مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طبّ مکمّل، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴

بررسی اثر سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی میزان بقای دودمان سلولی K-562

سعیده سلیمانی[۱]، مهناز آذرنیا[۲] *، زهره شریفی[۳]، هما سلیمانی[۴]، مهسا زمانیان[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم جانوری گرایش سلولی – تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲. استاد، دکترای بافت – جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۳. دانشیار، دکترای ویروس‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، مؤسسه‌ی عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
۴. استادیار، دکترای بیوفیزیک، گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۵. کارشناس آزمایشگاه، کارشناس ارشد زیست‌مولکولی– ژنتیک، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، مؤسسه‌ی عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۹

چکیده

مقدمه: لوسمی میلوئیدی مزمن، یک بیماری بدخیم است و داروهای مختلفی جهت درمان آن پیشنهاد می‌شود؛ اما هیچ‌کدام از آن‌ها به‌صورت کامل قادر به بهبود بیماری نیست. اخیراً سمّ عقرب به‌عنوان ماده‌ای با فعّالیت ضدّ سرطان در رده‌های سلولی معرفی شده است. در مطالعه‌ی حاضر، اثر سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده‌ی سلولی k-562 به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی سرطان میلوئیدی مزمن، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه‌ی تجربی است که در آن به‌منظور تعیین IC50، سلول‌های k-562 در محیط کشت RPMI محتوی ۱۰٪ سرم جنین گاو و ۱٪ پنی‌سیلین– استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰µg/ml تا ۱/۹۵) از سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس تیمار شدند. اثر سمّیت سلولی زهر عقرب علیه سلول‌های سرطانی K-562 با روش MTT بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Prism نسخه‌ی ۶ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سم، میزان غلظت IC50 برای سم برابر µg/ml ۶۲/۵ بود. نتایج این تحقیق معلوم کرد که اثر این سم بر روی سلول‌های K-562 در مقایسه با کنترل وابسته به زمان است. میانگین درصد سلول‌های زنده‌مانده در مقایسه با سلول‌های درمان‌نشده (کنترل) در غلظت‌های ۱۲۵µg/ml، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵، به ترتیب، برابر ۱/۱۲± ۴۰/۶۹، ۱۰/۵± ۵۴/۹۲ و ۹/۴۳± ۵۳/۵۸ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش، این سم می‌تواند به‌عنوان یک انتخاب مناسب برای تحقیقات بیشتر در مهار لوسمی میلوئیدی مزمن مطرح شود.

کلیدواژه‌ها: ضدّ سرطان، سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس، K-562، IC50، آزمون MTT.

*نویسنده‌ی مسئول: E.mail: Azarnia@khu.ac.ir

مقدمه

سرطان در دهه‌های آینده یکی از علل مهم بار بیماری در جهان خواهد بود و انتظار می‌رود تعداد موارد جدید این بیماری به ۱۰ میلیون نفر در سال ۲۵۲۵ افزایش یابد (۱). سرطان‌های سیســـتم خون‌ساز از شایع‌ترین بدخیمی‌های بـدن هستند؛ به‌طوری‌که سرطان لوسمی هشتمین سرطان شایع بدن بوده و در کل ۴/۰۲٪ از سرطان‌های زنان و ۴/۸۹ ٪ از سرطان‌های مردان را شامل می‌شود (۱). در حال حاضر داروهایی که در درمان لوسمی به کار گرفته می‌شوند، عمدتاً به دلیل ایجاد مقاومت به دارو اثر خود را از دست می‌دهند؛ لذا تلاش در جهت به‌کارگیری داروهایی با پتانسیل بالا که اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی را ندارند و می‌توانند در درمان سلول‌های سرطانی مؤثر واقع شوند، ادامه دارد (۲).

امروزه منابع طبیعی جایگاه خاصی در ساخت داروها و درمان بیماری‌ها پیدا کرده‌اند؛ به‌طوری‌که قریب به ۲۳٪ از داروهای جدیدی که اجازه‌ی تجویز از سازمان دارو و غذا [1](FDA) گرفته‌اند با تکیه‌بر مواد طبیعی تولید و ساخته شده‌اند (۳). زهر حیوانات و سموم با منبع طبیعی نیز به‌عنوان یک ابزار درمانی بالقوه جایگاه خود را در کاربردهای زیست‌پزشکی پیدا کرده است (۴). یکی از خصوصیات مهم داروهای ضدّ سـرطان اثر سیتوتوکسیک آن‌ها روی سلول‌های سرطانی است. تحقیقات اخیر حاکی از آن است که بعضی از عوامل سیتوتوکسیک در زهر جانوران سمّی مانند مار و عقرب وجود دارد (۵). به‌طورکلی زهر عقرب‌ها از موکوس، الیگوپپتیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آلی دیگر و نیز از آنزیم‌هایی همچون فسفولیپاز، هیالورونیداز و مولکول‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین مثل سروتونین، هیستامین، مهارکننده‌های پروتئاز و آزادکننده‌های هیستامین تشکیل شده است (۶ و ۷). مطالعات بر روی سموم طبیعی و زهر عقرب‌ها رو به افزایش است و بیان‌کننده‌ی اثرات ضدّ تکثیری، القاء اپاپتوز و اثر مهاری در رشد سرطان و متاستازی این ترکیبات در شرایط in vivo و in vitro می‌باشد (۴، ۷). اخیراً سمّ عقرب منبع مورد توجهی برای معالجه‌ی سرطان بوده است (۸).

استفاده از سمّ عقرب‌های گونه‌های Leiurus quinquenstriatus و Buthus martensii Karsh (BMK) به‌عنوان محصولات طبیعی جهت درمان سرطان قبلاً شناخته شده بود (۹). به‌علاوه در مورد عملکرد سیتوتوکسیک سمّ عقرب سیاه هندی Heterometrus bengalensis روی لوسمی سلول‌های انسانی مقالاتی منتشر شده است (۱۰). در ایران، عقرب‌های خانواده‌ی بوتیده و اسکورپیونیده سمّ خطرناک تولید می‌کنند که بیشترین آمار مرگ‌ومیر مربوط به آن‌هاست. از بین این عقرب‌ها، عقرب همیسکورپیوس لپتوروسHemiscorpius lepturus، متعلق به خانواده‌ی بوتیده که به زبان محلی به آن «گادیم» می‌گویند در نواحی جنوبی و جنوب غربی ایران به فراوانی یافت می‌شود. این عقرب از نظر پزشکی، مهم‌ترین گونه‌ی عقرب در ایران است که معمولاً کمتر از ۹ سانتی‌متر طول دارد و با دم تسبیح‌شکل خود، به‌آسانی تشخیص داده می‌شود (۱۱). همیسکورپیوس لپتوروس دارای سمّ سیتوتوکسیک بسیار قوی است؛ به‌طوری‌که اگر در منطقه‌ی خوزستان حدود ۱۵ – ۱۰٪ گزش‌ها مربوط به این عقرب باشد، ۹۵٪ موارد مرگ در اثر نیش‌زدگی، مربوط به این عقرب است. یافته‌ها نشان می‌دهند که ویژگی‌های مشخصه‌ی بالینی تولیدشده به‌وسیله‌ی این عقرب، به‌طور قابل توجهی متفاوت از دیگر عقرب‌هایی است که در جهان گزارش شده است (۱۲، ۱۳).

ماکروملکول‌ها در سطح سلول‌های سرطانی به‌صورت بالقوه اهداف مناسبی برای مداخلات درمانی هستند. اجوزف و همکاران اثرات مختلفی برای سمّ عقرب ازجمله اثر ضدّ سرطانی را بیان کردند که این تأثیر ناشی از مهار کانال‌های سدیم، پتاسیم و کلر به‌وسیله‌ی این سموم است (۴ ، ۸).

سم‌ها درواقع، پروتئین‌های کشنده‌ی سلولی قوی هستند که با اتصال به گیرنده‌های حدّ واسط اندو سیتوتوکسیک

[1] .Food and Drug Administration

می‌توانند بر بخش داخلی سلول پستان‌داران اثر بگذارند (۱۴).

هدف از اجرای این تحقیق، بررسی اثر سیتوتوکسیک سمّ خالص عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی میزان رشد و درصد حیات دودمان سلول سرطانی k-562 می‌باشد؛ چرا که از سویی توانایی سموم طبیعی در اتصال هدفمند به سطح طیف وسیعی از سلول‌ها امید تازه‌ای برای ساخت داروهای ضدّ سرطان ایجاد کرده است (۱۵) و از سوی دیگر تعادل بین اثرات دارویی و سمّی یک ترکیب، عامل تعیین کننده ی مهمی است که توانایی کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت رده‌ی سلولی k-562:

رده‌ی سلولی k-562 از بانک سلول انستیتو پاستور خریداری شد. محیط کشت این سلول‌ها RPMI 1640(Sigma) محتوی ۱۰٪ سرم جنین گاو FBS[1] (Gibco) و ۱٪ پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Roche 500X) بود که سلول‌ها در آن شناور بودند. فلاسک محتوی سلول‌های k-562 تهیه‌شده در زیر هود لامینار، به‌خوبی ضدّ عفونی شد و به انکوباتور دارای دمای ۳۷°C و هوای مرطوب با غلظت ۵ درصد CO2 انتقال یافت. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت تعویض شد و سلول‌ها پاساژ شدند. برای انجام آزمایش‌ها، از پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی استفاده شد.

شمارش سلول‌ها

برای شمارش و بررسی توان بقاء سلول‌ها از لام نئوبار و تکنیک رنگ‌آمیزی با محلول تریپان‌بلو (Sigma) استفاده شد.

برای تهیه‌ی محلول تریپان‌بلو ۰/۴٪، مقدار g ۰/۲ پودر توزین و در ۵۰ml بافر فسفات‌سالین (PBS)[2] حل شد. برای جلوگیری از رشد قارچ و مخمّر، به آن سدیم آزاید ۰/۲٪ اضافه شد.

– محاسبه‌ی تعداد سلول‌های زنده و مرده در هر میلی‌لیتر با توجه به ضریب رقت (۲) و ضریب حجم (10^4) لام نئوبار، به شکل زیر بود (۱۶):

$$\text{Cells}/\text{ml} = \frac{\text{Average of cells}}{\text{mm}^2} \times 2 \times 10^4$$

طرز تهیه‌ی سم:

سمّ عقرب به‌صورت لیوفیلیزه از مؤسسه‌ی رازی خریداری شد. این سم تا قبل از محلول‌شدن در دمای c °۲۰- قابل نگهداری بود و بعد از محلول‌شدن به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در ۴°c قابل استفاده بود. سپس ۱ میلی‌گرم از سم در ۱ میلی‌لیتر PBS حل شد که در نتیجه ۱۰۰۰ میکروگرم سم محلول در یک میلی‌لیتر به دست آمد. آنگاه رقیق‌سازی به‌صورت نسبت ۱ به ۱ با PBS انجام شد و رقت‌های بعدی ۱/۹۵، ۳/۹۰، ۱۵/۷،۷/۸۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵ به دست آمد.

تعیین IC50[3]

این میزان بیان‌گر غلظتی از داروست که ۵۰٪ از فعّالیت بیولوژیکی سلول‌های سرطانی k-562 را در مقایسه با کنترل مهار می‌کند. اندازه‌گیری IC50 با استفاده از محلول رنگی تریپان‌بلو و سنجش آن با لام هموسایتومتر (نئوبار) انجام شد. علاوه بر این، از روش دقیق‌تر آزمون MTT[4] نیز برای اندازه‌گیری IC50 استفاده شد.

آزمون MTT

در این مطالعه جهت بررسی درصد حیات سلول‌های کشت-داده‌شده در معرض غلظت‌های مختلف سم در قیاس با سلول‌های کنترل (سلول‌های سرطانی k-562 که در همان شرایط محیطی رشد یافتند اما تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سم قرار نگرفتند) از روش MTT استفاده شد. جهت ارزیابی سلول‌های تکثیرشده، تعداد 10^4 × ۱ سلول درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد. برای هرکدام از غلظت‌های ذکرشده‌ی سم، ۳ چاهک از پلیت و ۳ چاهک نیز برای گروه کنترل (بدون تیمار با

1.Fetal Bovine Serum
2.Phosphate Buffered Saline
3. The half maximal inhibitory concentration.
4. Multi-Table Tournament

سم) به‌موازات آزمون‌ها در نظر گرفته شد. سلول‌ها در گروه‌های مختلف ۴۸ ساعت انکوباسیون نگهداری شدند. با این روش درصد حیات سلول‌ها در طول موج‌های خاص (۶۰۰-۵۰۰ نانومتر) به روش اسپکتروفوتومتری سنجیده شد. لازم به ذکر است هر غلظت از سم به‌صورت ۳ بار تکرار، آزمایش شد و میانگین این اندازه‌گیری‌ها به‌عنوان نتیجه‌ی نهایی گزارش شد.

آزمون فلوسایتومتری

به‌منظور بررسی میزان زنده بودن سلول‌های کشت‌داده شده در معرض غلظت‌های انتخابی سم و زمان تیمار با سم، از کیت Annexin-V FITC Apoptosis استفاده شد و مراحل فوق با استفاده از این آزمون انجام گرفت. بعد از جمع‌آوری سلول‌های تیمارشده‌ی مجاور با ترکیب خاص کیت، سلول‌ها به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ در دور ۸۰۰g رسوب داده شدند. در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها دو بار با PBS سرد شست‌وشو داده شدند و ۱ میلی‌لیتر از بافر اتصال Annexin-V، ۱۰µl از Annexin-V به نمونه‌ها اضافه گردید. این نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند و حداکثر تا یک ساعت بعد با دستگاه فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفتند. در این تکنیک، تک‌تک سلول‌هایی که به‌صورت سوسپانسیون درآمده‌اند مورد بررسی قرار می‌گیرند. در سلول‌های زنده‌ی سالم، آنکسین V به سطح خارجی غشاء متصل نمی‌شود ولی در سلول‌های مرده چون تمامیت غشاء از بین رفته آنکسین V به فسفاتیدیل سرین که در برگه‌ی داخلی غشاء قرار گرفته است می‌چسبد و باعث می‌شود که سلول‌ها آنکسین مثبت شوند. لازم به ذکر است هر غلظت از سم به‌صورت ۸ بار تکرار، آزمایش شد و میانگین این اندازه‌گیری‌ها به‌عنوان نتیجه‌ی نهایی گزارش شد.

آنالیز آماری

اطلاعات ثبت‌شده با کمک آزمون‌های آماری اختصاصی One way ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار پریسم صورت گرفت. بیان اطلاعات کمّی به‌صورت Mean±SD بود. برای آنالیز آماری قیاس متغیرهای کمّی از آزمون‌های t-test و ANOVA استفاده شد. لازم به ذکر است زمانی که ارزش p کمتر از ۰/۰۵ بود تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به‌منظور بررسی اثر سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس و تعیین اثر مهاری سم در مقایسه با گروه کنترل بر روی حیات سلولی k-562 با توجه به غلظت‌های مختلف سمّ خالص، بر مبنای مطالعات قبلی (۱۰، ۱۸، ۱۷) دوز ۱۰۰۰ الی ۱/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد (نمودار شماره‌ی ۱).

نتیجه‌ی مشهودی از کاهش قابل توجهی از زنده‌بودن سلول در برابر غلظت‌های مختلف سم وابسته به زمان وجود داشت ($p<0/05$). در گروه کنترل مرگ سلولی مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت سم، میزان مرگ سلولی افزایش یافت. میزان مرگ‌ومیر در تیمارهای مختلف ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$). غلظت ۶۲/۵ میکروگرم که باعث مرگ ۵۰٪ از سلول‌های k-562 شد به‌عنوان IC50 انتخاب شد (نمودار شماره‌ی ۱).

به‌منظور بررسی دقیق میزان بقای سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، برای گروه‌های کنترل و تیمارشده با غلظت‌های انتخابی سم، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۸ سری آزمایش انجام و میانگین و انحراف معیار آن گزارش شد. میانگین درصد سلول‌های زنده پس از تیمار با ۳ غلظت انتخابی ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با حالت کنترل در جدول شماره‌ی ۱ گزارش شد.

آنالیز آماری (با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری) اختلاف معنی‌داری را پس از ۲۴ ساعت بین گروه‌های مختلف تیمارشده با سم در غلظت‌های مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و گروه کنترل نشان نداد ($p>0/05$) (جدول شماره‌ی ۱)؛ اما این اختلاف پس از ۴۸

ساعت بین غلظت انتخابی سم با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). درحالی‌که گروه‌ها پس از ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری را در میانگین درصد بقای سلولی در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با یکدیگر نشان ندادند ($p>۰/۰۵$). تکنیک دقیق فلوسایتومتری تأییدی بر نتایج حاصل از آزمون MTT بود. میانگین درصد سلول‌های زنده‌مانده (با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری) پس از تیمار با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل در نمودار شماره‌ی ۲ نشان داده شده است.

بحث

داده‌های به‌دست‌آمده از نتایج این مطالعه نشان داد که ۲۴ ساعت پس از تیمار با ۳ غلظت انتخابی سم، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف سم با هم و با گروه کنترل وجود نداشت. هر چند، دوز ۶۲/۵ میکروگرم سم نسبت به گروه‌های دیگر اختلاف نشان داد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. داده‌ها نشان داد که درصد سلول‌های زنده، ۴۸ ساعت بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف سم نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کمتر بود.

در یک تحقیق مشاهده شد که سمّ همیسکورپیوس لپتوروس، علاوه بر لیزشدن وابسته به دوز گلبول‌های قرمز انسانی، دارای فعّالیت فسفولیپازی در کنار آزادسازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز است (۱۹). فسفولیپازها در فعّالیت‌های سیستم ایمنی و در تکثیر و تمایز سلول‌های سرطانی نقش دارند (۲۰). همچنین یافته‌ها نشان داده‌اند که هیالورونیداز تنها آنزیمی است که به‌طور قابل توجهی در زهر عقرب‌های خانواده‌ی بوتیده وجود دارد (۶ ، ۲۱). به نظر می‌رسد آنزیم هیالورونیداز با جدا کردن سلول‌ها از بستر ظرف کشت، باعث مرگ سلولی می‌شود (۶).

گروه III فسفولیپازها عمدتاً در زهر غیر مهره‌دارانی همچون عقرب‌ها و زنبور عسل پیدا شده‌اند (۶). مطالعات نشان می‌دهند که ترشح فسفولیپاز A۲ که به خانواده‌ی III این آنزیم تعلق دارد سبب القای آپوپتوز نورونی گسترده در کشت سلول‌های کورتیکال مغز می‌شود (۲۲).

پریور و همکاران به بررسی اثرات سمّ زنبور عسل بر القاء تمایز رده‌ی سلولی K-562 به سمت دودمان اریتروئیدی پرداختند. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد زهر زنبور عسل در غلظت ۵/۵ الی ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت و غلظت‌های ۳/۵ الی ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت باعث مرگ۵۰ ٪ سلول‌ها می‌شود (۲۳). نتایج مطالعه‌ی لیو و همکاران نشان داد سمّ عقرب Macrothele raveni بر روی رشد رده‌ی سلولی k-562 اثر مهاری دارد. در مطالعه‌ی آن‌ها میزان IC50 این سم، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین اثر مهاری این سم بر روی لنفوسیت‌های طبیعی انسان باIC50 در غلظت حدود ۳۶/۴ میکروگرم / میلی‌لیتر مشاهده گردید (۲۴). درحالی‌که در تحقیق حاضر، میزان IC50، ۶۲/۵ میکروگرم گزارش شد که این مسئله نشان‌دهنده‌ی آن است که سمّ عقرب نوع غیر بومی نسبت به سم عقرب مورد ارزیابی ما و زهر زنبور عسل نسبت به هر دوی آن‌ها از قدرت بالاتری در نابودی سلول‌ها برخوردار است و قادر است سلول‌ها را با دوز کمتر از بین ببرد. در مطالعه‌ی حاضر سلول‌های غیر تیماریافته در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند و میزان تکثیر و بقای یکسانی را در هر دو زمان مورد مطالعه داشتند. در پژوهش دیگر مشخص شد که سمّ عقرب سیاه هندی با مقادیر IC50 با غلظت ۴۱/۵μg/ml و ۸۸/۳ μg/ml، به ترتیب، باعث مهار رشد سلول‌های لوکمیای انسانی U937 و K-562 می‌گردد. اما در تحقیق حاضر به دنبال سنجشMTT با استفاده از فاکتور IC50 و القاء مهار رشد سلول به نصف میزان کنترل (در غلظت۶۲/۵ μg/ml)، نشان‌دهنده‌ی میزان سمّ کمتر مورد نیاز نسبت به زهر عقرب هندی بود و قدرت مهار رشد سلولی در سمّ عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بیشتر بود. یکی از پروتئین‌های موجود در سمّ عقرب ازجمله سمّ عقرب سیاه هندی، پروتئینی به نام

بنگالین است. این پروتئین از خواص ضدّ تکثیر، سیتوتوکسیک و فعّالیت آپوپتوژنیک بر روی سلول‌های لوسمیک انسانی U937 (لنفوم) و K-562 (لوسمی میلوئیدی مزمن) برخوردار است. نتایج، حاکی از آن است که مکانیسم مولکولی پروتئین بنگالین برای اثر ضدّ سرطانی بر روی سلول‌های لوسمی انسانی به‌واسطه‌ی آبشار مرگ میتوکندری انجام می‌شود (۱۰). سمّ همیسکورپیوس لپتوروس به علت تقویت تأثیرش در کنار منیزیم و کلسیم یک متالو پروتئیناز بوده و باعث ایجاد سلول‌های روحی به علت خروج هموگلوبین می‌شود (۲۵).

شهرام‌یار و همکاران نشان دادند که در سلول‌های سرطانی میلوئیدی HL-60 که به مدت ۲۴ ساعت در معرض ICD-85 (ترکیب پپتیدی مشتق از سمّ مار halys Agkistrodon و عقرب همیسکورپیوس لپتوروس) قرار گرفتند تغییرات مرفولوژیکی نظیر کوچک‌شدن نسبت هسته به سیتوپلاسم، جمع‌شدن سیتوپلاسم، متراکم‌شدن محتویات هسته‌ای، افزایش واکوئل‌های سیتوپلاسمی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک و تخریب میتوکندری به وقوع پیوست. دوزهای سمّ مورد استفاده در این آزمایش از ۴۰ تا ۴×۱۰^{-۵} میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. میزان IC50 برابر ۰/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. تغییرات مرفولوژیکی مشخص آپوپتوتیک به‌وسیله‌ی سمّ ترکیبی در این مطالعه اثبات شد (۱۸). در تحقیق حاضر، مشاهده‌ی میکروسکوپی سلول‌ها نیز بیان‌گر آن بود که با افزایش زمان، میزان مرگ سلول‌ها افزایش می‌یابد؛ به شکلی که در ۴۸ ساعت، این سلول‌ها به‌تدریج از مرحله‌ی خوشه‌ای به مرحله‌ی تک یا چند سلولی در می‌آیند و در نهایت فقط فضای ظاهری از غشاء سلول باقی می‌ماند.

اگرچه غلظت‌های مختلف سم بر روی درصد سلول‌های زنده با هم تفاوت داشتند اما این تفاوت وابسته به غلظت در محدوده‌ی آزمایشی نبود و در سه غلظت بهینه‌ی ۳۱/۲۵μg/ml، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میزان میانگین درصد بقای سلولی به ترتیب برابر ۱/۱۲± ۴۰/۶۹، ۱۰/۵± ۵۴/۹۲ و ۹/۴۳± ۵۳/۵۸ بود که بیان‌گر روند منفی رشد بود و نشان می‌داد که تأثیر سم وابسته به زمان است.

در مطالعه‌ی سانگ و همکاران مشخص شد که نوعی پپتید حاصل از سمّ عقرب بر روی رده‌ی سلولی THP-1 که از رده‌ی سلولی سرطانی میلوئیدی است، قادر است با مهار مسیر NF-kB رشد سلول‌های مزبور را مهار کرده و تقسیم سلولی را در فاز G1 متوقف کند (۲۶). این احتمال وجود دارد که آنزیم‌های موجود در زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس قادر به افزایش مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در رده‌ی سلولی k-562 شوند که برای این فرضیه نیاز به پژوهش‌های بعدی است.

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که زهر عقرب با وجود اجزا و ترکیبات مختلف خود، پتانسیلی قوی در درمان بیماری‌های انسانی دارد (۲۷، ۲۸). تعادل بین اثرات دارویی و سمّی یک ترکیب، عامل تعیین کننده ی مهمی است که امکان کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند (۱۸).

نتایج این مطالعه نشان داد غلظت‌های ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم که باعث مرگ سلول‌های k-562 پس از ۴۸ ساعت می‌گردند تفاوت معناداری را از نظر بقا نسبت به یکدیگر در این بازه‌ی زمانی نشان نمی‌دهند (نتایج حاصل از آن‌ها با وجود تکرار زیاد نزدیک به هم بود). لذا پیشنهاد می‌شود که آزمایش‌های مکمّل جهت تعیین دوزی از سم که موجب افزایش آپوپتوز گردد صورت گیرد و مشخص گردد که آیا میزان نکروز و آپوپتوز اولیه و تأخیری پس از ۴۸ ساعت نسبت به هم و نسبت به گروه کنترل، تفاوتی در این ۳ غلظت دارد یا خیر؟

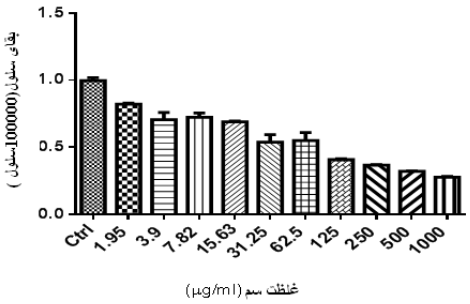
نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، نتایج این مطالعه نشان داد که این سم قادر است در یک رفتار وابسته به زمان و وابسته به غلظت باعث مرگ سلول‌های سرطانی K-562 شود؛ اما مطالعات بیشتر در جهت میزان و درصد مرگ به‌صورت آپوپتوزیس و نکروز با توجه به غلظت اپتیمم و زمان مذکور لازم است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه‌ی خانم سعیده سلیمانی در دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شمال می‌باشد که با شماره‌ی ۱۶۲ به تصویب رسیده است.

نویسندگان مقاله از مسئولان و کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی سازمان انتقال خون ایران، به خاطر همکاری‌های لازم جهت اجرای این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

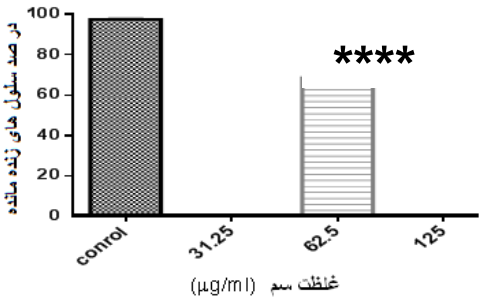


نمودار شماره‌ی (۱) اثر غلظت‌های مختلف سم بر بقاء سلول‌ها در رده‌ی سلولی k-562 را با استفاده از تکنیک MTT

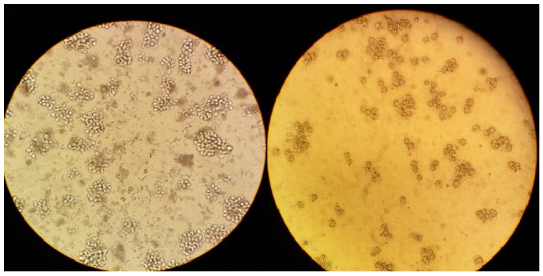
جدول شماره‌ی (۱) میانگین درصد سلول‌های زنده‌مانده پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های k-562 با غلظت‌های انتخابی سمّ عقرب

وضعیت سلولی / غلظت سم (µg/ml)	انحراف معیار ± میانگین درصد سلول زنده
۰	۹۷/۵۸±۱/۰۳۹
۳۱/۲۵	۹۲/۸۶±۲/۵۹
۶۲/۵	۹۳/۲۸±۳/۵۸
۱۲۵	۹۵/۰۷±۱/۱۱

با استفاده از روش فلوسایتومتری میانگین در صد سلول‌های زنده‌مانده به دست آمد



نمودار شماره‌ی (۱) میانگین درصد سلول‌های زنده‌مانده‌ی سلول‌های k-562 با استفاده از روش فلوسایتومتری، ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های انتخابی سم (معناداری به‌وسیله‌ی آزمون ANOVA در مقایسه با کنترل نشان داده شده است). داده‌ها به‌صورت Mean±SD برای هر غلظت سم بیان شده است (***(p<۰/۰۰۱).



شکل شماره‌ی (۱) رده‌ی سلولی k-562 قبل از مجاورت با سم عقرب با بزرگ‌نمایی ۴۰ (سمت چپ)

رده‌ی سلولی k-562 پس از مجاورت با سم عقرب در مرحله‌ی مرگ سلولی با بزرگ‌نمایی ۴۰ (سمت راست)

References:

1. Ravaria M, Sadeghian MH, Ebrahimzadeh S, Daneshvar D. Frequency of ABO and Rh blood groups in patiens with acute leukemia. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2011;13(1):126-31.
2. Mousavi M, Moasses Ghaffari S, Asadi M , Osevdy Kermani A. effect of Carbenoxolone growth inhibition and apoptosis in cell line k562. Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2012;16(1):27-37.[persian]
3. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. Nature. 2004;432(7019):829-37.
4. Joseph B GJ. Scorpion toxins and its applicationsInternational. Journal of Toxicological and Pharmacological Research. 2012;4:57-61.
5. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. Indian journal of experimental biology. 2010;48(2):93-103.
6. Kadkhodaei–Elyaderan M, Amozgari Z, Hanifi H. Hyaluronidase and phospholypase activity in the venom of Mesobuthus Epeus epeus Scorpion. KAUMS Journal (FEYZ). 2007;10(4):24-30.[persian]
7. Ding J, Chua PJ, Bay BH, Gopalakrishnakone P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. Experimental biology and medicine. 2014;239(4):387-93.
8. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion Buthus martensi Karsch. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2002;40(9):1239-58.
9. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. The Biochemical journal. 1997;326 (1):1-16.
10. Das Gupta S, Debnath A, Saha A, Giri B, Tripathi G, Vedasiromoni JR, et al. Indian black scorpion (Heterometrus bengalensis Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. Leukemia research. 2007;31(6):817-25.
11. Isazadehfar KH EL, Entezariasl M. Epidemiology of Scorpionism in southwest, Iran, 2008. Iranian Journal of Epidemology. 2013;8(4) :54-60.
12. Pipelzadeh MH, Jalali A, Taraz M, Pourabbas R, Zaremirakabadi A. An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2007;50(7):984-92.
13. Behdani M, Hosseininejad chafi M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad Shahreza H, Ghasemi P, et al. Antiserum production in immunized camel by the venom of Hemiscorpius lepturus scorpion: evaluation of neutralizing test in vivo. Tehran University of Medical Sciences. 2010, 68(5): 268-273. [persian]
14. Fitzgerald D .Why toxins ! Semin Cancer Biol. 1996;7(2):87-95.
15. Hmed B, Serria HT, Mounir ZK. Scorpion peptides: potential use for new drug development. Journal of toxicology. 2013;2013:95-97.
16. Stoddart MJ. Mammelian cell viability methods and

protocols(molecular and biology), New York:,Humana press; 2011.

17. Zargana J, Umar S, Sajad M, Naime M, Shakir A, Khan H A. Scorpion venom (Odontobuthus doriae) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in humanbreast cancer cells (MCF-7). Toxicology in Vitro. 2011; 25(8):1748–1756.
18. Shahramyar Z, Zare Mirakabadi A, Morovati H. Cytotoxicity effect of ICD-85 (Venom–derived peptides) on promyelocytic cancer cell lines (HL-60). Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2012;21(4):238-43. [persian]
19. Dehghani R, Fathi B. Scorpion sting in Iran: A review. Toxicon. 2012;60(5):919-33.
20. Song Y, Wilkins P, Hu W, Murthy KS, Chen J, Lee Z, et al. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 suppresses proliferation and tumorigenicity of ovarian carcinoma cells. The Biochemical journal. 2007;406(3):427-36.
21. Arena JM. Venoms: Chemistry and Molecular Biology. JAMA. 1977;238(19):2075–80.
22. Sun GY, Shelat PB, Jensen MB, He Y, Sun AY, Simonyi A. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. Neuromolecular medicine. 2010;12(2):133-48.
23. Parivar K, Nabiuni M, Mohseni Kouchesfehani H, Ramezani T, amini E. The effect of Honey bee venom on induction of differentiation of k562 cell line to erythroid linage. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2013;22(4):244-50.[persian]
24. Liu Z, Zhao Y, Li J, Xu S, Liu C, Zhu Y, et al. The venom of the spider Macrothele raveni induces apoptosis in the myelogenous leukemia K562 cell line. Leukemia research. 2012;36(8):1063-6.
25. Seyedian R HSM, Kamyab M , Mansury R, Seyedian N , Gharibi S, Zare Mirakabadi A . An in vitro Comparative study upon the Hemolytic, Thrombogenic, Coagulation parameters and Stability properties of the Hemiscorpiuslepturus Venom .Journal Archive of Razi Institute. 2014;69(1):69-76. [persian]
26. Song X, Zhang G, Sun A, Guo J, Tian Z, Wang H, et al. Scorpion venom component III inhibits cell proliferation by modulating NF-κB activation in human leukemia cells. Experimental and Therapeutic Medicine. 2012; 4(1):1446-150.
27. Ezoe S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. International journal of environmental research and public health. 2012;9(7):2444-53.
28. Seiter K, Mamorska-Dyga A. Obinutuzumab treatment in the elderly patient with chronic lymphocytic leukemia. Clinical interventions in aging. 2015;10:951-61

Original Article

Evaluation of the *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on cell viability of K-562 cell line

Soleimani S [1], Azarnia M[2], Sharifi Z[3], soleimani H[4], Zamanian M[5]

1. M.Sc student in Animal Sciences branch of Cell and Developmental Biology, Department of Biology, School of Science, Tehran North branch, Islamic AZAD University, Tehran, Iran
2. Professor, PhD in Histology - Embryology, Department of Biology, School of Science, Tehran North branch, Islamic AZAD University, Tehran, Iran
3. Associate professor, ,PhD in Virology, Department of microbiology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
4. Assistant professor, ,PhD in Biophysics, Department of Physiology and Medical Physics, School of Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
5. BS of Clinical Laboratory , M.Sc of Genetics and Molecular Biology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Received: 26 December, 2015؛ Accepted: 28 February, 2016

Abstract

Introduction: Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a malignant disease. Different drugs have been suggested for the treatment of leukemia, but none of them has resulted in complete remission. Recently scorpion toxins have been reported to have anticancer activity on several cell lines. In the present study, the effects of *Hemiscorpius Lepturus* scorpion was evaluated on K-562 cell line as an experimental model of CML.

Methods: In this experimental trial to determine IC50, K-562 cells were cultured in RPMI media with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), and 1% penicillin/streptomycin. Then they were treated with different concentrations of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom (1.95-1000µg/ml). Cytotoxic effect of venom against K-562 cancer cells was evaluated by MTT method. The data was an analyzed by the Graph Pad Prism 6.

Results: After the treatment of K-562 cells with different concentrations of venom, the MTT assay determined the IC50 value of 62.5 µg/ml of scorpion venom. The results of this study indicated that the treatment of the K-562 cells with scorpion venom was time-dependent compared to the untreated cells. Compared with untreated cells (control), survival rates of the cells after 48-hour treatment with concentrations of 125, 62.5 and 32.25 µg/ml were 40.69±1.12, 54.92±10.5 and 53.58±9.43 respectively.

Conclusion: According to results of the study, this venom can be considered as a potential drug candidate for further studies on inhibitor treatment for CML.

Key words: Anticancer, *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom, K-562, IC50, MTT assay

*Corresponding author: E.mail: Azarnia @ khu .ac.ir