دانشگاه صنعتی امیرکبیر

(پلی تکنیک تهران)

دانشکده: **مهندسی شیمی**

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته تحصیلی: بیوتکنولوژی

عنوان

جداسازی و شناسایی عامل ضد انعقاد خون از زهر مار افعی قفقازی ایران

استاد راهنما

دکتر فرزین ذکائی

دکتر عباس زارع

دانشجو

محمد قربانپور

دانشگاه صنعتی امیرکبیر
(پلی‌تکنیک تهران)

بسمه تعالی

شماره : .....
تاریخ : .....

فرم اطلاعات پایان نامه
کارشناسی ارشد و دکترا

معاونت پژوهشی
فرم پروژه تحصیلات تکمیلی ۷

مشخصات دانشجو:

نام ونام خانوادگی: محمد قربانپور **دانشجوی آزاد** ■ **بورسیه** □ **معادل** □

شماره دانشجویی 85122004 **دانشکده: مهندسی شیمی** **رشته تحصیلی: بیوتکنولوژی**

نام ونام خانوادگی استاد راهنما: دکتر فرزین ذکائی- دکتر عباس زارع

عنوان به فارسی: جداسازی و شناسایی عامل ضد انعقاد خون از زهر مار افعی قفقازی ایران

عنوان به انگلیسی: Purification and partial characterization of a anticoagulant protein from the venom of Iranian Agkistrodon halys

نوع پروژه : کارشناسی ارشد **کاربردی** ■ **بنیادی** □ **توسعه‌ای** □ **نظری** □

تاریخ شروع: ۸۶/۷/۱ **تاریخ خاتمه : ۸۷/۶/۱۶** **تعداد واحد: ۸**

سازمان تأمین کنندهٔ اعتبار:

واژه‌های کلیدی به فارسی: افعی قفقازی ایران، ضدانعقاد خون، ژل کروماتوگرافی، کروماتوگرافی تبادل یونی، تست PT.

واژه‌های کلیدی به انگلیسی: Iranian snake venom, *Agkistrodon halys*, serine protease, chromatography, coagulant activity

نظرها و پیشنهادها به منظور بهبود فعالیت های پژوهشی دانشگاه: تخصیص اعتبار مالی بیشتر به این بخش

استاد راهنما:
دانشجو:

امضاء استاد راهنما: **تاریخ:**

نسخه ۱: معاونت پژوهشی
نسخه ۲: کتابخانه و به انضمام دو جلد پایان نامه به منظور تسویه حساب با کتابخانه و مرکز اسناد و مدارک علمی

چکیده

آنزیمهای سرین پروتئاز (Serine protease enzymes) یکی از مهمترین ترکیبات موجود در زهر مار می‌باشند که مطالعات زیادی جهت جداسازی و شناسایی آنها صورت گرفته است. این آنزیمها توانایی شکستن فیبرینوژن(همانند ترومبین) و تشکیل فیبرینوپپتیدهای A یا فیبرینوپپتیدهای B یا هر دو را دارند. آنزیمهای سرین پروتئاز حاصل از زهر مارها، به خانواده‌ی پروتئازها تعلق دارند که در in vivo خون را لخته می کنند. این آنزیمها هنگامیکه در in vitro عمل می کنند با کاهش فیبرینوژن در گردش خون، از انعقاد آن جلوگیری می کنند.

در این تحقیق، زهر مار افعی قفقازی با استفاده از روشهای کروماتوگرافی شامل یک مرحله ژل کروماتوگرافی بر روی سفادکس G50، کروماتوگرافی تبادل یونی بر روی DEAE- سفاروز CL-6B و HPLC بر روی ستون C18 مجزا شده، فعالیت انعقادی فراکسیونهای مختلف جدا شده به کمک تست PT سنجیده شد. در شروع کار، با استفاده ژل کروماتوگرافی بر روی سفادکس G50 زهر مار افعی قفقازی به فراکسیونهای مختلف تفکیک شده و فعالیت انعقادی فراکسیونهای مختلف جدا شده به کمک تست PT سنجیده شد. از ژل کروماتوگرافی پنج فراکسیون بدست آمد که اولین فراکسیون خاصیت انعقادی و فراکسیون دوم خاصیت ضدانعقادی داشت. فراکسیون دوم که حاوی عامل ضدانعقادی بود برای تخلیص بیشتر به ستون کروماتوگرافی تبادل یونی DEAE- سفاروز CL-6B تزریق شده و فعالیت انعقادی فراکسیونهای مختلف جدا شده به کمک تست PT سنجیده شد. فراکسیون اول کروماتوگرافی تبادل یونی خاصیت ضدانعقادی داشت. از ۱۸۲ میلی‌گرم زهرخام مار افعی قفقازی مصرف شده حدود ۲۱/۷۵ میلی‌گرم عامل ضدانعقادی بدست آمد که AH۲۱ نامیده شد. وزن ملکولی این عامل ضد انعقادی توسط ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید در حدود kDa ۲۲ تخمین زده شد. مقدار پروتئین ضدانعقادی تخلیص شده، چیزی در حدود ۱۲٪ وزن زهر خام بود. این عامل در غلظتهای بالاتر از µg/ml ۱۰۰ موجب عدم انعقاد در تست PT شد؛ درحالیکه µg/ml ۱۰، پائین ترین غلظتی بود که این عامل در تست PT اثر ضدانعقادی به جای گذاشت.

فراکسیون اول حاصل از ژل کروماتوگرافی که خاصیت ضدانعقادی داشت بر روی ستون کروماتوگرافی تبادل یونی DEAE- سفاروز CL-6B برده شده و فراکسیون ضدانعقادی حاصل به HPLC دارای ستون C18 تزریق شد. در مرحله نهایی تخلیص دو آنزیم سرین پروتئاز بدست آمد. از ۱۸۲ میلی‌گرم زهر تزریق شده به ستون حدود ۱/۵۲ میلی‌گرم آنزیم‌سرین‌پروتئاز بدست آمد؛ آنزیمهای سرین‌پروتئاز تخلیص شده با عناوین AH۱٤۳ و AH۱٤٤ نامیده شدند. وزن ملکولی این آنزیمها توسط ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید، بترتیب در حدود kDa ۳۲ و kDa ۳۲/۵ تخمین زده شد. آنزیمهای تخلیص شده AH۱٤۳ و AH۱٤٤ بر روی پلاسما اثر انعقادی

داشتند. هپارین و EDTA بر روی هیچکدام از آنزیمهای AH۱۴۳ و AH۱۴۴ اثر بازدارندگی نداشتند. این آنزیمها در گستره pH های ۵ تا ۱۰ دارای فعالیت بودند و pH بهینه برای فعالیت این آنزیمها ۷/۵ بود؛ خارج از این گستره، آنزیمهای تخلیص شده بسرعت فعالیت خود را از دست دادند. این دو پروتئاز در دمای ^{o}C ۳۷ بیشینه فعالیت خود را داشتند؛ با افزایش دما این آنزیمها بسرعت فعالیت خود را از دست دادند و در نهایت در دمای C^{o} ۶۰ بطور کامل غیر فعال شدند. با توجه به ویژگیهای آنزیمهای تخلیص شده AH۱۴۳ و AH۱۴۴، آنها بعنوان آنزیمهای شبه ترومبین معرفی شدند.

فصل اول- زهر مارها و مشخصات آن

۱- زهر مار و ترکیبات آن

زهر مار مایعی روغنی شکل، دارای رنگ سفید تا زرد و با pH اندکی اسیدی می باشد. زهر تازه مار، وزن مخصوصی در حدود ۱۰۳۰ تا ۱۰۵۰ داشته و پودر آن در آب و در محلول ۹ در هزار نمک طعام حل می‌شود. زهر مار همانند بسیاری از مواد زیستی، در حالت خشک شده تغییرات کمتری نسبت به گذشت زمان نشان می‌دهد[۱]. زهر مار مخلوطی پیچیده از پلی‌پپتیدها و پروتئینهای سمی، آنزیمی، دارویی و مواد غیر پروتئینی از قبیل انواع لیپیدها، کربوهیدراتها، نمکهای مختلف (فلزی، غیرفلزی و شبه فلزی)، ریبوفلاوین و آب می باشد[۱] و نقش مهمی در شکار کردن (غیر فعال کردن شکار) و هضم غذای مار دارد. زهرها نقاط مختلفی از سیستم حیاتی حیوان طعمه را مورد هدف قرار داده و عمدتا سیستم عصبی و گردش خون دو سیستم اصلی فیزیولوژیک می باشند که توسط بسیاری از زهرها مورد هدف قرار می گیرند و با تعلیق این سیستمها، شکار در مدت زمانی کوتاه از پای در می آید[۲]. در حال حاضر بیش از ۲۰۰ گونه مار سمی برروی زمین شناسایی شده‌است که در چهار خانواده بزرگ زیر طبقه بندی می شوند[۳]:

- هیدروفیه Hydrophiae
- الاپیده Elapidae
- ویپریده Viperidae
- کروتالیده Crotalidae

این مارها دارای غددی هستند که سنتز، نگهداری و ترشح تقریباً ۵۰-۶۰ ترکیب پروتئینی/پپتیدی با ساختار و عملکرد متفاوت را به عهده دارند؛ بهنگام نیش زدن، این ترکیبات در شکل فعال یا غیر فعال وارد بدن جاندار می شوند.

ترکیبات موجود در زهر هر یک از خانواده های ماری مذکور از لحاظ عملکرد شباهت زیادی با یکدیگر دارند (یعنی بطور کلی سمهای عصبی در زهر مارهای متعلق به خانواده الاپیده و هیدروفیه و سمهای هموراژیک در زهر مارهای متعلق به دو خانواده دیگر یافت می شوند)؛ ولیکن زهر مارهای هر خانواده نیز، ممکن است با یکدیگر تفاوتهایی داشته باشند. برخی ترکیبات نیز وجود دارند که تنها از زهر یک گونه مار جداسازی شده اند[۴].

۱-۱- مواد پروتئینی با خواص غیر آنزیمی

این نوع پروتئینها در حدود ۹۰ تا ۹٤٪ وزن خشک زهر را تشکیل می دهند، وزن ملکولی آنها متغیر است و با تاثیر برروی ماهیچه ها، اندام و اعصاب اعمال حیاتی را مختل می سازند. تعداد ترکیبات سمی پروتئینی و اثرات فیزیوپاتولوژی آنها برحسب نوع مار متفاوت است. برخی از آنها

روی دستگاه عصبی اثر می گذارند، برخی تراوایی غشای یاختـه را تغییـر مـی دهنـد و بعضـی دیگـر موجب تخریب تارهای ماهیچه ای می شوند[۱]. مواد پروتئینی با خواص سمی موجود در زهر مارهـا عبارتنـد از: نوروتوکسـینها (Neurotoxins)، لکتینهـا (Lectins)، سیتوتوکسـینها (Cytotoxins)، کاردیوتوکسینها (Cardiotoxins)، فاکتورهای رشد عصـبی (Nerve growth factors)، بازدارنـده های آنزیمی و غیره و ...[۳].

۲-۱- مواد پروتئینی با خواص آنزیمی

بطور متوسط حدود ۲٦ نوع آنزیم سمی در زهر مارهای سمی یافت مـی شـود. اگرچـه یـک مـار سمی تمام این آنزیمها را همراه با هم ندارد، اما اغلب آنها حاوی ۱۲ آنزیم یاد شده در زیر می باشند. تعدادی از آنها به فرآیند هضم کمک کرده، در حالیکه بقیه مخصوص فلـج کـردن شـکار مـی باشـند. آنزیمهای موجود در اکثر زهرهای مارها عبارتنـد از: فسـفولیپاز A، L- آمینواکسـیداز، هیالورونیـداز، فسفودی استراز، نوکلوئوتیداز، فسفومونو استراز، دئوکسی ریبونوکلئاز، آدنوزین تری فسـفاتاز، دی ان ای نوکلئوتیداز، آریلامیداز و پپتیداز [۱].

در سم مارهای تیره ویپریده و کروتالیده علاوه بر آنزیمهای مـذکور، آنزیمهـایی ماننـد آندوپپتیـداز، آرژنین استرهیدرولاز، کنینوژناز، آنزیمهای شبه ترومبین، آنزیم فعـال کننـده فـاکتور ۱۰، آنـزیم فعـال کننده پروترومبین، آنزیمهای استیل کولین اسـتراز، فسـفولیپاز-B و نیـز گلیسروفسـفاتاز نیـز حضـور دارند. آنزیمهایی از قبیل ترانس آمیناز، کاتالاز، آمیلاز، بتاگلوکوزآمینوداز و لاکتات دهیدروژناز نیـز در سموم برخی از مارها گزارش شده اند. چگونگی اثر ایـن آنزیمهـا نیـز متفـاوت اسـت؛ برخـی ماننـد پروتئیناز، فسفولیپاز، آرژنین استر هیدرولاز و هیالورونیداز موجب تخریب مویرگهـا در محـل تزریـق زهر و نکروز بافتها می شوند [۶]. در ادامه به اختصار خواص تعدادی از این آنزیمها بررسی می شود.

۱-۲-۱- کولین استرازها (نوروتوکسینها)[1]

کولین استرازها یکی از مهمترین آنزیمهای زهری مـی باشـد کـه لازمـه سیسـتم عصـبی انسـانها و حیوانات می باشد. یک کلید الکتریکی۲ (سیناپس) در سیستم عصبی انسان است کـه یـک ماهیچـه را توسط یک عصب به حرکت وا می‌دارد. لـذا یـک علامـت الکتریکـی توسـط اسـتیل کـولین از میـان اتصالات مابین ماهیچه ها و عصب هدایت شده و ماهیچه ها به حرکت درمـی آیـد. معمـولاً پـس از حرکت، استیل کولین استراز آزاد می شود تا استیل کولین را آزاد کرده و تحریک ماهیچه خاتمه یابـد. آنزیم کولین استراز این عمل را با شکستن شیمیایی استیل کـولین بـه ترکیبـات دیگـر و دفـع آنهـا از

[1] Cholinesterase
[2] synapse

سیستم عصبی انجام می دهد. در صورتیکه کولین استراز قادر به شکستن یا دفع استیل کولین نباشد، ماهیچه ها بدون کنترل به حرکت خود ادامه خواهند داد. اگر تعداد پیامهای عصبی فرستاده شده از سیناپس توسط فعالیت کولین استراز کنترل نشود، علائم الکتریکی بطور مداوم فرستاده می شوند. ارسال علائم بصورت تکراری و چک نشده منجر به حرکتهای غیر ارادی و سریع عضلات، فلج شدگی، تشنج و در نهایت مرگ می شود. ملکول زهر مار بر خلاف ملکول استیل کولین، با گروه الکل جایگاه دریافت کننده واکنش نمی‌دهد، بنابراین تجزیه نشده و جایگاه گیرنده[1] را تخلیه نمی کند. در عوض دائماً با سیناپس برهمکنش داده و منجر به بازماندن کانال دریافت کننده می شود و بدین ترتیب علائم الکتریکی را قطع می کند. در صورتیکه این اتفاق رخ دهد شکار معمولاً طی ۳۰ دقیقه می میرد.

۲-۲-۱- فسفولیپاز

وجود فسفولیپازهای A1، A2، C و D در زهر مارها گزارش شده است. این هیدرولازهای استرولیتیک، ترکیب ۳-Sn-فسفوگلیسیریدها را در موقعیت ۲ هیدرولیز می کنند[۶] . فسفولیپاز A2 همانند کولین استرازها در گروه سمهای عصبی زهر مار قرار می گیرند که غشاهای بیولوژیک را تخریب نموده و حتی ممکن است منجر به آسیب دیدگی کامل یا تجزیه (شکست سلولی) شوند. بدن انسان فسفولیپازA2 های مخصوص به خود (پانکراتیک-I یا پانکراتیک-II) را تولید کرده، که اعمال متنوعی را انجام می دهند. فسفولیپازA2 انسان به هضم آنزیمی، انقباض سلولی و تخریب پاتوژنها کمک می کند. اثرات فیزیولوژیک مختلف فسفولیپازA2 توسط دریافت کننده متصل شده به آن تعیین می شود. اتصال فسفولیپازA2 به دریافت کننده های استیل کولین، پیوند با استیل کولین را مسدود ساخته و منجر به فلج می شود. پیوند فسفولیپازA2 با دریافت کننده، در عضلات مختلف با روشهای متنوعی تاثیر می گذارد؛ یعنی تمایلات متفاوتی برای پیوند با انواع عضلات وجود دارد. بدلیل تمایل زیاد فسفولیپازA2 به دیافراگم، اغلب موجب نقص‌های تنفسی می شود.

۳-۲-۱- L-آمینواکسیداز[2]

L -آمینواکسیدازها واکنش آمین زدایی اکسیدی تعدادی از اسیدهای آمینه را کاتالیز می کند. این واکنشها عبارتند از: تجزیه کامل ایزومرهای L اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین، تیروزین، تریپتوفان، فنیل آلانین، هیستیدین، نئورولوسین، نوروالین ، سیترولین و متیونین؛

$$RCHNH_2COOH + O_2 + H_2O \longrightarrow RCOCOOH + NH_3 + H_2O_2$$

[1] Cholinesterase
[2] L-amino acid oxidase (LAO)

تجزیه کامل ایزومرهای L اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین، تیروزین، تریپتوفان، فنیل آلانین، هیستیدین، نئورولوسین، نوروالین ، سیترولین و متیونین؛ اسیدهای آمینه L- سرین، ترئونین، اسید آسپارتیک، لیزین و ارنیتیدین تنها به مقدار اندکی مورد تهاجم قرار می گیرند[۷ و ۸].

٤-۲-۱- هیالورونیداز[1]

این آنزیم منجر به واکنش زیر در بدن می شود:

Hyaluronic acid ----------> Acetylglucosamine

هیالورونیک اسید در تمام اندام بدن یافت می شود، ولی بالاترین غلظت آن در بافتهای ارتباطی نرم یافت می شود. این ماده نقش بسیار مهمی در زمینه های مکانیکی و حرکتی بدن بازی می کند. بدین معنی که به مفاصل حالت کشسانی و به دیسک مهره داران سختی می‌دهد و اغلب جزئی بسیار مهم در شفافیت چشم می باشد. ثابت شده است که این گلیکوز آمین‌گلیکان (glycosaminoglycans) برای فعالیت بافتها مانند هیدراسیون بافت، روانسازی، مهاجرت سلولی، فعالیت سلولی و نفوذ سلولی مهم می باشد[۵].

۵-۲-۱- پروتئازها

از آغاز قرن گذشته، همزمان با تشخیص انعقاد خون توسط زهر برای اولین بار، بسیاری از محققین به مطالعه درباره پروتئازها پرداختند. با این وجود اولین پروتئاز زهری در سال ۱۹۵۰ تخلیص شد. پروتئازهایی که تا کنون جداسازی شده‌اند بطور کلی به دو دسته سرین پروتئازها و متالوپروتئازها طبقه بندی می شوند. پروتئازها واکنشهای تخریب پیوندهای پپتیدی پروتئین را در بافتها کاتالیز کرده و منجر به آسیب دیدگی دیواره رگهای خونی و آسیب دیدگی فرایند گردش خون می شوند[۳].

بر اساس یک فهرست ارائه شده از پروتئازهای موجود در زهر مار، تا کنون بیش از ۱۵۰ پروتئاز مختلف از زهر مار تخلیص شده و بطور کامل یا جزئی شناسائی شده اند. توالیهای اسیدآمینه بیش از ٤۰ پروتئاز توسط سنجش توالی پروتئین یا استنتاج از توالی نوکلوتیدی تشخیص داده شده اند.

پروتئازهای زهری که تا کنون از لحاظ ساختاری شناسایی شده اند جزء سرین پروتئازها یا متالوپروتئازها می باشند و با کمی استثناء همگی فعالیت فیبرینوژنولیتیک دارند[۹].

[1] Hyaluronidase

۶-۲-۱- نوکلئازها و ریبونوکلازها

اندونوکلئازهای زهر مار، پیوندهای حساس فسفاتی، دی استرهای داخل زنجیره های DNA یا RNA را هیدرولیز می کنند. از این آنزیمها در مطالعه RNAی مخمرها استفاده شده است[۱۰].

۷-۲-۱- فسفو دی استرازها

این آنزیمها به زهرها توانائی شکستن پیوندهای فسفودی‌استر را در اسیدهای نوکلئیک می دهند. الیگونوکلئوتیدها به منزله بازدارنده رقابتی این آنزیمها عمل می کنند[۱۰].

فصل دوم -ترکیبات انعقادی و ضدانعقادی موجود در زهر مار

۲- ترکیبات انعقادی و ضدانعقادی موجود در زهر مار

برای آشنایی با ترکیبات انعقادی و ضدانعقادی موجود در زهر مار و درک بهتر مکانیزم اثر آنها ابتدا سیستم انعقاد خون و هموستاز بطور مختصر توضیح داده می شود. سپس، به ترکیبات انعقادی و ضدانعقادی موجود در زهر مار اشاره می شود. و در نهایت کروماتوگرافی و تعدادی از روشهای آن به اختصار شرح داده شده و برخی از روشهای استفاده شده برای جداسازی سرین پروتئازها بیان می شوند.

۱-۲- هموستاز

۱-۱-۲- تعریف هموستاز

اصطلاح هموستاز به توقف جریان خون اطلاق می شود. هموستاز طوری طراحی شده است که یکپارچگی دستگاه گردش خون را حفظ کرده، از خروج خون از کانالهای آن جلوگیری کند. هموستاز عموماً به پنج مرحله تقسیم می شود:

۱ -اسپاسم رگی.

۲ -تشکیل پلاگ پلاکتی.

۳ -انعقاد خون یا ایجاد لخته فیبرینی نامحلول.

۴ -انقباض لخته.

۵ -انحلال لخته.

در ادامه هر یک از این مراحل به اختصار توضیح داده می شوند.

۱-۱-۱-۲- اسپاسم رگی

اسپاسم رگی نخستین مرحله تشکیل لخته خون است؛ این پدیده با مکانیسمهای موضعی و هومورال ایجاد می شود. اسپاسم رگی، رگ را تنگ کرده و جریان خون را کاهش می دهد. این پدیده موقتی بوده و معمولاً کمتر از یک دقیقه طول می کشد.

۲-۱-۱-۲- تشکیل پلاگ پلاکتی

پلاگ پلاکتی دومین خط دفاعی پس از اسپاسم رگی است که با تماس پلاکتها با دیواره رگ آغاز می شود. پلاکتها، یا ترومبوسیتها، قطعات درشتی از سیتوپلاسم سلولهای مغز استخوان، موسوم به مگاکاربوسیتها هستند. آنها دارای غشاء بوده ولی فاقد هسته می باشند. طول عمر آنها ۵ تا ۹ روز است.

پلاکتها با چسبیدن به دیواره آسیب دیده رگ، طی یک فرایند از دیسکهای صاف به کره های زائده دار تغییر شکل می‌دهند. تشکیل پلاگ پلاکتی مستلزم چسبندگی و نیز تجمع پلاکتی است. تجمع پلاکتی هنگامی روی می دهد که پلهای فیبرینوژن به هم متصل شده، یک شبکه ایجاد شود. عوامل تجمع شامل ADP، ترومبین و ترومبوکسان A2 هستند[۱۱].

در ضمن انعقاد پلاسما، با تبدیل فیبرینوژن به فیبرین، پلاگ پلاکتی ناپایدار استحکام می یابد. در صورتی که آسیب وارده جزئی باشد، نیازی به تشکیل لخته های فیبرین نبوده و پلاگ پلاکتی کافی است.[۱۱].

۳-۱-۱-۲- انعقاد خون یا ایجاد لخته فیبرینی نامحلول

انعقاد خون سومین مرحله هموستاز است. در این فرایند رشته های فیبرین تشکیل شده و یک شبکه تشکیل می دهند که اجزای دیگر را متصل به هم نگه می دارد.

۴-۱-۱-۲- انقباض لخته

انقباض لخته بلافاصله پس از تشکیل لخته شروع می شود. این پدیده که نیازمند شمار زیادی از پلاکتهاست با کشیدن لبه های مجروح رگ به سمت هم نقش مهمی در هموستاز دارد[۱۲].

۵-۱-۱-۲- انحلال لخته

پس از ورود پلاسمینوژن به لخته فیبرینی، پلاسمینوژن توسط فعال کننده پلاسمینوژن بافتی به پلاسمین تبدیل می شود. در ادامه پلاسمین فعال شده، فیبرنولیز موضعی را انجام داده و فیبرین از جریان خون حذف می شود؛ اگر پلاسمین وارد جریان خون شود، بسرعت توسط بازدارنده های پلاسمایی مهار می شود؛ از اینرو فعالیت پروتئولیتیکی پلاسمین به جایگاههای رسوب فیبرین محدود می شود[۱۳].

۶-۱-۱-۲- کنترل سیستم پلاسمایی (مهار کننده‌های طبیعی انعقاد)

هموستاز توسط یک سری بازدارنده کنترل می شود. بازدارنده های مونووالان پروتئینهایی هستند که در طی واکنشهای انعقادی ایجاد می شوند؛ مثلاً فیبرینوژن را گاهی "آنتی ترومبین" می نامند، بدلیل اینکه برروی ترومبین می نشیند. در حالیکه بازدارنده های پلی والان با ویژگی کم اما تاثیر مهارکنندگی قوی به مراکز سرینی فعال پروتئازهای انعقادی متصل می شوند[۱۴].

۱. *آنتی ترومبین III*: با ترومبین به صورت یک به یک جمع شده و آن را از فعالیت باز می‌دارد. آنتی ترومبینIII یک گلیکو پروتئین موسوم به کوفاکتور هپارین است. این ماده به مرکز سرینی ترومبین می چسبد. همچنین F Xa، F XIIa، F IXa، کالیکرین و پلاسمین را خنثی می کند[۱۵].

۲. *کوفاکتور II هپارین*: آنتی پلاسمین، بازدارنده پلاسمین آلفا ۲ می باشد. این بازدارنده گلیکوپروتئینی می تواند به عنوان مهار کننده ترومبین نیز عمل کند. کمبود ارثی این ماده، می‌تواند موجب ترامبوز شود.

۳. آلفا ماکروگلوبین: از جنس گلیکوپرتئین است و از فعالیت ترومبین جلوگیری می‌کند[۱۴].

۴. *پروتئین C*: پروتئینC یک پروتئین وابسته به ویتامین K است که توسط ترومبین و عامل فعال کننده X موجود در زهر افعی راسل به پروتئینC فعال تبدیل می شود[۱۵].

۵. *پروتئین S*: به عنوان کوفاکتورهمراه پروتئین C عمل می‌کند و برای وجودش، نیاز به ویتامین K است[۱۵].

۲-۱-۲- عوامل یا پروتئینهای انعقادی

عوامل انعقادی در گروه پروتئینهای پلاسما قرار می گیرند که در شرایط عادی به صورت بی خاصیت[1] یا به گونه غیر آنزیمی[2] در گردش خون وجود دارند. مکان تولید بیشتر عوامل انعقادی کبد است. عوامل انعقادی بر پایه اعداد رومی شماره گذاری شده اند. شماره گذاری عوامل انعقادی بر پایه ترتیب کشف آنهاست و به ترتیب واکنش آنها در روند انعقادی ربطی ندارد(جدول ۱-۲).

عوامل انعقادی از نظر فعالیت، به سه گروه تقسیم بندی می شوند:

۱. نقش سوبسترای انعقادی
۲. نقش کوفاکتور
۳. نقش آنزیمی

عامل شماره یک انعقاد یا فیبرینوژن، بعنوان سوبسترای انعقاد عمل می کند. در واقع هدف نهایی انعقاد تبدیل فیبرینوژن به لخته فیبرینی می باشد.

کوفاکتورهای انعقادی پروتئینهایی هستند که واکنش آنزیمی را در روند انعقادی تقویت می کنند. عامل شماره سه یا ترومبوپلاستین بافتی، عامل شماره پنج، عامل شماره هشت و عامل فیتزجرالد (کینینوژن با وزن ملکولی بالا) جزو کو فاکتورهای دستگاه انعقادی هستند.

دیگر عوامل انعقادی در گروه آنزیمی جای می گیرند. این عوامل، پس از فعال شدن، دارای خاصیت آنزیمی هستند. گروه آنزیمی عوامل انعقادی عبارتند از:

---

1 Inert
2 Zymogen

۱ –سرین پروتئازها

۲ –ترانس آمیدازها[1]

عامل شماره ۱۳ فعال یا پایدار کننده فیبرین، تنها آنزیم ترانس آمیداز دستگاه انعقادی می‌باشد که نقش آن ایجاد پیوند کوالانسی میان مونومرهای فیبرین تشکیل شده، جهت ایجاد لخته پایدار است.

عوامل انعقادی دیگر موجود در گروه آنزیمی دارای نقش سرین پروتئازی می باشند؛ به این مفهوم که در جایگاه فعال خود دارای اسید آمینه سرین می باشند و توسط همین جایگاه فعال، پیوندهای پپتیدی را می شکنند[۱۶].

جدول۱-۲ - نامگذاری عوامل انعقادی

شماره فاکتور	نام فاکتور انعقادی	نام لاتین
عامل ۱	فیبرینوژن	Fibrinogen
عامل ۲	پروترومبین	prothrombin
عامل ۳	ترومبوپلاستین بافتی	Tissue factor
عامل ۴	یون کلسیم	Calcium ion
عامل ۵	عامل ناپایدار	Labile factor
عامل ۷	عامل پایدار	Stable factor
عامل ۸	ضد هموفیلی	Anti hemophilic factor
عامل ۹	عامل کریسمس	Chrismas factor
عامل ۱۰	استووارت – پرور	Stuart-prower factor
عامل ۱۱	ترومبوپلاستین پیشرو	plasma thromboplastin antecedent
عامل ۱۲	هاگمن	Hageman factor
عامل ۱۳	پایدار کننده فیبرین	Fibrin stabilizing factor
عامل فیتز جرالد	کینینوژن با وزن ملکولی بالا	HMWK
عامل فلچر	پره کالیکرین	prekalikerien

۱-۲-۱-۲- پروترومبین و ترومبین

پروترومبین یکی از پروتئینهای پلاسما یعنی یک آلفا-دو گلوبولین با وزن ملکولی ۶۸۷۰۰ می باشد. پروترومبین در پلاسمای طبیعی با غلظت حدود ۱۵۰ میلی گرم در لیتر وجود داشته و یک پزوتئین ناپایدار است که می تواند به آسانی به ملکولهای کوچکتر که یکی از آنها α– ترومبین با وزن ملکولی ۳۳۷۰۰ یعنی تقریباً نصف وزن ملکولی پروترومبین است، تجزیه شود [۱۸ و ۱۶].

1 Transamidase

α-ترومبین حیوانی (حالت فعال پروترومبین فاکتور II انعقادی) سرین پروتئازی چند کاره است. مطالعات گسترده محققین برروی فعالیت و ساختار آن آشکار ساخت که این آنزیم نقشهای مهم و متنوعی را در سیستم گردش خون و انعقاد حیوانات بازی می‌کند. بدلیل نقش مهم ترومبین در تبدیل فیبرینوژن (فاکتور ۱) به لخته های فیبرینی، توسط آزادسازی FPA و FPB از زنجیره های Aα و Bβ فیبرینوژن، که بعداً توسط فاکتور فعال کننده XII اتصالات جانبی پیدا می کند، اغلب فیبرینوژناز نامیده می شود. با این وجود، ترومبین علاوه بر عمل بر روی فیبرینوژن، اغلب محرک انعقاد خون توسط تحریک عامل فعال کننده XIII, V و VIII (و در صورت امکان فاکتورVII) می باشد. کمپلکس آن با ترومبودیولین[1] در سلولهای اندوتلیال، باعث فعال شدن پروتئین C می شود. این فرایند منجر به بازدارنگی انعقاد خون توسط غیر فعال کننده ی فرم فعال فاکتور V و VIII می شود؛ از این گذشته، ترومبین اغلب فیبرنولایزز را تحریک نموده و تجمع لخته ها را فراهم می سازد[۳۳].

۲-۲-۱-۲- فیبرینوژن

فرمول ساختمانی فیبرینوژن به صورت (γ ،Bβ و Aα) می‌باشد. این فرمول بیان می کند که، فیبرینوژن از ۳ جفت زنجیره پلی پپتیدی ناهمگون تشکیل شده است(شکل۱-۲).

مولکول فیبرینوژن به صورت دو واحدی و متقارن است. هر نیمه ملکول فیبرینوژن در بردارنده یک زنجیره پلی پپتیدی γ ،Bβ و Aα به گونه مارپیچ است. بخش های پایانی آمینی هر شش زنجیره در میان ملکول، یک ساختمان غده ای شکل (گلوبولار) مرکزی یا میدان E[2] ایجاد می کند. این میدان از سوی پیوندهای دی سولفیدی پایدار گشته و در بردارنده فیبرینوپپتیدهای A و B (FPB و FPA) است. فیبرینوپپتیدهای A وB بترتیب، در انتهای زنجیره β و α در میدان E قرار گرفته اند؛ از اینرو زنجیره های آلفا و بتا نامیده شده اند. جدا شدن فیبرینوپپتیدهای A وB از ملکول فیبرینوژن باعث دگرگونی آن به فیبرین می شود؛ این عمل تحت تاثیر ترومبین صورت می پذیرد.

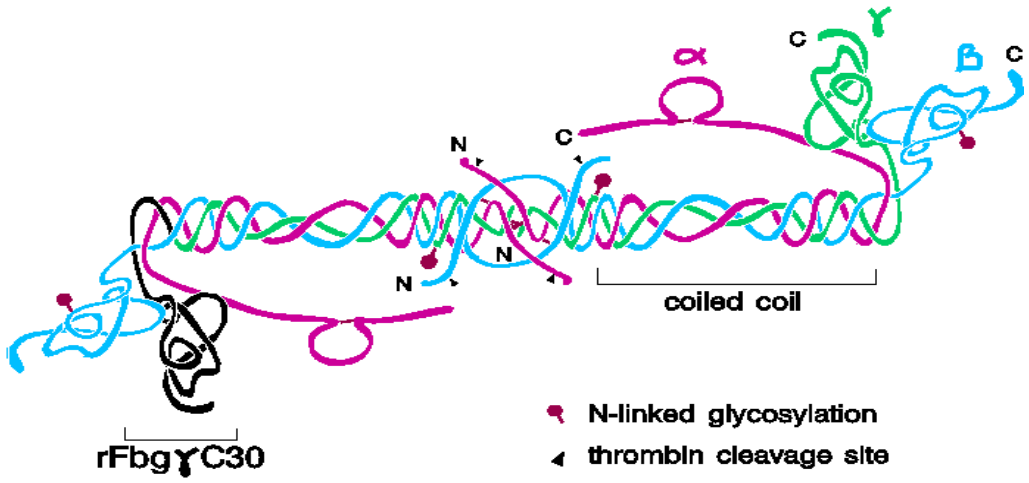
زنجیرههای β، α و γ بترتیب دارای ۶۲۵، ۴۶۱ و ۴۱۱ اسید آمینه هستند. اندازه کل ملکول فیبرینوژن در حدود ۴۵ تا ۴۷ نانومتر و وزن ملکولی آن ۳۴۰kDa است. در روند دگرگونی مولکول فیبرینوژن به فیبرین و ایجاد لخته، سه واکنش مهم روی می دهد:

۱. رها شدن فیبرینوپپتیدهای A وB و دگرگونی ملکول فیبرینوژن به فیبرین در اثر ترومبین.
۲. پلیمر شدن خود به خود مونومرهای فیبرین از سوی نیروهای الکترواستاتیک و بدون وابستگی آنزیمی.

1 thrombomodulin
[2] E domain

۳. ایجاد اتصالات تقاطعی کوالانس[1] در میان مونومرهای فیبرین از سوی عامل ۱۳ فعال یا پایدارکننده فیبرین.

پایداری پایانی شبکه فیبرین، از نظر مکانیکی و نیز نگهداری لخته تازه تشکیل شده در برابر هجوم پلاسمین، که آنزیم حل کننده فیبرین در دستگاه فیبرینولیتیک است، بر عهده عامل ۱۳ فعال است[۱۶].



شکل ۱-۲- فرمول ساختمانی فیبرینوژن

۳-۱-۲- انعقاد خون

انعقاد خون سومین مرحله هموستاز می باشد. بیش از ۵۰ ماده مختلف که درانعقاد خون مؤثرند، در خون و بافتها یافت شده‌اند. بعضی از این مواد که فاکتور انعقادی[2] نام دارند موجب پیشبرد انعقاد می شوند، درحالیکه بعضی از آنها با نام فاکتور ضدانعقادی[3] موجب توقف فرایند انعقاد می شوند. منعقد شدن یا نشدن خون به درجه تعادل این دو گروه ماده بستگی دارد. در حالت طبیعی مواد ضد انعقادی برتری داشته و خون منعقد نمی شود؛ اما هنگامیکه رگی پاره شود مواد انعقادی در ناحیه آسیب دیده فعال شده، بر مواد ضدانعقادی غلبه می کنند و در نتیجه یک لخته خون تشکیل می گردد.

تقریباً تمام محققینی که در زمینه انعقاد خون کار می کنند، عقیده دارند که انعقاد خون در سه مرحله اساسی انجام می گیرد(شکل۲-۲):

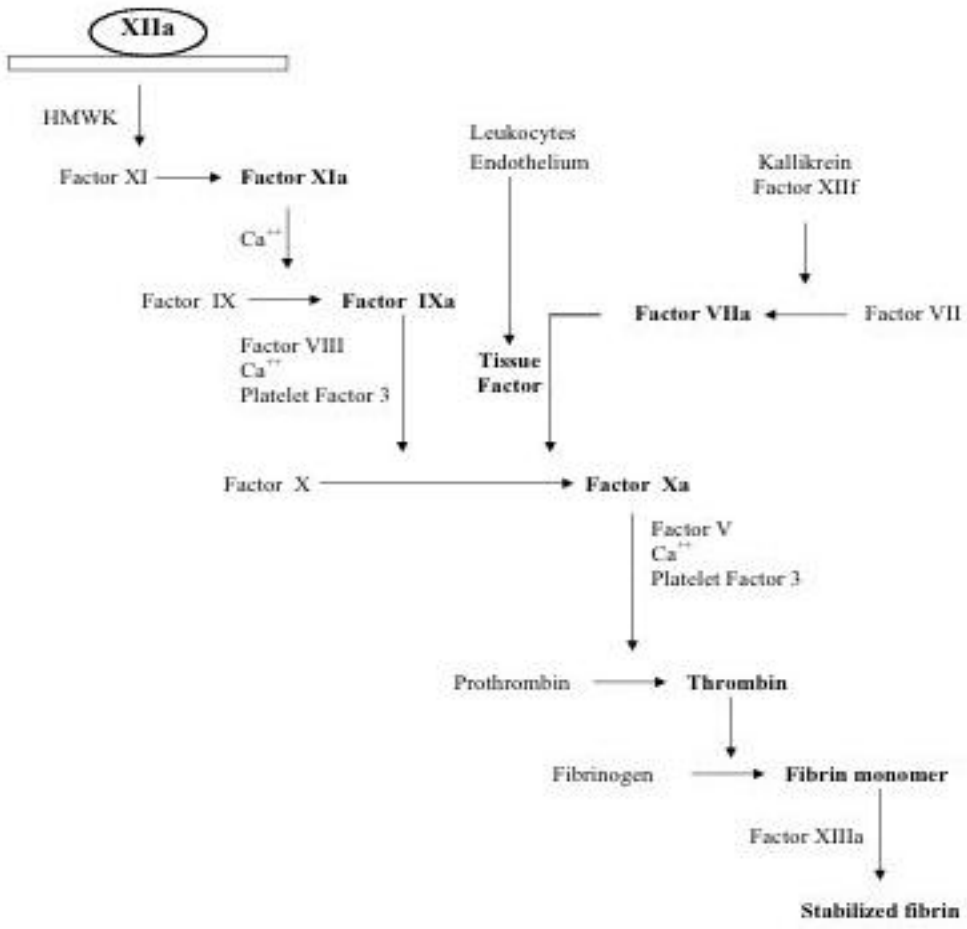
۱- تعدادی از مواد موسوم به فعال کننده پروترومبین به پاره شدن رگ یا آسیب دیدگی خود خون پاسخ می دهند.

---

[1] cross-linked
[2] procoagulant
[3] anticoagulant

۲- ماده فعال کننده پروترومبین، موجب تبدیل پروترومبین به ترومبین می شود.

۳ -ترومبین بعنوان یک آنزیم عمل کرده و فیبرینوژن را به رشته های فیبرین تبدیل می کند و رشته های حاصل، گلبولهای قرمز و پلاسما را در بین خود محصور کرده و لخته را تشکیل می دهند[۱۷و۱۶].



شکل ۲-۲- آبشار انعقاد خون

۱-۳-۱-۲- شروع انعقاد، تشکیل کمپلکس فعال کننده پروترومبین

هدف پایانی انعقاد این است که آنزیم ترومبین به وجود آید. این آنزیم است که در پایان فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل می کند. رشته های فیبرین پس از اتصال به یکدیگر، یک شبکه در محل آسیب دیده ایجاد می کنند.

فیبرینوژن یک گلیکوپروتوین پلاسمایی است که از سوی کبد ساخته شده و مقداری از آن نیز در درون پلاکتها و مگاکاریوسیت ها هست. این پروتئین نقش مهمی در انعقاد خون و ترمیم آن دارد و در واقع با تبدیل فیبرینوژن به فیبرین است که خون روانی خود را از دست داده و با تنیده شدن رشته

های فیبرین سدی حل نشدنی برای جلو گیری از نشت خون در جای آسیب دیده، بوجود می آید[۱۷].

۲-۳-۱-۲- راههای فعال شدن انعقاد خون

انعقاد خون دائماً در مقادیر کم در حال انجام می باشد؛ تا زمانیکه صدمه یا محرک دیگری که بر هموستاز اثر کند وجود نداشته باشد، فعال شدگی عمده ای رخ نمی دهد. تنها فاکتوری که بصورت فعال یافت می شود احتمالاً فاکتورVIIa می باشد که تنها بخش اندکی از غلظت کلی فاکتورVII می باشد. دو مسیر عمده و مهم فعال شدن در انعقاد خون وجود دارد، که دائماً در حال واکنش متقابل با یکدیگر هستند [۱۸] و در نهایت هر یک به ایجاد ترومبین می انجامند[۱۶]، عبارتند از:

- فعال شدن توسط فاکتور بافتی.

فعال شدن خارجی از طریق فاکتور VII (مواجه شدن خون با دیواره مجروح).

- فعال شدن توسط تماس با سطوح غیر فیزیولوژیک.

فعال شدن داخلی از طریق سیستم تماسی (مواجه شدن خون با مواد بافتی)[۱۷].

انعقاد خون نتیجه فعال شدن هر یک از دو مسیر داخلی و خارجی انعقاد است. مسیر داخلی که نسبتاً کند است در عروق صورت گرفته و مسیر خارجی که بسیار سریعتر است در بافتها فعال می شود. این دو مسیر کاملاً از یکدیگر جدا نبوده، در چند مرحله همپوشانی دارند. این دو مسیر در سطح فاکتور X با یکدیگر تلاقی می کنند و سایر مراحل پس از آن در هر دو مسیر مشترک است؛ بطوریکه مرحله نهایی در هر دو مسیر یکسان بوده و شامل واکنش ترومبین و فیبرینوژن می باشد. هر دو این مسیرها برای هموستاز طبیعی ضروری می باشند و هنگامیکه خون از عروق بیرون می رود فعال می شوند[۱۷].

هدف از فرایند انعقاد تشکیل لخته فیبرینی غیر قابل حل می باشد. این فرایند مستلزم همکاری حداقل ۳۰ ترکیب متفاوت است که برخی انعقاد را پیش می برند (کوگالنت) و برخی جلوی آن را می گیرند (آنتی کوگالنت). هر یک از این فاکتورها معمولاً یک مرحله اختصاصی را در روند انعقاد به پیش می برند. کنش یک فاکتور انعقادی طوری طراحی شده است که فاکتور بعدی را فعال کند(اثر آبشاری). در اکثر منابع شکل فعال شده هر فاکتور با زیر نویس α نشان داده می شود. از آنجا که تمامی این عوامل در شکل غیر فعال در خون موجودند، طبیعت چند مرحله ای برای این فرایند ضروری بنظر می رسد تا از تشکیل تصادفی لخته های درون رگی جلوگیری شود[۱۶].

از آنجا که دو آزمایش مهم انعقاد (PT وPTT) این دو را از یکدیگر جدا می کند، برای سهولت معمول است که این دو مسیر را بطور جدا مورد بررسی قرار داد. بعلاوه این مسیرها توسط

پروتئازهای باکتریایی، پروتئازهای مشتق از تومور یا سایر محرکها نظیر آنزیمهای سم مـار برانگیختـه می شوند[۱۸].

۳-۳-۱-۲- تشکیل فیبرین و اتصالات عرضی

مرحله نهایی آبشار انعقادی منجر به تشکیل فیبرین غیر محلول می شود. این واکنش طی یک سری واکنشهای پروتئولیتیک توسط ترومبین کاتالیز می شود و در نهایت منجر به تبدیل فیبرینـوژن محلـول به فیبرین نامحلول در پلاسما می شود. شکل ۱ یک طرح شماتیک از فیبرینوژن و فیبرینوپپتیـدهای Aو B را در بخش مرکزی E نشان میدهد که توسط ترومبین جدا می شوند[۱۸].

محصول این واکنش مونوفیبرین (des-AB-fibrin) نام دارد. آزاد شـدن فیبرینوپپتیـدهای FPA و FPB(یک فرایند پلکانی که سبب ایجاد des-A-fibrin و des-B-fibrin می شود) تغییرات عمده ای را در ساختمان ملکول فیبرینوژن بوجود آورده و سبب پلیمریزاسیون می شـود. پـس از آنکـه انـدازه ملکول حاصل به میزان قابل توجهی رسید، قابلیت انحلال فیبرین به میزان زیادی کم مـی شـود. ایـن امر باعث تشکیل یک پلیمر غیر محلول (لخته) می شود. ترومبین در لخته بصورت متصل باقی مانده، فعالیت خود را کماکان حفظ می کند.

۴-۳-۱-۲- تثبیت فیبرین توسط فاکتور XIII

تثبیت فیبرین مرحله نهایی انعقاد است. تشکیل des-A-fibrin توسط ترومبین موجب فعـال شـدن تقریباً خودبخود یک فاکتور انعقادی دیگر، یعنی فاکتور XIII طی یک واکنش وابسـته بـه کلسـیم مـی شود. در پلاسما فاکتور XIII بعنوان یک ترانس گلوتاماز عمل کرده، بین ملکولهـای فیبـرین اتصـالات عرضی برقرار می نماید. طبق اطلاعات جدید des-A-fibrin سوبسترای فاکتور XIII می باشد.

بعلاوه فاکتور XIII بین چندین پروتئین دیگر و لخته فیبرینی نیز اتصال برقرار می کند. از میان ایـن پروتئینها می توان به α۲- آنتی ترومبین که یک مهار کننده مرکزی سیستم فیبرینولیز می باشـد، اشـاره کرد. این مهار کننده ها مانع از بین رفتن زودهنگام لخته می شوند.

فیبرین یک شبکه سه بعدی تشکیل می دهد که حاوی سـلولهای بـه دام افتـاده مثـل ترومبوسـیتها، اریتروسیتها و گلبولهای سفید می باشد. در مراحل اولیه، به دلیل فعالیت فیبرینولیتیک پائین، لختـه تـا مدتی نسبتاً پایدار اباقی می‌ماند. از آنجا که لخته تشکیل شده، هنوز هم حـاوی تـرومبین فعـال اسـت قطعات ناشی از حل شدن لخته (آمبولی) ممکن است یک ماده بسیار ترومبوژنیک را به سـایر عـروق خونی منتقل کنند که می تواند آغازگر یک واقعه ترومبوآمبولیک جدید(سکته مغزی) باشد[۱۸].