مقایسه روش‌های مختلف استخراج فیبرونکتین و نقش‌های درمانی آن

مهرداد زمان گلزاری ـ بیوشیمیست بالینی ، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

خلاصه

فیبرونکتین یکی از فاکتورهای مهم خون از نظر کمی و کیفی بشمار می‌رود. این گلیکو پروتئین که توسط بسیاری از سلولها سنتز و ترشح می‌شود، دارای غلظت پلاسمایی حدود ۰/۳mg/ml می‌باشد،لذا پلاسما منبع مناسبی جهت استخراج آن محسوب می‌گردد.

روشهای مختلفی جهت استخراج فیبرونکتین از خون وجود دارند که بنا به درجه خلوص و کاربرد، متنوع می‌باشند(۳). ساده‌ترین متد تهیه کریوپریسیپیتات پلاسما و طولانی‌ترین آنها جداسازی افتراقی است. روش ترکیبی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی میل ترکیبی و تعویض یونی، متدی مطلوب، دقیق، سریع با درجه خلوص بسیار بالا محسوب می‌شوند و کروماتوگرافی میل ترکیبی مهمترین مرحله آن بشمار می‌رود، روش ترکیبی مذکور جهت تولید انبوه و کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کاربردهای درمانی فیبرونکتین متعدد می‌باشند که از آن جمله می‌توان به نقش این ماده در درمان بیمارهای عفونی، اولسر مقاوم قرنیه، تسریع در التیام زخم، انعقاد خون و سوختگیها اشاره نمود.(۱۱-۱).

واژه‌های کلیدی :

ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، روشهای استخراج فیبرونکتین، نقش درمانی، درجه خلوص، بازده، pFN،کریوپریسیپیتات، سیکاتریکس.

اهداف :

۱- بدست آوردن بهترین و مناسب‌ترین روش استخراج فیبرونکتین از نظر درجه خلوص، زمان جداسازی و بازده عمل .

۲- استفاده از هدف (۱) بمنظور کاربردهای درمانی این ماده.

مقدمه

فیبرونکتین (Fn) بمعنای رشته اتصالی، اولین بار در سال ۱۹۴۸ توسط موریسون و همکارانش در پلاسما کشف گردید. مولکول فیبرونکتین پلاسمایی (pFn) بصورت یک هترودیمر با وزن مولکولی ۴۵۰kDa بوده و محتوی حدود ۵٪ کربوهیدرات می‌باشد. این ماده عمدتاً توسط هپاتوسیت‌ها و سلولهای اندوتلیال سنتز و ترشح شده و بمیزان ۰/۳mg/ml پلاسما در آن وجود دارد لذا پلاسما منبع مناسبی جهت جداسازی آن می‌باشد.

pFn واجد مناطق اتصالی با ماکرو مولکولهایی همچون کلاژن، فیبرین، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و نیز سلولها و باکتریها می‌باشد.

این ماده نقش مهمی در انعقاد خون و التیام زخم ایفا می‌کند، بطوری که فاکتور XIII فعال(آنزیم ترنسگلوتامیناز)واکنش ماده مذکور را با خودش و با فیبرین از طریق تشکیل پیوندهای عرضی کووالانسی کاتالیز می‌نماید تا بدین ترتیب، ماتریکس چسبنده‌ای جهت تثبیت گلبولهای قرمز و پلاکت‌ها و انقباض لخته در محل جراحت ایجاد شود و عمل انعقاد صورت گیرد. در پروسه التیام زخم و ترمیم بافت، ماتریکس فیبرونکتین ـ کلاژن جهت الصاق فیبروبلاست‌ها و سایر سلولها در موضع عمل می‌کند.

روش :

۱- ساده‌ترین و قدیمترین روش جداسازی pFn، تهیه

کریوپریسیپیتات پلاسما(رسوب پلاسما در ۴ درجه سانتیگراد) می‌باشد. قسمت عمده این رسوب **Fn** می‌باشد که بعلت تمایل جهت تشکیل پیوند و رسوب بسافیبرینوژن و بعضی پروتئین‌ها(فاکتورهای **VIII**و **XIII** در سرما حاصل می‌شود. مقدار یک حجم از محلول سیترات سدیم ۵٪ با چهار حجم خون مخلوط شده سپس پلاسما جدا می‌گردد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده می‌شود. رسوب حاصله کریوپریسیپیتات است که قابل جداسازی و استفاده می‌باشد. جهت مهار اثر پروتئازهای پلاسما بر روی **Fn** ۰/۲ حجم از محلول **PMSF** $۱۰^{-۴}$ **M** به پلاسمای جمع‌آوری شده افزوده می‌شود.(نمودار ۱).

۲- طولانی‌ترین روش جداسازی **pFn** استفاده از مرحله ته‌نشینی افتراقی، کروماتوگرافی تعویض یونی، الکتروفورز،دیالیز و ژل‌فیلتراسیون می‌باشند که بکمک محلول و بافرهای مختلف طبق نمودار ۲ می‌توان **Fn** خالص را جهت مصارف مختلف از جمله تهیه آنتی **Fn** و مطالعات ساختمانی و بیوشیمیایی بدست آورد.(نمودار۲).

۳- روش کروماتوگرافی میل ترکیبی پلاسما بر روی ستون ژلاتین سفاروز **4B**که در آن بر حسب استفاده، از چند نوع بافر و محلول‌های مختلف، شستشو و استخراج ستون می‌توان چهار نوع محلول **Fn** از نظر بازده عمل بدست آورد(نمودار۳).

۴- روش کروماتوگرافی میل ترکیبی پلاسما بر روی ستون هپارین ـ سفاروز**CL-6B** که در آن بکمک محلولهای شستشو و استخراج، **pFn** قابل جداسازی است(نمودار۴).

۵- روش استخراج بر روی ستون آنتی **Fn**، این روش با بازده بالایی همراه است.

در این متد جهت تهیه ستون، ابتدا**Fn** انسانی توسط یکی از روشهای واجد بازده بالا تهیه شده و به خرگوش تزریق می‌گردد تا عمل ایمن‌سازی انجام شود؛ سپس سرم این حیوان که حاوی **Anti Fn** و مقداری آنتی‌بادی بر علیه سایر پروتئین‌های همراه **Fn** می‌باشد از ستون حاوی سرم انسانی فاقد **Fn** عبور داده می‌شود تا فقط **Anti Fn** خارج شده و از آن بمنظور تهیه ستون مورد نظر استفاده شود.**pFn** ضمن عبور از این ستون به آنتی‌بادی خود متصل گردیده و بقیه پلاسما خارج می‌شود. حال میتوان با غلظت‌های کم اوره **pFn** را شستشو و استخراج نمود(نمودار۵).

۶- روش ترکیبی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی میل ترکیبی و تعویض یونی .

تکنیک فوق بسیار مطلوب، دقیق ، سریع و با درجه خلوص بسیار بالا می‌باشد. اگر مراحل مختلف این روش از نظر میزان پروتئین، میزان **Fn**، درصد نسبت این دو بیکدیگر، درجه خلوص و بازده عمل با یکدیگر مقایسه شوند(جدول ۱ و هیستوگرام ۱و۲) می‌توان به این نتیجه رسید که مهمترین مرحله جداسازی و تخلیص در این روش، کروماتوگرافی میل ترکیبی است. ابتدا پلاسما از ستون سفاروز **4B** عبور داده می‌شود تا حدی از ترکیبات مختلف بویژه ایمنوگلوبولین‌ها تصفیه شود؛ سپس پلاسمای صاف شده، از ستون ژلاتین ـ سفاروز **4B** عبور داده می‌شود تا تمام ترکیبات پلاسما به جز **Fn** عبور کنند. بکمک بافر استخراج کننده **Fn** از ستون شسته می‌شود، از آنجا که همراه این ماده مقدار کمی ترکیبات دیگر از جمله گلیکوزآمینوگلیکان و پروتئوگلیکان‌ها نیز وجود دارند لذا محلول **Fn** از ستون تعویض یونی **DE-52** بکمک گرادیان افزایشی **NaCl** و بافر ستون عبور داده می‌شود تا کاملاً تخلیص گردد.(نمودار۶).

نتایج

هر یک از روشهای یاد شده ویژگیها و کاربردهای خاصی را دارا می‌باشند.

روش ۱ بازده بسیار بالا و درجه خلوص پائینی را داراست و چون از نظر اقتصادی بسیار کم هزینه می‌باشد لذا از آن می‌توان جهت تهیه معرف کیت‌های

تشخیصی استفاده نمود.

روش ۶ درجه خلوص بسیار بالا (۱۱۵ برابر) و بازده ۳۵/۵٪ دارا می‌باشد و در کارهای تحقیقاتی از نظر مطالعه ساختمان مولکول، تهیه **Anti Fn**، کاربردهای تشخیصی، درمانی قابل استفاده می‌باشد.

میزان خلوص و کاربردهای روش ۲ همانند روش ۶ می‌باشد اما بازده کمتری داشته و وقت‌گیرتر است.

روش ۳ بسر حسب نوع بافر واجد بازده‌های ۹۷٪،۴۵٪،۴۰٪،۱۵٪ و درجه خلوص ۱۰۰ برابر داراست و کاربردهای آن مشابه روش ۲ و ۶ می‌باشد.

مزیت این روش صرف زمان کوتاه جهت استخراج **Fn** می‌باشد(حدود ۳ ساعت) بعلاوه یکی از متدهای روش مذکور واجد بازده و درجه خلوص بسیار بالاست.

بازده روش ۴ بسیار پایین و درجه خلوص آن کمتر از روش ۳ می‌باشد.

روش ۵ درجه خلوص و بازده بسیار بالایی دارد و از این نظر و نیز از جنبه کاربردی مشابه روش ۳ می‌باشد.

کاربرد

۱- در بیماران عفونی ، مجروح، آسیب‌دیده و دچار سوختگی، **pFn** بعلت نقش اُپسونیک آن مصرف شده و کاهش می‌یابد، لذا اندازه‌گیری غلظت **pFn** در اینگونه بیماران می‌تواند بعنوان یک مارکر عمل نموده و در کنار درمان‌های متداول، جایگزین آن از طریق تزریق می‌تواند موجب تسریع در امر بهبودی گردد.

۲- تشکیل سیکاتریکس ناشی از زخم قرنیه از علل اصلی کوری و اختلال دید در سراسر دنیا می‌باشد. زخم تروفیک استرومایی که عارضه مواردی از زخمهای قرنیه می‌باشد با نقص اپیتلیالی مقاوم مشخص می‌شود بطوری که در لبه‌های زخم، این سلولها روی هم جمع شده و قادر به پوشاندن سطح زخم نمی‌باشند. در صورت عدم درمان سریع و کامل، این وضعیت منجربه تخریب شدید استروما و عفونت باکتریایی یا قارچی ثانویه می‌شود. در مواردی که درمانهای رایج مؤثر واقع نشوند، می‌توان از قطره چشمی **Fn** برای این منظور استفاده نمود که تقریباً در تمامی مواردی منجربه بهبودی می‌گردد.

پس از مطالعه و مقایسه عملی روشهای مختلف استخراج **pFn**، از متد آخر جهت جداسازی و تخلیص این ماده و تهیه قطره چشمی استریل بمنظور درمان زخمهای تروفیک قرنیه استفاده نمودیم. (۱۷-۱۲ و ۱۰)

این بررسی و تحقیق در بیمارستان فارابی و دپارتمان بیوشیمی پزشکی دانشگاه تهران با همکاری خانم دکتر رحیمی و آقای دکتر اصغرنیا در سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۷۱ بر روی ۵ بیمار با عارضه وبا، تبخال، آسیبهای شیمیایی و ملتحمه بصورت **Double blind** با موفقیت انجام شد. به امید پروردگار نتایج این پروژه را در شماره‌های بعدی این مجله بصورت یک مقاله تحقیقی عنوان خواهیم نمود.

البته جهت مطالعه آماری نیاز به بیماران بیشتری می‌باشد که امیدواریم بصورت یک طرح پژوهشی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه و با همکاری دانشجویان علاقمند این امر صورت پذیرد.

۳- افزودن **Fn** در محل پانسمان زخم می‌تواند موجب تسریع در التیام زخم گردد که این مسئله بویژه در زخم بستر حائز اهمیت می‌باشد.

سطح خونی **Fn** و سایر پارامترهای انعقادی در بیماران دچار زخم بستر که در کشور ما تعداد آنها زیاد است در بیمارستان یاسر، با همکاری مرکز ضایعات نخاعی جانبازان و معلولین و بیمارستان بقیةا...(عج) اندازه‌گیری و بصورت مقاله‌ای در دومین کنگره بین المللی بیوشیمی ارائه شد(۱۱).

امیدواریم این پروژه نیز بصورت یک طرح پژوهشی با کاربرد درمانی در این بیماران انجام پذیرد.

جدول ۱ - مقایسه مراحل جداسازی و تخلیص **pFn** با توجه به پارامترهای مختلف.

stage No.	Purification stages	Total Vol. (ml)	protein (mg/ml) (1)	total protein (mg) (2)	total Fn (µg) (3)	total Fn/ total prot. (%)	Fold (4)	yield (%) (5)
0	Plasma	6.5	60000	390000	3380	0.86	1	100
1	gel filtration on sepharose 4B	21	5750	120750	3360	2.8	3.25	99
2	affinity chromatography on gelatin-sepharose 4B	11	325	3575	3300	92	107	97.6
3	ion exchange chromatography on DE-52	11	110	1210	2475	204.5	115	35.5

(1) protein dosage = by lowry procedure

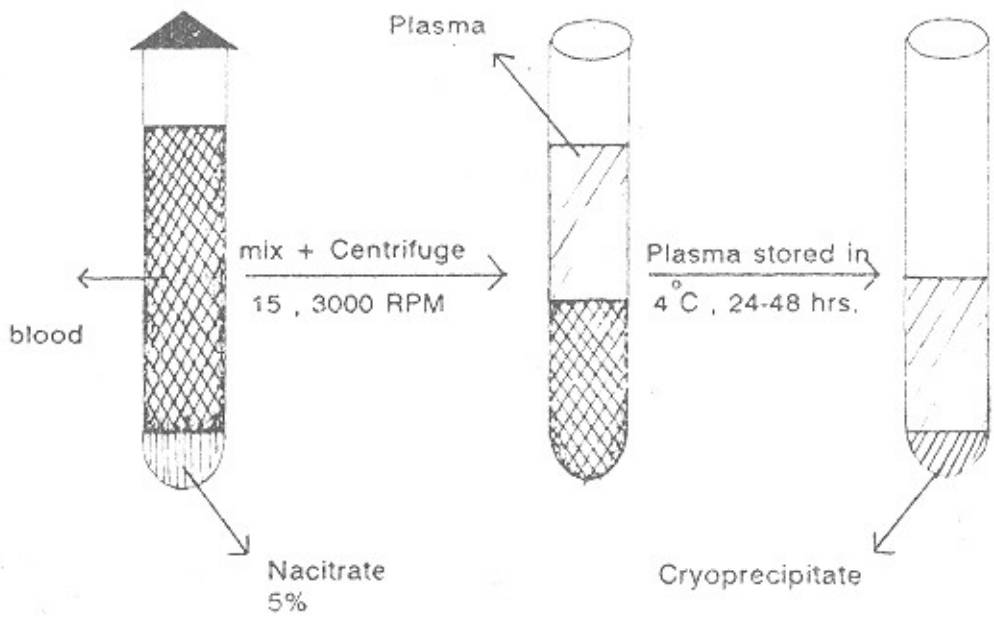
(2) Total Protein = Protein × Total vol.

(3) Total Fn dosage = Fn (by immunoturbidimetric assay) × Total vol.

(4) $Fold = \frac{\text{Total Fn}/\text{Total protein (step)}\%}{\text{Total Fn}/\text{Total protein (initial)}\%}$

(5) yield = tot.Fn (step)/tot.Fn (initial)

نمودار ۱ - روش تهیه کریوپریسیپیتات.



نمودار ۲ - مراحل ته‌نشینی افتراقی، کروماتوگرافی تعویض یونی، الکتروفورز، دیالیز و ژل فیلتراسیون برای جداسازی **pFn**.