پتانسیل آنتی‌پلاسمینوژن منوکلونال آنتی‌بادی در دستکاری دو سیستم فیبرینولیز و آنژیوژنز

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

علی ملکی[۱]، کامران منصوری[۲*]
منوچهر میرشاهی[۳]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۴]
محمد اکرمی[۳]

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی، بخش آزمایشگاه بالینی، بیمارستان حضرت معصومه، سازمان تامین اجتماعی کرمانشاه
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۳- گروه بیوشیمی پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
۴- گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

*نویسنده مسئول: کرمانشاه، سرخه لیژه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، صندوق پستی ۱۵۶۸ تلفن: ۴۲۷۶۴۷۱-۰۸۳۱
email: kmansouri@kums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۸/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: پلاسمینوژن توسط یک‌سری فعال‌کننده‌ها (PAs) به آنزیم فعال پلاسمین تبدیل می‌شود و نقش خود را که انحلال لخته فیبرینی است به‌انجام می‌رساند. سیستم فیبرینولیز همچنین در فرآیند آنژیوژنز نیز دارای نقش اساسی می‌باشد. فعالیت سیستم فیبرینولیز از طریق پروتئولیز با واسطه فیبرین، مهاجرت و تهاجم سلولی را کنترل می‌کند. به‌علاوه آنزیم پلاسمین رشد تومور و متاستاز را تنظیم می‌کند. آنتی‌بادی‌های منوکلونال به‌عنوان ابزارهای بیولوژیک کارآمد نقش مهمی را در تحقیقات بنیادین ایفاء می‌کنند. ***روش بررسی:*** نخست به روش‌های مختلف چشمی، سنجش کمی قطعات DD/E به‌روش D- دایمر و استفاده از سوبسترای کروموژنیک S-2251 (روش الیزا)، تأثیر آنتی‌بادی‌ها بر فعالیت سیستم فیبرینولیز در حضور فعال‌کننده‌ها بررسی شد. در مرحله بعد اثر آنتی‌بادی‌ها بر فرآیند آنژیوژنز در یک مدل رگزایی در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** نتایج حاصله نشان داد که آنتی‌بادی MC2B8 که مهارکننده فعالیت پلاسمینوژن در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن است، بر فرآیند رگزایی نیز اثر مهاری دارد. A1D12 که یک آنتی‌بادی علیه بخش N- ترمینال پلاسمینوژن است علاوه بر تسریع فعالیت سیستم فیبرینولیز در حضور فعال‌کننده‌ها، باعث فعال شدن فرآیند آنژیوژنز در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. ***نتیجه‌گیری:*** تشکیل پلاسمین یک مرحله کلیدی در تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال جهت تشکیل عروق خونی است. پلاسمین به‌طور مستقیم توسط تجزیه ماتریکس فیبرینی و دیگر ماتریکس‌ها و به‌طور غیرمستقیم توسط فعال کردن ماتریکس متالوپروتئازها و فاکتورهای رشد رگزایی در رگزایی نقش دارد. بر طبق نتایج آزمایشگاهی به‌دست آمده آنتی‌بادی‌های منوکلونال MC2B8 و A1D12 در یک حالت وابسته به دوز در این فرایند نقش دارند.

کلمات کلیدی: سیستم فیبرینولیز، آنژیوژنز، پلاسمینوژن، آنتی‌پلاسمینوژن منوکلونال آنتی‌بادی.

مقدمه

سیستم هموستاز (Hemostasis) با برقراری جریان طبیعی خون بدن را در مقابل خونروی در طی آسیب‌های مختلف حفظ می‌کند. به‌دنبال آسیب عروق خونی، آبشار انعقاد فعال شده و ترومبوز (شامل فیبرین و پلاکت‌های فعال شده) شکل می‌گیرد. لخته مذکور ایجاد یک سد موقتی کرده و بدین ترتیب رگ آسیب دیده را مسدود می‌کند. متعاقباً جهت انحلال لخته فیبرینی و بهبود آسیب وارده، سیستم فیبرینولیز وارد عمل می‌شود. بازسازی بافت آسیب دیده وابسته به تشکیل عروق خونی جدید است، فرآیندی که آنژیوژنز خوانده می‌شود.[۱-۳] سیستم فیبرینولیز از زیموژن پلاسمینوژن، آنزیم فعال پلاسمین، فعال کننده‌های پلاسمینوژن یعنی فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA) و اوروکیناز یا فعال‌کننده ادراری پلاسمینوژن (uPA) تشکیل شده است.[۴] پلاسمینوژن یک گلیکوپروتئین تک زنجیره‌ای با ۷۹۱ اسید آمینه و وزن مولکولی ۹۲ کیلودالتون است. فرم طبیعی آن (گلو- پلاسمینوژن) که دارای گلوتامیک اسید در پایانه آمینی می‌باشد، متشکل از یک پپتید در انتهای آمینی بنام پپتید پره‌اکتیواسیون (PAP) (توالی آمینو اسیدی ۷۷-۱)، سپس پنج ساختار حلقوی شکل مشابه کرینگل (K1-5) و در نهایت بخش کاتالیتیکی سرین پروتئازی (شامل سه اسید آمینه His^{603}، Asp^{646} و Ser^{741}) در پایانه کربوکسیلیک قرار دارد. دومین‌های کرینگلی که حاوی جایگاه‌های اتصال به لیزین (LBS) هستند واسطه میان‌کنش داخل مولکولی پلاسمینوژن و نیز اتصال پلاسمینوژن و پلاسمین به فیبرین، سوبستراها، فعال‌کننده‌ها، مهارکننده‌ها و غشاء

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

سلولی می‌باشند. تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین با شکسته شدن پیوند پپتیدی Arg^{561}-Val^{562} توسط فعال‌کننده‌ها صورت می‌گیرد.[۵و۶] برخی از پروتئین‌های مرتبط با انعقاد و فیبرینولیز در آنژیوژنز نیز نقش دارند.[۷] به‌علاوه حداقل شش مورد از پروتئین‌های سیستم هموستاتیک حاوی اجزای نهفته ضد آنژیوژنز بدین شرح هستند: آنژیواستاتین (جزء پلاسمین)، آنتی آنژیوژنیک AT، اندواستاتین (دومین پنج کینینوژن با وزن مولکولی بالا) و اجزای ۱ و ۲ از پروترومبین.[۸] از میان پروتئین‌های درگیر در فیبرینولیز و آنژیوژنز ما توجه خود را به پلاسمینوژن معطوف کرده‌ایم که یک نقش کلیدی در هر دو فرآیند دارد. فاکتورهای رشد آنژیوژنیک بیان فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن (tPA, uPA) را بر سطح سلول‌های اندوتلیال القاء می‌کنند که هر دوی این سرین پروتئازها باعث تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین می‌شوند. تشکیل پلاسمین یک مرحله اساسی جهت تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل عروق خونی است. در مجاورت فیبرین پلاسمینوژن می‌تواند به انواع گوناگونی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی بچسبد. پلاسمین حاصل مستقیماً باعث تجزیه فیبرین و دیگر پروتئین‌های ماتریکس می‌شود. به‌علاوه می‌تواند متالوپروتئینازهای (MMPs) متعددی را فعال کند که آنها نیز باعث تجزیه بیشتر ماتریکس خارج سلولی شوند.[۲] آنتی‌بادی‌های منوکلونال معرف‌های مهمی در پژوهش‌های بیومدیکال، تشخیص بیماری‌ها و درمان برخی بیماری‌ها (نظیر عفونت‌ها و سرطان‌ها) به شمار می‌روند. این مولکول‌ها در تحقیقات بنیادین جهت تشخیص پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، تعیین جایگاه اپی‌توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن، مطالعه میانکنش‌های داخل ملکولی پروتئین‌ها و یا مطالعه و دستیابی به داروهای جدید استفاده نمود.[۹و۱۰]

نخستین آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی در سال ۱۹۸۲ توسط Ploplis تهیه و مطالعه شدند.[۱۱] از آن زمان تاکنون محققین متعددی در نقاط مختلف دنیا به تهیه و مطالعهٔ آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن همت گماشته‌اند. در پژوهش حاضر از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن به‌عنوان ابزارهایی جهت دستکاری سیستم فیبرینولیز انسانی و نقش اجزاء ساختاری و شکل فضایی مولکول پلاسمینوژن در فعالیت این سیستم استفاده شده است. همچنین با به‌کارگیری مدل آزمایشگاهی رگزایی، به مطالعه اثر آنتی‌بادی‌های مذکور بر فرآیند رگزایی پرداختیم.

روش بررسی

این مطالعه بین سال‌های ۸۳-۱۳۷۹ در بخش بیوشیمی و هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس انجام گردیده و یک مطالعه بنیادی می‌باشد. مواد مورد استفاده شامل ترومبین انسانی، فیبرینوژن انسانی، فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن، اوروکیناز، استرپتوکیناز، EACA (اپسیلون آمینوکاپروئیک اسید)، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، گلیسرول، ۲- مرکاپتواتانل، پرسولفات آمونیوم، TEMED، بروموفنل‌بلو، کیسه دیالیز، EDTA، NaCl، NaH_2PO_4، Na_2HPO_4، محیط کشت سلولی RPMI، ایزوبوتانل و مارکر وزن مولکولی از شرکت Sigma؛ آپروتینین (Trasylol) از شرکت Bayer، بیوتین، ST-HRP از شرکت pierce؛ TMB از شرکت پیشتاز طب؛ سوبسترای سنتتیک S-2251 از شرکت Chromogenix؛ کیت D- دایمر از شرکت Stago؛ پلاسمینوژن انسانی، EGSF، دودمان سلولی اندوتلیال مغز استخوان انسانی HBMEC و سلول‌های هیبریدومای A1D12 و MC2B8 و قسمت $F(ab')_2$ آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 اهدایی دکتر میرشاهی؛ ستون سفارز پروتئین G از شرکت Pharmacia؛ ذرات Cytodex-3-Microcarrier و سلول MCDB131 از شرکت Sigma؛ پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) از سازمان انتقال خون ایران و موش Balb/C از انستیتو پاستور ایران بود.

برای تهیه و تخلیص آنتی‌بادی‌های منوکلونال و بررسی فعالیت بیولوژیکی آنها، پس از کشت سلول‌های هیبریدومای تولید کننده هر یک از آنتی‌بادی‌ها در محیط RPMI-1640 و سپس تزریق‌آنها به‌صورت داخل صفاقی به موش‌های Balb/c، آنتی‌بادی‌های موجود در آسیت پس از تغلیظ به روش رسوب در آمونیوم سولفات اشباع، در بافر PBS دیالیز شده و سپس به‌روش افینیتی کروماتوگرافی توسط پروتئین G خالص شدند[۱۰] و در نهایت با توجه به میزان جذب آنتی‌بادی‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر، غلظت هر یک از آنتی‌بادی‌ها محاسبه شد.[۱۱و۱۲] به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌های حاصله، ابتدا ۱۰۰µl گلو- پلاسمینوژن با غلظت ۲µg/ml، (pH 7.4) به‌مدت یک شبانه روز در دمای اتاق بر روی پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پوشیده شد. سپس آنتی‌بادی‌های منوکلونال A1D12, MC2B8 و قسمت $F(ab')_2$ آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 (غلظت نهایی ۷۰ نانوگرم تا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر) رقیق‌شده در محلول محتوی ۰/۰۵ درصد

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

Tween20، ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در ردیف‌های جداگانه و در شرایط pH 7.4 به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷^{oc} با گلو- پلاسمینوژن پوشیده شده روی پلیت ۹۶ خانه‌ای انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو، چاهک‌ها با محلول BSA یک درصد بلوکه شدند. پس از شستشوی مجدد پلیت، رقت ۱ به ۲۰۰۰ آنتی‌بادی نشاندار ثانویه به چاهک‌ها افزوده شده و پس از ۱/۵ ساعت انکوباسیون، پلیت به دقت شسته شد. در نهایت ۱۰۰µl از محلول ۰/۵mg/ml سوبسترای OPD (O-Phenylenediamine) حل شده در بافر سیترات/ فسفات با pH 5، محتوی ۰/۶٪ آب اکسیژنه به آنها اضافه شد. میزان رنگ که معرف میزان اتصال است پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک دو نرمال با اندازه‌گیری جذب در ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت سیستم فیبرینولیز به‌روش آزمون D- دایمر: بدین منظور پس از مخلوط کردن پلاسمای پولد با غلظت‌های مختلف هر یک از آنتی‌بادی‌ها، به هر سری از لوله‌ها مقدار مشخصی از فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن اضافه شد. پس از انعقاد محتویات لوله‌ها توسط ترومبین انسانی، در فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای میزان لیز لخته هر یک از لوله‌ها ارزیابی شد. برای رقت‌های متوالی هر آنتی‌بادی، به محض آنکه لخته یکی از لوله‌ها به‌طور کامل لیز شد، به‌وسیله آپروتینین فعالیت فیبرینولیز مهار و میزان D- دایمر سرم‌های به‌دست آمده، به روش اتوماتیک ایمونوتوربیدومتری اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت سیستم فیبرینولیز به‌روش الیزا: بدین منظور ابتدا گلو- پلاسمینوژن انسانی (غلظت نهایی پنج میکروگرم در میلی لیتر) به مدت یک ساعت با هر یک از آنتی‌بادی‌ها (غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) مجاور گردید. سپس سوبسترای S-2251 اضافه شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. برای شروع واکنش فعال‌سازی در آزمون‌های جداگانه، uPA (غلظت نهایی ۴۰ واحد)، استرپتوکیناز (غلظت‌نهایی ۱۵ واحد) و tPA (غلظت نهایی ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) در حضور منومر فیبرین (غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. افزایش جذب در ۴۰۵ نانومتر طی زمان به‌علت هیدرولیز سوبسترا توسط پلاسمین تولیدی اندازه‌گیری شد. سرعت اولیه در مرحله پایا اندازه‌گیری شده و مقادیر پارامترهای K_m و V_{max} فعال شدن پلاسمینوژن از روی نمودار Linweaver-Burk و با استفاده از معادلهٔ معکوس Michaelis-Menten، معادله ۱، محاسبه گردید:

$$\frac{1}{v}=\frac{V_{max}}{K_M}.\frac{1}{S}+\frac{1}{K_M} \quad (۱)$$

K_{cat} بر اساس معادله ۲ محاسبه شد:

$$V_{max}=K_{cat}\times E_0 \quad (۲)$$

بررسی‌مکانیسم اثر مهاری آنتی‌بادی MC_2B_8 بر فعال‌شدن پلاسمینوژن:

الف. استفاده از آنالوگ سنتتیک لیزین EACA و روش الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی: بدین‌منظور پس از آماده کردن چهار میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری اپندورف در هر یک از آنها به میزان ۱۵ میکرولیتر پلاسمینوژن (غلظت ۱۰mg/ml) اضافه شد. سپس به محتویات لوله سوم و چهارم ۱۵ میکرولیتر از غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار EACA (به‌عنوان بازکنندهٔ ساختار پلاسمینوژن) اضافه شد و تمامی لوله‌ها پنج دقیقه انکوبه شدند. در مرحلهٔ بعد به لوله‌های دوم و چهارم ۱۵µl از غلظت ۸mg/ml آنتی‌بادی MC_2B_8 و به لوله‌های اول و سوم ۱۵µl PBS اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، به‌تمامی لوله‌ها ۱۵µl اوروکیناز (غلظت ۴۰۰IU/ml) اضافه شد و لوله‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷^{oC} انکوبه شدند. سپس از محتویات لوله‌ها الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی انجام گرفت.

ب. بررسی اثر احتمالی آنتی‌بادی‌های مذکور بر اتصال پلاسمینوژن به فیبرینوژن به‌روش الیزا: بدین منظور پس از کوت کردن (coating) فیبرینوژن در چاهک‌ها، مسدود کردن فضای باقیمانده و سپس شستشوی چاهک‌ها، در مرحله بعد برای هر یک از آنتی‌بادی‌ها مخلوطی از پلاسمینوژن بیوتینیله از قبل مجاور شده با آنتی‌بادی، به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه و شستشو، به چاهک‌ها محلول ST-HRP اضافه شد. پس از انکوباسیون و شستشوی مجدد، به هر یک از چاهک‌ها سوبسترای TMB اضافه شد و در نهایت پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه توسط اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف شده و میزان جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

ج. آزمون پلاسمین: به‌منظور تفسیر بهتر مکانیسم عمل آنتی‌بادی MC2B8، اثر این آنتی‌بادی بر سرعت هیدرولیز پلاسمینی سوبسترای S-2251 سنجش شد. در این آزمون ابتدا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر پلاسمین با هر یک از این آنتی‌بادی‌ها به غلظت ۲۵µg/ml مجاور شد. سپس سوبسترای S-2251 افزوده شده و سرعت اولیه محاسبه گردید.

آماده سازی ذرات سیتودکس- ۳- میکروکریرز: ذرات سیتودکس- ۳- میکروکریرز (cytodex-3-microcarriers) به مدت هشت الی ۱۰

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

ساعت در بافر PBS قرار گرفتند تا متورم شوند. ذرات متورم‌شده به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس در زیر هود استریل، بافر فسفات از محیط حذف گردید و به‌جای آن محیط MCDB131 حاوی چهار درصد ESGF اضافه شد و محصولات به‌دست‌آمده تا هنگام استفاده در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

کشت سلول‌های اندوتلیال مغز استخوان انسانی: نخست دودمان سلولی HBMEC[1] در فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری کشت داده، پس از آنکه سلول‌ها سطح فلاسک را پوشاندند و تعداد آنها در فلاسک کشت سلولی به بیش از یک میلیون رسید، با استفاده از تریپسین- EDTA ۲/۵٪ این سلول‌ها به‌صورت سوسپانسیون در آورده شدند. سپس به‌منظور گردهمایی سلول‌ها در یک نقطه از ذرات سیتودکس-۳- میکروکریر استفاده شد. پس از کنترل چسبیدن سلول‌ها به ذرات cytodex (که با میکروسکوپ صورت می‌گیرد)، ذرات پوشیده از سلول با محلول فیبرینوژن (با غلظت ۲/۵mg/ml) مخلوط شدند و به آنها ترومبین (با غلظت ۲IU/ml) اضافه‌شد و مخلوط حاصل بلافاصله در ماکروپلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول تقسیم گردید. بعد از لخته شدن فیبرینوژن و تشکیل ژل فیبرین، محیط کشت کامل (MCDB131 و ESGF) به هر چاهک اضافه شد. به‌منظور جلوگیری از فعالیت بیش از حد فیبرینولیز سلول‌ها مقدار ۲۰۰IU/ml آپروتینین به محیط کشت رویی و ژل فیبرین اضافه شد. پس از ۵-۳ روز انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷^{oc} و CO_2 پنج درصد فرایند رگزایی بررسی گردید.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر فرآیند آنژیوژنز: آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه در رقت‌های نهایی مختلف ۴۸۰-۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محلول فیبرینوژن اضافه شد و همانند مرحله قبلی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در مقایسه با کنترل اثر آنتی‌بادی‌ها بررسی شد.

یافته‌ها

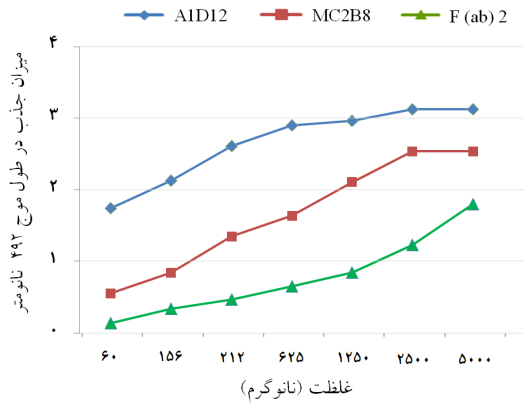
تخلیص آنتی‌بادی‌ها: طبق نتایج حاصل از الکتروفورز آنتی‌بادی‌ها به‌روش SDS-PAGE، آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص شده با ستون پروتئین G دارای درجه خلوص بالایی بودند (نتایج نشان داده نشد).

نتایج حاصل از تعیین فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌ها به‌روش الیزا: نتایج حاصله نشان داد که آنتی‌بادی‌ها دارای فعالیت بیولوژیک مناسب می‌باشند. همچنین آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 قوی‌تر از آنتی‌بادی MC2B8 به گلو- پلاسمینوژن متصل می‌شود اما بخش $F(ab')_2$ آنتی‌بادی A1D12 ضعیف‌تر از آنتی‌بادی MC2B8 متصل می‌شود. در حضور آنتی‌بادی کنترل نامرتبط اتصالی مشاهده نشد (نمودار ۱).

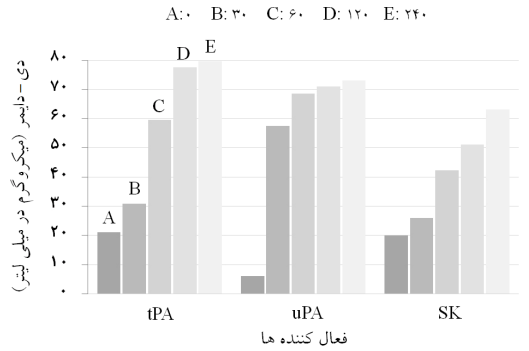
نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها به روش آزمون D- دایمر: نتایج به‌دست آمده نشان داد که آنتی‌بادی A1D12 به‌صورت وابسته به دوز فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن افزایش می‌دهد. در حالی‌که MC2B8 به‌صورت وابسته به دوز فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن مهار می‌کند. (نمودارهای ۲ و ۳).

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌بادیها به روش الیزا: آنتی‌بادی A1D12 بر فعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط فعال‌کننده‌ها و در نتیجه هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251 اثر افزایش‌دهنده داشت ولی آنتی‌بادی MC_2B_8 بر فعال‌شدن پلاسمینوژن خالص توسط فعال‌کننده‌ها و در نتیجه هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251 اثر مهاری داشت. طبق منحنی پیشرفت واکنش (Progress curve) فعال‌شدن گلو- پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ u-PA، در حضور آنتی‌بادی A1D12 فاز تاخیری واکنش قبل از ظهور فعالیت قابل سنجش، اندکی کاهش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 این مرحله اندکی افزایش یافته است. سرعت اولیه فعال‌شدن پلاسمینوژن به‌وسیله uPA در حضور آنتی‌بادی A1D12 در غلظت یک میلی‌مولار سوبسترا، تقریباً ۳/۵ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۲ برابر کاهش یافت. بر اساس داده‌های جدول ۱، آنتی‌بادی A1D12 میزان سرعت ماکزیمم (V_{max}) فعال‌شدن پلاسمینوژن توسط uPA را حدود سه برابر افزایش و آنتی‌بادی MC2B8 این مقدار را به‌میزان ۱/۳ برابر کاهش داد. مقدار KM (معرف تمایل آنزیم به سوبسترا) در این نوع واکنش در حضور آنتی‌بادی A1D12 نسبت به شرایط عدم حضور آنتی‌بادی تغییر چندانی نکرد اما این مقدار در حضور آنتی بادی MC2B8، ۲/۳ برابر کاهش یافت. در ارتباط با فعال‌کننده استرپتوکیناز، طبق جدول ۱ آنتی‌بادی A1D12 فاز تاخیری واکنش را کاهش و آنتی‌بادی MC2B8 آن‌را افزایش داده است. در آزمون مقایسه‌ای انجام شده معلوم شد سرعت اولیه فعال‌شدن گلو- پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی A1D12 در غلظت یک میلی‌مولار سوبسترا، ۳/۴ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 به‌میزان ۳/۲ برابر کاهش می‌یابد. در حضور فعال‌کننده استرپتوکیناز، آنتی‌بادی A1D12 بر میزان تمایل آنزیم به سوبسترا تقریباً اثری ندارد اما آنتی بادی MC2B8 این تمایل را ۲/۲ برابر کاهش می‌دهد. همچنین

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017



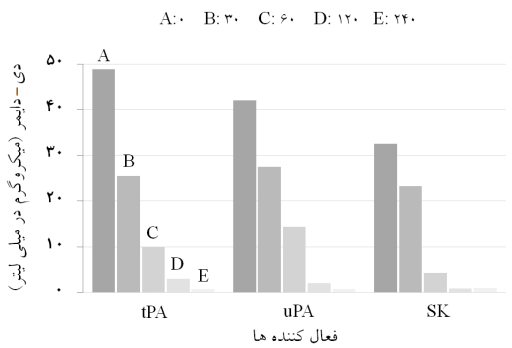
نمودار-۱: منحنی تعیین فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌ها به‌روش الیزا



t-PA:tissue Plasminogen Activator, u-PA:ureakinase Plasminogen Activator, SK:Strptokinase

نمودار-۲: اثر افزایشی آنتی‌بادی A1D12 در حضور فعال کننده‌های مختلف پلاسمینژن با غلظت‌های مختلف A1D12 در آزمایش د- دایمر

سرعت ماکزیمم فعال شدن پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ استرپتوکیناز در حضور آنتی‌بادی A1D12، ۳/۶ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۶۵ برابر کاهش می‌یابد. در ارتباط با فعال‌کننده tPA، فعال‌شدن پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ این فعال‌کننده طبق داده‌های جدول ۱ سرعت اولیهٔ فعال شدن پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ tPA در حضور آنتی‌بادی A1D12، ۱/۵ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۳/۲ برابر



t-PA:tissue Plasminogen Activator, u-PA:ureakinase Plasminogen Activator, SK:Strptokinase

نمودار-۳: اثر مهار MC2B8 در حضور فعال‌کننده‌های مختلف پلاسمینژن با غلظت‌های مختلف MC2B8 در آزمایش د- دایمر

کاهش می‌یابد. در حضور این فعال‌کننده نیز آنتی‌بادی A1D12 بر تمایل آنزیم به سوبسترا اثری ندارد در حالی‌که آنتی‌بادی MC2B8 مقدار آن را ۱/۳ برابر کاهش می‌دهد. سرعت ماکزیمم فعال‌شدن پلاسمینوژن به‌وسیله tPA در حضور آنتی‌بادی A1D12 و در غلظت یک میلی‌مولار سوبسترا، ۱/۶ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 به‌میزان ۲/۸ برابر کاهش می‌یابد. فعال‌شدن گلو- پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ هر کدام از فعال‌کننده‌ها در حضور آنتی‌بادی کنترل (Irrelevant) مشابه شرایط عدم حضور آنتی‌بادی بود.

نتایج اثر آنتی‌بادی مهاری MC2B8 بر سرعت هیدرولیز پلاسمین: برای تفسیر بهتر مکانیسم عمل آنتی‌بادی مهاری MC2B8، اثر آن بر فعالیت هیدرولیزی‌پلاسمین مورد سنجش‌قرار گرفت. در حضور این‌آنتی‌بادی تفاوت چندانی در سرعت هیدرولیزی پلاسمین مشاهده نگردید. نتایج حاصل از اثر آنتی‌بادی‌ها بر فرآیند آنژیوژنز: این نتایج نشان داد که در مقایسه با کنترل منوکلونال آنتی‌بادی MC2B8 فرایند رگزایی را تا غلظت ۲۴۰µg/ml مهار می‌کند (شکل ۱). در مقابل مقایسه با کنترل منوکلونال آنتی بادی A1D12 در غلظت ۲۴۰µg/ml فرایند رگزایی به

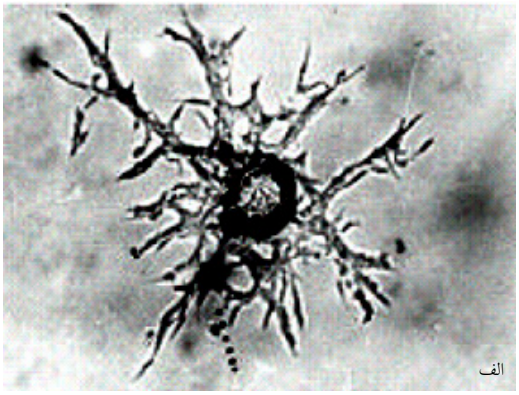
جدول-۱: پارامترهای سینتیکی فعال‌شدن پلاسمینوژن انسانی به‌وسیله فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی‌های منوکلونال

متغیر	عدم حضور آنتی‌بادی			آنتی‌بادی A1D12			آنتی‌بادی MC2B8		
فعال کننده	u-PA	استرپتوکیناز	t-PA	u-PA	استرپتوکیناز	t-PA	u-PA	استرپتوکیناز	t-PA
K_M (µM)	۵۵۲±۲۷	۳۴۲±۱۷	۳۲۵±۱۶	۵۶۳±۲۸	۳۵۴±۱۷	۳۳۸±۱۶	۱۲۸۳±۶۴	۷۶۲±۳۸	۴۲۱±۲۱
V_{max} (µM/min×1^{-3})	۱/۹۴±۰/۰۷	۲/۴±۰/۰۹	۱/۹±۰/۰۷	۶±۰/۲۴	۸/۶۵±۰/۳۴	۳/۱±۰/۱۵	۱/۴۸±۰/۰۵	/۹±۰/۰۳	۰/۶±۰/۰۲
K_{cat} (s^{-1}×1^{-2})	۳/۴۹±۰/۱۷	۴/۳±۰/۲	۳/۴۲±۰/۱۷	۱۰/۹±۰/۵۴	۱۵/۵±۰/۷۷	۵/۶±۰/۲۸	۲/۶±۰/۱۴	۱/۶۲±۰/۰۸	۱/۱۸±۰/۰۵
$\frac{k_{cat}}{K_M}$ (s^{-1}µM^{-1}×1^{-5})	۶/۳	۱۲/۵	۱۰	۱۹/۳	۴۴	۱۶/۵	۲	۲/۱	۲/۸

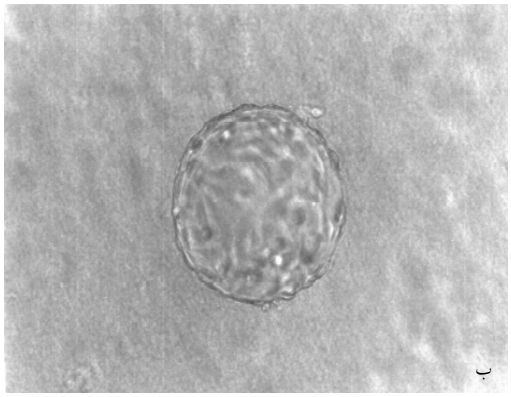
K_M(µM): میزان تمایل آنزیم به سوبسترا، V_{max} (µM/min×1^{-3}): سرعت بیشینه فعالیت آنزیم، K_{cat} (s^{-1}×1^{-2}): تعداد واکنش‌های کاتالیز شده در واحد زمان، k_{cat}/K_M (s^{-1}µM^{-1}×1^{-5}) بازده کاتالیتیکی

t-PA:tissue Plasminogen Activator u-PA:ureakinase Plasminogen Activator

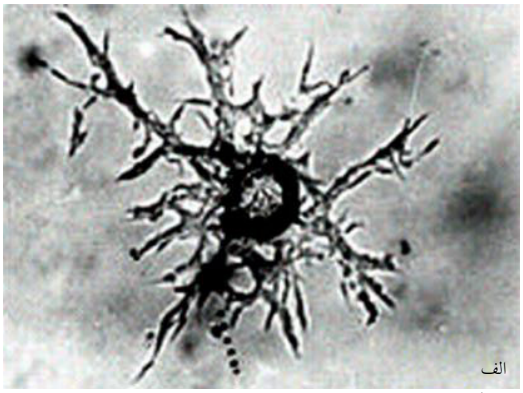
Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017



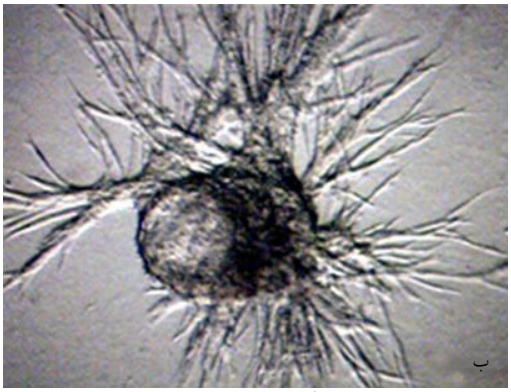
شکل-۱: تاثیر آنتی‌بادی MC2B8 بر رگزایی. الف- پلیت کنترل و مشاهده رگزایی در روز هفتم.



ب- مهار رگزایی در حضور آنتی‌بادی MC2B8 در غلظت ۲۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که بعد از گذشت هفت روز رگزایی مشاهده نشد.



شکل-۲: تاثیر آنتی‌بادی A1D12 بر رگزایی. الف- پلیت کنترل و مشاهده رگزایی در روز هفتم.



ب- تسریع رگزایی در حضور آنتی‌بادی A1D12 در غلظت ۲۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که در مقابل مقایسه با کنترل رگزایی را به‌میزان ۴۰٪ افزایش می‌دهد.

میزان ۴۰٪ را تسریع می‌نماید (شکل ۲).

بحث

اثرات متفاوت آنتی‌بادی‌های منوکلونال مورد مطالعه در حضور یک نوع فعال‌کننده مربوط به مکانیسم‌های مختلف این آنتی‌بادی‌هاست. بر اساس مقادیر KM و Vmax به‌دست آمده، الگوی مهاری آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 بر فعال شدن پلاسمینوژن به‌وسیله فعال‌کننده‌ها به‌علت کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا و کاهش سرعت ماکزیمم، از نوع مهار چندگانه می‌باشد. آنتی‌بادی A1D12 به‌علت عدم تغییر قابل ملاحظه در میزان تمایل آنزیم به سوبسترا و افزایش دادن سرعت ماکزیمم فعال‌شدن پلاسمینوژن توسط فعال‌کننده‌ها و در نتیجه افزایش کارایی کاتالیتیکی (kcat/KM) آنزیم به‌عنوان یک آنتی‌بادی منوکلونال فعال‌کننده محسوب می‌شود. آنتی‌بادی A1D12 اپی‌توپی را در ناحیه توالی اسید آمینه‌ای Arg68-Lys77 انتهای آمینی گلو- پلاسمینوژن می‌شناسد.[۱۴] می‌توان گفت که این آنتی‌بادی با اتصال به اپی‌توپ خود به‌دنبال القای تغییر شکل فضایی در ملکول پلاسمینوژن، منجر به جدایی بر هم کنش داخل ملکولی بین PAP و دومین Kringle4/Proteinase گلو- پلاسمینوژن شده و آرایش فضایی این ملکول را باز می‌نماید. با این عمل مولکول گلو- پلاسمینوژن بازتر شده و از نظر ساختاری به لیز- پلاسمینوژن نزدیک می‌شود.[۱۴] با شکل‌گیری مولکول شبه لیز- پلاسمینوژن، جایگاه‌های اتصال لیزین بهتر در دسترس فعال‌کننده‌ها قرار گرفته و در نهایت کارایی کاتالیتیکی فعال‌کننده پلاسمینوژن در حضور این آنتی‌بادی افزایش می‌یابد. آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 به نحو موثری هر سه واکنش فعال‌سازی گلو- پلاسمینوژن توسط فعال‌کننده‌ها را مهار می‌کند[۱۲و۱۳] اما اثر قابل ملاحظه‌ای بر سرعت هیدرولیز پلاسمین ندارد. از مکانیسم‌های احتمالی این آنتی‌بادی، اتصال آن به جایگاه برش آنزیم Arg561-Val562، یا نزدیک به آن و در نتیجه مهار فعال شدن گلو-

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

پلاسمینوژن می‌باشد.[۱۳] این احتمال وجود دارد که عمل مهار به‌صورت تغییر شکل فضایی صورت گیرد. به‌علاوه ممکن است آنتی‌بادی MC2B8 با جلوگیری از تشکیل کمپلکس بین فعال‌کننده‌ها و گلو- پلاسمینوژن موجب مهار فعال‌شدن پیش‌آنزیم پلاسمینوژن شود. برای در مکانیسم عمل این آنتی‌بادی، مطالعه واکنش‌پذیری آن با بخش‌های مختلف گلو- پلاسمینوژن و بررسی اثر آن بر میانکنش بین پلاسمینوژن و فیبرینوژن، همانگونه که برای آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 انجام شده است، و مطالعهٔ اثر آن بر فعال‌شدن مینی- پلاسمینوژن لازم است. نتایج حاصل از آزمایش مقایسه اثر بخشی F(ab´)2 آنتی‌بادی A1D12 بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به‌وسیله u-PA با آنتی‌بادی کامل A1D12 بیانگر آنست که بخش F(ab´)2 آنتی‌بادی، عامل اصلی و ضروری در القای تغییرات خواص فعال گلو- پلاسمینوژن انسانی است. پیشنهاد می‌شود که با توجه به اثرات بالای آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 بر سرعت فعال‌شدن گلو- پلاسمینوژن انسانی که فرم پلاسمایی پلاسمینوژن نیز می‌باشد، با انسانی کردن بخش F(ab´)2 این آنتی‌بادی، بتوان از آن به‌عنوان دارویی در درمان بیماری‌های انسداد عروقی نظیر سکته قلبی استفاده نمود، همانگونه که داروهایی به‌نام Abciximab و Pexelizumab نیز به همین سبک تهیه شده و در درمان سکته قلبی استفاده می‌شوند. برخی از پروتئین‌های مرتبط با انعقاد و فیبرینولیز در رگزایی نیز نقش دارند[۷] که ازجمله آنها می‌توان به پلاسمینوژن اشاره نمود. در حقیقت مراحل اولیه رگزایی حاصل هماهنگی کمپلکس‌های فعال مولکولی مثل واکنش اینتگرین با متالوپروتئینازها، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن و سوبسترای آنها و غیره می‌باشد. در تهاجم سلول‌های توموری و تجزیه ساختار عروقی در طی آنژیوژنز، سیستم پروتئولیتیک مانند پلاسمینوژن، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن و متالوپروتئینازهای ماتریکس دارای اهمیت ویژه می‌باشند. عقیده بر این است که u-PA و مهارکننده آن یعنی مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن (PAI-1) در تنظیم مرحله اول رگزایی یعنی تغییر وضع پروتئولیتیک پروتئین‌های ماتریکس و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال درگیر هستند.[۱۸] تشکیل پلاسمین یک مرحله اساسی در تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به‌منظور تشکیل عروق جدید است. پلاسمین به‌صورت مستقیم با تجزیه مستقیم فیبرین و ترکیبات دیگر ماتریکس و به‌صورت غیرمستقیم با فعال کردن متالوپروتئینازهای تجزیه‌کننده ماتریکس و فاکتورهای رشد آنژیوژنیک نظیر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا Transforming Growth Factor β (TGF- β)، فاکتور رشد هپاتوسیت Hepatocyte Growth Factor (HGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست پایه Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) در آنژیوژنز شرکت می‌کند. طی دهه گذشته تحقیقات آنژیوژنیک بر تشخیص و تعیین هویت مهار کننده‌های آنژیوژنز و ارزش درمانی آنها در درمان سرطان‌ها و بیماری‌های مرتبط با آنژیوژنز متمرکز شده است. سیستم فعال‌کننده پلاسمین یک هدف بالقوه بدین منظور به‌حساب می‌آید.[۱۹و۲۰] بدین منظور استراتژی‌های مختلفی جهت مهار فعال شدن پلاسمینوژن و آنژیوژنز به‌کار گرفته شده‌اند.[۲۱و۲۲] از میان مکانیسم‌های پایه‌ای متعددی که تحت پژوهش هستند می‌توان به تداخل بین چسبندگی و رشد سلول‌های اندوتلیال اشاره نمود که روش‌های متعددی جهت بلوک این فرایند در نظر گرفته شده است.[۲۳] برخی مکانیسم‌های دیگر نظیر مهار فعالیت متالوپروتئیناز (که ظاهراً تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند) و مهار مسیرهای پیام‌دهی داخل سلولی (جهت اختلال در رشد و بقاء سلول‌ها) تحت بررسی می‌باشند. برخی از این مهارکننده‌های آنژیوژنز که تحت کارآزمایی بالینی هستند آنتی‌بادی منوکلونال هستند که از جمله آنها می‌توان به IMC-1C11 که یک منوکلونال آنتی‌بادی بر ضد VEGFR2 است (anti-VEGFR2) و آنتی VEGF اشاره نمود.[۲۲] جالب این است که این دو آنتی‌بادی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یا گیرنده آن را نشانه رفته‌اند اما در این پژوهش از آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن که خود در این امر نقش محوری دارد استفاده نمودیم. براساس نتایج به‌دست آمده در in vitro آنتی‌بادی MC2B8 به‌شکل وابسته به دوز فرآیند آنژیوژنز را مهار می‌کند در حالی‌که A1D12 این فرآیند را به‌شکل وابسته به دوز تسریع می‌کند. ممکن است آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 در مهار رگزایی در in vivo نیز نقش بسزایی داشته باشد. در صورت تعیین دقیق اپی‌توپ آنتی‌بادی MC2B8 ممکن است این آنتی‌بادی به‌عنوان ابزاری کارآمد جهت تشخیص توالی خاصی از پلاسمینوژن که در فرایند رگزایی درگیر است، سودمند باشد. نکته آخر اینکه آنتی‌بادی‌ها به‌دلیل ویژگی بسیار بالایی که نسبت به آنتی‌ژن هدف دارند، کلاس منحصربه‌فردی از روش‌های درمانی را ارائه می‌نمایند. درمان با آنتی‌بادی یک زمینه

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

تحقیقاتی نوین را در ارتباط با مهار شکل‌گیری عروق خونی جدید (آنژیوژنز) که با بیماری‌های گوناگونی از جمله سرطان مرتبط است فراهم ساخته است. با توسعه روش‌های مهندسی مولکولی جهت ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال کایمریک و انسانی شده مجدداً رویکرد گسترده‌ای به استفاده بالینی از آنتی‌بادی‌ها صورت گرفته است به‌گونه‌ای که FDA تاکنون مجوز استفاده درمانی ۱۳ آنتی‌بادی را صادر کرده و تا سال ۲۰۰۰ متجاوز از ۷۰ آنتی‌بادی در مرحله کارآزمایی بالینی فاز II بوده‌اند.[۲۴و۲۲] امید می‌رود با بررسی‌های بیشتر آنتی‌بادی‌های ذکر شده در این مقاله‌و انجام مطالعات کارآزمایی بالینی و انسانی کردن آنها زمینه برای استفاده‌های بالنی از آنها فراهم گردد.

References

1. Vogten JM, Reijerkerk A, Meijers JC, Voest EE, Borel Rinkes IH, Gebbink MF. The role of the fibrinolytic system in corneal angiogenesis. *Angiogenesis* 2003; 6: 311-6.
2. Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MF. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1695-705.
3. Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Reijerkerk A, Wu YP, Voest EE, et al. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr Biol* 2002; 12): 1833-9.
4. Oh CW, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1683-7.
5. Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 99-108.
6. Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3: 605-14.
7. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1835-42.
8. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-4.
9. VandeBerg J, Abee CR, Dyke B. Monoclonal Antibody Production, A Report of the Committee on Methods of Producing. Monoclonal Antibodies. Washington, DC: National Academy Press, 1999.
10. Howard GC, Bethell DR. Basic Methods in Antibody Production and Characterization. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001.
11. Ploplis VA, Cummings HS, Castellino FJ. Monoclonal antibodies to discrete regions of human Glu1-plasminogen. *Biochemistry* 1982; 21: 5891-7.

۱۲.ملکی علی، میرشاهی منوچهر، پورفتح اله علی اکبر، منصوری کامران. آنتی‌بادیهای منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی MC2B8 و A2C8 فعالیت سیستم فیبرینولیز را مهار می‌کنند. نشریه علمی-پژوهشی فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳۸۴: سال ۹، شماره ۲: ۲۰۳ تا ۲۰۹.

۱۳.ملکی علی، میرشاهی منوچهر، پورفتح اله علی اکبر. بررسی اثر آنتی‌بادیهای منوکلونال ضد پلاسمینوژن A2B3، A5E10 و A4D10، برسیستم فیبرینولیز. نشریه علمی-پژوهشی خون ۱۳۸۵: سال ۳، شماره ۱: صفحات ۲۹ تا ۳۶.

14. Mirshahi M, Soria J, Lijnen HR, Fleury V, Bertrand O, Drouet L, et al. A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH2-terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. *Fibrinolysis and Proteolysis* 1997; 11:155-63.
15. Odekon LE, Blasi F, Rifkin DB. Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF-beta. *J Cell Physiol* 1994; 158: 398-407.
16. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993; 143: 949-58.
17. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 26031-7.
18. Koolwijk P, Kapiteijn K, Molenaar B, van Spronsen E, van der Vecht B, Helmerhorst FM, et al. Enhanced angiogenic capacity and urokinase-type plasminogen activator expression by endothelial cells isolated from human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3359-67.
19. George SJ, Johnson JL, Smith MA, Jackson CL. Plasmin-mediated fibroblast growth factor-2 mobilisation supports smooth muscle cell proliferation in human saphenous vein. *J Vasc Res* 2001; 38: 492-501.
20. Reijerkerk A, Mosnier LO, Kranenburg O, Bouma BN, Carmeliet P, Drixler T, et al. Amyloid endostatin induces endothelial cell detachment by stimulation of the plasminogen activation system. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 561-8.
21. Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MF. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1695-705.
22. Hicklin DJ, Witte L, Zhu Z, Liao F, Wu Y, Li Y, et al. Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001; 6: 517-28.
23. Daly ME, Makris A, Reed M, Lewis CE. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1660-73.
24. Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 433-6.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 1, Apr 2009: 33-41

The potential of antiplasminogen monoclonal antibodies in fibrinolytic & angiogenesis system manipulation

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:42 IRST on Wednesday November 22nd 2017

Maleki A.[1]
Mansouri K.[2*]
Mirshahi M.[3]
Pourfatholah A K.[4]
Akrami M.[3]

1- Department of Medical Laboratory, Hazrat Massomeh Hospital, Social Security Organization, Kermanshah
2- Department of Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences
3- Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University
4- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University

[*] Corresponding author: Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah IRAN
Tehran, IRAN
Tel: +98-831-4276471
email: kmansouri@kums.ac.ir

Received: September 24, 2008 Accepted: November 17, 2008

Abstract

Background: Plasminogen has a central role in fibrinolyrtic system can activate through various activators (PAs) to its active form plasmin and perfoem its vital function that is fibrin clot lysis. Furthermore the fibrinolyrtic system plays a major role in angiogenesis. The fibrinolyrtic system activation control cell migration and invasion. In addition to this, plasmin regulates tumor growth. Monoclonal antibodies, as biological tools, play an important role in basic researches.
Methods: In the first step the effects of antibodies on the activation of fibrinolyrtic system with PAs were evaluated with several methods including macroscopic observation, quantitative measurement of DD/E fragments by D-dimer assay and activation of plasminogen by S-2251 synthetic substrate (ELISA method), subsequently we studied the effect of antibodies on angiogenesis process in an in- vitro model.
Results: Results showed that MC2B8 that is an inhibitor of plasminogen activation in presence of plasminogen activators can inhibit angiogenesis process: A1D12 that is against N-terminal domain of Glu-plasminogen, in addition to activation of fibrinolyrtic system in presence of plasminogen activators, can activate in vitro angiogenesis process.
Conclusion: Plasmin formation is a critical step in invasion and migration of endothelial cells to form new vessels. Plasmin directly participates in angiogenesis by direct fibrin and other matrix components degradation, and indirectly by activating matrix degrading metalloproteinase and angiogenic growth factors. According to the in- vitro results, MC2B8 and A1D12 monoclonal antibodies play roles in this process in a dose dependent manner.

Keywords: Fibrinolysis system, angiogenesis, plasminogen, antiplasminogen monoclonal antibody.