Archive of SID

(مقالهٔ پژوهشی)

تخلیص فا کتور فعال‌کنندهٔ V انعقاد خون از زهر افعی لبتینای ایران

زهره آموزگاری[۱*]، عباس زارع میرک آبادی[۲]، مژگان نور بهبهانی[۳]

۱- مربی گروه بیوشیمی.
۲- استادیار گروه جانوارن سمی.
۳- کارشناس گروه بیوشیمی.

۱و۳- دانشکدهٔ پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
۲- مؤسسه تحقیقاتی سرم‌سازی و واکسن رازی، بخش جانوران سمی و تولید آنتی ونوم، حصارک، کرج، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
زهره آموزگاری گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۱۱۸۶۳۵
Email: zamoozgari277@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: زهر مارهای ویپریده (افعی‌ها) حاوی پروتئین‌هایی می‌باشند که روی انعقاد خون اثر می‌گذارند. هدف از این مطالعه، تشخیص و جداسازی فعال‌کنندهٔ فاکتور خونی انعقادی V از زهر افعی لبتینای ایران می‌باشد.

روش بررسی: فعال‌کنندهٔ فاکتور V از ۲۰۰ میلی‌گرم زهر خام به وسیلهٔ سه مرحله کروماتوگرافی: ژل فیلتراسیون روی سفادکس G100، کروماتوگرافی تعویض یون روی DEAE – سلولز و کروماتوگرافی میل ترکیبی روی هپارین آگاروز تخلیص شد. اثر فعال‌کنندهٔ فاکتور V روی فاکتور V انسانی به وسیلهٔ فعالیت امیدولیتیک‌ترومبین تولید شده به وسیلهٔ فاکتور V فعال شده (Va) بررسی شد.

یافته‌ها: فعال‌کنندهٔ فاکتور V تخلیص‌شده یک باند پروتئینی را به وسیلهٔ الکتروفورز روی سدیم دودسیل‌سولفات ژل الکتروفورز (SDS - PAGE) نشان داد. وزن مولکولی آن در حدود ۲۹ kDa تخمین زده شد. این فاکتور، در حضور یون کلسیم فاکتور V را به فاکتور Va تبدیل می‌کند. فعالیت ارژینین استرهیدرولازی روی سوبسترای BAEE (N^{α} - بنزوئیل ارژینین اتیل استر) دارد. فعالیت امیدولیتیک ضعیفی روی سوبسترای S-2222 (بنزوئیل – ایزولوسیل- گلوتامیل - گلیسیل - ارژینیل پارانیتروانیلید) نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد که فاکتور تخلیص شده برای فاکتور V اختصاصی می‌باشد.

کلید واژگان: زهر مار، افعی لبتینا، فعال‌کنندهٔ فاکتور V.

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۶ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۷/۶ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/۸/۳

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زهر مارها، به ویژه مارهای متعلق به خانواده‌های کروتالیده و ویپریده دارای فاکتورهای مهمی هستند که روی سیستم هموستاتیک اثر دارند. امروزه توجه دانشمندان بیشتر بر روی استفاده از فاکتورها در تست‌های آزمایشگاهی، کاربردهای کلینیکی و مطالعات تئوریک آنها معطوف گشته است (۱). در زهر مارهای این خانواده‌ها هر دو عامل انعقادی و ضد انعقادی یافت می‌شوند. این فاکتورها شامل: آنزیم‌هایی شبیه به ترومبین (۲)، فیبرینوژناز و آنزیم‌های فیبرینولیتیک (۳)، فعال‌کنندهٔ پلاسمینوژن (۴)، فعال‌کنندهٔ پروترومبین (۵)، فعال‌کنندهٔ فاکتور X (۶)، فعال‌کنندهٔ فاکتور V (۷)، فعال‌کنندهٔ پروتئینC (۸) و القاءکننده‌ها و مهار کننده‌های تجمع پلاکتی (۹) می‌باشند.

تبدیل فاکتور V به فاکتور Va یک نقش اساسی در مراحل نهایی انعقاد خون یعنی تبدیل پروترومبین به ترومبین نشان می‌دهد. در این راه فاکتور Va نقش یک کوفاکتور غیر آنزیمی را ایفاء می‌کند. فعال‌کنندهٔ فیزیولوژیک فاکتور V، ترومبین و فاکتور Xa می‌باشند.

فعال‌کنندهٔ فاکتور V که در زهر مارها وجود دارد، سرین پروتئازی می‌باشد که یک پیوند پپتیدی را در فاکتور V می‌شکند و آن را به فاکتور Va تبدیل می‌کند. فعال-کنندهٔ فاکتور V از زهر افعی روسلی (RVV-V) سرین پروتئازی می‌باشد که ساختمانی گلیکو پروتئینی دارد و از یک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۲۸۰۰۰ دالتون تشکیل شده است (۷).

افعی لبتینا (گرزه‌ٔ مار) یکی از مارهای سمی می‌باشد که پراکندگی زیادی در ایران دارد. از آنجایی که زهر مارها در نقاط مختلف جغرافیایی با همدیگر متفاوت هستند، در مطالعهٔ حاضر چگونگی تخلیص فعال‌کنندهٔ فاکتور V و بررسی خصوصیات آن از زهر اافعی لبتینای ایران شرح داده می‌شود.

روش بررسی

زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفیلیزهٔ اهدایی مؤسسهٔ تحقیقاتی و سرم‌سازی رازی حصارک کرج بود. سفاکس G-100 ساخت شرکت فارماسیا، DEAE - سلولز، استات‌امونیوم از شرکت مرک آلمان، هپارین آگاروز، فاکتور V انسانی، پروترومبین انسانی، سوبستراهای،

(Benzoyl - Ile - glu - Gly - Arg - p-nitroanilide) S-2222

(H – D – Phe – PiP – Arg – BAEE وPNA) S-2238

(N^{α}– Benzoyl – L- arginine ethyl ester

(N^{α} – dansyl – P – guanidine – phenyl alanine piperidide) I2S81 (مهارکنندهٔ

استانداردهای وزن مولکولی، فسفریلاز b (۹۴ KDa)– البومین سرم گاوی (۶۷ KDa) و مهارکنندهٔ تریپسین (۲۰/۱ KDa) انیدرازکربنیک (۲۹ KDa) و اوالبومین (۴۳ KDa) از شرکت سیگما خریداری شدند. پلاسمای نرمال سیتراته از ۱۰- ۵ دهندهٔ سالم تهیه و در ۲۰ – °C ذخیره شد.

مراحل جداسازی فعال‌کنندهٔ فاکتور V

جداسازی با استفاده از روش فرید و همکاران (Farid etal) (۱۰) روی ستون سفادکس G-100 در ۴+ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت. ۲۰۰میلی‌گرم زهر خام (Crude venom) در ۲میلی‌لیتر بافر استات‌امونیوم ۲۰ میلی‌مولار (pH = 4/6) حل و محلول حاصل ۳۰ دقیقه در 2000g سانتریفوژ شد.

بعد از اندازه‌گیری پروتئین محلول زرد رویی که حاوی ۱۷۸ میلی‌گرم پروتئین بود، به تدریج وارد ستونی از سفادکس G-100 به طول ۱ متر و قطر ۲ سانتی‌متر گردید. ستون قبلاً با بافر استات‌امونیوم ۲۰ میلی‌مولار (PH = 6/8) به تعادل رسیده بود بعد از جذب نمونه ستون با همین بافر شست‌وشو داده شد.

نمونه‌ها به وسیلهٔ دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک مدل LKB با سرعت جریان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت جمع آوری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۲۸۰ نانومتر به وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر مدل perkein Elmer UV Vis Lambda 2 خوانده شد و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید، سپس پیک‌های مختلف دیالیز و تغلیظ شدند.

پیک II (PII) حاصل کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به علت داشتن خاصیت فعال‌کنندگی فاکتور V برای جداسازی بعدی روی ستون دی‌اتیل‌امینواتیل سلولز (DE-52) برده شد.

۵ میلی‌لیتر پیک II حاوی ۲۵/۶ میلی‌گرم پروتئین به تدریج وارد ستونی به طول ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱ سانتی‌متر از DE-52 شد، نمونه‌ها با سرعت جریان ۱۲ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شدند. ابتدا پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند از ستون خارج شده و بعد از اینکه این پروتئین‌ها کاملاً از ستون خارج شدند، بلافاصله به گرادیانی از استات امونیم ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ وصل شد. پس از اتمام گرادیان، شست‌وشوی نهایی با بافراستات امونیوم ۱۰۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ صورت گرفت. جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب بر حسب تعداد لوله‌ها رسم گردید، سپس پیک‌های مختلف، دیالیز و لیوفیلیزه شدند.

پیک II2 حاصل کروماتوگرافی تعویض یون به دلیل داشتن خاصیت فعال‌کنندگی فاکتور V برای جداسازی بعدی روی ستون هپارین آگاروز برده شد. ستون ابتدا با بافر بیکربنات امونیوم ۲۰ میلی مولار با PH برابر ۶/۸ به تعادل رسید. نمونه‌ها با سرعت جریان ۱۲ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شدند. بعد از خروج پروتئین‌هایی که جذب ستون نشده بودند، ستون به گرادیانی از بی‌کربنات امونیوم ۷۵۰ تا ۱۳۰۰میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ وصل شد.

بعد از اتمام گرادیان، شست‌وشوی نهایی با بافر بی‌کربنات امونیوم ۲۰۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸صورت گرفت. جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۲۸۰ نانومتر قرائت و منحنی جذب بر حسب شمارهٔ لوله‌ها رسم شد، سپس نمونه‌ها دیالیز و تغلیظ شدند.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین

مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش لوری (Lowry) (۱۱) تعیین گردید. یک سری لوله به‌طور دو تایی برای هر نمونه به اضافهٔ یک شاهد حاوی ۱میلی‌لیتر آب مقطر انتخاب شدند. مقدار مناسبی از ۰/۱ تا ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد پروتئین (سرم آلبومین گاوی ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) را در لوله‌های مخصوص به خود ریخته و حجم هر لوله با آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. زهر خام و سایر فراکسیون‌ها هم با رقت‌های معین، جداگانه با آب مقطر به ۱میلی‌لیتر رسانده شدند. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط معرف‌ها (۱ میلی‌لیتر محلول سولفات مس ۱ درصد در آب مقطر + ۱ میلی‌لیتر تاتارات مضاعف سدیم و پتاسیم ۲درصد در آب مقطر + ۹۸ میلی‌لیتر کربنات سدیم انیدر ۲درصد در سودیم نرمال) به هر لوله اضافه شد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو (۲ بار رقیق شده) به هر کدام از لوله‌ها افزوده شد. پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. پس از رسم منحنی استاندارد مقدار پروتئین نمونه‌ها تعیین شد.

الکتروفورز SDS –پلی‌اکریل امید (SDS-PAGE) جهت تعیین وزن ملکولی

برای تعیین وزن ملکولی از الکتروفورز بر روی ژل به روش لملی (Laemmli) (۱۲) استفاده شد. ژل شامل دو قسمت ژل جداکننده و ژل متراکم‌کننده بود. ژل جداکننده شامل اکریل امید ۱۲/۵درصد، بافرتریس- HCL ۳ مولار، سدیم‌دودسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد، آمونیوم پرسولفات ۱/۵ درصد بود. محلول حاصل وارد لوله‌هایی به طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۰/۸ سانتی‌متر گردید تا پلیمریزه شود. ژل متراکم‌کنندهٔ حاوی اکریل امید ۳۰ درصد بافر تریس-HCL ۵/. مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰درصد و آمونیوم پرسولفات ۱/۵درصد بود. بلافاصله ژل متراکم‌کننده به طول ۱ سانتی-

www.SID.ir

Archive of SID

متر روی ژل جدا کننده ریخته شد. بعد از پلیمریزه شدن ژل‌ها و افزودن نمونه‌ها روی آنها، الکتروفورز در بافر تریس – گلیسین با PH برابر ۸/۳ انجام شد به طوری که در ابتدا ولتاژ روی ۶۰ ولت تنظیم تا نمونه‌ها وارد ژل جدا کننده شوند و از آنجا به بعد ولتاژ را به ۱۲۰ ولت رسانده و تا پایان الکتروفوز ولتاژ ثابت نگه داشته شد. بعد از انجام الکتروفورز به مدت ۴ ساعت، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت به وسیلهٔ محلول رنگ‌آمیزی (کوماسی‌بلو ۰/۲۵ درصد، متانول ۵۰ درصد، اسید استیک ۷ درصد) رنگ-آمیزی شدند.

رنگ‌های اضافی از روی ژل‌ها به وسیلهٔ محلول رنگ بر (متانول ۳۰ درصد، اسید استیک ۷ درصد) زدوده شدند. ژل‌ها در محلول فیکساتور (اسید استیک ۵ درصد) نگهداری شدند. نمونه‌های استاندارد پروتئینی شامل: فسفریلاز b (۹۴ KDA) آلبومین سرم گاوی (KDA ۶۷) انیدرازکربنیک (۲۹ KDA) اوالبومین (۴۳ KDA) و مهارکنندهٔ تریپسین (۲۰/۱ KDA) بودند. زهر خام و نمونه‌ها طوری تهیه شدند که مقدار پروتئین در آنها ۲ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر نمونه بودند که در هر بار الکتروفورز از ۳۰ – ۲۵ میکرولیتر آنها استفاده شد. پس از ظهور پروتئین‌ها روی ژل، فاصلهٔ رنگ نشانگر (بروموفنل بلو) و باندهای پروتئینی (لبه جلویی هر باند) را از ابتدای ژل جدا کننده اندازه‌گیری و سپس حرکت نسبی (RF) هر پروتئین از رابطهٔ زیر محاسبه شد.

$$RF = \frac{\text{مسافت طی شده توسط پروتئین}}{\text{مسافت طی شده توسط رنگ نشانگر}}$$

با توجه به اطلاعات مربوط به اوزان مولکولی و RF پروتئین‌های استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه-لگاریتمی رسم گردید. وزن مولکولی پروتئین مورد مطالعه از روی منحنی استاندارد تخمین زده شد.

آزمایش‌های انزیمی

بررسی توأم فعالیت انعقادی و ضدانعقادی (Recalcified plasma clotting time)

برای بررسی این فاکتورها از روش دی‌میتروو (Dimitrov) (۱۳) با مقداری تغییرات استفاده شد. در یک سری لولهٔ آزمایش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسمای تازهٔ انسانی ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه ریخته شدند. به عنوان نمونه کنترل در یک لولهٔ دیگر حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسمای تازهٔ انسان، ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. لوله‌های آزمایشگاه، ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه و سپس به هر لولهٔ آزمایش ۰/۱ میلی-لیتر کلرید کلسیم ۰/۲۵ مولار افزوده شد و بلافاصله زمان‌های انعقاد آنها ثبت گردید. طبق این روش اندازهٔ فعالیت انعقادی کاهش در زمان انعقاد و اندازهٔ فعالیت ضد انعقادی افزایش در زمان انعقاد در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.

اندازه گیری فعالیت امیدولیتیک

اندازه‌گیری فعالیت امیدولیتیک بر اساس روش ژانگ (Zhang) (۴) انجام شد.

به ۹۵۰ میکرولیتر بافر تریس- HCL، ۵۰ میلی‌مولار، با PH برای ۷/۸ حاوی توئین-۸۰، ۰/۰۱ درصد و سوبسترای S- 2222 ۰/۲ میلی‌مولار به مقدار ۵۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد. تشکیل پارانیترو آنیلین آزاد-شده در یک میلی‌لیتر نمونه در دقیقه در ۲۵ درجهٔ سانتی-گراد می‌باشد و فعالیت مخصوص از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود

$$\text{فعالیت مخصوص } \left(\frac{Unit}{mg}\right) = \frac{\frac{\Delta A\ 405}{MIN} \times 1000 \times V}{\epsilon Pnitroaniline \times mg\ protein\ percuvette}$$

- $\frac{\Delta A\ 405}{MIN}$ = تغییرات جذب در دقیقه، در طول موج ۴۰۵ نانومتر
- V = حجم نمونه مورد آزمایش
- $\epsilon\ Pnitroaniline$ = ضریب جذب مولی پارانیتروانیلین که برابر $10000 m^{-4}\ cm^{-4}$ در ۴۰۵ نانومتر می‌باشد.

اندازه گیری فعالیت استرولیتیک

برای بررسی این فعالیت از روش هومل (Hummel) (۱۴) روی سوبسترای BAEE استفاده شد. ابتدا در یک

www.SID.ir

Archive of SID

کووت به عنوان شاهد که حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، ۰/۳ میلی‌لیتر سوبسترای BAEE ۰/۰۱ مولار و ۲/۶ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۰۴۶ مولار حاوی کلرید کلسیم ۰/۰۱۱۵ مولار با PH برابر ۸/۱ مخلوط گردید سپس در کووت دیگر ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه با ۲/۶ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۰۴۶ مولار حاوی کلرید کلسیم ۰/۰۱۱۵ مولار با برابر ۰/۱ مخلوط گردید. این مخلوط ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس ۰/۳ میلی‌لیتر سوبسترای BAEE ۰/۰۱ مولار به آن افزوده و خوب مخلوط شد و بلافاصله تغییرات جذب آن در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در طول موج ۲۵۳ نانومتر ثبت گردید. در این آزمایش یک واحد از فعالیت برابر با میکرومول سوبسترای هیدرولیز شده (BAEE) در یک میلی‌لیتر نمونه در دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد.

فعالیت مخصوص از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت مخصوص } (Unit/mg) = \frac{\frac{\Delta A\ 253}{MIN} \times 1000 \times V}{\epsilon BAEE \times mg\ protein\ per\ cuvette}$$

تغییرات جذب در دقیقه، در طول موج ۲۵۳ نانومتر $= \frac{\Delta A\ 253}{MIN}$

V = حجم نمونهٔ مورد آزمایش

ϵ BAEE = ضریب جذب مولی BAEE که در طول موج 253 نانومتر برابر $946 m^{-1}\ cm^{-1}$ می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت فعال‌کنندگی فاکتور V

این آزمایش بر اساس روش گراد و همکارانش (۱۵) انجام شد. در این روش ابتدا توسط فعال‌کنندهٔ زهر و در حضور یون کلسیم فاکتور V به فاکتور Va تبدیل و سپس فاکتور Va در حضور سایر فاکتورهای اضافه شده، پروترومبین را به ترومبین تبدیل نموده و فعالیت ترومبین تولیدشده بعد از یک دقیقه با استفاده از سوبسترای S-2238 تعیین شد. مقدار ترومبین تولیدشده در این آزمایش ارتباط مستقیمی با غلظت فاکتور Va دارد.

۱) به ۱۰۰ میکروگرم فاکتور V، ۱۰۰ میکرولیتر بافرتریس- HCL ۵۰ میلی‌مولار حاوی کلرور سدیم ۰/۱ مولار و کلرید کلسیم ۰/۰۱ مولار با PH برابر ۷/۸ ، ۵۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد.

۲) به ۱۷۰ میکرولیتر بافرتریس– HCL حاوی کلرور سدیم ۱۷۵ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۲ میکرومولار، اوالبومین ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مهارکنندهٔ I2581 ۲۰ میکرومولار با PH برابر ۷/۹، ۱۰ میکرولیتر فاکتور Xa نانو مولار افزوده شد و بعد از ۳۰ ثانیه،۲۰ میکرولیتر فاکتور Va به آن افزوده شد.

۳) ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط شمارهٔ ۲ را به یک لولهٔ حاوی ۹۰۰ میکرولیتر بافرتریس- HCL ۵۰ میلی‌مولار حاوی کلرور سدیم ۰/۱ مولار، توئین ۸۰، ۰/۰۱ درصد و سوبسترای S-2238 ۰/۰۲ میلی‌مولار با PH برابر ۷/۹ افزوده شد و بلافاصله تغییرات جذب در ۴۰۵ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. طبق این روش یک واحد از فعالیت (IU) برابر با مقداری از فاکتور Va می‌باشد که در مدت زمان یک دقیقه پروترومبین را به ترومبین تبدیل کند به طوری‌که ترومبین تولیدشده یک فعالیت امیدولیتیک یک واحد جذب در دقیقه تولید کند.

مهارکنندهٔ I258 (مهارکنندهٔ برگشت‌پذیر ترومبین) در مخلوط آزمایش از فعال شدن یا غیر فعال شدن فاکتور V به وسیلهٔ ترومبین تشکیل شده در آزمایش جلوگیری می‌کند. وجود این مهارکننده در اندازه‌گیری فعالیت ترومبین مداخله نمی‌کند. زیرا یک مهارکنندهٔ برگشت‌پذیراست و عمل مهارکنندگی آن در آزمایش ترومبین به وسیلهٔ رقیق کردن مخلوط آزمایش در کووت و حضور مقدار زیادی سوبسترای S- 2238 (سوبسترای واقعی ترومبین) از بین می‌رود.

یافته‌ها

نتایج جداسازی

نتیجهٔ کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۲۰۰ میلی‌گرم زهر خام (حاوی ۱۷۸ میلی‌گرم پروتئین) در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق این روش پروتئین‌های زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۵ فراکسیون مشخص مجزا شدند که به

www.SID.ir

Archive of SID

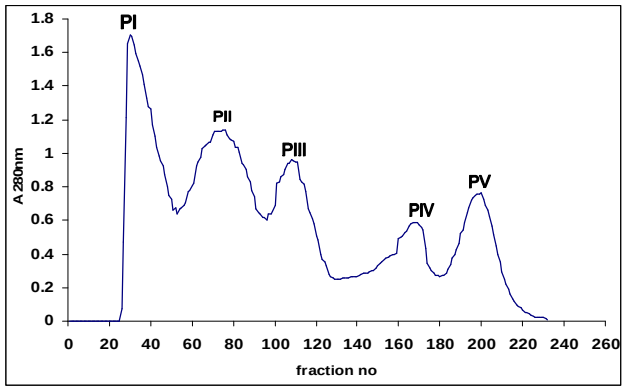
ترتیب خارج شدن از ستون: PI , PII , PIII , PIV , PV, نام‌گذاری شدند. نتیجهٔ کروماتوگرافی تعویض یون PII بر روی ستون DE-52 در شکل ۲ نشان داده شده است. PII به علت داشتن خاصیت فعال‌کنندگی فاکتورV بر روی ستون DE-52 برده شد. ۵ میلی‌لیتر PII حاوی ۲۵/۶ میلی‌گرم پروتئین بر روی ستون DE-52 برده شد. نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. ۴ میلی‌لیتر PII2 حاوی ۶/۱۶ میلی‌گرم پروتئین روی ستون هپارین آگاروز در PH برابر ۶/۸ برده شد. که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. طبق این روش PII2 به دو زیر فراکسیون PII 2-1 و PII 2-2 مجزا شد.

نتایج کلی سنجش پروتئین در جداول ۱ تا ۳ نشان داده شده است. به طور کلی از ۱۷۸ میلی‌گرم پروتئینی که بر روی ستون سفادکس G-100 برده شد، مقدار ۱۲۹/۱۶ میلی‌گرم پروتئینی استخراج شد که در پیک‌های مختلف پراکنده شدند که راندمان کار ۷۲/۴ درصد می‌باشد. از ۲۵/۶ میلی‌گرم پروتئین PII که بر روی ستون DE-52 برده شد، مقدار ۲۱/۶۲ میلی‌گرم پروتئین استخراج شد که راندمان کار ۸۴ درصد می‌باشد. از ۶/۱۶ میلی‌گرم پروتئین PII2 که بر روی ستون هپارین- اگاروز برده شد، مقدار ۳/۸۷ میلی‌گرم پروتئینی استخراج شد که راندمان کار ۶۲/۸ درصد می‌باشد.

نتایج الکتروفورز SDS- پلی‌اکریل امید (SDS-PAGE) و تعیین وزن مولکولی فعال‌کنندهٔ فاکتور V تخلیص شده و پروتئینی‌های استاندارد به کار گرفته شده برای تعیین وزن مولکولی بر روی SDS-PAGE در شرایط غیر احیا با پلی‌اکریل امید ۱۲/۵ درصد الکتروفورز شدند که نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. وزن مولکولی فاکتور V تخلیص شده در حدود ۲۹ KDa بود.

نتایج اندازه‌گیری فعالیتهای آنزیمی

نتایج کلی اندازه‌گیری فعالیت فعال‌کنندگی فاکتور V در مراحل مختلف تخلیص در جدول ۴ و نتایج فعالیت انعقادی در جدول ۵ نشان داده شده است. چنانچه در جدول ۵ مشاهده می‌شود، زهر خام و فعال‌کنندهٔ فاکتورV با غلظتهای مختلف آزمایش شدند. زمان انعقاد نمونهٔ کنترل ۲۰۳ ثانیه بود. زهر خام در غلظتهای پایین فعالیت انعقادی و در غلظتهای بالا فعالیت ضد انعقادی دارد. فعالیت انعقادی فعال‌کنندهٔ فاکتور V با افزایش غلظت افزایش یافت، به طوری که در نهایت زمان انعقاد پلاسما را از ۲۰۳ ثانیه به ۵ ثانیه رساند که این درصد ۸ برابر زهر خام برای غلظت ۱۰۰ میکروگرم از هر دو می‌باشد. نتایج فعالیت استرولیتیک در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ماکزیمم فعالیت در PII وجود دارد و فعال‌کنندهٔ فاکتور V به نسبت زهر خام و PII فعالیت نسبتاً پایینی دارد. نتایج فعالیت امیدولیتیک در جدول ۴ نشان داده شده است.

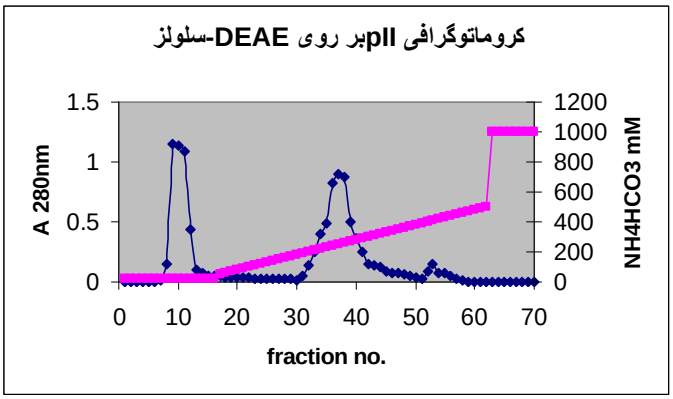


شکل 1: کروماتوگرافی زهر خام افعی لبتینای ایران روی سفادکس G-100

ستون (۲ × ۱۰۰ cm) با بافراستات امونیوم ۲۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ به تعادل رسیده و با همین بافر با سرعت جریان ۱۵ میلی-لیتر در ساعت شست‌وشو داده شد.

www.SID.ir

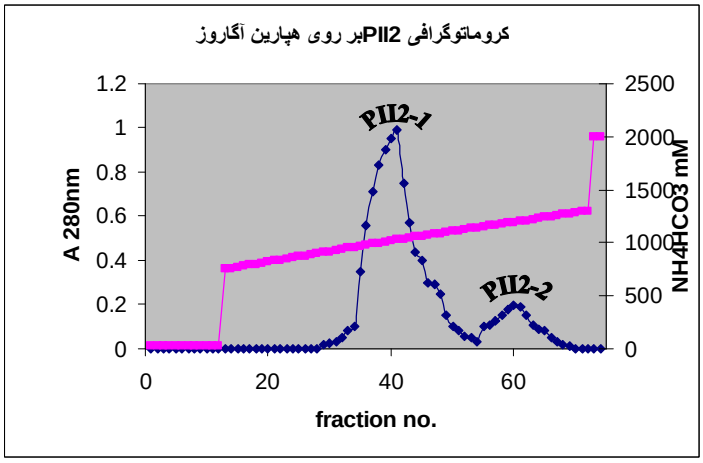
Archive of SID



شکل 2: کروماتوگرافی PII بر روی ستون DEAE-52

ستون (cm ۲۰ × ۱) ابتدا با بافراستات امونیوم ۲۰ میلی‌مولار PH = ۶/۸ به تعادل رسید

کروماتوگرافی با همین بافر با سرعت جریان ۱۲ میلی‌لیتر در ساعت شروع شد. پس از خروج پروتئینهای جذب نشده , ستون به گرادیانی از بافر استات امونیوم ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌مولار با PH = ۶/۸ وصل شد و در آخر شست‌وشوی نهایی با بافراستات امونیوم ۱۰۰۰ میلی‌مولار داده شد.



شکل 3: کروماتوگرافی PII 2 بر روی ستون هپارین آگاروز

ستون (cm ۱۰ × ۱) ابتدا با بافر بیکربنات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار PH برابر ۶/۸ به تعادل رسید. پس از خروج پروتئین‌های که جذب ستون نشده بودند، ستون به گرادیانی از بی‌کربنات آمونیوم ۷۵۰ تا ۱۳۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ وصل شد. پس از تمام شدن گرادیان، شست‌وشوی نهایی با بافر بی کربنات آمونیوم ۲۰۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ صورت گرفت. فراکسیون‌ها با سرعت جریان ۱۲ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1: نتایج سنجش پروتئین در زهر خام و فراکسیون‌های حاصل از آن در مرحلهٔ اول کروماتوگرافی روی ستون سفادکس G-100

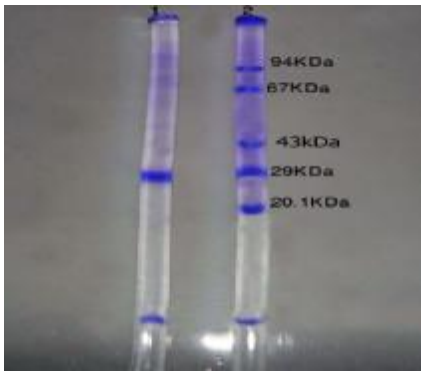
راندمان	توتال پروتئین	غلظت پروتئین	حجم نمونه	فاکتور اندازه گیری شده
(%)	(mg)	(mg/ml)	(ml)	نمونه
۱۰۰	۱۷۸	۸۹	2*	زهر خام (C.V)
۲۶/۹	۴۸	۴/۸	۱۰	PI
۱۸/۳	۳۲/۶۴	۲/۷۲	۱۲	PII
۱۵/۶۴	۲۷/۸۴	۱/۹۲	۱۴/۵	PIII
۴/۹۴	۸/۸	۰/۴۴	۲۰	PIV
۶/۶۴	۱۱/۸۹	۰/۶۶	۱۸	PV

جدول 2: نتایج سنجش پروتئین PII و فراکسیون‌های جدا شده از آن در مرحلهٔ دوم کروماتوگرافی

راندمان	توتال پروتئین	غلظت پروتئین	حجم نمونه	فاکتور اندازه گیری شده
(%)	(mg)	(mg/ml)	(ml)	نمونه
۱۰۰	۲۵/۶	۵/۱۲	5*	زهر خام (C.V)
۴۱/۰۹	۱۰/۵۲	۲/۶۳	۴	PI 1
۳۰/۰۷	۷/۷	۱/۵۴	۵	PII 2
۱۳/۵۹	۳/۴۸	۱/۱۶	۳	PIII 3

جدول 3: نتایج سنجش پروتئین PII 2 و فراکسیون‌های جدا شده از آن در مرحلهٔ سوم کروماتوگرافی

راندمان	توتال پروتئین	غلظت پروتئین	حجم نمونه	فاکتور اندازه گیری شده
(%)	(mg)	(mg/ml)	(ml)	نمونه
۱۰۰	6/16	1/54	۴	PII 2
42/8	2/64	0/66	۴	PII 2-1
16/2	1/23	0/41	۳	PII 2-2



شکل 4: تعیین وزن مولکولی فعال‌کنندهٔ فاکتور V تخلیص‌شده به‌وسیلهٔ SDS-PAGE در شرایط غیر احیاء و ژل پلی‌اکریل امید 12/5 درصد

نمونه ها به ترتیب:

۱ – فعال‌کنندهٔ فاکتور V از زهر افعی لبیتنا

۲ – استانداردهای وزن مولکولی که عبارت‌اند از:

فسفریلاز b (۹۴ KDa) ، آلبومین سرم گاوی (۶۷ KDa)، اوالبومین (۴۳ KDa)، انیدرازکربنیک (۲۹ KDa) و (۲۰/۱ KDa) Soyabean Trypsin inhibitor

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 4 : نتایج کلی تخلیص فعال‌کنندهٔ فاکتور V، فعالیت ارژنین استر هیدرولازی و فعالیت امیدولیتیک از زهر افعی لبتینای ایران

فعالیت امیدولیتیک Unit/mg	ارژنین استر هیدرولاز Unit/mg	Yield %	فاکتور تخلیص	فعالیت مخصوص فعال‌کنندهٔ فاکتورV Unit/mg	فعالیت فعال‌کنندهٔ فاکتورV Unit	پروتئین mg%	فاکتور اندازه‌گیری شدهٔ مراحل مختلف تخلیص
۱۶/۸۹	۳/۸۵	۱۰۰	۱	۱/۵۷	۲۷۹/۴۶	۱۷۸	Crude venom
۶/۵۴	۱۱/۴۴	۷۵/۷۵	۵/۲۶	۸/۲۷	۲۱۷/۷	۲۵/۶	SephadexG100 PII
۳/۲۴	۲/۵	۷۷/۵۸	۲۲/۴	۳۵/۱۹	۲۱۶/۸	۶/۱۶	DEAE-cellulose52 PII2
۱/۸	۱/۴۶	۵۳/۱	۳۵/۸	۵۶/۲۵	۱۴۸/۱۵	۲/۶۴	Heparin agarose PII2-1

یک واحد از فعالیت فعال‌کنندهٔ فاکتور V برابر با مقداری از فاکتور V فعال شده (Va) می‌باشد که در مدت زمان یک دقیقه پروترومبین را به ترومبین تبدیل کند، به طوری‌که ترومبین تولید شده یک فعالیت امیدولیتیک یک واحد جذب در دقیقه تولید کند.

جدول 5: فعالیت انعقادی (Recalcification Plasma Clotting Time) 0/5 میلی‌لیتر پلاسمای سیتراتهٔ تازهٔ انسان به‌وسیلهٔ 0/1 میلی‌لیتر از هر نمونه حاوی غلظت‌های معین پروتئین

زمان انعقاد (ثانیه)				فاکتور اندازه‌گیری شده
PII 2-1 (VLVa)	PII 2	PII	C.V	میکروگرم پروتئین
10	15	23	19/9	10
8/ 5	14/5	23	28/9	50
5	13	23	40	100
5	13	23	منعقد نشد	150

۱ – زمان انعقاد نمونهٔ کنترل ۲۰۳ ثانیه می‌باشد.

۲ - C.V با غلظت ۱۵۰ میکروگرم در عرض ۲۴ ساعت هم نتوانست پلاسما را منعقد کند.

بحث

اطلاعات ما نشان می‌دهد که در زهر افعی لبتینای ایران دو فعالیت انعقادی و ضد انعقادی توأماً وجود دارد به طوری که زهر خام در غلظت‌های پایین فعالیت‌های انعقادی و در غلظت‌های بالا فعالیت ضد انعقادی دارد. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که زهر مارها به ویژه مارهای متعلق به خانوادهٔ کروتالیده و ویپریده دارای فاکتورهای مهمی هستند که روی انعقاد خون اثر می‌گذارند. این فاکتورها پروتئازهایی هستند که به دو دسته، سرین پروتئاز و متالوپروتئاز تقسیم می‌شوند(۱۶). فعال‌کنندهٔ فاکتورV یکی از فاکتورهایی است که فاکتور V انعقاد خون را فعال می‌کند. تخلیص فعال‌کنندهٔ فاکتور V به وسیلهٔ سه مرحلهٔ کروماتوگرافی انجام شد. ژل فیلتراسیون زهر خام به وسیلهٔ سفادکس G-100 پنج فراکسیون را نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

در این مرحله فعالیت ضد انعقادی از فعالیت انعقادی مجزا شد، ولی فعالیت‌های انعقادی در فراکسیون‌های اول، دوم و چهارم بود که این فعالیت مربوط به فاکتورهای مختلف می‌باشد و این مسأله در مارهای دیگر هم وجود دارد به طوری که در زهر مارها چندین فاکتور انعقادی مختلف وجود دارد (۱). در مرحلهٔ دوم کروماتوگرافی روی DEAE – 52 فعال‌کنندهٔ فاکتور V از بعضی از پروتئین‌ها جدا شده و این فعال‌کننده در فراکسیون دوم این مرحله وجود داشت. تخلیص نهایی به وسیلهٔ کروماتوگرافی هپارین- آگاروز انجام شد و سپس فعال-کنندهٔ تخلیص‌شده به وسیلهٔ SDS – PAGE آنالیز شد که یک باند خالص را روی ژل پلی‌اکریل‌امید نشان داد. فعال‌کنندهٔ فاکتور V برای اولین‌بار از زهر افعی روسلی (Russle viper) استخراج شد که RVV – V نامیده شد. RVV – V یک گلیکو پروتئین با وزن مولکولی ۲۸ تا ۲۹ کیلو دالتون می‌باشد. این فعال‌کنندهٔ فاکتور V در ناحیهٔ rg – Ser می‌شکند. وزن مولکولی فعال‌کنندهٔ فاکتور V در زهر افعی لبتینا نزدیک به RVV – V زهر روسلی است (۱۷).

فعالیت‌های انعقادی فعال‌کنندهٔ فاکتور V در حدود ۸ برابر زهر خام بود. فعالیت ارژنین استرهیدرولازی با استفاده از سوبسترای BAEE در زهر خام و مراحل مختلف تخلیص اندازه‌گیری شد. بیشترین فعالیت در فراکسیون دوم حاصل از مرحلهٔ اول کروماتوگرافی موجود است. اما این فعالیت در فعال‌کنندهٔ فاکتورV نسبتاً پایین و در حدود ۳۸ درصد فعالیت زهر خام ۱۲ درصد فعالیت PΠ بود. دلیل این مسأله می‌تواند مربوط به این باشد که احتمالاً در زهر افعی لبتینا چندین ارژینین استرهیدرولاز وجود دارد که همگی روی سوبسترای BAEE اثر دارند و این آنزیم‌ها در مراحل مختلف کروماتوگرافی از همدیگر جدا شده‌اند. وجود چندین نوع ارژینین استرهیدرولاز در زهر بعضی از مارها گزارش شده است (۱۸). فعالیت امیدولیتیک با استفاده از سوبسترای S – 2222 در زهر خام و در مراحل مختلف تخلیص اندازه-گیری شد. بیشترین فعالیت در زهر خام وجود داشت و در فعال‌کنندهٔ فاکتور V این فعالیت پایین و در حدود ۱۰ درصد فعالیت در زهر خام بود. احتمالاً در زهر خام چندین فاکتور امیدولیتیک وجود دارد که در مراحل مختلف کروماتوگرافی از همدیگر جدا شده‌اند. البته اثبات این مسأله منوط به تحقیقات بیشتری است.

قدردانی

نویسندگان این مقاله از مؤسسهٔ تحقیقات سرم‌سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لبتینا و از مدیریت محترم سازمان برنامه و بودجهٔ استان خوزستان جهت حمایت مالی از پروژهٔ تحقیق این مقاله و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1-Tamara S, Adrijana L, Igork. Haemostatically active proteins in snake venom. Toxicon 2011; 57: 627 - 654.

2-Soares A, Arantes E, Hirayama S, Selistre H, Fonseca F, Henrique F, Penha N, Oliveira F, . Functional and structural characterization of a new thrombin - like enzyme from Bothrops alternates snake venom. Toxicon 2010; 55: 1365 - 1377.

3-Costa M, Richardson M, Santos D, CastroPimenta A, Homsi - Brandeburgo M, Soares A, Oliveira F. Isolation and structural characterization of a new fibrin (ogen) olytic Metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom. Toxicon 2008; 51: 574 - 584.

4-Zhang Y, Wisner A, Xiong Y, Bon C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. J Biol Chem 1995;270 : 10246 - 10255.

5-Silva M, Schattner M, Ramos C, Junqueira I, Guarnieri M, Lazzari M, Sampaio C, Pozner R, Ventura J, Chudzinski - Tavassi A. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (sjararaca - da - seca) snake venom: characterization and molecular cloning. Biochem J 2003; 369 : 129 - 139.

www.SID.ir

Archive of SID

6-Siigur J, Siigur E. Factor X activating proteases from snake venoms. J., Toxicol. Toxin Rev 2006; 25 : 235 - 255.
7-Bos M, Boltz M , St Pierre L, Masci P, de Jersey J, Lavin M, Camire R. Venom factor V from the common brown snake escapes haemostatic regulation through procoagulant adaptations. Blood 2009; 114: 686 - 692.
8-Gempeler P , Muller C. 2006. Diagnostic use of the protein C activator from Agkistrodon contortrix. Tox. Rev 2006; 25: 335 - 349.
9-Hsu C, Huang T. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. J.Thram. Haemost 2008 ; 6 : 1578 – 1585
10-Farid M, TU T. Characterization of cerastobin a thrombin - like enzyme from the venom of cerastes vipera (shara sand viper). Biochemistry 1998; 28 : 317 - 377 .
11-Lowry O, Rosebrough N , Farr A, Randall R . Protein measurement with the folin phenol. J. boil. Chem 1951; 193 : 295 - 275.
12-Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680 - 685.
13-Dimitrov G, Kandonbar R. Fractionation of vipera russelli venom by gel filtation. Toxicon 1968 ; 5: 213 -221.
14-Hummel B. A Modified spectrophotometric determination of chymotrypsin. Trypsin and thrombin. J. Biochem. Physio 1959; l37: 1393 - 1395.
15-Gerad I , Tans G, Yukelson L, Zwaal R, Rosing J. Activation of bovine factor V by an activator purified from the venom of Naja naja oxina. Toxicon 1992;30 : 1065 - 1079.
16-Gomes M, Mendes M, Oliveira F, Andrade R , Bernardes C, Hamaguchi A, de Alcantara T, Soares A, Rodrigues V , Homsi - Brandeburgo M . A new weakly hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom. Toxicon 2009 : 53, 24 -32.
17-Nicolaes G, Rosing J. Activation of factor V by venom proteases. Tox Rev 2006 ; 25: 217 - 234.
18-Siigur E, Mahar A, Siigur J . Fibrinogenase from of Vipera lebetina. Toxicon 1991; 29 (1): 107 - 118.

www.SID.ir

Archive of SID

Purification of Blood Coagulation Factor V Activator from the Venom of Iranian *Vipera lebetina*

Zohreh Amoozegari[1*], Abbas Zare Mirak Abadi[2], Mozhgan Noorbehbahani[3]

1-Lecturer of Biochemistry.
2-Assistant Professor of Venomous *Animals and Antivenom Production.*
3-M.A in Biochemistry.

1,3-Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2-Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Corresponding author:
Zohreh Amoozgari ; Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel:+989163118635
Email:zamoozgari277@yahoo. com

Abstract

Background and Objective: The venom of many Viperidae snake appear to contain proteins that affect blood coagulation. The aim of this study was to identify and isolate a blood coagulation factor V activator present in the venom from ***Vipera lebetina***.

Material and Methods: Factor V activator was purified from 200 mg of crude venom by three steps of chromatorgraphy which included: gel filtration on sephadex G100, Ion exchange chromatography on DEAE and cellulose and affinity chromatography on heparin agarose. The effect of factor V activator on human factor V was studied by measuring the amidiolytic activity of the produced thrombin by activated factor V (Va).

Results: The results of SDS – PAGE identified an activator of factor V as a single protein band with a molecular weight of 29 KDa. This compound was converted, in the presence of calcium ions, to active factor Va. It also had arginine esterase activity toward substrate BAEE (N^{α}-benzoyl arginine ethyester) and a weak amidase activity on S-2222 (benzoyl-le-glu-Gly-Arg-p- nitroanilide).

Conclusion: The results of this study showed that the isolated factor is a specific activator on factor V.

Keywords: factor V activity, snake venom, *Vipera lebetina*.

►*Please cite this paper as:*
Purification of Blood Coagulation Factor V Activator from the Venom of Iranian Vipera Lebetina. Amoozegari Z, Zare Mirak A, Noorbehbahani M. Jundishapur Sci Med J 2013;12(1):21-32

www.SID.ir