مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۳، پاییز ۹۷، صفحات ۲۲۰ تا ۲۲۹
DOI: 10.29252/iau.28.3.220

Original Article

استخراج آنزیم استرپتوکیناز از استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*) جدا شده از مخاط گلو و بررسی اثرات فیبرینولیتیک و سمیت آن بر سلول‌های سالم Hu02

علی اکبر حاتمی[۱]، انوش اقدامی[۲]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
[۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه ، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بیماری‌های قلبی عروقی در حال حاضر جزو سه علت اول مرگ و میر و ناتوانی انسان در سراسر دنیا و در حال تبدیل شدن به اصلی‌ترین عامل مرگ و میر یا ناتوانی در اغلب کشورها هستند. استرپتوکیناز به عنوان شناخته شده ترین داروی فیبرینولیزی، مدت مدیدی است که در درمان سکته قلبی استفاده می‌شود. این آنزیم از باکتریهای بتا همولیتیک تولید می‌شود. در این تحقیق آنزیم استرپتوکیناز از باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه جدا شده از گلو استخراج شد.*

روش بررسی: پس از کشت باکتری‌ها و بررسی فعالیت بتاهمولیزی آنها، انزیم باکتریها استخراج و فعالیت فیبرینولیزی و تست عدم سمیت انجام گرفت.

یافته‌ها: *در میان آنزیم‌های استخراج شده، ۱۴ درصد از نمونه‌ها دارای فعالیت فیبرینولیزی بالاتر از ۳۰ ٪ بودند و آنزیم استخراجی باکتری استاندارد کمتر از نمونه‌های بالا فعالیت فیبرینولیزی داشت. در تست عدم سمیت در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت میزان سمیت آنزیم استخراجی از باکتری استاندارد از دیگر نمونه‌ها کمتر بود.*

نتیجه‌گیری: *آنزیم‌های استخراجی دارای اثر فیبرنولیزی بودند و این اثر در باکتری‌های جدا شده از گلو از باکتری استاندارد بیشتر مشاهده شد. سمیت آنزیم‌ها بسته به زمان و غلظت تغییر کرد و با کاهش غلظت سمیت کاهش و با افزایش زمان افزایش یافت که می‌توان آن را به عنوان داروی جدید، کم‌خطر و طبیعی در از بین بردن لخته های خونی معرفی کرد.*

واژگان کلیدی: *استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکیناز، اثرات فیبرینولیتیک، سلول‌های سالم فیبروبلاستی.*

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از ایجاد لخته‌های خونی در حال حاضر جزء سه علت اول مرگ و میر ناتوانی انسان در سراسر دنیا و در حال تبدیل شدن به اصلی‌ترین عامل مرگ و میر یا ناتوانی در اغلب کشورها هستند. درمان ترومبولیتیک یک درمان مرسوم در درمان سکته قلبی است، البته در استفاده از این داروها مشکلاتی از قبیل تاخیر فعالیت، خونریزی مشاهده می‌شود. داروهای ترومبولیتیک استفاده شده در درمان سکته قلبی عبارت از فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، اوروکیناز و استرپتوکیناز هستند که به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. استرپتوکوک آگالاکتیه به شکل دیپلوکوک گرم مثبت است که در ایجاد گلودردهای چرکی دارای اهمیت ویژه‌ای است. این باکتری دارای فاکتورهای حدت مهمی از جمله استپتوکیناز و استرپتودورناز و همولیزین است. استرپتوکیناز، قدیمی‌ترین و بهترین فعال کننده پلاسمینوژن است که به وسیله گونه‌های بتا همولیتیک

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، انوش اقدامی
(**email**: eghdami49@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۱۵

استرپتوکوکوس تولید می‌شود. این آنزیم یک پروتئین خارج سلولی است که فاقد خاصیت پروتئازی بوده و سبب تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین فعال می‌شود که می‌تواند فیبرین لخته را تجزیه کند. استرپتوکیناز در درمان ترومبوز وریدعمقی و آمبولی ریه کاربرد دارد. همچنین در درمان ترومبوز شریانهای کرونر بعد از سکته قلبی و نیز در باز کردن انسداد کانولهای شریانی و وریدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. استرپتوکیناز پلاسمینوژن را هم وابسته به فیبرین و هم غیر وابسته به فیبرین را می‌تواند فعال کند. امروزه استرپتوکیناز بیشتر به صورت نوترکیب تولید می‌شود و در مقایسه با فعال کننده پلاسمینوژن بافتی قیمت پایین‌تری دارد (۱, ۲). گروهی از محققین در سال ۲۰۱۱ عنوان کردند که استرپتوکیناز عامل موثر برای فعال کردن پلاسمینوژن بافتی است که در برخورد با انفارکتوس قلبی حاد عامل بسیار با ارزش و مطمئنی است. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترا زولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستالهای آبی رنگ نا محلول است. در سال ۱۹۸۳ MTT به عنوان جایگزینی برای روش رادیواکتیو پیشنهاد شد. در این روش بر خلاف سایر روش‌ها، مراحل شستشو جمع آوری سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها و افزایش خطای کار می‌شوند؛ حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر در یک میکرو پلیت انجام می‌شود. لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا بوده، در صورتی که آزمایش روی سلول های چسبیده به پلیت انجام شود (۳, ۴). در این پژوهش سعی شده است تا با رعایت شرایط استریل و ملاحظات ایمنی، آنزیم استرپتوکیناز را از باکتری‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداسازی کنیم و بدون کوچکترین تغییر، تاثیر آنها را بر روی لخته‌های خونی و کازئین شیر بررسی کنیم و اثر بخش بودن آن را در جهت استفاده در درمان بیماریهای قلبی و گرفتگی عروق کرونر را نشان دهیم. در این راستا اثر سمیت آنزیم‌های استخراج شده بر روی سلول‌های سالم فیبروبلاستی سالم انسانی HU02 بررسی شد. در این تحقیق، یافته‌ها مشابه یافته‌های نوها بشیر است که برای بررسی فعالیت آنزیم استخراجی آزمونهای فیبرینولیزی ،کازئینولیزی و همچنین لیز لخته بر روی لام را انجام دادند. بررسی های ایشان منجر به شناسایی سه آنزیم با فعالیت فیبرینولیزی بالاتر از ۳۰٪ شد. تحقیق حاضر با نتایج ذکر شده در بالا با این تحقیق مشابه است اما از لحاظ تست MTT،این اولین تحقیق و گزارش در این رابطه است. با توجه به نیاز داخلی کشور به داروی استرپتوکیناز و قیمت نسبتا بالای آن، نیاز به تولید این دارو در کشورمان احساس می شود. هدف از تحقیق حاضر با توجه به آمار رو به رشد سکته های قلبی در کشور و همچنین گرایش جوامع امروزی به فرآورده‌های طبیعی، در این تحقیق با استخراج آنزیم استرپتوکیناز از *استرپتو کوکوس آگالاکتیه* جدا شده از مخاط گلو و اثر فیبرینولیتیک آنها بر لخته‌های خونی، اثر فرآورده‌های میکروبی به عنوان محصولات طبیعی و تهیه داروی طبیعی که عوارض جانبی داروهای سنتزی را نداشته باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تعداد۵۰ نمونه باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه از گلوی بیماران در بیمارستان میلاد در مدت ۶ ماه از اسفند ۱۳۹۵ تا شهریور ماه ۱۳۹۶ جمع آوری شدند. باکتری‌ها در محیط BHI broth و با استفاده از گلیسیرین استریل در دمای ۳۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در فواصل دو ماهه پاساژهای مکرر صورت گرفت. باکتری‌های جداشده بر روی محیط کشت محیط بلاد آگار (مرک، آلمان) رشد کرده و کلنی‌های محدب کرم رنگی را تولید کردند و با توجه به روش-های شناسایی از قبیل نوع همولیز ،رنگ آمیزی گرم، مشاهده مستقیم، کاتالاز ،تست کمپ و حساسیت به باسیتراسین و اپتوچین برای همه ۵۰ نمونه و همچنین باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه ATCC12386 تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران انجام گرفت. آنزیم استرپتوکیناز استخراج شد و خواص فیبرینولیزی، کازئینولیزی و همچنین تست MTT بر روی سلول های سالم فیبروبلاستی انسان HU02، مربوط به نمونه های شاخص از نظر اثر فیبرینولیزی و سویه استاندارد استرپتوکوکوس آگالاکتیه با کد ATCC 12386 آزمایش شد.

روش‌های جداسازی و خالص سازی استرپتوکیناز

کلونی‌های کشت خالص که با نمایش ناحیه روشن از همولیز روی پلیتهای بلاد آگار کشت داده شده بودند، در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مینرال سالت براث و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از گسترش تیرگی، ۱میلی لیتر از این محیطهای ذکر شده، به ۴۹ میلی لیتر محیط کشت مینرال سالت براث انتقال یافت و انکوبه شد. نمونه‌ها با استفاده از سانتریفوژ سرد در ۱۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت سلولی آزاد از میان فیلتر

۰/۴۵ میکرون استات سلولز جداسازی شد و فیلتر شده ها بعنوان استرپتوکیناز خام در نظر گرفته شدند (۱).

آزمون حل کردن لخته خونی

خون انسانی تازه تهیه شد و به هر یک از لوله‌ها مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از این خون اضافه شد. سپس همه لوله‌های حاوی خون انسانی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از تشکیل لخته، لوله‌ها در g۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سرم روی لخته‌ها با مکش از داخل لوله‌ها خارج شد، بدون اینکه آسیبی به لخته‌ها وارد شود. وزن لوله‌های میکرو سانتریفوژ همراه با لخته یادداشت شد (w2). وزن لخته با کم کردن w2 از w1 محاسبه شد. در ادامه مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از هر یک از سوپرناتانت‌های سلولی جدا شده (۵۱ نمونه) به هر یک از لوله‌های حاوی لخته اضافه شد. به دو لوله دیگر مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHI Broth اضافه شد. همه نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند و لیز لخته ها در این مدت انجام شد. پس از انکوباسیون مایع هر یک از لوله ها خارج شده و لوله ها دوباره وزن شدند (۱).

در صد لیز لخته با استفاده از معادله محاسبه شد:

درصد لیز لخته =(w3-w1)/(w2-w1)*100) 100))-

کازئینولیز شعاعی

محیط کشت SKIM MILK agar طبق دستور العمل کارخانه تهیه شد، سپس مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از هر یک از سوپر ناتانت‌های جداسازی شده به چاهک‌های درون پلیت SKIM MILK agar که قبلا ایجاد شده بودند اضافه شد و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند تا میزان هضم کازئین بررسی شود.

لیز لخته خون روی لام

به تعداد نمونه‌ها لام تمیز انتخاب و شماره گذاری شدند. بر روی هر لام یک قطره خون ریخته شد و پس از تشکیل لخته و فیکس شدن آنها ، مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از آنزیم خام به لخته های روی لام ها اضافه شد و لیز لخته مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی (HU02 IBRCC 10309) از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران خریداری شد. سلول‌ها در فلاسک T-25 تهیه شده بودند. سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس جهت اطمینان از عدم آسیب دیدگی و از لحاظ چسبندگی به فلاسک بررسی شد. سلول HU02 خاصیت چسبندگی داشته وبه کف فلاسک می‌چسبند و عدم چسبندگی نشانگر این است که Confluncy سلول‌ها زیاد است، به این معنی که مرگ و میر سلول‌ها با تکثیرشان برابر است (stationary phase) و در نتیجه سلول بلافاصله وارد فاز مرگ (deat phase) خواهد شد. بنابراین زمانی که confluncy به ۸۰-۷۰ درصد رسید، کشت مجدد انجام شد. جهت کشت سلول HU02 از محیط کشت (DMEM+2Mml l-Glutamine +10% Fetal Bovine serum) (FBS استفاده شد. سپس داخل هود درب فلاسک حاوی سلول‌ها را باز کرده و لایه رویی سلول ها توسط ۵ میلی لیتر محلول PBS شسته شد و ۲ میلی لیتر محلول Trypsin (0.25%) EDTA- (0.25%) به فلاسک حاوی سلول‌ها اضافه شد. دوباره درب فلاسک به آرامی تکان داده شد تا از پوشش کامل سلول‌ها توسط محلول اطمینان حاصل شود. دوباره درب فلاسک به آرامی بسته شد و در انکوباتور CO2 دار، با جو ۵٪ و در دمای ۳۷ درجه سانتی گرادبه مدت ۳ دقیقه انکوبه شد پس از انکوباسیون وضعیت سلول‌ها زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. سلولها جدا شده بودند و در سوسپانسیون شناور بودند. بلافاصله فلاسک به زیر هود انتقال داده شد و ۲ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه شد و بعد طی چند بار پیپتور کردن سوسپانسیون هموژنی حاصل شد. سوسپانسیون به یک لوله مخروطی شکل ۱۵ میلی لیتری یا همان فالکن انتقال داده شد و طی ۵ دقیقه با دور ۲۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی خارج شده و سپس توسط انگشت به آرامی به فالکن ضربه وارد شد تا گلوله‌های سلولی نرم شوند. در مرحله بعد ۲ میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و طی چند بار پیپتور کردن محلول توسط پیپت، اجازه داده شد تا سلول‌ها کاملا تفکیک شوند و در نهایت سلول‌ها جهت تست MTT استفاده شدند (۵, ۶).

روش شمارش سلولی جهت بررسی درصد سلولهای زنده و استفاده در تست MTT

ابتدا سلول‌ها به کمک محلول تریپسین-EDTA آزاد شده و در حجم کمی از محیط کشت به صورت سوسپانسیون در آمدند. سپس در داخل لوله مخروطی شکل(فالکن) استریل ۱۵ میلی لیتری به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰ g سانتریفوژ شدند. سوسپانسیون سلولی ، چند بار با پیپت پاستور کشیده و خالی شد تا سلول‌ها بصورت یکنواخت و مجزا از هم درآمدند. تحت شرایط استریل ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی برداشته و هم حجم آن تریپان بلو ۰/۴ درصد اضافه شد و با پیپت کردن به آرامی مخلوط شد، بدین ترتیب سلول‌ها دو بار رقیق شدند. روی لام نئوبار تمیز ۳-۲ میکرولیتر آب مقطر قرار داده و یک لام سنگی روی آن قرار داده شد. لام را به آرامی فشار داده و چند بار به عقب و جلو کشیده شد، طوری که آب

مقطـر از کنـاره‌هـا خـارج شـدند و لام روی لام ثابـت شـد. سوسپانسیون سلولی را مخلـوط کـرده و در هـر دو طـرف لام نئوبار از این سوسپانسیون پر شد. پس ازچند لحظه سـلول‌هـا در کف لام ته نشین و بی حرکت شدند و با میکروسکوپ نوری و با درشت نمایی ۲۰ بررسی شدند. تعداد سلول‌هـای زنـده یـا رنگ نگرفته، شفاف بودند و سلول‌های رنگ گرفتـه یـا سـلول-های آبی رنگ غیرزنده بودند. اکثریت سـلول‌هـا (حـدود ۹۸٪) زنده بودند (۷).

روش محاسبه شمارش سلولی از فرمول زیر به دست آمد:

۱۰۰×ضریب رقت رنگ×تعداد سلول=تعدادسلول ها بـه ازای هر میلی لیتر

اثـر سـایتو توکسـیک عصـاره بـه دسـت آمـده از بـاکتری اسـترپتوکوکوس آگالاکتیـه بـر روی سـلول‌هـای سـالم فیبروبلاسـتی HU02 بـه روش رنـگ سـنجی بـا اسـتفاده از hiazol-2yl)-2,5 diphenl Tetrazolium bromide(MTT) 3-(4,5 dimethylt و در مقایسه با گروه‌های کنتـرل بررسـی شد. عصاره به دست آمده از اسـترپتوکوکوس، بـا اسـتفاده از روشserial dilution رقت سازی شـد. بـدین صـورت کـه از عصاره نهایی (به عنوان غلظـت ۱۰۰ در صـد در نظـر گرفتـه شد)، ۱۰۰ لاندا برداشته و بـه چاهـک اول کـه حـاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت اختصاصی و ۱۰۰ میکرو لیتر سلول مورد آزمایش بود اضافه شد (تمامی چاهک‌هـا همـین مقـدار محیط کشت و سلول را داشـتند). پـس از چنـد بـار پیپتـور کردن (جهت هموژن شـدن) چاهـک اول ۱۰۰ لانـدا از ایـن چاهک برداشته و به چاهک دوم اضافه شد و به همین ترتیب از چاهک دوم به سوم و چهارم تا چهـار دهـم بـدین ترتیـب انجام شد. به منظور دقت بیشتر و صحت تکرار پذیری داده‌ها به هر غلظت و برای هر سلول حداقل ۳ حفره اختصاص داده شد. همچنین ۳ حفـره جهـت شـاهد (Control) کـه همـان محیط کشت حاوی سلول در نظر گرفته شد و ۳ حفـره نیـز جهت کنتـرل مثبـت (DMSO)اختصـاص داده شـد. پـس از اضافه کردن عصاره با غلظت‌های متفاوت، پلیـت ۹۶ خانـه‌ای در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با جو؛ ۵٪ CO_2 انکوبه شد. به هر یک از حفره‌های محیط کشت ۱۰ میکرولیتـر محلـول MTTاضافه شد و ظرف را در ورق آلومینیـومی پوشـانیده و دوباره در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد بـا جـو؛ ۵٪ CO_2 و رطوبت ۱۰۰٪ انکوبه شـد. پـس از ۴-۲ سـاعت انکوباسـیون (زمان در آزمایش ما ۳ ساعت بـود)، بـا کمـک میکروسـکوپ اینورت حضور رسوب ارغوانی رنگ نقطه‌ای بررسی شـد و در صورت مشاهده رسـوب ارغـوانی زیـر میکروسـکوپ، محـیط کشت چاهک‌ها کاملا تخلیه شد (فقط در مـورد سـلول هـای چسبنده). ۱۰۰میکرو لیتـر محلـول DMSO جهـت انحـلال کریستالهای فورومازان اضافه شد و در نهایت میـزان جـذب (OD)توسط دستگاه Elisa Plate Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شـد. در ضـمن درصـد بقـای سـلولی در گـروه کنتـرل منفـی ۱۰۰ در نظـر گرفتـه شـد و غلظتـی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سـلولی را بـه نصـف تقلیل می‌دهد، از روی نمودار با استفاده از نـرم افـزار اکسـل تعیین شد. در پایان درصد زنده مـانی سـلول (viability) بـر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۸).

OD sample /OD control *100=Viability

جهت تحلیل آماری داده‌ها در قسمت آمـار توصـیفی، از میـان شاخص های گرایش مرکزی میانگین محاسبه شد و در قسمت آمار استنباطی نتایج با نـرم افـزار اکسـل و آزمـون آمـاری بـا مقایسه میانگین تحلیل و استنباط شد. در این راستا، نتایج در مورد مرگ سلولی به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد.

یافته‌ها

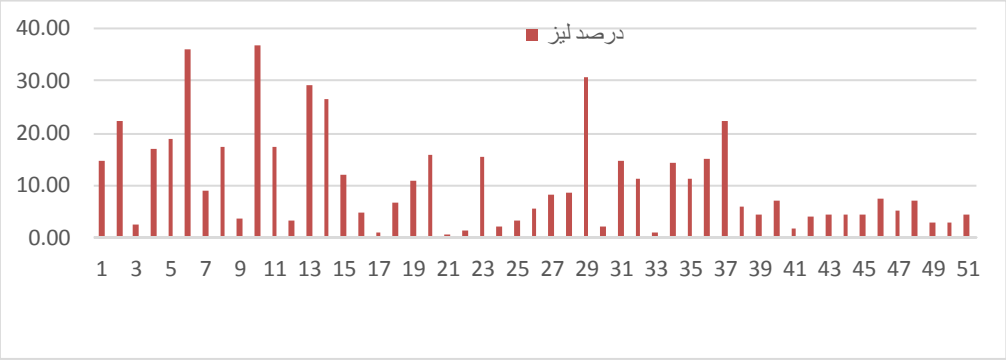
اگر میزان جذب نمونه (سلول هایی که ماده مورد آزمـایش به آنها اضـافه شـده اسـت) از میـزان جـذب گـروه کنتـرل (سلول‌هایی که در مجاورت دارو یا ماده مورد بررسـی قـرار نگرفته‌اند) بیشتر باشد، این موضوع نشـانده فرآینـد تکثیـر بیشتر نسبت به گـروه کنتـرل اسـت (Proliferation). اگـر میزان جذب نمونه از میزان جذب گروه کنترل کمتر باشـد این موضوع نشانده فرآیند مـرگ سـلولی در نمونـه اسـت و نشان دهنده سمی بودن ماده استفاده شده در ایـن غلظـت است (Cytotoxicity). اگر میـزان جـذب نمونـه بـا میـزان جذب گروه کنترل برابر باشد این موضوع نشان دهنـده بـی اثر بودن ماده استفاده شده بر تکثیر و مرگ سلول‌ها اسـت. نتـایج حاصـل از حـل کـردن لختـه خـونی بـرای بـاکتری استرپتوکوکوس اگالاکتیه ATCC12386 و جدا شده از گلو در جدول ۱ ثبت شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون لیز لخته، آنزیم‌های استخراج شـده از نمونـه‌هـای شـماره ۱۱، ۷، ۲۹، ۱۴، ۱۵، ۳۶ ، ۲ و شـماره ۵ بـالاتر از ۲۰٪ لیز لخته را ایجادکردند و در این میـان آنـزیم شـماره ۱۱ و ۷ به ترتیب با تقریب ۳۷٪ و ۳۶٪ لیز لختـه بـالاترین فعالیت را نشان دادند. حال آنکه آنـزیم اسـتخراج شـده از نمونه استاندارد اسـترپتوکوکوس آگالاکتیـه ATCC12386 دارای فعالیت فیبرینولیزی در حد٪ ۴/۴۳ بود.

جدول۱. نتایج جذب برای آنزیم‌های با فعالیت بالادر طول موج ۴۹۲/۶۳۰ نانومتر

آنزیم استخراج شده از نمونه شماره ۳۷	آنزیم استخراج شده از نمونه شماره ۲۹	آنزیم استخراج شده از شماره ۱۴	آنزیم استخراج شده از شماره ۱۳	آنزیم استخراج شده از شماره ۱۰	آنزیم استخراج شده از نمونه شماره ۶	آنزیم استخراج شده از نمونه شماره ۲	آنزیم استخراج شده از باکتری استاندارد ATCC:12386	شماره نمونه
۰/۰۵۶	۰/۰۸۴	۰/۰۶۲	۰/۰۶۸	۰/۰۶۲	۰/۰۷۰	۰/۰۷۱	۰/۰۳۷	میزان جذب

جدول ۲. فعالیت کاز ئینولیزی آنزیم‌های استخراجی از نمونه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه

شماره نمونه	قطر ناحیه روشن	شماره نمونه	قطر ناحیه روشن	شماره نمونه	قطر ناحیه روشن	شماره نمونه	قطر ناحیه روشن
۱	≥1 mm	۱۳	≥۵ MM	۲۵	≥1 MM	۳۷	≥۴ MM
۲	≥7MM	۱۴	≥۳ MM	۲۶	≥۷ MM	۳۸	≥1 MM
۳	≥1 MM	۱۵	≥۱MM	۲۷	≥1 MM	۳۹	≥1 MM
۴	≥1 MM	۱۶	≥1 MM	۲۸	≥1 MM	۴۰	≥1 MM
۵	≥1 MM	۱۷	≥1 MM	۲۹	≥۹ MM	۴۱	≥1 MM
۶	≥۳ MM	۱۸	≥1 MM	۳۰	≥۱mm	۴۲	≥1 MM
۷	≥۱ MM	۱۹	≥1 MM	۳۱	≥1 MM	۴۳	≥1 MM
۸	≥1 MM	۲۰	≥1 MM	۳۲	≥1 MM	۴۴	≥1 MM
۹	≥1 MM	۲۱	≥1 MM	۳۳	≥1 MM	۴۵	≥1 MM
۱۰	≥۳ MM	۲۲	≥1 MM	۳۴	≥1 MM	۴۶	≥1 MM
۱۱	≥۱ MM	۲۳	≥1 MM	۳۵	≥1 MM	۴۷	≥1 MM
۱۲	≥1 MM	۲۴	≥1 MM	۳۶	≥1 MM	۴۸	≥1 MM
۴۹	≥1 MM	۵۰	≥1 MM	ATCC12386	≥1 MM		



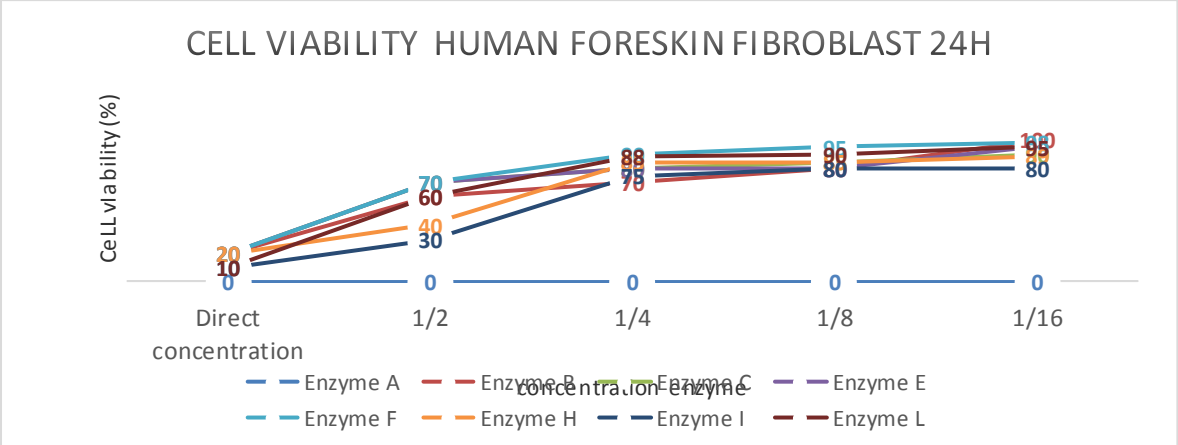
نمودار ۱. درصد لیزلخته توسط آنزیم‌های استخراج شده از نمونه های استرپتوکوکوس آگالاکتیه

نتایج آزمون کازئینولیز شعاعی

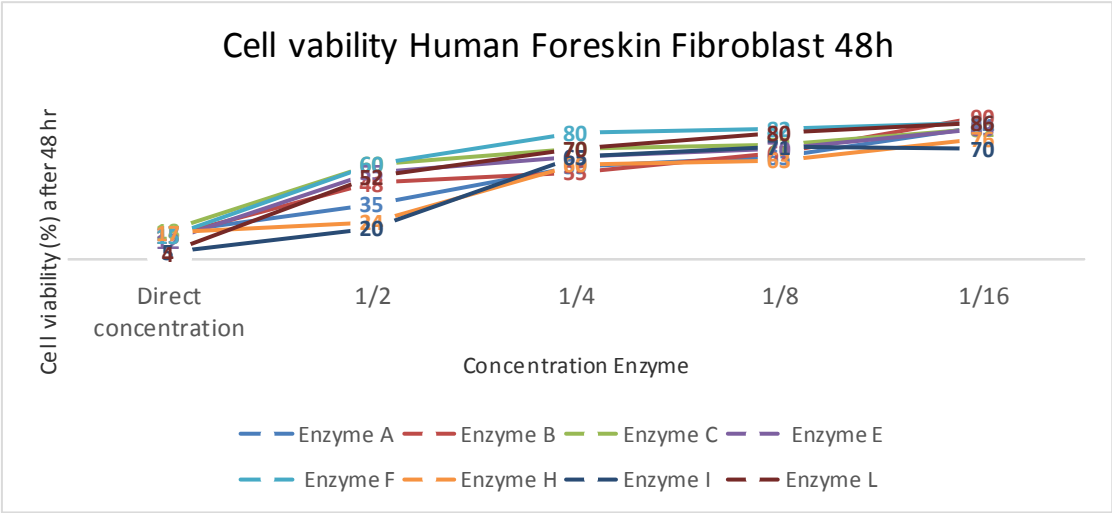
در جدول ۲ فعالیت کازینولیزی عصاره‌های باکتریایی که داخل چاهک‌های درون محیط کشت SKIM MILK agar ریخته شده بودند نشان داده شده است. میزان فعالیت کازینولیزی بر اساس مشاهده و اندازه گیری قطر ناحیه روشن و مقایسه با مرجع گونه استرپتوکیناز آگالاکتیهATCC12386 است. یک واحد از فعالیت آنزیم، مقداری از آنزیم است که بتواند ناحیه روشن به قطر ۱ میلی متر را در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، pH=۷ در مدت ۲۴ ساعت ایجاد کند. همه نمونه‌ها ناحیه روشن بیشتر از قطر ۱ میلی متر را ایجاد کردند، در صورتی که نمونه‌های ۱۱ و ۷ قطر بیشتر از ۳ و ۴ میلی متر را به وجود آوردند.

نتایج آزمون لیز لخته خون روی لام

آزمون لیز لخته خونی بر روی لام های تمیز صورت گرفت و پس از فیکس کردن مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر خون تازه بر روی لام‌ها از آنزیم‌های با در صد بالای لیز لخته مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر بر روی



نمودار ۲. تاثیر رقتهای آنزیم بر روی سلولهای سالم فیبروبلاستی HU02 در ۲۴ ساعت برای همه آنزیمها (حروف A,B.C.E.F.H.I.L به ترتیب مطابق با آنزیمهای استخراجی از.نمونه‌های شماره:،۲،۶،۱۰،۱۳،۱۴،۲۹،۳۷ ، باکتری استاندارد می باشد.)



نمودار ۳. تاثیر رقتهای آنزیم بر روی سلولهای سالم فیبروبلاستی HU02 در ۴۸ ساعت برای همه آنزیم ها(حروف A,B.C.E.F.H.I.L به ترتیب مطابق با آنزیمهای استخراجی از.نمونهای شماره:،۲،۶،۱۰،۱۳،۱۴،۲۹،۳۷ ، باکتری استاندارد می باشد.)

هر قطره خونی ریخته شد و فعالیت لیز لخته که به صورت ناحیه روشن و حالت مایع بر روی لام ایجاد شده بود، مشاهده شد.

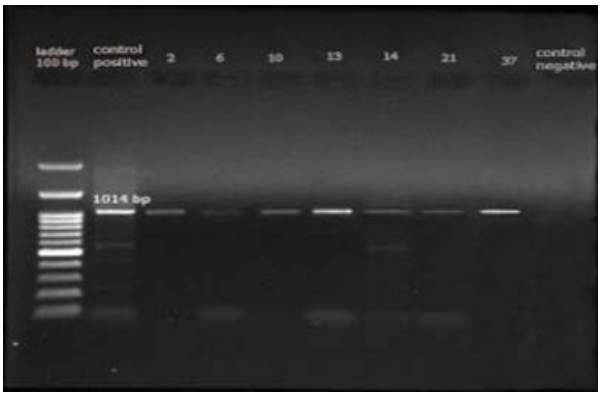
نتیجه مربوط به استخراج ژنومی

جهت اندازه گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده، میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ که در شکل ۱ نشان داده شده است، به صورت کمی اندازه گیری شد (همچنین به صورت کیفی در الکتروفورز نیز چک شد). میزان نسبت OD260 به OD280 نشان دهنده کیفیت استخراج DNA است که طبق منابع معتبر این میزان اگر بین ۱/۷ الی ۲ باشد، استخراج به خوبی صورت گرفته است و ما یک DNA بدون ناخالصی خواهیم داشت.

با توجه به شکل ۱ مربوط به مشاهده ژل محصولات pcr در دستگاه ژل داک، باندهای ستون اول شاخص DNA LEADER و باند ستون دوم مربوط به باکتری استاندارد استرپتوکوکوس آگالاکتیه ATCC12386 است که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. باند تشکیل شده در محدوده۱۰۱۴ bb است که مربوط به ژن استرپتوکیناز است. از ستون سوم به بعد، نمونه‌های ۲،۶،۱۰،۱۳،۱۴،۲۹،۳۷ قرار دارند. باند تشکیل شده مربوط به نمونه‌ها نیز در محدوده ۱۰۱۴ bb است، یعنی اینکه همه نمونه‌های مورد آزمون واجد ژن استرپتوکیناز هستند.

نتایج اثر سمیت سلولی مربوط به آنزیم‌های استخراجی در نمودار ۱ تا ۳ درج شده است. نتایج حاکی از این موضوع است که اثرات سمیت سلولی نمونه استاندارد با کد ATCC 12386 نسبت به نمونه‌های شاخص شماره ۲، ۱۰، ۶، ۲۹ ، ۱۳، ۱۴ و ۲۷ بیمارستانی کمتر است. با توجه به رقت سازی انجام شده و

زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته اثرات سمیت وابسته به زمان است، یعنی با افزایش زمان، میزان سمیت آنزیم افزایش می‌یابد.



شکل۱. محصولات PCR مربوط به ژن استرپتوکیناز باکتری‌های استرپتوکوکوس اگالاکتیه

همچنین میزان سمیت آنزیم‌های استخراج شده نسبت عکس با غلظت دارد، به طوری که با کاهش غلظت، سمیت کاهش یافته و درصد سلولهای زنده افزایش می‌یابد. میزان سمیت آنزیم‌های باکتری استاندارد در غلظت اولیه با نمونه‌های شماره ۲،۶،۱۰،۱۳ و ۱۴ تفاوتی ندارد و درصد سلول‌های زنده ۲۰٪ است، ولی از نمونه‌های ۲۹ و ۳۷ بیشتر است. آنزیم‌های استخراج شده از نمونه‌های شماره ۲۹ و ۳۷ نسبت به نمونه-های فوق الذکر دارای سمیت بیشتری هستند. این سمیت در این نمونه‌ها نیز با کاهش غلظت آنزیم کاهش یافته است، ولی در غلظت‌های کمتر نیز نسبت به نمونه‌های فوق بیشتر هستند. در رقت‌های ۱/۸ و۱/۱۶ در مدت ۲۴ ساعت، درصد سلول‌های زنده در همه آنزیم‌ها بین ۸۰ الی ۱۰۰ درصد است و این درصد در زمان ۴۸ ساعته بین ۷۰ الی ۹۰ درصد کاهش یافته است. آنزیم‌های استخراج شده از سویه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه استاندارد و وحشی برای سنجش فعالیت فیبرینولیزی، کازئینولیزی و تست MTT مورد استفاده قرار گرفتند و در سنجش اثر فیبرینولیزی روی لخته-های خونی، همه نمونه‌ها دارای فعالیت فیبرینولیزی بودند، اما نمونه‌های شماره ۱۰، ۶، ۲۹ ، ۱۳ ،۱۴ و ۲۷ به ترتیب بیشترین فعالیت فیبرینولیزی را بر روی لخته خونی ایجاد کردند و آنزیم استخراج شده از استرپتوکوکوس آگالاکتیه ATCC 12386 دارای فعالیت ۴/۴۳ ٪ فیبرینولیزی بود که نشان دهنده این است که اثر فیبرینولیزی سویه‌های وحشی نسبت به نمونه استاندارد بیشتر است. با توجه به داده‌های به دست آمده ۵/۸ ٪ نمونه‌ها بالاتر از ۳۰ درصد، ۵/۸ ٪ بین ۳۰-۲۰ درصد و ۲۵/۴ ٪ نمونه‌ها بین ۱۰ الی ۲۰ درصد فعالیت فیبرینولیزی داشتند. بقیه نمونه-ها فعالیت کمتر از ۱۰ درصد داشتند. با توجه با اینکه جذب اولیه برای آنزیم‌های با فعالیت فیبرینولیزی بالا ذکر شده است و نمونه-های آنزیمی دارای جذب متفاوتی هستند، احتمالا تفاوت در میزان فعالیت فیبرینولیزی می-تواند به دلیل تفاوت در غلظت آنزیم‌ها باشد.

بحث

نتایج بابا شمسی و همکارانش نشان داد که با اضافه کردن گلوکز به محیط کشت، میزان ترشح استرپتوکیناز به طور معنی دار افزایش می‌یابد که حکایت از وابستگی تولید آنزیم استرپتوکیناز با متابولیسم گلوکز و ترشح اسید دارد (۲). معمارنژاد و همکاران در تحقیقی ژن استرپتوکیناز از سویه های مختلف بومی ایران بررسی کردند. ژن استرپتوکیناز جدا شده از سویه استاندارد S.equisimilis ATCC9542 پس از تکثیر به روش PCR در وکتور ابراز پروتئین Pqe30 انجام شد. نتایج نشان داد که وجود سکانس اضافی ۶ xHis نه تنها مانع فعالیت آن نمی‌شود، بلکه امکان تخلیص یک مرحله‌ای و آسان آنزیم را نیز فراهم می‌آورد (۹). نتایج تحقیقات نژاد مقدم و همکارانش نشان داد استفاده از حامل PGEX-4T-2 ضمن تولید استرپتوکیناز نوترکیب فعال و با بازدهی فراوان، دم GST را نیز به ابتدای آمینی آن اضافه می‌کند که می‌توان از آن برای تخلیص یک مرحله‌ای و آسان با استفاده از لیگاند گلوتاتیون سود برد (۲). ایکس فریدا و همکارانش عنوان کردند که فعالیت زیستی آنزیم با روش کازئینولیز شعاعی و هیدرولیز سوبسترای ساخته شده CLN (که شامل کمپلکس پلاسمای انسانی + آنزیم استرپتوکیناز بود) انجام شد، و وجود هاله روشن در دور چاهک‌های پلیتS kim milk agar نشان دهنده فعالیت کازئینولیزی آنزیم استرپتوکیناز بود. همچنین میزان پروتئین به وسیله روش لوریس و حرکت الکتروفورزیس بررسی شد و وزن مولکولی آن به وسیله SDS-Page و تشکیل باند در محدوده ۴۷ کیلو دالتون تعیین شد (۱۰, ۱۱). نوها بشیر و همکارانش در مطالعه‌ای برای بررسی فعالیت زیستی از روش کازئینولیزی شعاعی و هضم لخته خون درون لوله‌های میکرو سانتریفوژ استفاده کردند و نتایج حاصله نشان دهنده فعالیت بالای نمونه SK2 نسبت به بقیه نمونه‌ها بود. در این مطالعه نمونه آنزیم sk2 با٪ ۳۸ تجزیه لخته در مدت ۲۰ دقیقه بیشترین درصد تجزیه را داشت (۱). هدف از مطالعه گاله فاران و همکارانش، تبدیل صفات طبیعی استرپتوکوکوس اکویس میلیس به صفات توسعه یافته با استفاده از موتانسهای تصادفی و تشعشع U.V برای بالا بردن تولید استپتوکیناز بود.

نتایج نشان داد که سویه‌های جهش یافته فعالیت بالای استرپتوکیناز را در مقایسه با سویه‌های وحشی دارند (۱۲). سوباترا دوی و همکارانش بهبود مطالعه به وسیله تغییر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی برای افزایش تولید ناتوکیناز از سودوموناس آئروجینوس(Pseudomonas aeruginosa) جدا شده از شیر گاو را مشاهده کردند. تولید ناتوکیناز (آنزیم فیبرینولایتیک) به وسیله جهش زایی شیمیایی و فیزیکی افزایش یافت. در این مطالعه افزایش تولید ناتوکیناز به وسیله باسیلوس سابتلیس جهش یافته با U.Vافزایش معنی‌داری را در فعالیت فیبرینولیتیک نسبت به نمونه وحشی نشان داد (۱۳). در بررسی باردواج و همکارانش، میزان استرپتوکیناز تولید شده به وسیله Streptococcus dysgalactiae sub sp.equimilis SK-6 همراه با سورفکتانت، فاکتور رشد، عناصرکم مصرف و تحت تاثیر پارامترهای فیزیکی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط کشت نمک معدنی، با سورفاکتانت مختلف، عوامل رشد و عناصر کمیاب تکمیل شد. اثر دوره کمون و حجم تلقیح نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که عملکرد استرپتوکیناز در حضور سورفکتانت غیر یونی، که در آن توئین ۸۰ (برای پشتیبانی از تولید حداکثر آنزیم ۰/۱۷۸ U / میلی لیتر) بالاتر بود. عوامل رشد مانند گلایسین و مکمل تیامین منجر به تولید بهترآنزیم شد (۱۴). نتایج مگال هیس و همکارانش جهت آزمون سنجش مهار رقابتی نشان داد که تاحدی از طریق لیزین سایت‌های پلاسمینوژن اتصال با واسطه است. به دنبال اتصال پلاسمینوژن و فعال سازی،Streptococcus agalactiae قابلیت کاهش فیبرونکتین (یکی از دسته ماتریکس‌های پروتئینی خارج سلولی) را در شرایط In vitro دارد. علاوه بر این، انکوباسیون Streptococcus agalactiae تنها با پلاسمینوژن، یا پلاسمینوژن به علاوه فیبرینوژن، در حضور tpa بیماری‌زای آن را در موش‌های C57BL/6 افزایش داد، به این معنی است که استفاده از تمایل فعالیت پلاسمینوژن به وسیله باکتری بیماریزایش را افزایش می‌دهد (۱۵). در مطالعه وایشناوی و همکارانش تمرکز اصلی پژوهش بر ارزیابی فعالیت ترومبولیتیک استرپتوکیناز و خالص سازی آنزیم تولیدی از استرپتوکوکوس اکوینوس (Accession VIT-VB2 no.jx406835) جدا شده از نمونه شیر بود. نتایج نشان داد که دمای دمای بهینه ۱۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه ۶ است. فعالیت خاص آنزیم تولیدی درحدود ۶۵۸۵ ۱ U MG-1 و وزن مولکولی به وسیله SDS-PAGE،kda 47 تعیین شد (۱۶). دوبی و همکارانش با جداسازی و تخلیص آنزیم ناتوکیناز، استرپتوکیناز و اوروکیناز از سوپرناتانت سلولی باسیلوس سابتیلیس،استرپتوکوکوس بتا همولیتیک، و ایکولای نوترکیب (دارای قطعه ژنی کوتاه DNA از سودوموناس) و کشت داده شده در محیط broth ، فعالیت ترموفیلیک، هیدروفیلیک و فعالیت قوی فیبرینولیزی را نشان دادند. دما و pH بهینه برای این سه آنزیم به ترتیب ۳۷ تا ۵۵ و ۹ ،۲۷ تا ۳۷ و ۷ تا ۵۵ و ۶ بود. وزن مولکولی آنها به ترتیب ۲۸، ۴۷ و ۳۴ کیلو دالتون بود که با ژل الکتروفورز دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید به دست آمد. فعالیت کازئینولیتیک به ترتیب ۵۷۶/۷۳U و۴۶۷/۷۳ و ۷۸۵/۷۳U تعیین شد. در صورتی که فعالیت فیبرینولیتیک به وسیله روش فیبرین پلیت به ترتیب U۵،U۱۰ و U۱۵ بود. همچنین جهش زای وابسته به زمان برای تولید آنزیم بررسی شد و نتایج منتج به این شد که تولید آنزیم وابسته به منابع کربنی، نیتروژنی، pH و دما است و در تاثیر UV، کلونی‌های UV60 و UV 90 بیشترین ناحیه هیدرولیزی ناتوکیناز را با روش کازئینولیزی داشتند (۱۷). کریمی و همکارانش که بر روی تولید استرپتوکیناز از Streptococcus eqisimilis H46A و خالص سازی آن به وسیله روش کاهش شیمیایی مطالعه کردند. در تغذیه Batch-محیط کشت، میزان تولید استرپتوکیناز بیش از دو برابر در مقایسه با -Batch محیط کشت افزایش یافت و ناخالصی‌ها به طور موثر از استرپتوکیناز با روش کاهش از هم جدا شدند (۱۸). ایمان و همکارانش فعالیت آنزیم تولیدی به وسیله روش پلیت فیبرین را بررسی کردند. به علاوه اثر pH در مقادیر مختلف و دماهای متفاوت (۵، ۲۵، ۳۵ و ۵۵ درجه سانتی-گراد) آزمایش شدند. نتایج آشکار کرد که pH بهینه ۶ و دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد هستند (۱۹). ساروادنیا و همکارانش تحقیقی جهت بررسی بر جداسازی تولید و خالص سازی استرپتوکیناز از استرپتوکوکوس پایوژن انجام دادند. نتایج مشخص کرد که غلظت ۸۰-۲۰ درصد سولفات آمونیوم نسبت به غلظت‌های ۵۰-۲۰ درصد و ۸۰-۷۰ درصد فعالیت آنزیم را تا۶۰ درصد حفظ می‌کند. همچنین در فرایند خالص سازی با -DEAE سلولاز، شستشو با NaCL ۰/۲ M نسبت به غلظت ۰/۱ M و غلظت ۰/۳M نتایج بهتری را نشان داد (۲۰). ولومانی و همکارانش در راستای تولید، تخلیص آنزیم فیبرینولیزی از باکتری‌های جدا شده از آب دریا و جدا شده در محیط کشت (Luria Bertani broth) LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت ۲۴ ساعت را بررسی کردند. فعالیت فیبرینولیزی آنزیم استخراج شده دو برابر بیشتر از فعالیت کازئینولیزی و ۱۰ برابر بیشتر از فعالیت آلبومینولیزی بود.

همچنین آنزیم بر روی گلبول‌های قرمز و بافت‌های جانوری بی تاثیر بود. باکتری با استفاده از خواص بیوشیمیایی ویبریو کامپبلی Vibrio Compbelli شناسایی شد (۲۱). مولایی و همکارانش در مطالعه‌ای تجربی، با استفاده از روش PCR، ژن استرپتوکیناز را از استرپتوکوک پیوژن تکثیر کردند. نتایج این پژوهش نشان داد پروتئین تولید شده از نظر انتی زیسیته با فرم طبیعی یکسان است. بیشترین مقدار پروتئین تولید شده در غلظت باکتری با جذب نوری ۰/۸ بود. نتایج حاکی از این است که تغییر شرایط محیط کشت می‌تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری میزبان شود.

وجود برخی عوامل غذایی از جمله گلوکز به تنهایی باعث افزایش محصول نمی‌شود، بلکه امکان دارد کاهش محصول را نیز در پی داشته باشد (۲۲, ۲۳). استرپتوکیناز ، قدیمی‌ترین و بهترین فعال کننده پلاسمینوژن است که به وسیله گونه‌های بتا همولیتیک استرپتوکوکوس تولید می‌شود. این آنزیم یک پروتئین خارج سلولی است که فاقد خاصیت پروتئازی است و سبب تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین فعال می‌شود که می-تواند فیبرین لخته را تجزیه کند. در حال حاضر استرپتوکیناز به عنوان داروی انتخابی به ویژه در کشورهای کم درآمد محسوب می‌شود.

REFERENCES

1. Basheer N, Modawi A, Elamin HB, Ibrahim HM. A Potential New Isolate for Streptokinase Production. Int J Curr Microbiol App Sci 2015;4:380-7.

2. Nejadmoghaddam MR, Modarressi MH, Babashamsi M, Chamankhah M. Cloning and Overexpression of Active Recombinant Fusion Streptokinase: A New Approach to Facilitate Purification. Pak J Biol Sci 2007;10:2146-51.

3. Chakraborty C, Agoramoorthy G. A special report on India's biotech scenario: Advancement in biopharmaceutical and health care sectors. Biotechnology advances. 2010;28:1-6.

4. Instruments BT, Winooski V. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. Bio Techniques 2007;43:178-86.

5. Ahmad Gh, Kalin J. Study of adhesion and proliferation characteristics of different populations of epidermal cells of hair follicle in culture media.

6. Anarkulli C. An Investigation of a Method for Epithelial Cell Culture in the Skin of the Albino Rabbit. J Zanjan Univ Med Sci 1998;6:28-34.

7. Golshid Jashh, Parviz, Hamid Ghazan, Mansoureh M. Transferring the Enhanced Green Florescent Protein Gene to a Calf Spermatogonium Clone Using Turbofect.

8. Soltan Dallal MM , Yazdi MH , Hassan ZM , Holakuyee M , Abedi Mohtasab TP , Aminharaty F, et al. The effect of oral administration of Lactobacillus acidophilus on enhancing the immune system's efficiency and increasing the life span of mice with breast cancer. TUMJ 2010;67:753-8.

9. Arabi R, Rohavand F, Farzin, Norouzian, Sadeghi A, Rahedian M. et al. Cloning and expression of shortened and intact streptokinase molecules in Escherichia coli and assessment of their biological activity. Agricultural Biotechnology Journal 2011;2:55-67.

10. Sasirekha C, Ramya S, Balagurunathan R. Fibrinolytic enzyme from actinomycetes. J Pharm Res 2012;5:5457.

11. Jalalirad R, Kavianpour A, Beiroti A, Sepahi M, Tavakoli Zaniani P, Arsalani F. Exploration of Recombinant Streptokinase Degradation Products Under Various pH Reduction Conditions in Downstream Processing. Recent Pat Biotechnol 2015;9:139-44.

12. Zia MA, Shahid M, Abdullah S, Faran Ge. Improved streptokinase production; uv irradiation of streptococcus equisimilis. TPMJ 2015;22:656-63.

13. Chandrasekaran SD, Vaithilingam M, Shanker R, Kumar S, Thiyur S, Babu V, et al. Exploring the in vitro thrombolytic activity of nattokinase from a New Strain Pseudomonas aeruginosa CMSS. Jundishapur J Microbiol 2015;8:e23567.

14. Bhardwaj S, Angayarkanni J. Streptokinase production from Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis SK-6 in the presence of surfactants, growth factors and trace elements. 3 Biotech 2015;5:187-93.

15. Magalhaes V, Veiga-Malta I, Almeida MR, Baptista M, Ribeiro A, Trieu-Cuot P, et al. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in Streptococcus agalactiae and enhances its virulence in a mouse model. Microbes Infect 2007;9:1276-84.

16. Babu V, Subathra Devi C. In vitro thrombolytic activity of purified streptokinase extracted from Streptococcus equinus VIT_VB2 isolated from bovine milk. J Thromb Thrombolysis 2015;39:71-8.

17. Dubey R, Kumar J, Agrawala D, Char T, Pusp P. Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources. AJOL 2011;10:1408-20.

18. Karimi Z, Babashamsi M, Asgarani E, Niakan M, Salimi A. Fermentation, fractionation and purification of streptokinase by chemical reduction method. Iran J Microbiol 2011;3:42.

19. Zalas-Wiecek P, gospodarek E, Piecyk K. Influence of subinhibitory concentrations of cefotaxime, imipenem and ciprofloxacin on adhesion of Escherichia coli strains to polystyrene. Pol J Microbiol 2011;60:345-9.

20. Alam T, Khattak YJ, Beg M, Raouf A, Azeemuddin M, Khan AA. Diagnostic accuracy of ultrasonography in differentiating benign and malignant thyroid nodules using fine needle aspiration cytology as the reference standard. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:10039-43.

21. Velumani S, Toh YX, Balasingam S, Archuleta S, Leo YS, Gan VC, et al. Low antibody titers 5 years after vaccination with the CYD-TDV dengue vaccine in both pre-immune and naive vaccinees. Hum Vaccines Immunother 2016;12:1265-73.

22. Goyal D, Sahni G, Sahoo DK. Enhanced production of recombinant streptokinase in Escherichia coli using fed-batch culture. Bioresour Technol 2009;100:4468-74.

23. Sriraman K, Jayaraman G. Enhancement of recombinant streptokinase production in Lactococcus lactis by suppression of acid tolerance response. Appl Microbiol Biotechnol 2006;72:1202-9.