

## دارای رتبه علمی- پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

### اثر $\alpha$ -لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیک زهر خام افعی لبتینای ایران

#### زهره آموزگاری

مری بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

#### سمانه صالحی پور باورصاد

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

#### مژگان نوربهبانی

کارشناس آزمایشگاه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

#### نویسنده مسئول: زهره آموزگاری

پست الکترونیک: Zamoozgari277@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۶۳۱۱۸۶۳۵

آدرس: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۹۳/۲/۲۱

ویرایش پایانی: ۹۳/۴/۱۳

پذیرش: ۹۳/۴/۱۷

#### چکیده

**زمینه و هدف:** زهر مارها مخلوطی از عناصر سمی و آنزیم ها می باشند. زهر مارها دارای عواملی هستند که قادر به لیز غشا های سلولی و زیر سلولی می باشند، بنابراین قادر به همولیز گلبول های قرمز حیوانات مختلف از جمله انسان می باشند. دو نوع فعالیت همولیتیک، مستقیم و غیر مستقیم در زهر مارها وجود دارد. فسفولیپاز A2 به عنوان ماده مسئول لیز غیرمستقیم شناخته شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر  $\alpha$ -لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیکی زهر افعی لبتینای ایران می باشد.

**روش بررسی:** غلظت پروتئین زهر خام افعی لبتینا با استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت همولیتیک مستقیم زهر با استفاده از گلبول های قرمز انسان (RBC) و فعالیت همولیتیک غیر مستقیم روی RBC در حضور زرده ی تخم مرغ انجام شد. سپس  $\alpha$ -لیپوئیک اسید با غلظت های متفاوت در بافر تریس - HCL ۱۰۰ میلی مولار به کار برده شد و اثر آن روی همولیز گلبول های قرمز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** فعالیت همولیتیک مستقیم زهر روی RBC انسان مشاهده نشد اما فعالیت همولیتیک غیرمستقیم وجود داشت به طوری که این فعالیت با افزودن غلظت های مختلف  $\alpha$ -لیپوئیک اسید افزایش یافت. درصد همولیز غیرمستقیم در حضور  $\alpha$ -لیپوئیک اسید ۶۰ میکرومولار تا ۶۰ درصد افزایش یافت.

**نتیجه گیری:**  $\alpha$ -لیپوئیک اسید نه تنها فاقد اثرات مهارکنندگی روی فعالیت همولیتیک زهر افعی لبتینای ایران بود بلکه اثرات مثبت روی این فعالیت داشت.

**واژه های کلیدی:** زهر افعی لبتینای ایران، همولیتیک مستقیم، همولیتیک غیرمستقیم،  $\alpha$ -لیپوئیک اسید، فسفولیپاز A2

#### آدرس مقاله

آموزگاری ز، صالحی پور باورصاد س، نوربهبانی م " اثر  $\alpha$ -لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیک زهر خام افعی لبتینای ایران " مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۷۵-۷۰

رادیکال‌های آزاد محلول در آب و محلول در چربی می‌باشد.  $\alpha$ -لیپوئیک اسید به عنوان یک ضد التهاب عمل می‌کند که مکانیسم ملکولی آن هنوز شناخته نشده است. همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که  $\alpha$ -لیپوئیک اسید مهارکننده ی برخی از فسفولیپازهای A2 می‌باشد که می‌تواند برخی از اثرات آنها را مهار کند (۶). هدف از این مطالعه پاسخ به این سؤال است که با توجه به این که مسئول همولیتیک غیرمستقیم در زهر افعی لبتینای ایران فسفولیپاز A2 می‌باشد و از طرفی چون  $\alpha$ -لیپوئیک اسید مهارکننده ی این آنزیم می‌باشد آیا در حضور  $\alpha$ -لیپوئیک اسید اثرات همولیتیک این زهر کاهش می‌یابد؟

### روش بررسی

زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفیلزده اهدایی مؤسسه تحقیقاتی رازی بود،  $\alpha$ -لیپوئیک اسید ساخت شرکت Sigma، فسفات منوسودیک، فسفات دی سودیک، کلرید کلسیم، تریس، سولفات مس متبلور ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ )، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، کربنات سدیم، سود، آلومین سرم گاوی ساخت شرکت مرک بودند. معرف فولین سیوکالتو از ترکیب تنگستات سدیم، مولیدات سدیم، اسید فسفریک غلیظ، اسید کلریدریک غلیظ و برم که ساخت شرکت مرک بودند در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور ساخته شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش لوری (۷) تعیین گردید. همولیتیک مستقیم بر اساس روش Gutierrez et al (۸) با بعضی از تغییرات انجام شد. در سه لوله سانتیفریوژ، ۲/۷ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول‌های قرمز ۲ درصد در سرم فیزیولوژی حاوی کلرید کلسیم ۲ میلی مولار با PH برابر ۷/۲ ریخته شد و سپس به هر لوله ۰/۱ میلی لیتر زهرخام حاوی مقدار پروتئین به ترتیب ۰/۰۱۲، ۰/۰۲۳ و ۰/۰۴۷ میلی گرم ریخته شد. در یک لوله سانتیفریوژ دیگر به عنوان شاهد، ۲/۷ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز و ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. نمونه‌ها به همراه شاهد به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون لوله‌ها در ۳۰۰۰g سانتیفریوژ شدند و سپس جذب محلول رویی در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید (نمونه‌ها به

زهر مارها کمپلکسی از عناصر توکسیک و آنزیم‌های مختلف می‌باشند. به طور کلی مارهای سمی متعلق به چهار خانواده وپیریده (افعی‌ها)، الپیده (مارهای کبری)، کروتالیده و هیدروفیده (مارهای دریایی) می‌باشند. وپیرا لبتینا (Vipera lebetina) که در ایران به گرز مار معروف می‌باشد در خانواده وپیریده جای دارد و در نقاط مختلف ایران وجود دارد. زهر مارها حاوی عواملی هستند که قادر به لیز غشا‌های سلولی و زیر سلولی می‌باشند، بنابراین قادر به همولیز گلبول‌های قرمز حیوانات مختلف از جمله انسان می‌باشند. همولیزی که به وسیله ی زهر مارها صورت می‌گیرد به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد. همولیز مستقیم توسط بعضی از زهرها بدون دخالت ترکیب دیگری صورت می‌گیرد. همولیز غیر مستقیم در حضور لسیتین یا یک منبعی از لسیتین صورت می‌گیرد که این همولیز به واسطه هیدرولیز لسیتین به لیزولسیتین و اسیدهای چرب توسط آنزیم فسفولیپاز A2 زهر مار و متعاقب آن لیز گلبول‌های قرمز خون به وسیله ی این محصولات می‌باشد (۱). فسفولیپاز A2 (EC : 3.1.1.4) متعلق به یک خانواده ی بزرگ از آنزیم‌هایی می‌باشد که پیوند استری را در موقعیت ۲-Sn فسفوگلیسریدها هیدرولیز می‌کند و مشتقات لیزوفسفولیپید و اسید چرب را به وجود می‌آورد که هر دو محصول می‌توانند باعث اثرات فارماکولوژیک متعدد شوند (۲،۳). فسفولیپازهایی که از منابع مختلف استخراج نموده اند به سه دسته فسفولیپاز A2 ترشحی (sPLA2)، فسفولیپاز A2 سیتوزولیک (cPLA2) و فسفولیپاز A2 غیروابسته به کلسیم (iPLA2) تقسیم می‌شوند که همه ی آن‌ها بر اساس اطلاعات ساختمانی و خصوصیات ملکولی به ۱۱ گروه تقسیم می‌شوند. این آنزیم دارای اثرات مختلف از قبیل نروتوکسیک، کاردیوتوکسیک، میوتوکسیک، همولیتیک، ضد انعقادی، ضدپلاکت‌ها، ایجاد کننده ادم و آسیب بافتی می‌باشند (۴،۵). از طرفی برخی از تحقیقات مشخص نموده اند که  $\alpha$ -لیپوئیک اسید (۲۱) دی تیولان ۳ پنتانوئیک اسید (که یک کوفاکتور مهم در کمپلکس‌های آنزیمی  $\alpha$ -کتواسیدها می‌باشد یک آنتی‌اکسیدان قوی و مؤثر در مقابل

آزمایش شدند). برای اندازه گیری درصد همولیز در یک لوله ی سانتریفیوژ به عنوان لوله ی توتال همولیز (کل همولیز) ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول های قرمز در بافر فسفات ۰/۲ مولار همراه با ۲/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ در سرم فیزیولوژی افزوده و در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب محلول لیز شده در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهدی حاوی ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر ، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ، ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ قرائت گردید (برای یکسان شدن شرایط آزمایش لوله شاهد هم در ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد) و درصد همولیز از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{total hemolysis}}} \times 100$$

و از آنجایی که درصد همولیز بستگی به غلظت پروتئین هر نمونه دارد برای این که مقایسه ی درستی از فعالیت داشته باشیم درصد همولیز بر میلی گرم پروتئین مورد استفاده در هر لوله تقسیم شد.

صورت سه تایی گذاشته شدند). همولیتیک غیرمستقیم (فعالیت فسفولیپاز A2) بر طبق روش Gul and Smith (۵) با بعضی تغییرات انجام شد. ابتدا سه لوله سانتریفیوژ و یک لوله شاهد انتخاب شدند. در هر لوله ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول های قرمز در بافر فسفات ۱۰ درصد، ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با  $\text{PH}=7.2$  ریخته شد. سپس به لوله شاهد ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و به لوله های آزمایش ، ۰/۱ میلی لیتر زهر خام با مقدار پروتئین به ترتیب ۰/۰۱۲، ۰/۰۲۳، و ۰/۰۴۷ میلی گرم ریخته شد. به همه لوله ها ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ در سرم فیزیولوژی به عنوان منبع لسیتین اضافه شد. لوله ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. با گذاشتن لوله ها در یخ واکنش متوقف شد. سپس لوله ها در ۴ درجه سانتی گراد در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول های رویی در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهد قرائت گردید (نمونه ها به صورت سه تایی

جدول ۱- نتایج فعالیت همولیتیک غیرمستقیم زهر خام روی گلبول های قرمز انسان

زهر خام (شماره لوله)	غلظت پروتئین (mg)	درصد همولیز (%)	درصد همولیز mg پروتئین
T1	(۰/۰۱۲)	(۲/۹±۰/۴)*	(۲۴۱/۷)
T2	(۰/۰۲۳)	(۸/۶±۰/۹۵)	(۳۷۳/۹)
T3	(۰/۰۴۷)	(۲۲/۴±۱/۶۳)	(۴۷۶/۶)

\*اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار (Means ± S.D) بیان شده اند که n=۳ می باشد.

فعالیت همولیتیک غیر مستقیم بر اساس درصد همولیز بیان شده اند.

جدول ۲- اثر  $\alpha$ -لیپوئیک اسید با غلظت های مختلف روی همولیز گلبول های قرمز انسان توسط زهر خام افعی لبینای ایران

غلظت پروتئین زهر خام	غلظت $\alpha$ -لیپوئیک اسید (میکرومولار)	درصد همولیز
(۰/۰۴۷)	۰	(۲۲/۴±۱/۶۳)*
(۰/۰۴۷)	۳	(۵۱/۳±۱/۷۴)
(۰/۰۴۷)	۷	(۵۲/۷±۱/۴۸)
(۰/۰۴۷)	۱۵	(۵۴±۱/۱۵)
(۰/۰۴۷)	۳۰	(۵۶/۷±۱/۰۲)
(۰/۰۴۷)	۶۰	(۶۰±۱/۶۳)
۰	۶۰	-

\*اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار (Means ± S.D) بیان شده اند که n=۳ می باشد.

نتیجه گرفته شد. با افزایش غلظت  $\alpha$ -لیپوئیک اسید درصد همولیز بیشتر شد که این مسأله برای ما دور از انتظار بود زیرا اکثر منابع گزارش داده اند که  $\alpha$ -لیپوئیک اسید یک مهارکننده ی قوی فسفولیپاز A2 می باشد (۶). این نتیجه می تواند دلایل مختلفی داشته باشد. همان طوریکه تحقیقات نشان می دهد فسفولیپاز A2 خانواده ی بزرگی از یک آنزیم می باشد که به شکل های مختلف وجود دارد که همان طوریکه در مقدمه ذکر شد آن ها را به سه دسته ترشعی، سیتوزولیک و غیروابسته به کلسیم تقسیم می کنند که باز این سه دسته را بر اساس اطلاعات ساختمانی و خصوصیات ملکولی به ۱۱ گروه تقسیم می کنند (۴،۵). پس می توان پیشنهاد نمود که ممکن است  $\alpha$ -لیپوئیک اسید، فسفولیپاز A2 موجود در زهر افعی لبتینا را مهار نکند ولی برای اینکه، این مسئله روشن شود، باید فسفولیپاز A2 را از زهرخام خالص نمود و اثرات  $\alpha$ -لیپوئیک اسید را روی آنزیم خالص بررسی نمود که این منوط به تحقیقات بعدی می باشد. دلیل دوم این است که آزمایش های ما روی زهر خام این مار بود، پس می توان احتمال داد که در حضور  $\alpha$ -لیپوئیک اسید عوامل دیگری در زهر فعال شوند که بتوانند باعث لیز گلبول های قرمز شوند که این مسأله هم منوط به بررسی های بیشتری می باشد.

### نتیجه گیری

$\alpha$ -لیپوئیک اسید نه تنها فاقد اثرات مهارکنندگی روی فعالیت همولیتیک زهر افعی لبتینای ایران بود، بلکه اثرات مثبت روی این فعالیت دارد که چگونگی این اثرات منوط به تحقیقات بیشتری است.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مؤسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لبتینا و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای تامین بودجه طرح تحقیقاتی و از گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

$\alpha$ -لیپوئیک اسید در غلظت های مختلف به کار برده شد که در تمام لوله ها غلظت پروتئین زهر خام ثابت بود. با افزایش غلظت  $\alpha$ -لیپوئیک اسید درصد همولیز افزایش می یابد به طوریکه در غلظت ۶۰ میکروگرم درصد همولیز به ۶۰ درصد می رسد. در یک لوله (لوله آخر در جدول) ۶۰ میکروگرم  $\alpha$ -لیپوئیک اسید به تنهایی به کار برده شد که در این لوله هیچ گونه فعالیت همولیتیکی مشاهده نشد. در صورتی که  $\alpha$ -لیپوئیک اسید با همین غلظت در حضور زهر فعالیت همولیز را تقریباً ۳ برابر می کند (از ۲۲/۴ درصد به ۶۰ درصد می رساند).

### بحث

این مطالعه نشان داد که زهر افعی لبتینای ایران با غلظت های مختلف نمی تواند باعث همولیز مستقیم گلبول های قرمز انسان شود. اما همان طوری که در زهر سایر مارهای خانواده وپیریده فاکتور غیرمستقیم همولیز وجود دارد در زهر افعی لبتینای ایران هم فعالیت همولیز غیرمستقیم وجود داشت. مطالعات نشان می دهد فسفولیپاز A2 موجود در این زهر مسئول این فعالیت همولیتیک می باشد. همان طوری که مطالعات نشان می دهد فسفولیپاز A2 دارای اثرات مختلف از قبیل نروتوکسیک، کاردیوتوکسیک، همولیتیک، ضدانعقادی و ... می باشد. از طرفی برخی از تحقیقات نشان داده اند که  $\alpha$ -لیپوئیک اسید مهارکننده ی فسفولیپاز A2 می باشد (۶). همین مسأله باعث شد که اثر  $\alpha$ -لیپوئیک اسید روی همولیز غیر مستقیم گلبول های قرمز که توسط زهر افعی لبتینای ایران صورت می گیرد، بررسی شود. در این مطالعه یک بار گلبول های قرمز در شرایط مختلف؛ در حضور زهر، غیاب زهر، زهر به همراه  $\alpha$ -لیپوئیک اسید در غلظت های مختلف و  $\alpha$ -لیپوئیک اسید به تنهایی (بدون زهر) بررسی شد. گلبول های قرمز در حضور  $\alpha$ -لیپوئیک اسید به تنهایی هیچگونه همولیزی را نشان ندادند اما در حضور زهر خام درصد همولیز را در حدود ۲۲/۴ درصد نشان دادند. در حضور زهر به همراه  $\alpha$ -لیپوئیک اسید با غلظت ۶۰  $\mu$ g درصد همولیز از ۲۲/۴ درصد به ۶۰ درصد رسید که حتی بعد از چندین بار تکرار باز همین

## References

1. Kornalik F. *The influence of snake venomes on blood coagulation*. Pharmacol Ther. 1985; 29(3): 353-405.
2. Kini RM. *Excitement : structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes*. Toxicon. 2003; 42(8): 827-842.
3. Tamara S, Adrijana L, Igor K. *Haemostatically active proteins in snake venoms*. Toxicon. 2011; 57(5): 627-64.
4. Duncan RE, Sarkadi-nagy E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. *Identification and functional characterization of adipose-specific Phospholipase A2 (AdPLA)*. J Biol Chem. 2008; 283(37): 25428-25436.
5. Schaloske RH, Dennis EA. *The Phospholipase A2 superfamily and its group numbering system*. Biochem, Biophys. Acta. 2006; 1761(11): 1246-1259.
6. Noormohamad J, Mysore AS, Bannikuppe SV. *Alpha-lipoic acid: an inhibitor of secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity*. Life sciences. 2006; 80(2): 146-153.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall Rj. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biolchem. 1951; 193(1): 265-75.
8. Gutierrez JM, Ownby CL, Odell GV. *Isolation of a myotoxin from Bothrops venom, partial characterization, and action on skeletal muscle*. Toxin. 1984; 22(1): 115-120.
9. Gul S, Smith AD. *Haemolysis of washed human red cells by combined action of Naja-naja Phospholipase A2 and albumin*. Biochem Biophys Act. 1984; 288(1): 237-240.
10. Marsh N, Williams V. *Practical applications of snake venom toxins in haemostasis*. Toxicon. 2005; 45(8): 1171-81.
11. Sggarwal SK, Yip K, Prasad Sk. *Snake venom for acute myocardial infarction: Natural serendipity or an abstraction to Treatment*. International journal cardiology. 2007; 119(2): e53-e55.
12. Iwanage S, Suzuki T. *Enzymes in snake venom*. In: *snake venoms; Hanbook of experimental Pharmacology* (Ed. By chen YL). Springer, Veraly, Newyork, NY. 1979: 61-159.
13. Mion G, Olive F, Hernandez E, Martin Ym, Vieillefosse AS. *Action of snake venoms on blood coagulation: diagnosis of hemorrhagic syndromes*. Bull Soc Pathol Exot. 2002; 95(3): 132-138.
14. Atanasov VN, Dancheva D, Mitewa M, Petrova S. *Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor*. Biochemistry (Mosc). 2009; 74(3): 276-80.

## Effect of $\alpha$ -lipoic Acid on Hemolytic Activity of Iranian Vipera Lebetina Venom

**Amoozgari, Z. (MSc)**

MSc of Biochemistry, Faculty  
of Medicine, Ahvaz  
jundishapure University of  
Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Salehi pour bavarsad, S.  
(BSc)**

MSc Student of Biochemistry,  
Faculty of Medicine, Ahvaz  
jundishapure University of  
Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Noorbehbahani, M. (BSc)**

BSc of medical Science,  
Faculty of Medicine, Ahvaz  
jundishapure University of  
Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author:**

Amoozgari, Z.

**Email:**

Zamoozgari277@yahoo.co  
m

**Received:** 11 May 2014

**Revised:** 4 Jul 2014

**Accepted:** 8 Jul 2014

**Abstract**

**Background and Objective:** Snake venom is a complex of several toxic elements and enzymes. It has the agents with the ability to destroy cellular and subcellular membrane and to bring about hemolysis of red blood cells (RBC). Two types of direct and indirect hemolytic activity are known in snake venom in that phospholipase A2 is responsible for the indirect lysis. The aim of this study was to investigate the effect of  $\alpha$ -lipoic acid on hemolytic activity of Iranian Vipera Lebetina venom.

**Material and Methods:** Protein concentration of the crude venom of Vipera Lebetina was determined using bovine serum albumin as a standard. Direct hemolytic activity of venom was determined by using the Human RBC and Indirect hemolytic activity was assayed on RBC in the presence of egg yolk. Then,  $\alpha$ -lipoic acid with different concentrations in 100 mM Tris-HCL buffer was applied and its effect on hemolysis of RBC was studied.

**Results:** direct hemolytic activity on RBC was not observed while its indirect activity was detected to be increased proportional to different concentration of  $\alpha$ -lipoic acid. The range of indirect hemolysis was increased up to 60% by 60 $\mu$ m  $\alpha$ -lipoic acid.

**Conclusion:** Not only has  $\alpha$ -lipoic acid no inhibitory effects on the hemolytic activity of Iranian Vipera Lebetina venom but also has the positive effects on it.

**Keywords:** Iranian Vipera Lebetina Venom, Direct Hemolytic, Indirect Hemolytic,  $\alpha$ -Lipoic Acid, Phospholipase A2