

## فیبرونکتین "چسب بیولوژیک"، استخراج، تخلیص، دوزیمتری و کاربردهای کلینیکی آن

مهرداد زمان گلزاری

بیوشیمیست بالینی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

### خلاصه:

فیبرونکتین، ترکیب گلیکوپروتئینی است که در سطح سلول، پلاسما و سایر مایعات بیولوژیک یافت می‌شود و دارای نقشهای متعددی می‌باشد بطوری که بعنوان ماده تثبیت‌کننده و سازمان‌دهنده و نیز اپسونین فعالیت می‌کند و در پدیده مهاجرت سلولی چه در دوران جنینی و چه در پروسه انعقاد خون و التیام زخم نقش بسزایی دارد.

از آنجا که مقدار فیبرونکتین در پلاسما بیش از سایر مایعات بیولوژیک می‌باشد لذا طی مراحل ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی میل ترکیبی از پلاسما استخراج و توسط کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص گردید. کیفیت و کمیت مراحل مذکور بوسیله روشهای ایمنوتوریدیمتری، الکتروفورز، ایمنودیفیوژن و ایمنوالکتروفورز تأیید شد.

### اهداف:

و کاربردی مذکور تحت عنوان "درمان زخم تروپیک مقاوم قرنيه بكمك قطره چشمی فیبرونکتین" از طرف انجمن بیوشیمی ایران جهت شرکت و ارائه در کمیته بین‌المللی شیمی کلینیکال و کسب جایزه بین‌المللی مقالات کاربردی (IFCC - AVL) برگزیده شده و مقاله دیگر تحت عنوان "جداسازی، تخلیص و تعیین مقدار فیبرونکتین پلاسمای انسان" از طرف کنگره بین‌المللی شیمی کلینیکال لندن جهت ارائه پذیرفته شده است.

- (۱) بررسی نقش فیبرونکتین در انعقاد خون و التیام زخم.
  - (۲) کاربردهای تشخیصی فیبرونکتین.
  - (۳) کاربردهای درمانی فیبرونکتین.
  - (۴) بررسی نقش فیبرونکتین در سیتواسکلتون و دینامیک سلولی.
  - (۵) نقش فیبرونکتین بعنوان اپسونین.
- اینجانب در مورد هدفهای ۱، ۳ و ۴ مقالات متعددی ارائه نموده‌ام. یکی از مقالات تحقیقاتی

سایر مقالات و محل ارائه آنها عبارتند از:

۱- بررسی نقش فیبرونکتین در سیتواسکلتون و دینامیک سلولی: کنگره بیوشیمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (۲۵ تا ۲۹ شهریور ۷۴).

۲- بررسی پارامترهای مختلف خون و فیبرونکتین در بیماری زخم بستر: دومین کنگره سراسری بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران (۲۵ تا ۲۷ آبان ۷۲).

۳- مقایسه روشهای مختلف استخراج فیبرونکتین: کنگره خون و بیماریهای مرتبط، سازمان انتقال خون، تهران (آبان ۷۳).

#### مقدمه:

فیبرونکتین (fibronectin, Fn) که از دو کلمه لاتین "fibra" بمعنای رشته و "nectere" یعنی اتصال مشتق شده (۱ و ۳)، گلیکوپروتئین سطح سلولی، پلاسمائی و سایر مایعات بیولوژیک است که به عنوان تثبیت کننده و سازمان دهنده مطرح می باشد و در مهاجرت سلولی چه در هنگام نمو جنین و چه در طی انعقاد خون نقش اساسی داشته و بعنوان اپسونین (Opsonin) نیز به شمار می رود (۱۶ و ۱۰ و ۱ و ۳).

فرم پلاسمائی آن (pFn)، محلول و هترو دimer (heterodimer) بوده و شکل سلولی آن (cFn) غیر محلول و دimer (dimer) یا بصورت

مولتیمر (multimer) می باشد (۶ و ۲ و ۱).

هر زیر واحد (subunit) فیبرونکتین واحد Mn برابر ۲۲۰ تا ۲۵۰ هزار بوده (۱۷ و ۶ و ۵ و ۳ و ۱) و ۶۰ تا ۷۰ نانومتر طول و ۲ تا ۳ نانومتر ضخامت دارد و از ۲۱۴۵ تا ۲۴۴۵ رزیدوی اسید آمینه بر حسب نوع آن تشکیل شده است (۹).

دو زیر واحد در قسمت کربوکسیل انتهائی (C-terminal) توسط پیوندهای دی سولفیدی به یکدیگر متصلند، زیر واحدها یکسان نبوده بلکه مشابهند.

فیبرونکتین حاوی جایگاههای فسفریلاسیون (۷ و ۶)، آسیلاسیون (۸) و گلیکوزیلاسیون (۱۷ و ۳ و ۱) بوده و واحد ۳ نوع سیکونس (توالی، sequence) تکراری اسید آمینه ای در ساختمان اول خود می باشد (۲).

ژن فیبرونکتین حاوی حدود ۱۵۰ اگزون (exon) بوده و مراحل اسپلایسینگ (Splicing) را به منظور سنتز انواع این ماده طی می کند (۱۵ و ۹). فیبرونکتین به صورت مولکول های نرم و سست و نامتقارن واحد نواحی متمرکز (codenced) بوده و ساختمان دوم آن تقریباً ۱۰۰٪ بصورت فرم بتا و آنتی پارالل (antiparallel -  $\beta$ form) می باشد (۴ و ۳). از نظر ساختمان سوم، زنجیرهای پلی پپتیدی فیبرونکتین حاوی نواحی متمرکز تاخورده و پیچیده یا به عبارت دیگر بصورت مناطق چندبار متراکم شده و گلوبولار (globular) مستقل سازمان یافته اند (۱۰).

ساختمان چهارم فیبرونکتین تحت تأثیر عوامل

مختلف فیزیوشیمیایی از فرم متراکم تا گسترده ۷ شکل متغیر است ولی فرم پلاسمائی آن در شرایط طبیعی بصورت فشرده می باشد (۱۷ و ۱۲ و ۱۱ و ۱۰ و ۳ و ۱).

میزان سنتز این ماده  $0.71 \text{ g/kg}$  وزن بدن بر ساعت و میزان کاتابولیسم آن  $4/81\%$  بر ساعت بوده و نیمه عمر ۲۵ ساعت دارا می باشد (۱۴).

فیبرونکتین به کلاژن، ژلاتین، فیبرین، گلیکوز آمینوگلیکان ها، اسفنگولیپیدها، استیل کولین استراز، فاکتور کمپلمان  $\text{Clq}$ ، هپارین، اسید هیالورونیک، سولفات دکستران و هپاران، DNA، باکتریها، سطوح سلولی، پروتئین واکنش گر C (CRP)، اکترین و خودش میل ترکیبی داشته و اعمال اتصال آن بصورت تعاونی (Cooperative) می باشد (۱۵ و ۱۳ و ۱۰ و ۳ و ۱). فیبرونکتین به دلیل خاصیت اتصال با ترکیبات مختلف و متعدد فوق الذکر، چسب بیولوژیک نامیده می شود.

بیوسنتز این ماده توسط بسیاری از سلول ها از جمله فیبروبلاستها، ماکروفاژها، سلولهای گلیال، اندوتلیال و اپیتلیال و نیز میوبلاستها انجام می شود.

### - کاربردها:

#### نقش فیبرونکتین در انعقاد خون و التیام

##### زخم:

فیبرونکتین یکی از اجزاء مهم تشکیل دهنده لخته

خون و در نتیجه التیام زخم می باشد بدین ترتیب که به لخته فیبرین پیوندشده و یک ماتریکس چسبنده موقتی برای سلولهای خون جهت رشد به داخل زخم به وجود می آورد. عامل متصل کننده فیبرونکتین به فیبرین، فاکتور ۱۳ فعال شده می باشد که آنزیم منعقدکننده خون یا ترنس گلوتامیناز نیز نامیده می شود. در واقع آنزیم فوق در کاتالیز چند نوع واکنش دخالت دارد:

(۱) بین ۲ پروتئین مذکور از طریق تشکیل یک پیوند کووالان اتصال عرضی برقرار می کند.

(۲) در خود فیبرین نیز پیوند عرضی ایجاد می کند و بدین ترتیب سستی واکنش میان فیبرونکتین و فیبرین جبران می شود.

(۳) پیوند عرضی کووالانس میان فیبرونکتین و فیبرینوزن برقرار می کند.

(۴) بین فیبرونکتین و خودش پیوند عرضی کووالانس ایجاد می کند.

در واقع واکنش فاکتور XIII با فیبرین، فیبرونکتین و نیز کلاژن فرآیند اصلی و ضروری در التیام زخم و ترمیم بافت محسوب می شود.

عمل مهم فیبرونکتین در لخته خون این است که فیبروبلاستها و سایر سلولهایی که زخم و جراحت را التیام می بخشند به لخته چسبیده و بر روی آن تنها زمانی که فیبرونکتین از طریق اتصال عرضی به فیبرین متصل شده حرکت می کنند.

در جراحات وارده به قرنیه چشم، لایه نازکی از فیبرین و فیبرونکتین در مکان زخم توسعه

می‌باید و سلولهای پوششی قرنیه که جراحی را بهبود می‌بخشند در طول لایه پروتئینی فوق حرکت می‌کنند.

بعلاوه مشخص و ثابت شده که فیبرونکتین اضافی، فرآیند تعمیر و مرمت را تسریع می‌نماید و در معالجه زخم قرنیه کاربرد اساسی دارد.

### کاربردهای تشخیصی فیبرونکتین:

(۱) غلظت Fn خون در DIC یا سندرم انعقاد داخل عروقی منتشر (Disseminated Intravascular Coagulation Syndrome).

(۲) غلظت Fn، اغلب در سیروز (Cirrhosis) و کولستازی (Cholestasis) افزایش می‌یابد.

(۳) غلظت خونی Fn در طی سپتیسمی (Septicemia)، ضربه و یا بعد از جراحی کاهش می‌یابد.

(۴) معمولاً فرم سلولی Fn (cFn) به دنبال هجوم ویروسهای انکوژنیک (Oncogenic) یا کارسینوژن (carcinogen) به توده‌های سلولی کاهش می‌یابد.

(۵) میزان pFn به دنبال سوختگی کاهش می‌یابد.

### کاربردهای درمانی Fn:

(۱) در درمان زخمها از جمله زخم قرنیه

(۲) درمان سپتیسمی

(۳) درمان سرطان

(۴) درمان بیماریهای کبدی

### نقش Fn در سیتواسکلتون و دینامیک سلولی:

این ماده که در سطح سلولهای نرمال، فراوان بوده و به عنوان چسب یا سیمان در اتصال سلولهای نرمال به ماده زمینه بین سلولی نقش مهمی را داراست در سطح سلولهای سرطانی وجود نداشته و علت اتصال سست سلولهای سرطانی به ماده زمینه فقدان این فاکتور می‌باشد. در ضمن ماده مذکور عامل مهمی در پهن شدن و گسترده‌گی سلولهای نرمال می‌باشد در حالی که سلولهای تومور بعلت فقدان این ماده گرد و مدور هستند (۲).

فیبرونکتین عامل ایجاد نظام و آرایش ویژه و طبیعی سیتواسکلتون (Cytoskeleton) سلولهای نرمال می‌باشد که از طریق اثر خاص خود بر روی پروتئین اکتین این عمل را انجام می‌دهد.

### نقش Fn بعنوان اپسونین:

pFn نقش یک پروتئین opsonin را داراست. اپسونین به ماده‌ای اطلاق می‌شود که قادر به انتقال و تحویل باکتری‌ها و سایر سلولها و مواد جهت فاگوسیتوز می‌باشد. pFn کلیرانس (clearance) سیستم رتیئکولواندوتلیال (reticuloendothelial) یا ماکروفاژی ذرات غیرباکتریایی از جمله کمپلکس‌های فیبرینوژن - فیبرین، بقایای کلاژن، پلاکت‌های تغییر یافته و

و تخلیص و آزمایشهای کمی و کیفی فیبرونکتین از طریق روشهای ژل فیلتراسیون (۱۸)، کروماتوگرافی میل ترکیبی (۲۰) کروماتوگرافی تعویض یونی (۲۱)، ایمنوتوربیدیمتری (۱۶)، الکتروفورز (۲۳)، ایمنودیفیوژن و ایمنوالکتروفورز (۲۵) به منظور کاربردهای متعدد کلینیکی و درمانی آن میباشد. یک کاربرد درمانی آن با موفقیت انجام شده که به زودی پس از تکمیل بررسیهای آماری، طی مقاله جداگانه‌ای به نظر علاقه‌مندان خواهد رسید و بررسی کلینیکی دیگری که اهمیت تشخیصی دارد در حال بررسی است که نتایج آن نیز جداگانه منتشر خواهد شد.

### مواد و روش‌ها:

الف) ژل فیلتراسیون، ۱- ژل سفاروز 4B (Pharmacia Uppsala, Sweden)، ۲- محلول PBS (phosphate buffer saline) 20mM با PH برابر ۷/۲ حاوی سترات سدیم ۰/۰۱ M و PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلوراید)  $10^{-4}$  M و آزید سدیم ۰/۱٪ (از این بافر جهت اکیلیبراسیون و نیز شستشوی ستون استفاده می‌گردد) ۳- محلول سترات سدیم ۰/۵٪ (از این محلول به عنوان ماده ضدانعقادی استفاده می‌شود).

۴- شرح آزمایش (۴، ۱۹، ۲۰)

ب) کروماتوگرافی میل ترکیبی:

۱- پودر CNBr activated sepharose 4B

(pharmacia, Uppsala, sweden) و ژلاتین

قطعات سلولهای آسیب‌دیده و نیز انواع باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس (staphylococcus aureus) را وساطت و تسهیل می‌نماید.

### مراحل جداسازی و تخلیص:

به منظور استفاده از فیبرونکتین در امور تحقیقاتی و کاربردهای کلینیکی آن لازم است بر اساس روشهایی دقیق این ماده از سایر مواد و ترکیبات بی‌شمار خون جداسازی و تخلیص شده و میزان موفقیت در هر مرحله به کمک روشهای خاص مورد ارزیابی قرار گیرد.

مراحل مختلف جداسازی و تخلیص این ماده و میزان خلوص و بازده عمل در هر مرحله بر اساس مقادیر حجمی، پروتئین، فیبرونکتین و فعالیت مخصوص در جدول (۱) ثبت شده و منحنی دانسیته نوری نسبت به زمان برای هر مرحله ترسیم گردیده است (نمودار شماره ۱).

جهت کنترل عینی دقت کار از روش الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل آمید (متد Laemmli) ایمنودیفیوژن به روش Ouchterlony، ایمنوالکتروفورز متد scheidegger استفاده گردید. تعیین مقدار عمومی پروتئین‌ها در مراحل مختلف به روش lowry و تعیین مقدار اختصاصی فیبرونکتین به روش ایمنوتوربیدیمتری انجام پذیرفت.

هدف از این مطالعه و بررسی تجربی، جداسازی

خالص (sigma, type 1 from swine skin).

۲- HCL یک میلی مولار (این محلول از یکطرف موجب ابقاء فعالیت گروههای واکنشگر سفاروز فعال شده می شود که در PH بالا هیدرولیز می شوند و از طرف دیگر مواد دکستران و لاکتوز را که جهت پایدار نمودن سفاروز فعال شده و حفظ دانه های پودر مذکور بدان می افزایند، می شوید.

۳- بافر کوپل کننده:  $0.1M$   $NaHCO_3$  با PH برابر  $8.3$  و  $0.5M$   $NaCl$  شرایط مساعد را جهت حل شدن ژلاتین و کوپل نمودن با سفاروز فعال شده مهیا می سازد و از طرف دیگر به منظور خارج ساختن ژلاتین اضافی از ژل بکار رفته و نیز غلظت بالای  $NaCl$  واکنش پروتئین - پروتئین را که بعلت طبیعت پلی الکترولیت پروتئین ها انجام می شود بحداقل می رساند).

۴- عامل بلوکه کننده:  $0.2M$  گلیسین با PH برابر  $8$  (این محلول گروههای فعال باقیمانده در سفاروز فعال شده جفت شده با ژلاتین را بلوکه می کند تا با سایر مواد واکنش نکند).

۵- محلول  $NaCl$ : حاوی  $10^{-4}$  PMSF (از این محلول جهت شستشوی هیپارین از ستون ژلاتین - سفاروزی که فیبرونکتین به آن چسبیده قبل از استخراج فیبرونکتین استفاده می شود).

۶- اوره  $8M$  (این محلول موجب شستشوی پروتئین اضافی می شود زیرا سیانات حاصله از تجزیه اوره با گروههای آمینوی آزاد پروتئین ها واکنش می کند).

۷- محلول PBS

۸- محلول استخراج کننده: اوره  $4M$ ، بافر تریس  $0.5M$  با PH برابر  $7.5$  حاوی  $10^{-4}M$  PMSF و  $0.1\%$   $NaN_3$  (از آنجائیکه وجود یا تشکیل یون سیانات از اوره در هنگام استخراج فیبرونکتین ایجاد اشکال می کند از بافر تریس در تهیه این محلول استفاده می شود تا گروههای آمینو جهت ترکیب با سیانات بوجود آیند. بدین منظور که سیانات با گروههای آمینوی آزاد فیبرونکتین ترکیب نشوند و اوره یونیزه نشده موجب استخراج فیبرونکتین و شستشوی آن از ستون شود).

۹- شرح آزمایش (۱، ۲۰)

ب) کروماتوگرافی تعویض یونی:

۱- پودر DE-52

۲- بافر اکیلیبراسیون DE-52، اوره  $4/5$  و تریس  $0.1M$  با PH برابر  $7.2$  (آنیونهای موجود در این بافر با کاتیونهای ستون DE-52 پیوندشده و محیط را آماده تبادل یون می نماید)  $0.3M$   $NaCl$  (بکاربردن گرادیان افزایشی  $NaCl$  همراه بافر DE-52 بتدریج قدرت یونی با فرز را افزایش داده موجب جداسازی فیبرونکتین از ستون می گردد).

۴- شرح آزمایش (۱)

ت) دیالیز غلظتی:

۱- کیسه دیالیز

۲- محلول  $0.3\%$  (W.V) سولفید سدیم (جهت شستشوی ترکیبات سولفور از کیسه دیالیز)

۳- محلول  $0.2\%$  (V/V) اسید سولفوریک

۳mA و بازاء هر اسلب ۲۵mA بکار برده شده، هر الکتروفورز حدود ۳ ساعت بطول انجامید.

ج) ایمنودیفیوژن:

۱- بافر باربیتال: ۱۰ گرم سدیم باربیتال + ۱/۶ گرم اسید باربیتوریک + آب مقطر با تنظیم PH روی ۸/۶ به حجم ۱۰۰۰ ml رسانده می شود.

۲- محلول آنتی فیبرونکتین انسانی: آنتی سرم لیوفیلیزه (Sigma) ۲ ml + آب دیونیزه با غلظت ۲۲/۵mg/ml.

۳- بافر تریس ۱۰۰mmol/lit با  $PH=8/0$  (جهت رقیق سازی فیبرونکتین از این بافر استفاده می شود).

۴- محلول آگار: ۱ یا ۱/۵ گرم پودر ۱۰۰ml بافر باربیتال گرم + ۱/۱ گرم آزید سدیم.

۵- محلول آمیدوشوارتز (کوماسی بلو).

۶- محلول رنگ بر: ۴۵ml متانول + ۱۰ml اسید استیک + ۴۵ml آب مقطر.

۷- شرح آزمایش (۱۹،۲۵): بر روی هریک از اسلایدهای تمیز به ابعاد ۷۶×۵۶ میلی متر بصورت سریع و یکساخت ۸ میلی لیتر محلول آگار بمنظور ایجاد ضخامت ۲ میلی متر اضافه گردیده، توسط ژل کاتر در هر منطقه از هر اسلاید ۷ حفره در اطراف ایجاد و در حفره مرکزی هریک از مناطق آنتی فیبرونکتین با رقت مشخص و در حفره های اطراف نمونه مورد نظر (آنتی ژن) به ترتیبی که ذکر خواهد شد اضافه می شود تا در صورت اکی والاسیون رسوب پایداری تشکیل شود و سرانجام مراحل تثبیت و رنگ آمیزی

۴- محلول ۰/۱٪ آزید سدیم.

۵- شرح آزمایش (۱۹).

ث) تعیین مقدار پروتئین ها:

۱- محلول ۱٪ سولفات مس

۲- محلول A: محلول ۲٪ تارترات مضاعف سدیم و پتاسیم

۳- محلول C: محلول ۲٪ کربنات سدیم در سود ۰/۱ نرمال.

۴- معرف مخلوط: ۱ واحد A + ۱ واحد محلول B + ۹۸ واحد محلول C (پایدار بمدت ۱ روز).

۵- معرف فولین سیوکالتو ۲N (۲ بار رقیق شود)

۶- محلول پروتئین استاندارد: اوآلبومین ۱۰mg/100ml.

۷- شرح آزمایش (۲۲)

ج) الکتروفورز:

۱- ذخیره محلول اکریل آمید و بیس اکریل آمید: ۳۰٪ اکریل آمید، ۰/۸٪ بیس و ۱/۱۲۵ مولار تریس.

۲- محلول رنگ آمیزی: ۲٪ کوماسی بریلیانت بلو (R-۲۵۰)، ۵۰٪ متانول، ۱۰٪ اسید استیک و ۰/۰۵٪ مرکاپتواتانول.

۳- محلول رنگ بر: ۲۰٪ متانول، ۵٪ اسید استیک و ۷۵٪ آب مقطر.

۴- محلول نگاهداری (شستشو): ۷/۵٪ اسید استیک.

۵- شرح آزمایش (۲۴): دو روش دیسک و اسلب الکتروفورز به روش Laemmli با درصدهای مختلف ژل وضعیت جریان ثابت به ازاء هر لوله

اسلایدها انجام می پذیرد.

ح) ایمنوالکتروفورز:

محلولهای مورد نیاز علاوه بر آنچه که در مورد ایمنودیفرانژن ذکر گردید عبارتند از:

۱- بافر PBS یا تامپون سرم فیزیولوژی (۹ گرم نمک طعام + ۲/۷ گرم فسفات دی پتاسیک ۲۲۰ ml فسفات منو پتاسیک + آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml برسد).

۲- شرح آزمایش (۱۹،۲۵): به ۷ اسلاید هر یک به ابعاد ۷۶×۲۶ mm و ضخامت ۲ میلی متر آگاروز اضافه گردید و توسط ژل کاتریک شیار طولی در وسط و دو حفره در دو طرف شیار وسط ایجاد شد و فقط ژل موجود در دو حفره خارج می گردد و نمونه های مورد نظر آنتی ژن به ترتیبی که ذکر خواهد شد در حفرات اضافه گردیده و اسلایدها در دستگاه ایمنوالکتروفورز قرار گرفته و دستگاه به منبع نیرو متصل و روی ولتاژ ثابت ۷۵ ولت و ۲/۵ mA به ازاء هر اسلاید تنظیم می گردد. مدت الکتروفورز ۱/۵ ساعت می باشد. حال شیارهای طولی در هر اسلاید خالی شده و آنتی سرم به ترتیبی که ذکر می شود اضافه می گردد و در صورتیکه بعد از چند روز رسوب قابل تشخیصی تشکیل گردید اسلایدها در PBS یک ساعت قرار داده شد و بعد شکافهای وسط توسط ژل پر شده و در محیط مرطوب انکوبه و سپس رنگ آمیزی می گردند.

خ) ایمنوتوربیدیمتری:

۱- بافر آنتی سرم = بافر فسفات ۱۰۰ mmol/lit با PH برابر ۷/۴ و ۳٪ (W/V) پلی اتیلن گلیکول حاوی یا فاقد ۰/۴٪ SDS (این بافر PH مناسب را تأمین و افزایش دهنده پلیمریزاسیون آنتی ژن - آنتی بادی می باشد).

۲- آنتی فیبرونکتین و بافر تریس (قبلاً ذکر گردید).

۳- محلول ترکیب واکنش: ۱ حجم آنتی سرم + ۱۰ حجم بافر آنتی سرم.

۴- شرح آزمایش (۱۶): دو روش وجود دارد:

۱- روش نقطه انتهایی.

۲- روش زمان تثبیت شده که هر دو به تقلید از بروشور کیت انجام می پذیرد.

### نتایج و تفسیر:

حجم کلی ماده مورد نظر × ضریب رقت × (میانگین) جذب نمونه ماده مورد نظر = جذب کلی ماده مورد نظر (در ۲۸۰ نانومتر).

$227/5 = 0/350 \times 100 \times 6$  = جذب کلی پلاسما ی اولیه (پلاسما ی اضافه شده به ستون سفاروز).

$126 = 0/060 \times 100 \times 21$  = جذب کلی پلاسما ی جمع آوری شده از ستون سفاروز.

۱- اختلاف میان دو جذب نوری مذکور ناشی از ژل فیلتراسیون پلاسما است که قسمتی از اختلاف مذکور مربوط به جذب ایمنوگلوبولین ها و سایر ترکیبات متصل شونده به ستون سفاروز و قسمتی دیگر مربوط به رقت حاصله از عمل

مذکور از آنجائی که محلول فیبرونکتین تنها حاوی مقدار کمی ترکیب ناخواسته بوده و تفکیک و تجزیه و تحلیل خوب است، بافر حد (بافر حاوی قدرت یونی بالا) باید ترجیحاً به اندازه کافی قوی باشد تا فیبرونکتین که خیلی محکم پیوند شده شستشو شود.

۶- در مقایسه باندهای پروتئینی در مراحل مختلف استخراج فیبرونکتین نشان می‌دهد که یک باند در ژل الکتروفورز اسلب ۸٪ و ۳٪ در بین باندهای ابتدایی (نزدیک به مرز ژل Stacking separating) پلاسمای استخراجی از ستون ژلاتین سفاروز در مقایسه با باند همپراز خود در پلاسمای جمع‌آوری شده از ستون سفاروز و پلاسمای اولیه وجود ندارد و در موقعیت همپراز ژل فیبرونکتین حاصله از ستون ژلاتین سفاروز حاصله از ستون DE-52 که تنها یک باند دارند ظاهر شده که عملاً نقش کروماتوگرافی میل ترکیبی و دقت عمل این مرحله را کاملاً اثبات می‌کند و مقایسه محل باند مذکور با باند استاندارد فیبرونکتین اثبات می‌کند که باند مذکور فیبرونکتین می‌باشد.

۷- از آنجاییکه محلول فیبرونکتین استاندارد مورد استفاده خالص نبوده و حاوی BSA (آلبومین سرم گاوی) می‌باشد ولی از طرف دیگر غلظت فیبرونکتین در هر یک از محلولهای استاندارد مشخص شده با مقایسه باندهای حاصله از الکتروفورز دیسک ۵٪ و ۳٪ می‌توان باند فیبرونکتین را از باندهای BSA تمیز داد.

ژل فیلتراسیون مذکور می‌باشد.

$16/8 = 100 \times 0/65 =$  جذب کلی پیک پلاسمای جمع‌آوری شده از ستون ژلاتین - سفاروز.

$0/92 = 1 \times 3 \times 0/31 =$  جذب کلی پیک فیبرونکتین جمع‌آوری شده از ستون ژلاتین سفاروز.

$\frac{1}{18} = \frac{0/92}{16/8} =$  نسبت بین ماکزیمم جذب فیبرونکتین به پلاسمای (منهای فیبرونکتین) .

۲- نسبت مذکور متناسب با نسبت به دست آمده از مقاله است و مقایسه مذکور بیانگر دقت و صحت آزمایش می‌باشد.

$0/4 = 11 \times 1 \times 0/36 =$  جذب کلی فراکسیونهای جمع‌آوری شده فیبرونکتین از ستون DE-52 .

۳- افزایش مستمر (تدریجی) و خطی قدرت یونی موجب افزایش رقابت و در نتیجه کاهش واکنش میان تعویض‌کننده یون و مواد نمونه و در نهایت شستشوی ماده مورد نظر از ستون DE-52 گردیده و تفکیک مطلوبی را به دست می‌دهد.

۴- حجم کلی بافر (محلول) شستشودهنده در یک گرادیان باید حدود ۵ برابر حجم ستون تعویض‌کننده یون باشد. گرادیانهای طولانی‌تر (با شیب کم) می‌توانند منجر به گستردگی بیش از منحنی و رقت نمونه شوند. گرادیانهای کوتاه‌تر (با شیب زیاد) معمولاً نمی‌توانند به اندازه کافی منجر به جداسازی شوند.

۵- در آزمایش کروماتوگرافی تعویض یونی

۸- هر قدر وزن مولکولی ماده بیشتر باشد انتشار دیرتر صورت گرفته و واکنش آنتی ژن با آنتی بادی به تعویق می افتد.

۹- اگر شرایط اکسی والان بودن بین آنتی ژن و آنتی بادی برقرار نشود یا رسوبی تشکیل نمی شود و یا اگر تشکیل شود یا کمرنگ می باشد و یا در نزدیکی یکی از دو حفره تشکیل می شود.

۱۰- رسوبهای تشکیل شده در یک منطقه در جایی که بهم می رسند اگر متقاطع نباشند نشانه آنتی ژنیک می باشد که در آزمایشهای فوق اینگونه بوده و اگر متقاطع باشند نشانه تفاوت آنتی ژنیک می باشند.

۱۱- در طی آزمایشهای فوق تمام احتمالات جهت اکسی والاسیون اجرا شده و همانگونه که مشاهده می شود بهترین رقت آنتی فیبرونکتین  $\frac{1}{6}$  می باشد.

۱۲- جهت حرکت فیبرونکتین در ایمنوالکتروفورز از قطب منفی بطرف قطب مثبت می باشد ولی به علت وزن مولکولی زیاد حرکت زیادی نمی نمایند.

۱۳- در این مرحله با تجربه ای که از مرحله هشتم به دست آمده بود رقت  $\frac{1}{6}$  و نیز  $\frac{1}{4}$  برای آنتی فیبرونکتین بکار برده شده و نتیجه خوبی به دست آمد.

۱۴- آزمایشهای الکتروفورز، ایمنودیفیوژن و ایمنوالکتروفورز دلیل قاطعی جهت اثبات وجود فیبرونکتین می باشد و بصورت کیفی آن را ثابت می نماید.

۱۵- تعیین مقدار فیبرونکتین به روش

ایمنوتوربیدیمتری بسیار ساده می باشد ولی باید به دقت انجام شده و چندبار تکرار شود تا میانگین به دست آمده برای هر نمونه نتیجه خوبی داشته باشد.

۱۶- مقایسه تمام نتایج به دست آمده نشان می دهد که تغییرات جذب نوری ( $\Delta d$ ) در حضور دترژان کمی بالاتر از حالتی است که دترژان موجود نیست.

۱۷- آزمایش ایمنوتوربیدیمتری بدون استفاده از کسیت ولی به تقلید از بروشور آن انجام شد بطوری که تمام محلولها و بافرها شخصاً تهیه گردید و تنها از محلولهای استاندارد فیبرونکتین کیت استفاده گردید.

۱۸- منحنی استاندارد ایمنوتوربیدیمتری فیبرونکتین چه طبق مقاله اصلی و چه طبق نتایج به دست آمده به صورت تقریباً محدب بوده و در غلظتهای بالاتر از حدود  $800 \mu\text{g/ml}$  به تدریج درجه تحدب بیشتر می شود.

۱۹- مهمترین و اساسی ترین مرحله در استخراج فیبرونکتین، مرحله کروماتوگرافی میل ترکیبی بوده است و میزان اتلاف پروتئین بصورت فیبرونکتین بعلت خاصیت میل ترکیبی بسیار بالای ستون به فیبرونکتین بسیار کم می باشد. کروماتوگرافی تبادل یون و ژل فیلتراسیون به ترتیب در درجه دوم و سوم اهمیت می باشند.

۲۰- در اکثر مقالات، جهت استخراج فیبرونکتین تنها مرحله کروماتوگرافی میل ترکیبی پیشنهاد می شود که جهت کارهای تحقیقاتی و نیز

تهیه محلولهای استاندارد کافی به نظر می‌رسد اما  
تحقیقات بیوشیمی فیزیکی هر سه مرحله  
جهت کاربردهای کلینیکی و درمانی و نیز  
کروماتوگرافی باید به ترتیب به کار رود.

## REFERENCES:

1. Ruoslahti, E., Hayman, E.G.; pierschbacher, M.E Engvall, E.: methods in-Enzymology , 82 , 803 - 831(1982).
2. Hynes, R.O. ; Scientific American , 245 , 6,32-42(1986).
3. Yamada, K.M. , E Olden , K. : Nature , 275 , sep . 21 .(1978).
4. Lngvall , E. , E Rouslahti , E. , Int.J.Cancer ; 20,1-5(1977).
5. Mosher, E.F. ; J.Biol . Chem . 250 . 6614-6621(1975).
6. Ali, I.U. ; FEBS lett. 176,1.169-175(1984).
7. Etheredge, R.E., Han, S. Fossel, E., Tanzer, M.L.E Glimcher M.J.; FEBS lett. 186,2,256-262(1985).
8. Mutschler, J.L. ; FEBS lett . 201,2,210-214(1986).
9. Gutman, A. Yamada, K.M.E Kornblihtt, A. ; FEBS lett , 207,1145-148(1986).
10. Osterlund, F. Eronen, I., osterlund, K.E Vacanto, M.; Biochemistry 24,2001-2667(1985).
11. Ingham, K.C. Brew, S. Abroekelmann, I.J.E Mc Donald, J.A. ; Biol.Chem. 259,19,11901-11907(1984).
12. Rocco, M., Arezu, O.E Zardi, I ; FEBS lett., 178,2,327-330(1984).
13. Tamkun, J.W.E Hynes, R.O. ; J.Biol.Chem. 258,7,4641-4647,(1983).
14. Pussell, B.A., Peake, P.W., Broen, M.A.E Charles Worth, J.A., J. Clin. Invest 76,143-148(1985).
15. Garica-pardo, A., pearlstein, E.E Frangione, B.; Biol.Chem 260,18,10320-10325(1985).
16. Saba, T. Malbert, W.H. Blumenstock, F.A., Evanoga, G. Fritz, S.E Cho, E.; J. Lab Clin. med. Med. 98,4,482-491(1981).
17. Homandberg, G.A.E Erickson, H.P.; Biochemistry, 25,22,6917-6925(1986).
18. Gel filtration theory and practice; pharmacia fine chemicals , Uppsala, sweden (1982-3).
19. Zardi, I. Siri, A. Carnemolla, B. cosulich, E. viale G, E santi, L. j Immunology met. 34,155-165(1980).
20. Affinity Chromatography; pharmacia fine chemicals , uppsala Sweden (1983).
21. Ion Exchange Chromatography; pharmacia fine chemicals , Uppsala, Sweden(1983).

22.Lowry,O.H.E Bessey,O.A.:J.Chem.,163.633(1946).

23.Tietz.Textbook of Clinical chemistry,Section Three,p.98-135(1986).

24.Laemmli,U.K.;Nature,227,Aug 15,608-686(1970).

25.Ouchterlong ,O,E Nelsson,I.A.;handbook of experimental Immunology chapter 19(1973).

جدول شماره ۱

| Sage No | purificatio Stages                                    | Total Volume (ml) | protein(1) (μg/ml) | Total(2) protein (μg) | Total(3) FN (μg) | Total FN Total Pr. (%) | fold(4) | Yield(5) % |
|---------|-------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------------|---------|------------|
| 0       | plasma                                                | 6.5               | 60,000             | 390,000               | 3380             | 0.86                   | 1       | 100        |
| 1       | Gel filtration on Sepharose 4B==>plasma(1)            | 21                | 5750               | 120,750               | 3360             | 2.8                    | 3.25    | 99         |
| 2       | Affinity chromatography on qelatinsepharose4B==>FN(2) | 11                | 325                | 3575                  | 3300             | 92                     | 107     | 97.6       |
| 3       | Ion exchange chromatography on DE-52==>FN(3)          | 11                | 110                | 1210                  | 1199             | 99                     | 115     | 35.5       |

1.Protein dosage :by lowry procedure

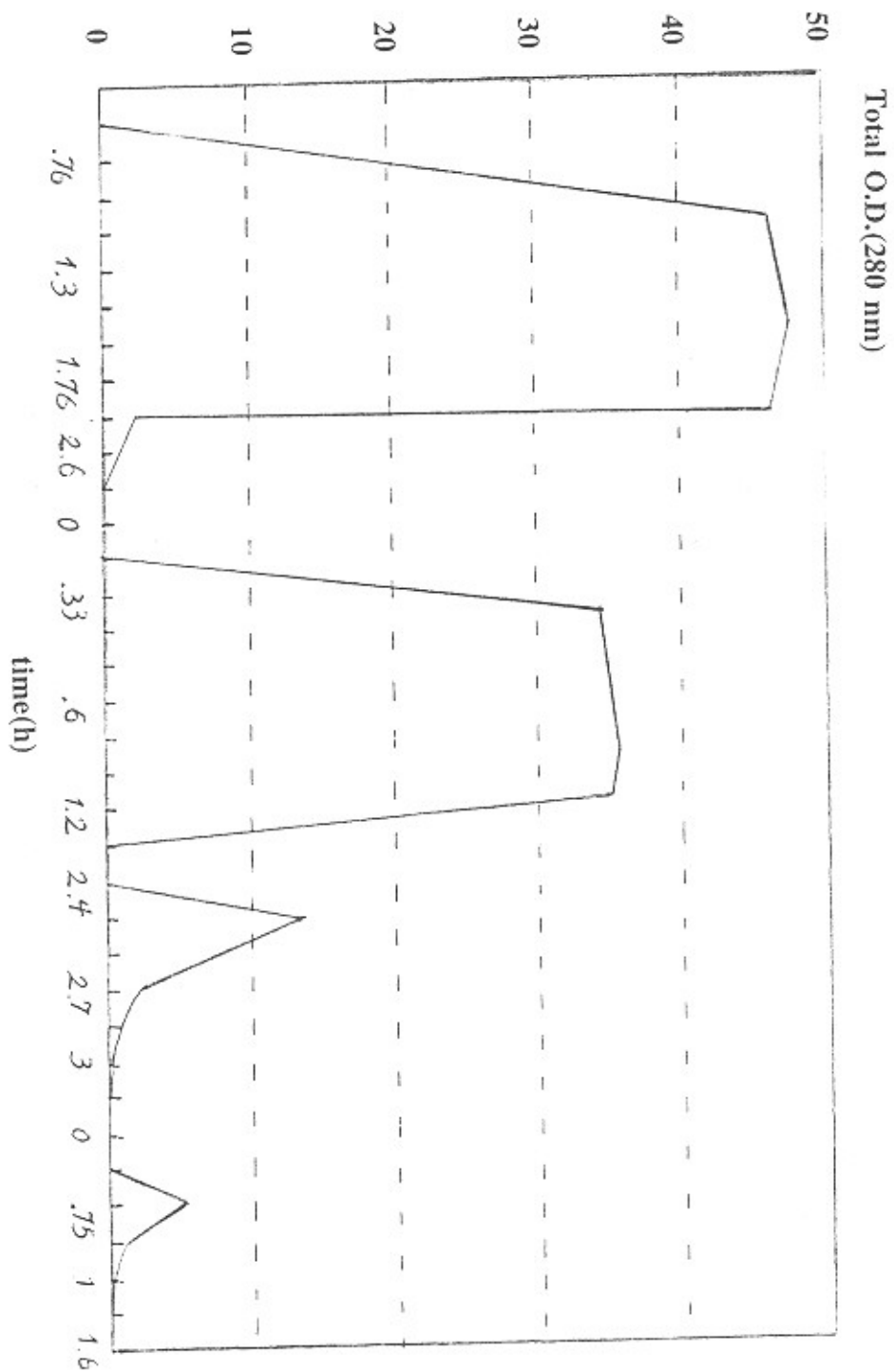
2.Total Protein =protein x Total Volume

3.Total in dosage = FN (by immunoturbidimetric assay ) x total volume

4.Fold = Tot.FN/Tot.Pr.(Step) %/Tot.FN./Tot.Pr.(Initial) %

5.Yield = Tot.FN.(Step)/Tot.FN(Initial)

## Separation and purification of FN



نمودار (۱): منحنی دانسیته نوری کل، نسبت به زمان برای مراحل ژل فیلتراسیون (۱)، کروماتوگرافی میل ترکیبی (۲ و ۳) و کروماتوگرافی تبادل یونی (۴) (به ترتیب از چپ به راست شماره منحنی‌ها در پراگت در هر مرحله ذکر گردیده) فیبرونکتین پلاسما