

تخلیص فاکتور فعال کننده V انعقاد خون از زهر افعی لبتینای ایران

زهرة آموزگاری^{۱*}، عباس زارع میرک آبادی^۱، مژگان نور بهبهانی^۲

چکیده

زمینه و هدف: زهر مارهای ویپریده (افعی‌ها) حاوی پروتئین‌هایی می‌باشند که روی انعقاد خون اثر می‌گذارند. هدف از این مطالعه، تشخیص و جداسازی فعال‌کننده فاکتور خونی انعقادی V از زهر افعی لبتینای ایران می‌باشد. روش بررسی: فعال‌کننده فاکتور V از ۲۰۰ میلی‌گرم زهر خام به وسیله سه مرحله کروماتوگرافی: ژل فیلتراسیون روی سفادکس G100، کروماتوگرافی تعویض یون روی DEAE - سلولز و کروماتوگرافی میل ترکیبی روی هپارین آگاروز تخلیص شد. اثر فعال‌کننده فاکتور V روی فاکتور V انسانی به وسیله فعالیت امیدولیتیک ترومبین تولید شده به وسیله فاکتور V فعال شده (Va) بررسی شد.

یافته‌ها: فعال‌کننده فاکتور V تخلیص شده یک باند پروتئینی را به وسیله الکتروفورز روی سدیم دودسیل سولفات 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 ارژنین استرهدرولازی روی سوسترای BAEE (N^α - بنزوئیل ارژنین اتیل استر) دارد. فعالیت امیدولیتیک ضعیفی روی سوسترای S-2222 (بنزوئیل - ایزولوسیل - گلوتامیل - گلیسیل - ارژنینیل پارانیتروانیلید) نشان می‌دهد. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که فاکتور تخلیص شده برای فاکتور V اختصاصی می‌باشد.

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

۱- مربی گروه بیوشیمی.

۲- استادیار گروه جانوران سمی.

۳- کارشناس گروه بیوشیمی.

۳۱- دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقاتی سرم‌سازی و واکسن سازی، بخش جانوران سمی و تولید آنتی‌بوم، حصارک، کرج، ایران.

* نویسنده مسؤل:

زهرة آموزگاری گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۱۱۸۶۳۵

Email: zamoozgari277@yahoo.com

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)، فعال‌کننده پلاسمینوژن (۴)، فعال‌کننده پروترومبین (۵)، فعال‌کننده فاکتور X (۶)، فعال‌کننده فاکتور V (۷)، فعال‌کننده پروتئین C (۸) و القاء‌کننده‌ها و مهارکننده‌های 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. فعال‌کننده فیزیولوژیک فاکتور V، ترومبین و فاکتور Xa می‌باشند.

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

افعی لبتینا (گرزه 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 مطالعه حاضر چگونگی تخلیص فعال‌کننده فاکتور V و بررسی خصوصیات آن از زهر افعی لبتینای ایران شرح داده می‌شود.

روش بررسی

زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفیلیزه اهدایی مؤسسه 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، سوسترهای،

(Benzoyl - Ile - glu - Gly - S-2222
Arg - p-nitroanilide)
(H - D - Phe - PiP - Arg - S-2238
BAEE و PNA)

(N^a- Benzoyl - L- arginine ethyl ester
(مهارکننده I2S81 - P - dansyl - N^a -
guanidine - phenyl alanine piperidide)
استانداردهای وزن مولکولی، فسفریلاز b (KDa)

۹۴) - البومین سرم گاوی (۶۷ KDa) و مهارکننده تریپسین (۲۰/۱ KDa) انیدرازکربنیک (۲۹ KDa) و االبومین (۴۳ KDa) از شرکت سیگما خریداری شدند. پلاسمای نرمال سیراته از ۱۰-۵ دهنده سالم تهیه و در ۲۰ °C - ذخیره شد.

مراحل جداسازی فعال‌کننده فاکتور V

جداسازی با استفاده از روش فرید و همکاران (Farid et al) (۱۰) روی ستون سفادکس G-100 در +۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. ۲۰۰ میلی‌گرم زهر خام (Crude venom) در ۲ میلی‌لیتر 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 وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک مدل LKB با سرعت جریان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت جمع آوری شدند.

منحنی جذب بر حسب شماره 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 اضافه یک شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر انتخاب شدند. مقدار مناسبی از ۰/۱ تا ۱ میلی‌لیتر لیترا 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 ۱ میلی‌لیتر رسانده شدند. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط معرف‌ها (۱ میلی‌لیتر محلول سولفات مس ۱ درصد در آب مقطر + ۱ میلی‌لیتر تانارات مضاعف سدیم و پتاسیم ۲ درصد در آب مقطر + ۹۸ میلی‌لیتر کربنات سدیم انیدر ۲ درصد در سودنیم 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 ۱۲/۵ درصد، بافر تریس - HCL ۳ مولار، سدیم دودسیل 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 متراکم‌کننده حاوی اکریل امید ۳۰ درصد بافر تریس - HCL ۵/۵، مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد و آمونیوم پرسولفات ۱/۵ درصد بود. بلافاصله ژل متراکم‌کننده به طول ۱ سانتی-

جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر 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 بافر استات 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 میلی‌مولار 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 ۱۳۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ وصل شد.

بعد از اتمام گرادیان، شست‌وشوی نهایی با بافر بی-کربنات امونیوم ۲۰۰۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ صورت گرفت. جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۲۸۰ نانومتر قرائت و

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

اندازه‌گیری 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 سوسترای 2222 S- ۰/۲ میلی‌مولار به مقدار ۵۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد. تشکیل پارانیترو آنیلین آزاد- شده در یک میلی‌لیتر نمونه در دقیقه در ۲۵ درجه سانتی-گراد می‌باشد و فعالیت مخصوص از رابطه زیر محاسبه می‌شود

$$\frac{\Delta A_{405}}{\text{MIN}} \times 1000 \times V = \epsilon \text{Pnitroaniline} \times \text{mg protein per cuvette}$$

$$\text{فعالیت مخصوص (Unit/mg)} = \frac{\Delta A_{405}}{\text{MIN}} = \text{تغییرات جذب در دقیقه، در طول موج } 405 \text{ نانومتر}$$

$$V = \text{حجم نمونه مورد آزمایش}$$

$\epsilon \text{Pnitroaniline}$ = ضریب جذب مولی پارانیتروانیلین که برابر $10000 \text{ cm}^{-1} \text{ m}^{-1}$ در ۴۰۵ نانومتر می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت استرولیتیک

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

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 الکتروفورز ولتاژ ثابت نگه داشته شد. بعد از انجام الکتروفورز به مدت ۴ ساعت، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت به وسیله محلول رنگ‌آمیزی (کوماسی بلو ۰/۲۵ درصد، متانول ۵۰ درصد، اسید استیک ۷ درصد) رنگ-آمیزی شدند.

رنگ‌های اضافی از روی ژل‌ها به وسیله 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) انیدراز کربنیک (۲۹ KDA) اولبومین (۴۳ KDA) و مهارکننده 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، فاصله رنگ نشانگر (بروموفل بلو) و باندهای پروتئینی (به جلویی هر باند) را از ابتدای ژل جدا کننده اندازه‌گیری و سپس حرکت نسبی (RF) هر پروتئین از رابطه 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)

مولار و کلرید کلسیم ۰/۰۱ مولار با PH برابر ۷/۸، ۵۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد.

(۲) به ۱۷۰ میکرولیتر بافر تریس - HCL حاوی کلرور سدیم ۱۷۵ میلی مولار، کلرید کلسیم ۲ میکرومولار، اوالبومین ۰/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر، مهارکننده 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 شماره ۲ را به یک لوله حاوی ۹۰۰ میکرولیتر بافر تریس - HCL ۵۰ میلی مولار حاوی کلرور سدیم ۰/۱ مولار، توتین ۸۰، ۰/۰۱ درصد و سوسترای S-2238 ۰/۰۲ میلی مولار 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 می باشد که در مدت زمان یک دقیقه پروترومبین را به ترومبین تبدیل کند به طوری که ترومبین تولید شده یک فعالیت امیدولیتیک یک واحد جذب در دقیقه تولید کند.

مهارکننده I258 (مهارکننده برگشت پذیر ترومبین) در مخلوط آزمایش از فعال شدن یا غیر فعال شدن فاکتور V به وسیله ترومبین تشکیل شده در آزمایش جلوگیری می کند. وجود این مهارکننده در اندازه گیری فعالیت ترومبین مداخله نمی کند. زیرا یک مهارکننده برگشت پذیر است و عمل مهارکنندگی آن در آزمایش ترومبین به وسیله رقیق کردن مخلوط آزمایش در کووت و حضور مقدار زیادی سوسترای S-2238 (سوسترای واقعی ترومبین) از بین می رود.

یافته ها

نتایج جداسازی

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

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

فعالیت مخصوص از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

ΔA_{253} = تغییرات جذب در دقیقه، در طول موج ۲۵۳ نانومتر

V = حجم نمونه مورد آزمایش

ϵ_{BAEE} = ضریب جذب مولی BAEE که در طول موج ۲۵۳ نانومتر برابر $946 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ می باشد.

اندازه گیری فعالیت فعال کنندگی فاکتور V

این آزمایش بر اساس روش گراد و همکارانش (۱۵) انجام شد. در این روش ابتدا توسط فعال کننده 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 تولید شده بعد از یک دقیقه با استفاده از سوسترای S-2238 تعیین شد. مقدار ترومبین تولید شده در این آزمایش ارتباط مستقیمی با غلظت فاکتور Va دارد.

(۱) به ۱۰۰ میکروگرم فاکتور V، ۱۰۰ میکرولیتر بافر تریس - HCL ۵۰ میلی مولار حاوی کلرور سدیم ۰/۱

تخلیص شده و پروتئینی‌های استاندارد به کار گرفته شده برای تعیین وزن مولکولی بر روی SDS-PAGE در شرایط غیر احیا با پلی‌اکریل آمید 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.

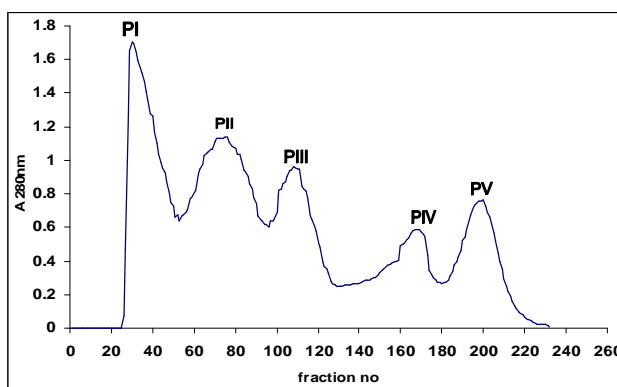
نتایج اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی

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 فعال‌کننده فاکتور V با غلظت‌های مختلف آزمایش شدند. زمان انعقاد نمونه کنترل ۲۰۳ ثانیه بود. زهر خام در غلظت‌های پایین فعالیت انعقادی و در غلظت‌های بالا فعالیت ضد انعقاد دارد. فعالیت انعقادی فعال‌کننده 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 فعال‌کننده فاکتور V به نسبت زهر خام و PII فعالیت نسبتاً پایینی دارد. نتایج فعالیت امیدولیتیک در جدول ۴ نشان داده شده است.

ترتیب خارج شدن از ستون: PI, PII, PIII, PIV, PV, نام‌گذاری شدند. نتیجه کروماتوگرافی تعویض یون PII بر روی ستون DE-52 در شکل ۲ نشان داده شده است. PII به علت داشتن خاصیت فعال‌کنندگی فاکتور V 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.

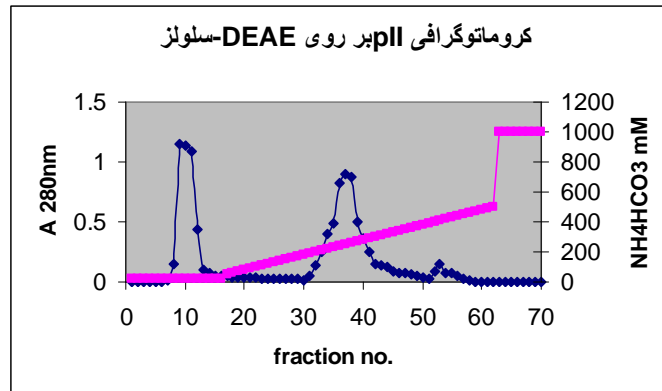
نتایج کلی سنجش پروتئین در جداول ۱ تا ۳ نشان داده شده است. به طور کلی از ۱۷۸ میلی‌گرم پروتئینی که بر روی ستون سفادکس G-100 برده شد، مقدار ۱۲۹/۱۶ میلی‌گرم پروتئینی استخراج شد که در پیک‌های مختلف پراکنده شدند که راندمان کار ۷۲/۴ درصد می‌باشد. از ۲۵/۶ میلی‌گرم پروتئین PII که بر روی ستون DE-52 برده شد، مقدار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

نتایج الکتروفورز SDS- پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) و تعیین وزن مولکولی فعال‌کننده فاکتور V



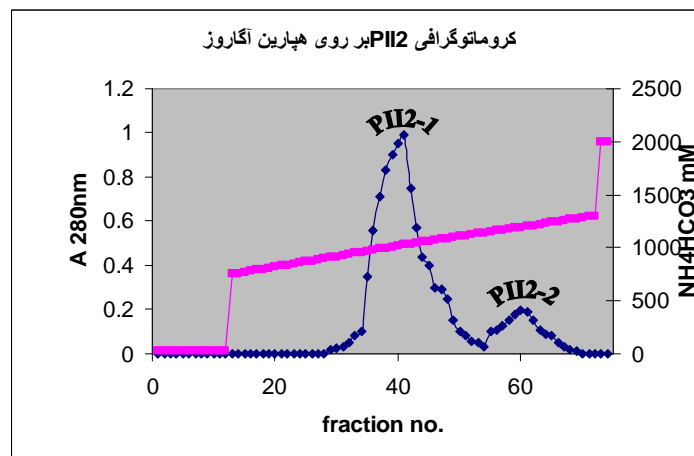
شکل ۱: کروماتوگرافی زهر خام افعی لبتینای ایران روی سفادکس G-100

ستون (۱۰۰ cm × ۲) با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار با PH برابر ۶/۸ به تعادل رسیده و با همین بافر با سرعت جریان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت شست‌وشو داده شد.



شکل 2: کروماتوگرافی PII بر روی ستون DEAE-52

ستون (۲۰ cm × ۱) ابتدا با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار $\text{PH} = 6/8$ به تعادل رسید. پس از خروج پروتئینهای جذب نشده، ستون به گرادیانی کروماتوگرافی با بافر با سرعت جریان ۱۲ میلی لیتر در ساعت شروع شد. پس از خروج پروتئینهای جذب نشده، ستون به گرادیانی از بافر استات آمونیوم ۵۰ تا ۵۰۰ میلی مولار با $\text{PH} = 6/8$ وصل شد و در آخر شست و شوی نهایی با بافر استات آمونیوم ۱۰۰۰ میلی مولار داده شد.



شکل 3: کروماتوگرافی PII 2 بر روی ستون هیپارین آگاروز

ستون (۱۰ cm × ۱) ابتدا با بافر بیکربنات آمونیوم ۲۰ میلی مولار PH برابر $6/8$ به تعادل رسید. پس از خروج پروتئینهای که جذب ستون نشده بودند، ستون به گرادیانی از بی کربنات آمونیوم ۷۵۰ تا ۱۳۰۰ میلی مولار با PH برابر $6/8$ وصل شد. پس از تمام شدن گرادیان، شست و شوی نهایی با بافر بی کربنات آمونیوم ۲۰۰۰ میلی مولار با PH برابر $6/8$ صورت گرفت. فراکسیونها با سرعت جریان ۱۲ میلی لیتر در ساعت جمع آوری شدند.

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

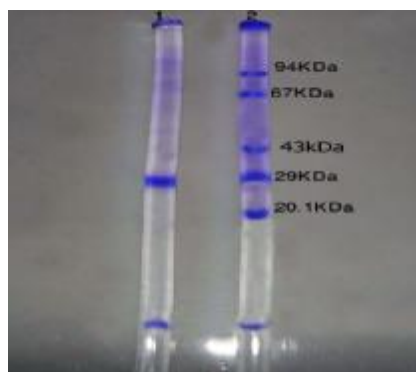
راندمان (%)	توتال پروتئین (mg)	غلظت پروتئین (mg/ml)	حجم نمونه (ml)	فاکتور اندازه‌گیری شده نمونه
۱۰۰	۱۷۸	۸۹	۲*	زهر خام (C.V)
۲۶/۹	۴۸	۴/۸	۱۰	PI
۱۸/۳	۳۲/۶۴	۲/۷۲	۱۲	PII
۱۵/۶۴	۲۷/۸۴	۱/۹۲	۱۴/۵	PIII
۴/۹۴	۸/۸	۰/۴۴	۲۰	PIV
۶/۶۴	۱۱/۸۹	۰/۶۶	۱۸	PV

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

راندمان (%)	توتال پروتئین (mg)	غلظت پروتئین (mg/ml)	حجم نمونه (ml)	فاکتور اندازه‌گیری شده نمونه
۱۰۰	۲۵/۶	۵/۱۲	۵*	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 مرحله سوم کروماتوگرافی

راندمان (%)	توتال پروتئین (mg)	غلظت پروتئین (mg/ml)	حجم نمونه (ml)	فاکتور اندازه‌گیری شده نمونه
۱۰۰	۶/۱۶	۱/۵۴	۴	PII 2
۴۲/۸	۲/۶۴	۰/۶۶	۴	PII 2-1
۱۶/۲	۱/۲۳	۰/۴۱	۳	PII 2-2



شکل 4: تعیین وزن مولکولی فاکتور V تخلیص شده به وسیله SDS-PAGE در شرایط غیر احیاء و ژل پلی‌اکریل امید 12/5 درصد

نمونه‌ها به ترتیب:

۱ - فعال‌کننده فاکتور V از زهر افعی لیبیتنا

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

جدول 4: نتایج کلی تخلیص فعال‌کننده 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 فعال‌کننده فاکتور V Unit/mg	فعالیت فعال‌کننده فاکتور V Unit	پروتئین mg%	فاکتور اندازه‌گیری شده 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 فعال‌کننده 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 طوری که ترومبین تولید شده یک فعالیت امیدولیتیک یک واحد جذب در دقیقه تولید کند.

جدول 5: فعالیت انعقادی (Recalcification Plasma Clotting Time) 0/5 میلی لیتر پلاسما سیراته تازه انسان به وسیله

0/1 میلی لیتر از هر نمونه حاوی غلظت‌های معین پروتئین

فاکتور اندازه‌گیری شده

زمان انعقاد (ثانیه)

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

۱ - زمان انعقاد نمونه کنترل ۲۰۳ ثانیه می‌باشد.

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

بحث

فاکتورها پروتئین‌هایی هستند که به دو دسته، سرین پروتئاز و متالوپروتئاز تقسیم می‌شوند (۱۶). فعال‌کننده فاکتور V یکی از فاکتورهایی است که فاکتور V انعقاد خون را فعال می‌کند. تخلیص فعال‌کننده فاکتور V به وسیله سه مرحله کروماتوگرافی انجام شد. ژل فیلتراسیون زهر خام به وسیله سفادکس G-100 پنج فاکتور را نشان داد.

اطلاعات ما نشان می‌دهد که در زهر افعی لبتینای ایران دو فعالیت انعقادی و ضد انعقادی توأم 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 خانواده کروتالیده و وپریده دارای فاکتورهای مهمی هستند که روی انعقاد خون اثر می‌گذارند. این

در حدود ۳۸ درصد فعالیت زهر خام ۱۲ درصد فعالیت PPI بود. دلیل این مسأله می‌تواند مربوط به این باشد که احتمالاً در زهر افعی لبتینا چندین ارژنین استریدرولاز وجود دارد که همگی روی سوبسترای BAEE اثر دارند و این آنزیم‌ها در مراحل مختلف کروماتوگرافی از همدیگر جدا شده‌اند. وجود چندین نوع ارژنین استریدرولاز 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 اندازه‌گیری شد. بیشترین فعالیت در زهر خام وجود داشت و در فعال‌کننده 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 مؤسسه تحقیقات سرم‌سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لبتینا و از مدیریت محترم سازمان برنامه و بودجه استان خوزستان جهت حمایت مالی از پروژه تحقیق این مقاله و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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 مرحله دوم کروماتوگرافی روی DEAE - 52 فعال‌کننده فاکتور V از بعضی از پروتئین‌ها جدا شده و این فعال‌کننده در فراکسیون دوم این مرحله وجود داشت. تخلیص نهایی به وسیله کروماتوگرافی هپارین- آگاروز انجام شد و سپس فعال‌کننده تخلیص شده به وسیله SDS - PAGE آنالیز شد که یک باند خالص را روی ژل پلی‌اکریل‌امید نشان داد. فعال‌کننده فاکتور V برای اولین بار 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 فعال‌کننده فاکتور V در ناحیه rg - Ser می‌شکند. وزن مولکولی فعال‌کننده فاکتور V در زهر افعی لبتینا نزدیک به RVV - V زهر روسلی است (۱۷).

فعالیت‌های انعقادی فعال‌کننده فاکتور V در حدود ۸ برابر زهر خام بود. فعالیت ارژنین استریدرولاز با استفاده از سوبسترای BAEE در زهر خام و مراحل مختلف تخلیص اندازه‌گیری شد. بیشترین فعالیت در فراکسیون دوم حاصل از مرحله اول کروماتوگرافی موجود است. اما این فعالیت در فعال‌کننده فاکتور V نسبتاً پایین و

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, Homs - 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.

- 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.Throm. 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 filtration. Toxicon 1968 ; 5: 213 -221.
- 14-Hummel B. A Modified spectrophotometric determination of chymotrypsin. Trypsin and thrombin. J. Biochem. Physio 1959; 137: 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 , Homs - 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.

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

Zohreh Amoozegari^{1*}, Abbas Zare Mirak Abadi², Mozhgan Noorbehbahani³

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 Amoozegari ; Department of
Biochemistry,
Faculty of Medicine, Ahvaz
Jundishapur University of Medical
Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +989163118635
Email: zamoozegari277@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 chromatography 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 amidolytic 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 ethylester) 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