

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۶-۵ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

بررسی فرکشن‌های استخراجی از سم عقرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های جنینی کلیه انسان HEK293

زهرا ستایش‌مهر^{۱*}

۱- گروه زیست‌شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه زابل- زابل- ایران، پست الکترونیکی: setayeshmehrz@uoz.ac.ir

چکیده

در این مطالعه، اثر فرکشن‌های استخراجی از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* بر روی سلول‌های جنینی کلیه انسان HEK293 در حضور و عدم حضور H_2O_2 بررسی شد. درصد زنده‌مانی سلول‌های کشت داده شده با استفاده از تست MTT اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور غلظت‌های مختلف دو فرکشن F2 و F4 ($35-0 \mu g/ml$) تهیه شدند. علاوه بر این، آنزیم کاتالاز از سلول‌ها استخراج و سپس فعالیت آن اندازه‌گیری گردید. نتایج مطالعه نشان داد که درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK293 تیمار شده با F2 و F4 در شرایط حضور و عدم حضور H_2O_2 وابسته به دوز کاهش یافت. میزان کاهش درصد زنده‌مانی در غلظت $35 \mu g/ml$ ، برای هر دو فرکشن F2 و F4، ۲۲/۴۵ درصد در شرایط عدم حضور H_2O_2 و ۱۸/۵ درصد در شرایط حضور H_2O_2 نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار بود. هر دو فرکشن F2 و F4، کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز را خنثی نمودند، به‌طوری‌که توانستند میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را در شرایط حضور نسبت به عدم حضور H_2O_2 افزایش دهند. میزان افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای سلول‌های تیمار شده با F2 و F4، به ترتیب، در شرایط عدم حضور H_2O_2 (۲۸ و ۶۱ درصد) و در شرایط حضور H_2O_2 (۴۷ و ۶۳ درصد) بود. به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که F2 و F4 استخراج شده از سم عقرب، از طریق بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود سبب افزایش درصد زنده‌مانی و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردد.

واژه‌های کلیدی: فرکشن، سم عقرب، *Hemiscorpius lepturus* HEK293، آنتی اکسیدان

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین‌المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

۱- مقدمه

استرس اکسیداتیو، نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال است. ترکیبات اکسیدانت یا گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species)، باید با مکانیسم‌های حفاظتی حذف شوند، زیرا ROS قادرند با اجزای مختلف سلولی واکنش نشان دهند. استرس اکسیداتیو سبب بروز آسیب بافتی، مرگ سلولی و بیماری می‌شود. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو با بروز بیماری‌های مزمن، از جمله دیابت، پوکی استخوان، سرطان، تصلب شرایین، بیماری عروقی کرونر قلبی، اختلال در عملکرد عصبی و تضعیف سیستم ایمنی بدن همراه است (۱).

امروزه، بسیاری از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مانند BHT، BHA، PG و TBHQ، آنتی اکسیدانت‌های سنتزی قوی هستند که جهت حذف رادیکال‌های آزاد موجود در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژیک به کار می‌روند. با این حال، به دلیل عوارض جانبی، کاربردهای آن‌ها به شدت محدود می‌شود. در مقابل، به دلیل عوارض جانبی کمتر آنتی اکسیدان‌های طبیعی، آنها معمولاً از منابع غذایی جدا می‌شوند (۲). از سم مار کبری هندی *Naja naja*، پروتئینی آنتی اکسیدان و سیتوتوکسیک به نام NN-32 جداسازی و شناسایی شد. سم خالص شده با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی چندین پیک تولید کرد که در میان آن‌ها، فرکشن ۳۲ دارای خاصیت سیتوتوکسیک-قلبی بود. جرم مولکولی آن ۶/۷ کیلودالتون و ده توالی N-ترمینال آن به صورت LKCNKLVPLF تعیین شد. این پروتئین، فعالیت پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ و نسبت Bax-Bcl2 را افزایش داد. همچنین، نشانگرهای آنتی اکسیدانی گلووتاتیون، گلووتاتیون پراکسیداز، گلووتاتیون ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت کاتالاز را افزایش داد. با توجه به اهمیت ترکیبات موجود در سموم حیوانات به عنوان عوامل آنتی اکسیدان، هدف از مطالعه حاضر، بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی فرکشن‌های F2 و F4 در شرایط برون تنی از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های جنینی کلیه انسانی HEK293 بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلولی و سنجش MTT

سلول‌های جنینی کلیه HEK293، در فلاسک‌های کشت 25 cm^2 حاوی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با FBS ده درصد کشت داده شدند. فلاسک‌ها در انکوباتور با CO_2 ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. به منظور ارزیابی سمیت سلولی، ابتدا حدود 1×10^4 سلول در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف F2 و F4 (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به تنهایی و در ترکیب با ۰/۰۵ میکرومولار H_2O_2 ، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از تیمار، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT، به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه شد تا کریستال‌ها حل شوند. شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. از معادله زیر برای اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی سلولی استفاده شد (۳):

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

$$\text{درصد زیست پذیری سلولی} = \text{Asample/Acontrol} \times 100$$

در تمامی آزمایشات نمونه- H_2O_2 ، کنترل شامل ۰/۰۵ میکرومولار H_2O_2 بدون نمونه فرکشن و گلووتاتیون بود، در حالی که در آزمایشات تیمار فرکشن و گلووتاتیون به تنهایی، از نمونه بدون فرکشن استفاده شد.

۲-۲- استخراج و تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

کشت سلول‌های جنینی کلیه در فلاسک‌های 75 cm^2 حاوی ۱۰ ml محیط کشت RPMI1640 انجام شد. سلول‌ها هفته‌ای دو بار پاساژ داده شدند تا تعداد آن‌ها به 5×10^6 سلول رسید. سپس به هر فلاسک ۱ میلی لیتر محلول فرکشن با غلظت‌های نهایی ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سلول‌ها از سطح فلاسک توسط یک اسکالپر خراشیده شدند، سپس به مدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه سونیکاتور همگن شدند. برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT: catalase) از روش ویدرت و کولن (۲۰۱۰) استفاده شد (۴). به طور خلاصه، ۴ml محلول بافر فسفات و ۵۰ μl محلول لیزات سلولی به یک فالتون ۱۵ ml اضافه و مخلوط شدند. محتوای فالتون به دو قسمت تقسیم شد، به این ترتیب که ۲ ml نمونه به یک کوئت و ۲ ml به کوئت کوآرتز دیگر اضافه گردید. به اولین کوئت، ۱ml محلول بافر فسفات (کنترل منفی) و به کوئت دیگر، ۱ ml محلول H_2O_2 اضافه شد. محلول‌های حاصل به شدت مخلوط شدند. در مورد نمونه کنترل، ۳۵ μl محلول آنزیمی کاتالاز به جای لیزات سلولی استفاده شد. میزان تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰nm هر ۳۰ ثانیه برای مدت ۲ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم CAT به صورت $\text{mK/mg protein}^{-1}$ بیان شد.

۳-۲- تحلیل آماری

این مطالعه یک طرح کامل تصادفی با سه تکرار آزمایش بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه‌های آماری Mstat C و JMP و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵، معنی داری در نظر گرفته شد.

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

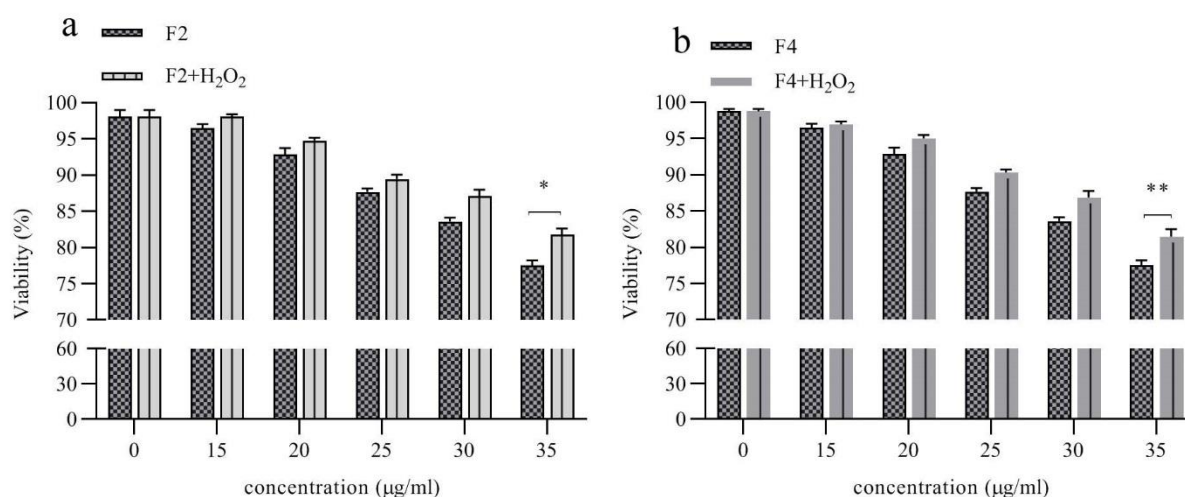
هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

۳- نتایج

نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که درصد زیست‌پذیری سلول‌های HEK293، وابسته به دوز کاهش داشت. فرکشن F2 و F4 توانستند در بالاترین غلظت مورد استفاده (۳۵ $\mu\text{g/ml}$) در حضور H_2O_2 نسبت به عدم حضور H_2O_2 سبب افزایش معناداری در میزان درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK293 گردند ($p < 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های جنینی کلیه انسان HEK293 تیمار شده با غلظت‌های مختلف فرکشن‌های (a) F2 و (b) F4 در حضور و عدم حضور H_2O_2 . * ($p < 0.05$) و ** ($p < 0.01$)، بیانگر وجود اختلاف معنادار میان غلظت‌های ۳۰ و ۳۵ $\mu\text{g/ml}$ فرکشن‌های F2 و F4 در حضور H_2O_2 در مقایسه با عدم حضور H_2O_2 است.

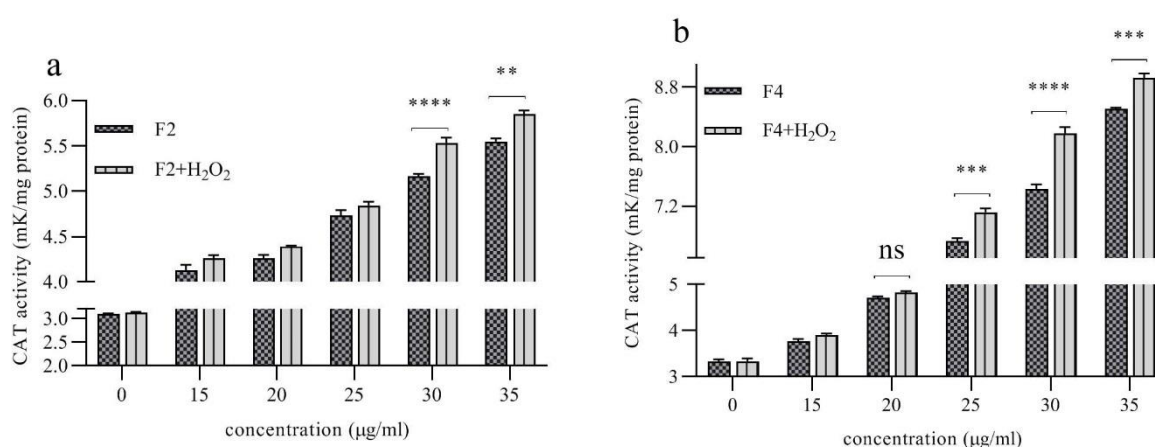
18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

نمودار ۲، نشان دهنده فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول های تیمار شده با F2 و F4 در حضور و عدم حضور H_2O_2 است (شکل ۲). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت F2 و F4، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. میان فعالیت آنزیم کاتالاز سلول های تیمار شده با F2 و F4 در غلظت های ۳۰ و ۳۵ $\mu g/ml$ در حضور H_2O_2 در مقایسه با عدم حضور H_2O_2 اختلاف معنادار مشاهده شد ($p < 0.05$).



شکل ۲. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول های HEK293 تیمار شده با غلظت های مختلف F2 (a) و F4 (b) در حضور و عدم حضور H_2O_2 . *، **، ***، **** و *****، وجود اختلاف معنادار را در سطوح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱ نشان می دهد.

۴- بحث

گونه های اکسیژن فعال، توسط سلول های طبیعی در طول فعالیت های طبیعی متابولیک تولید می شوند و توسط سیستم های آنتی اکسیدانی درون زحذف می شوند. تعادل بین تولید و خنثی سازی ROS یک رویداد ضروری در موجودات زنده است. استرس اکسیداتیو زمانی رخ می دهد که این تعادل وجود نداشته باشد. در این شرایط، به دلیل سطح بالای تولید ROS، سیستم حذف کنندگی ROS مختل شده است (۵). نمونه ای از مولکول های حساس به ردوکس سلولی، آنزیم های آنتی اکسیدان هستند که مرحله اولیه دفاع سلولی در برابر آسیب ناشی از رادیکال های آزاد می باشند.

مطالعه حاضر نشان داد میزان کاتالاز و درصد زنده ماندن سلولی در سلول های تیمار شده با F2 و F4 در شرایط وجود H_2O_2 در مقایسه با عدم وجود H_2O_2 افزایش یافت. بررسی های کنونی نشان داده است که پس از تیمار با F2 و F4 در شرایط حضور H_2O_2 سطح سیستم های آنتی اکسیدان تا حدی نسبت به شرایط عدم حضور H_2O_2 بازسازی شد. این مشاهدات این فرضیه را مطرح کردند که F2 و F4 ممکن است با افزایش فعالیت سیستم های آنتی اکسیدان، استرس اکسیداتیو را در سلول های جنینی کلیه انسانی HEK293 کاهش دهد. تحقیقات مشابهی نشان می دهد که تیمار با عوامل آنتی اکسیدان سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در بافت های حیوانی گردید. هو و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند که هیدرولیزات کازئین سبب افزایش

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل SOD و GPx در کبد و پلاسمای موش شد، درحالیکه میزان مالون دی آلدئید کاهش یافت (۶). ژائو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در جریان پردازش طولانی مدت پروتئین‌های Jinhua ham، پپتیدهای کوچکی دارای فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد بدست آمدند (۷).

مراجع

- [1] Shahidi F, Zhong Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur J Lipid Sci Technol*; 112: 930–940, 2010.
- [2] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem*; 51: 3661–3667, 2003.
- [3] Asoodeh A, Haghparast A, Kashef R, Chamani J. Pro-inflammatory cytokin responses of A549 epithelial cells to antimicrobial peptide brevinin-2R. *Int J Pept Res Ther*; 19: 157-162, 2013.
- [4] Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*; 5: 55-61, 2010.
- [5] Fedrico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Carmela L. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*; 121: 2381-2386, 2007.
- [6] Hu W, Wang T, Zhou Y, Lin G. Effects of hydrolysed casein on antioxodative enzymes in mice. *Acta Nutr Sin*; 27: 54–57, 2005.
- [7] Zhao GM, Tian W, Liu YX, Zhou GH, Xu XL, Li MY. Proteolysis in biceps femoris during Jinhua ham processing. *Meat Sci*; 79: 39-45, 2008.

The study of extracted fractions from scorpion venom on catalase enzyme activity in human embryonic kidney HEK293 cells

Zahra Setayesh-Mehr^{1*}

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran, Email:
setayeshmehr@uoz.ac.ir

Abstract

The current research investigated the effect of fractions extracted from *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on HEK293 human embryonic kidney cells, both in the presence and absence of H₂O₂. The survival percentage of cultured cells was measured using the MTT assay. For this purpose, different concentrations of the two isolated fractions, F2 and F4 (0-35 µg/mL), were prepared. In addition, the catalase enzyme was extracted from the cells, and its activity was measured. The results demonstrated that the survival percentage of HEK293 cells treated with F2 and F4 decreased in a dose-dependent manner, both in the presence and absence of H₂O₂. At a concentration of 35 µg/mL, the decrease in cell survival was 22.45% for both F2 and F4 in the absence of H₂O₂, and 18.5% in the presence of H₂O₂, compared to the untreated control. Both F2 and F4 fractions counteracted the reduction of catalase enzyme activity, leading to the increased activity in the presence of H₂O₂ compared to its absence. The increase in catalase activity for cells treated with F2 and F4 was 28% and 61%, respectively, in the absence of H₂O₂, and 47% and 63%, respectively, in the presence of H₂O₂. Overall, the findings showed that F2 and F4 extracted from scorpion venom enhance cell survival and increase catalase enzyme activity through their antioxidant activity.

Keywords: Fraction; Scorpion venom; *Hemiscorpius lepturus*; HEK293; Antioxidant