ORIGINAL ARTICLE

# *Identification of Fibrinolytic Activity in Iranian Vipera Lebetina Venom*

Zohreh Amoozgari[1],
Maryam Cheraghzadeh[2],
Mozhgan Noorbehbahani[3],
Nasrin Lamuchi Deli[4]

[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)



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 188 شهریور سال 1399 (25-17)

# تشخیص فعالیت فیبرینولیتیک در زهر افعی لبتینای ایران

زهره آموزگاری[1]
مریم چراغ زاده[2]
مژگان نور بهبهانی[3]
نسرین لموچی دلی[4]

## چکیده

**سابقه و هدف:** افعی لبیتنا (Vipera lebetina) در مناطق وسیعی از ایران زندگی می‌کند و زهر آن حاوی انواعی از پروتئینازهای گوناگون است که دارای فعالیت‌های انعقادی و ضد انعقادی می‌باشد. از آن‌جائی‌که امکان نقش درمانی آنزیم‌های فیبرینولیتیک در حل شدن لخته‌های 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 روش‌ها:** در این مطالعه تجربی اجزای زهر خام به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-100 جداسازی شدند و فعالیت‌های اندوپپتیداز، آرژنین استر هیدرولاز، انعقادی، ضد انعقادی و فیبرینولیتیک بر روی زهر خام و اجزای جداسازی شده بررسی گردید.

**یافته‌ها:** زهر خام به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به 5 جزء (PI-PV) جدا شد. 200 میلی‌گرم زهرخام حاوی 187 میلی‌گرم پروتئین بوده و از 187میلی‌گرم پروتئین به کار رفته روی ستون، 115/7 میلی‌گرم 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 استرهیدرولازی 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 فعالیت‌های پروتئولیتیک قوی از جمله فعالیت فیبرینولیتیک می‌باشد 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، فیبرینولیزیز

## مقدمه

زهر مار از ترکیب پیچیده‌ای از آنزیم‌ها، ترکیبات غیرسمی و توکسین‌ها، ساخته شده است که در سه گروه اصلی سیتوتوکسین، نوروتوکسین و هموتوکسین دسته‌بندی می‌شوند، البته انواع دیگری از توکسین نیز در زهر مار وجود دارد که عبارتند از کاردیوتوکسین، میوتوکسین و نفروتوکسین(1). زهر مارهای متعلق به خانواده کروتالیده و ویپریده هموتوکسین بوده و دارای آنزیم‌های مهمی هستند که روی سیستم هموستاتیک اثر دارند. در حالی

**مولف مسئول: زهره آموزگاری -** اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی E-mail : Zamoozgari277@yahoo.com
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



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

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 حفار، 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(4،3).

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 می توانند پلاسمینوژن و بعضی از پروتئازها را فعال‌کنند 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 این‌که به میزبان آسیب برسانند بسیار حائز اهمیت می‌باشند و محققین بسیاری در این زمینه پژوهش می‌کنند. مکانیسم لیز مستقیم فیبرین و فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن کاملا 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 تهیه‌گردید. سفادکس G100 ساخت شرکت فارماسیا، استات آمونیوم، کلرور سدیم، کلرور کلسیم، سولفات مس متبلور ($CuSO_4+5H_2O$)، سود، آلبومین 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 در4+ درجه سانتی‌گراد صورت‌گرفت(14). بدین منظور 200 میلی‌گرم زهرخام در 2 میلی‌لیتر بافر استات امونیوم 20 میلی‌مولار *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 میلی‌گرم پروتئین بود به تدریج وارد ستونی از سفادکس G-100 به طول 1 متر و قطر 2 سانتی‌متر گردید. از قبل جهت به تعادل رسیدن ستون از بافراستات



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

امونیوم 20 میلی‌مولار ( PH = 6.8) استفاده شد و پس از جذب نمونه، ستون با همین بافر شستشو داده شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک مدل LKB با سرعت جریان 15 میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری 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 وپس از رسم منحنی استاندارد مقدار پروتئین نمونه‌ها تعیین شد.

*بررسی توام 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 میلی‌لیتر پلاسمای تازه انسانی، 0/1 میلی‌لیتر از هر نمونه شامل زهر خام و فراکسیون‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به هر لوله آزمایش 0/1 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر پلاسمای تازه انسان، 0/1 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، 0/3 میلی‌لیتر سوبسترای BAEE 0/01 مولار و 2/6 میلی‌لیتر بافر تریس 0/046 مولار حاوی کلرید کلسیم 0/0115 مولار با PH=8.1 و سپس در کووت دیگر 0/1 میلی‌لیتر نمونه با 2/6 میلی‌لیتر بافر تریس 0/046 مولار حاوی کلرید کلسیم 0/0115 مولار با PH= 8/1 مخلوط گردید. این مخلوط 5 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس 0/3 میلی‌لیتر سوبسترای BAEE 0/01 مولار به آن افزوده و خوب مخلوط و بلافاصله تغییرات جذب آن در 25 درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد می‌باشد. فعالیت مخصوص از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

$\frac{\Delta A\ 253}{MIN}$ = تغییرات جذب در دقیقه درطول موج253 نانومتر

V = حجم نمونه مورد آزمایش

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

*فعالیت پروتئولیتیک*

در این آزمایش تجربی فعالیت پروتئولیتیک بر اساس روش ساتاکه (SATAKE) و همکاران با مقداری تغییر انجام گردید(18). بدین‌ترتیب که 6 عدد لوله آزمایش انتخاب و در هر کدام 0/5 میلی‌لیتر محلول کازئین 1 درصد در بافر تریس - اسیدکلریدریک 0/4 مولار ریخته شد. سپس به هر کدام از لوله‌ها به ترتیب 0/5 میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد انکوبه و سپس واکنش با افزودن 0/5 میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید 16 درصد به هر کدام از لوله‌ها متوقف گردید. برای هرکدام از نمونه‌ها یک لوله بلانک (B)



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

تهیه شد. در یک لوله آزمایش به عنوان استاندارد 0/5 میلی‌لیتر از محلول استاندارد تیروزین (حاوی 18/1 میلی‌گرم تیروزین در 1 لیتر اسیدکلریدریک 0/2 مولار) ریخته و در یک لوله دیگر به عنوان شاهد استاندارد سرم آلبومین گاوی 0/5 میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. بعد از افزودن تری کلرواستیک اسید به لوله‌های T و نمونه‌ها و B، همه لوله‌ها به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت محیط انکوبه و پس از گذشت این مدت مخلوط‌های آزمایش با کاغذ واتمن شماره 2 صاف شدند. سپس به 0/5 میلی‌لیتر از محلول‌های صاف شده همه لوله‌ها، 2/5 میلی‌لیتر کربنات سدیم 0/4 مولار و 0/5 میلی‌لیتر معرف فولین سیو کالتو ( دوبار رقیق شده) افزوده و با سرعت مناسب مخلوط شدند. لوله‌ها به مدت 20 دقیقه در درجه حرارت محیط انکوبه و پس از این مدت جذب نوری هر کدام از لوله‌ها 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 می‌شود و برابر با مقداری از آنزیم می‌باشد که یک افزایش در رنگ معادل با 1 میکروگرم تیروزین در دقیقه با معرف فولین بدهد.

$$PU=Cst \times \frac{OD\ T}{OD\ st}$$

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

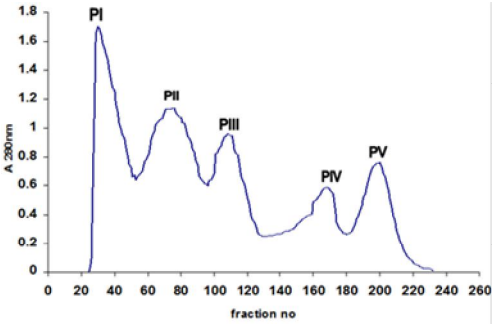
*فعالیت فیبرینولیتیک*

فعالیت فیبرینولیتیک براساس شفاف سازی پلیت فیبرین براساس روش Gasmi و همکاران انجام شد(19). مخلوط آزمایش حاوی 25 میکرولیتر محلول فیبرینوژن یک درصد در بافر 5 میلی مولار تریس HCl با PH=7.5 ، حاوی کلرید سدیم 10 میلی مولاو و کلرید کلسیم 25 میلی مولار و همچنین 100 میکلولیتر ترومبین گاوی 1U/ml بود که در یک پلیت 14 سانتی‌متر ریخته و بعد از 2 ساعت انکوباسیون در 37 درجه، 5 میکرولیتر 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 برابراست 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 میلی‌گرم زهر خام (حاوی 178 میلی‌گرم پروتئین) در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. طبق این روش پروتئین‌های زهر خام براساس‌وزن 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 فراکسیون‌های 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 بافراستات امونیوم 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).

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

زمان های انعقاد 0/5 میلی‌لیتر پلاسمای سیتراته 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 درمرحله اول کروماتوگرافی روی ستون سفادکس G-100

| فاکتور اندازه گیری | حجم نمونه (ml) | غلظت پروتئین (mg/ml) | توتال پروتئین (mg) | راندمان درصد |
|---|---|---|---|---|
| (C.V) زهر خام | 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) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PV | PIV | PIII | PII | PI | C.V | میکروگرم |
| 203 | 60 | 83/7 | 23/7 | 13 | 19/9 | 10 |
| 203 | 34 | 123 | 23 | 13 | 28/9 | 50 |
| 203 | 34 | منعقدنشد | 23 | 13 | 40 | 100 |
| 203 | 34 | منعقدنشد | 23 | 13 | منعقدنشد | 150 |

**جدول شماره 3:** فعالیت های آنزیمی فیبرینولیتیک، آرژنین استر هیدرولازی و کازئینولیتیک در زهر خام و فراکسیون‌های آن

| فعالیت / نمونه | فعالیت کازئینولیتیک (1) (اندوپپتیداز) Unit/mg | فعالیت آرژنین استر هیدرولازی (2) Unit/mg | فعالیت فیبرینولیتیک (3) Unit/mg |
|---|---|---|---|
| زهرخام | 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 براساس انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) بیان شده اند که n=3 می باشد.

1- یک واحد از فعالیت کازئینولیتیک برابر با مقداری از آنزیم که یک افزایش در رنگ معادل با 1 میکروگرم تیروزین در دقیقه با معرف فولین بدهد تقسیم بر میلی گرم پروتئین

2- یک واحد از فعالیت آرژنین استر هیدرولازی برابر با میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده (BAEE) در دقیقه تقسیم بر میلی گرم پروتئین

3- یک واحد از فعالیت فیبرینولیتیک برابر است با ناحیه لیز شده بر حسب (mm) تقسیم بر میکروگرم پروتئین

## 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(22،21). مارها به چند خانواده اصلی ویپریده (افعی‌ها)، کروتالیده، هیدروفیده والاپیده (مارهای کبری) تقسیم می‌شوند. زهر مارهای خانواده ویپریده مخلوطی از پروتئین‌ها می‌باشند که عملکردهای بیولوژیک مختلفی دارند از جمله می‌توانند برسیستم 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 ویپریده می‌باشد. این مار درایران، قبرس، الجزایر، تونس، عراق، سوریه، فلسطین و لبنان وجود دارد. نتایج این پژوهش نشان دادکه زهر این افعی دارای هر دو فعالیت انعقادی و ضدانعقادی می‌باشد و این مسئله در تعداد زیادی از زهر مارهای ویپریده وکروتالیده وجود دارد(24).

نتایج حاصل از بررسی داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش نشان‌دهنده این حقیقت بودکه 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(25،20). در بررسی فعالیت ضدانعقادی نتایج موید این مطلب بود که این خاصیت فقط در زهرخام و فراکسیونIII مشاهده شد.

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

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

داشت. فعالیت آرژنین استرهیدرولازی در زهر خام و فراکسیون‌های I و II وجود داشت. پژوهش‌ها نشان داد که زهر افعی لبتینا حاوی چندین آرژنین استرهیدرولاز می باشد 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 می کند در حالی‌که 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 زهرافعی لبتینا که 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 لبتینای 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.

## References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Zelanis 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.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

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. Indentification 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

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]

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.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-06 ]