشگاه ونوم و فرآورده‌های دارویی تهیه کردیم. پس از جداسازی فراکشن‌ها با روش ژل فیلتراسیون، اندازه‌گیری غلظت پروتئین ونوم و فراکشن‌های تخلیص شده انجام شد. فراکشن مؤثر با افزایش غلظت دارای اثر کشندگی بیشتر بود؛ بنابراین بقیه مراحل تخلیص روی این فراکشن فعال انجام شد و به عنوان فراکشن کاندید انتخاب شد.

در مرحله بعد، کشت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم را انجام دادیم. پس از جداسازی فراکشن‌های زهر با روش ژل فیلتراسیون و سپس تغلیظ فراکشن‌ها به روش لیوفیلیزاسیون، تعیین فراکشن فعال از میان فراکشن‌های تخلیص شده که بیشترین اثر کشندگی انگل را داشت، مشخص شد. از فراکشن فعال انتخاب شده، غلظت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰۰۰۰ تهیه شد.

سیس تعیین دُز مؤثر فراکشن فعال یا (IC<sub>50</sub>) با روش مولکولی دقیق انجام شد. روش مولکولی qPCR جهت تأیید نهایی IC<sub>50</sub> که در تحقیقات قبلی ما با روش‌های معمولی رنگ‌آمیزی گسترش خونی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) پلاسمودیوم فالسیپاروم که هیچ‌کدام حساسیت و اختصاصیت روش‌های مولکولی را ندارند، انجام شده بود [۱۳].

### استخراج DNA

برای بررسی سطح بیان ژن‌های 18S rRNA پلاسمودیوم فالسیپاروم همه مراحل استخراج زیر هود لامینار انجام شد و قبل از شروع کار زیر هود با وایتکس و الکل ۷۰ درصد تمیز شد.

وسایل کار برای استخراج شامل سمپلرها، سرسمپلرها و میکروتیوب که زیر هود قرار داشتند و به مدت بیست دقیقه تحت UV قرار گرفت. تمامی سرسمپلرها و میکروتیوب‌ها RNase-Free بودند و قبل از شروع کار در دو دوره زمانی ۴۵ دقیقه اتوکلاو شده بودند.

ابتدا پانصد میکرولیتر خون در فالكون پانزده ریخته با آب دو بار تقطیر به حجم هفت میلی‌لیتر رساندیم. سپس ده دقیقه تکان داده شد. در این مرحله بهتر است در فالكون‌ها با پارافیلیم بسته شود. به مدت دوازده دقیقه با دور rpm3000 در سانتریفیوژ یخچال دار، سانتریفیوژ شد.

سیس مایع رویی را خالی کردیم تا رسوب دست‌نخورده باقی بماند. آب مقطر اضافه کردیم و مراحل قبل تکرار شد تا مایع رویی

پایین آمده است، ولی متأسفانه در نقاط مختلف جهان فراوانی سوش‌های پلاسمودیوم فالسیپاروم، که به داروهای استاندارد مانند کلروکین مقاوم هستند، افزایش یافته است.

در سال‌های اخیر یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر مالاریا افزایش مقاومت دارویی گزارش شده؛ بنابراین دانشمندان در پی جست‌وجوی دارویی جدید جهت مهار کردن این بیماری هستند [۱، ۲].

با پیشرفت علم پزشکی و علوم وابسته، در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی در مورد خواص شیمیایی انواع توکسین‌ها انجام گرفته است. در ایران انواع مارهای سمی و نیمه سمی، مانند کفچه مار، مار کبری، مارهای دریایی، افعی شاخدار، گرز مار، افعی دماوندی، افعی البرز و مار جعفری زیست می‌کنند.

مار کبرای ایران (Naja Naja Oxiana) از مارهای خانواده الاپیده بوده که در مناطق وسیعی از شمال شرقی ایران به فراوانی یافت می‌شود. این مار از مارهای بسیار خطرناک محسوب شده و زهر آن حاوی فاکتورهای توکسیک عصب‌گرا با وزن مولکولی نسبتاً پایین است.

امروزه از بزاق یا به عبارتی همان زهرمارها می‌توان انواع داروها، سرم و واکسن را تهیه کرد. در این تحقیق برای تعیین میزان بار انگلی از روش مولکولی Real-time PCR دقیق با حساسیت و اختصاصیت بالا استفاده کردیم که تأییدکننده نهایی روش‌های دیگر تعیین بار انگلی است [۳-۶].

در مطالعات پیشین، محققین اثرات ضد پلاسمودیوم برگئی عصاره الکلی زردچوبه و گیاه تاجریزی بلوچی در موش را نشان دادند [۷، ۸].

مطالعات سال‌های گذشته نشان داده که ائوزین B به عنوان داروی جدید ضد انگل مالاریا در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی می‌تواند مطرح باشد. محققین به بررسی اثر ضد سرطانی زهر مار ناجا ناجا اکسیانا ایرانی با القای آپوپتوز روی سلول‌های سرطانی پرداختند [۹، ۱۰].

در سال‌های گذشته محققین با افزایش موارد مقاومت دارویی به انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در برابر داروهای رایج در درمان به تحقیق در مورد خواص انواع زهر مارها پرداختند. نتایج نشان داد که زهر مار Bothrop asper و زهر مار زنگی آمریکای جنوبی دارای خواص نفوذ سلولی و ضد قارچی و ضد انگلی هستند [۱۱، ۱۲].

هدف ما از این تحقیق، بررسی اثر ضد پلاسمودیوم فالسیپاروم (در مرحله رینگ) فراکشن فعال جداشده از سم مار کبرای ایرانی با روش Real-time PCR با تعیین بار انگلی بود.

Injection Water و سمپلر، پنس، میکرو تیوب پنج‌جاء میکرولیتری Cool Box، کیت Primer Design Master SYBR، دستگاه ABI Step One، درپوش آنها.

### روش انجام آزمایش Real-time PCR

ابتدا در دو ویال ۰/۲ سی‌سی مواد زیر به آرامی و روی یخ با سمپلر مخلوط شد. در این مطالعه برای همه پرایمرهای استفاده شده در واکنش Real-time PCR، Stock های ۱۰ درصد از Stock اولیه ۱۰۰ μl تهیه شد و سپس حجم‌های لازم از پرایمرها وارد ۱۵ μl واکنش شد. همچنین در این مطالعه در هر μl از DNA به میزان ۱۵ ng نمونه وجود داشت. مواد لازم جهت انجام Real-time PCR در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند.

پس از یک spin پنج ثانیه‌ای در نهایت استریپ‌ها را به دستگاه Real-time PCR انتقال دادیم تا تحت برنامه داده‌شده به دستگاه عمل کند.

در این روش از نمونه DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. غلظت DNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر ۲۶۰ نانومتر تعیین شد و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه‌های آن تبدیل شد. استانداردهای غلظتی ژن‌های معروف به صورت تجاری قابل خریداری است.

در مورد ژن 18s rRNA توالی آن را یافته، سپس برای سنتز به شرکت تکاپوزیست ارسال شد (جدول شماره ۲). ژن سنتز شد. از نمونه‌های استاندارد به صورت سریالی رقت تعیین کرده و همراه با نمونه هدف در دستگاه Real-time PCR قرار داده شد.

با استفاده از (Threshold Cycle) که دستگاه برای هر رقت به ما می‌دهد، یک منحنی رسم کرده که X آن رقت یا تعداد کپی از ژن و Y آن CT بود، نمودار به دست آمده یک نمودار خطی است که با قرار دادن عدد نمونه هدف در نمودار، غلظت یا تعداد کپی آن نیز به دست می‌آید. 234 bp طول توالی ژن است.

AACACGGGGAACTCACTAGTTTAAAGACAAGAG-TAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTTCTTGATTTCTTG-GATGaGTGATGCATGGCCGTTTTAGTTCGTGAATAT-GATTTGTCTGTTAATTCCGATAACGAACGAGATCT-TAACCTGCTAATTAGCGGTAATACACTATATTCTTA-AGTGAAATTAGAATATAGATAAATTGTGCTAATTTT-GATTAATAATATTAGAATG

پس از اینکه از حالت لیوفیلیزه با اضافه کردن 100 μl آب مقطر تزریقی به حالت مایع درآمد، غلظت آن را با نانودراپ سنجیدیم. ده نانوگرم در میلی‌لیتر غلظت داشت.

فرمول تبدیل غلظت به تعداد نسخه‌های ژن:

سفید شد. سپس ۲۵۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه کردیم.

در مرحله بعد پنجاه میکرولیتر پروتئیناز K اضافه کردیم. در مرحله بعد داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس overnight قرار دادیم. پس از اضافه کردن هم حجم بافر لیز فنل، داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور چهارده هزار به مدت سیزده دقیقه سانتریفیوژ کردیم، بعد از سانتریفیوژ خارج کرده، مایع رویی را وارد میکروتیوب جدید کرده و هم حجم محلول رویی کلروفرم اضافه کردیم.

سپس داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور دوازده هزار به مدت یازده دقیقه سانتریفیوژ کردیم. مایع رویی را در ویال جدید وارد کردیم و سپس هم حجم محلول جداشده ایزوپروپانل (حدود پانصد میکرو لیتر) به لوله‌ها اضافه شد. بعد از پنج تا ده ثانیه تکان دادن لوله‌ها، آنها را ده دقیقه در دمای اتاق ساکن قرار دادیم [۱۴، ۱۵].

### شست‌وشوی DNA

برای خارج کردن کامل کلروفرم، رسوب DNA با اتانول ۷۵ درصد شست‌وشو داده شد. به این منظور به رسوب RNA مقدار یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درجه سلسیوس اضافه و به آرامی مخلوط شد. بعد میکروتیوب را به مدت پنج دقیقه در ۴°C و ۷۵۰۰ سانتریفیوژ کردیم. در مرحله بعد مایع رویی توسط سمپلر دور ریخته شد.

### خشک کردن رسوب DNA

برای خشک شدن نسبی رسوب ده دقیقه در میکروتیوب باز گذاشته شد. در تمام این مراحل سعی شد مقادیر به طور دقیق و صحیح رعایت شوند.

ژن 18s rRNA در پلاسمودیم دارای کپی نامبر بالایی است. قدم اول در انجام Real-time PCR تعیین هدف است. هدف ما اندازه‌گیری کپی نامبر ژن 18s rRNA بود که مؤید پارازیتمی است. در واقع این تست تأییدی برای تست شمارش انگل به روش رنگ آمیزی گیمسا و تعیین آنزیم لاکتات دهیدروژناز است.

با استفاده از روش Quantification Absolute و با استفاده از یک منحنی استاندارد تعداد دقیق نسخه‌های 18s rRNA کلون در puc57 در نمونه‌ها مشخص شد.

با توجه به مطالعه تیلر و همکاران [۱۵] از پرایمر معرفی شده در مقاله کمک گرفتیم و پس از بلاست کردن آن، این نتیجه حاصل شد که این پرایمر با گونه‌های فالسیپاروم، ناولزی، ویواکس، اووال و برگگی ۱۰۰ درصد تطابق ژنتیکی داشت. نوع سنجش مورد نظر با دستگاه Real-time PCR از نوع ABI Step One و استفاده از روش SYBR Green بود.

مواد لازم برای انجام Real-time PCR



جدول ۱. مواد لازم برای Real-time PCR

ماده	حجم
SYBER Green (primer design)	7.5µL
ddH2O	5.5µL
Forward Primer	0.5µL
Reverse Primer	0.5µL
sample	1µL
15µL	Total



تست تعیین بار انگلی روی فراکشن‌های جدا شده در مرحله رینگ در پلیت کشت انجام شد. از سم رقت‌های مختلف استفاده شد و میزان پارازیتی با روش مولکولی دقیق Real-time PCR جهت تأیید روش‌های رنگ‌آمیزی گیمسا، لاکتات دهیدروژناز در هر کدام از چاهک‌ها انجام شد تا مؤثرترین فراکشن فعال روی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم تعیین شود.

تعیین دُز مؤثر فراکشن فعال مرحله دوم یا (IC<sub>50</sub>) با روش Real-time PCR

در تصویرهای زیر می‌توان منحنی تکثیر و ذوب مربوط به ژن 18s rRNA را مشاهده کرد. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، اطلاعات به دست آمده از بیان ژن 18s rRNA با نتایج حاصل از منحنی استاندارد ژن 18s rRNA سنتز و کلون شده و در PUC57 نرمال سازی شد.

با کمک نمودارهای تکثیر میزان (CT/Threshold Cycle) نمونه‌ها مشخص شد و به کمک منحنی ذوب (Melt curve) وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمر وجود محصول غیراختصاصی مشخص شد. نمودارها نشان دهنده اختصاصی بودن شرایط انجام Real-time PCR برای این ژن است.

منحنی استاندارد ژن 18srRNA سنتز شده و کلون شده در PUC57 در روش برون تنی در تصویر شماره ۱ مشخص شده است. منحنی ژن 18srRNA سنتز شده و کلون شده در PUC57 و نمونه‌های استخراج شده از انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط کشت در مجاورت فراکشن فعال جهت تست IC<sub>50</sub> در روش برون تنی در

$number\ of\ copies\ (molecules) =$

$$\frac{X\ ng * 6.0221 \times 10^{23}\ molecules/mole}{N * 660\ g/mole} * 1 \times 10^9\ ng/g$$

X = amount of amplicon (ng) غلظت ده نانوگرم

N = length of dsDNA amplicon جفت باز ۲۳۴

660 g/mole = average mass of 1 bp dsDNA

در هر نانوگرم صد هزار نسخه ژن وجود داشت، ابتدا رقت سریالی از غلظت ده نانوگرم از ژن 18s rRNA را تهیه شد و سپس نمونه‌ها به صورت دوتایی آماده شدند. پس از یک اسپین پنج ثانیه‌ای در نهایت استریپ‌ها را به دستگاه Real-time PCR انتقال دادیم تا تحت برنامه داده شده به دستگاه عمل کند.

شرایط سیکل دمایی Real-time PCR برای ژن هدف به قرار زیر بود

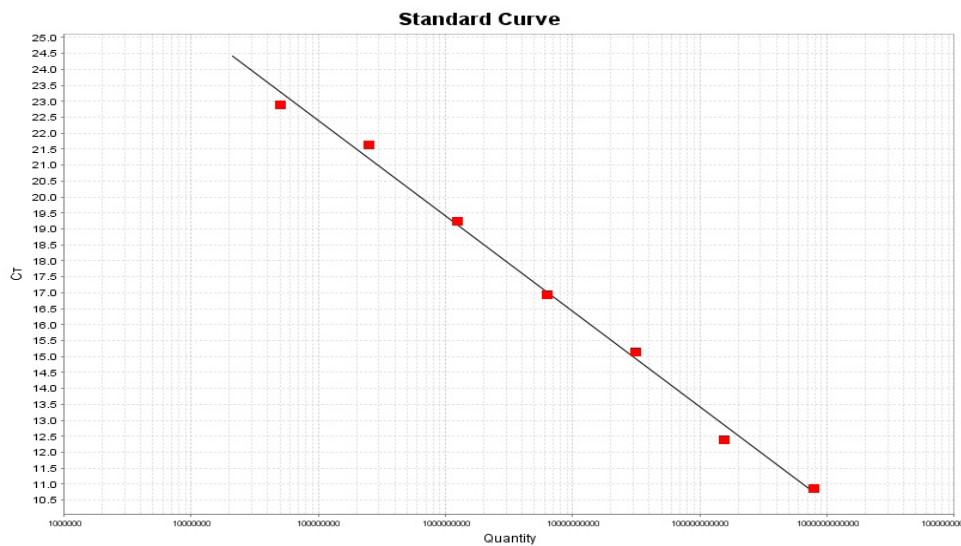
یک مرحله 95°C برای چهارده دقیقه جهت فعال سازی آغازی آنزیم پلیمرز، در ادامه چهل سیکل که شامل 95°C برای پانزده ثانیه و 60°C برای شصت ثانیه بود، برای مرحله annealing/extention صورت گرفت و در نهایت برای رسم منحنی ذوب 95°C (Melt Curve Analysis) برای پانزده ثانیه، 70°C برای شصت ثانیه و ۹۵°C برای پانزده ثانیه انجام شد [۱۶، ۱۷].

یافته‌ها

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای RCP emti-laeR

Primers	Primer pair sequences
Reverse Primer	5'-GCTCTTTCTTGATTCTTGGATG-3'
Forward Primer	5'-AGCAGGTTAAGTTCTCGTTCG-3'





تصویر ۱. منحنی استاندارد ژن 18s rRNA سنتز شده در روش برون تنی

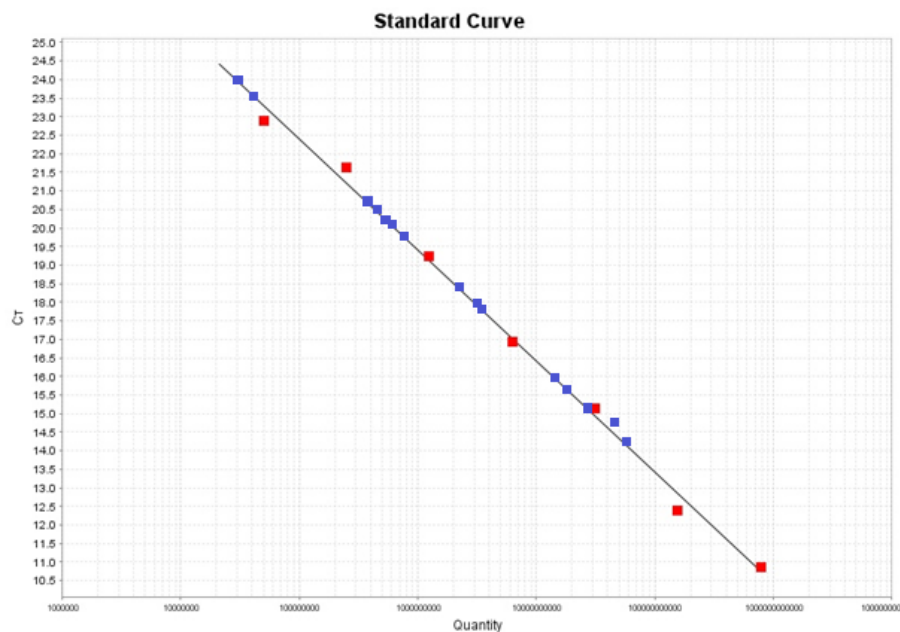
تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. در تصویر شماره ۳ منحنی ذوبن 18srRNA سنتز شده و کلون شده در PUC57 جهت تست IC50 در روش برون تنی قابل مشاهده است. تصویر شماره ۴ منحنی تکثیر ژن 18srRNA سنتز شده و کلون شده در PUC57 جهت تست IC50 در روش برون تنی را مشخص می کند. در تصویر شماره ۵ IC50 فراکشن فعال حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی با روش Real-time PCR تعیین شده است.



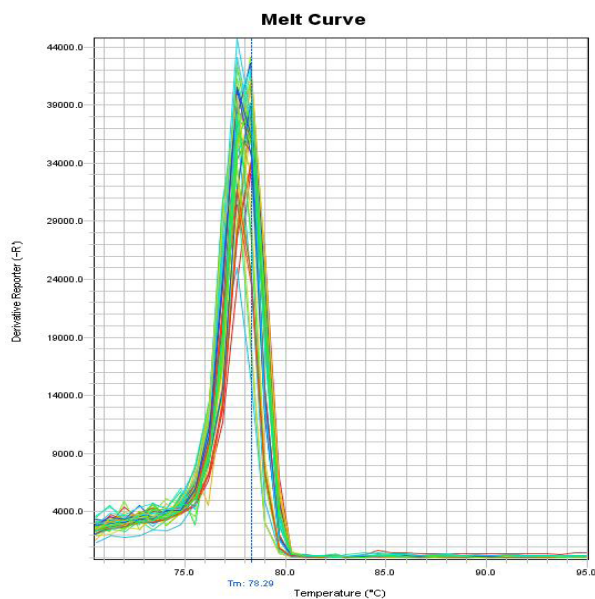
انگل پلاسمودیوم، عامل مولد مالاریا تأثیر بسیار گسترده‌ای در سلامت جوامع انسانی در سطح جهان دارد. به واسطه سرعت پیشرفت و توزیع جغرافیایی وسیع مقاومت انگل در برابر داروهای رایج ضد مالاریا، تهیه داروهای مختلف جدید علیه این بیماری یک ضرورت قطعی است. ظهور مقاومت دارویی به معنای افزایش خطر عوارض جانبی و یا مخارج بیشتر در استفاده از داروهای جدید است [۲].

انگل پلاسمودیوم در مرحله رینگ دارای فعالیت متابولیک بالایی است. به این دلیل از مرحله رینگ انگل استفاده کردیم

### بحث



تصویر ۲. منحنی ژن 18s rRNA سنتز شده و نمونه‌های استخراج شده از انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط کشت در مجاورت فراکشن فعال جهت تست IC50 در روش برون تنی



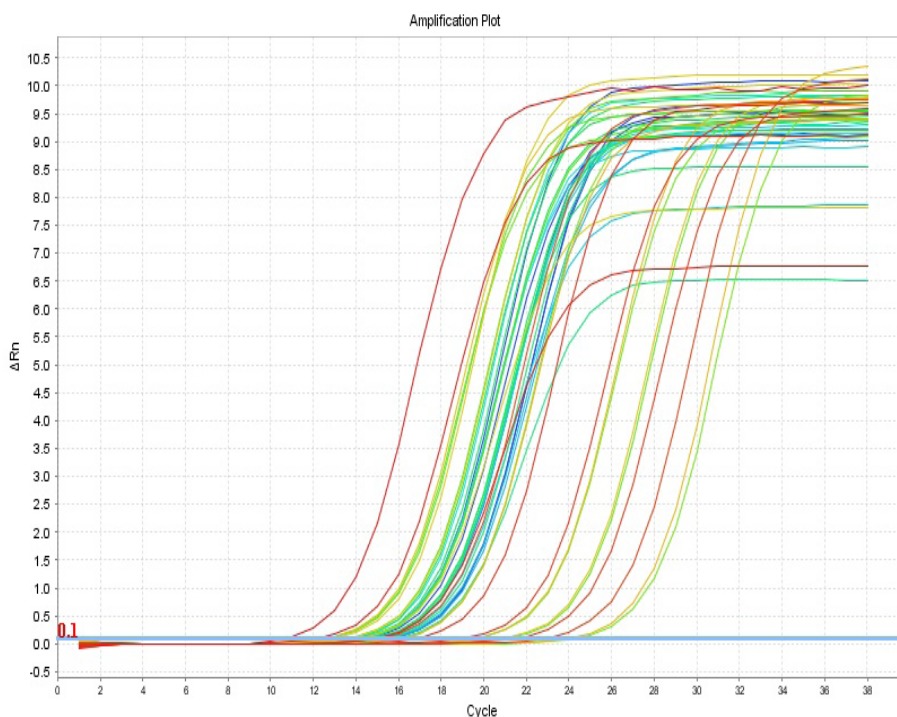
تصویر ۳. منحنی ذوب ژن 18s rRNA سنتز شده به روش برون تنی

و آمین‌ها است.

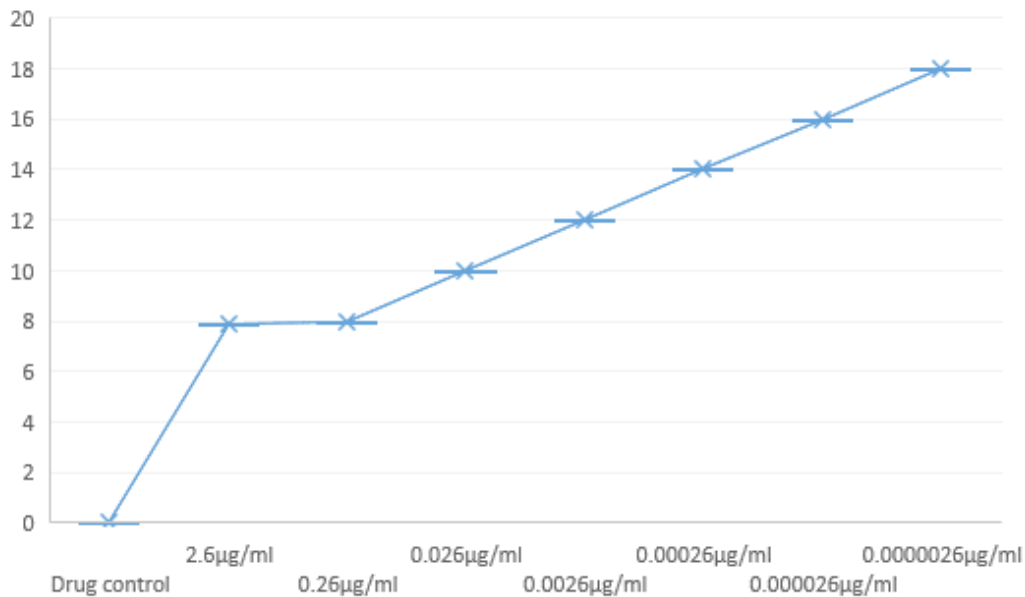
مهم‌ترین آنزیم‌ها شامل فسفولیپاز A<sub>2</sub>، آمینو اسید اکسیداز، فسفو دی استراز، استیل کولین استراز، آرژنین استر هیدرولاز و آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند. یکی از انواع تقسیم‌بندی عمومی زهر مارها، تقسیم‌بندی بر اساس تأثیرات آنها است که به نوروکسین، هموتوکسین، میوتوکسین و کاردیوتوکسین دسته‌بندی می‌شوند [۵، ۶].

که در ادامه تحقیقات به بررسی پروفایل متابولیت‌های انگل در حضور غلظت معینی از فراکشن فعال سم مار کبری، به منظور شناسایی محل‌های تأثیرگذاری این دارو روی متابولیسم انگل و تعیین متابولیت مؤثر در شکستن مقاومت دارویی مالاریا پیردازیم.

امروزه ثابت شده که زهر مار به عنوان یک منبع بیولوژیکی فعال، مخلوطی از پروتئین‌ها (آنزیمی و غیر آنزیمی) و ترکیبات غیر پروتئینی از قبیل فلزات، چربی‌ها، نوکلئوتیدها، کربوهیدرات‌ها



تصویر ۴. منحنی تکثیر ژن 18s rRNA سنتز شده جهت تست IC50 در روش برون تنی



تصویر ۵. تعیین  $IC_{50}$  اثر اکشن فعال حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی با روش Real-time PCR



جنس، گونه و تحت گونه میکروارگانیسم‌ها همچنین تعیین مقاومت دارویی اشاره کرد.

منگولد و همکاران برای افتراق گونه‌های پلاسمودیوم در نمونه ۳۵۸ بیمار در سنگاپور از روش Real-time PCR استفاده کردند. در این روش از رنگ سایبرگرین و از ژن 18s rRNA استفاده کردند و این روش ۰/۰۱- ۰/۰۲ پارازیتمی حساسیت داشت. ۸۲ بیمار که از نظر میکروسکوپی منفی گزارش شدند، با روش Real-time PCR از نظر پلاسمودیوم مثبت بودند [۱۴].

تیلر و همکاران با استفاده از روش DNA، Real-time PCR انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم را از خون کامل استخراج کرده و با استفاده از رنگ سایبرگرین و استفاده از ژن 18s rRNA به تعیین پارازیتمی پرداختند و این روش استخراج DNA انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم از خون کامل را روشی سریع، دقیق و به صرفه در شناسایی بیماران مشکوک پیشنهاد کردند [۱۵، ۱۷].

وجود یک آزمون اختصاصی و حساس برای تشخیص این انگل در تعیین  $IC_{50}$  بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش از روش Real-time PCR برای شناسایی انگل استفاده شد که روشی حساس و اختصاصی است. ژن 18s rRNA که برای طراحی پرایمر استفاده شده، دارای تعداد کپی زیادی در ژنوم انگل است.

در مطالعات پیشین از پرایمرهایی بر اساس ژن 18S rRNA برای تشخیص پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم ویواکس استفاده شده که مشابه پرایمرهایی هستند که در این تحقیق به کار رفته است. حساسیت این روش نسبت به روش متداول

جیلانوم و همکاران نشان دادند که کاهش فسفولیپید در محیط کشت پلاسمودیوم فالسیپاروم با استفاده از آلبومکس دو که لیپوپروتئین کمتری دارد، فعالیت آنتی‌پلاسمودیومی فسفولیپاز A2 (استخراج شده از زهر مار زنگی) را کاهش می‌دهد. نقش آنزیماتیک فسفولیپاز A2 در کنترل رشد انگل مالاریا در مطالعه جیلانوم و همکاران به وضوح نشان داده شده است [۱۸].

کاستیلو و همکاران به بررسی فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2 و فسفولیپاز هومولوگ شده حاصل از زهر مار Bothrop asper با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی پرداختند و نشان دادند که فسفولیپاز A2 و هومولوگ آن، اثر آنتی‌پلاسمودیومال دارند [۱۱].

مالوف و همکاران نشان دادند که کروتامین پلی‌پپتیدی از زهر مار زنگی آمریکای جنوبی با خواص نفوذ سلولی و خواص ضدقارچی و ضدانگلی می‌تواند از توسعه پلاسمودیوم فالسیپاروم در دز  $IC_{50}=1/87$  میکرومولار جلوگیری کند [۱۲]. از آنجا که شناسایی دقیق و سریع عوامل عفونی از مطالعات مهم جامعه پزشکی است، روش‌های مولکولی در موارد زیادی جایگزین مناسبی با روش‌های معمولی هستند. در میان روش‌های مولکولی، Real-time PCR (qPCR) گسترده‌تری روزافزونی در شناسایی عوامل عفونت‌زا یافته است، این روش که بر مبنای شناسایی و تکثیر ژنوم میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند، دارای حساسیت بسیار بالایی در تشخیص است، به طوری که قادر است تعداد بسیار اندک پاتوژن‌ها را که با روش‌های دیگر قابل شناسایی نیستند، تشخیص دهد.

از دیگر مزایای آن می‌توان به توانایی تشخیص عوامل عفونی در مراحل ابتدایی، حساسیت، ویژگی، دقت و سرعت در تعیین

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی ایران و انستیتو پاستور ایران برای تأمین اعتبارات لازم و همکاری در انجام آزمایشات تخصصی پروژه تشکر و قدردانی می‌کنند.

و معمولی مانند میکروسکوپی بیشتر است و نتایج این تحقیق با نتایج محققین قبلیدر این زمینه هم‌خوانی دارد [۱۹، ۲۰].

ابراهیم‌زاده و همکاران [۱۶] و ذاکری و همکاران [۲۰] از ژن 18s rRNA برای سنتز پرایمر استفاده کردند و Nested PCR را مناسب جهت تشخیص پلاسمودیوم از خون محیطی پیشنهاد کردند.

علاوه بر تأمین بودجه جهت خرید کیت و زمان رسیدن آنها، رشد سخت انگل و آلودگی محیط کشت آن، تنظیم-Real time PCR و عدم دسترسی آسان به مواد اولیه و آنزیم را می‌توان از مهم‌ترین محدودیت‌ها و مشکلات تحقیق نام برد.

### نتیجه‌گیری

تعیین بار انگلی با روش مولکولی qPCR تأییدکننده قطعی روش‌های تعیین‌کننده بار انگلی به روش‌های رنگ‌آمیزی و سنجش لاکتات دهیدروژناز انگل بود که در مطالعه قبلی انجام شده بود.

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد اثر ضد پلاسمودیومی فراکشن فعال سم مار کاملاً مشهود است. این نتایج امیدوارکننده، انگیزه را برای ادامه تحقیقات پیشرفته در این زمینه ایجاد می‌کند؛ بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، رسیدن به ایجاد داروهای آنتی‌مالاریای مؤثر جدید پس از تحقیقات سیستماتیک در این زمینه خیلی دور از ذهن نخواهد بود.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران این مقاله را تأیید کرده است (کد اخلاق: IR.IUMS.REC1395.9223651202).

#### حامی مالی

این تحقیق از پروژه تحقیقاتی (شماره: IR.IUMS.REC1395.9223651202) دانشگاه علوم پزشکی ایران بودجه دریافت کرده است.

#### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.



## References

- [1] Chirebvu E, Chimbari MJ, Ngwenya BN. Assessment of risk factors associated with malaria transmission in tubu village, northern botswana. *Malaria Research and Treatment*. 2014; 2014:403069. [DOI:10.1155/2014/403069] [PMID] [PMCID]
- [2] Sant'Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG, Fuly AL, et al. BjuSSuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2008; 151(3):443-54. [DOI:10.1016/j.cbpa.2007.02.036] [PMID]
- [3] Utkin YN. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*. 2015; 6(2):28-33. [DOI:10.4331/wjbc.v6.i2.28] [PMID] [PMCID]
- [4] Liu CC, Yang H, Zhang LL, Zhang Q, Chen B, Wang Y. Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014; 15(12):4753-8. [DOI:10.7314/APJCP.2014.15.12.4753] [PMID]
- [5] Dhananjaya BL, Sivashankari PR. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; An overview. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015; 15(7):649-57. [DOI:10.2174/1568026615666150225113402] [PMID]
- [6] Malleswari M, Josthna P, Doss PJ. Orally Administered Venom of Naja Naja Alters Protein Metabolic Profiles in the Liver of Albino Rats. *International Journal Of Life Sciences Biotechnology And Pharma Research*. 2015; 4(1):10-6. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.676.7515&rep=rep1&type=pdf>
- [7] Heydari P, Nateghpour M, Mazhari N, Motevalli Haghi A, Farivar L, Souri E, et al. Evaluation of Effectiveness of Ethanolic Extract of *Curcuma longa*, discretely and in Combination with Chloroquine against Chloroquine-Sensitive Strain of *Plasmodium berghei*. *Herbal Medicines Journal*. 2018; 3(4):133-8. <http://eprints.lums.ac.ir/id/eprint/1961>
- [8] Garedaghi Y, Khaki A. Evaluation of the effectiveness of ethanolic extract of *solanum surrattense* against *plasmodium berghei* in comparison with chloroquine in sourian mice using in vivo tests. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*. 2014; 1(3):76-9. <http://www.cjmb.org/text.php?id=113>
- [9] Massimine KM, McIntosh MT, Doan LT, Atreya CE, Gromer S, Sira-waraporn W, et al. Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(9):3132-41. [DOI:10.1128/AAC.00621-06] [PMID] [PMCID]
- [10] Ebrahim K, Vatanpour H, Zare A, Shirazi FH, Nakhjavani M. Anticancer activity a 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] [PMCID]
- [11] Castillo JC, Vargas LJ, Segura C, Gutiérrez JM, Pérez JC. In vitro anti-plasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxins*. 2012; 4(12):1500-16. [DOI:10.3390/toxins4121500] [PMID] [PMCID]
- [12] El Chamy Maluf S, Dal Mas C, Oliveira EB, Melo PM, Carmona AK, Gazarini ML, et al. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. *Peptides*. 2016; 78:11-6. [DOI:10.1016/j.peptides.2016.01.013] [PMID]
- [13] Hajjalilani F, Elmi T, Mohamadi M, Sadeghi S, Shahbazzadeh D, Ghafarifar F, et al, Analysis of the active fraction of Iranian *Naja naja oxiana* snake venom on the metabolite profiles of the malaria parasite by 1HNMR in vitro. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020; 23(4):534-43. [DOI:10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005]
- [14] Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(5):2435-40. [DOI:10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005] [PMID] [PMCID]
- [15] Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. *Malaria Journal*. 2011; 10:244. [DOI:10.1186/1475-2875-10-244] [PMID] [PMCID]
- [16] Ebrahimzadeh A, Fouladi B, Fazaeli A. High rate of detection of mixed infections of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in South-East of Iran, using nested PCR. *Parasitology International*. 2007; 56(1):61-4. [DOI:10.1016/j.parint.2006.12.001] [PMID]
- [17] Taylor SM, Juliano JJ, Trottman PA, Griffin JB, Landis SH, Kitsa P, et al. High-throughput pooling and Real-time PCR-based strategy for malaria detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(2):512-9. [DOI:10.1128/JCM.01800-09] [PMID] [PMCID]
- [18] Guillaume C, Deregnacourt C, Clavey V, Schrével J. Anti-Plasmodium properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A2 are serum-dependent. *Toxicon*. 2004; 43(3):311-8. [DOI:10.1016/j.toxicon.2004.01.006] [PMID]
- [19] Parvazi S, Sadeghi S, Azadi M, Mohammadi M, Arjmand M, Vahabi F, et al. The effect of aqueous extract of cinnamon on the metabolome of *Plasmodium falciparum* using 1HNMR spectroscopy. *Journal of Tropical Medicine*. 2016; 2016:3174841. [DOI:10.1155/2016/3174841] [PMID] [PMCID]
- [20] Zakeri S, Mamaghani S, Mehrizi A, Shahsavari Z, Raeisi A, Arshi S, et al. Molecular evidence of mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections in northern Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean health journal*. 2004; 10(3):336-42. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/119418>