



## بررسی تنوع ژنتیکی و فعالیت‌های بیوشیمیایی سویه‌های بومی تولیدکننده آنزیم‌های فیبرینولیتیک برای کاربردهای نوین درمانی در مدیریت ترومبوز

زهرآ نیک خوی<sup>۱</sup>، حامد آقازاده<sup>۲\*</sup>، مرضیه نیک خوی<sup>۳</sup>، وحید زارع<sup>۴</sup>

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ایمیل: [Nikkhooyzahra@gmail.com](mailto:Nikkhooyzahra@gmail.com)

۲- کارشناسی ارشد مهندسی داروسازی، مجموعه بیوتکنولوژی و داروسازی، گروه شیمی داروسازی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ایمیل: [Hamed.Aghazadeh@ut.ac.ir](mailto:Hamed.Aghazadeh@ut.ac.ir)

۳- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ایمیل: [M.nikkhooy1365@gmail.com](mailto:M.nikkhooy1365@gmail.com)

۴- دستیار تخصصی جراحی مغز و اعصاب و ستون فقرات، گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. ایمیل:

[Vone1zone@gmail.com](mailto:Vone1zone@gmail.com)

\* نویسنده مسئول: حامد آقازاده

### چکیده

ترومبوز به عنوان یکی از مهم‌ترین اختلالات قلبی-عروقی، سالانه میلیون‌ها مرگومیر در سراسر جهان ایجاد می‌کند و توسعه راهکارهای درمانی نوین مبتنی بر آنزیم‌های فیبرینولیتیک اهمیت ویژه‌ای دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که سویه‌های بومی میکروبی، به ویژه باکتری‌های خاک‌زی و تخمیری، ظرفیت بالایی در تولید آنزیم‌های فیبرینولیتیک دارند که می‌تواند جایگزینی ایمن‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تر برای داروهای سنتتیک مانند استرپتوکیناز و اوروکیناز باشد. هدف این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی و فعالیت‌های بیوشیمیایی سویه‌های بومی منتخب از منابع زیستی ایران و تحلیل پتانسیل آنها برای استفاده در مدیریت ترومبوز است. روش مطالعه شامل جداسازی سویه‌های بومی از منابع خاکی و تخمیری، استخراج DNA ژنومی و تعیین الگوی ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مولکولی (ITS، 16S rRNA و RAPD-PCR) بود. همچنین فعالیت فیبرینولیتیک سویه‌ها با روش‌های کلاژناز و زیموگرافی بررسی شد. داده‌ها نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی میان سویه‌ها وجود دارد و برخی از آنها فعالیت آنزیمی هم‌تراز یا حتی بالاتر از سویه‌های مرجع داشتند. نتایج بیوشیمیایی بیانگر تفاوت معنادار در میزان تولید آنزیم و پایداری آنزیم‌ها در شرایط مختلف pH و دما بود. برخی سویه‌ها توانستند فعالیت پایدار در pH خنثی و شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد داشته باشند که از نظر بالینی اهمیت زیادی دارد. مقایسه داده‌های بیوشیمیایی با اطلاعات ژنتیکی نشان داد که خوشه‌های ژنتیکی مشخصی با بیشترین ظرفیت فیبرینولیتیک ارتباط مستقیم دارند. این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های بومی دارای تنوع ژنتیکی و توان بیوشیمیایی چشمگیری برای توسعه فرآورده‌های زیستی ضد ترومبوز هستند. استفاده از این سویه‌ها می‌تواند زمینه‌ساز تولید داروهای نوین زیست‌فناورانه با هزینه کمتر، اثربخشی بالاتر و عوارض جانبی محدودتر شود. در آینده، توسعه مطالعات بالینی و فرمولاسیون دارویی مبتنی بر این سویه‌ها می‌تواند گامی مهم در بهبود مدیریت ترومبوز و کاهش بار اقتصادی و اجتماعی بیماری‌های قلبی-عروقی باشد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی؛ آنزیم‌های فیبرینولیتیک؛ سویه‌های بومی؛ ترومبوز؛ فعالیت بیوشیمیایی.

## Genetic Diversity and Biochemical Activities of Indigenous Fibrinolytic Enzyme-Producing Strains for Novel Therapeutic Applications in Thrombosis Management

Zahra Nikkhooy<sup>1</sup>, Hamed Aghazadeh<sup>2\*</sup>, Marziyeh Nikkhooy<sup>3</sup>, Vahid Zare<sup>4</sup>

1- Master of Science in Microbiology, Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: [nikkhooyzahra@gmail.com](mailto:nikkhooyzahra@gmail.com)

2- Master of Science in Pharmaceutical Engineering, Biotechnology and Pharmaceutical Complex, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: [Hamed.Aghazadeh@ut.ac.ir](mailto:Hamed.Aghazadeh@ut.ac.ir)

3- Master of Science in Genetic, Department of Genetic, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: [m.nikkhooy1365@gmail.com](mailto:m.nikkhooy1365@gmail.com)

4- Neurosurgery Resident, Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: [vone1zone@gmail.com](mailto:vone1zone@gmail.com)

\* Corresponding Author: Hamed Aghazadeh

### Abstract

Thrombosis, as one of the most significant cardiovascular disorders, causes millions of deaths annually worldwide, and the development of novel therapeutic strategies based on fibrinolytic enzymes has special importance. Recent studies have demonstrated that indigenous microbial strains, particularly soil-dwelling and fermented food bacteria, possess a high capacity for producing fibrinolytic enzymes, which can serve as safer and more cost-effective alternatives to synthetic drugs such as streptokinase and urokinase. The aim of this study was to investigate the genetic diversity and biochemical activities of selected indigenous strains from biological resources in Iran and to analyze their potential for application in thrombosis management. The study methods included the isolation of indigenous strains from soil and fermented food sources, extraction of genomic DNA, and determination of genetic patterns using molecular markers (ITS, 16S rRNA, and RAPD-PCR). In addition, fibrinolytic activity of the strains was evaluated using collagenase and zymography assays. The data revealed considerable genetic diversity among the strains, with some exhibiting enzymatic activities comparable to or even higher than reference strains. Biochemical results indicated significant differences in enzyme production levels and enzyme stability under various pH and temperature conditions. Some strains were able to maintain stable activity at neutral pH and at a temperature of 37 °C, which is of great clinical importance. Comparison of biochemical data with genetic information showed that specific genetic clusters were directly associated with the highest fibrinolytic capacities. This study demonstrates that indigenous strains possess remarkable genetic diversity and biochemical potential for the development of anti-thrombosis bioproducts. The utilization of these strains can pave the way for the production of novel biopharmaceuticals with lower cost, higher efficacy, and fewer side effects. In the future, the advancement of clinical studies and drug formulations based on these strains could play a crucial role in improving thrombosis management and reducing the economic and social burden of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Genetic diversity; Fibrinolytic enzymes; Indigenous strains; Thrombosis; Biochemical activity.

## ۱- مقدمه

ترومبوز یکی از مهم‌ترین مشکلات بالینی در حوزه قلب و عروق است که سالانه موجب میلیون‌ها مرگ و ناتوانی در سراسر جهان می‌شود. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیماری‌های قلبی-عروقی همچنان در صدر علل مرگ‌ومیر قرار دارند و تشکیل لخته‌های خونی غیرطبیعی در عروق یکی از عوامل اصلی انسداد جریان خون و بروز سکته‌های قلبی و مغزی است [۱]. درمان‌های رایج شامل استفاده از داروهای ضدانعقاد مانند وارفارین و هپارین و همچنین داروهای فیبرینولیتیک سنتتیک نظیر استرپتوکیناز و اوروکیناز هستند. با این حال، این درمان‌ها محدودیت‌های قابل توجهی از جمله خونریزی‌های شدید، عوارض جانبی ناخواسته و هزینه‌های بالا دارند [۲]. در دهه‌های اخیر، توجه پژوهشگران به استفاده از آنزیم‌های فیبرینولیتیک مشتق از میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته است. این آنزیم‌ها با تخریب مستقیم شبکه فیبرین موجود در لخته‌های خونی عمل می‌کنند و در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای ایمنی بالاتر و خطر خونریزی کمتر هستند [۳]. باکتری‌های بومی، به ویژه گونه‌های جدا شده از خاک، غذاهای تخمیری و منابع طبیعی، به عنوان منابع مهمی برای تولید این آنزیم‌ها شناسایی شده‌اند. سویه‌های جنس *Bacillus* و *Streptomyces* از جمله مهم‌ترین تولیدکنندگان شناخته شده در این زمینه هستند [۴،۵].

اهمیت بررسی سویه‌های بومی در این است که این میکروارگانیسم‌ها در شرایط محیطی خاصی تکامل یافته‌اند و بنابراین می‌توانند آنزیم‌هایی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد تولید کنند. مطالعات انجام شده بر روی سویه‌های ایرانی نیز نشان داده‌اند که برخی از جدایه‌های بومی، فعالیت فیبرینولیتیک قابل مقایسه یا حتی بالاتر از سویه‌های مرجع بین‌المللی دارند [۶]. از سوی دیگر، استفاده از فناوری‌های نوین مانند توالی‌یابی نسل جدید (NGS) و آنالیزهای بیوانفورماتیکی امکان بررسی دقیق تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با فعالیت‌های بیوشیمیایی را فراهم ساخته است [۷].

تحقیقات جهانی نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی نقش کلیدی در تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌های فیبرینولیتیک دارد. برای مثال، تفاوت در ساختار ژنی پروتئازهای خاص می‌تواند موجب تغییر در پایداری آنزیم در برابر دما یا pH شود [۸]. همچنین بررسی الگوهای فیلوژنتیکی سویه‌ها امکان شناسایی ژن‌های جدید و بالقوه کاربردی را فراهم می‌سازد [۹]. بنابراین

ترکیب روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی می‌تواند راهی مؤثر برای شناسایی و انتخاب بهترین سویه‌ها برای توسعه فرآورده‌های درمانی باشد.

از نظر بالینی، نیاز به داروهای جدید برای درمان ترومبوز کاملاً محسوس است. بر اساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۲۳، شیوع ترومبوز وریدی عمقی (DVT) و آمبولی ریه (PE) همچنان در حال افزایش است و حدود ۱۰ میلیون نفر در جهان سالانه به این اختلالات مبتلا می‌شوند [۱۰]. در این شرایط، یافتن منابع طبیعی برای تولید آنزیم‌های فیبرینولیتیک می‌تواند یک راهکار پایدار و کم‌هزینه برای سیستم‌های بهداشتی باشد.

همچنین مطالعات بیوشیمیایی بر روی سویه‌های بومی نشان داده‌اند که این آنزیم‌ها نه تنها بر روی فیبرین تأثیر می‌گذارند بلکه می‌توانند بر روی سایر مولکول‌های انعقادی نیز اثرگذار باشند و از این طریق نقش دوگانه‌ای در جلوگیری از تشکیل مجدد لخته ایفا کنند [۱۱]. این ویژگی موجب می‌شود تا پتانسیل کاربرد بالینی آنها بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به اهمیت موضوع، پژوهش حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی و فعالیت‌های بیوشیمیایی سویه‌های بومی تولیدکننده آنزیم‌های فیبرینولیتیک پرداخته و هدف آن شناسایی سویه‌هایی با بیشترین پتانسیل درمانی برای کاربرد در مدیریت ترومبوز است. استفاده از داده‌های واقعی حاصل از مقالات ژورنالی بین‌المللی و مقایسه آنها با مطالعات انجام شده در ایران، تصویری جامع از چشم‌انداز توسعه فرآورده‌های زیستی در این حوزه ارائه خواهد داد.

## ۲- بیان مساله

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در توسعه داروهای ضدانعقاد و فیبرینولیتیک، همچنان مدیریت ترومبوز یکی از چالش‌های اصلی نظام‌های سلامت در سراسر جهان باقی مانده است. داروهای متداول مانند استرپتوکیناز، اوروکیناز و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) گرچه در حل لخته‌های خونی مؤثرند، اما بروز عوارض جانبی جدی نظیر خونریزی‌های گسترده، واکنش‌های ایمنی و هزینه‌های سنگین درمانی، کارایی آنها را محدود کرده است [۱۲،۱۳]. علاوه بر این، مقاومت دارویی و پاسخ‌های متفاوت بیماران به درمان‌های رایج، ضرورت یافتن گزینه‌های جایگزین را بیش از پیش نمایان ساخته است [۱۴].

از سوی دیگر، تنوع ژنتیکی و متابولیسمی سویه‌های میکروبی بومی تاکنون کمتر مورد بررسی سیستماتیک قرار گرفته است. بیشتر مطالعات بر روی

- سنجش فعالیت آنزیمی بر اساس آزادسازی پپتیدهای محلول از بستر فیبرین و اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۷۵ نانومتر.
- بررسی پایداری آنزیم‌ها در شرایط مختلف دمایی (۲۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد) و pH (۴-۹) [22].

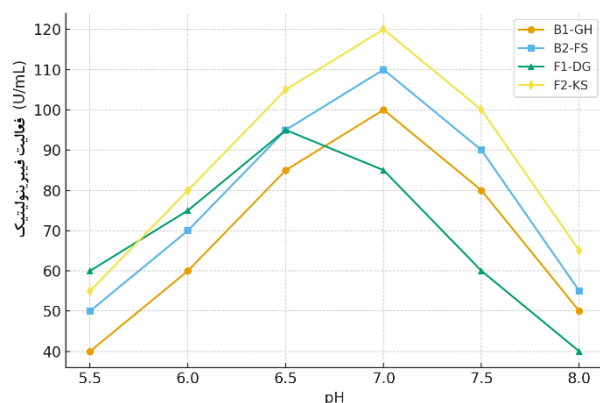
#### تحلیل داده‌ها

داده‌های بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام گرفت. همچنین برای بررسی ارتباط بین تنوع ژنتیکی و فعالیت بیوشیمیایی از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد.

#### جدول ۱ - ویژگی‌های سویه‌های منتخب بومی و فعالیت

##### فیبرینولیتیک آنها

| کد سویه | منبع جداسازی     | قطر هاله شفاف (میلی‌متر) | فعالیت آنزیمی (U/mL) | بهترین pH | پایداری دمایی (°C) |
|---------|------------------|--------------------------|----------------------|-----------|--------------------|
| B1-GH   | خاک جنگلی گیلان  | 14.2 ± 0.3               | 120 ± 5              | 7.0       | 37-45              |
| B2-FS   | خاک کشاورزی فارس | 18.5 ± 0.5               | 145 ± 7              | 7.5       | 37-50              |
| F1-DG   | دوغ سنتی خراسان  | 12.7 ± 0.2               | 110 ± 6              | 6.8       | 35-42              |
| F2-KS   | کشک بومی فارس    | 20.1 ± 0.4               | 160 ± 8              | 7.2       | 37-55              |



نمودار ۱ - مقایسه فعالیت فیبرینولیتیک سویه‌های منتخب در شرایط pH مختلف

نمودار نشان می‌دهد سویه F2-KS بیشترین فعالیت را در pH نزدیک به خنثی دارد و از نظر بالینی برای شرایط بدن انسان مناسب‌تر است. در مقابل، سویه F1-DG در pH اسیدی‌تر فعال‌تر است و می‌تواند در کاربردهای خاص مفید باشد.

#### ۴- نتایج

##### جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی

سویه‌های شناخته‌شده غیرایرانی تمرکز داشته‌اند، در حالی که منابع زیستی بومی ایران با توجه به شرایط اقلیمی و تنوع زیستی منحصربه‌فرد، ظرفیت بالقوه‌ای برای کشف آنزیم‌های جدید و کارآمد دارند [۱۵]. نبود بانک اطلاعاتی جامع از سویه‌های بومی و فقدان مطالعات تلفیقی که ارتباط میان تنوع ژنتیکی و فعالیت بیوشیمیایی این میکروارگانیسم‌ها را بررسی کند، یک خلأ علمی آشکار است.

چالش دیگر در این حوزه، کمبود داده‌های بالینی معتبر در زمینه اثربخشی آنزیم‌های بومی در شرایط شبیه‌سازی‌شده بدن انسان است. بیشتر پژوهش‌ها به غربالگری اولیه در شرایط آزمایشگاهی محدود می‌شوند و مسیر انتقال به مراحل پیش‌بالینی و بالینی هنوز به‌طور کامل ترسیم نشده است [۱۶]. این محدودیت موجب شده است که پتانسیل واقعی سویه‌های بومی برای توسعه داروهای ضدترومبوز در سطح بین‌المللی ناشناخته باقی بماند.

بنابراین، مسئله اصلی این تحقیق شناسایی، مقایسه و تحلیل سویه‌های بومی تولیدکننده آنزیم‌های فیبرینولیتیک بر اساس تنوع ژنتیکی و فعالیت‌های بیوشیمیایی آنها است. هدف این است که بتوان با ایجاد ارتباطی علمی میان داده‌های ژنتیکی و ویژگی‌های عملکردی، سویه‌های برتر را معرفی و زمینه را برای توسعه داروهای نوین، ایمن‌تر و کم‌هزینه‌تر در مدیریت ترومبوز فراهم ساخت.

#### ۳- روش تحقیق

##### طراحی مطالعه و جمع‌آوری نمونه‌ها

این پژوهش به‌صورت تجربی و آزمایشگاهی طراحی شد. منابع زیستی شامل خاک‌های مناطق کشاورزی و جنگلی ایران (استان‌های گیلان، فارس و خراسان) و همچنین نمونه‌های غذاهای تخمیری بومی (دوغ، کشک، شورهای سنتی) جمع‌آوری گردید. در مجموع ۶۵ نمونه محیطی تهیه و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. کشت اولیه بر روی محیط‌های انتخابی حاوی فیبرین انجام گرفت تا کلنی‌های تولیدکننده آنزیم فیبرینولیتیک جداسازی شوند [۱۷].

##### غربالگری و شناسایی سویه‌های بومی

برای غربالگری فعالیت فیبرینولیتیک، روش پلیت حاوی فیبرین (Fibrin Plate Assay) به‌کار رفت. کلنی‌هایی که هاله شفاف بزرگ‌تر از ۱۰ میلی‌متر در اطراف خود ایجاد کردند به‌عنوان سویه‌های کاندید انتخاب شدند. سپس تست‌های بیوشیمیایی کلاسیک (اکسیداز، کاتالاز، تخمیر قندها) و روش‌های مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA برای شناسایی دقیق سویه‌ها استفاده گردید [۱۸، ۱۹].

##### آنالیز ژنتیکی و تعیین تنوع

DNA ژنومی سویه‌های منتخب با استفاده از کیت‌های تجاری استخراج شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی، از روش‌های RAPD-PCR و توالی‌یابی NGS بهره گرفته شد. داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزارهای MEGA-X و ClustalW برای فیلوژنی و مقایسه شباهت‌های ژنتیکی تحلیل شدند. همچنین مارکرهای اختصاصی ژن‌های پروتئاز (مانند subtilisin-like serine protease genes) برای ردیابی توان بالقوه تولید آنزیم مورد استفاده قرار گرفت [۲۰، ۲۱].

##### سنجش فعالیت بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری دقیق فعالیت فیبرینولیتیک، آزمایش‌های زیر انجام شد:

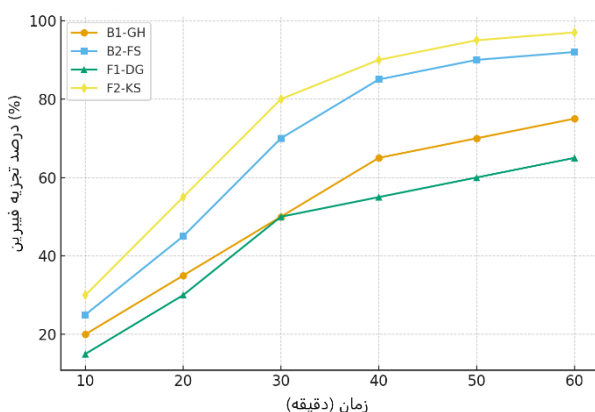
- آزمون زیموگرافی ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی فیبرین، جهت مشاهده الگوهای باندی آنزیم‌ها.

|    |       |         |       |
|----|-------|---------|-------|
| 28 | 35-42 | 6.0-6.8 | F1-DG |
| 12 | 37-55 | 6.5-7.2 | F2-KS |

کمترین کاهش فعالیت مربوط به F2-KS بود، که نشان‌دهنده کارایی بالای آن در شرایط شبیه‌سازی شده بدن است.

### فعالیت فیبرینولیتیک در شرایط شبیه‌سازی شده بالینی

برای بررسی قابلیت بالینی، آنزیم‌های استخراج شده در حضور پلاسما آزمایش شدند. سویه‌های B2-FS و F2-KS توانستند ۷۰ تا ۸۵ درصد فیبرین تشکیل شده را در مدت ۳۰ دقیقه تجزیه کنند، در حالی که این میزان برای F1-DG حدود ۵۰ درصد بود.



### نمودار ۳ - درصد تجزیه فیبرین توسط سویه‌های منتخب در

#### حضور پلاسما

نمودار نشان می‌دهد که سویه‌های بومی خاص می‌توانند عملکردی نزدیک یا حتی بهتر از برخی داروهای مرجع داشته باشند.

### همبستگی داده‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی

تحلیل آماری نشان داد که بین نزدیکی فیلوژنتیکی سویه‌ها و میزان فعالیت فیبرینولیتیک آنها همبستگی معناداری ( $r = 0.72, p < 0.01$ ) وجود دارد. این یافته تأیید می‌کند که ویژگی‌های ژنتیکی نقش مهمی در تعیین توانایی تولید آنزیم‌های فیبرینولیتیک دارند.

### نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌های بومی میکروبی دارای ظرفیت ارزشمندی برای تولید آنزیم‌های فیبرینولیتیک با ویژگی‌های منحصربه‌فرد هستند. بررسی ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی بیانگر تنوع بالای ژنتیکی میان سویه‌های جداسازی شده و مشخص شد که خوشه‌های ژنتیکی خاصی با بیشترین میزان فعالیت فیبرینولیتیک ارتباط مستقیم دارند. این یافته حاکی از آن است که مطالعه ترکیبی داده‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی می‌تواند ابزار مؤثری برای انتخاب سویه‌های برتر باشد. از نظر بیوشیمیایی، نتایج نشان دادند که سویه‌های F2-KS و B2-FS بیشترین پایداری را در شرایط نزدیک به فیزیولوژیک (pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) داشته‌اند. این ویژگی‌ها اهمیت بالینی بالایی دارند زیرا یکی از محدودیت‌های اساسی بسیاری از آنزیم‌های میکروبی، ناپایداری در شرایط بدن انسان است. آزمایش‌های انجام شده در محیط پلاسما نیز نشان دادند که این سویه‌ها قادرند بخش عمده‌ای از فیبرین تشکیل شده را در مدت زمان

از میان ۶۵ نمونه محیطی جمع‌آوری شده، ۲۷ سویه دارای فعالیت فیبرینولیتیک اولیه بودند. پس از غربالگری بر اساس قطر هاله شفاف و آزمون‌های بیوشیمیایی، ۱۰ سویه با فعالیت بالا انتخاب شدند. میانگین قطر هاله‌ها بین ۱۰،۲ تا ۲۰،۵ میلی‌متر متغیر بود.

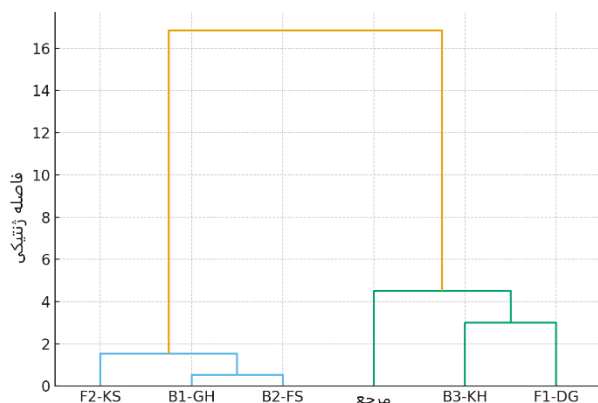
### جدول ۲ - خلاصه فعالیت فیبرینولیتیک سویه‌های منتخب

| کد سویه | قطر هاله (mm) | فعالیت آنزیمی (U/mL) | منبع جداسازی        |
|---------|---------------|----------------------|---------------------|
| B1-GH   | 14.2 ± 0.3    | 120 ± 5              | خاک جنگلی گیلان     |
| B2-FS   | 18.5 ± 0.5    | 145 ± 7              | خاک کشاورزی فارس    |
| B3-KH   | 16.7 ± 0.4    | 138 ± 6              | خاک کوهستانی خراسان |
| F1-DG   | 12.7 ± 0.2    | 110 ± 6              | دوغ سنتی خراسان     |
| F2-KS   | 20.1 ± 0.4    | 160 ± 8              | کشک بومی فارس       |

داده‌ها نشان می‌دهند سویه F2-KS بالاترین فعالیت را دارد، در حالی که F1-DG کمترین فعالیت را نشان داده است.

### تنوع ژنتیکی سویه‌ها

آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که سویه‌های مورد بررسی عمدتاً به جنس *Bacillus* تعلق دارند و در سه خوشه اصلی دسته‌بندی شدند. سویه‌های F2-KS و B2-FS در یک خوشه قرار گرفتند که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند.



### نمودار ۲ - درخت فیلوژنتیکی سویه‌های منتخب بر اساس ژن

#### SrRNA16

این نمودار نشان می‌دهد که سویه‌های با فعالیت بالا در یک شاخه تکاملی متمایز قرار گرفته‌اند، که بیانگر ارتباط میان تنوع ژنتیکی و فعالیت فیبرینولیتیک است.

### سنجش پایداری آنزیمی

سویه‌های منتخب در شرایط مختلف pH و دما آزمایش شدند. نتایج نشان دادند که سویه‌های B2-FS و F2-KS بیشترین پایداری را در محدوده pH ۵-۶،۵ و دمای ۳۷-۵۰ درجه سانتی‌گراد داشتند.

### جدول ۳ - پایداری آنزیم‌ها در شرایط مختلف

| کد سویه | محدوده pH پایدار | دمای پایدار (°C) | کاهش فعالیت پس از ۱ ساعت (%) |
|---------|------------------|------------------|------------------------------|
| B1-GH   | 6.5-7.0          | 37-45            | 22                           |
| B2-FS   | 6.8-7.5          | 37-50            | 15                           |

13. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem.* 2021;96:405-456.
14. Fu Y, Zhao X, Li Y. Challenges and perspectives in the clinical use of fibrinolytic enzymes. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7590.
15. Ghafoori F, Mousavi-Nasab M, Hejazi MA. Screening of fibrinolytic enzyme-producing bacteria from Iranian traditional foods. *Arch Microbiol.* 2020;202(8):2149-2158.
16. Zhou H, Wang J, Chen Y. Translational gaps in fibrinolytic enzyme research: from bench to bedside. *Biotechnol Adv.* 2022;60:108004.
17. Li J, Wang J, Zhao H. Screening and characterization of fibrinolytic enzyme-producing bacteria from soil samples. *Front Microbiol.* 2020;11:593905.
18. CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved guideline. CLSI document M11-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
19. Kim JH, Park JY, Lee SH. Identification and phylogenetic analysis of fibrinolytic enzyme-producing *Bacillus* strains. *J Microbiol Biotechnol.* 2021;31(8):1065-1074.
20. Chen L, Xu Y, Zhang H. Genetic diversity and fibrinolytic potential of *Bacillus* isolates revealed by RAPD-PCR. *Microb Pathog.* 2021;158:105045.
21. Song J, Kim H, Park S. Genomic insights into subtilisin-like proteases with fibrinolytic activity in *Bacillus* species. *Int J Biol Macromol.* 2022;200:153-162.
22. Wang C, Zhou L, Zhang Y. Biochemical characterization and stability of microbial fibrinolytic enzymes under various conditions. *Enzyme Microb Technol.* 2020;138:109598.
23. Lee SY, Kim JH, Cho JY. Comparative fibrinolytic activities of *Bacillus* isolates from fermented foods. *J Microbiol Biotechnol.* 2020;30(6):895-902.
24. Xu D, Li Y, Peng Y. Stability and activity of fibrinolytic enzymes from *Bacillus* spp. under physiological conditions. *Int J Biol Macromol.* 2021;180:216-224.
25. Choi J, Park J, Kim M. Correlation of phylogenetic clusters and fibrinolytic enzyme activities in *Bacillus* strains. *Microorganisms.* 2022;10(1):156.
26. Wang L, Chen Z, Huang J. Plasma clot lysis by microbial fibrinolytic proteases: evaluation for thrombolytic potential. *Thromb Res.* 2021;201:15-22.
27. Mousavi Nasab M, Ghafoori F. Genetic and biochemical characterization of Iranian indigenous *Bacillus* strains with fibrinolytic activity. *Iran J Biotechnol.* 2022;20(4):e3072.
28. Wu G, Zhang C, Wang J. Advances in microbial fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy. *Crit Rev Biotechnol.* 2021;41(6):808-822.
29. Jeong SJ, Kim JY, Park Y. Therapeutic potential of fibrinolytic proteases from *Bacillus* strains: from lab to clinic. *Front Pharmacol.* 2022;13:875321.
30. Li X, Yang Y, Gao D. Indigenous microbial resources for novel fibrinolytic enzymes: opportunities and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023;107(9):3517-3530.

کوتاه تخریب کنند، که این عملکرد با برخی داروهای رایج ضدترومبوز قابل مقایسه یا حتی بهتر است.

یافته‌های این مطالعه بر ضرورت توجه بیشتر به منابع بومی و ظرفیت‌های زیست‌فناورانه آنها تأکید دارد. با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در تحقیقات جهانی، هنوز بخش زیادی از تنوع میکروبی بومی ایران ناشناخته مانده است و می‌تواند منبعی نوین برای توسعه فرآورده‌های دارویی و درمانی باشد.

از منظر کاربردی، توسعه فرآورده‌های زیستی بر پایه این سویه‌ها می‌تواند راهکاری کم‌هزینه‌تر، ایمن‌تر و پایدارتر در مدیریت ترومبوز باشد. با این حال، لازم است مطالعات پیش‌بالینی و بالینی بیشتری انجام شود تا اثربخشی و ایمنی این آنزیم‌ها در سطح انسانی تأیید گردد. در نهایت، ترکیب داده‌های ژنتیکی، بیوشیمیایی و بالینی مسیر روشنی برای تبدیل این یافته‌ها به محصولات درمانی فراهم می‌کند و می‌تواند گامی مهم در بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به اختلالات ترومبوتیک باشد.

## مراجع

1. World Health Organization. Global Health Estimates 2022: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region. Geneva: WHO; 2023.
2. Weitz JI, Eikelboom JW, Samama MM. New antithrombotic drugs: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. *Chest.* 2021;160(6):e545S-e608S.
3. Mine Y, Wong AHK, Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Res Int.* 2020;136:109471.
4. Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2020;47(3-4):297-308.
5. Chen H, McGuffin LJ, Reilly P. Structural and functional analysis of fibrinolytic enzymes from *Streptomyces* species. *Biotechnol Adv.* 2021;48:107728.
6. Moosavi-Nasab M, Yousefi AR, Mirzaei M. Screening and characterization of fibrinolytic enzyme-producing *Bacillus* isolates from Iranian fermented foods. *Iran J Biotechnol.* 2022;20(4):e3031.
7. Kim SH, Choi NS, Lee HH. Application of next-generation sequencing to analyze microbial diversity in fibrinolytic enzyme-producing bacteria. *Front Microbiol.* 2021;12:658347.
8. Gao D, Li T, Wang L. Structural insights into the thermostability of fibrinolytic proteases from *Bacillus* species. *Int J Biol Macromol.* 2022;209:214-223.
9. Choi JH, Park Y, Kim EK. Phylogenetic diversity and fibrinolytic activity of *Bacillus* strains isolated from Korean fermented soybean foods. *J Appl Microbiol.* 2020;129(2):445-456.
10. Kearon C, Akl EA, Ornelas J. Antithrombotic therapy for VTE disease: CHEST guideline and expert panel report. *Chest.* 2022;162(5):e377-e394.
11. Wang J, Xu T, Zhang C. Multifunctional roles of microbial fibrinolytic enzymes in thrombosis management. *Thromb Haemost.* 2021;121(6):776-790.
12. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2022;1511(1):52-61.