

(OPEN ACCESS)

A review of the importance of leech and its saliva enzymes

Sepide Firouzbakhsh^{*1}, Mohammad Sudagar²

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sepide.firouzbakhsh_s02@gau.ac.ir
2. Professor, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar_m@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Extension Paper

Article history:

Received: 04.23.2024

Revised: 05.11.2024

Accepted: 05.26.2024

Keywords:

Bioactive compounds,
Leech,
Saliva

ABSTRACT

Leeches are from the group of Annelida ringworms. These creatures feed on blood and are known as blood-sucking creatures. Species of blood-sucking leeches in the world have been studied because they secrete saliva and these secretions are used in medical and therapeutic sciences. There are many bioactive compounds in leech saliva, including Hirudin, histamine, cholinesterase, hyaluronidase, antistatic, bedlinen, Eglin, Destabilase, acetylcholine, or glaze, Hematin, Dilantin, Decorin, Hirostatin, Pyraz enzyme, lectin, nitrogen monoxide. They are synthetase, collagenase, proteolytic enzymes, and antimicrobial agents. The use of leeches in medicine is based on these bioactive compounds. The bioactive compounds of leech have blood coagulation inhibitors and anti-inflammatory agents that can play an effective role in improving blood circulation, reducing inflammation, and accelerating healing processes. The use of leech in the treatment of various diseases, including venous disorders, complications after plastic surgery, arthritis, improving the immune system, skin diseases, varicose veins, diabetes, chronic sinusitis, ear and eye infections, reducing pain, treating diseases Arthritis and inflammatory diseases are nowadays considered as a complementary approach in modern medicine. The increase in the global value and price of leeches, especially in recent decades, is the result of a better understanding of the therapeutic potential of bioactive compounds in the saliva of these organisms. The increasing demand for natural and low-complicated treatment methods has caused the value of leeches to increase significantly in the medical field, which shows the great importance of leeches in the advancement of medical science and the treatment of diseases.

Cite this article: Firouzbakhsh, Sepide, Sudagar, Mohammad. 2025. A review of the importance of leech and its saliva enzymes. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (1), 1-20.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2024.22381.1867

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

مروری بر اهمیت زالو و آنزیم‌های حاصل از بزاق آن

سپیده فیروزبخش^{۱*}، محمد سوداگر^۲

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sepide.firouzbaksh_s02@gu.ac.ir
۲. استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sudagar_m@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- ترویجی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۴ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶ واژه‌های کلیدی: آنزیم، بزاق، زالو	زالوها از شاخه کرم‌های حلقوی Annelida هستند. این موجودات عمدتاً از خون تغذیه می‌نمایند و به عنوان موجودات خون‌خوار شناخته می‌شوند. گونه‌های زالوهای خون‌خوار در دنیا به دلیل بزاقی که ترشح می‌کنند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند که این ترشحات در علوم پزشکی و درمانی کاربرد زیادی دارند. در بزاق زالو ترکیبات فراوانی وجود دارد که شامل: هیرودین، هیستامین، کالین استراز، هیالورونیداز، آنتی‌ستاسین، بدلین، آگلین، دستابیلز، استیل کولین، اورگلاز، همتین، قیلانتین، دکورسین، هیروستاسین، آنزیم پیراز، لکتین، منوکسید نیتروژن سنتتاز، کلاژناز، آنزیم‌های پروتئولیتیک و عوامل ضد میکروبی هستند. کاربرد زالو در پزشکی، بر پایه استفاده از این ترکیبات استوار است. ترکیبات بزاق زالو، دارای مهارکننده‌های انعقاد خون و عوامل ضد التهابی هستند که در بهبود گردش خون، کاهش التهاب و تسریع فرآیندهای ترمیمی می‌توانند نقش مؤثری ایفا نمایند. استفاده از زالو در کمک به فرآیند درمان بیماری‌های مختلف، از جمله اختلالات وریدی، عوارض پس از جراحی پلاستیک، آرتروز، بهبود سیستم ایمنی، بیماری‌های پوستی، واریس، دیابت، سینوزیت‌های مزمن، عفونت‌های گوش و چشم، کاهش درد، درمان بیماری‌های مفصلی و بیماری‌های التهابی امروزه به عنوان یک رویکرد مکمل در طب مدرن مورد توجه قرار گرفته است. افزایش ارزش و قیمت جهانی زالو به ویژه در دهه‌های اخیر، نتیجه درک بهتر از پتانسیل درمانی ترکیبات موجود در بزاق این موجودات است. در واقع، تقاضای روزافزون برای روش‌های درمانی طبیعی و کم‌عارضه، سبب شده است که ارزش زالو در حوزه پزشکی به‌طور چشم‌گیری افزایش یابد که نشان‌دهنده اهمیت زیاد زالو در پیش‌برد علم پزشکی و کمک به فرآیند درمان بیماری‌ها است.

استناد: فیروزبخش، سپیده، سوداگر، محمد (۱۴۰۴). مروری بر اهمیت زالو و آنزیم‌های حاصل از بزاق آن. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۱)، ۱-۲۰.

DOI: 10.22069/japu.2024.22381.1867



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

زالوها موجوداتی هستند که به دلیل مکیدن و تغذیه از خون میزبان، از جمله انسان و حیوانات شناخته شده‌اند. در دو انتهای بدن زالو بادکش وجود دارد که یکی از این بادکش‌ها در انتهای قدامی بدن قرار گرفته است؛ دهان زالو نیز در این قسمت قابل مشاهده است که از آن برای گزش و ایجاد زخم کوچک برای دسترسی به جریان خون و مکیدن خون میزبان استفاده می‌گردد (شکل ۱). بادکش دیگر در انتهای خلفی بدن زالو قرار گرفته است و به عنوان نقطه اتصال زالو به بدن میزبان برای ثبات در زمان تغذیه کاربرد دارد (۱). زالوهایی که از ترشحات آن‌ها در درمان انسان استفاده می‌گردد *Hirudo medicinalis*، *Hirudo verbana* و *Hirudo orientalis* را می‌توان نام برد. این گونه‌های زالو در زیررده *Arhynchobdellida* قرار گرفته‌اند و دارای ویژگی‌هایی هستند که آن‌ها را برای استفاده در علوم پزشکی و درمانی مناسب می‌سازد. پرورش و استفاده از این زالوها تحت شرایط کنترل شده و بهداشتی انجام می‌گیرد تا اطمینان حاصل شود که از نظر پزشکی ایمن و مؤثر هستند (۲). بزاق زالو که در هنگام فرآیند تغذیه وارد خون میزبان می‌شود، دارای ترکیبات متعددی است. این ترکیبات می‌توانند از منابع طبیعی مانند: گیاهان، حیوانات و یا میکروارگانیسم‌ها و یا در نتیجه سنتز شیمیایی تولید گردند (۳). آن‌ها در دوزهای کم، می‌توانند اثرات قابل توجهی بر سلامتی میزبان داشته باشند و در بسیاری از موارد به عنوان بخشی از درمان دارویی یا به عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شوند (۴). این ترکیبات به تقویت سیستم ایمنی، بهبود سلامت قلب، کاهش التهاب، محافظت در برابر بیماری‌های مزمن و تقویت سلامت کلی بدن کمک می‌کنند (۵). به طور کلی این ترکیبات از طریق مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند عمل کنند. برخی از آن‌ها ممکن است با گیرنده‌های خاصی در سلول‌های

هدف اتصال برقرار کرده و به این ترتیب، مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی را تحریک و یا مهار نمایند (۶). دیگر ترکیبات ممکن است به طور مستقیم با آنزیم‌ها و یا پروتئین‌ها تداخل کرده، فرایندهای متابولیکی را تغییر دهند یا از آسیب‌های سلولی جلوگیری نمایند. همچنین، برخی دیگر از این ترکیبات می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و گروهی نیز ممکن است خواص ضد میکروبی یا ضد التهابی داشته باشند (۷). معروف ترین ترکیب زیست فعال موجود در بزاق زالو هیرودین^۱ نام دارد. هیرودین موجود در بزاق زالو از انعقاد خون جلوگیری می‌کند. زالوها از مکانیسم‌های دیگر ضد انعقاد خون نیز برخوردار هستند؛ بزاق زالوهای *Hirudo medicinalis* دارای پلاسمای مهارکننده کالیکرین^۲ و شامل دستابیلز^۳ است. کالیکرین بزاق زالو نقش مهمی در فرایندهای انعقادی و ضد انعقادی در بدن میزبان ایفا می‌کند (۸). دستابیلز با تجزیه ایزوپتیدیهای متقاطع در فیبرین لخته‌های خون، به حل کردن لخته‌های خون کمک می‌کند، این فرایند، امکان تداوم جریان خون را به زالو می‌دهد و از انعقاد خون در محل گزش جلوگیری می‌کند. از جمله آنزیم دیگر در بزاق زالوها آنتی ستاسین^۴ است (۴). این ماده نیز یک مهارکننده قوی فرایند انعقاد خون است و به زالو این امکان را می‌دهد که مدت زمان طولانی‌تری از خون میزبان تغذیه نماید. بعد از یافتن آنتی‌ستاسین، ترکیب دیگری از آن به نام هیروستاسین^۵ نیز یافت شد (۹). علاوه بر این، مواد ضد انعقادی در بزاق زالوها، حاوی مهارکننده‌های تجمع پلاکتی هستند. ترکیبی مانند آپیراز^۶ که ADP و ATP را به AMP هیدرولیز می‌کنند و به شدت تجمع

1- Hirudin

2- Kallikrein

3- Destabilase

4- Antistasin

5- Hirustasin

6- Apyrase

است (۱۱). اهمیت زالو در درمان بیماری‌ها از گذشته شناخته شده است و در سال‌های اخیر، به لطف پیشرفت‌های علمی، مجدداً مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات موجود در بزاق زالو پتانسیل درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها را دارا می‌باشد. زالو درمانی به عنوان یک درمان جایگزین یا مکمل برای برخی از افراد که به روش‌های درمانی پاسخ نمی‌دهند در حال افزایش است. زالوها به‌ویژه *Hirudo medicinalis* به دلیل آنزیم‌های موجود در بزاق، در درمان و بهبود شرایط گوناگون در پزشکی کاربرد دارند (۲).

پلاکتی ناشی از ADP را مهار می‌نمایند. هم‌چنین یک کلاژناز نیز از بزاق زالوها شناسایی شد که کلاژن تیپ ۱ را از پوست گوساله هیدرولیز می‌کند (۴). کلاژن تیپ ۱ پروتئینی است که نقش مهمی در حفظ استحکام، انعطاف‌پذیری و ساختار بافت‌های مختلف بدن ایفا می‌نماید. پروتئینی به نام کالین^۱ نیز از بزاق زالو کشف شد (۱۰). مطالعات دیگری وجود هیالورونیداز^۲ که یک عامل نفوذپذیری به بافت‌ها است و هم‌چنین بدلین^۳ و اگلین^۴ را در بزاق زالو بررسی کردند. وجود تمام این ترکیبات در بزاق، زالو را به موجودی مفید برای صنعت پزشکی تبدیل کرده



شکل ۱- بادکش قدامی و بادکش انتهایی زالو.

Figure 1. Anterior and posterior suckers of a leech.

آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین خون را آزاد نمایند. با رویکرد گفته شده در بالا، زالو می‌تواند از هجوم لکوسیت‌ها به منطقه گزش جلوگیری کرده و در یک مدت زمان طولانی به تغذیه از میزبان بپردازد (۱۱). این یکی از دلایل مهم برای استفاده از بزاق زالو در صنعت پزشکی است. بزاق زالو دارای ترکیبات متعددی است که به آن‌ها اجازه می‌دهد خون میزبان خود را مکیده و فرآیند خون‌خواری را بهینه کنند. در این قسمت به تفکیک به ترکیبات موجود در بزاق زالو خواهیم پرداخت (۳).

نحوه عملکرد بزاق زالو: ترکیباتی مانند هیالورونیداز و کلاژناز که از بزاق زالو ترشح می‌شوند کمک می‌کنند تا بافت بدن میزبان در هنگام گزش توسط زالو باز شود. در ادامه این مورد، زالوها مکانیسم تکامل‌یافته‌ای برای کنترل فرآیند ضدانعقادی میزبان دارند (۱۲). که این کار را از طریق جلوگیری از درد در منطقه گزش برای میزبان، کاهش التهاب موضعی و هم‌چنین تولید مواد ضدانعقادی خون و مواد منبسط‌کننده عروق خونی انجام می‌دهند (۴). هر گونه استرس ناشی از گزش زالوها موجب ایجاد پاسخ التهابی در بدن میزبان می‌شود که این امر سبب هجوم لکوسیت‌ها به منطقه گزش خواهد شد (۱۳). هجوم لکوسیت‌ها به منطقه موجب می‌شود که آن‌ها

1- Calin
2- Hyaluronidase
3- Bdelin
4- Eglin

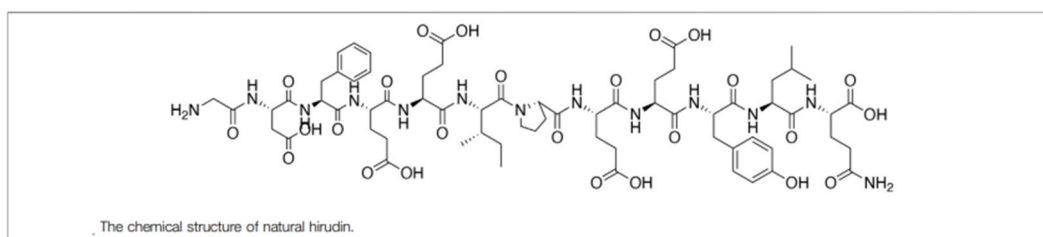
هیرودین: هیرودین، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در بزاق زالو است (شکل ۲). هیرودین یک پپتید طبیعی است که از ۶۵ اسیدامینه با وزن مولکولی حدود ۷ کیلو دالتون، تشکیل شده است که ترکیب و توالی این اسیدهای آمینه با توجه به گونه زالو می‌تواند متفاوت باشد اما عملکرد اصلی آن یعنی مهار ترومبین در همه یکسان است (۱۴). هیرودین برای اولین بار در اوایل سال ۱۸۸۴ یافت شد، زمانی که هایکرفت، داروشناس اتریشی، دریافت که عصاره به دست آمده از *Hirudo medicinalis* دارای مواد ضدانعقاد است (۱۵). در سال ۱۹۵۵، مارکوارد با موفقیت هیرودین نسبتاً خالص را از غدد بزاقی *Hirudo medicinalis* به دست آورد، که به‌طور گسترده‌ای راه‌گشای پژوهش‌های مهارکننده‌های ترومبین بود (۱۶). در سال ۱۹۸۴، دات و همکاران، توالی کامل اسیدامینه هیرودین را بررسی کردند. هیرودین به عنوان یک مهارکننده قوی فعالیت آنزیم ترومبین، نقش کلیدی در فرآیند انعقاد خون دارد (۱۳). توالی اسیدهای آمینه در هیرودین به آن‌ها اجازه می‌دهند تا به جایگاه فعال ترومبین متصل شده و فعالیت آن را مهار کنند بدون این که به راحتی از آن جدا شوند. این خاصیت به دلیل وجود سه جفت پیوند دی سولفید در هیرودین است (Cys6-Cys14, Cys16-Cys28, Cys32-Cys39) که موجب می‌شود، این ساختار با قسمت فعال ترومبین جفت شده و پیوند مستحکمی را تشکیل دهند (۱۷). علاوه بر این، توالی ویژه Pro-Lys-Pro در وسط زنجیره پپتیدی قرار دارد، که نه تنها موجب استحکام و ثبات هیرودین می‌گردد بلکه موجب ایجاد پیوند دقیق بین هیرودین و ترومبین خواهد شد. ترومبین آنزیمی است که در تبدیل فیبرینوژن به فیبرین، ماده اصلی تشکیل‌دهنده لخته‌های خونی نقش دارد (۱۸). هم‌چنین، فیبرینوژن یک پروتئین حل‌شدنی در پلاسمای خون است که توسط کبد تولید می‌گردد (شکل ۳). این

پروتئین در فرایند انعقاد خون نقش دارد و پیش‌ساز فیبرین است. این خاصیت مهار ترومبین، برای زالوها در فرآیند خون‌خواری بسیار مهم است زیرا هیرودین باعث می‌شود خون میزبان در طول مدت خون‌خواری لخته نشود، که این امر به زالو اجازه می‌دهد به تغذیه از خون تازه و روان ادامه دهد (۱۹). هیرودین با جلوگیری از تشکیل لخته‌های خون، خطر انسداد در مجاری زالو را در هنگام خون‌خواری کاهش می‌دهد؛ هم‌چنین هیرودین با انبساط ماهیچه‌های صاف جدار عروق خونی، سبب گشادی عروق و افزایش جریان خون می‌گردد (۲۰). هیرودین از خاصیت بی‌حس‌کنندگی نیز برخوردار است؛ بنابراین پس از چسبیدن زالو و ترشح بزاق، منطقه گزش بی‌حس می‌گردد و احساس سوزش نیش زالو از بین خواهد رفت (۲۱). علاوه بر کاربردهای طبیعی در فرآیند خون‌خواری زالوها، هیرودین به دلیل خواص ضدانعقادی خود و مهار ترومبین در پزشکی مدرن مورد توجه قرار گرفته است (۱۸). این ترکیب در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی که با لخته‌های خون مرتبط هستند، مانند ترومبوز واریسی، کمک به ترمیم زخم، دیابت، کاربرد در جراحی قلب و عروق، خون‌ریزی مغزی و تومور استفاده می‌گردد و به عنوان یک داروی ضدانعقادی در برخی موارد دیگر پزشکی می‌توان از آن استفاده نمود (۲۲). هم‌چنین، هیرودین می‌تواند حساسیت سلول‌ها به انسولین را افزایش داده و در نتیجه جذب گلوکز را افزایش دهد. هیرودین، و در برخی موارد هیرودین متصل شده با ترکیب پلی‌اتیلن گلیکول^۱ در بسیاری از روش‌های درمانی کاربرد دارد (۳). هیرودین مؤثرتر از هپارین برای جلوگیری از شکل گرفتن لخته خون در عروق ترومبوزیس بعد از عمل جراحی تعویض مفصل ران عمل می‌نماید. PEG-هیرودین، به عنوان یک ماده ضد انعقاد در بیماران دیالیزی و در مراحل

انتهایی بیماری کلوی کاربرد دارد (۲۳). این ماده با اثر ضد انعقادی در فواصل جلسات دیالیز، مانع از به وجود آمدن عوارض تشکیل لخته خون در عروق می‌گردد (۲۴). با توجه به مزایای گفته شده برای هیروودین و استفاده از آن در علوم پزشکی، استفاده از هیروودین طبیعی می‌تواند دارای معایب نیز باشد که از آن جمله می‌توان به هزینه بالا، نیمه عمر کوتاه و سهل بودن ایجاد خونریزی اشاره نمود. به دلایل گفته شده در بالا، استفاده از هیروودین طبیعی می‌تواند کم‌تر از میزان مورد انتظار در علوم پزشکی باشد (۲۵). در حال حاضر، اصلاح ساختاری هیروودین و سیستم استفاده هدفمند دارویی مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته است؛ که برای حل معضلات گفته شده در بالا مفید خواهد بود (۸). امروزه هیروودین با کمک مهندسی ژنتیک و تکنولوژی DNA به صورت نو ترکیب تولید می‌گردد. پس از دهه‌ها مطالعه و پیشرفت، چندین مشتق از هیروودین به دست آمد که برای درمان بیماری‌های ترومبینی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ مانند: لپیرودین^۱، دسیروودین^۲ و بیوالیروودین^۳ (۳). لپیرودین یک پلی‌پپتید ۶۵ تایی با وزن مولکولی ۶۹۷۹/۵ KDa است که جایگاه اتصال فعال، محل اتصال فیبرینوژن آزاد و لخته ترومبینی را مستقیماً می‌تواند مهار کند. لپیرودین، اولین ممانعت‌کننده مستقیم ترومبین مورد تأیید FDA در سال ۱۹۹۸، برای جلوگیری از انعقاد در بیماران دچار کاهش پلاکت به دلیل تأثیر هپارین و سندرم کاهش پلاکت هپارین و ترومبوزیس حیات می‌باشد؛ زیرا این بیماران حساس به هپارین هستند (۲۶). لپیرودین یکی از جایگزین‌های مشابه هیروودین و در دسترس بیمارانی که دچار بای پس قلبی-ریوی هستند می‌باشد. لپیرودین به دو قسمت از ترومبین متصل می‌شود و

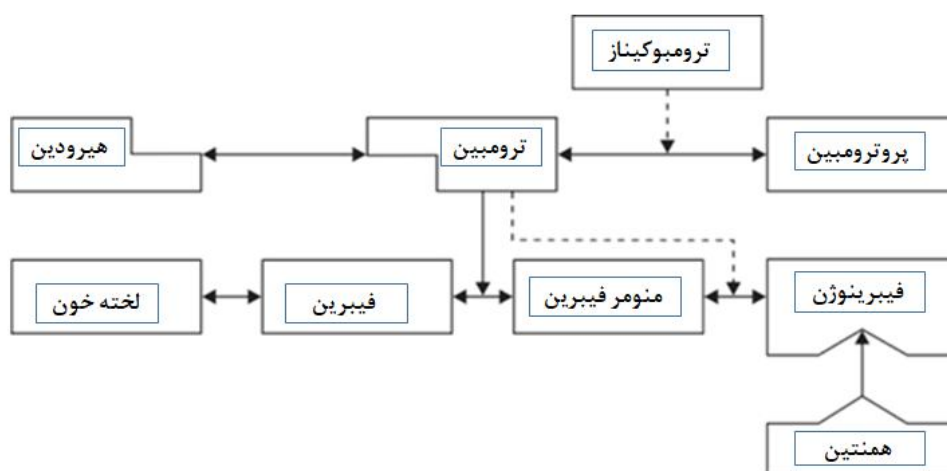
اتصال غیرقابل بازگشت ترومبین-لپیرودین تشکیل شده و در نهایت این ترکیب از طریق ادرار دفع می‌گردد (۲۳). لپیرودین پتانسیل بالا و اثر ممانعت‌کنندگی مستقیم، بر ترومبین آزاد و ترومبین متصل به لخته را دارا می‌باشد (۲۱). به‌طور کلی برتری لپیرودین، تأثیر آنی، نیمه عمر نسبتاً کوتاه و عدم ایجاد واکنش‌های حساسیتی ویژه برهم‌کنش با آنتی‌بادی‌های تحریک‌شونده با هپارین می‌باشد. همچنین، دسیروودین یک مهارکننده مستقیم ترومبین است که دارای اسیدامینه مشابه توالی لپیرودین است فقط در اسیدامینه اول تا دوم در انتهای توالی اسیدامینه تفاوت دارند. توالی اسیدامینه لپیرودین در محل اتصال به ترومبین، Lue1-Thr2 می‌باشد در حالی که در دسیروودین، Val1-Val2 است (۲۵). علاوه بر این دو مورد، آنالوگ دیگر هیروودین به نام بیوالیروودین، یک پلی‌پپتید مصنوعی با وزن مولکولی ۲۱۸۰ است که تجمع پلاکت را می‌تواند مهار کند اما واکنش پلاکتی را افزایش نمی‌دهد (۴). اتصال بین بیوالیروودین و ترومبین به‌طور فزاینده‌ای برگشت‌پذیر است؛ که دلیل اصلی آن پیوند پپتیدی بین Arg3-Pro4 می‌باشد که به راحتی توسط ترومبین شکسته می‌شود. بیوالیروودین برخلاف هیروودین یک ممانعت‌کنندگی کوتاه‌مدت با ترومبین به وجود می‌آورد. از بیوالیروودین نیز به دلیل کارایی بالا در درمان سکته و روش‌های بای پس قلبی-ریوی استفاده می‌گردد (۲۳). از هیروودین نو ترکیب در آنژیوپلاستی کرونری، درمان ترومبوزیس عروق خونی و به عنوان جایگزین هپارین در بیماران حساس به هپارین می‌توان استفاده نمود (۱۳).

1- Lepirudin
2- Desirudin
3- Bivalirudin



شکل ۲- ساختار شیمیایی هیرودین (۳۲).

Figure 2. Chemical structure of hirudin (32).



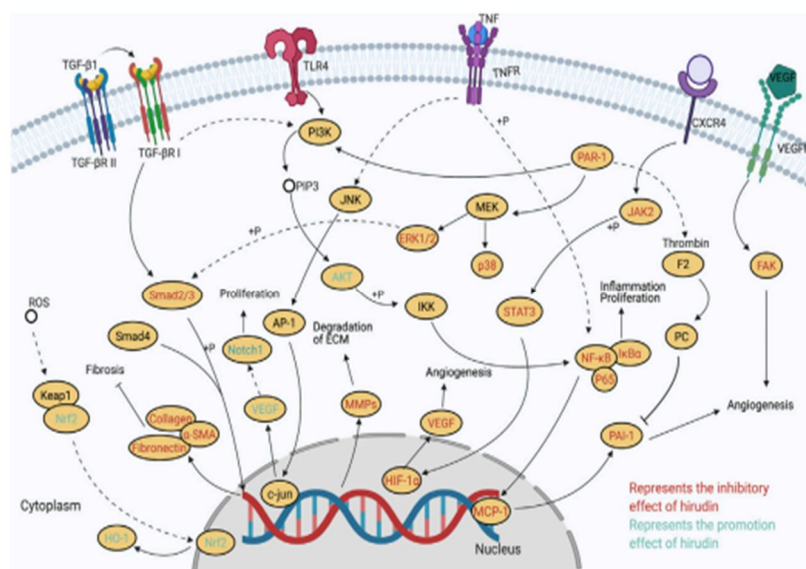
شکل ۳- نقش هیرودین در انعقاد خون (۵۳).

Figure 3. The role of hirudin in blood coagulation (53).

عوامل شبه هیرودین: اخیراً عوامل شبه هیرودین^۱ که دارای ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابه هیرودین هستند، به عنوان زیرگروه ترکیبات مشتق شده از غدد بزاقی زالو در نظر گرفته می‌شوند (۳). مولر و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که یک ساختار انتهایی N مشابه که حاوی بقایای اسید آمینه آب‌گریز است در موقعیت‌های ۱ و ۳ همه HLF ها وجود دارد (۱۴). به علاوه، بررسی‌ها نشان داد که با توجه به جزئیات ساختار ژن حفظ شده، هیرودین‌ها ممکن است عوامل شبه هیرودین منحصربه‌فردی برای ترومبین داشته باشند. تاکنون هشت شبه هیرودین شامل: HLF1, HLF2, HLF3, HLF4, HLF5, HLF6, HLF7 و HLF8 در زالو شناسایی شده است. در میان آن‌ها فقط HLF5 و HLF8 فعالیت ضدانعقادی از خود نشان داده اند (۲۷). اما فعالیت مهارکنندگی آن‌ها بسیار کم‌تر از هیرودین است. این نتایج نشان داد که انتهای N و C و همچنین قسمت‌های کروی مرکزی برای هیرودین و شبه هیرودین برای عملکرد فعالیت ضدترومبینی بسیار مهم است (۶). عوامل شبه‌هیرودین نیز مانند هیرودین دارای خواص ضدالتهابی، ضدانعقادی، ضددرد، ضدتومور است و از لخته شدن خون، تخریب بافت‌ها، غضروف‌ها و عضلات جلوگیری می‌نمایند (۸).

عوامل شبه هیرودین: اخیراً عوامل شبه هیرودین^۱ که دارای ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابه هیرودین هستند، به عنوان زیرگروه ترکیبات مشتق شده از غدد بزاقی زالو در نظر گرفته می‌شوند (۳). مولر و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که یک ساختار انتهایی N مشابه که حاوی بقایای اسید آمینه آب‌گریز است در موقعیت‌های ۱ و ۳ همه HLF ها وجود دارد (۱۴). به علاوه، بررسی‌ها نشان داد که با توجه به جزئیات ساختار ژن حفظ شده، هیرودین‌ها ممکن است عوامل شبه هیرودین منحصربه‌فردی برای ترومبین داشته باشند. تاکنون هشت شبه هیرودین شامل: HLF1, HLF2, HLF3, HLF4, HLF5, HLF6, HLF7 و HLF8 در زالو شناسایی شده است. در میان آن‌ها فقط HLF5 و HLF8 فعالیت ضدانعقادی از خود نشان داده اند (۲۷). اما فعالیت مهارکنندگی آن‌ها بسیار کم‌تر از هیرودین است. این نتایج نشان داد که انتهای N و C و همچنین قسمت‌های کروی مرکزی برای هیرودین و شبه هیرودین برای عملکرد فعالیت ضدترومبینی بسیار مهم است (۶). عوامل شبه‌هیرودین نیز مانند هیرودین دارای خواص ضدالتهابی، ضدانعقادی، ضددرد، ضدتومور است و از لخته شدن خون، تخریب بافت‌ها، غضروف‌ها و عضلات جلوگیری می‌نمایند (۸).

1- HLF



شکل ۴- مسیرهای مولکولی درگیر در فعالیت های دارویی هیرودین (۳۲).

Figure 4. Molecular pathways involved in the pharmacological activities of hirudin (32).

می‌کند و این فرآیند، تغذیه زالو را تسهیل می‌نماید. موارد گفته شده کمک می‌کنند که زالوها بتوانند به‌طور مؤثرتری از خون میزبان تغذیه کنند (۲۸ و ۲۹). همچنین، واکنش‌های منطقه‌ای ناشی از هیستامین می‌تواند منجر به قرمزی و تورم در محل گزش گردد. در پزشکی، هیستامین به‌خاطر نقش‌های مختلف بیولوژیکی، از جمله در واکنش‌های التهابی و آلرژیک، شناخته شده است (۳).

هیستامین^۱: هیستامین‌ها موادی هستند که باعث گشاد شدن رگ‌های خونی می‌شوند و جریان خون را به‌سمت ناحیه گزیدگی افزایش می‌دهند که این امر به زالو اجازه می‌دهد به راحتی و به میزان بیشتری از خون تغذیه نماید (شکل ۵) (۱۱). هیستامین هم‌چنین ممکن است به افزایش نفوذپذیری مویرگ‌ها کمک کند، به این صورت که به خروج مایعات و دیگر مولکول‌ها از درون رگ‌ها به بافت اطراف کمک

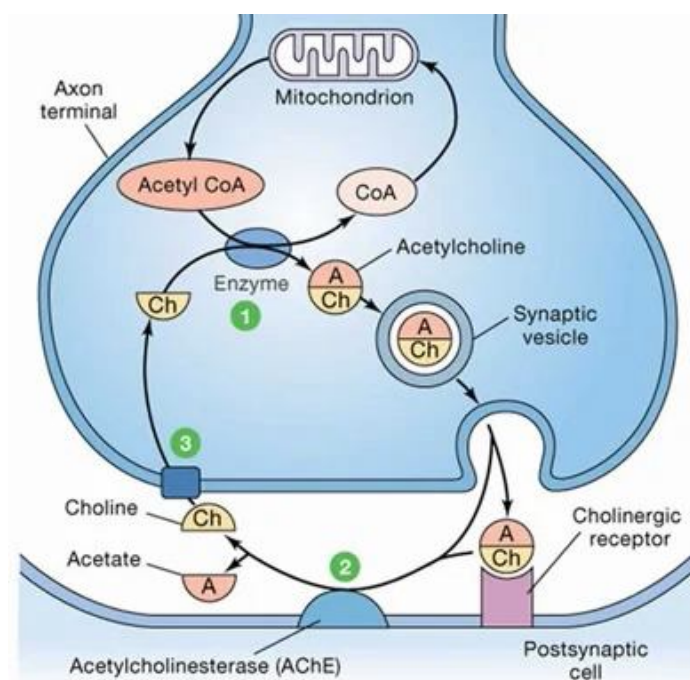


شکل ۵- ساختار هیستامین.

Figure 5. Structure of histamine.

ماده شیمیایی که در انتقال پیام‌های عصبی نقش دارد، عمل می‌کند (شکل ۶). با کاهش سطوح استیل کولین در محل گزش، انتقال پیام‌های عصبی مربوط به احساس درد و ناراحتی کاهش می‌یابد (۳۰). این امر به زالو کمک می‌کند تا برای مدت زمان طولانی‌تری به خون‌خواری خود ادامه دهد، بدون آن‌که میزبان متوجه حضور آن شود یا واکنش نشان دهد (۳۱).

کالین^۱: کالین استراز آنزیمی است که در فرآیند انتقال پیام‌های عصبی نقش دارد و در کاهش فعالیت عضلانی میزبان می‌تواند به زالو کمک نماید. در واقع برای کاهش احساس درد و ناراحتی در میزبان هنگام گزش کاربرد دارد (۲۴). با این کار، زالو می‌تواند به‌طور مؤثرتری تغذیه کند، زیرا میزبان کمتر احساس ناراحتی کرده و کمتر به گزش واکنش نشان می‌دهد (۶). کالین استراز معمولاً با شکستن استیل کولین، یک



شکل ۶- کالین استراز.

Figure 6. Cholinesterase.

(۲۴). از دیگر خواص این اسیدامینه نقش ضدالتهابی و مسکن بودن آن است. به این صورت که به عنوان یک مهارکننده طبیعی آنزیم‌های پروستوگلاندینی که مسئول ایجاد درد و التهاب هستند عمل می‌کند و در نتیجه به کاهش درد و التهاب در منطقه گزش توسط زالو، کمک خواهند کرد (۳۳).

استیل کولین^۲: استیل کولین نوعی استیل است که به شکل آنزیم اسیدامینه‌ای وجود دارد که به‌عنوان نوروتنسمیتر نقش مهمی در سیستم عصبی و هضمی زالو ایفا می‌نماید. استیل کولین مسئول انتقال پیام‌های عصبی بین سلول‌های عصبی است (۳۲). همچنین، این اسیدامینه در بزاق زالو می‌تواند خواص ضدباکتریایی داشته باشد که در پاک‌سازی مواد غذایی و جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی مفید می‌باشند

1- Calin
2- Acetylcholine

آنتی‌ستاسین: آنتی‌ستاسین یکی دیگر از ترکیبات موجود در بزاق زالو می‌باشد که به‌عنوان یک مهارکننده قوی در فرآیند انعقاد خون عمل می‌نماید (۳۴). این پروتئین با مهار فاکتورهای خونی که در فرآیند انعقاد نقش دارند، از تشکیل لخته خون در محل گزش جلوگیری می‌کند. علاوه بر کمک به تغذیه زالو، وجود آنتی‌ستاسین در بزاق زالوها می‌تواند پتانسیل درمانی داشته باشد (۲۵). این پروتئین یک مهارکننده قوی فاکتور انعقادی Xa یک پروتئاز سرین است. پروتئاز سرین دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که با هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در پروتئین‌ها عمل می‌نمایند. این پروتئاز، آنتی‌ستاسین را می‌شکند و یک توالی ۱۰ کیلو دالتون تولید می‌کند (۳۵). بنابراین وجود آنتی‌ستاسین خون میزبان را در حالت مایع نگه می‌دارد. کاربردهای پزشکی آنتی‌ستاسین به نقش آن به‌عنوان یک ضدانعقاد محدود نمی‌شود زیرا توانایی آن در مهار پروتئازهای سرین نیز برای جلوگیری از گسترش تومورها، احتمالاً با کاهش احتمال متاستاز، نشان داده شده است (۳۲). پژوهش‌های آکادمیک در زمینه آنتی‌ستاسین و دیگر مهارکننده‌های انعقادی موجود در بزاق زالو به درک بهتر مکانیسم‌های بیولوژیکی که این موجودات برای تغذیه خود استفاده می‌کنند کمک کرده و هم چنین می‌تواند به کشف راه‌کارهای درمانی نوین برای انسان منجر گردد (۳۶).

اورگل‌لاز^۱: اورگل‌لاز آنزیمی با اثرات ضدالتهابی و ترمیمی است که در بزاق زالو یافت می‌شود. اورگل‌لاز از خانواده گلیکوزیدازها است که با هیدرولیز اسید هیالورونیک، پیوندهای بین مولکول‌های آن شکسته شده و به این ترتیب نفوذپذیری بافت‌ها افزایش خواهد یافت (۲۶). اورگل‌لاز با مهار سنتز پروستاگلاندین‌ها، لکوترین‌ها و سایر مولکول‌های التهابی، به کاهش درد و تورم کمک خواهد کرد. مطالعات نشان داده‌اند که اورگل‌لاز می‌تواند در درمان بیماری‌های التهابی مانند

1- Orgalase

آرتروز، روماتیسم مفصلی و پسوریازیس مؤثر باشد (۳۷). هم‌چنین، اورگل‌لاز با تحریک تولید کلاژن و الاستین^۲، به ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده کمک می‌نماید. کلاژن و الاستین دو پروتئین مهم هستند که در ساختار پوست یافت می‌شوند. هر دو پروتئین به حفظ استحکام، انعطاف‌پذیری و جوانی پوست کمک می‌نمایند (۳۳). بنابراین، آنزیم اورگل‌لاز می‌تواند در درمان زخم و سوختگی، ترمیم غضروف و بهبودی بعد از عمل جراحی مؤثر باشد.

همنتین^۳: این ترکیب به‌عنوان آپروتینین شناخته می‌شود. آپروتینین، مهارکننده پروتئاز است و از لخته شدن خون جلوگیری می‌نماید. همنتین، با مهار پروتئازهای خاص، به‌ویژه کالیکرین، تریپسین و پلاسمین، عمل می‌کند (۳۸). این امر به‌طور مستقیم بر مسیرهای انعقاد خون و فیبرینولیز تأثیر می‌گذارد و از لخته شدن خون جلوگیری می‌کند. بنابراین، همنتین به‌عنوان یک ضدانعقاد قوی شناخته می‌شود که می‌تواند به‌طور مؤثری از لخته شدن خون جلوگیری نماید (۳). در مقایسه با سایر داروهای ضدانعقاد، عوارض جانبی کم‌تری دارد. همنتین در جراحی، سکنه مغزی، بیماری‌های قلبی عروقی کاربرد دارد. هم‌چنین، همنتین در درمان برخی از بیماری‌های التهابی و خودایمنی مانند آرتریت روماتوئید، بیماری‌های پوستی و در درمان برخی از انواع سرطان، مانند سرطان پروستات و سرطان پستان، مؤثر می‌باشد (۲۱). پژوهش‌های جدید در حال بررسی کاربردهای جدید همنتین در درمان بیماری‌های مختلف، از جمله آلزایمر، پارکینسون و بیماری‌های خودایمنی است (۳۲).

قیلان‌تین^۴: قیلانتین، آنزیمی است که از بزاق زالو استخراج می‌شود. این آنزیم دارای اثرات ضدالتهابی و ضد درد قوی می‌باشد. قیلانتین با مهار چندین پروتئاز التهابی، از جمله فسفولیپاز A2، سیکلواکسیژناز

2- Elastin
3- Hementin
4- Ghilanten

(COX)^۱ و لیپوکسیژناز (LOX)^۲ به کاهش التهاب و درد کمک می‌نمایند. این آنزیم‌ها در متابولیسم اسید آراشیدونیک نقش دارند (۳۲). نقش فسفولیپاز A2 در شکستن فسفولیپیدها و تبدیل آن به اسید آراشیدونیک است که پیش‌ماده‌ای برای پیام‌رسان‌های ثانویه مانند پروستاگلاندین، لکوترین و لیپوکسین‌ها می‌باشد که در فرایندهای درد، التهاب، انقباض عضلات صاف و تجمع پلاکتی نقش دارند (۴۰). سیکلواکسیژنازها نیز در پاسخ به محرک‌های التهابی مانند سایتوکین‌ها آزاد می‌شوند و اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین تبدیل می‌نمایند. این مولکول‌ها در فرایندهای انعقاد خون، التهاب، درد، تب و تنظیم دمای بدن نقش دارند (۴۱). لیپواکسیژناز نیز اسید آراشیدونیک را به لکوترین^۳ و لیپوکسین تبدیل می‌نمایند که این مولکول‌ها در التهاب، آلرژی، تصلب شرایین و مرگ سلولی نقش دارند. مهار این پروتئازها توسط قیلانتین صورت می‌گیرد که در نتیجه می‌تواند درد ناشی از آرتریت، آرتروز و سایر بیماری‌های التهابی را تسکین دهد (۳۳). همچنین، قیلانتین می‌تواند به‌طور مؤثری موجب کاهش درد، تورم و التهاب مفاصل در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید گردد. هم‌چنین، این آنزیم به تسکین دردهای عضلانی و مفصلی ناشی از آسیب‌های ورزشی، کشیدگی عضلات و سایر بیماری‌ها کمک می‌نماید (۲۶).

دکورسین^۴: دکورسین، به عنوان آنزیم ضد التهاب و ضد درد از بزاق زالو شناخته می‌شود و از عملکردهای آن، ممانعت از فعالیت گلیکوپروتئین‌ها است. دکورسین با اتصال به گلیکوپروتئین‌های خاص، از فعالیت آن‌ها در فرایندهای مختلف سلولی و فیزیولوژیکی جلوگیری می‌کند (۲۴). برخی از گلیکوپروتئین‌هایی که دکورسین می‌تواند مهار کند عبارتند از: PDGF، VEGF و

MMP. دکورسین با مهار PDGF، از تکثیر سلول‌های عضلانی صاف و تشکیل پلاکت در عروق خونی جلوگیری می‌کند. با مهار VEGF، از رشد و تکثیر رگ‌های خونی جدید جلوگیری می‌کند (۳۳). این امر می‌تواند در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های چشمی مفید باشد. هم‌چنین، دکورسین با مهار MMP، از تخریب ماتریکس خارج سلولی و غضروف جلوگیری می‌کند. این امر می‌تواند در درمان آرتروز و سایر بیماری‌های مفصلی مفید باشد.

هیروستاسین: هیروستاسین، یک آنزیم ضدانعقاد خون است که از بزاق زالو استخراج می‌گردد. علاوه بر مهار ترومبین، هیروستاسین به عنوان یک بازدارنده قوی برای چندین پروتئاز کلیدی دیگر، از جمله کاتپسین G، کالیکرین بافتی، تریپسین و کیموتریپسین نیز شناخته می‌شود. اهمیت مهار این پروتئازها نقش مهمی در علوم پزشکی دارد (۲۳). از جمله کاتپسین G در التهاب، تهاجم تومور و مرگ سلولی نقش دارد که به درمان بیماری‌های مختلف مانند آرتریت روماتوئید، بیماری التهابی روده و پسوریازیس می‌تواند کمک نماید (۴۲). کالیکرین بافتی در فعال شدن سیستم کینین و ایجاد التهاب نقش دارد. بنابراین، مهار آن در جلوگیری از رشد و گسترش تومورها کمک می‌نماید. تریپسین و کیموتریپسین در هضم پروتئین‌ها و فعال شدن سایر پروتئازها نقش دارند (۳۷). بنابراین، به تنظیم هضم پروتئین‌ها و جلوگیری از آسیب به مخاط روده و در درمان زخم معده، زخم اثنی عشر و بیماری کرون کمک می‌نمایند (۲۲).

بدلین: بدلین‌ها ترکیباتی هستند که خاصیت ضدالتهابی و ضدترومبینی دارند و به کاهش تورم و قرمزی در ناحیه گزیدگی کمک می‌نمایند. بدلین‌ها آنزیم‌های مهارکننده پروتئازها مانند تریپسین، کیموتریپسین یا پلاسمین هستند که از فاکتورهای تورم بافت می‌باشند. بدلین‌ها اثر ضدترومبوتیک دارند، آن‌ها توانایی کاهش میزان لخته شدن خون را دارا می‌باشند (۳). در واقع،

- 1- Cyclooxygenase
- 2- Lipoxigenase
- 3- Leukotriene
- 4- Decorsin

آن‌ها قادر به مهار فعالیت ترومبین و سایر عوامل انعقادی هستند. برخی از بدلین‌ها ممکن است اثر بیهوشی نیز داشته باشند، که به کاهش میزان درد در محل گزش زالو کمک خواهند نمود و گیرنده‌های درد را تحت تأثیر قرار خواهند داد (۳۲). هم‌چنین، بدلین‌ها می‌توانند بر جریان خون در محل گزش تأثیر بگذارند و به گشاد شدن رگ‌های خونی و بهبود جریان خون در ناحیه گزش کمک نمایند (۲۵). بدلین‌ها به‌طور کلی از نظر بیولوژیکی برای بدن انسان بی‌خطر معرفی شده و استفاده از آن‌ها در پزشکی کاربرد دارد. هم‌چنین، بدلین خاصیت ضد تورم و ضدالتهاب دارد و در اکثر بیماری‌هایی که ریشه تورمی مثل روماتیسم مفاصل، تورم مفاصل، تورم مغز یا حتی تورم عضلات دارند، موجب کمک به فرایند درمان و کنترل این بیماری‌ها می‌گردند (۳۳).

اگلین: اگلین‌ها که در بزاق زالوها یافت می‌شوند، گروهی از پروتئین‌ها هستند که خاصیت ضدالتهابی دارند. اگلین‌ها برای اولین بار در فرآورده‌های تجاری هیرودین همراه با بدلین‌ها شناسایی شدند. اگلین‌ها وزن مولکولی کم دارند. آن‌ها توانایی مهار آلفاکیموتریپسین^۱، ساب تلیسین^۲ و پروتئازهای خشی گرانولوسیت‌هایی مانند الاستاز^۳ و کاتپسین^۴ را دارند (۴۳). این ترکیبات به کاهش التهاب و تورم در ناحیه گزیدگی کمک می‌کنند؛ در واقع این ترکیبات، می‌توانند به زالو اجازه دهند برای مدت زمان طولانی‌تری بدون تحریک شدید پوست میزبان از خون آن تغذیه کند (۴۴). هم‌چنین، این خاصیت ضدالتهابی می‌تواند به کاهش واکنش ایمنی میزبان در برابر گزش کمک نماید. یکی از ویژگی‌های این پروتئین‌ها عدم وجود پیوندهای دی سولفیدی و باقی‌مانده‌های متیونین، ایزولوسین و تریپتوفان است

- 1- Alpha-Chymotrypsin
- 2- Subtilisin
- 3- Elastase
- 4- Cathepsin

(۲۱). این ساختار منحصر به فرد آن‌ها را در میان پروتئین‌ها برجسته می‌کند. اگلین‌ها، به همراه سایر ترکیبات موجود در بزاق زالو، به تسهیل فرآیند خون‌خواری کمک کرده و هم‌چنین در کاربردهای پزشکی مدرن، به‌عنوان بخشی از درمان‌های خاص مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۲). به عنوان مثال، خواص ضدالتهابی آن‌ها می‌تواند در درمان بیماری‌هایی که با التهاب مرتبط هستند، مفید باشد. اگلین‌ها به میزان قابل‌توجهی به کاهش التهاب پس از عمل جراحی و مشکلات آندوتلیوم روده‌ای به‌خصوص در بیماری کرون کمک می‌نمایند. هم‌چنین، اگلین‌ها مانع از تشکیل لخته به دنبال سپتی سمی در خون می‌گردند (۲۴).

دستابیلاز^۵: آنزیم دیگر موجود در بزاق زالو دستابیلاز است، این آنزیم با توانایی تجزیه فیبرین که یکی از اجزا اصلی لخته خون است، به کاهش خطر ترومبوز و بهبود جریان خون کمک می‌کند. در واقع این آنزیم با تبدیل دیمرهای فیبرین به مونمر، منجر به تجزیه لخته‌های خون در محل گزش می‌شود (۸). این فرآیند زمینه‌ساز یک محیط انعقادی پایدار و جلوگیری از تشکیل لخته در محل گزیدگی توسط زالو است. پژوهش‌ها روی دستابیلاز نشان‌دهنده پتانسیل بالقوه آن در توسعه استراتژی‌های درمانی نوین برای مدیریت و درمان اختلالات انعقادی و افزایش خطر ترومبوز است (۳۲). هم‌چنین، این آنزیم در بهبود گردش خون و تسریع روند ترمیم زخم در بیمارانی که دچار آسیب‌های عروقی شده‌اند می‌تواند مفید باشد (۴۵). در پاکسازی محل تجمع پلاکت و گرفتگی قوی عمل می‌نماید. منجر به حل شدن لخته‌های خونی تشکیل شده در عروق و اعصاب می‌شود؛ بنابراین در درمان سکته‌های مغزی، قلبی و فلج‌های ناشی از آن‌ها می‌تواند مؤثر باشد. هم‌چنین دستابیلاز در ترمیم زخم‌های مزمن مانند زخم‌های دیابتی، زخم بستر و سوختگی‌ها مؤثر هستند (۲۶).

- 5- Destabilase

آپیراز^۱: در بزاق زالو آنزیم آپیراز یافت می‌شود، که نقش مهمی در تسهیل فرآیند خون‌گیری زالو از طریق جلوگیری از انعقاد خون دارد. این آنزیم موجب مهار تجمع پلاکت‌ها می‌گردد، که از تشکیل لخته خون جلوگیری کرده و به زالو اجازه می‌دهد تا برای مدت زمان طولانی‌تری از خون میزبان تغذیه نماید. آنزیم آپیراز، هیدرولیزکننده نوکلئوتید است که در بسیاری از بافت‌های زیستی یافت می‌شود (۲۴). این آنزیم ADP و ATP را به AMP تبدیل می‌کند و در نتیجه با مهار تجمع پلاکت‌ها از تشکیل لخته خون ممانعت به عمل می‌آورد. این فرایند نه تنها برای تغذیه زالو اهمیت دارد بلکه در پزشکی نیز کاربردهای بالقوه‌ای دارد (۳۷). پژوهش‌ها روی آپیراز به دنبال استفاده از خواص ضدانعقادی و ضدالتهابی آن برای توسعه درمان‌های جدید برای بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات انعقادی، تسریع فرایند بهبودی پس از جراحی و شرایط التهابی هستند (۸). علاوه براین، درک مکانیسم عملکرد آنزیم آپیراز و توسعه راهبردهای درمانی جدید می‌تواند به بهبود مدیریت عملکرد پلاکت‌ها و جلوگیری از انعقاد خون کمک نماید (۳۳).

لکتین^۲: در بزاق زالو، لکتین‌ها از طریق فرآیندی در سلول‌های غدد بزاقی تولید می‌شوند. لکتین‌های تولید شده در سلول‌های غدد بزاقی، از طریق غشا سلولی به داخل مجرای بزاقی ترشح می‌شوند (۸). لکتین‌ها با اتصال به پلاکت‌های خون، از لخته شدن خون جلوگیری می‌نمایند. این خاصیت، زالو را قادر می‌سازد تا بدون ایجاد لخته، از خون میزبان خود تغذیه کند (۴۱). لکتین‌ها با مهار فعالیت برخی از مولکول‌های التهابی، به کاهش التهاب و درد کمک می‌کنند. همچنین، این آنزیم‌ها با اتصال به میکروب‌ها، می‌توانند از رشد و تکثیر آن‌ها جلوگیری نمایند.

لکتین‌ها با تحریک سیستم ایمنی بدن، به مبارزه با عفونت‌ها کمک می‌کنند (۴۶). نوع زالو، شرایط محیطی و سن زالوها بر میزان تولید لکتین توسط زالو تأثیرگذار هستند. لکتین‌های بزاق زالو در کمک به فرایند درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتروز، زخم‌های دیابتی، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۷).

منوکسید نیتروژن سنتتاز: منوکسید نیتروژن یک مولکول سیگنال‌دهنده کوچک است که نقش‌های گسترده‌ای در بدن دارد، از جمله: در تنظیم گشادی عروق، پاسخ‌های ایمنی، عملکرد عصبی و ترمیم اعصاب نقش دارد. این آنزیم مسئول تولید منوکسید نیتروژن از آرژنین است. آرژنین یک اسیدآمینه است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی نقش دارد (۳). وجود آنزیم منوکسید نیتروژن سنتتاز در بزاق زالو به تسهیل جریان خون میزبان کمک کرده تا با کاهش التهاب، افزایش گردش خون در محل گزش به وجود آید (۲۱). در نتیجه این امر موجب تغذیه طولانی‌تر زالو از خون میزبان می‌گردد. این مکانیسم در پزشکی مدرن به‌ویژه در زمینه‌هایی مانند: ترمیم زخم و درمان بیماری‌های گردش خون می‌تواند کاربرد داشته باشد (۸).

هیالورونیداز: این آنزیم در بزاق زالو موجب افزایش نفوذپذیری بافت‌ها می‌شود. با تجزیه هیالورونیک اسید، هیالورونیداز باعث می‌شود بافت‌ها نرم‌تر و انعطاف‌پذیرتر شوند، که این امر به نفوذ بهتر دیگر مواد موجود در بزاق زالو و همچنین داروها به بافت‌های آسیب‌دیده کمک می‌نماید (۴۷). هیالورونیک اسید یک ماده گلیکوزامینوگلیکان^۳ است که در ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شود و نقش مهمی در حفظ آب و نرمی بافت‌ها دارد. با کاهش غلظت و سفتی ماتریکس خارج سلولی، هیالورونیداز می‌تواند

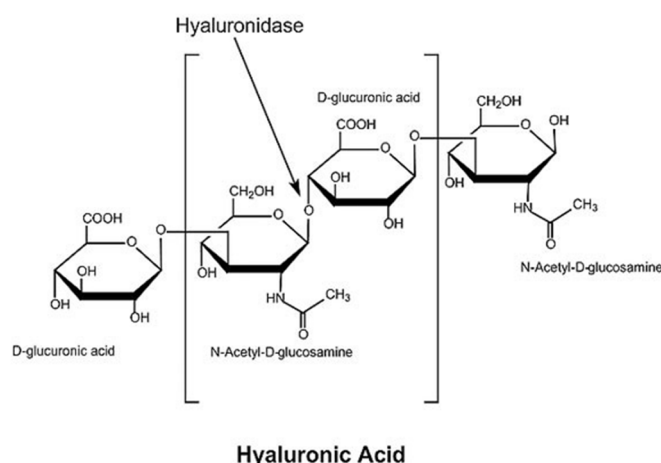
1- Apyrase

2- Lectin

3- Glycosaminoglycans

به‌ویژه در زمینه‌های پزشکی مانند جراحی پلاستیک و کمک به درمان زخم‌ها مورد توجه قرار گرفته است (شکل ۷).

به کاهش تورم و تسریع فرآیند ترمیم زخم کمک کند (۳۰). بنابراین، هیالورونیداز در بزاق زالو به عنوان یک مؤلفه مهم در اثرات درمانی زالو، مانند بهبود جریان خون و کاهش تورم عمل می‌کند (۴۸). این خاصیت،



شکل ۷- ساختار هیالورونیداز.

Figure 7. Structure of hyaluronidase.

این‌رو به حفظ خون میزبان در حالت روان و جلوگیری از لخته شدن آن کمک می‌نمایند. همچنین این آنزیم‌ها ممکن است به تجزیه موانع بافتی و پروتئین‌های محافظتی پوست کمک کنند، که این امر می‌تواند به نفوذ بهتر زالو به درون بافت‌های میزبان کمک نماید (۲۳). کلاژنازاها ممکن است خاصیت ضدالتهابی داشته باشند و به کاهش التهاب و تسکین درد در محل گزیدگی نیز کمک کنند. از این ویژگی در کاهش درد و التهاب در مفاصل افراد مبتلا به آرتروز می‌توان بهره برد (۳۰).

الاستاز: یکی دیگر از آنزیم‌های پروتئولیتیک بزاق زالو الاستاز می‌باشد که این آنزیم توانایی تجزیه الاستین را دارند. الاستاز به هضم پروتئین‌های موجود در خون میزبان کمک می‌نماید و به زالو اجازه می‌دهد تا مواد مغذی را جذب کند (۳). از عملکردهای دیگر

کلاژناز: کلاژنازاها یکی از آنزیم‌های پروتئولیتیک در بزاق زالو می‌باشند که کلاژن را تجزیه کرده و نقش مهمی در فرآیند خون‌خواری این موجودات دارند. کلاژن یک پروتئین است که در تمام بافت‌های بدن یافت می‌شود و به استحکام و انعطاف‌پذیری آن‌ها کمک می‌نماید (۳۷). کلاژنازاها در زالو چندین عملکرد دارند، آن‌ها به ترمیم زخم‌ها و بازسازی بافت‌ها کمک می‌نمایند. از این ویژگی کلاژناز در درمان می‌توان بهره برد؛ در واقع، کلاژنازاها با تحریک تولید کلاژن جدید، به کاهش چین و چروک و خطوط ریز و همچنین در بهبود ظاهر اسکارهای پوستی می‌توانند کمک نمایند (۴۹). یکی دیگر از عملکردهای آن‌ها، نقش در تسهیل جریان خون است (۵۰). آنزیم‌های پروتئولیتیک به تجزیه پروتئین‌هایی که در فرآیند انعقاد خون نقش دارند کمک می‌کنند، از

می‌نمایند (۲۷). محافظت از محیط زخم یکی دیگر از عملکردهای فاکتورهای ضد میکروبی است. این عمل به حفظ یک محیط سالم در اطراف محل گزش کمک می‌کند، که این مسئله برای ادامه فرآیند خون‌خواری مؤثر است (۵۱). این فاکتورهای ضد میکروبی نشان‌دهنده تطبیق‌پذیری زالوها با محیط‌هایی است که ممکن است حاوی تعداد زیادی میکروارگانیسم مضر باشند و به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به‌طور مؤثرتری تغذیه کنند بدون این‌که خود یا میزبان‌شان در معرض خطر عفونت قرار گیرند. این خواص ضد میکروبی در بزاق زالوها هم‌چنین می‌تواند برای کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گیرد، به ویژه در زمینه‌هایی که کنترل عفونت‌ها مهم است (۵۲).

نتیجه‌گیری

استفاده از آنزیم‌های موجود در بزاق زالو در علوم پزشکی و درمان نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده است. ترکیبات موجود در بزاق زالو شامل موادی مانند هیرویدین، دستایلاز، کالین استراز، هیالورونیداز، هیستامین، اگلین‌ها، بدلین‌ها، مهارکننده‌های پروتئاز و مواد دیگری هستند که باعث افزایش اهمیت زالو در علوم پزشکی و درمانی شده است (۳۰). این ترکیبات موجب جلوگیری از لخته شدن خون، افزایش جریان خون، کاهش التهاب و تورم، تسریع ترمیم زخم، خواص ضد میکروبی، کاهش درد و عملکردهای دیگری در زالو می‌شوند و به فرآیند خون‌خواری زالو از بدن میزبان کمک می‌نمایند (۴۱). بزاق زالو به‌عنوان یک ماده پیچیده عمل می‌کند که می‌تواند در زمینه‌های مختلف پزشکی، از جمله درمان بیماری‌های وریدی، دیابت، آرتروز، بهبود سیستم ایمنی، عوارض پس از جراحی پلاستیک و بیماری‌های پوستی مفید باشد (۲۰). به همین دلیل، زالو درمانی یک رویکرد جالب و قدرتمند در پزشکی مدرن است که پتانسیل دارد

این آنزیم، جلوگیری از لخته شدن خون است. الاستاز با تجزیه فیبرین، از لخته شدن خون جلوگیری می‌کند و به زالو اجازه می‌دهد تا به مدت طولانی‌تر از خون میزبان تغذیه نماید. الاستاز با تجزیه الاستین تخریب شده، به ترمیم زخم‌ها و بازسازی بافت‌ها کمک می‌کند (۴۱). هم‌چنین این آنزیم با مهار سایتوکین‌های التهابی، التهاب را کاهش داده و به بهبود زخم‌ها کمک می‌نماید. الاستاز با مهار برادی‌کینین^۱، درد را کاهش می‌دهد و به بهبود زخم‌ها کمک می‌نماید (۸). برادی‌کینین یک پپتید فعال زیستی می‌باشد که با تحریک آزاد شدن هیستامین و سایر مواد التهابی موجب التهاب می‌گردد. دیگر عملکرد الاستازها این است که توانایی تجزیه باکتری‌ها و قارچ‌ها را دارند و به جلوگیری از عفونت زخم‌ها کمک می‌نمایند. در واقع، الاستازها نقش ضد میکروبی نیز در بزاق زالو ایفا می‌نمایند (۳۰). آنزیم الاستاز در کمک به روند درمان زخم‌های مزمن مانند زخم‌های دیابتی، زخم‌های بستر و سوختگی‌ها مؤثر است. هم‌چنین الاستاز با کاهش التهاب و درد مفاصل در افراد مبتلا به آرتروز، به بهبود کیفیت زندگی آن‌ها کمک می‌نماید. در جراحی پلاستیک برای ترمیم بافت‌ها و کاهش اسکارها و هم‌چنین در تولید داروهای ضد التهابی، ضددرد و ضد میکروب از الاستاز استفاده می‌گردد (۳۳).

فاکتورهای ضد میکروبی: فاکتورهای ضد میکروبی در بزاق زالو عملکردهای مهمی در حفاظت از زالو و میزبان در طول فرآیند خون‌خواری دارند. فاکتورهای ضد میکروبی به جلوگیری از رشد باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های مضر در ناحیه گزش کمک می‌کنند، که این امر از بروز عفونت در زخم ناشی از گزش جلوگیری می‌کند (۴۳). هم‌چنین این ترکیبات به حفاظت از خود زالو در برابر عفونت‌های احتمالی ناشی از میکروب‌های موجود در خون میزبان کمک

به‌عنوان یک ابزار مکمل در کنار درمان‌های سنتی مورد استفاده قرار گیرد (۵۳). با این‌حال، برای فهم دقیق‌تر عملکرد و کاربردهای این ترکیبات، به پژوهش‌های بیش‌تری نیاز است.

چالش‌ها و ملاحظات

استفاده از زالوها در علوم پزشکی و درمان، با وجود پتانسیل بالقوه‌اش در بهبود جریان خون و کاهش التهاب با چالش‌ها و ملاحظات متعددی همراه است که نیازمند توجه دقیق علمی و اخلاقی است. یکی از چالش‌های اصلی استفاده از زالو در درمان، خطر بروز عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های موجود در بزاق زالو است. این میکروارگانیسم‌ها

می‌توانند موجب عفونت‌های موضعی یا سیستمیک شوند (۵۴). بنابراین، استریل‌سازی مناسب و مراقبت‌های پس از درمان از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین برخی افراد ممکن است به ترکیبات موجود در بزاق زالو واکنش حساسیتی نشان دهند؛ در نتیجه، نیاز به نظارت و مداخله پزشکی است. هم‌چنین، با توجه به افزایش تقاضا برای استفاده از زالوها در پزشکی مدرن، به فشار بر جمعیت طبیعی زالو می‌تواند منجر شود (۵۵). حفاظت از گونه‌ها و تضمین دسترسی پایدار به زالو برای استفاده درمانی مستلزم برنامه‌ریزی و مدیریت دقیق است.

منابع

1. Dong, H., Ren, J. X., Wang, J. J., Ding, L. S., Zhao, J. J., Liu, S. Y., & Gao, H. M. (2016). Chinese Medicinal Leech: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2016, 7895935. <https://doi.org/10.1155/2016/7895935>.
2. Sudagar, M., & Kalateh Jari, P. (2018). An overview of the optimum breeding conditions of medical leeches (*Hirudo* spp). *Journal of Caspian Sea Aquatics*, 3 (2017), 45-54.
3. Müller, C., Lukas, P., Böhmert, M., & Hildebrandt, J. P. (2020). Hirudin or hirudin-like factor - that is the question: insights from the analyses of natural and synthetic HLF variants. *FEBS letters*, 594 (5), 841-850. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13683>.
4. Hildebrandt, J. P., & Lemke, S. (2011). Small bite, large impact-saliva, and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Die Naturwissenschaften*, 98 (12), 995-1008. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0859-z>.
5. Sudagar, M., & Firouzbakhsh, S. (2024). The role of *Aeromonas* bacteria in the digestive system of leeches. In "1" international conference of innovative aquaculture. ICIA 2024-40. Gorgan, Iran.
6. Doreen, A., Wüstenhagen, Lukas, P., Müller, C., Aubele, S. A., Hildebrandt, J. P., & Kubick, S. (2020). Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w.
7. Vázquez-Reyes, S., Velázquez-Villegas, L. A., Vargas-Castillo, A., Noriega, L. G., Torres, N., & Tovar, A. R. (2021). Dietary bioactive compounds as modulators of mitochondrial function. *The Journal of nutritional biochemistry*, 96, 108768. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108768>.
8. Bobrovsky, P., Manuvera, V., Baskova, I., Nemirova, S., Medvedev, A., & Lazarev, V. (2021). Recombinant Destabilase from *Hirudo medicinalis* is able to Dissolve Human Blood Clots in Vitro. *Current issues in molecular biology*, 43 (3), 2068-2081. <https://doi.org/10.3390/cimb43030143>.

9. Baskova, I. P., Khalil, S. M., Nartikova, V. F., & Paskhina, T. S. (1992). Inhibition of plasma kallikrein. Kininase and kinin-like activities of preparations from the medicinal leeches. *Thrombosis research*, 67 (6), 721-30.
10. Ohta, N., Brush, M., & Jacobs, J. W. (1994). Interaction of Antistasin-Related Peptides with Factor Xa: Identification of a Core Inhibitory Sequence. *Thrombosis and Haemostasis*, 72, 825-830.
11. Sivachandran, P., Heera, R., Lalitha, P., Ravichandran, M., Sivadasan, S., & Marimuthu, K. (2015). An overview of leech and its therapeutic applications.
12. Deckmyn, H., Stassen, J. M., Vreys, I., Van Houtte, E., Sawyer, R. T., & Vermeylen, J. (1995). Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of platelet adhesion to collagen, prevents platelet-rich thrombosis in hamsters. *Blood*, 85 (3), 712-719.
13. Eldor, A., Orevi, M., & Rigbi, M. (1996). The role of the leech in medical therapeutics. *Blood reviews*, 10 (4), 201-209. [https://doi.org/10.1016/s0268-960x\(96\)90000-4](https://doi.org/10.1016/s0268-960x(96)90000-4).
14. Müller, C., Haase, M., Lemke, S., & Hildebrandt, J. P. (2017). Hirudins and hirudin-like factors in Hirudinidae: implications for function and phylogenetic relationships. *Parasitology research*, 116 (1), 313-325. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5294-9>.
15. Mammen, E. F. (1983). Seminars in Thrombosis and Hemostasis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 9 (1), 1-72. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004999>.
16. Fields, W. S. (1991). The history of leeching and hirudin. *Haemostasis*, 21 (1), 3-10. <https://doi.org/10.1159/000216256>.
17. Nowak, G. (2002). Pharmacology of recombinant hirudin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 28 (5), 415-424. <https://doi.org/10.1055/s-2002-35293>.
18. Wüstenhagen, D. A., Lukas, P., Müller, C., Aubele, S. A., Hildebrandt, J. P., & Kubick, S. (2020). Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. *Scientific reports*, 10 (1), 19818. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w>.
19. Electricwala, A., Hartwell, R., Scawen, M. D., & Atkinson, T. (1993). The complete amino acid sequence of a hirudin variant from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Journal of protein chemistry*, 12 (3), 365-370. <https://doi.org/10.1007/BF01028198>.
20. Bidmal, H., Sudagar, M., & Shakouri, M. (1401). Effect of camel and frog blood on sexual maturity, survival and production rate of cocoon and larvae in eastern leeches. (*Hirudo orientalis*) *Journal: Aquaculture Development (Life Sciences)*. 16 (1), 42-33.
21. Cherniack, E. P. (2011). Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 16 (1), 50-58.
22. Lu, Z., Shi, P., You, H., Liu, Y., & Chen, S. (2018). Transcriptomic analysis of the salivary gland of medicinal leech *Hirudo nipponia*. *PLOS ONE*. 13 (10), e0205875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205875>.
23. Vitin, A. A., Dembo, G., Vater, Y., Martay, K., Azamfirei, L., & Ezri, T. (2008). Anesthetic implications of the new anticoagulant and antiplatelet drugs. *Journal of Clinical Anesthesia*, 20 (3), 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2007.10.013>.
24. Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind. Res. J. Pharm. Sci.* 1 (1), 34.
25. Alaama, M., Kucuk, O., Bilir, B., Merzouk, A., Ghawi, A. M., Yerer, M. B., Ahmado, M. A., Abdualkader, A. M., & Helaluddin, A. (2024). Development of Leech Extract as a Therapeutic Agent: A Chronological Review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*.
26. Lukas, P., Melikian, G., Hildebrandt, J. P., & Müller, C. (2022). Make it double: identification and characterization

- of a Tandem-Hirudin from the Asian medicinal leech *Hirudinaria manillensis*. *Parasitology research*, 121 (10), 2995-3006. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07634-0>.
27. Lukas, P., Wolf, R., Rauch, B. H., Hildebrandt, J. P., & Müller, C. (2019). Hirudins of the Asian medicinal leech, *Hirudinaria manillensis*: same, but different. *Parasitology research*, 118 (7), 2223-2233. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06365-z>.
28. Singh, A. P. (2010). Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complementary therapies in clinical practice*, 16 (4), 213-215. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005>.
29. Baskova, I. P., Ferner, Z., Balkina, A. S., Kozin, S. A., Kharitonova, O. V., Zavalova, L. L., & Zgoda, V. G. (2008). Steroids, histamine, and serotonin in the medicinal leech salivary gland secretion. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2, 215-225.
30. Lemke, S., & Vilcinskas, A. (2020). European Medicinal Leeches-New Roles in Modern Medicine. *Biomedicines*, 8 (5), 99. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050099>.
31. Graftskaia, E. N., Pavlova, E. R., Babenko, V. V., Latsis, I. A., Malakhova, M., Lavrenova, V. N., Bashkirov, P. V., Belousov, D. M., Klinov, D. V., & Lazarev, V. N. (2020). The *Hirudo Medicinalis* Microbiome Is a Source of New Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
32. Junren, C., Xiaofang, X., Huiqiong, Z., Gangmin, L., Yanpeng, Y., Xiaoyu, C., Yuqing, G., Yanan, L., Yue, Z., Fu, P., & Cheng, P. (2021). Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review. *Frontiers in pharmacology*, 12, 660757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.660757>.
33. Grassberger, M., Sherman, R. A., Gileva, O., Kim, C. M., & Mumcuoglu, K. Y. (2013). Biotherapy - History, Principles and Practice.
34. Tuszyński, G. P., Gasic, T. B., & Gasic, G. J. (1987). Isolation and characterization of antistatin. An inhibitor of metastasis and coagulation. *The Journal of biological chemistry*, 262 (20), 9718-9723.
35. Yan, A., Ren, C., Chen, T., Jiang, X., Sun, H., & Hu, C. (2016). Identification and functional characterization of a novel antistatin/ WAP-like serine protease inhibitor from the tropical sea cucumber, *Stichopus monotuberculatus*. *Fish & shellfish immunology*, 59, 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.038>.
36. Iwama, R. E., Tessler, M., Siddall, M. E., & Kvist, S. (2021). The Origin and Evolution of Antistatin-like Proteins in Leeches (Hirudinida, Clitellata). *Genome biology and evolution*, 13 (1), evaa242. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa242>.
37. Kvist, S., Manzano-Marín, A., de Carle, D., Trontelj, P., & Siddall, M. E. (2020). Draft genome of the European medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Annelida, Clitellata, Hirudiniiformes) with emphasis on anticoagulants. *Scientific reports*, 10 (1), 9885. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66749-5>.
38. Kornowski, R., Eldor, A., Werber, M. M., Ezov, N., Zwang, E., Nimrod, A., Chernine, A., Finkelstein, A., Panet, A., Laniado, S., & Keren, G. (1996). Enhancement of recombinant tissue-type plasminogen activator thrombolysis with a selective factor Xa inhibitor derived from the leech *Hirudo medicinalis*: comparison with heparin and hirudin in a rabbit thrombosis model. *Coronary artery disease*, 7 (12), 903-909. <https://doi.org/10.1097/00019501-199612000-00005>.
39. Feiden, T., Valduga, E., Zeni, J., & Steffens, J. (2023). Bioactive Compounds from Artichoke and Application Potential. *Food technology and biotechnology*, 61 (3), 312-327. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.03.23.8038>.
40. Baskova, I. P., & Zavalova, L. L. (2001). Proteinase inhibitors from the

- medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66 (7), 703-714. <https://doi.org/10.1023/a:1010223325313>.
41. Babenko, V. V., Podgorny, O. V., Manuvera, V. A., Kasianov, A. S., Manolov, A. I., Graftskaia, E. N., Shirokov, D. A., Kurdyumov, A. S., Vinogradov, D. V., Nikitina, A. S., Kovalchuk, S. I., Anikanov, N. A., Butenko, I. O., Pobeguts, O. V., Matyushkina, D. S., Rakitina, D. V., Kostyukova, E. S., Zgoda, V. G., Baskova, I. P., Trukhan, V. M., & Lazarev, V. N. (2020). Correction to: Draft genome sequences of *Hirudo medicinalis* and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches. *BMC genomics*, 21 (1), 503. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06897-0>.
42. Min, G. S., Sarkar, I. N., & Siddall, M. E. (2010). Salivary transcriptome of the North American medicinal leech, *Macrobdella decora*. *The Journal of parasitology*, 96 (6), 1211-1221. <https://doi.org/10.1645/GE-2496.1>.
43. Herlin, C., Bertheuil, N., Bekara, F., Boissiere, F., Sinna, R., & Chaput, B. (2017). Leech therapy in flap salvage: Systematic review and practical recommendations. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*, 62 (2), e1-e13. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2016.06.004>.
44. Sig, A. K., Guney, M., Uskudar Guclu, A., & Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy-an overall perspective. *Integrative medicine research*, 6 (4), 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001>.
45. Marin, E., Kornilov, D. A., Bukhdruker, S. S., Aleksenko, V. A., Manuvera, V. A., Zinovev, E. V., Kovalev, K. V., Shevtsov, M. B., Talyzina, A. A., Bobrovsky, P. A., Kuzmichev, P. K., Mishin, A. V., Gushchin, I. Y., Lazarev, V. N., & Borshchevskiy, V. I. (2023). Structural insights into thrombolytic activity of destabilase from the medicinal leech. *Scientific reports*, 13 (1), 6641. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32459-x>.
46. De Filippis, V., Acquasaliente, L., Pontarollo, G., & Peterle, D. (2018). Noncoded amino acids in protein engineering: Structure-activity relationship studies of hirudin-thrombin interaction. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65 (1), 69-80. <https://doi.org/10.1002/bab.1632>.
47. Maltz, M., & Graf, J. (2011). The type II secretion system is essential for erythrocyte lysis and gut colonization by the leech digestive tract symbiont *Aeromonas veronii*. *Applied and environmental microbiology*, 77 (2), 597-603. <https://doi.org/10.1128/AEM.01621-10>.
48. Zhang, J., & Lan, N. (2018). Hirudin variants production by genetic engineered microbial factories. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 34 (2), 261-280. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1506898>.
49. Abdualkader, A. M., Merzouk, A., Ghawi, A. M., & Alaama, A. (2011). Some Biological Activities of Malaysian Leech Saliva Extract. *IJUM Engineering Journal*, 12.
50. Munro, R., Jones, C. P., & Sawyer, R. T. (1991). Calin--a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 2 (1), 179-184. <https://doi.org/10.1097/00001721-199102000-00027>.
51. Verriere, B., Sabatier, B., Carbonnelle, E., Mainardi, J. L., Prognon, P., Whitaker, I., Lantieri, L., & Hivelin, M. (2016). Medicinal leech therapy and *Aeromonas* spp. infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 35 (6), 1001-1006. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2629-5>.

52. Firouzbakhsh, S., & Sudagar, M. (2024). Factors affecting cannibalism in leeches. In "1" international conference of innovative aquaculture. ICIA 2024-50. Gorgan, Iran.
53. Elyassi, A. R., Terres, J., & Rowshan, H. H. (2013). Medicinal leech therapy on head and neck patients: a review of literature and proposed protocol. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 116 (3), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2011.12.020>.
54. Sudagar, M., & Firouzbakhsh, S. 2024. Hexamita parasite and its effects on leech mortality. In "1" international conference of innovative aquaculture. ICIA 2024-41. Gorgan, Iran.
55. Bidmal, H., & Sudagar, M. (2020). Effect of two water environments - moss and peat moss soil on cocoon count, cocoon weight, and number of eastern leeches losses (*Hirudo orientalis*). *Journal of Animal Physiology and Development*, 51 Vol., 13 No., 4 Autumn, 99, 39-48.