خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۳۶-۲۹)

بررسی اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی A_4D_{10}, A_5E_{10} و A_3B_2 بر سیستم فیبرینولیز

علی ملکی[1]، دکتر منوچهر میرشاهی[2]، دکتر علی اکبر پورفتح الله[3]

چکیده

سابقه و هدف

اصلی‌ترین ترکیب سیستم فیبرینولیز، پیش‌آنزیم پلاسمینوژن می‌باشد که توسط فعال‌کننده‌های مختلفی به فرم فعال خود یعنی آنزیم پلاسمین تبدیل شده و نقش حیاتی خود را که همانا لیز لخته‌های فیبرینی است ایفا می‌کند. نخستین آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی در سال ۱۹۸۲ توسط پلوپلیس تهیه و اثر آن مطالعه شد. از آن زمان تاکنون محققین متعددی در نقاط مختلف دنیا به تهیه و مطالعهٔ آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن همت‌گماشته‌اند که حاصل تحقیقات‌آن‌ها قابل توجه بوده و زوایای تاریکی از دانش ما را در مورد ساختمان و مکانیسم فعال‌شدن پلاسمینوژن، وضعیت فیزیولوژیک فیبرینولیزو غیره روشن ساخته‌اند. در این تحقیق، اثرات احتمالی سه آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی A_4D_{10}, A_5E_{10} و A_3B_2 بر سیستم فیبرینولیز و مکانیسم احتمالی اثر آن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پس از طی مراحلی نظیر کشت سلول‌های هیبریدومای تولید کننده آنتی‌بادی، تزریق این سلول‌ها به صفاق موش، تهیه آسیت و تخلیص آنتی‌بادی‌ها از آن، با روش‌های مختلفی از جمله ارزیابی چشمی لیز لخته پلاسمایی در حضور آنتی‌بادی‌ها، اندازه‌گیری کمی قطعات DD/E به روش آزمون D ـ دایمر، ارزیابی به روش الیزا با استفاده از سوبسترای سنتتیک S-2251 و غیره اثر این آنتی‌بادی‌ها بررسی شد.

یافته‌ها

مشاهدات اولیه با استفاده از پلاسمای پولد انسانی نشان داد که دو آنتی‌بادی A_5E_{10} و A_4D_{10} در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن t-PA، u-PA و SK، فعالیت سیستم فیبرینولیز را افزایش می‌دهند در حالی‌که آنتی‌بادی A_3B_2 در حضور این فعال‌کننده‌ها تأثیری بر سرعت فیبرینولیز ندارد. براساس نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری کمی قطعات DD/E به روش آزمون D ـ دایمر، اثر افزایشی آنتی‌بادی‌های A_4D_{10} وA_5E_{10} به‌صورت وابسته به دوز است. در آزمون دیگری که توسط سوبسترای سنتتیک S-2251 انجام گرفت مشخص شد که فعال شدن پلاسمینوژن در حضور اوروکیناز و در نتیجه شکسته شدن این سوبسترا در حضور آنتی‌بادی‌های A_5E_{10} وA_4D_{10} افزایش می‌یابد. به علاوه بی‌اثر بودن آنتی‌بادی A_3B_2 بر فعال شدن پلاسمینوژن در این آزمون نیز تأیید شد.

نتیجه‌گیری

احتمالا آنتی‌بادی‌های A_4D_{10} و A_5E_{10} با باز کردن فرم ساختاری پلاسمینوژن، فعال شدن آن را در مقابل فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن تسهیل می‌کنند.

کلمات کلیدی: فیبرینولیز، پلاسمینوژن، آنتی‌بادی منوکلونال، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن

تاریخ دریافت: ۸۳/ ۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۱۳

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد هماتولوژی ـ گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۵۵
۲- PhD بیوشیمی ـ استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- PhD ایمونولوژی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تشکیل لخته مانع از دست رفتن خون از عروق آسیب دیده می‌شود. اما در نهایت برای برقراری جریان خون، بایستی این لخته از بین برود. وضعیت اخیر با حل شدن لخته توسط سیستم فیبرینولیز برقرار می‌شود. اجزای سیستم فیبرینولیز شامل یک پیش‌آنزیم غیرفعال (پلاسمینوژن) است که توسط فعال کننده‌های پلاسمینوژن یعنی فعال‌کننده بافتی (t-PA) و فعال کننده ادراری (u-PA) به فرم فعال یعنی پلاسمین تبدیل می‌شود (۱). پلاسمینوژن (EC3.4.21.7) گلیکوپروتئینی تک زنجیره‌ای شامل ۷۹۱ اسید آمینه با وزن مولکولی ۹۲ کیلودالتون است. در قسمت N– ترمینال آن که شامل توالی آمینو اسیدی ۷۷-۱ می‌باشد، قطعهٔ PAP (پپتید پره‌اکتیواسیون) قرار دارد. سپس پنج ساختار حلقوی شکل مشابه به‌نام کرینگل وجود دارد که هر یک از حدود ۸۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند.کرینگل‌ها که آن‌ها را به ترتیب با نمادهای K_1 تا K_5 نشان می‌دهند با دارا بودن جایگاه‌های اتصال به لیزین(LBS) باعث میانکنش داخل مولکول و نیز اتصال پلاسمینوژن به فیبرین (که در سطح خود دارای لیزین فراوان است) می‌گردند. در نهایت در بخش C– ترمینال مولکول، دومین سرین پروتئاز قرار دارد که جایگاه کاتالیتیک پلاسمینوژن (شامل سه اسیدآمینه His^{603}، Asp^{646} و Ser^{741}) بوده و حل لخته فیبرینی را به عهده دارد. به علاوه ناحیه اثرفعال‌کننده‌های پلاسمینوژن که شامل توالی آمینواسیدی Arg^{561}-Val^{562} می‌باشد در این قسمت واقع شده است(۲).

به‌طور کلی مولکول پلاسمینوژن به دو شکل وجود دارد: ۱-گلو ـ پلاسمینوژن که نخستین اسید آمینه N– ترمینال آن یک گلوتامیک اسید می‌باشد. ۲-لیزـپلاسمینوژن که نخستین اسید آمینه N ــ ترمینال آن یک لیزین می‌باشد. گلو ـ پلاسمینوژن درشکل طبیعی خود دارای یک ساختار فضایی بسته و تقریباً دوکی شکل است. این شکل فضایی مولکول پلاسمینوژن را شکل آلفا می‌نامند. چنانچه گلوـپلاسمینوژن تحت تأثیر پروتئازهایی نظیر پلاسمین قرار گیرد، بخش PAP خود را از دست داده و تبدیل به لیزـ پلاسمینوژن می‌شود. لیزــ پلاسمینوژن دارای شکل فضایی گاما می‌باشد (۲).

آنتی‌بادی‌های منوکلونال ازجمله ابزارهای تشخیصی پیشرفته در تحقیقات پزشکی به شمار می‌روند. این مولکول‌های پروتئینی دارای مصارف بی‌شماری از جمله مصارف تشخیصی، درمانی و کاربرد در تحقیقات بنیادین هستند. مثلاً می‌توان از این مولکول‌ها در تعیین جایگاه اپی‌توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن و اعمال احتمالی آن‌ها استفاده کرد. بنابراین از آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌توان در مطالعه میانکنش‌های داخل مولکولی پروتئین‌ها استفاده نمود. نخستین آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی در سال ۱۹۸۲ توسط پلوپلیس و همکاران تهیه ومطالعه شدند. از آن زمان تاکنون محققین متعددی در نقاط مختلف دنیا به تهیه و مطالعهٔ آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن همت گماشته‌اند که حاصل تحقیقات آن‌ها قابل توجه بوده و زوایای تاریکی از دانش ما در مورد ساختمان و مکانیسم فعال شدن پلاسمینوژن و وضعیت فیزیولوژیک فیبرینولیز را روشن ساخته‌اند. به‌طور کلی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضدپلاسمینوژنی که تاکنون تهیه شده‌اند از نظر عملکردی در سه دسته کلی قرار می‌گیرند، دسته‌ای از آن‌ها سرعت فعال شدن پلاسمینوژن را در حضور تمامی فعال‌کننده‌های آن افزایش می‌دهند (مثل MPW2PG، MPW1PG، F12P18، F11P6، F11P5، F3P2، A1D12). دسته دوم آنتی‌بادی‌ها (نظیر αpg-96) باعث مهار فعال شدن پلاسمینوژن در حضور این فعال‌کننده‌ها می‌شوند و بالاخره دسته سوم آن‌هایی هستند که در حضور برخی فعال کننده‌های پلاسمینوژن اثر فعال‌کنندگی یا مهاری بر فعال شدن پلاسمینوژن دارند و در حضور برخی دیگر از این فعال‌کننده‌ها بی‌اثر بوده و یا اثر مخالف دارند. به عنوان مثال αpg-28 و αpg-247 فعال شدن پلاسمینوژن را در حضور t – PA و SK مهار می‌کنند ولی در حضور u – PA فاقد این اثر می‌باشند (۱۳-۳).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده‌از نوع تجربی بود. پلاسمای مورد استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

از نوع پولد بوده و از مخلوط FFP پنج اهداکننده سالم (به نسبت مساوی) به‌دست آمد. نمونه در حجم‌های کوچک تقسیم شده و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

تهیه و تخلیص آنتی‌بادی‌های منوکلونال

سلول‌های هیبریدومای تولید کننده هر یک از آنتی‌بادی‌ها در محیط RPMI- ۱۶۴۰ (سیگما) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند. پس از آن‌که تعداد این سلول‌ها به حد کافی رسید، حدود 10^6 سلول (به‌صورت سوسپانسیون در PBS) به صورت داخل صفاقی به موش‌های Balb/c (انستیتو پاستور ایران) که از قبل پریستان دریافت کرده بودند تزریق شد. پس از گذشت۲-۱ هفته که مایع آسیت هر یک از موش‌ها به میزان کافی رسید، مایع آسیت آن‌ها آسپیره شده و پس از سانتریفوژ شدن (۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰) در دمای ۲۰- درجه منجمد شد. آنتی‌بادی‌های موجود در آسیت پس از تغلیظ به روش رسوب در غلظت۵۰-۴۵ درصد آمونیوم سولفات اشباع، در حداقل حجم بافر PBS ۰/۱ مولار حل شده و به مدت یک شب در همین بافر دیالیز شدند. درمرحلهٔ بعد آنتی‌بادی‌ها به روش افینیتی کروماتوگرافی توسط پروتئین G فارماسیا خالص شدند (۳). در نهایت با توجه به میزان جذب آنتی‌بادی‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر، غلظت هر یک از آنتی‌بادی‌ها محاسبه شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت لیز لخته پلاسمایی در حضور فعال کننده‌های پلاسمینوژن (تعیین اثر اولیه آنتی‌بادی‌ها)

نخست شرایط به‌گونه‌ای تعیین شد که ۲۰۰ میکرولیتر لخته پلاسمای پولد توسط غلظت مناسبی از هر یک از فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن t-PA، u-PA و Sk سیگما (با حجم ۱۰ میکرولیتر) در فاصلهٔ زمانی ۲-۱ ساعت به‌طور کامل لیز گردد. به این‌ترتیب مشخص شد که غلظت مناسب فعال‌کننده‌ها برای هدف مذکور برابر ۵IU/ml برای Sk، ۱mg/ml برای t-PA و ۱۳۰۰IU/ml برای u-PA می‌باشد. سپس برای تعیین اثر آنتی‌بادی‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسمای پولد با ۱۵ میکرولیتر از غلظت ۴ mg/ml هر یک از آنتی‌بادی‌ها مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحلهٔ بعد پس از اضافه شدن ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مذکور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن، ۲۵ میکرولیتر از غلظت IU/ml ۵۰ ترومبین انسانی سیگما به مخلوط پلاسمایی فوق اضافه شد و در شرایطی که لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه انکوبه بودند، در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای میزان لیز لختهٔ پلاسمایی در حضور هر یک از آنتی‌بادی‌ها ارزیابی شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت لیز لختهٔ پلاسمایی در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن به روش آزمون D ـ دایمر

در لوله‌های آزمایش متعدد، ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسمای پولد با ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۴، ۲، ۱و ۰/۵ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر هر یک از آنتی‌بادی‌ها مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به هر سری از این لوله‌ها ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های از پیش تعیین شده فعال کننده‌های پلاسمینوژن اضافه شد و پس از آن‌که محتویات لوله‌ها توسط ۲۵ میکرولیتر ترومبین انسانی (با غلظت ۵۰IU/ml) منعقد شد، در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای (در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) 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 (Bayer) (۱۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰۰۰IU/ml) فعالیت فیبرینولیز مهار و میزان D - دایمر سرم‌های به‌دست آمده، به روش اتوماتیک ایمونوتوربیدومتری توسط اتوآنالیزر استاگوکامپکت (فرانسه) اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت فعال شدن پلاسمینوژن توسط اوروکیناز (u-PA) با استفاده از سوبسترای سنتتیک S-2251

برای انجام این آزمون پس از آن که شرایط بهینه هر یک از اجزای شرکت‌کننده تعیین شد به ترتیب زیر عمل کردیم. نخست در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت

Archive of SID
www.SID.ir

سلول، ۲۵ میکرولیتر از پلاسمینوژن خالص (اهدایی دکتر میرشاهی) (غلظت ۲۵۰ µg/ml) ریخته و ۲۵ میکرولیتر از غلظت ۵۰۰µg/ml هریک از آنتی‌بادی‌ها به آن اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲۵µl از غلظت ۶۰۰۰µg/ml سوبسترای سنتتیک S -۲۲۵۱ (کروموژنیکس) و سپس ۲۵µl از غلظت ۳۰IU/ml اوروکیناز به چاهک‌ها اضافه شد و در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای میزان جذب نور چاهک‌ها توسط دستگاه الیزاریدر (آنتوس) در طول موج ۴۰۵ نانومتر سنجش شد. شایان ذکر است تمامی مراحل فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. لازم به ذکر است که در این مرحله از چندین کنترل مختلف استفاده شد.

بررسی میزان اتصال پلاسمینوژن به فیبرینوژن در حضور آنتی‌بادی‌ها به روش الیزا

نخست ۶۰۰ µL از محلول ۱۰ mg/ml پلاسمینوژن خالص توسط ۱۳۵µL از محلول ۱۰ میلی مولار بیوتین (پیرس) در حضور ۲۲۵µL بافر PBS ۰/۱ مولار بیوتیلینه شد (محصول نهایی ۱۰۰µL پلاسمینوژن بیوتینیله باغلظت 6mg/ml بود). به منظور بررسی اثر آنتی بادی‌ها بر اتصال پلاسمینوژن بیوتینیله به فیبرینوژن، از روش الیزا استفاده شد.

به این منظور نخست در یک پلیت الیزا با استفاده از ۱۰۰µL از غلظت ۱۰µg/ml فیبرینوژن مرحله کوتینگ (Coating) انجام گرفت. پس از انکوباسیون، بلوکینگ (Blocking) توسط محلول مسدودکننده شامل بافر PBS (حاوی غلظت ۱٪ آلبومین سرم گاوی‌یا BSA) و شستشو، ۱۰۰µL از مخلوط از پیش‌انکوبه شده پلاسمینوژن بیوتینیله و آنتی‌بادی‌ها (۵۰µL از غلظت ۱۶µg/ml پلاسمینوژن بیوتینیله و۵۰µL از غلظت‌های ۱۶، ۸ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیترآنتی‌بادی‌های مذکور) به چاهک‌ها اضافه کرده و انکوباسیون نمودیم.پس از شستشو به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰µL از رقت $\frac{1}{300}$ محلول ST-HRP (پیرس) اضافه شد. پس از ۱۵دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰µL از سوبسترایTMB (پیرس) اضافه‌شد و پس از ۳۰ دقیقه به کمک اسیدسولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف شد. سپس جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه الیزاریدر (آنتوس) قرائت شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین اثر اولیه آنتی‌بادی‌ها

بر اساس مطالعاتی که بر سرعت لیز لختهٔ پلاسمایی در حضور آنتی‌بادی‌ها به روش چشمی انجام شده مشخص‌شد که در حضور سه فعال کننده پلاسمینوژن (u-PA , t-PA , SK) آنتی‌بادی‌های A_5E_{10} و A_4D_{10} سرعت انحلال لخته پلاسمایی‌را افزایش می‌دهند در حالی که در حضور این فعال کننده‌ها،آنتی‌بادی A_3B_2 بی‌اثراست.

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها به روش آزمون D– دایمر

براساس نتایجی که از آزمون D ــ دایمر نمونه‌ها به‌دست آمد مشخص شد که آنتی‌بادی‌های A_5E_{10} و A_4D_{10} به‌صورت وابسته به دوز، فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن افزایش می‌دهند. در حالی‌که آنتی‌بادی A_3B_2 اثری بر فعالیت سیستم فیبرینولیز ندارد(نمودارهای ۱ تا ۵).

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها به روش آزمون هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251

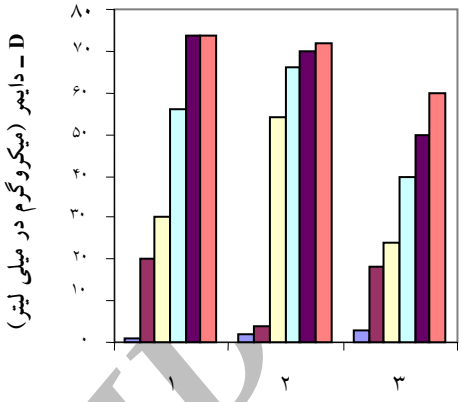
نتایج حاصل از این آزمون تأیید کننده نتایج به‌دست آمده از مراحل قبلی بود. یعنی دو آنتی‌بادی A_5E_{10} و A_4D_{10} برفعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط اوروکیناز و هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251، اثر افزایش دهنده داشتند و آنتی‌بادی A_3B_2 نیز اثری بر این واکنش نداشت. براساس آزمون هیدرولیز S-2251، اثر افزایشی A_5E_{10} بر فعال شدن پلاسمینوژن بیشتر از A_4D_{10} است (نمودار ۴).

نتایج حاصل از بررسی میزان اتصال پلاسمینوژن به فیبرینوژن در حضور آنتی‌بادی‌ها

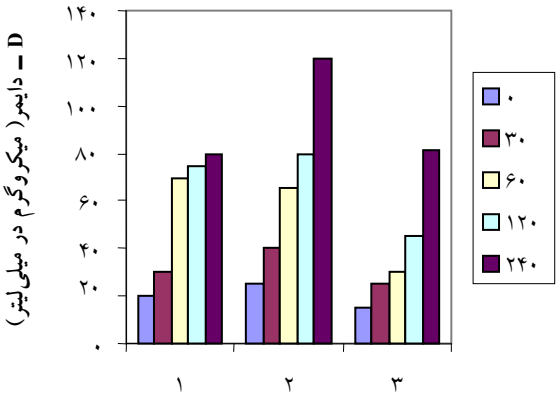
کلیه آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه در این تحقیق میزان اتصال‌پلاسمینوژن به‌فیبرینوژن‌را افزایش می‌دهند(نمودار۵).

Archive of SID

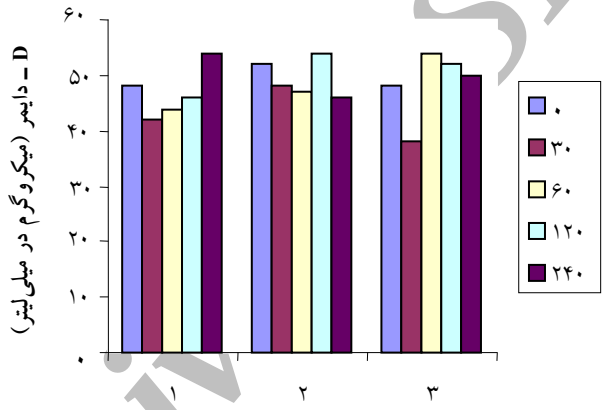
www.SID.ir



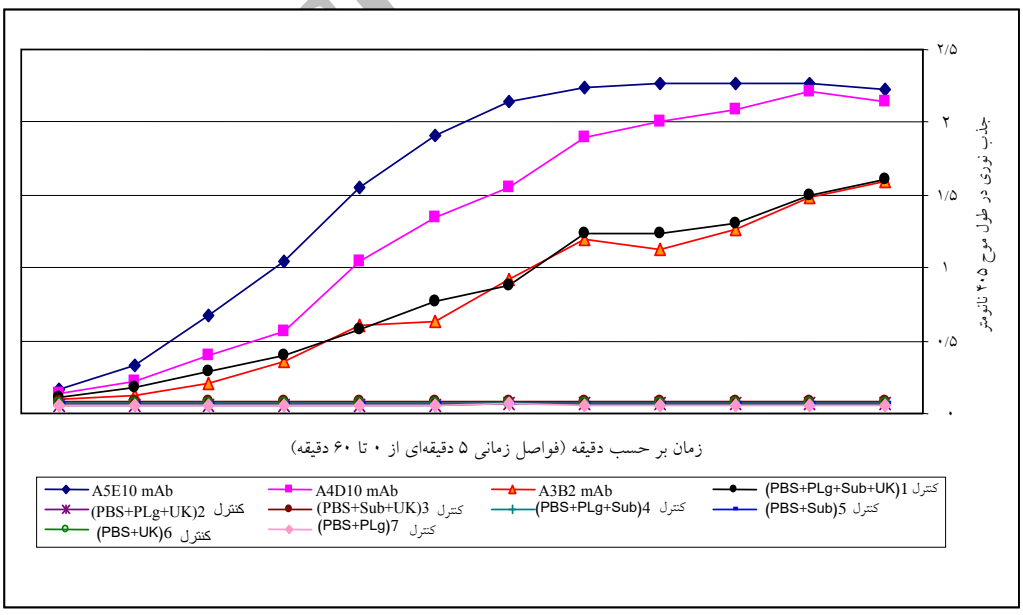
نمودار ۱: اثر افزایشی آنتی‌بادی A_5E_{10}



نمودار ۲: اثر افزایشی آنتی‌بادی A_4D_{10}

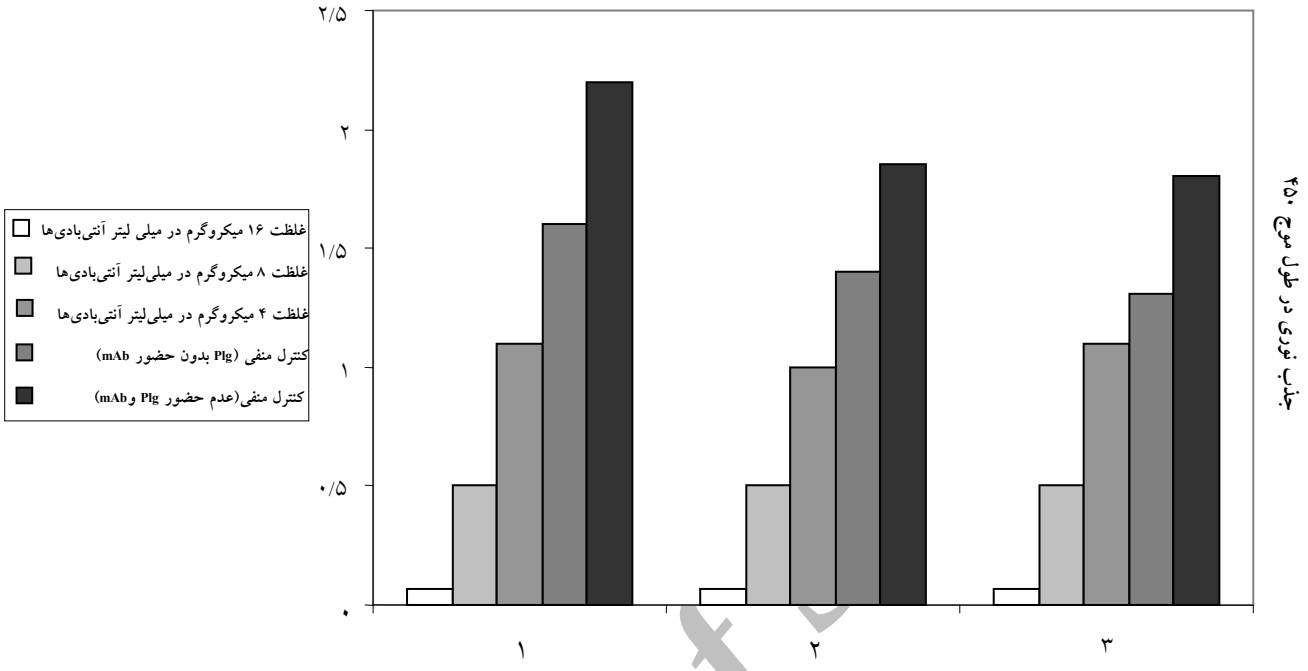


نمودار ۳: آنتی‌بادی A_3B_2 بر فعال شدن سیستم فیبرینولیز در حضور فعال کننده‌های پلاسمینوژن بی اثر است



نمودار۴: اثرآنتی‌بادی‌ها به‌روش‌آزمون هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251آنتی بادی‌های A_1D_{12}،A_5E_{10}وA_4D_{10} سرعت تبدیل پلاسمینوژن

www.SID.ir



نمودار۵: بررسی اتصال پلاسمینوژن بیوتینیله به فیبرینوژن در حضور غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی‌ها

بحث

در یک جمع‌بندی کلی از نتایج به‌دست آمده تا این مرحله، مشخص می‌شود که آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه در این تحقیق از نظر عملکردی در دو دسته قرار می‌گیرند. دستهٔ اول آنتی‌بادی‌ها که شامل A_5E_{10} و A_4D_{10} می‌باشند، سرعت فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال‌کننده‌های u-PA, t-PA و SK را افزایش داده و در نتیجه باعث تسریع انحلال لخته پلاسمایی و آزاد شدن فرآورده D– دایمر می‌شوند. این دسته همچنین با افزایش فعال شدن پلاسمینوژن در حضور u-PA، هیدرولیز سوبسترای S-2251 را تسریع می‌کنند. دستهٔ دوم که شامل A_3B_2 می‌باشد، بر سرعت فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال‌کننده‌ها تأثیری ندارد.

آنتی‌بادی‌هایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند دارای موارد تشابه و تفاوت متعددی با دیگر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضدپلاسمینوژن که تاکنون تهیه شده‌اند، می‌باشند. به‌عنوان مثال دو آنتی‌بادی A_5E_{10} و A_4D_{10} از نظر عملکردی به میزان زیادی با آنتی‌بادی‌های MPW_1PG و MPW_2PG (هاتی ۱۹۸۷) مشابهت دارند(۳). کلیه این آنتی‌بادی‌ها انحلال لخته را در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن تسریع می‌کنند و نیز سرعت فعال شدن پلاسمینوژن درحضور u–PA و در نتیجه هیدرولیز سوبسترای S-2251 را افزایش می‌دهند. اختلاف A_5E_{10} و A_4D_{10} با آنتی‌بادی‌های مذکور در این است که اثر افزایشی آنتی‌بادی‌های A_5E_{10}, A_4D_{10} بر فعال شدن plg در حضور PA ها در یک حالت وابسته به دوز است در حالی‌که MPW_1PG و MPW_2PG در مقابل فعال کننده u-PA به صورت وابسته به دوز و در مقابل t - PA به صورت غیروابسته به دوز عمل می کنند (۳). هم‌چنین دو آنتی‌بادی A_5E_{10} و A_4D_{10} تشابه زیادی با آنتی‌بادی A_1D_{12} (میرشاهی ۱۹۹۷) از نظر افزایش سرعت انحلال لخته پلاسمایی و آزاد سازی فرآورده D ـ دایمر دارند. از نظر هیدرولیز S-2251 نیز مشابه A_1D_{12} عمل می‌کنند ولی اثر آن‌ها ضعیف‌تر از A_1D_{12} است ($A_1D_{12}>A_5E_{10}>A_4D_{10}$) (نمودار ۵). تحقیقات انجام گرفته بر سینیتیک فعال شدن پلاسمینوژن نشان می‌دهد که سرعت فعال شدن این مولکول ارتباط مستقیمی با وضعیت ساختاری آن دارد. این مولکول در فرم آلفا به دلیل بسته بودن ساختار تمایل کمتری به فعال شدن دارد در حالی‌که فرم بتای آن که ساختاری نیمه باز دارد با سرعت بیشتری فعال می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات انجام شده بر آنتی‌بادی A_1D_{12} نشان می‌دهد که این آنتی‌بادی با اتصال به بخش پپتید N– ترمینال (NTP) پلاسمینوژن، میانکنش این بخش را با کرینگل ۵، که نقش عمده‌ای در ایجاد فرم بسته (آلفا) ساختار پلاسمینوژن دارد، از بین می‌برد (۹). با این عمل مولکول گلو- پلاسمینوژن بازتر شده و از نظر ساختاری به لیز-پلاسمینوژن نزدیک می‌شود (۱۴). این تغییر شکل در رفتار سینتیکی این پروتئین نیز به خوبی منعکس می‌شود چرا که فعال شدن کمپلکس A_1D_{12}-plg توسط فعال کننده‌های پلاسمینوژن به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد (۹).

نتیجه‌گیری

احتمال می‌رود آنتی‌بادی‌های A_5E_{10} و A_4D_{10} با بازکردن فرم ساختاری پلاسمینوژن، بر فعال شدن آن توسط فعال‌کننده‌ها (PAs) تأثیرگذار باشند. به ویژه آن که این آنتی‌بادی‌ها باعث اتصال بیشتر پلاسمینوژن بیوتینیله‌شده به فیبرین می‌شوند. شایان ذکر است مولکول پلاسمینوژن در فرم‌های ساختاری نیمه‌باز (β) یا باز (γ) نسبت به فرم ساختاری بسته خود (فرم α) به میزان بیشتری به فیبرینوژن (فیبرین) متصل می‌شود. تفاوت میزان اثر فعال‌کنندگی دو آنتی‌بادی A_5E_{10} و A_4D_{10} در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن (به‌ویژه در حضور u-PA در آزمون هیدرولیز S-2251) نشان می‌دهد که این آنتی‌بادی‌ها دارای جایگاه‌های تشخیص (اپی‌توپ) متفاوتی برروی پلاسمینوژن هستند.

Archive of SID

References :

1- Axelsso F. Plasminogen. Product monograph.1995; Available fromL URL:http: www. Chromogenix.Se/.
2- Ponting CP, Marshall J M, Cederholm W. Plasminogen: a structural review. Blood Coagulation and Fibrinolysis 1992; 3: 605-614.
3- Hattey E, Wojta J, Binder BR. Monoclonal antibodies against plasminogen and alpha-2-antiplasmin: binding to native and modified antigens. Thromb Res 1987; 45: 485-495.
4- Ploplis VA, Cummings HS, Castellino FJ. Monoclonal antibodies to discrete region of human Glu-Plasminogen. Biochemistry 1982; 21: 5891-97.
5- Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A monoclonal antibody specific for Lys-Plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen invivo. J Biol Chem 1985; 260:12106-12111.
6- Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A Monoclonal antibody directed against the high-affinity lysine-binding site (LBS) of human plasminogen. Role of LBS. In the regulation of fibrinolysis. Eur J Biochem 1986; 15: 65-69.
7- Sim PS, Fayle DRH, Doe WF, Stephens RW. Monoclonal antibodies inhibitory to human plasmin. Eur J Biochem 1986; 158:537-542.
8- William R, Church L, Terri LM. Inhibition of plasminogen activation by monoclonal antibodies to the kringle 5-B chain segment of human plasminogen. Hybridoma 1991; 10(6): 659-672.
9- Mirshahi MC, Soria J, Lignen 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 modificatio of its functional roperties. Fibrinolgysis proteolysis 1997; 11(3): 155-163.
10- Macloiwa S, Arai K, Ueda y, Ishizuka M, Mimuro J, Asakura S, Matsuda M, et al. A battery of monoclonal antibodies that induce unique conformations to evolve cript but constitutive function of plasminogen. J Biochem 1997; 121 (2) : 278-287.
11- Makohonenko IM, Iakovlev So, Slominskii OI, Korolchuk VI, Hrynenko TV. Plasminogen activation by anti plasminogen monoclonal antibody 1V-1C. Properties and mechanism of reaction. Ukr Biokhim zh 2000; 72(4): 99-108.
12- Cummngs HS, Castellino FJ. A monoclonal antibody to the epsilou-aminocaproic acid binding site on the kringle 4 region of human plasminogen that accelerates the activation of Glu-plasminogen bu urokinase. Arch Biochem Biophys 1985; 236: 612-618.
13- Ehrenreich F, Hattey E, Wojta J, Binder BR. Effect of antiplasminogen monoclonal antibodies on whole blood clot lysis. Haemostasis 1988; 18:99-107.
14- Mirshahi MC, Ranjbar B, Soria J, Soria C. A conformational change of glu-plasminogen by the monoclonal antibody A1D12, inducing a changement of plasminogen binding to fibrin and an increased activation by plasminogen activators: a study by fluorescence spectroscopy and circular dichrosim. Supplement to the Journal of Trombosis and Haemostasis 2001.
15- Slominskii AL. Catalytic properties of Glu-plasminogen in a complex with monoclonal antibody 1V-1C. Ukr Biokhim Zh 1999; 71(4): 113-115.

www.SID.ir

Evaluation of the effect of antihuman plasminogen monoclonal antibodies of A_4D_{10}, A_5E_{10} and A_3B_2 on the activation of fibrinolytic system

Maleki A.[1](MS), Mirshahi M.[1](PhD), Pourfathollah A.A.[1,2](PhD)

[1]*Department of Hematology of Tarbiat Modarres University*
[2] *Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center*

Abstract

Background and Objectives
The most important component of fibrinolytic system is the proenzyme plasminogen that through various activators is converted to its active form plasmin and performs its vital functions that is fibrin clot lysis. The first anti human plasminogen antibody was prepared by Ploplis in 1982 and its effect was studied. Since then many researchers have attempted to prepare and study anti plasminogen antibodies to elucidate important aspects of structure and activation mechanism of plasminogen , physiologic condition of fibrinolysis, etc. In the present study, we studied the probable effects of three antihuman plasminogen monoclonal antibodies A_4D_{10}, A_5E_{10} and A_2C_8 on the activation of the fibrinolytic system.

Materials and Methods
After separate steps like the culture of antibody-producing hybridoma cells, their injection to mice, extraction of the ascites fluid and purification of antibodies were taken, various methods such as optical evaluation of plasma clot lysis in the presence of antibodies, quantitative measurement of DD/E in D-dimer assay, evaluation with ELIZA assay using S-2251 synthetic substrate lysis and the like were used to study the effects of thses antibodies.

Results
Primary observations with human pooled plasma showed that in the presence of plasminogen activators (t-PA, u-PA and SK), A_5E_{10} and A_4D_{10} can enhance activation of fibrinolytic system, but A_3B_2 has no effect on this system. According to D- dimer assay, it was shown that the lytic effects of A_5E_{10} and A_4D_{10} antibodies were dose dependent; the higher the amount of antibodies, the lower their effects. The other test performed with S-2251 synthetic substrate showed plasminogen activation in the presence of Urokinase; therefore, lysis of this substrate enhanced in the presence of A_5E_{10} and A_4D_{10} antibodies. Moreover, in this test ineffectiveness of A3B2 on plasminogen activation was confirmed**.**

Conclusions
In conclusion, we suggested A_4D_{10} and A_5E_{10} antibodies by modification of structural from of plasminogen facilitate its activation in presence of plasminogen activators.

Key words*:* Fibrinolytic, Plasminogen, Monoclonal antibody, Plasminogen activators
SJIBTO 2006; 3(1): 29-36

Received: 14 Des 2004
Accepted: 4 Mar 2006

Correspondence: Maleki A., MS of Hematology, Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14155-111,Tehran, Iran.Tel: (+9821) 88011001; Fax : (+9821) 88013030
E-mail: *Ali Hematologist@yahoo.com*

Archive of SID
www.SID.ir