Birjand University of Medical Sciences

Journal of Birjand University of Medical Sciences

Review Article

Snake venom proteins and coagulopathy caused by snakebite

Mahdi Babaie[1]

ABSTRACT

Snakebite affects around 3 or 4 million humans annually leading to more than 100,000 deaths. Coagulopathy is one of the significant causes of both morbidity and mortality in these patients. Accordingly, it is of utmost importance to diagnose and treat coagulation disorder due to bites; in addition, it is accompanied by various clinical aspects, such as pre-coagulation, fibrinogen coagulation time, fibrinolytic, platelet activation, anticoagulant, thrombotic, and bleeding. The main cause of coagulopathy caused by snakebite is the presence of compounds found in snake venom. These compounds are mostly proteins with enzymatic activity and high stability; moreover, they rapidly react with factors in the blood circulatory system and disrupt their correct functioning. Regarding the snake venom compounds, especially their proteins, it should be mentioned that different snakes' venoms have different proteins, which can have a role in coagulation or anticoagulation depending on its amount. The coagulant proteins are subclassified as clotting factor activators and thrombin-like enzymes. The anticoagulant proteins can prevent blood clotting leading to coagulopathy and include phospholipases A_2, fibrinolytic, protein C activator, and L-amino acid oxidase (enzymatic anticoagulants) or C-type lectin-like proteins, three-finger toxins (TFTs), and proteinase inhibitors (nonenzymatic anticoagulants). All of these factors cause coagulopathy due to snake bites, which is a clinically important phenomenon and should be carefully examined; otherwise, it would be difficult to make the diagnosis and treatment process. If untreated, coagulopathy can develop quickly and lead to the patient's death.

Keywords: Coagulopathy, Protein, Snakebite, Snake venom

Citation: Babaie M. [Snake venom proteins and coagulopathy caused by snakebite]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(2): 88-105. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.2.100

Received: March 29, 2020 **Accepted:** June 22, 2020

[1] Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Corresponding author: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
Tel: +982634570038 Fax: +982634552194 E-mail: m.babaie47@yahoo.com

مقاله مروری

پروتئین‌های زهر مارها و اختلالات انعقادی ناشی از مارگزیدگی

مهدی بابائی[1]

چکیده

گزش مارها سالیانه حدود ۳ تا ۴ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد که بیش از صد هزار نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند. یکی از دلایل مرگ‌ومیر و ایجاد عارضه به وسیله زهر مارها اختلال انعقادی ناشی از گزش آن‌ها می‌باشد. اختلال انعقادی ناشی از گزش، جنبه‌های بالینی مختلفی (مانند پیش انعقادی، زمان انعقاد فیبرینوژن، فیبرینولیتیک، فعال‌کردن پلاکت، ضدانعقادی، ترومبوتیک، خونریزی دهنده) دارد که تشخیص و درمان آن حائز اهمیت است. عامل اصلی اختلالات انعقادی که در اثر مارگزیدگی ایجاد می‌شود، ترکیبات موجود در زهر مارها است. این ترکیبات که بیشتر آن‌ها پروتئین‌هایی با خواص آنزیمی و پایداری زیاد هستند به سرعت با فاکتورهای خونی موجود در سیستم گردش خون جانداران واکنش می‌دهند و عملکرد صحیح این فاکتورها را دچار اختلال می‌کنند. نکته مهم در مورد ترکیبات زهر مار و به‌خصوص پروتئین‌های آن این است که زهر مارهای مختلف دارای پروتئین‌های مختلفی هستند که بسته به مقدارشان می‌توانند نقش انعقادی یا ضد انعقادی داشته باشند. پروتئین‌های انعقادی به عنوان فعال کننده‌های فاکتور لخته شدن و آنزیم‌های شبیه ترومبین طبقه بندی می‌شوند. پروتئین‌های ضد انعقادی از لخته شدن خون جلوگیری می‌کنند و منجر به عدم انعقاد خون می‌شوند که شامل فسفولیپاز A_2، فیبرینولیتیک، فعال کننده پروتئین C و L-آمینواسیداکسیدازها (ضد انعقاد کننده‌های آنزیمی) یا پروتئین‌های مانند شبه لکتین نوع C، توکسین‌های سه انگشتی (TFTs) و مهار کننده های پروتئیناز (ضد انعقادهای غیرآنزیمی) هستند. تمامی این عوامل در اثر مار گزیدگی موجب اختلال انعقادی می‌گردند و اختلال انعقادی یک پدیده مهم بالینی است و اگر به درستی درک نشود ممکن است در فرایند تشخیص مار گزیدگی و درمان آن مشکل ایجاد کند، به‌طوری که به سرعت می‌تواند توسعه یابد و باعث مرگ فرد مارگزیده گردد.

واژه‌های کلیدی: اختلال انعقادی، پروتئین، مارگزیدگی، زهر مار

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۲): ۸۸-۱۰۵.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۲

[1] مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

نویسنده مسئول: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
آدرس: کرج- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸ نمابر: ۰۲۶۳۴۵۵۲۱۹۴ پست الکترونیکی: m.babaie47@yahoo.com

مقدمه

زهر مارها یکی از عجیب‌ترین تحولات در تکامل موجودات است. زهر اکثر مارها منبع غنی از پروتئین‌ها و پپتیدهای مؤثر بر سیستم هموستاتیک هستند که بر علیه انواع فاکتورهای درگیر در انعقاد و فیبرینولیز فعالیت دارند. ترکیبات موجود در زهر مار نقاط مختلفی از سیستم‌های حیاتی طعمه را هدف قرار می‌دهند و عمدتاً سیستم عصبی و گردش خون دو مکان اصلی فیزیولوژی هستند که توسط بسیاری از زهرها مورد هدف قرار می‌گیرند و با تعلیق این سیستم‌ها، شکار در مدت زمانی کوتاه از پای در می‌آید (۱).

بیشترین تأثیر زهر مار بر دستگاه گردش خون است و موجب پارگی رگ‌ها و خونریزی داخلی و حتی خونریزی مغزی می‌گردد. تورم و درد در محل گزش بعد از چند دقیقه ظاهر می‌شود. ادرار خون آلود، خون دماغ و تشنج از عوارض مار گزیدگی است. به علاوه خونریزی موضعی از محل گزش، محل‌های آسیب رگ و از لثه‌ها و دستگاه گوارش ایجاد می‌شود و اثرات بالینی بسیار شدید و کشنده‌ای دارد. (۳، ۲).

روش تحقیق

مقاله حاضر، یک مطالعه مروری می‌باشد که پس از جستجو در بانک‌های PubMed، Scopus، Medline، Google scholar تهیه شده و سعی گردید که در آن از اطلاعات به روز استفاده گردد. در مواردی از پایگاه Magiran و جهاد دانشگاهی نیز استفاده گردید. جستجوی کتابخانه‌ای برای جمع‌آوری اطلاعات از کتاب‌های در دسترس و الکترونیکی نیز انجام گرفت. در حد امکان، تمامی مقالات و خلاصه مقالات معتبر خارجی و داخلی مرتبط، مرور گردید. در جستجو از کلمات کلیدی مانند اختلال انعقادی، مارگزیدگی، زهر مار، پروتئین‌های زهر مار استفاده شده است.

یافته‌ها

گزش مارها سالیانه حدود ۳ تا ۴ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد که بیش از صد هزار نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند. از دلایل اصلی مرگ‌ومیر و ایجاد عارضه به وسیله زهر مارها، اختلال انعقادی[1] ناشی از مار گزیدگی است (۴). هر نوع وضعیتی که در اثر تزریق زهر مار به بدن جاندار موجب افزایش یا کاهش زمان انعقاد خون گردد، عارضه اختلال انعقادی را ایجاد می‌کند. این اختلال، جنبه‌های بالینی مختلفی را ایجاد می‌کند و تشخیص و درمان مارگزیدگی و عوامل ایجاد کننده آن را حائز اهمیت می‌نماید (۵). استفاده از پادزهر، مؤثرترین راه درمان اختلال انعقادی است و درمان‌های دیگر شامل فاکتور درمانی جایگزین و هپارین بی‌اثر و حتی خطرناک می‌باشند. تداخل با مراحل مختلف سیستم هموستاتیک یک موضوع متداول در میان زهر مارها است (۹-۶). گزش مار و زهری که وارد بدن جاندار می‌شود پتانسیل زیادی برای ایجاد اثرات وسیع و قابل توجه بالینی دارد (شکل ۱).

شکل ۱- اثرات وسیع و قابل توجه بالینی در اثر مارگزیدگی

اختلال انعقادی ایجاد شده در اثر تزریق زهر[2] توسط خانواده مارهای الاپیده و ویپریده ایجاد می‌گردد. در این میان الاپیدهای استرالیایی قوی‌ترین مارهایی هستند که منجر به ایجاد شدیدترین اختلال انعقادی در اثر تزریق زهر را می‌شوند، هر چند که همه گونه-های آن چنین تأثیر شدیدی را ندارند (جدول ۱) (۱۰).

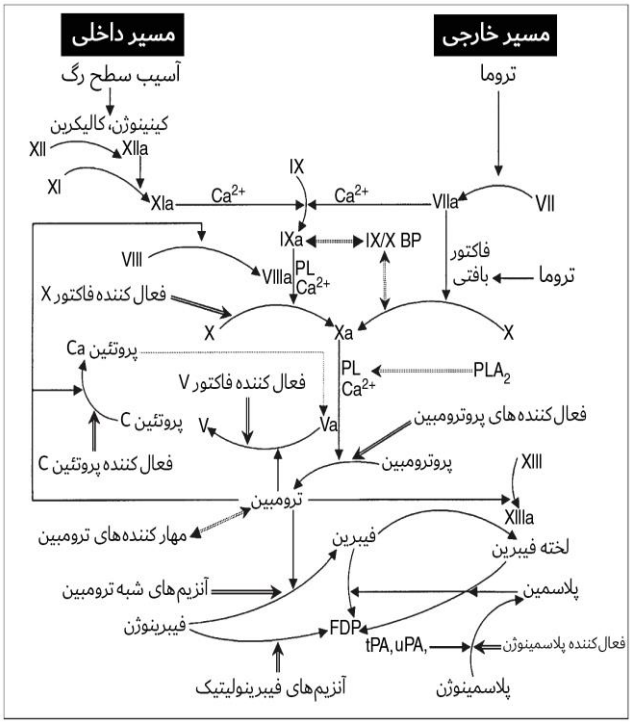
[1] Coagulopathy
[2] Venom-Induced Consumption Coagulopathy; VICC

جدول ۱- خلاصه مارهایی که باعث ایجاد انعقاد ناشی از زهر می‌گردند (۱۰)

گونه‌های مار	پراکندگی	زهرهای انعقادی	تست VICC	فاکتور اثر گذار
Daboia russelii	آسیا	فعال کننده‌های FV و FX	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، CT، WBCT20	فیبرینوژن، FX، FV
Daboia russelii siamensis	آسیا	فعال کننده‌های FV و FX	PT، عدم لخته خون	فیبرینوژن، FX، FV
Hypnale hypnale	آسیا	TLE	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، CT، PT، aPTT، WBCT20	فیبرینوژن، FX، FIII
Echis carinatus	آسیا	PTA	WBCT20	پروترومبین
Calloselasma rhodostoma	آسیا	TLE	۳۰<VCT دقیقه، فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، FDP	فیبرینوژن
Trimeresurus albolabris	آسیا	TLE	فیبرینوژن، فیبرینوپپتید A، پلاسمینوژن، FDP	فیبرینوژن
Trimeresurus macrops	آسیا	TLE	فیبرینوژن، فیبرینوپپتید A، پلاسمینوژن، FDP	فیبرینوژن
Trimeresurus stejnegeri	آسیا	TLE، فعال کننده پلاسمینوژن	فیبرینوژن، FDP، AT-III	فیبرینوژن
Rhabdophis subminiatus	آسیا	؟	فیبرینوژن، FDP	فیبرینوژن
Rhabdophis tigrinus	آسیا	؟	فیبرینوژن، FDP، PT، aPTT	فیبرینوژن
Pseudonaja spp.	استرالیا	PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT،	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Notechis scutatus	استرالیا	PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Tropidechis carinatus	استرالیا	PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Hoplocephalus spp.	استرالیا	PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Oxyuranus scutellatus	آسیا- استرالیا	PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Bothrops atrox	آمریکای جنوبی	TLE، فعال کننده‌های FV و FX	D-دایمر، PT، aPTT، FDP	فیبرینوژن
Bothrops asper	آمریکای جنوبی	TLE، PTA	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV، FII
Bothrops jararaca	آمریکای جنوبی	TLE، PTA، فعال‌کننده‌های FV و FX	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Lachesis spp.	آمریکای مرکزی	TLE	فیبرینوژن، D-دایمر، α۲-آنتی پلاسمین	فیبرینوژن
Crotalus durissus	آمریکای جنوبی و مرکزی	TLE	فاکتور لخته کننده، D-دایمر، PT، aPTT، FDP	فیبرینوژن، FV، FII
Crotalus atrox	آمریکای شمالی	TLE	فیبرینوژن، PT، aPTT	فیبرینوژن
Crotalus adamanteus	آمریکای شمالی	TLE	فیبرینوژن، آنتی‌پلاسمین III، D-دایمر، PT، aPTT، FDP	فیبرینوژن
Crotalus molossus molossus	آمریکای شمالی	TLE?	فیبرینوژن، PT، FDP	فیبرینوژن
Crotalus horridus	آمریکای شمالی	TLE	فیبرینوژن، FDP	فیبرینوژن
Crotalus helleri	آمریکای شمالی	TLE	فیبرینوژن، PT	فیبرینوژن
Vipera aspis	اروپا	فعال کننده FX	فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Vipera berus	اروپا		فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Vipera ammodytes ammodytes	اروپا		فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Atheris squamigera	آفریقا	TLE	فیبرینوژن، aPTT	فیبرینوژن
Atheris chlorechis	آفریقا	TLE	فیبرینوژن، PT، aPTT	فیبرینوژن
Atheris nitschei	آفریقا	TLE	فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Cerastes cerastes	آفریقا/ خاورمیانه	TLE	فیبرینوژن، D-دایمر، فاکتور V، PT، aPTT	فیبرینوژن، FV
Cerastes vipera	آفریقا/ خاورمیانه	TLE (cerastobin)	فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Proatheris superciliaris	آفریقا		فیبرینوژن، D-دایمر، PT، aPTT	فیبرینوژن
Bitis arietans	آفریقا	TLE	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، PT	فیبرینوژن
Bitis gabonica	آفریقا	TLE (Gabonase)	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، PT	فیبرینوژن
Echis coloratus	آفریقا	PTA	فیبرینوژن، PT، FDP	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Echis ocellatus	آفریقا	PTA	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، WBCT20	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Echis pyramidum	آفریقا	PTA	فیبرینوژن، فاکتور لخته کننده، PT	فیبرینوژن، FV، FII، FIII
Dispholidus typus	آفریقا	TLE، PTA، فعال‌کننده SVMP، FX	فیبرینوژن، ترمبوالاستوگرافی، PT، aPTT، FDP	فیبرینوژن

aPTT: activated partial thromboplastin time; **CT:** clotting time; **VCT:** venous clotting time; **FDP:** fibrinogen degradation products; **PLA2:** phospholipase A_2, **PT:** prothrombin time; **TLE:** thrombin like enzymes; **WBCT:** whole blood clotting time; **WBCT20: 20** minutes whole blood clotting time; **FII:** factor II; **FV:** factor V; **FX:** factor X; **FDP:** fibrinogen degradation products; **PTA:** prothrombin activator; **SVMP:** snake venom metalloproteinase

همان‌طور که گفته شد با ورود زهر مار به بدن جاندار مهم‌ترین سیستمی که آسیب می‌بیند سیستم گردش خون است که پیامد آن اختلال انعقادی است. نکته مهم در مطالعه اختلالات انعقادی در اثر ترکیبات گوناگون زهر مارها، بررسی مواد یا پروتئین‌های زهر مار هستند که این عارضه را ایجاد می‌کنند (شکل ۲). خالص سازی این ترکیبات و نحوه اثر آن‌ها بر سیستم گردش خون توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده است. جداسازی ترکیبات مختلف در بیشتر کارهای تحقیقاتی که هدف خالص‌سازی پروتئین‌های حیاتی است اکثراً توسط روش‌های کروماتوگرافی انجام می‌گیرد (۱۳-۱۱). با این روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌های متنوعی تخلیص شده است (۱۴) که آگاهی از وجود این ترکیبات و نحوه عملکرد آن‌ها برای درک بیشتر مسئله اختلال انعقادی مهم می‌باشد. لذا در این زمینه به بررسی پروتئین‌های زهر مارها که در اختلالات انعقادی دخیل هستند، می‌پردازیم.



شکل ۲- مسیرهای فیبرینولیتیک انعقاد خون و محل عملکرد پروتئین‌های زهر مار

فلش دو خط: پروتئین‌های زهر مار؛ فلش پیوسته مستقیم: فعال سازی، فلش نقطه‌چین مستقیم: مهار؛ فلش خمیده؛ تبدیل، فلش دو سر: اتصال.

الف- ترکیبات پروتئینی با خواص آنزیمی

۱- فسفولیپازها: وجود فسفولیپازهای A_1، A_2، C و D در زهر مارها و دیگر جانوران سمی گزارش شده است. آنزیم‌های فسفولیپاز A_2، در گروه آنزیم‌های استرولیتیکی قرار می‌گیرند، این آنزیم‌ها گلیسرو فسفولیپیدها را در وضعیت sn-2 شاخه اصلی هیدرولیز کرده و اسید چرب و لیزوفسفولیپید آزاد می‌کنند. طیف گسترده‌ای از اثرات فسفولیپازهای زهر مار گزارش شده است. این اثرات شامل تخدیر اعصاب (نوروتوکسیک)، انقباض مردمک چشم (میوتوکسیک)، سموم قلبی (کاردیوتوکسیک)، انحلال گلبول‌های قرمز (همولیتیک)، تشنج آور، ضد انعقادی، ضد پلاکت و صدمات بافتی هستند (۱۵). اثرات ضد انعقادی این آنزیم‌ها، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر دارند. از آنجا که فسفولیپیدها نقش اساسی در تشکیل برخی از کمپلکس‌های انعقادی دارند، اولین پیش بینی برای مکانیسم اثر ضد انعقادی این آنزیم‌ها ممکن است تخریب سطح فسفولیپیدها برشمرده شود. هر چند که آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 اغلب انعقاد خون را توسط مکانیسمی که به هیدرولیز فسفولیپیدها بستگی دارد، تحت تأثیر قرار می‌دهند، اما اثرات دیگری مانند تأثیرات ضد میکروبی آن‌ها نیز گزارش شده است (۱۷، ۱۶).

۲- L-آمینواکسیدازها: L-آمینو اسید اکسیدازها[1] در زهر مارهای وایپریده و الاپیده وجود دارند. این آنزیم‌ها همودایمر و گلیکوپروتئین‌های متصل شونده به فلاوین منونوکلئوتید[2] یا فلاوین آدنین دی نوکلئوتید[3] با وزن ملکولی ۱۵۰-۱۱۰ کیلودالتون هستند. L-آمینو اکسیدازها واکنش آمین زدایی اکسیدی تعدادی از اسیدهای آمینه را کاتالیز می‌کند (۱۹، ۱۸).

$$RCHNH_2COOH+H_2O \rightarrow RCOCOOH+NH_3+H_2O_2$$

L-آمینواسید اکسیدازها در ارتباط با سیستم هموستاتیک، گزارش شده‌اند که تراکم و تجمع پلاکت را تحت تأثیر قرار می‌دهند و خونریزی را به واسطه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های اندوتلیال عروقی ایجاد می‌کنند (۲۰).

[1] L-amino acid oxidase
[2] Flavin mononucleotide; FMN
[3] Flavin adenine dinucleotide; FAD

۳- پروتئازها: پروتئازهایی که تاکنون جداسازی شده‌اند، به طور کلی به دو دسته متالوپروتئازها و سرین پروتئازها طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئازها واکنش تخریب پیوندهای پپتیدی پروتئین را در بافت‌ها کاتالیز می‌کنند و منجر به آسیب‌دیدگی دیواره رگ‌های خونی و آسیب دیدگی گردش خون می‌شوند. پروتئازهای سمی که تاکنون از لحاظ ساختاری شناسایی شده‌اند، جزء سرین پروتئازها یا متالوپروتئازها هستند و این پروتئازها با کمی استثناء همگی فعالیت فیبرینوژنولیتیک[1] دارند (۲۲، ۲۱).

- **متالوپروتئینازها:** متالوپروتئینازهای زهر مار آنزیم‌های اِندو-پروتئولیتیک[2] هستند. فعالیت آن‌ها بستگی به یون‌های فلز روی دارد. براساس اندازه و ویژگی‌های ساختاری، این آنزیم‌ها به گروه‌های P-I، P-II، P-III و P-IV تقسیم می‌شوند. پروتئینازهای P-I تنها از یک میدان متالوپروتئینازی تشکیل شده‌اند، پروتئینازهای P-II حاوی متالوپروتئیناز و میدان‌های دیس‌اینتگرین، پروتئینازهای P-III حاوی متالو پروتئینازهای شبه دیس‌اینتگرین و دُمین غنی از سیستئین و پروتئینازهای P-IV حاوی ساختار دُمین P-III به علاوه دُمین شبه لکتین پیوند یافته با باندهای دی‌سولفیدی است (۲۳). متالوپروتئینازها علاوه بر هضم غذا، دارای چندین اثر زیستی شامل خونریزی، اثرات انعقادی، ضد انعقادی و آنتی پلاکتی نیز هستند. این آنزیم‌ها می‌توانند توسط انعقاد خون و بستن مسیر جریان خون تجزیه غشاء زیرین رگ‌ها، منجر به خونریزی شدید شوند (۲۴).
سرین پروتئازها، مانند متالوپروتئینازهای با فعالیت فیبرینوژنولیتیک، در درمان‌های پزشکی، قابل استفاده هستند. این آنزیم‌ها سطوح فیبرینوژن را در پلاسما کاهش می‌دهند و یا پلاسمای لخته شده را حل می‌کنند (ترومبولایزز[3]) (۲۵).
- **سرین پروتئازها:** سرین پروتئازها در زهر مارهای ویپریده، الاپیده و کلوبریده وجود دارد (۲۶). سرین پروتئازهای زهر مار زنجیره‌های پلی‌پپتیدی را در موقعیت ریشه‌های آمینواسیدی دارای بار مثبت در ناحیه C-ترمینال می‌شکنند. تمامی اعضای این گروه را می‌توان به عنوان اندوپپتیدازها طبقه‌بندی کرد. سرین پروتئازها اغلب فعالیت استرولیتیک قوی در مقابل استرهای آنالوگ سوبستراهای پپتیدی ویژه نشان می‌دهند. این ویژگی برای روش‌های سنجش کنیتیکی مفید است. تعدادی از سرین پروتئازها هر دو فعالیت فیبرینولیتیک و فیبرینوژنولیتیک را دارند. اما تعدادی از آن‌ها تنها فعالیت فیبرینوژنولیتیک دارند و اغلب پروتئازهای شبه ترومبین نامیده می‌شوند. با این وجود، واکنش آن‌ها با دیگر سوبستراهای ترومبین، به خوبی فیبرینوژن نیست. به علاوه، تعدادی گزارش‌ها نیز بر وجود سرین پروتئازهایی با فعالیت‌هایی از قبیل فعال کننده فاکتور V، پروتئین C، پلاسمینوژن یا پلاکت‌ها اشاره می‌کنند. بیشتر عمل سرین پروتئازهای زهر مار شامل اثر بر تراکم پلاکت، انعقاد خون، فیبرینولیز، سیستم کمپلمان و فشار خون است (۲۷، ۱۵).

۴- آنزیم‌های شبه ترومبین[4]: این آنزیم‌ها در اکثر زهر مارهای خانواده ویپریده و کروتالیده یافت شده‌اند. این آنزیم‌ها در خواص فیزیکوشیمیایی، گسستن پیوند پپتیدی و فعالیت بیولوژیکی با دیگر فاکتورهای انعقادی و پلاکت‌ها تفاوت دارند. آنزیم‌های شبه‌ترومبین زهر مارها به خانواده سرین پروتئازها تعلق دارند که در شرایط آزمایشگاهی خون را لخته می‌کنند. این آنزیم‌ها هنگامی که در شرایط طبیعی عمل می‌کنند با کاهش مقدار فیبرینوژن موجود در گردش خون، از انعقاد خون جلوگیری می‌کنند (۲۸)؛ بنابراین آنزیم‌هایی از زهر مار که دارای فعالیت‌های پروتئولیتیکی و انعقادی هستند و می‌توانند در فرآیند انعقاد مداخله کنند، به عنوان آنزیم‌های شبه ترومبین شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها اساساً سرین پروتئاز می‌باشند و همانند ترومبین فیبرینوژن را لخته کند و فیبرینوپپتیدهای A و B را آزاد نماید (۳۰، ۲۹). برخی از آنزیم‌های شبه ترومبین به عنوان عامل ضد انعقاد برای جلوگیری و درمان تعداد زیادی از بی‌نظمی‌های ترومبوتیک[5]، جراحی، پیوند عضو، در آزمایشگاه‌ها برای سنجش فیبرینوژن در نمونه‌های خون هپارینه و

[1] Fibrinogenolytic
[2] Endoproteolytic
[3] Thrombolysis
[4] Thrombin-like enzymes
[5] Thrombotic

به عنوان یک عامل در مطالعات انعقادی استفاده می‌شود. در درمان بالینی، این سرین پروتئازها برای جلوگیری از ترومبوز و اصلاح گردش خون (کاهش ویسکوزیته خون) استفاده می‌گردند. در حال حاضر تعدادی از این آنزیم‌ها شامل آنکرود، باتروکسوبین و رپتیلاز به صورت دارو استفاده می‌شوند (۳۲، ۳۱).

۵- پروتئازهای شبه کالیکرین[1]: گروه دیگری از سرین پروتئازهای سمی، آنزیم‌های پروتئازی شبه کالیکرین هستند. این آنزیم‌ها هیپوتنسیوکالکرین[2] را از کینینوژن پلاسمای حیوانی آزاد می‌کنند. اخیراً یک پروتئاز شبه کالیکرین از زهر مار *Agkistrodon Halys Blomhofi* جداسازی و هالیستاز[3] نامیده شده است. این آنزیم از نظر توالی، به کالیکرین (۴۲٪) شباهت زیادتری در مقایسه با ترومبین (۲۶٪) دارد (۳۳) و زنجیره βB را در Arg 42 و با سرعت کمتر از زنجیره αA فیبرینوژن را می‌شکنند و محصولی تولید می‌کند که از لخته‌های فیبرین تولیدی توسط ترومبین کوچکتر باشد. در نتیجه از لخته شدن طبیعی فیبرینوژن جلوگیری می‌کند و کاهش فشار خون را القاء و از انعقاد خون جلوگیری می‌کنند (۳۴).

۶- فعال‌کننده‌های پروتئین C: فعال‌کننده پروتئین C، پروتئینازهای ضد انعقادی است که فاکتور V_a و VII_a را غیر فعال می‌سازد و نقشی کلیدی در کنترل هموستاز دارد. پیش‌ساز غیر فعال آن، پروتئین C، پروتئینی وابسته به ویتامین K و زیموژنی دو زنجیره است که توسط ترومبین فعال می‌شود. پروتئین C فعال فاکتورهای V_a و VII_a را تجزیه می‌کند، بنابراین ضد انعقادی است (۲۷، ۶). برخلاف واکنش فعال‌کنندگی پروتئین C توسط ترومبین که نیاز به ترومبومودین به عنوان کوفاکتور دارد، این فعال‌کننده‌ها مستقیماً پروتئین C را به شکل فعالش در می‌آورند. پروتاک، سریع‌ترین فعال‌کننده پروتئین C، از زهر مار *Agkistrodon Contortrix Contortrix* تخلیص شده است و در تشخیص اختلالات مسیر پروتئین C به طور وسیعی مصرف می‌شود (۳۶، ۳۵).

۷- فعال‌کننده فاکتور V: فاکتور V گلیکوپروتئینی چندکاره با وزن مولکولی ۳۳۰ کیلودالتون است که اثرات مهمی در زمینه‌های انعقادی و ضدانعقادی دارد. ترومبین با شکستن فاکتور V فاکتور V_a را ایجاد می‌کند. فاکتور V_a کوفاکتور تقویت‌کننده واکنش فعال‌سازی پروترومبین می‌باشد که توسط فاکتور X_a کاتالیز می‌گردد و فعالیت کوفاکتوری آن توسط پروتئین C فعال شده تنظیم می‌شود. همچنین فاکتور V به عنوان کوفاکتور در غیر فعال سازی فاکتور VIII عمل می‌کند (۳۷). تعدادی فعال‌کننده فاکتور V از زهر مارهای *Bothrops Atrox*، *Russelli Vipera*، *Naja Nigricollis*، *Nigricollis*، *Naja Naja Oxiana* و *Vipera ursine* جداسازی شده است (۳۸).

۸- فعال‌کننده فاکتور X: فعال‌کننده فاکتور X از زهر مارهای بسیاری از گونه‌های متعلق به خانواده‌های ویپرده و کروتالیده و تعداد کمی از مارهای متعلق به خانواده الاپیده جداسازی شده‌اند. این فعال‌کننده‌ها سرین پروتئاز یا متالوپروتئیناز هستند. مهمترین آن‌ها فعال‌کننده فاکتور X و RVV-X است که در زهر مار *Vipera russelli* یافت می‌شود. از RVV-X در تعدادی از سنجش‌های انعقادی، به طور مشخص برای اندازه گیری خود فاکتور X، برای تخمین اثر ضدانعقادی لوپوس و برای تمایز دادن فاکتور VII و فاکتور X استفاده می‌شود (۳۹).

۹- فعال‌کننده‌های FX: FX بالغ یک پروتئین ۵۹ کیلو دالتون است متشکل از یک زنجیره سنگین که با پیوند دی‌سولفیدی به یک زنجیره سبک متصل است. FX با ایجاد شکست در پیوند Arg 194-Ile 195 خود که ۵۲ ریشه اسیدآمینه اول از ناحیه N-ترمینال زنجیره سنگین برداشت شده فعال می‌شود. تعداد کمی از سرین پروتئازهایی که FX را فعال می‌کنند، از زهر مارها جداسازی شده‌اند (۴۰). به عنوان مثال این نوع از فعال‌کننده‌ها از زهر مار *Hannah ophiophagus* (۴۱) و *Bungarus fasciatus* (۴۲) جداسازی شده است. این فعال‌کننده‌ها با ایجاد شکست در زنجیره سنگین FX وابسته به یون‌های Ca^{2+} عمل می‌کنند (۴۳).

[1] Kallikrein-like proteases
[2] Hypotension kallikrein
[3] Halystase

۱۰- فعال‌کننده‌های FVII: FVII به عنوان یک زیموژن تک زنجیره‌ای ۵۰ کیلودالتون در خون گردش می‌کند. شکست پیوند پپتیدی Arg 152-Ile 153 آن را به شکل فعال فیزیولوژیکی که به صورت $FVII_a$ دو زنجیره می‌باشد، تبدیل می‌کند (۴۴). سرین پروتئازهایی که فقط FVII را فعال کنند تاکنون جداسازی نشده‌اند. برای مثال، اسکوتارین[1] فعال‌کننده FVII، فعال‌کننده پروترومبینی گروه C نیز می‌باشد که تشخیص آن به واسطه وزن ملکولی محصولات حاصل از تخریب آن تشخیص داده می‌شود (۴۵). فعال سازی FVII به وسیله اسکوتارین مشابه فعال‌سازی این فاکتور در مسیر داخلی انعقاد است. فعال‌سازی به وسیله فسفولیپیدها و یون-های Ca^{2+} بهتر و شدیدتر صورت می‌گیرد.

۱۱- فعال‌کننده‌های FV: FV پروتئین تک زنجیره‌ای ۲۳۰ کیلو دالتونی است. فعال‌سازی این فاکتور به وسیله α-ترومبین با ایجاد شکست در سه موقعیت بعد از Arg 709، Arg 1018، Arg 1545 ایجاد می‌شود. شکست در دو موقعیت اول (Arg 709, Arg 1018) برای فعال‌شدن کافی نیست؛ اما شکست در موقعیت سوم را تسریع می‌کند که این شکست برای فعال‌شدن ضروری است. آنزیم VLFVA و RVV-V به واسطه شکست FV پس از اسیدآمینه Arg 1545 آن را فعال می‌کند (۴۶).

۱۲- فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن: پلاسمینوژن انسان یک گلیکوپروتئین تک زنجیره‌ای ۹۲ کیلو دالتونی است (۴۷). فقط سه فعال‌کننده ویژه پلاسمینوژن از زهر مارها جداسازی شده است که عبارتند از TSV-PA (۴۸)، Haly-PA (۴۹) و LV-PA (۵۰) می‌باشد. بهترین مورد شناسایی شده TSV-PA است که یک سرین پروتئاز تک زنجیره‌ای است و پلاسمینوژن را در محلی مانند فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع اوروکینازی و فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی (بعد از Arg 561) برای تولید پلاسمین (آنزیم دو زنجیره‌ای کلیدی در فیبرینولیز یا تجزیه فیبرین) می‌شکند.

۱۳- نوکلئازها و ریبونوکلئازها: اندونوکلئازهای زهر مار، پیوندهای حساس فسفات، دی‌استرهای داخل زنجیره‌ای DNA یا RNA را هیدرولیز می‌کنند. نوکلئازها (DNAase، RNAase و فسفودی استرازها) و نوکلئوتیدازها (´۵-نوکلئوتیدازها، ADPases و ATPases) به طور وسیع در زهر مارها وجود دارند. این آنزیم‌ها کمتر مطالعه شده‌اند و نقش دارویی آن‌ها به وضوح نشان داده نشده است. گزارش شده که برخی از آن‌ها بر روی تراکم پلاکت‌ها اثر دارند. آنزیم‌های ریبونوکلئاز و دی‌زوکسی ریبونوکلئاز عمل هیدرولیز را افزایش می‌دهند و اغلب در زهر مارهایی که دارای خاصیت عصب‌گرا یا نروتوکسین هستند مانند مار کبرا وجود دارند (۵۱، ۱۵).

ب- ترکیبات پروتئینی ضد انعقادی با خاصیت غیرآنزیمی

۱- بازدارنده‌های ترومبین: بوثروجاراسین بازدارنده‌ای با وزن مولکولی ۲۷ کیلو دالتون است که از زهر مار *Bothrops Jararaca* جداسازی شده است. این پروتئین از زیر واحدهای ۱۳ کیلودالتون که با پل‌های دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند، تشکیل شده است. بوثروجاراسین دو مکانیسم مستقل برای جلوگیری از انعقاد دارد. این ماده زمان انعقاد فیبرینوژن را توسط بازدارندگی رقابتی و جلوگیری از اتصال ترومبین به ترومبودیولین و کاهش نرخ فعال‌کنندگی پروتئین C، طولانی می‌کند (۳۹، ۵).

۲- ضد انعقادهای لوپوس: این ضد انعقادها، یک جمعیت هتروژن از ایمونوگلوبین‌ها (آنتی‌بادی‌های فسفولیپیدی) هستند که در تست‌های انعقادی وابسته به فسفولیپیدها مانند PT، aPTT و KCT تداخل ایجاد می‌کنند. به دلیل هتروژنیک ملکولی ضد انعقادهای لوپوس، هیچ تستی به طور مستقل منجر به غربال رضایت‌بخش آنها نشده و بیشتر از aPTT و KCT استفاده می‌شود (۵۲).

۳- فاکتور ون‌ویلبرلند[2]: تعدادی از گونه‌های مار *Bothrops* حاوی بوتروستین می‌باشند. بوتروستین برای اینکه بر روی پلاکت‌ها تأثیر بگذارند به فاکتور ون‌ویلبرلند نیاز دارند. این ماده به طور جزئی

[1] Oscutarin

[2] Von Willebrand factor; vWf

پلاکت‌های حاصل از بیماری برنارد–سولیر را جمع می‌کند (۵۳، ۳۹). در مطالعات اخیر فاکتورهای ضد انعقادی از زهر مارها جدا شده‌اند که عملکردی شبیه فاکتور ون‌ویلبرلند در انسان را دارند که از آن جمله می‌توان به اِکیستین[1] از مار جعفری اشاره کرد که تجمع پلاکت‌ها را مهار می‌کند (۵۴).

۴- پلاکت‌های گلیکوپروتئینی: بسیاری از زهر مارها فعالیت پلاکتی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که مهم‌ترین آن‌ها دیس اینتگرین‌ها هستند. دیس‌اینتگرین‌ها خانواده بزرگی از پروتئین‌های همولوگ را تشکیل می‌دهند که از تجمع پلاکت‌ها از طریق بازدارندگی فعالیت گیرنده‌های گلیکوپروتئینی سطحی جلوگیری می‌کنند (۵۵).

۵- غیرفعال کننده‌های مهارکننده‌های سرین پروتئازها (سرپین‌ها[2]): سرین پروتئازهایی برای غیرفعال کردن سرپین‌های پلاسما، مهارکننده‌های سرین پروتئاز درگیر در تنظیم کردن فعالیت فاکتورهای انعقادی و فیبرینولیز به دست آمده‌اند. CR سرپیناز یک پروتئیناز ۴۵/۵ کیلو دالتونی است که آنتی‌ترومبین III انسانی را با ایجاد شکست در Arg 393-Ser 394 جایگاه فعالش غیرفعال می‌کند (واکنشی وابسته به هپارین). غیر فعال کردن مهار کننده‌های فیبرینولیز یکی از مکانیسم‌های افزایش فیبرینولیز است. به طور مثال، پروتئیناز–۱ هپارین کوفاکتور II را در حضور یون‌های Ca^{2+} غیرفعال می‌کند (۵۶).

ج- خونریزی‌دهنده‌ها

متالو پروتئینازها به وسیله بر هم زدن و مختل کردن فعل و انفعالات بین سلول‌های اندوتلیال و غشاء پایه به عنوان یک پیامد تخریب ترکیبات پروتئینی غشاء پایه مانند فیبرونکتین، لامینین، کلاژن نوع IV و نیدوژن (انتاکتین)، به علاوه با تخریب پروتئین‌های غشاء سلول اندوتلیال، اینتگرین‌ها و کدهرین‌ها ایجاد خونریزی[3] می‌کنند (۵۸، ۵۷). اتصال به کلاژن دارای اهمیت زیادی برای فعالیت خونریزی دهنده متالوپروتئینازها است. پیشنهاد شده که علاوه بر نقش این متالوپروتئینازها در سست کردن دیواره رگ، در هم شکستن بیوفیزیکی مانند تخریب کشش دیواره و ایجاد شکاف استرسی وابسته به جریان خون، نقش معنی‌داری در پاتوژنز آسیب سلول اندوتلیال و خونریزی تحریک شده به وسیله آن‌ها بازی می‌کند. بسیاری از متالوپروتئینازها دارای فعالیت خونریزی دهنده هستند و همچنین اکثریت آن‌ها فیبرین یا فیبرینوژنولیتیک بودند (۶۰، ۵۹). اکثر پروتئین‌های موجود در زهر مار در جدول ۲ آورده شده‌اند.

جدول ۲- خانواده پروتئینی موجود در زهر اکثر مارها

خانواده پروتئینی	هدف در سیستم هموستاتیک	اثر
سرین پروتئازها	پلاکت‌ها	تراکم
	FX، FVII، FV، FII، PC	فعال سازی
	پلاسمینوژن	فعال سازی
	فیبرینوژن	انعقاد
	فیبرین	تخریب
	سرپین‌ها	غیرفعال سازی
متالوپروتئینازها	سلول‌های اندوتلیال، غشاء پایه	خونریزی
	پلاکت‌ها	مهار تراکم و انباشتگی
	FX ،FII	فعال سازی
	فیبرینوژن (فیبرین)	تخریب
	سرپین‌ها	غیرفعال سازی
فسفولیپازهای A_2	$TF/FVII$ ،FII_a ،FX_a	مهار
	پلاکت‌ها	تراکم و انباشتگی، مهار تراکم و انباشتگی
L–آمینواسیداکسیدازها	سلول‌های اندوتلیال	خونریزی
	پلاکت‌ها	تراکم و انباشتگی، مهار تراکم و انباشتگی
۵´-نوکلئوتیدازها	پلاکت‌ها	مهار تراکم و انباشتگی
دیس‌اینتگرین‌ها	پلاکت‌ها	مهار تراکم و انباشتگی
شبه لکتین نوع C	FII_a ،FX،FIX	مهار
پروتئین‌ها	FX ،FII	فعال سازی
	پلاکت‌ها	مهار انباشتگی، انباشتگی
توکسین‌های سه انگشتی	$FVII_a$	مهار
	پلاکت‌ها	مهار تراکم و انباشتگی

[1] Echicetin
[2] Serpins
[3] Haemorrhagins

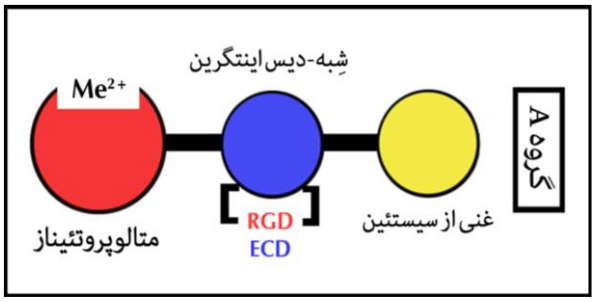
د- پروتئازهای پیش انعقادی

این آنزیم‌ها یک فاکتور انعقادی به‌خصوص در آبشار انعقادی را فعال می‌کنند و شکل‌گیری لخته را تسریع می‌کنند. فاکتورهای پیش‌انعقادی از جمله فعال کننده‌های FVII، فعال کننده‌های FX، فعال کننده‌های پروترومبینی می‌باشند. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای انعقـادی، فعال‌کننده‌های پـروترومبینی هستند. فعال‌کننده‌های پروترومبین زهر مار متالوپروتئیناز یا سرین‌پروتئاز هستند و براساس مکانیسم عمل و کوفاکتورهای مورد نیازشان در چهار گروه A، B، C، D طبقه بندی می‌شوند.

انواع فعال‌کننده‌های پروترومبین

آنزیم‌های پروتئاز در زهر مارها می‌توانند مشکلات خاص انعقاد خون را ایجاد نمایند. همان‌طور که گفته شد، پروتئازهای خالص شده از زهر مار به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند. گروه اول متالوپروتئازها هستند که برای فعالیت نیاز به یون‌های کلسیم و روی دارند. این آنزیم‌ها به عنوان عامل فعال کننده فاکتور (X)۱۰ خون، فعال کننده پروترومبین، پروتئازهای هموراژیک و پروتئازهای ایجاد مرگ برنامه ریزی شده سلولی عمل می‌کنند. گروه دوم پروتئازهای سرینی هستند که به عنوان عامل فعال کننده فاکتور (V)۵ خون، فعال‌کننده پروتئین C، فعال‌کننده پلاسمینوژن، عامل ترشح کینین، فعال‌کننده فاکتور (X)۱۰ خون و فعال کننده پروترومبین عمل می‌کنند.

۱- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه یک (A): این متالوپروتئینازها به‌طور مؤثر پروترومبین را بدون نیاز به هر گونه کوفاکتوری مانند یون‌های Ca^{2+}، فسفولیپیدها یا FV_a فعال می‌کنند. این فعال‌کننده‌ها در زهر تعدادی از مارهای افعی یافت شده‌اند و احتمالاً نقش توکسین را در زهر مار دارد و پس از آن نسبت به مهار کننده‌های طبیعی منعقد کننده، سرپین‌ها از جمله آنتی‌ترومبین مقاومت می‌کنند (۶۱). بهترین نمونه فعال‌کننده گروه A، اکارین است که از زهر مار جعفری[1] جداسازی شده است (۱۲). پروتئین متالوپروتئینازی و به لحاظ ساختاری، ۶۴٪ با زنجیره سنگین فعال کننده FX (RVV-X) از زهر مار افعی راسل یکسان است. اکارین شامل سه دُمین، دُمین متالوپروتئیناز، دُمین شبه دیس-اینتگرین و یک دُمین غنی از سیستئین است (شکل ۳) (۶۱). اکارین یک آنزیم کارآمد و مؤثر با Km پایین برای پروترومبین و Kcat بالا می‌باشد. اکارین پیوند بین Arg 320-Ile 321 در پروترومبین را می‌شکند و میوزوترومبین تولید می‌کند. میوزوترومبین با هضم خود به‌خودی سرانجام به α-ترومبین تبدیل می‌شود. اکارین همچنین می‌تواند دس‌کربوکسی پروترومبین را که موجب تجمع و انباشتگی در طول درمان با وارفارین می‌شود، فعال کند. ارزش این آنزیم در این است که بر خلاف فاکتور Xa می‌تواند به طور مستقل بدون نیاز هیچ کوفاکتوری، حتی بدون فاکتور V بر روی پروترومبین کربوکسیله شده و یا کربوکسیله نشده عمل نماید؛ بنابراین حتی اگر در فاکتور V اختلالی وجود داشته باشد، می‌توان با این آنزیم میزان موجودی پروترومبین را در خون بیماران اندازه‌گیری نمود و از آن به عنوان یک ابزار مهم در آزمایشگاه‌ها برای بررسی خون بیمارانی که دچار بیماری کبدی هستند، استفاده کرد (۶۲).

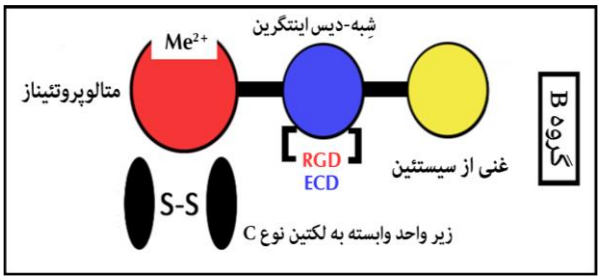


شکل ۳- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه یک (A)

۲- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه دوم (B): فعال کننده‌های پروترومبینی گروه دوم برای فعالیت نیاز به غلظت میلی‌مولار Ca^{2+} دارد و در فقدان Ca^{2+} فعالیت ندارند. همچنین بر خلاف اکارین مشتقات پروترومبینی را که مزاحم اتصال به Ca^{2+} می‌شوند را فعال نمی‌کند؛ مانند دس‌کربوکسی پروترومبین و پری ترومبین. از لحاظ عملکردی زیر واحد متالوپروتئیناز جداشده شبیه اکارین است و نیاز به مقدار زیاد Ca^{2+} برای فعالیت ندارد (۶۱). کارین اکتیواز-۱، فعال‌کننده دیگر پروترومبین می‌باشد که از زهر مار

[1] *Echis Carinatus*

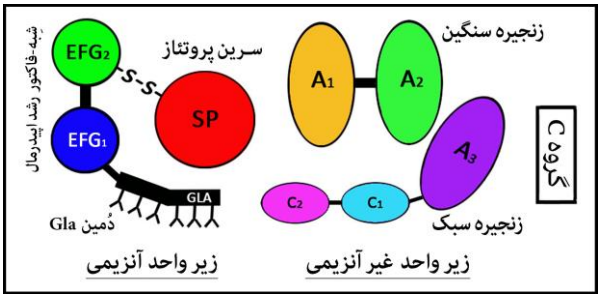
جعفری جدا شده است و در مقایسه با اکارین و دیگر فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه A این پروتئیناز فعالیتش وابسته به Ca^{2+} است. این پروتئین شامل دو زیر واحد می‌باشد که به وسیله پیوند غیر کوالانسی به‌هم متصل‌اند: یک متالوپروتئیناز ۶۲ کیلودالتونی و یک شبه لکتین ۲۵ کیلودالتونی. نوع C دیمری سولفیدی شده است (شکل ۴) (۶۳، ۶۱). زیر واحد وابسته به لکتین نوع C وابستگی به Ca^{2+} را نوسازی می‌کند و آن را به حالت اولیه بر می‌گرداند. فعال سازی پروترومبین به وسیله کارین اکتیواز-۱ توسط قطعه یک از پروترومبین مهار می‌شود و زیر واحد تنظیمی آن مستعد اتصال به قطعه یک در حضور یون‌های Ca^{2+} است؛ بنابراین این پروتئین کنفورماسیون Ca^{2+}-اتصال را از دُمین Gla در پروترومبین از طریق زیر واحد تنظیمی ۲۵ کیلو دالتونی تشخیص می‌دهد و متعاقب آن تبدیل پروترومبین به وسیله زیر واحد کاتالیتیک ۶۲ کیلو دالتونی کاتالیز می‌شود (۶۳، ۶۱).



شکل ۴- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه دو (B)

۳- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه سوم (C):

این فعال‌کننده‌ها سرین پروتئازهایی هستند که منحصراً در زهر مارهای خانواده الاپیده استرالیایی یافت می‌شود و نیاز به Ca^{2+} و فسفولیپید برای فعالیت بیشینه خود دارند. این فعال‌کننده‌ها از زهر مارهایی مانند *O.Scutellatus* و *Pseudonaja textilis* جدا و خالص سازی شده‌اند و دارای وزن ملکولی بالا حدود ۲۵۰ کیلو دالتون و چندین زیر واحد هستند (۶۱). از این گروه پسوتارین C از زهر مار *Pseudonaja textilis* خالص سازی شده است. قدرت و بازده این فعال‌کننده پروترومبین ۲۰-۱۶ درصد زهر خالص مار بود. پسوتارین C، فعالیت پیش‌انعقادی قوی در پلاسمای انسان دارد. این فعال‌کننده، پروترومبین گاوی را به ترومبین بالغ با شکست آن در باندهای پپتیدی Arg 273-Thr 274 و Arg 322-Arg 323 (مطابق با شکست مخصوص، مانند Fx_a) تبدیل می‌کند. پسوتارین C به لحاظ ساختاری و عملکردی شبیه به فاکتور انعقادی Fx_a پستانداران و فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه D زهر مار می‌باشد و یک زنجیره سبک و یک زنجیره سنگین دارد که به وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیری به هم متصل‌اند. زنجیره سبک آن یک دُمین Gla دارد که به وسیله دو دُمین شبه EGF ادامه یافته است. زنجیره سنگین شامل یک دمین سرین پروتئاز است (شکل ۵) (۶۵، ۶۴). فعال‌سازی بخش پپتیدی حاکی از کوتاه‌تر بودن آن از Fx پستانداران است. در روند انعقاد خون پستانداران، Fv_a بعد از نقش انعقادی خود به واسطه شکست پروتئولیتیک به وسیله پروتئین C فعال‌کننده (APC)، غیرفعال می‌شود که این یک تنظیم مهم در آبشار انعقادی می‌باشد (۶۱).



شکل ۵- فعال‌کننده‌های پروترومبینی گروه سوم (C)

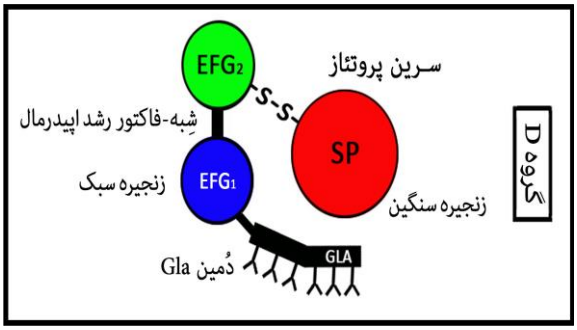
۴- فعال کننده‌های پروترومبینی گروه چهارم (D):

پروتئینازهایی این گروه که تاکنون یافت شده‌اند، منحصراً در زهر مارهای خانواده الاپیده استرالیایی وجود دارند. فعالیت آن‌ها به طور مؤثری به وسیله اضافه کردن یون‌های Ca^{2+} و Fv_a و حباب‌های فسفولیپیدی دارای بار منفی، تحریک می‌شود. این فعال‌کننده‌ها در زهر مار ببری[1]، مار فلس خشن[2]، مار نواری شکل استفان[3]، مار ببری پنینسولا[4] و مار مشکی شکم قرمز[5] یافت شده است (۶۱).

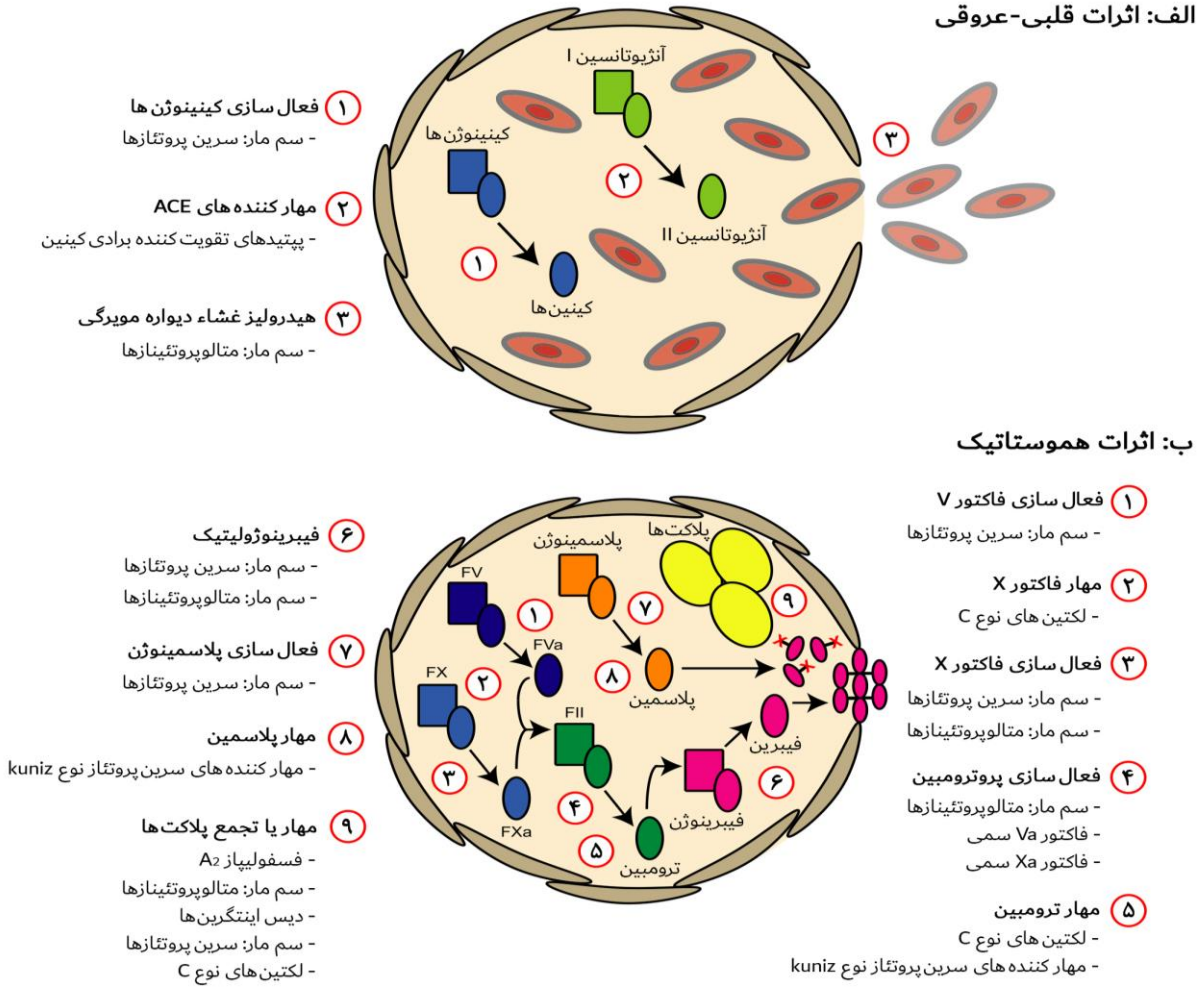
تروکارین D خالص شده از زهر *Tropidechis carinatus*

[1] Scutatus Notechis
[2] Tropidechis carinatus
[3] Hoplocephalus stephensi
[4] Nothechis ater niger
[5] Pseudechis porphyriacus

بهترین و بیشترین نمونه مطالعه شده در گروه فعال‌کننده‌های پروترمبینی گروه D می‌باشد. به لحاظ توانایی، قدرت این فعال‌کننده به وسیله اضافه کردن Ca^{2+} و Fv_a و فسفولیپیدها حدود ۴ درجه بالا می‌رود. توالی‌های آمینواسیدی تروکارین D و هوسپارین D به لحاظ ساختاری مشابه Fx_a می‌باشند. تروکارین D همچنین به‌طور مشابه دو پیوند پپتیدی (Arg 274-Thr 275 و Arg 323-Ile 324) را در طول فعال‌سازی پروترومبین به عنوان Fx_a می‌شکند؛ از این رو به لحاظ عملکردی مشابه Fx_a پستانداران است. این فعال کننده‌ها دو زنجیره دارند: زنجیره‌های سبک شامل یک دُمین Gla که به وسیله دو دُمین EGF ادامه یافته است و زنجیره‌های سنگین که شامل یک دُمین سرین پروتئاز می‌باشد که این دو زنجیره با یک پیوند داخل زنجیری دی سولفیدی به همدیگر متصل نگه داشته شده‌اند (شکل ۶) (۶۶ و ۶۱).



شکل ۶- فعال کننده‌های پروترومبینی گروه چهارم (D)



شکل ۷- اهداف فیزیولوژیکی زهر مار با خاصیت هموتوکسیک. مکان هر هدف و انواع زهرهای سمی که این مکان‌ها را هدف قرار می‌دهند، با دایره قرمز مشخص شده است. ACE: آنزیم های تبدیل کننده آنژیوتانسین؛ FV: فاکتور V؛ FVa: فاکتور V فعال شده؛ FX: فاکتور X؛ FXa: فاکتور X فعال شده؛ FII: پروترومبین

در شکل ۷، نمای شماتیک از اهداف فیزیولوژیکی زهر مار با خاصیت هموتوکسیک نشان داده شده است که در نمای اول (الف) اهداف زهرهای سمی که باعث ایجاد اثرات قلبی عروقی می‌شوند که از نظر بالینی به عنوان افت فشار خون مطرح می‌گردند و در نمای دوم (ب) اهداف زهرهای سمی که باعث ایجاد عوارض خونریزی می‌شوند که به صورت اختلال انعقادی ارائه می‌گردند، به نمایش در آمده است.

بحث

گزش توسط مار می‌تواند از یک زخم سوراخ مانند کوچک و ساده تا بیماری تهدید کننده حیات و مرگ را باعث شود. همیشه باید این نکته را مد نظر داشت که علائم اولیه متعاقب گزش می‌توانند گمراه کننده باشند و گاهی قربانی؛ در حالی که علائم قابل توجه اولیه ندارد، ناگهان به طرف شوک و مشکلات تنفسی سوق پیدا می‌کند.

معمولاً با توجه به نوع مار، هر دو نوع زهر با غلظتی متفاوت با یکدیگر مخلوط هستند؛ مثلاً در زهر بسیاری از افعی‌ها، میزان غلظت زهر مختل‌کننده جریان خون بیشتر است؛ در حالی که بسیاری از مارهای کبری و سایر مارهای سمی دارای زهری هستند که بر روی سیستم عصبی بدن اثر می‌گذارد. هر نوع مار، زهری مخصوص به خود دارد که در ترکیب شیمیایی با زهر انواع مارهای دیگر متفاوت است، به همین دلیل مار گزیده باید با واکسن و سرمی مداوا شود که در برابر آن نوع زهر اثر و کارایی دارد (۴).

زهر مارهایی که انعقاد خون را طولانی می‌کنند، حاوی پروتئین‌ها یا گلیکو پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۳۵۰-۶ کیلودالتون هستند. این فاکتورها عدم انعقاد خون را توسط مکانیسم‌های مختلفی ایجاد می‌کنند. تعدادی از این پروتئین‌های ضد انعقادی دارای فعالیت آنزیمی هستند؛ مانند آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 و پروتئینازها، در حالی که برخی دیگر هیچ فعالیت آنزیمی ندارند. تنها مکانیسم ضد انعقادی تعداد کمی از این پروتئین‌ها شناخته شده است (۵۴).

ویژگی ضد انعقادی به طور گسترده‌ای در مارهای زیر خانواده‌های کروتالیده و ویپرده وجود دارد. تناقض موجود این است که این زهرها در حالت درون‌تنی به عنوان یک فاکتور ضد انعقادی و در حالت برون‌تنی به عنوان یک فاکتور انعقادی عمل می‌کند (۶۲). زهرها و آنزیم‌های منعقد کننده بر اساس عمل اختصاصی‌شان بر روی پروتئین‌های انعقادی تقسیم بندی می‌شوند و در این زمینه باید حقایقی را در نظر داشت:

الف- عمل آنزیم‌های انعقادی در درون‌تنی و برون‌تنی باید از هم متمایز شوند. اکثر آنزیم‌هایی که در برون‌تنی انعقادی می‌باشند، بنا به دوز تجویز شده و باعث دفیبریناسیون در برون‌تنی شده؛ لذا ضد انعقادی محسوب می‌شوند.

ب- یک آنزیم خالص می‌تواند به طور همزمان بر روی یک یا تعداد بیشتری از فاکتورهای انعقادی تأثیر مثبت و یا منفی بگذارد.

پ- اختلال حاصل در ساز و کار انعقاد، غالباً به تراکم آنزیم خالص بستگی دارد.

ت- فعالیت یک زهر خام به تراکم و نسبت آنزیم‌های مختلف انعقادی موجود در آن و غلظت خود زهر بستگی دارد.

ث- شواهدی بر تفاوت‌های قابل ملاحظه کمّی و کیفی در زهر گونه‌های مختلف مار گزارش شده است که برخی از این تفاوت‌ها به سن و مبدأ جغرافیایی مار دارد.

ج- تمامی مراحل سیستم انعقاد خون عموماً می‌توانند تحت تأثیر زهر مار و آنزیم‌های موجود در آن قرار گیرند.

باید توجه داشت که بعضی از اجزاء زهر می‌توانند به عنوان پیش انعقاد عمل کنند و باعث فعال‌شدن سیستم انعقادی در مطالعات درون‌تنی شوند، اما در اکثر موارد، این امر به ترومبوز و بیماری آمبولیک منجر نمی‌شود بلکه باعث مصرف فاکتورهای انعقادی می‌گردد و در نتیجه داروهای ضدانعقادی بالینی مصرف می‌شوند. این امر ممکن است باعث ایجاد اختلالات شدیدی در آزمون آزمایشگاه بالینی شود. سرعت توسعه اختلال انعقادی کاملاً متغیّر است. زمان از گزش تا دِفیبرینه شدن کامل می‌تواند به میزان کمی تا ۱۵ دقیقه برای برخی از الاپیدهای استرالیایی که در آن‌ها به وضوح مشخص است وجود دارد و بدون درمان با پادزهر ممکن است حداقل ساعت‌های زیادی و برای برخی از گونه‌ها روزها وجود داشته باشد (۷).

از نظر بالینی زهرهای منعقدکننده خون اگر به مقدار زیاد و به تدریج و آهسته وارد جریان خون شوند، خاصیت انعقاد خون را از بین می‌برند یعنی خون را دفیبرینه نموده و باعث عدم انعقاد خون می‌گردند. اگر مقدار این زهر زیاد باشد و به سرعت وارد جریان خون گردد باعث انعقاد خون در عروق شده و سرانجام مرگ فرا می‌رسد.

در نهایت می‌توان اظهار داشت که زهر مارها و جاندارن سمی دیگر، منبعی از ترکیباتی هستند که فرآیندهای متنوع موجود در سیستم انعقاد خون را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از کار می‌اندازند (۶۸ و ۶۷). تعدادی از این مولکول‌ها می‌توانند برای سلامتی انسان مفید و سودمند باشند؛ به طوری که می‌توان از برخی ترکیبات به‌دست آمده از زهرهای مختلف برای اهداف درمانی استفاده کرد (۷۱-۶۹).

در حالت کلی می‌توان نتیجه گرفت که در مراحل اولیه مطالعه و بررسی زهر مارها گام اول مشخص نمودن اثر زهر از نظر انعقادی یا ضد انعقادی بودن آن است. چرا که در این شرایط می‌توان کار تحقیقاتی را سازماندهی کرد و نوع فاکتور درگیر در این زهرها را جداسازی نمود. از نظر بالینی هم باید به این نکته دقّت نمود که زهرها و فاکتورهای آن در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی در بعضی موارد می‌توانند نتایج متناقض داشته باشند.

نتیجه‌گیری

با نگاهی کلی به ترکیبات زهر مارها و بررسی اثرات این ترکیبات بر روی خون جانداران، به این نتیجه می‌رسیم که بیشتر اختلالات انعقادی ایجاد شده در اثر وجود پروتئین‌هایی با خواص آنزیمی است. این پروتئین‌ها دارای ویژگی زیادی برای هدف‌های ملکولی‌شان، مقاوم به مهارکننده‌های فیزیولوژیکی و پایدار در محیط آزمایشگاهی و طبیعی هستند. این ترکیب‌ها دارای اختصاصیت بالایی بوده و به طور انتخابی بر فاکتورهای مختلف انعقاد خون اثر می‌گذارند. با نگاهی دقیق‌تر مشخص می‌شود که ترکیبات زهر مار به مراحل کلیدی مسیر فیزیولوژیک حمله می‌برند. امروزه مشخص شده است که یک زهر خاص بسته به غلظت مورد استفاده می‌تواند هر یک از این دو خصوصیت را داشته باشد.

بیماری انسداد شریان قلب، سکته و دیگر بیماری‌های مغزی و قلبی-عروقی علت عمده و مهم مرگ و میر در دنیا و همچنین ایران است که درصد بالایی از مرگ و میر را در میان تمام عوامل دیگر دارا می‌باشد. از آن‌جایی که لخته‌های خون شریانی از پلاکت‌ها و فیبرین تشکیل شده‌اند، استراتژی‌های درمان بر این اساس توسعه داده شده‌اند که هدف آن انعقاد، فیبرینولیز و عملکردهای پلاکت بوده است. ترکیبات زهر مار می‌توانند به عنوان دارو برای درمان اختلالات ترومبوآمبولیک[1] (انسداد یا لخته) استفاده شوند.

برخی پروتئین‌ها زهر مار می‌توانند در ابتدا یک فعالیت شبه ترومبین و در ادامه یک فعالیت شبه ترومبوپلاستین داشته باشند. اولین فعالیت آنزیم سبب انعقاد فیبرینوژن به وسیله شکستن فیبرینوپپتید A در محیط می‌شود؛ در حالی که دُمین فعالیت آنزیمی FX را فعال می‌کند. این پروتئین‌ها تراکم پلاکت را تسریع می‌کنند و از این رو زمان انعقاد را کوتاه کرده و صدمه و زیان به خون را کاهش می‌دهد که این امر برای پیشگیری و درمان خونریزی‌های ارگان‌های مختلف در زمینه‌های گوناگون می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و به عنوان ابزار تشخیصی در آزمایشگاه‌ها برای بررسی انعقاد مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[1] Thromboembolism

منابع:

1- Babaie M, Salmanizadeh H, Zolfagharian H. Blood Coagulation induced by Iranian saw-scaled viper (*Echis Carinatus*) venom: Identification, purification and characterization of a prothrombin activator. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(11): 1145-50. DOI: 10.22038/IJBMS.2013.1931

2- Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie. 2000; 82(9-10): 851-9. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01178-0

3- Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. J Thromb Haemost 2005; 3: 1791-9. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x

4- Salmanizadeh H, Zolfagharian H, Babaie M. Coagulopathy caused by the main anticoagulant fractions of *Echis carinatus* snake venom on blood. Int J Nano Stud Technol. 2015; 4(4): 93-99. DOI: 10.19070/2167-8685-1500018

5- Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Toxicon. 2005; 45: 1171-81. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.016.

6- Barton CA. Treatment of coagulopathy related to hepatic insufficiency. Crit Care Med. 2016; 44(10): 1927-33. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001998.

7- Zolfagharian H, Mohammadpour Dounighi N. Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. Arch Razi Ins. 2013; 68(1): 1-10. DOI: 10.7508/ARI.2013.01.001

8- White J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon. 2005; 45: 951-67. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.0309- Babaie M, Salmanizadeh H, Zolfagharian H, Alizadeh H. Properties of biological and biochemical effects of the Iranian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom. Bratisl Lek Listy. 2014; 115(7): 434-438. DOI: 10.4149/bll_2014_085

10- Maduwage K, Isbister GK. Current treatment for venom-induced consumption coagulopathy resulting from snakebite. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(10): e3220. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003220

11- Babaie M. Proteins separation and purification methods with focus on chromatography: A review study. J Ardabil Univ Med Sci. 2021; 20(2): 151-75. Link

12- Babaie M, Zolfagharian H, Salmanizadeh H, Zare Mirakabadi A, Alizadeh H. Effect of a protrombin activator isolated from Iranian *Echis carinatus* venom on hemostasis. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2013; 10(2): 173-81. Link

13- Silva BC, Nonato CM, Albuquerque S, Ho LP, Junqueira de Azevedo, et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. Toxicon. 2012; 60: 1263-76. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.08.008

14- Huang QQ, Teng MK, Niu LW. Purification and characterization of two fibrinogen-clotting enzymes from five-pace snake (*Agkistrodon acutus)* venom. Toxicon. 1999; 37: 999-1013. DOI: 10.1016/s0041-0101(98)00228-1

15- Kini RM. Anticoagulant proteins from snake venoms: Structure, function and mechanism. Biochem. 2006; 397: 377-87. DOI: 10.1042/BJ20060302

16- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Bee venom (*Apis Mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains: Bee venom an effective potential for bacteria. J Pharmacopuncture. 2016; 19(3): 225-30. DOI: 10.3831/KPI.2016.19.023

17- Verheij HM, Boffa MC, Rothen C, Bryckert MC, Verger R, De Haas GH. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A_2. Eur J Biochem.1980; 112: 25-32. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04982.x

18- Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsi-Brandeburgo MI, et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med Chem. 2006; 14: 7034-43. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.06.025

19- Samel M, Vija H, Rönnholm G, Siigur J, Kalkkinen N, Siigur E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus* (common viper) venom. Biochim Biophys Acta. 2006; 1764; 707-14. DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.01.021

20- Torii S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with l-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. J Biol Chem. 1997; 272: 9539-42. DOI: 10.1074/jbc.272.14.9539

21- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim Biophys Acta. 2000; 1477: 146-56. DOI: 10.1016/s0167-4838(99)00268-x

22- Howesa JM, Kamiguti AS, Theakston RDG, Wilkinson MC, Laing GD. Effects of three novel metalloproteinases from the venom of the West African saw-scaled viper, *Echis ocellatus* on blood coagulation and platelets. Biochim Biophys Acta. 2005; 1724: 194-202. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.03.011

23- Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS J. 2008; 275: 3016-30. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x

24- Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie. 2000; 82: 841-50. DOI: 10.1016/s0300-9084(00)01163-9

25- Swenson S, Markland FS Jr. Snake venom fibrin (ogen)olytic enzymes. Toxicon. 2005; 45(8): 1021-39. 10.1016/j.toxicon.2005.02.027

26- Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon. 2005; 45: 1115-32. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020

27- Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. Toxicon. 2010; 55: 745-53. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.006

28- Oyama E, Takahashi H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (*Sakishima habo*). Toxicon. 2000; 38: 1087-100. DOI: 10.1016/s0041-0101(99)00220-2

29- Oyama E, Takahashi H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (*Sakishima-habo*). Toxicon. 2003; 41: 559-68. DOI: 10.1016/s0041-0101(02)00363-x

30- Castro HC, Rodrigues CR. Current status of snake venom thrombin-like enzymes. Toxin Rev. 2006; 25(3): 291-318. DOI: 10.1080/15569540600567321

31- Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from Reptilase to now. Cell Mol Life Sci. 2004; 61(7-8): 843-56. DOI: 10.1007/s00018-003-3325-z

32- 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. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2008; 151(3): 443-454. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.02.036

33- Matsui T, Shakurai Y, Fujimura Y, Hayashi I, Ohishi S, Suzuki M, et al. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhofi*, a serine protease that cleaves specially fibrinogen and kininogen. Eur J Biochem. 1998; 252: 569-75. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520569.x

34- Liu S, Sun MZ, Sun C, Zhao B, Greenaway FT, Zheng Q. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii* ussurensis. Toxicon. 2008; 52(7): 760-8. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.08.012

35- Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, et al. Modeling Zymogen Protein C. Biophys J. 2000; 79(6): 2925-43. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76530-1

36- Murakami MT, Arni RK. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. J Biol Chem. 2005; 280(47): 39309-15. DOI: 10.1074/jbc.M508502200

37- Mann KG, Kalafatis M. Factor V: A combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. Blood. 2003; 101(1): 20-30. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0290

38- Rosing J, Govers-Riemslag JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis. 2001; 31(3-6): 241-6. DOI: 10.1159/000048069

39- Nicolau CA, Prorock A, Bao Y, Neves-Ferreira AGDC, Valente RH, Fox JW. Revisiting the therapeutic potential of *Bothrops jararaca* venom: Screening for novel activities using connectivity mapping. Toxins (Basel). 2018; 10(2): 69. DOI: 10.3390/toxins10020069

40- Tans G, Rosing J. Snake venom activators of factor X: an overview. Haemostasis. 2001; 31(3-6): 225-33. DOI: 10.1159/000048067

41- Lee WH, Zhang Y, Wang WY, Xiong YL, Gao R. Isolation and properties of a blood coagulation factor X activator from the venom of king cobra (*hannah Ophiophagus*). Toxicon. 1995; 33(10): 1263-76. DOI: 10.1016/0041-0101(95)00077-y

42- Zhang Y, Xiong YL, Bon C. An activator of blood coagulation factor X from the venom of *Bungarus fasciatus*. Toxicon. 1995; 33(10): 1277-88. DOI: 10.1016/0041-0101(95)00070-3

43- Siigur J, Siigur E. Factor X activating proteases from snake venoms. Tox Rev. 2006; 25: 235-55. DOI: 10.1080/15569540600567305

44- Fay PJ. Factor VIII structure and function. Int J Hematol. 2006; 83(2): 103-8. DOI: 10.1532/IJH97.05113

45- Lövgren A. Recombinant snake venom prothrombin activators. Bioengineered. 2013; 4(3): 153-7. DOI: 10.4161/bioe.22676

46- Camire RM. A new look at blood coagulation factor V. Curr Opin Hematol. 2011; 18(5): 338-42. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283497ebc

47- Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. Curr Opin Struct Biol. 2013; 23(6): 836-41. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.10.006

48- Zhang Y, Wisner A, Xiong Y, Bon C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. J Biol Chem. 1995; 270(17): 10246-55. DOI: 10.1074/jbc.270.17.10246

49- Park D, Kim H, Chung, K, Kim DS, Yun Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. Toxicon. 1998; 36(12): 1807-19. DOI: 10.1016/s0041-0101(98)00090-7

50- Hermogenes AL, Richardson M, Magalhaes A, Yarleque A, Rodriguez E, Sanchez EF. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human a2-macroglobulin. Toxicon. 2006; 47(4): 490-4. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.12.009

51- Dhananjaya BL, D Souza CJ. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. Biochemistry (Mosc). 2010; 75(1): 1-6. DOI: 10.1134/s0006297910010013

52- Chandrashekar V. Dilute Russell's viper venom and activated partial thromboplastin time in lupus anticoagulant diagnosis: is mixing essential? Blood Coagul Fibrinolysis. 2016; 27(4): 408-11. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000463

53- Matsui T, Hamako J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. Toxicon. 2005; 45(8): 1075-87. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.023

54- Babaie M, Zolfagharian H, Salmanizadeh H, Zare MA, Alizadeh H. Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake *Echis carinatus.* Acta bichimica plonica 2013; 60(1): 17-20. Link

55- Andrews RK, Berndt MC. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. Toxicon. 2000; 38(6): 775-91. DOI: 10.1016/s0041-0101(99)00187-7

56- Janssen M, Meier J, Freyvogel TA. Purification and characterization of an antithrombin III inactivating enzyme from the venom of the African night adder (*Causus rhombeatus*). Toxicon. 1992; 30(9): 985-99. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90043-5

57- Berling I, Brown SG, Miteff F, Levi C, Isbister GK. Intracranial haemorrhages associated with venom induced consumption coagulopathy in Australian snakebites (ASP-21). Toxicon. 2015; 102: 8-13. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.05.012

58- Wu WB, Huang TF. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase- induced endothelial cell apoptosis. Exp Cell Res. 2003; 288(1): 143-57. DOI: 10.1016/s0014-4827(03)00183-6

59- Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005; 45(8): 997-1011. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.029

60- Gutiérrez JM, Núñez J, Escalante T, Rucavado A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. Microvasc Res. 2005; 71(1): 55-63. DOI: 10.1016/j.mvr.2005.10.007

61- Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. Toxicon. 2005; 45(8); 1133-45. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.019

62- Salmanizadeh H, Babaie M, Zolfagharian H. In vivo evaluation of homeostatic effects of *Echis carinatus* snake venom in Iran. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2013; 19(3): 21-9. DOI: 10.1186/1678-9199-19-3

63- Patra A, Kalita B, Chanda A, Mukherjee AK. Proteomics and antivenomics of *Echis carinatus carinatus* venom: Correlation with pharmacological properties and pathophysiology of envenomation. Sci Rep. 2017; 7(1): 17119. DOI: 10.1038/s41598-017-17227-y

64- Rao VS, Kini RM. Pseutarin C, a prothrombin activator from *Pseudonaja textilis* venom: its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. Thromb Haemost. 2002; 88(4): 611-9. Link

65- Rao VS, Swarup S, Kini RM. The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V. Blood. 2003; 102(4): 1347-54. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3839

66- Joseph JS, Chung MC, Jeyaseelan K, Kini RM. Amino acid sequence of trocarin, a prothrombin activator from *Tropidechis carinatus* venom: its structural similarity to coagulation factor Xa. Blood. 1999; 94(2): 621-31. Link

67- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. J Pharmacopuncture. 2015; 18(4): 7-11. DOI: 10.3831/KPI.2015.18.031

68- Babaie M, Zolfagharian H, Zolfaghari M, Jamili S. Biochemical, hematological effects and complications of *Pseudosynanceia melanostigma* envenoming. J Pharmacopuncture. 2019; 22(3): 140-46. DOI: 10.3831/KPI.2015.18.031

69- Babaie M, Ghaempanah A. Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of *Apis mellifera* bee venom on NIH laboratory mice. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020; 8(3): 23-34. Link

70- Babaie M, Ghaempanah A, Mehrabi Z, Mollaei A. Partial purification and characterization of antimicrobial effects from snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) venoms. Iran J Med Microbiol. 2020; 14(5): 460-77. DOI: 10.30699/ijmm.14.5.460

71- Borojeni SK, Zolfagharian H, Babaie M, Javadi I. Cytotoxic effect of bee (*A. mellifera*) venom on cancer cell lines. J Pharmacopuncture. 2020; 23(4): 212-19. DOI: 10.3831/KPI.2020.23.4.212