

Identification of Fibrinolytic Activity in Iranian *Vipera Lebetina* Venom

Zohreh Amoozgari¹,
Maryam Cheraghzadeh²,
Mozhgan Noorbehhani³,
Nasrin Lamuchi Deli⁴

¹ Lecturer, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Laboratory staff, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ MSc Student in Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received August 24, 2019 ; Accepted July 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: *Vipera lebetina* lives in different areas in Iran, and its venom contains a variety of proteins with coagulant and anticoagulant activities. Fibrinolytic enzymes could have a therapeutic role in dissolution of blood clots, so, this study aimed at separating the venom components of Iranian *V. lebetina* and detecting its anticoagulant activity.

Materials and methods: In this experimental study, crude venom components were isolated by gel filtration chromatography on sephadex G-100. We investigated the endopeptidase, arginine ester hydrolase, coagulant, anticoagulant, and fibrinolytic activities in crude venom and separated fractions.

Results: The crude venom was separated into five fractions (PI-PV). 200 mg of crude venom contained 187 mg protein and 11.75 mg protein was recovered from 187 mg protein used on the column. The venom showed coagulant activity at low concentrations and anticoagulant activity at high concentrations. Endopeptidase activity was detected in crude venom and all fractions except PV. Also, arginine ester hydrolase activity was seen in crude venom, PI, and PII. Fibrinolytic activity was found in crude venom and only in PIII.

Conclusion: According to this study, the venom of Iranian *V. lebetina* has strong proteolytic activities including fibrinolytic that dissolve blood clots by lysis fibrin directly in laboratory conditions.

Keywords: *Vipera lebetina* venom, coagulant activity, anticoagulant activity, endopeptidase, arginine esterase, fibrinolysis

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (188): 17-25 (Persian).

* Corresponding Author: Zohreh Amoozgari - School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (E-mail: Zamoozgari277@yahoo.com)

تشخیص فعالیت فیبرینولیتیک در زهر افعی لبتینای ایران

زهره آموزگاری¹

مریم چراغ زاده²

مژگان نور بهبهانی³

نسرين لموچی دلی⁴

چکیده

سابقه و هدف: افعی لبتینا (*Vipera lebetina*) در مناطق وسیعی از ایران زندگی می کند و زهر آن حاوی انواعی از پروتئینهای گوناگون است که دارای فعالیت های انعقادی و ضد انعقادی می باشد. از آنجائی که امکان نقش درمانی آنزیم های فیبرینولیتیک در حل شدن لخته های خونی وجود دارد، پژوهش حاضر با هدف جداسازی اجزاء زهر خام و تشخیص فعالیت آنزیمی ضد انعقادی در زهر افعی لبتینای ایران انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی اجزای زهر خام به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-100 جداسازی شدند و فعالیت های اندوپپتیداز، آرژنین استر هیدرولاز، انعقادی، ضد انعقادی و فیبرینولیتیک بر روی زهر خام و اجزای جداسازی شده بررسی گردید.

یافته ها: زهر خام به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به 5 جزء (PI-PV) جدا شد. 200 میلی گرم زهر خام حاوی 187 میلی گرم پروتئین بوده و از 187 میلی گرم پروتئین به کار رفته روی ستون، 115/7 میلی گرم پروتئین بازیابی شد. این زهر حاوی فعالیت انعقادی در غلظت پائین و ضد انعقادی در غلظت بالا بوده و فعالیت اندوپپتیدازی در زهر خام و همه اجزاء آن به جز PV وجود داشت. همچنین فعالیت آرژنین استر هیدرولازی در زهر خام، جزء PI و PII و فعالیت فیبرینولیتیک در زهر خام و فقط در جزء PIII مشاهده گردید.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که فراکسیون زهر افعی لبتینای ایران حاوی فعالیت های پروتئولیتیک قوی از جمله فعالیت فیبرینولیتیک می باشد که قادر به لیز مستقیم فیبرین و حل کردن لخته های خونی در شرایط آزمایشگاهی است.

واژه های کلیدی: زهر افعی لبتینا، انعقاد و ضد انعقاد، اندوپپتیداز، آرژنین استراز، فیبرینولیز

مقدمه

وجود دارد که عبارتند از کاردیوتوکسین، میوتوکسین و نفروتوکسین (1). زهر مارهای متعلق به خانواده کروئالیده و ویریده هموتوکسین بوده و دارای آنزیم های مهمی هستند که روی سیستم هموستاتیک اثر دارند. در حالی

زهر مار از ترکیب پیچیده ای از آنزیم ها، ترکیبات غیرسمی و توکسین ها، ساخته شده است که در سه گروه اصلی سیتوتوکسین، نوروتوکسین و هموتوکسین دسته بندی می شوند، البته انواع دیگری از توکسین نیز در زهر مار

E-mail: Zamoozgari277@yahoo.com

مؤلف مسئول: زهره آموزگاری - اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی

1. مربی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

2. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

3. کارشناس علوم آزمایشگاه گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

4. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

تاریخ دریافت: 1398/6/2 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/8/18 تاریخ تصویب: 1399/4/15

که برخی از هموتوکسین‌ها باعث جلوگیری از انعقاد خون می‌شوند، برخی دیگر باعث به هم چسبیدگی پلاکت‌های خونی و شکل‌گیری لخته‌های خونی می‌گردند که منجر به مسدود کردن رگ‌های خونی می‌شوند (2). مارهای خانواده «Viperidae» از جمله افعی‌ها و افعی‌های حفره، این نوع از توکسین‌ها را تولید می‌کنند هر چند در زهر مارهای این خانواده‌ها هر دو عامل انعقادی و ضدانعقادی یافت می‌شوند. فعالیت ضد انعقادی سم بسیاری از مارها به واسطه وجود پروتئازهایی می‌باشند که بعضی از آن‌ها باعث حل مستقیم فیبرین شده و برخی با فعال نمودن پلاسمینوژن باعث حل شدن لخته‌های خونی می‌شوند (3،4).

آنزیم‌های موجود در زهر این دسته مارها شامل آنزیم‌های شبیه ترومبین (5)، فیبرینوژناز و آنزیم‌های فیبرینولیتیک (6)، فعال‌کننده پلاسمینوژن (7)، فعال‌کننده پروترومبین (8)، فعال‌کننده فاکتور X (9)، فعال‌کننده فاکتور V (10)، فعال‌کننده پروتئین C، القاکننده‌ها و مهارکننده‌های تجمع پلاکتی (11) می‌باشند. تغییر در فعالیت این دسته از آنزیم‌ها می‌تواند موجب حمله‌های قلبی از طریق اختلال در فرایند هموستاتیک موجود زنده شود. یکی از راه‌های درمان در معالجه حمله‌های قلبی، کشف داروهایی است که بتوانند باعث حل شدن لخته‌های خون شوند، مثل پلاسمینوژن بافتی (TPA) و استرپتوکیناز. این گونه داروها می‌توانند پلاسمینوژن و بعضی از پروتئازها را فعال کنند که در نتیجه پلاسمینوژن به پلاسمین تبدیل شده و باعث حل شدن لخته‌ها می‌شود، ولی از طرفی این گونه داروها می‌توانند باعث خونریزی و اثرات هموراژیک شوند (12). لذا داروهایی که بتوانند به طور مستقیم لخته‌های خونی را هدف قرار دهند بدون این که به میزبان آسیب برسانند بسیار حائز اهمیت می‌باشند و محققین بسیاری در این زمینه پژوهش می‌کنند. مکانیسم لیز مستقیم فیبرین و فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن کاملاً متمایز است و لذا اثرات ثانویه مانند اثر بر فعال شدن پلاکت‌ها و یا اثرات ثانویه‌ای که بر اثر فعال شدن پلاسمینوژن ایجاد می‌شود، در لیز مستقیم فیبرین مشاهده

نمی‌گردد (13). از آنجایی که زهر برخی مارها دارای آنزیم‌هایی است که می‌توانند بدون تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین و به‌طور مستقیم لخته‌ها را لیز نمایند، پژوهش حاضر با هدف یافتن ترکیبات آنزیمی با قابلیت لیز مستقیم لخته بر روی زهر خام افعی لبتینا و فراکسیون‌های جدا شده از آن انجام گردید. با این امید که با بررسی اثرات فارماکولوژیک زهر افعی تخلیص شده بر روی مدل‌های حیوانی، بتوان از نتایج آن در حوزه پزشکی بهره‌مند گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفیلیزه اهدائی موسسه تحقیقاتی و سرم‌سازی رازی حصارک کرج تهیه گردید. سفادکس G100 ساخت شرکت فارماسیا، استات آمونیوم، کلرور سدیم، کلرور کلسیم، سولفات مس متبلور ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، سود، آلومین سرم گاوی، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، تری کلرواستیک اسید ساخت شرکت مرک، L-فنیل آلانین، کازئین، تیروزین، N-بنزوئیل L-آرژنین اتیل استر (BAEE)، فیبرینوژن، ترومبین انسانی و پلاسمین از شرکت سیگما خریداری و مورد استفاده واقع شد. کلیه آزمایش‌ها به صورت تجربی و سه بار تکرار انجام شد.

جداسازی اجزای زهر مار

جداسازی با استفاده از روش کروماتوگرافی و طبق پروتکل فرید (Farid) و همکاران بر روی ستون سفادکس G-100 و در 4+ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (14). بدین منظور 200 میلی گرم زهر خام در 2 میلی لیتر بافر استات آمونیوم 20 میلی مولار $\text{pH} = 4/6$ حل شد و محلول حاصل به مدت 30 دقیقه در $2000g$ سانتریفوژ گردید.

پس از اندازه‌گیری پروتئین، محلول زرد رویی که حاوی 178 میلی گرم پروتئین بود به تدریج وارد ستونی از سفادکس G-100 به طول 1 متر و قطر 2 سانتی متر گردید. از قبل جهت به تعادل رسیدن ستون از بافر استات

امونیوم 20 میلی مولار (PH = 6.8) استفاده شد و پس از جذب نمونه، ستون با همین بافر شستشو داده شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه جمع کننده اتوماتیک مدل LKB با سرعت جریان 15 میلی لیتر در ساعت جمع آوری شدند. میزان جذب هر فراکسیون بلافاصله در طول موج 280 نانومتر و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل perkein Elmer UV Vis Lambda 2 قرائت شد و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید. سپس پیک های مختلف دیالیز و تغلیظ شدند.

اندازه گیری مقدار پروتئین

مقدار پروتئین نمونه‌ها با استفاده از آلبومین سرم گاوی BSA به روش پروتئین سنجی لوری (Lowry) تعیین گردید (15) و جذب نمونه‌ها در 540 نانومتر قرائت و پس از رسم منحنی استاندارد مقدار پروتئین نمونه‌ها تعیین شد.

بررسی توانم فعالیت انعقادی و ضد انعقادی (Recalcified plasma clotting time)

برای بررسی این فاکتورها از متد (Dimitrov) با اندکی تغییر استفاده شد (16). به طور خلاصه به 0/5 میلی لیتر پلاسما تازه انسانی، 0/1 میلی لیتر از هر نمونه شامل زهر خام و فراکسیون‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد انکوبه و سپس به هر لوله آزمایش 0/1 میلی لیتر کلرید کلسیم 0/25 مولار افزوده و بلافاصله زمان‌های انعقاد آن‌ها ثبت گردید. طبق این روش اندازه فعالیت انعقادی، کاهش در زمان انعقاد و اندازه فعالیت ضد انعقادی، افزایش در این زمان در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. نمونه کنترل حاوی 0/5 میلی لیتر پلاسما تازه انسان، 0/1 میلی لیتر سرم فیزیولوژی است.

اندازه گیری فعالیت آرژنین استرازی

برای بررسی این فعالیت از روش هومل (Hummel) بر روی سوبسترای BAEE استفاده شد (17). بدین صورت که کووت شاهد حاوی 0/1 میلی لیتر سرم فیزیولوژی،

0/3 میلی لیتر سوبسترای BAEE 0/01 مولار و 2/6 میلی لیتر بافر تریس 0/046 مولار حاوی کلرید کلسیم 0/0115 مولار با PH=8.1 و سپس در کووت دیگر 0/1 میلی لیتر نمونه با 2/6 میلی لیتر بافر تریس 0/046 مولار حاوی کلرید کلسیم 0/0115 مولار با PH=8/1 مخلوط گردید. این مخلوط 5 دقیقه در 25 درجه سانتی گراد انکوبه و سپس 0/3 میلی لیتر سوبسترای BAEE 0/01 مولار به آن افزوده و خوب مخلوط و بلافاصله تغییرات جذب آن در 25 درجه سانتی گراد در طول موج 253 نانومتر ثبت گردید. در این آزمایش یک واحد از فعالیت، برابر با میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده (BAEE) در یک میلی لیتر نمونه در دقیقه در 25 درجه سانتی گراد می‌باشد. فعالیت مخصوص از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت مخصوص (Unit/mg)} = \frac{\frac{\Delta A_{253}}{\text{MIN}} \times 1000 \times V}{\epsilon \text{BAEE} \times \text{mg protein per cuvette}}$$

$$\frac{\Delta A_{253}}{\text{MIN}} = \text{تغییرات جذب در دقیقه در طول موج 253 نانومتر}$$

$$V = \text{حجم نمونه مورد آزمایش}$$

$$\epsilon \text{BAEE} = \text{ضرب جذب مولی BAEE که در طول موج 253 نانومتر برابر } 1 \text{ cm}^1 \text{ } 946 \text{m}^1 \text{ می‌باشد.}$$

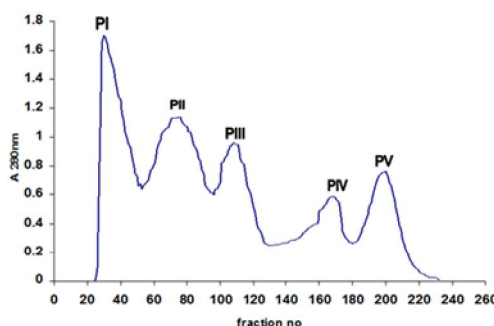
فعالیت پروتئولیتیک

در این آزمایش تجربی فعالیت پروتئولیتیک بر اساس روش ساتاکه (SATAKE) و همکاران با مقداری تغییر انجام گردید (18). بدین ترتیب که 6 عدد لوله آزمایش انتخاب و در هر کدام 0/5 میلی لیتر محلول کازئین 1 درصد در بافر تریس - اسید کلریدریک 0/4 مولار ریخته شد. سپس به هر کدام از لوله‌ها به ترتیب 0/5 میلی لیتر نمونه حاوی مقدار معینی پروتئین (زهر خام و فراکسیون‌های آن) افزوده و مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت 15 دقیقه در حمام آب گرم 37 درجه سانتی گراد انکوبه و سپس واکنش با افزودن 0/5 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید 16 درصد به هر کدام از لوله‌ها متوقف گردید. برای هر کدام از نمونه‌ها یک لوله بلانک (B)

PH=7.5، حاوی کلرید سدیم 10 میلی مولار و کلرید کلسیم 25 میلی مولار و همچنین 100 میکولیتتر ترومین گاوی 1U/ml بود که در یک پلیت 14 سانتی متر ریخته و بعد از 2 ساعت انکوباسیون در 37 درجه، 5 میکولیتتر نمونه (0-5µl) روی سطح پلیت ریخته شد و یک شب در 37 درجه انکوبه گردید. سپس به محلول واکنش، TCA 5 درصد افزوده و ناحیه لیز شده روی یک زمینه تیره بررسی شد. یک واحد از فعالیت فیبرینولیتیک برابر است با مقدار ناحیه لیز شده (mm) به وسیله 1 میکروگرم پروتئین. پلاسمین انسانی به عنوان نمونه کنترل مثبت (+) استفاده شد.

یافته ها

نتیجه کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای 200 میلی گرم زهر خام (حاوی 178 میلی گرم پروتئین) در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. طبق این روش پروتئین های زهر خام براساس وزن مولکولی به 5 فراکسیون مشخص مجزا شدند که به ترتیب خارج شدن از ستون به ترتیب PV, PIV, PIII, PII, PI نامگذاری شدند. میزان پروتئین موجود در زهر خام و فراکسیون های جدا شده با استفاده از روش لوری (Lowry) (15) سنجیده شد و نتایج آن در جدول شماره 1 نشان داده شده است.



تصویر شماره 1: کروماتوگرافی زهر خام افعی لبتینای ایران روی سفادکس G-100، ستون (100 cm × 2) با بافر استات آمونیوم 20 میلی مولار با PH برابر 6/8 به تعادل رسیده و با همین بافر با سرعت جریان 15 میلی لیتر در ساعت شستشو داده شد (20).

تهیه شد. در یک لوله آزمایش به عنوان استاندارد 0/5 میلی لیتر از محلول استاندارد تیروزین (حاوی 18/1 میلی گرم تیروزین در 1 لیتر اسید کلریدریک 0/2 مولار) ریخته و در یک لوله دیگر به عنوان شاهد استاندارد سرم آلبومین گاوی 0/5 میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. بعد از افزودن تری کلرواستیک اسید به لوله های T و نمونه ها و B، همه لوله ها به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت محیط انکوبه و پس از گذشت این مدت مخلوط های آزمایش با کاغذ واتمن شماره 2 صاف شدند. سپس به 0/5 میلی لیتر از محلول های صاف شده همه لوله ها، 2/5 میلی لیتر کربنات سدیم 0/4 مولار و 0/5 میلی لیتر معرف فولین سیو کالتو (دوبار رقیق شده) افزوده و با سرعت مناسب مخلوط شدند. لوله ها به مدت 20 دقیقه در درجه حرارت محیط انکوبه و پس از این مدت جذب نوری هر کدام از لوله ها در 660 نانومتر در مقابل B مخصوص به خود قرائت و با استاندارد تیروزین مقایسه گردید. طبق این روش، یک واحد آنزیم به عنوان واحد پروتئیناز (PU) تعریف می شود و برابر با مقداری از آنزیم می باشد که یک افزایش در رنگ معادل با 1 میکروگرم تیروزین در دقیقه با معرف فولین بدهد.

$$PU = CSt \times \frac{ODT}{ODst}$$

CSt برابر با غلظت استاندارد در لوله آزمایش می باشد سپس فعالیت مخصوص از تقسیم PU بر میلی گرم پروتئین در لوله آزمایش به دست آمد. PU به ازاء 0/5 میلی لیتر نمونه حاوی مقدار معینی پروتئین و سپس فعالیت کل (Total Unit) برای زهر خام و هر فراکسیون محاسبه شد.

فعالیت فیبرینولیتیک

فعالیت فیبرینولیتیک براساس شفاف سازی پلیت فیبرین براساس روش Gasmi و همکاران انجام شد (19). مخلوط آزمایش حاوی 25 میکولیتتر محلول فیبرینوژن یک درصد در بافر 5 میلی مولار تریس HCl با

بحث

زهر مارها حاوی ترکیبات بیوشیمیایی و دارویی هستند که نه تنها درون یک گونه، متفاوت هستند، بلکه در جنس‌های مختلف و حتی در سنین مختلف متنوع هستند (21، 22). مارها به چند خانواده اصلی و پیریده (افعی‌ها)، کرو تالیده، هیدروفیده و الایدیه (مارهای کبری) تقسیم می‌شوند. زهر مارهای خانواده و پیریده مخلوطی از پروتئین‌ها می‌باشند که عملکردهای بیولوژیک مختلفی دارند از جمله می‌توانند بر سیستم هموستاتیک اثر بگذارند. تعدادی از این پروتئین‌ها متالوپروتئینازهایی هستند که دارای فعالیت فیبرینولیتیک بوده و می‌توانند لخته‌های فیبرین را بدون فعال نمودن پلاسمینوژن و یا اثر بر سایر فعالیت‌های اجزاء خونی، حل نمایند (23).

در مطالعه حاضر فعالیت فیبرینولیتیک در زهر افعی لبتینای ایران اندازه گرفته شد. افعی لبتینا جزء خانواده و پیریده می‌باشد. این مار در ایران، قبرس، الجزایر، تونس، عراق، سوریه، فلسطین و لبنان وجود دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که زهر این افعی دارای هر دو فعالیت انعقادی و ضدانعقادی می‌باشد و این مسئله در تعداد زیادی از زهر مارهای و پیریده و کرو تالیده وجود دارد (24). نتایج حاصل از بررسی داده‌های به دست آمده از این پژوهش نشان‌دهنده این حقیقت بود که فعالیت انعقادی علاوه بر زهر خام در فراکسیون‌های PI، PII و PV نیز وجود دارد و همچنین بیش‌ترین فعالیت در فراکسیون PI گزارش شد. مطالعات قبلی این تیم پژوهشی بر زهر لبتینا نشان داد که این فعالیت مربوط به فاکتورهای انعقادی مختلف می‌باشد (20، 25). در بررسی فعالیت ضدانعقادی نتایج موید این مطلب بود که این خاصیت فقط در زهر خام و فراکسیون III مشاهده شد.

فعالیت پروتئولیتیک روی سوبسترای کازین انجام شد و بر اساس نتایج، زهر خام و همه فراکسیون‌های آن به جز PV حاوی فعالیت اندوپیتیدازی (کازینولیتیک) بودند اما فعالیت فیبرینولیتیک که هدف این مطالعه بود در زهر خام و بعد از جداسازی فقط در PIII وجود

زمان‌های انعقاد 0/5 میلی‌لیتر پلاسمای سیراته تازه انسان به وسیله 0/1 میلی‌لیتر از هر نمونه حاوی غلظت‌های معین و متفاوت پروتئین بر حسب میکروگرم در جدول شماره 2 نشان داده شده است. زمان انعقاد نمونه کنترل (0/5 میلی‌لیتر پلاسمای انسان + 0/1 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی) 203 ثانیه می‌باشد.

در ادامه، سایر فعالیت‌های آنزیمی به روش‌های ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد و نتایج حاصل در جدول شماره 3 گزارش شده است.

جدول شماره 1: نتایج سنجش پروتئین در زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از آن در مرحله اول کروماتوگرافی روی ستون سفادکس G-100

فاکتور اندازه‌گیری	حجم نمونه (ml)	غلظت پروتئین (mg/ml)	توتال پروتئین (mg)	واتدمان درصد
زهر خام (C.V)	2	89	178	100
PI	10	4/8	48	26/9
PII	12	2/72	32/64	18/3
PIII	14/5	1/92	27/84	15/64
PIV	20	0/44	8/8	4/94
PV	18	0/66	11/89	4/64

جدول شماره 2: زمان تشکیل لخته به روش Dimitrov

زمان انعقاد (ثانیه)						
میکروگرم	C.V	PI	PII	PIII	PIV	PV
10	19/9	13	23/7	83/7	60	203
50	28/9	13	23	123	34	203
100	40	13	23	متعقدنشده	34	203
150	متعقدنشده	13	23	متعقدنشده	34	203

جدول شماره 3: فعالیت‌های آنزیمی فیبرینولیتیک، آرژنین استر هیدرولازی و کازینولیتیک در زهر خام و فراکسیون‌های آن

فعالیت	فعالیت کازینولیتیک (1) (اندوپیتیداز) Unit/mg	فعالیت آرژنین استر هیدرولازی (2) Unit/mg	فعالیت فیبرینولیتیک (3) Unit/mg
زهر خام	42 ± 1/63	3/83 ± 0/61	12 ± 1/1
PI	54 ± 1/15	5/6 ± 0/46	-----
PII	21 ± 1/52	11/45 ± 1/2	-----
PIII	21/6 ± 1/46	-----	18 ± 1/43
PIV	8/4 ± 0/72	-----	-----
PV	-----	-----	-----

*: اطلاعات جدول بر اساس انحراف معیار ± میانگین (Mean ± SD) بیان شده اند که n=3 می‌باشد.

- 1- یک واحد از فعالیت کازینولیتیک برابر با مقداری از آنزیم که یک افزایش در رنگ معادل با 1 میکروگرم تیروزین در دقیقه با معرف فولین بدهد تقسیم بر میلی‌گرم پروتئین
- 2- یک واحد از فعالیت آرژنین استر هیدرولازی برابر با میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده (BAEE) در دقیقه تقسیم بر میلی‌گرم پروتئین
- 3- یک واحد از فعالیت فیبرینولیتیک برابر است با ناحیه لیز شده بر حسب (mm) تقسیم بر میکروگرم پروتئین

به وفور در ایران یافت می‌شود، دارای خاصیت لیز لخته بدون فعال نمودن پلاسمینوژن و اثر بر سایر اجزا خونی است و می‌توان گفت که یک فعالیت فیبرینولیتیک قوی در زهر این مار وجود دارد. با توجه به کاربرد این موضوع در پزشکی جهت حل لخته بدون اثرات جانبی، این تیم پژوهش قصد دارد در مطالعات آتی خود این آنزیم را تخلیص نموده و اثرات فارماکولوژیک آن را بررسی نماید، با این امید که بتوان از موهبت وجود این مخلوق در منطقه جغرافیایی ایران جهت درمان بهره‌مند گردید.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از موسسه تحقیقات سرم سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لیبینیای ایران و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این مطالعه (شماره طرح U-92083) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

داشت. فعالیت آرژنین استرئیدرولازی در زهر خام و فراکسیون‌های I و II وجود داشت. پژوهش‌ها نشان داد که زهر افعی لیبینا حاوی چندین آرژنین استرئیدرولاز می‌باشد که به وسیله سفادکس G-100 به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند. یکی با وزن مولکولی پائین که حاوی فعالیت کینینوژناز و دیگری با وزن مولکولی بالاتر که حاوی فعالیت امیدازی می‌باشد (26).

مطالعات در سایر مارها نشان داده که برخی از مارها حاوی آنزیم‌های فیبرینولیتیک می‌باشند و مطالعات گسترده‌ای بر این دسته از آنزیم‌ها انجام شده است. به طور مثال Retzios و Markland توانستند فیبرولازی فیبرولازی را گزارش کنند که در لوله آزمایش به سرعت لخته را حل می‌کند در حالی که این فیبرولاز پلاسمینوژن را فعال نمی‌کند و روی اجزاء دیگر خونی اثر ندارد و به وسیله هیچکدام از مهارکننده‌های سرین پروتئینازها در خون مهار نمی‌شود (23).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که زهر افعی لیبینا که

References

- Goswami PK, Samant M, Srivastava RS. Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014; 6(5): 4-7.
- Slagboom J, Kool J, Harrison RA, Casewell NR. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. Br J Haematol 2017; 177(6): 947-959.
- Salazar AM, Rodriguez Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (Bothrops atrox) from different geographical areas in Venezuela. Thromb Res 2007; 120(1): 95-104.
- Bello CA, Hermogenes ALN, Magalhaes A, Veiga SS, Gremski LH, Richardson M, et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucurus (white-tailed jararaca) snake venom. Biochimie 2006; 88(2): 189-200.
- Ullah A, Masood R, Ali I, Ullah K, Ali H, Akbar H, et al. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. International Journal of Biological Macromolecules 2018; 114: 788-811.
- Zelani A, Huesgen PF, Oliveira AK, Tashima AK, Serrano SMT, Overall CM. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. J Proteomics 2015; 113: 260-267.

7. Parry MA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 1998; 6(9): 1195-1206.
8. Silva MB, Schattner M, Ramos CRR, Inacio L, Guarnieri M, Lazzari MA, et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal* 2003; 369(Pt 1): 129-139.
9. Oulion B, Dobson JS, Zdenek CN, Arbuckle K, Lister C, Coimbra FCP, et al. Factor X activating *Atractaspis* snake venoms and the relative coagulotoxicity neutralising efficacy of African antivenoms. *Toxicol Lett* 2018; 288: 119-128.
10. Bos MHB, Boltz M, Pierre LS, Masci PP, De Jersey J, Lavin MF, et al. Venom factor V from the common brown snake escapes hemostatic regulation through procoagulant adaptations. *Blood* 2009; 114(3): 686-692.
11. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 2011; 57(5): 627-645.
12. Ali MR, Salim Hossain M, Islam MA, Arman MSI, Sarwar Raju G, Dasgupta P, et al. Aspect of thrombolytic therapy: a review. *The Scientific World Journal* 2014; 2014: 586510.
13. Mackessy SP, Saviola A, Mukherjee AK. Venom toxins to drugs: Anti-thrombotic and anti-metastasis compounds from snake venoms. *Toxicon* 2018; 150: 320.
14. Farid TM, Tu AT, El-Asmar MF. Characterization of cerastobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper). *Biochemistry* 1989; 28(1): 371-377.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
16. Dimitrov GD, Kankonkar RC. Fractionation of *Vipera russelli* venom by gel filtration. I. *Toxicon* 1968; 5(3): 213-221.
17. Hummel BC. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(12): 1393-1399.
18. Satake M, Murata Y, Suzuki T. Studies on Snake Venom. Xiii. chromatographic separation and properties of three proteinases from *agkistrodon halys blomhoffii* venom. *J Biochem* 1963; 53(6): 438-447.
19. Gasmi A, Karoui M, Benlasfar Z, Karoui H, El Ayeb M, Dellagi K. Purification and characterization of a fibrinogenase from *Vipera lebetina* (desert adder) venom. *Toxicon* 1991; 29(7): 827-36.
20. Amoozgari Z, Akbari A, Kadkhodaei EM, Noorbehbahani M, Shanaki BM. Identification and characterization of blood coagulation factor x activator from the venom of Iranian *vipera lebetina*, Jundishapur Scientific Medical Journal 2011; 10(4): 403-416 (Persian).
21. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 2003; 42(4): 405-411.
22. Meier J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon* 1986; 24(1): 41-46.
23. Retzios AD, Markland Jr FS. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood

- coagulation and fibrinolysis systems. *Thromb Res* 1988; 52(6): 541-552.
24. Marsh NA. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism--a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(3): 399-410.
 25. Amoozgari Z, Zare MAA. Purification and partial characterization of procoagulant factor (factor V activator from Iranian *Vipera lebetina* venom). *New Biotechnology* 2009(25): S83.(persian)
 26. Siigur E, Siigur Y, Aaviksaar AA, Kibirev VK, Fedoryak DM. Separation of a bradykinin-releasing enzyme from the proteolytic complex of Levantine viper venom. *Biokhimiia* (Moscow, Russia) 1982; 47(10): 1730-1737.