

پتانسیل آنتی‌پلاسمینوژن منوکلونال آنتی‌بادی در دستکاری دو سیستم فیبرینولیز و آنزیوژن

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

چکیده

زمینه و هدف: پلاسمینوژن توسط یک سری فعال کننده‌ها (PAs) به آنزیم فعال پلاسمین تبدیل می‌شود و نقش خود را که انحلال لخته فیبرینی است به انجام می‌رساند. سیستم فیبرینولیز همچنین در فرآیند آنزیوژن نیز دارای نقش اساسی می‌باشد. فعالیت سیستم فیبرینولیز از طریق پروتئولیز با واسطه فیبرین، مهاجرت و تهاجم سلولی را کنترل می‌کند. به علاوه آنزیم پلاسمین رشد تومور و متاستاز را تنظیم می‌کند. آنتی‌بادی‌های منوکلونال به عنوان ابزارهای بیولوژیک کارآمد نقش مهمی را در تحقیقات بنیادین ایفاء می‌کنند. روشن بررسی نخست به روش‌های مختلف چشمی، سنجش کمی قطعات DD/E بدروش D-دایمر و استفاده از سوبسترای کروموزنیک S-2251 (روش الیزا)، تأثیر آنتی‌بادی‌ها بر فعالیت سیستم فیبرینولیز در حضور فعال کننده‌های پلاسمینوژن است. در مرحله بعد اثر آنتی‌بادی‌ها بر فرآیند آنزیوژن 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 فعال کننده‌های پلاسمینوژن است، بر فرآیند رگزایی نیز اثر مهاری دارد. AID12 که یک آنتی‌بادی علیه پخش N-Terminal پلاسمینوژن است علاوه بر تسریع فعالیت سیستم فیبرینولیز در حضور فعال کننده‌ها، باعث فعال شدن فرآیند آنزیوژن در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. **نتیجه‌گیری:** تشکیل پلاسمین یک مرحله کلیدی در تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتیال جهت تشکیل عروق خونی است. پلاسمین به طور مستقیم توسط تجزیه ماتریکس فیبرینی و دیگر ماتریکس‌ها و به طور غیرمستقیم توسط فعال کردن ماتریکس متالوپروتئازها و فاکتورهای رشد رگزایی در رگزایی نقش دارد. بر طبق نتایج آزمایشگاهی به دست آمده آنتی‌بادی‌های منوکلونال MC2B8 و AID12 در یک حالت وابسته به دوز در این فرآیند نقش دارند.

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

علی ملکی^۱، کامران منصوری^{۲*}
منوچهر میرشاھی^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 لیزه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی،
صندوق پستی ۱۵۶۸ تلفن: ۰۸۳۱-۲۴۷۶۴۷۱
email: kmansouri@kums.ac.ir

مقدمه

اوروکیناز یا فعال کننده ادراری پلاسمینوژن (uPA) تشکیل شده است.^۱ پلاسمینوژن یک گلیکوپروتئین تک زنجیره‌ای با ۷۹۱ اسید آمینه و وزن مولکولی ۹۲ کیلو Dalton است. فرم طبیعی آن (گلو-پلاسمینوژن) که دارای گلوتامیک اسید در پایانه آمینی می‌باشد، متشکل از یک پیپید در انتهای آمینی بنام پپتید پره‌اکتیوایون (PAP) (توالی آمینو اسیدی ۱-۷۷، سپس پنج ساختار حلقوی شکل مشابه کرینگل K1-5) و در نهایت بخش کاتالیتیکی سرین پروتئازی (شامل سه اسید آمینه His⁶⁰³ و Asp⁶⁴⁶ و Ser⁷⁴¹) 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، سوبسترها، فعال کننده‌ها، مهارکننده‌ها و غشاء

سیستم هموستاز (Hemostasis) با برقراری جریان طبیعی خون بدن را در مقابل خونروری در طی آسیب‌های مختلف حفظ می‌کند. به دنبال آسیب عروق خونی، آبشار انعقاد فعال شده و ترومبوز (شامل فیبرین و پلاکت‌های فعال شده) شکل می‌گیرد. لخته مذکور ایجاد یک سد موقعی کرده و بدین ترتیب رگ آسیب دیده را مسدود می‌کند. متعاقباً جهت انحلال لخته فیبرینی و بهبود آسیب وارد، سیستم فیبرینولیز وارد عمل می‌شود. بازسازی بافت آسیب دیده وابسته به تشکیل عروق خونی جدید است، فرآیندی که آنزیوژن خوانده می‌شود.^{۲-۳} سیستم فیبرینولیز از زیموژن پلاسمینوژن، آنزیم فعال پلاسمین، فعال کننده‌های پلاسمینوژن یعنی فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA) و

روش بررسی

این مطالعه بین سال‌های ۱۳۷۹-۸۳ 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-مرکاپوتاتانول، پرسولفات آمونیوم، NaH₂PO₄، NaCl، TEMED، بروموفنل‌بلو، کیسه دیالیز، EDTA، RPMI، آیزو بوتانول و مارکر وزن Na₂HPO₄، محیط کشت سلولی (Trasylol) از شرکت Bayer، مولکولی از شرکت Sigma، آپروتینین (aprotinin) از شرکت ST-HRP از شرکت pierce، TMB از شرکت طب، سوبسترای سنتیک S-2251 از شرکت Chromogenix، کیت D-دایمر از شرکت Stago، پلاسمینوژن انسانی، EGSF، دودمان سلولی اندوتیال مغز استخوان انسانی HBMEC و سلول‌های هیریدومای A1D12 و MC2B8 و قسمت F(ab')₂ آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 اهدایی دکتر میرشاهی؛ ستون سفارز پروتین G از شرکت Cytodex-3-Microcarrier Pharmacia، ذرات MCDB131 از شرکت Sigma، پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) از سازمان انتقال خون ایران و موش Balb/c از انتستیو پاستور ایران بود.

برای تهیه و تخلیص آنتی‌بادی‌های منوکلونال و بررسی فعالیت بیولوژیکی آنها، پس از کشت سلول‌های هیریدومای تولید کننده هر یک از آنتی‌بادی‌ها در محیط RPMI-1640 و سپس تزریق آنها به صورت داخل صفاتی به موش‌های Balb/c، آنتی‌بادی‌های موجود در آسیت پس از تغاییر به روش رسوب در آمونیوم سولفات اشباع، در بافر PBS دیالیز شده و سپس به روش افینیتی کروماتوگرافی توسط پروتین G خالص شدند^{۱۰} و در نهایت با توجه به میزان جذب آنتی‌بادی‌ها طول موج ۲۸۰ نانومتر، غلظت هر یک از آنتی‌بادی‌ها محاسبه شد.^{۱۱} به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌های حاصله، ابتدا ۱۰۰ µl گلو-پلاسمینوژن با غلظت ۲ µg/ml، pH 7.4، به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق بر روی پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پوشیده شد. سپس آنتی‌بادی‌های منوکلونال MC2B8 A1D12، و قسمت F(ab')₂ آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 (غلظت نهایی ۷۰ نانوگرم تا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر) رقیق شده در محلول محتوى ۰/۰۵ درصد

سلولی می‌باشدند. تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین با شکسته شدن پیوند پیتیدی Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² توسط فعال‌کننده‌ها صورت می‌گیرد.^۹ برخی از پروتین‌های مرتبط با انعقاد و فیبرینولیز در آنزیوژن نیز نقش دارند.^۷ به علاوه حداقل شش مورد از پروتین‌های سیستم هموستاتیک حاوی اجزای نهفته ضد آنزیوژن بدین شرح هستند: آنزیوستاتین (جزء پلاسمین)، آنتی آنزیوژنیک AT، اندوستاتین (دومین پنج کینینوژن با وزن مولکولی بالا) و اجزای ۱ و ۲ از پروتومبین.^۸ از میان پروتین‌های درگیر در فیبرینولیز و آنزیوژن ما توجه خود را به پلاسمینوژن معطوف کردایم که یک نقش کلیدی در هر دو فرآیند دارد. فاکتورهای رشد آنزیوژنیک بیان فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن (tPA، uPA) را بر سطح سلول‌های اندوتیال القاء می‌کنند که هر دوی این سرین پروتازها باعث تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین می‌شوند. تشکیل پلاسمین یک مرحله اساسی جهت تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتیال و تشکیل عروق خونی است. در مجاورت فیبرین پلاسمینوژن می‌تواند به انواع گوناگونی از پروتین‌های ماتریکس خارج سلولی بچسبد. پلاسمین حاصل مستقیماً باعث تجزیه فیبرین و دیگر پروتین‌های ماتریکس می‌شود. به علاوه می‌تواند متالوپروتئینازهای (MMPs) متعددی را فعال کند که آنها نیز باعث تجزیه بیشتر ماتریکس خارج سلولی شوند.^{۱۰} آنتی‌بادی‌های منوکلونال معرفه‌های مهمی در پژوهش‌های بیومدیکال، تشخیص بیماری‌ها و درمان برخی بیماری‌ها (نظیر عفونت‌ها و سرطان‌ها) به شمار می‌روند. این مولکول‌ها در تحقیقات بنیادین جهت تشخیص پروتین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، تعیین جایگاه اپی‌توب‌های مختلف یک آنتی‌ژن، مطالعه میانکنش‌های داخل ملکولی پروتین‌ها و یا مطالعه و دستیابی به داروهای جدید استفاده نمود.^{۱۱}

نخستین آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی در سال ۱۹۸۲ توسط Ploplis تهیه و مطالعه شدند.^{۱۲} از آن زمان تاکنون محققین متعددی در نقاط مختلف دنیا به تهیه و مطالعه آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن همت گماشته‌اند. در پژوهش حاضر از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن به عنوان ابزارهایی جهت دستکاری سیستم فیبرینولیز انسانی و نقش اجزاء ساختاری و شکل فضایی مولکول پلاسمینوژن در فعالیت این سیستم استفاده شده است. همچنین با به کارگیری مدل آزمایشگاهی رگزایی، به مطالعه اثر آنتی‌بادی‌های مذکور بر فرآیند رگزایی پرداختیم.

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

$$V_{\max} = K_{cat} \times E_0 \quad (2)$$

بررسی مکانیسم اثر مهاری آنتیبادی MC_2B_8 بر فعال شدن پلاسمینوژن: الف. استفاده از آنالوگ سنتیک لیزین EACA و روش الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی: بدین منظور پس از آماده کردن چهار میکرو لیتر $0/5$ میلی لیتری اپندورف در هر یک از آنها به میزان 15 میکرو لیتر پلاسمینوژن (غلظت 10mg/ml) اضافه شد. سپس به محنتیات لوله سوم و چهارم 15 میکرو لیتر از غلظت 200 میلی مولار EACA (به عنوان بازکننده ساختار پلاسمینوژن) اضافه شد و تمامی لوله‌ها پنج دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد به لوله‌های دوم و چهارم $15\mu\text{l}$ از غلظت 8mg/ml آنتیبادی MC_2B_8 و به لوله‌های اول و سوم $15\mu\text{l}$ PBS اضافه شد. پس از 15 دقیقه انکوباسیون، به تمامی لوله‌ها $15\mu\text{l}$ اوروکیناز (غلظت 400IU/ml) اضافه شد و لوله‌ها به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شدند. سپس از محنتیات لوله‌ها الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی انجام گرفت.

ب. بررسی اثر احتمالی آنتیبادی‌های مذکور بر اتصال پلاسمینوژن به فیرینوژن به روش الیزا: بدین منظور پس از کوت کردن (coating) فیرینوژن به روش الیزا، 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 37 درجه و شستشوی چاهک‌ها محلول ST-HRP اضافه شد. پس از انکوباسیون و شستشوی مجدد، به هر یک از چاهک‌ها سوبستراتی TMB اضافه شد و در نهایت پس از انکوباسیون در 37 درجه توسط اسید سولفوریک 2 نرمال واکنش متوقف شده و میزان جذب چاهک‌ها در طول موج 450 نانومتر اندازه‌گیری شد.

ج. آزمون پلاسمین: به منظور تفسیر بهتر مکانیسم عمل آنتیبادی MC_2B_8 ، اثر این آنتیبادی بر سرعت هیدرولیز پلاسمینی سوبستراتی S-2251 سنجش شد. در این آزمون ابتدا پنج میکرو گرم در میلی لیتر پلاسمین با هر یک از این آنتیبادی‌ها به غلظت $25\mu\text{g/ml}$ مجاور شد. سپس سوبستراتی S-2251 افزوده شده و سرعت اولیه محاسبه گردید. آماده سازی ذرات سیتودکس- 3 -میکروکریز: ذرات سیتودکس- 3 -میکروکریز (cytodex-3-microcarriers) به مدت هشت الی 10

Tween20 درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در ردیف‌های جداگانه و در شرایط pH 7.4 به مدت 90 دقیقه در دمای 37°C با گلو-پلاسمینوژن پوشیده شده روی پلیت 96 خانه‌ای انکوبه شدند. پس از سه بار شستشوی چاهک‌ها با محلول BSA یک درصد بلوکه شدند. پس از شستشوی مجدد پلیت، رقت 1 به 2000 آنتیبادی نشاندار ثانویه به چاهک‌ها افزوده شده و پس از $1/5$ ساعت انکوباسیون، پلیت به دقت شسته شد. در نهایت $100\mu\text{l}$ از محلول $0/5\text{mg/ml}$ (O-Phenylenediamine) OPD حل شده در بافر سیترات/فسفات با $\text{pH } 5$ ، محتوی $0/6\%$ آب اکسیژن به آنها اضافه شد. میزان رنگ که معرف میزان اتصال است پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک دو نرمال با اندازه‌گیری جذب در 492 نانومتر تعیین شد. بررسی اثر آنتیبادی‌ها بر سرعت سیستم فیرینولیز به روش 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 محنتیات لوله‌ها توسط ترومیبن 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 به طور کامل لیز شد، به وسیله آپرتوئین فعالیت فیرینولیز مهار و میزان D-دایمر سرم‌های به دست آمده، به روش اتوماتیک ایمونوتوربیدومتری اندازه‌گیری شد. بررسی اثر آنتیبادی‌ها بر سرعت سیستم فیرینولیز به روش الیزا: بدین منظور ابتدا گلو-پلاسمینوژن انسانی (غلظت نهایی پنج میکرو گرم در میلی لیتر) به مدت یک ساعت با هر یک از آنتیبادی‌ها (غلظت نهایی 25 میکرو گرم در میلی لیتر) مجاور گردید. سپس سوبستراتی S-2251 اضافه شده و به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. برای شروع واکنش، فعال‌سازی در آزمون‌های جداگانه، uPA (غلظت نهایی 40 واحد)، استرپتوكیناز (غلظت نهایی 15 واحد) و tPA (غلظت نهایی 25 نانو گرم در میلی لیتر) در حضور منور فیرین (غلظت نهایی 50 میکرو گرم در میلی لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. افزایش جذب در 405 نانومتر طی زمان به علت 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 Michaelis-Lineweaver-Burk و با استفاده از معادله معکوس-Menten، معادله 1 ، محاسبه گردید:

آنتی بادی A1D12 ضعیفتر از آنتی بادی MC2B8 متصل می شود. در حضور آنتی بادی کنترل نامرتب اتصالی مشاهده نشد (نمودار ۱). نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی بادی ها به روش آزمون D-Dایمیر: نتایج به دست آمده نشان داد که آنتی بادی A1D12 به صورت وابسته به دوز فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال کننده های پلاسمینوژن افزایش می دهد. در حالی که MC2B8 به صورت وابسته به دوز فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال کننده های پلاسمینوژن مهار می کند. (نمودار های ۲ و ۳).

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی بادیها به روش الیزا: آنتی بادی A1D12 بر فعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط فعال کننده ها و در نتیجه هیدرولیز سوبیستای سنتیک S-2251 اثر افزایش دهنده داشت ولی آنتی بادی MC2B8 بر فعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط فعال کننده ها و در نتیجه هیدرولیز سوبیستای سنتیک S-2251 اثر مهاری داشت. طبق منحنی پیشرفت واکنش (Progress curve) فعال شدن گلو-پلاسمینوژن به وسیله u-PA، در حضور آنتی بادی A1D12 فاز تاخیری واکنش قبل از ظهور فعالیت قابل سنجش، اندکی کاهش و در حضور آنتی بادی MC2B8 این مرحله اندکی افزایش یافته است. سرعت اولیه فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله u-PA در حضور آنتی بادی A1D12 در غلاظت یک میلی مولار سوبیسترا، تقریباً ۳/۵ برابر افزایش و در حضور آنتی بادی MC2B8 ۲/۲ برابر کاهش یافت. بر اساس داده های جدول ۱، آنتی بادی A1D12 میزان سرعت ماکریزم (V_{max}) فعال شدن پلاسمینوژن توسط u-PA را حدود سه برابر افزایش و آنتی بادی MC2B8 این مقدار را به میزان ۱/۳ برابر کاهش داد. مقدار KM (معرف تمایل آنزیم به سوبیسترا) در این نوع واکنش در حضور آنتی بادی A1D12 نسبت به شرایط عدم حضور آنتی بادی تغییر چندانی نکرد اما این مقدار در حضور آنتی بادی MC2B8 ۲/۳ برابر کاهش یافت. در ارتباط با فعال کننده استرپتوکیناز، طبق جدول ۱ آنتی بادی A1D12 فاز تاخیری واکنش را کاهش و آنتی بادی MC2B8 آنرا افزایش داده است. در آزمون مقایسه ای انجام شده معلوم شد سرعت اولیه فعال شدن گلو-پلاسمینوژن در حضور آنتی بادی A1D12 در غلاظت یک میلی مولار سوبیسترا، ۳/۴ برابر افزایش و در حضور آنتی بادی MC2B8 به میزان ۳/۲ برابر کاهش می یابد. در حضور فعال کننده استرپتوکیناز، آنتی بادی A1D12 بر میزان تمایل آنزیم به سوبیسترا تقریباً اثربار ندارد اما آنتی بادی MC2B8 این تمایل را ۲/۲ برابر کاهش می دهد. همچنین

ساعت در بافر PBS قرار گرفتند تا متورم شوند. ذرات متورم شده به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس در زیر هود استریل، بافر فسفات از محیط حذف گردید و به جای آن محیط MCDB131 حاوی چهار درصد ESGF اضافه شد و محصولات به دست آمده تا هنگام استفاده در پنجچال چهار درجه سانتی گراد قرار داده شد.

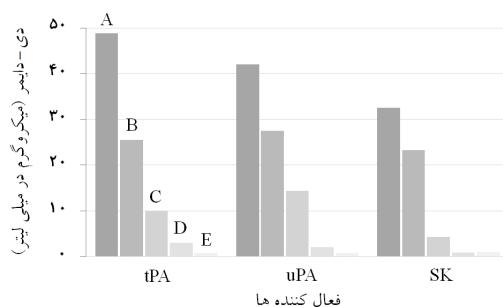
کشت سلول های اندوتیال مغز استخوان انسانی: نخست دودمان سلولی^۱ در فلاسک ۵۰ میلی لیتری کشت داده، پس از آنکه سلول ها سطح فلاسک را پوشاندند و تعداد آنها در فلاسک کشت سلولی به بیش از یک میلیون رسید، با استفاده از تریپسین-EDTA ۰/۲۵٪ این سلول ها به صورت سوسپانسیون در آورده شدند. سپس به منظور گرد همایی سلول ها در یک نقطه از ذرات سیتروکس-۳-میکروکریر استفاده شد. پس از کنترل چسبیدن سلول ها به ذرات cytodex (که با میکروسکوپ صورت می گیرد)، ذرات پوشیده از سلول با محلول فیبرینوژن (با غلاظت ۲/۵mg/ml) مخلوط شدند و به آنها ترومیبن (با غلاظت ۲IU/ml) اضافه شد و مخلوط حاصل بالا صalte در ماکروپلیت ۲۴ خانه ای کشت سلول تقسیم گردید. بعد از لخته شدن فیبرینوژن و تشکیل ژل فیبرین، محیط کشت کامل (MCDB131) و ESGF به هر چاهه اضافه شد. به منظور جلوگیری از فعالیت بیش از حد فیبرینولیز سلول ها مقدار ۲۰۰ IU/ml آپروتینین به محیط کشت روبی و ژل فیبرین اضافه شد. پس از ۳-۵ روز انکوباسیون پلیت ها در دمای ۳۷°C و CO₂ پنج درصد فرایند رگزابی بررسی گردید.

بررسی اثر آنتی بادی ها بر فرآیند آنژیوژن: آنتی بادی های مورد مطالعه در رقت های نهایی مختلف ۴۸۰-۳۰ میکرو گرم در میلی لیتر به محلول فیبرینوژن اضافه شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در مقایسه با کنترل اثر آنتی بادی ها بررسی شد.

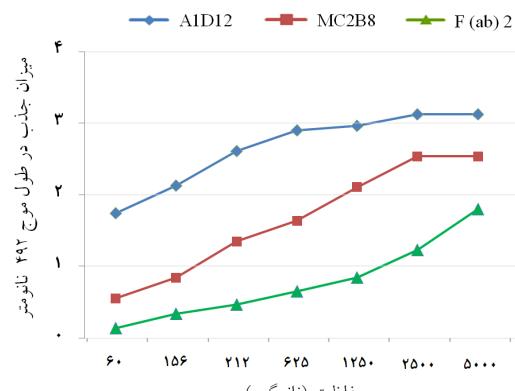
یافته ها

تخلیص آنتی بادی ها: طبق نتایج حاصل از الکتروفورز آنتی بادی ها به روشن SDS-PAGE، آنتی بادی های منوکلونال تخلیص شده با ستون پروتئین G دارای خلوص بالای بودند (نتایج نشان داده نشد). نتایج حاصل از تعیین فعالیت بیولوژیکی آنتی بادی ها به روش الیزا: نتایج حاصله نشان داد که آنتی بادی های دارای فعالیت بیولوژیک مناسب می باشند. همچنین آنتی بادی منوکلونال A1D12 قوی تر از آنتی بادی F(ab')₂ به گلو-پلاسمینوژن متصل می شود اما بخش ۲

A:۰ B:۳۰ C:۶۰ D:۱۲۰ E:۲۴۰

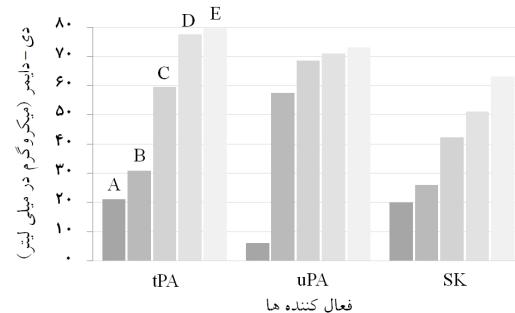


نمودار-۳: اثر مهار MC2B8 در حضور فعال کننده‌های مختلف پلاسمینوژن با غلظت‌های مختلف MC2B8 در آزمایش د-دایمر



نمودار-۱: متحنی تعیین فعالیت بیولوژیکی آنتیبادی‌ها به روش الیزا

A:۰ B:۳۰ C:۶۰ D:۱۲۰ E:۲۴۰



نمودار-۲: اثر افزایشی آنتیبادی AID12 در حضور فعال کننده‌های مختلف پلاسمینوژن با غلظت‌های مختلف AID12 در آزمایش د-دایمر

سرعت ماکریزم فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله استرپتوكیناز در حضور آنتیبادی AID12 ۳/۶ برابر افزایش و در حضور آنتیبادی هیدرولیزی پلاسمین مورد سنجش قرار گرفت. در حضور این آنتیبادی هیدرولیزی پلاسمین مشارکه قدرتمند نگردید. نتایج تفاوت چندانی در سرعت هیدرولیزی پلاسمین مشاهده نگردید. نتایج حاصل از اثر آنتیبادی این آنتیبادی هیدرولیزی آثیروژن: این نتایج نشان داد که در مقایسه با کنترل منوکلونال آنتیبادی MC2B8 فرایند رگزایی را تا غلظت ۲۴۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ مهار می‌کند (شکل ۱). در مقابل مقایسه با کنترل منوکلونال آنتیبادی AID12 در غلظت ۲۴۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ فرایند رگزایی به

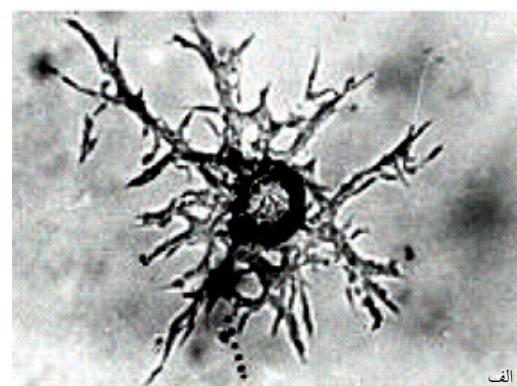
جدول-۱: پارامترهای سیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال کننده‌های پلاسمینوژن در حضور آنتیبادی‌های منوکلونال

آنتیبادی MC2B8		آنتیبادی AID12		عدم حضور آنتیبادی		متغیر
فعال کننده	اطلاعات	فعال کننده	اطلاعات	فعال کننده	اطلاعات	
t-PA	استرپتوكیناز	u-PA	استرپتوكیناز	t-PA	استرپتوكیناز	$K_M (\mu\text{M})$
۴۲۱±۲۱ ۰/۶±۰/۰۲ ۱/۱۸±۰/۰۵ ۲/۸	۷۶۲±۳۸ ۰/۹±۰/۰۳ ۱/۶۲±۰/۰۸ ۲/۱	۱۲۸۳±۶۴ ۱/۴۸±۰/۰۵ ۲/۶±۰/۱۴ ۲	۳۳۸±۱۶ ۳/۱±۰/۱۵ ۵/۶±۰/۲۸ ۱۶/۵	۳۵۴±۱۷ ۸/۶۰±۰/۳۴ ۱۰/۹۰±۰/۵۴ ۴۴	۵۶۳±۲۸ ۶±۰/۲۴ ۱۰/۹۰±۰/۵۴ ۱۹/۳	۳۲۵±۱۶ ۱/۹±۰/۰۷ ۳/۴۲±۰/۱۷ ۱۰
						$V_{max} (\mu\text{M}/\text{min}\times 1^3)$
						$(\text{s}^{-1}\times 1^2) K_{cat}$
						$\frac{k_{cat}}{K_M} (\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}\times 1^5)$

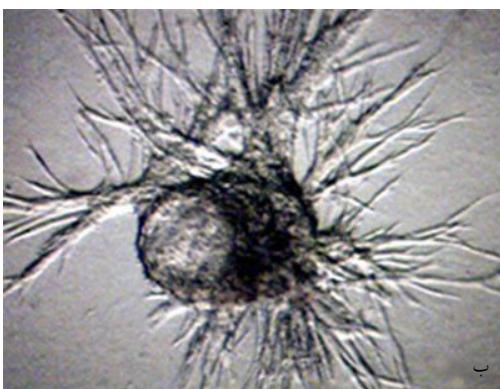
میزان تعامل آنزیم به سوبسترا: $K_M(\mu\text{M})$: میزان تعامل آنزیم به سوبسترا، V_{max} : سرعت پیشینه فعالیت آنزیم، $K_{cat}/K_M (\text{s}^{-1}\times 1^2)$: تعداد واکنش‌های کاتالیز شده در واحد زمان، k_{cat} : بازده کاتالیتیکی t-PA: tissue Plasminogen Activator u-PA: urokinase Plasminogen Activator



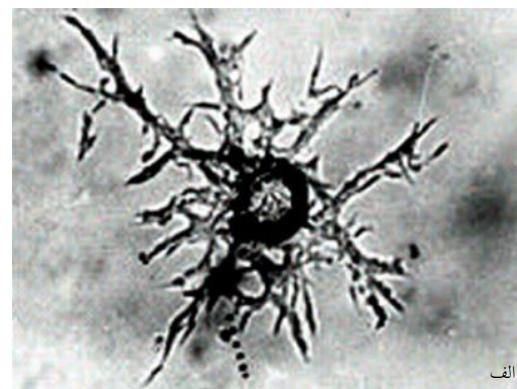
ب- مهار رگزایی در حضور آنتی بادی MC2B8 در غلظت ۲۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر که بعد از گذشت هفت روز رگزایی مشاهده نشد.



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



ب- تسريع رگزایی در حضور آنتی بادی A1D12 در غلظت ۲۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر که در مقابل مقایسه با کنترل رگزایی را به میزان ۴۰٪ افزایش می دهد.



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

میزان ۴۰٪ را تسريع می نماید (شکل ۲).

بحث

پلاسمینوژن می شناسد.^{۱۴} می توان گفت که این آنتی بادی با اتصال به اپی توپ خود به دنبال 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 می نماید. با این عمل مولکول گلو- پلاسمینوژن بازتر شده و از نظر ساختاری به لیز- پلاسمینوژن نزدیک می شود.^{۱۴} با شکل گیری مولکول شبه لیز- پلاسمینوژن، جایگاه های اتصال لیزین بهتر در دسترس فعال کننده ها قرار گرفته و در نهایت کارایی کاتالیتیکی فعال کننده پلاسمینوژن در حضور این آنتی بادی افزایش می یابد. آنتی بادی منوکلونال MC2B8 به نحو موثری هر سه واکنش فعال سازی گلو- پلاسمینوژن توسط فعال کننده ها را مهار می کند^{۱۵} اما اثر قابل ملاحظه ای بر سرعت هیدرولیز پلاسمین ندارد. از مکانیسم های احتمالی این آنتی بادی، اتصال آن به جایگاه برش آنزیم Arg561-Val562، یا نزدیک به آن و در نتیجه مهار فعل شدن گلو-

اثرات متفاوت آنتی بادی های منوکلونال مورد مطالعه در حضور یک نوع فعال کننده مربوط به مکانیسم های مختلف این آنتی بادی هاست. بر اساس مقادیر KM و Vmax به دست آمده، الگوی مهاری آنتی بادی منوکلونال MC2B8 بر فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله فعال کننده ها به علت کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا و کاهش سرعت ماکریزم، از نوع مهار چندگانه می باشد. آنتی بادی A1D12 به علت عدم تغییر قابل ملاحظه در میزان تمایل آنزیم به سوبسترا و افزایش دادن سرعت ماکریزم فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال کننده ها و در نتیجه افزایش کارایی کاتالیتیکی (Kcat/KM) آنزیم به عنوان یک آنتی بادی منوکلونال فعال کننده محسوب می شود. آنتی بادی A1D12 اپی توپی را در ناحیه توالي اسید آمینه ای Arg68-Lys77 انتهای آمینی گلو-

ماتریکس و فاکتورهای رشد آثیروژنیک نظیر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا (TGF- β)، Transforming Growth Factor β (TGF- β)، Hepatocyte Growth Factor (HGF)، Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) و Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) در آثیروژن شرکت می‌کند. طی دهه گذشته تحقیقات آثیروژنیک بر تشخیص و تعیین هویت مهار کننده‌های آثیروژن و آرژش درمانی آنها در درمان سرطان‌ها و بیماری‌های مرتبط با آثیروژن متمرک شده است. سیستم فعال کننده پلاسمین یک هدف بالقوه بدین منظور به حساب می‌آید.^{۱۹} بدین منظور استراتژی‌های مختلفی جهت مهار فعل شدن پلاسمینوژن و آثیروژن به کار گرفته شده‌اند.^{۲۰} از میان مکانیسم‌های پایه‌ای متعددی که تحت پژوهش هستند می‌توان به تداخل بین چسبندگی و رشد سلول‌های اندوتیال اشاره نمود که روش‌های متعددی جهت بلوک این فرایند در نظر گرفته شده است.^{۲۱} برخی مکانیسم‌های دیگر نظیر مهار فعالیت متالوپروتئیناز (که ظاهراً تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتیال را مهار می‌کند) و مهار مسیرهای پیامدهای داخل سلولی (جهت اختلال در رشد و بقاء سلول‌ها) تحت بررسی می‌باشند. برخی از این مهارکننده‌های آثیروژن که تحت کارآزمایی بالینی هستند آنتی‌بادی منوکلونال آنتی‌بادی بر ضد VEGFR2 است (anti-VEGFR2) و آنتی مونوکلونال آنتی‌بادی بر ضد AID12 است (anti-AID12).^{۲۲} جالب این است که این دو آنتی‌بادی فاکتور VEGF اشاره نمود. جالب این است که این دو آنتی‌بادی رشد اندوتیال 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 بدست آمده در *in vitro* آنتی‌بادی MC2B8 به شکل وابسته به دوز فرآیند آثیروژن را مهار می‌کند در حالی که AID12 این فرآیند را به شکل 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 اپی‌توب آنتی‌بادی MC2B8 ممکن است این آنتی‌بادی به عنوان ابزاری کارآمد جهت تشخیص توالی خاصی از پلاسمینوژن که در فرایند رگزایی درگیر است، سودمند باشد. نکته آخر اینکه آنتی‌بادی‌ها به دلیل ویژگی بسیار بالایی که نسبت به آنتی‌ژن هدف دارند، کلاس منحصر به‌فردی از روش‌های درمانی را ارائه می‌نمایند. درمان با آنتی‌بادی یک زمینه

پلاسمینوژن می‌باشد.^{۲۳} این احتمال وجود دارد که عمل مهار به صورت تغییر شکل فضایی صورت گیرد. به علاوه ممکن است آنتی‌بادی MC2B8 با جلوگیری از تشکیل کمپلکس بین فعال کننده‌ها و گلو-پلاسمینوژن موجب مهار فعل شدن پیش‌آنزیم پلاسمینوژن شود. برای در مکانیسم عمل این آنتی‌بادی، مطالعه واکنش‌پذیری آن با بخش‌های مختلف گلو-پلاسمینوژن و بررسی اثر آن بر میانکش بین پلاسمینوژن و فیرینولیز، همانگونه که برای آنتی‌بادی منوکلونال AID12 انجام شده است، و مطالعه اثر آن بر فعل شدن مینی-پلاسمینوژن لازم است. نتایج حاصل از آزمایش مقایسه اثر بخشی F(ab')² آنتی‌بادی AID12 بر فعل شدن گلو-پلاسمینوژن به وسیله F(ab')² با آنتی‌بادی کامل AID12 بیانگر آنست که بخش ۲ u-PA آنتی‌بادی، عامل اصلی و ضروری در القای تغییرات خواص فعل گلو-پلاسمینوژن انسانی است. پیشنهاد می‌شود که با توجه به اثرات بالای آنتی‌بادی منوکلونال AID12 بر سرعت فعل شدن گلو-پلاسمینوژن انسانی که فرم پلاسمایی پلاسمینوژن نیز می‌باشد، با انسانی کردن بخش ۲ F(ab')² این آنتی‌بادی، بتوان از آن به عنوان دارویی در درمان بیماری‌های انسداد عروقی نظر سکته قلبی استفاده نمود، همانگونه که داروهایی به نام Pexelizumab و Abciximab نیز به همین سبک تهیه شده و در درمان سکته قلبی استفاده می‌شوند. برخی از پروتئین‌های مرتبط با انعقاد و فیرینولیز در رگزایی نیز نقش دارند^۷ که از جمله آنها می‌توان به پلاسمینوژن اشاره نمود. در حقیقت مراحل اولیه رگزایی حاصل هماهنگی کمپلکس‌های فعل مولکولی مثل واکنش ایتگرین با متالوپروتئینازها، فعل کننده‌های پلاسمینوژن و سوپسترای آنها و غیره می‌باشد. در تهاجم سلول‌های توموری و تجزیه ساختار عروقی در طی آثیروژن، سیستم پروتولیتیک مانند پلاسمینوژن، فعل کننده‌های پلاسمینوژن و متالوپروتئیناز‌های ماتریکس دارای اهمیت ویژه می‌باشند. عقیده بر این است که u-PA و مهارکننده آن یعنی مهارکننده فعل کننده پلاسمینوژن (PAI-1) در تنظیم مرحله اول رگزایی یعنی تغییر وضع پروتولیتیک پروتئین‌های ماتریکس و مهاجرت سلول‌های اندوتیال درگیر هستند.^{۱۸} تشکیل پلاسمین یک مرحله اساسی در تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتیال به منظور تشکیل عروق جدید است. پلاسمین به صورت مستقیم با تجزیه مستقیم فیرین و ترکیبات دیگر ماتریکس و به صورت غیرمستقیم با فعل کردن متالوپروتئیناز‌های تجزیه کننده

است به گونه‌ای که FDA تاکنون مجوز استفاده درمانی آنتی‌بادی را صادر کرده و تا سال ۲۰۰۰ متوجه از ۷۰ آنتی‌بادی در مرحله کارآزمایی بالینی فاز II بوده‌اند.^{۲۲،۲۳} امید می‌رود با بررسی‌های بیشتر آنتی‌بادی‌های ذکر شده در این مقاله و انجام مطالعات کارآزمایی بالینی و انسانی کردن آنها زمینه برای استفاده‌های بالینی از آنها فراهم گردد.

References

- 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.
- 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.
- 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.
- Oh CW, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1683-7.
- Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 99-108.
- Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3: 605-14.
- Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1835-42.
- Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-4.
- VandeBerg J, Abbe CR, Dyke B. Monoclonal Antibody Production, A Report of the Committee on Methods of Producing. Monoclonal Antibodies. Washington, DC: National Academy Press, 1999.
- Howard GC, Bethell DR. Basic Methods in Antibody Production and Characterization. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001.
- Ploplis VA, Cummings HS, Castellino FJ. Monoclonal antibodies to discrete regions of human Glu1-plasminogen. *Biochemistry* 1982; 21: 5891-7.
- ملکی علی، میرشاھی متوجھ، پورفتح الله علی اکبر، منصوری کامران. آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی A2C8 و MC2B8. *فعالیت سیستم فیبرینولیز را مهار می‌کند*. نشریه علمی-پژوهشی فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳۸۴؛ سال ۹، شماره ۲، ۲۰۳ تا ۲۰۹.
- ملکی علی، میرشاھی متوجھ، پورفتح الله علی اکبر. بررسی اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن A4D10 و A5E10، بر سیستم فیبرینولیز. نشریه علمی-پژوهشی خون ۱۳۸۵؛ سال ۳، شماره ۱: صفحات ۲۹ تا ۳۶.
- 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.
- 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.
- Mars WM, Zaragnar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993; 143: 949-58.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 433-6.

تحقیقاتی نوین را در ارتباط با مهار شکل‌گیری عروق خونی جدید (آثیرپژنر) که با بیماری‌های گوناگونی از جمله سرطان مرتبط است فراهم ساخته است. با توسعه روش‌های مهندسی مولکولی جهت ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال کایمربیک و انسانی شده مجدد رویکرد گسترده‌ای به استفاده بالینی از آنتی‌بادی‌ها صورت گرفته

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

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 Modares University
4- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University

Abstract

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

Background: Plasminogen has a central role in fibrinolytic system can activate through various activators (PAs) to its active form plasmin and perform its vital function that is fibrin clot lysis. Furthermore the fibrinolytic system plays a major role in angiogenesis. The fibrinolytic 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 fibrinolytic 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 fibrinolytic 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.

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