

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

علی ملکی<sup>۱</sup>، دکتر منوچهر میرشاهی<sup>۲</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله<sup>۳</sup>

### 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 مطالعه آنتی‌بادی‌های ضد پلاسمینوژن همت گماشته‌اند که حاصل تحقیقات آن‌ها قابل توجه بوده و زوایای تاریکی از دانش ما را در مورد ساختمان و مکانیسم فعال‌شدن پلاسمینوژن، وضعیت فیزیولوژیک فیبرینولیز و غیره روشن ساخته‌اند. در این تحقیق، اثرات احتمالی سه آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی  $A_3B_2$  و  $A_4D_{10}$ ،  $A_5E_{10}$  بر سیستم فیبرینولیز و مکانیسم احتمالی اثر آن مورد مطالعه قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

پس از طی مراحل 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 - 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  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  در حضور فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن t-PA، u-PA و SK، فعالیت سیستم فیبرینولیز را افزایش می‌دهند در حالی که آنتی‌بادی  $A_3B_2$  در حضور این فعال‌کننده‌ها تأثیری بر سرعت فیبرینولیز ندارد. براساس نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری کمی قطعات DD/E به روش آزمون D - دایمر، اثر افزایشی آنتی‌بادی‌های  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  به صورت وابسته به دوز است. در آزمون دیگری که توسط سوبسترای سنتتیک S-2251 انجام گرفت مشخص شد که فعال‌شدن پلاسمینوژن در حضور اوروکیناز و در نتیجه شکسته شدن این سوبسترا در حضور آنتی‌بادی‌های  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  افزایش می‌یابد. به علاوه بی‌اثر بودن آنتی‌بادی  $A_3B_2$  بر فعال‌شدن پلاسمینوژن در این آزمون نیز تأیید شد.

#### نتیجه‌گیری

احتمالاً آنتی‌بادی‌های  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  با باز کردن فرم ساختاری پلاسمینوژن، فعال‌شدن آن را در مقابل فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن تسهیل می‌کنند.

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

تاریخ دریافت: ۱۳/۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴/۱۲/۱۳

۱- مؤلف مسئول: کارشناس ارشد هماتولوژی - گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس - صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۵۵

۲- PhD بیوشیمی - استادیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- PhD ایمونولوژی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

**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 فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن یعنی فعال‌کننده بافتی (t-PA) و فعال‌کننده اداری (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 ۱-۷۷ می‌باشد، قطعه PAP (پپتید پراکتیواسیون) قرار دارد. سپس پنج ساختار حلقوی شکل مشابه به نام 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 اسید آمینه  $^{603}\text{His}$ ،  $^{646}\text{Asp}$  و  $^{741}\text{Ser}$ ) بوده و حل لخته فیبرینی را به عهده دارد. به علاوه ناحیه اثر فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن که شامل توالی آمینو اسیدی  $^{562}\text{Val}$ - $^{561}\text{Arg}$  می‌باشد در این قسمت واقع شده است (۲).

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

آنتی‌بادی‌های منوکلونال از جمله 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 و مطالعه شدند. از آن زمان تاکنون محققین متعددی در نقاط مختلف دنیا به تهیه و مطالعه 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. به طور کلی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژنی 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 F11P5, F11P6, F12P18, MPW1PG, MPW2PG, A1D12, F3P2). دسته دوم آنتی‌بادی‌ها (نظیر  $\alpha\text{pg-96}$ ) باعث مهار فعال شدن پلاسمینوژن در حضور این فعال‌کننده‌ها می‌شوند و بالاخره دسته سوم آن‌هایی هستند که در حضور برخی فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن اثر فعال‌کنندگی یا مهار بر فعال شدن پلاسمینوژن دارند و در حضور برخی دیگر از این فعال‌کننده‌ها بی‌اثر بوده و یا اثر مخالف دارند. به عنوان مثال  $\alpha\text{pg-28}$  و  $\alpha\text{pg-247}$  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 شده از نوع تجربی بود. پلاسمای مورد استفاده

۲۰۰ میکرولیتر از پلاسما 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 مرحله بعد پس از اضافه شدن ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مذکور فعال‌کننده‌های پلاسما، 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 لخته پلاسمایی در حضور هر یک از آنتی‌بادی‌ها ارزیابی شد.

## بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت لیز لخته پلاسمایی در حضور فعال‌کننده‌های پلاسما، آزمون D - دایمر

در لوله‌های آزمایش متعدد، ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسما پولد با ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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 فعال‌کننده‌های پلاسما، اضافه شد و پس از آن‌که محتویات لوله‌ها توسط ۲۵ میکرولیتر ترومبین انسانی (با غلظت ۵۰ IU/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 ۱۰۰۰۰ IU/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 پلاسما، آزمون 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

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 تولیدکننده 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 ۱۰<sup>۶</sup> سلول (به‌صورت سوسپانسیون در PBS) به صورت داخل صفاقی به موش‌های Balb/c (انستیتو پاستور ایران) که از قبل پرستان دریافت کرده بودند تزریق شد. پس از گذشت ۲-۱ 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 غلظت ۵۰-۴۵ درصد آمونیوم سولفات اشباع، در حداقل حجم بافر PBS ۰/۱ مولار حل شده و به مدت یک شب در همین بافر دیالیز شدند. در مرحله 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 فعال‌کننده‌های پلاسما، آزمون تعیین اثر اولیه آنتی‌بادی‌ها

نخست شرایط به‌گونه‌ای تعیین شد که ۲۰۰ میکرولیتر لخته پلاسما پولد توسط غلظت مناسبی از هر یک از فعال‌کننده‌های پلاسما، t-PA، u-PA و Sk سیگما (با حجم ۱۰ میکرولیتر) در فاصله زمانی ۲-۱ ساعت به‌طور کامل لیز گردد. به این ترتیب مشخص شد که غلظت مناسب فعال‌کننده‌ها برای هدف مذکور برابر ۵ IU/ml برای Sk، ۱ mg/ml برای t-PA و ۱۳۰۰ IU/ml برای u-PA می‌باشد. سپس برای تعیین اثر آنتی‌بادی‌ها در

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 لخته پلاسمایی در حضور آنتی‌بادی‌ها به روش چشمی انجام شده مشخص شد که در حضور سه فعال کننده پلاسمینوژن (SK, t-PA, u-PA) آنتی‌بادی‌های A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> و A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> سرعت انحلال لخته پلاسمایی را افزایش می‌دهند در حالی که در حضور این فعال کننده‌ها، آنتی‌بادی A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> بی‌اثر است.

#### نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها به روش آزمون D-دایمر

بر اساس نتایجی که از آزمون D-دایمر نمونه‌ها به دست آمد مشخص شد که آنتی‌بادی‌های A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> و A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> به صورت وابسته به دوز، فعالیت سیستم فیبرینولیز را در حضور فعال کننده‌های پلاسمینوژن افزایش می‌دهند. در حالی که آنتی‌بادی A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> 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 به دست آمده از مراحل قبلی بود. یعنی دو آنتی‌بادی A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> و A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> بر فعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط اوروکیناز و هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251، اثر افزایش دهنده داشتند و آنتی‌بادی A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> نیز اثری بر این واکنش نداشت. بر اساس آزمون هیدرولیز S-2251، اثر افزایشی A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> بر فعال شدن پلاسمینوژن بیشتر از A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> است (نمودار ۴).

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

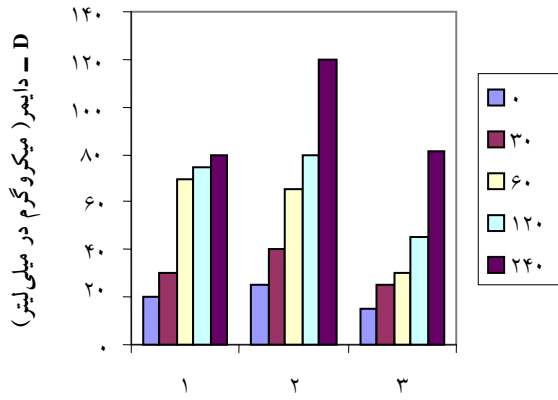
کلید آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه در این تحقیق میزان اتصال پلاسمینوژن به فیبرینوژن را افزایش می‌دهند (نمودار ۵).

سلول، ۲۵ میکرولیتر از پلاسمینوژن خالص (اهدایی دکتر میرشاهی) (غلظت ۲۵۰ μg/ml) ریخته و ۲۵ میکرولیتر از غلظت ۵۰۰ μg/ml هریک از آنتی‌بادی‌ها به آن اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲۵ μl از غلظت ۶۰۰۰ μg/ml سوبسترای سنتتیک S-2251 (کروموژنیکس) و سپس ۲۵ μl از غلظت ۳۰ IU/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.

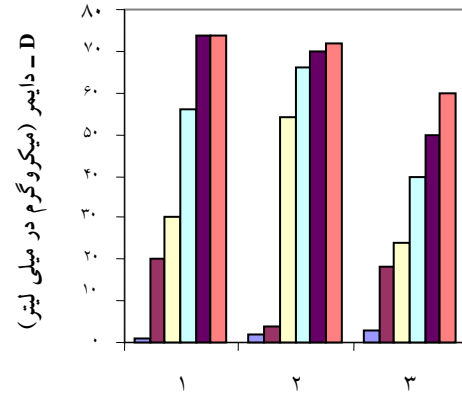
#### بررسی میزان اتصال پلاسمینوژن به فیبرینوژن در حضور آنتی‌بادی‌ها به روش الیزا

نخست ۶۰۰ μL از محلول ۱۰ mg/ml پلاسمینوژن خالص توسط ۱۳۵ μL از محلول ۱۰ میلی مولار بیوتین (پیرس) در حضور ۲۲۵ μL بافر PBS ۰/۱ مولار بیوتیلینه شد (محصول نهایی ۱۰۰ μL پلاسمینوژن بیوتیلینه باغلظت ۶ mg/ml بود). به منظور بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر اتصال پلاسمینوژن بیوتیلینه به فیبرینوژن، از روش الیزا استفاده شد.

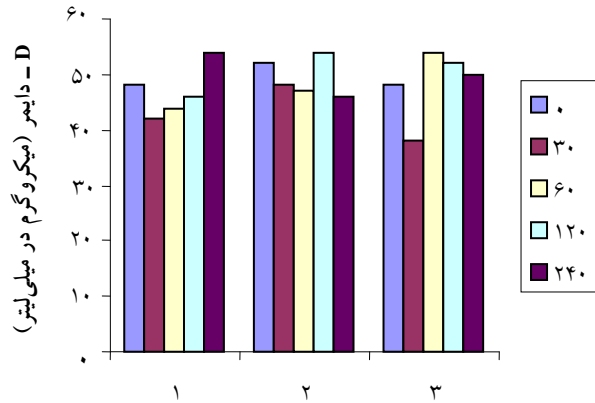
به این منظور نخست در یک پلیت الیزا با استفاده از ۱۰۰ μL از غلظت ۱۰ μg/ml فیبرینوژن مرحله کوتینگ (Coating) انجام گرفت. پس از انکوباسیون، بلوکینگ (Blocking) توسط محلول مسدودکننده شامل بافر PBS (حاوی غلظت ۱٪ آلبومین سرم گاوی یا BSA) و شستشو، ۱۰۰ μL از مخلوط از پیش‌انکوبه شده پلاسمینوژن بیوتیلینه و آنتی‌بادی‌ها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



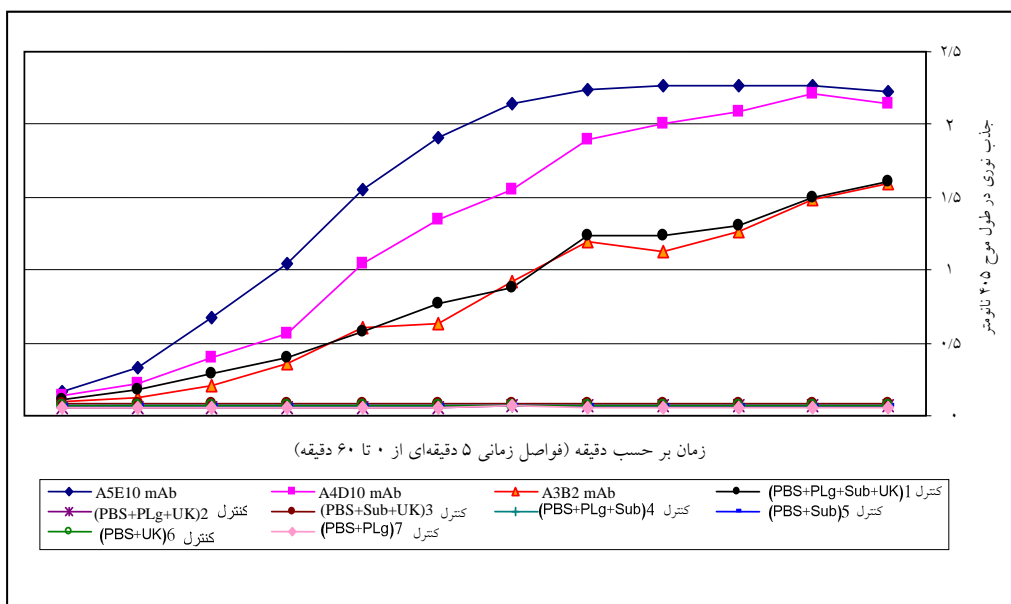
نمودار ۲: اثر افزایشی آنتی بادی A4D10



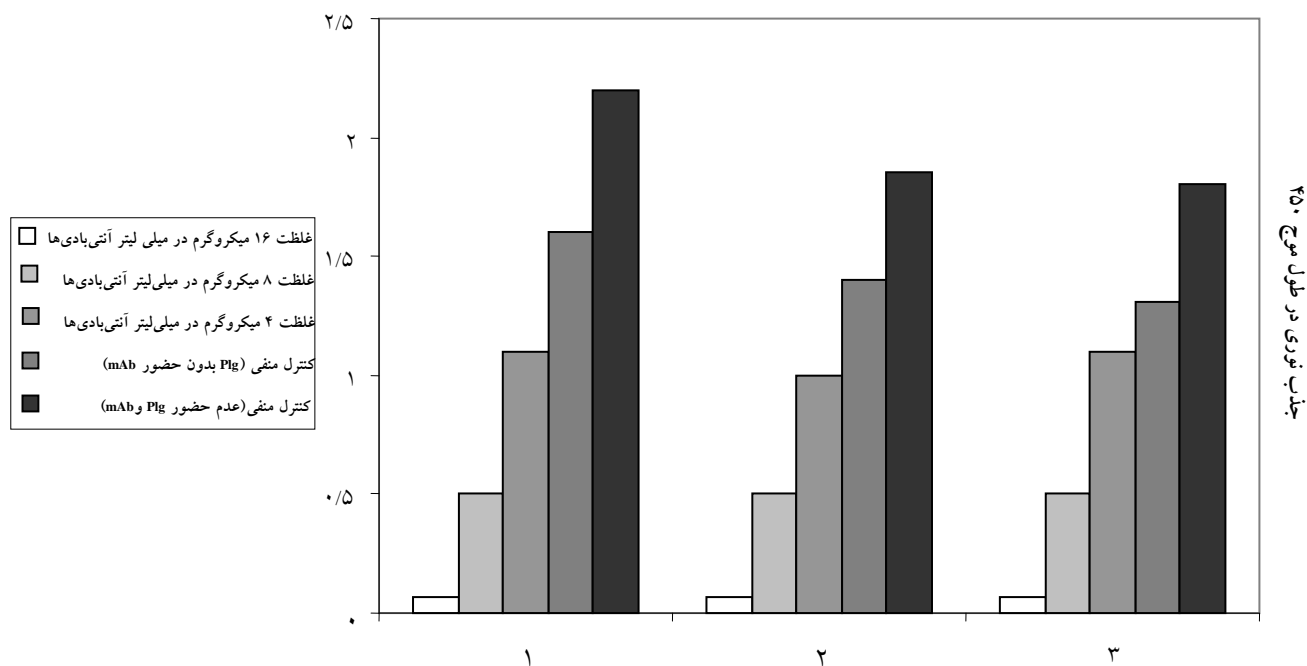
نمودار ۱: اثر افزایشی آنتی بادی A5E10



نمودار ۳: آنتی بادی A3B2 بر فعال شدن سیستم فیبرینولیز در حضور فعال کننده‌های پلاسمینوژن بی اثر است



نمودار ۴: اثر آنتی بادی‌ها به روش آزمون هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251 آنتی بادی‌های A4D10، A5E10، A7D12 و A4D10 سرعت تبدیل پلاسمینوژن



نمودار ۵: بررسی اتصال پلاسمینوژن بیوتینیل 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. دسته اول آنتی‌بادی‌ها که شامل  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  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. دسته 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 در حضور  $u-PA$  و در نتیجه هیدرولیز سوبسترای  $S-2251$  را افزایش می‌دهند. اختلاف اثر افزایشی آنتی‌بادی‌های  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  با این است که در حضور  $PA$ ‌ها در یک حالت وابسته به دوز است در حالی‌که  $MPW_1PG$  و  $MPW_2PG$  در مقابل فعال‌کننده  $u-PA$  به صورت وابسته به دوز و در مقابل  $t-PA$  به صورت غیروابسته به دوز عمل می‌کنند (۳). هم‌چنین دو آنتی‌بادی  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$  تشابه زیادی با آنتی‌بادی  $A_1D_{12}$  (میرشاهی ۱۹۹۷) از نظر افزایش سرعت انحلال لخته پلاسمایی و آزاد سازی فرآورده  $D$  - 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 سینتیک فعال شدن پلاسمینوژن نشان می‌دهد که سرعت فعال شدن این مولکول ارتباط مستقیمی با وضعیت ساختاری آن دارد. این مولکول در فرم  $\alpha$  به دلیل بسته بودن ساختار تمایل کمتری به فعال شدن دارد در حالی‌که فرم  $\beta$  آن که ساختاری نیمه باز دارد با سرعت بیشتری فعال می‌شود.

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

مطالعات انجام شده بر آنتی‌بادی  $A_1D_{12}$  نشان می‌دهد که این آنتی‌بادی با اتصال به بخش پپتید N-ترمینال (NTP) پلاسمینوژن، میانکشی 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 سیستیکی این پروتئین نیز به خوبی منعکس می‌شود چرا که فعال شدن کمپلکس  $A_1D_{12}$ -pIlg توسط فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد (۹).

### نتیجه‌گیری

احتمال می‌رود آنتی‌بادی‌های  $A_4D_{10}$  و  $A_5E_{10}$

### References :

- 1- Axelsso F. Plasminogen. Product monograph.1995; Available from [URL:http://www.Chromogenix.Se/](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 in vivo. 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 modification of its functional properties. Fibrinolysis proteolysis 1997; 11(3): 155-163.
- 10- Macloiw 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 chngement 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.

## Evaluation of the effect of antihuman plasminogen monoclonal antibodies of A<sub>4</sub>D<sub>10</sub>, A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> and A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> on the activation of fibrinolytic system

Maleki A.<sup>1</sup>(MS), Mirshahi M.<sup>1</sup>(PhD), Pourfathollah A.A.<sup>1,2</sup>(PhD)

<sup>1</sup>Department of Hematology of Tarbiat Modarres University

<sup>2</sup>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<sub>4</sub>D<sub>10</sub>, A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> and A<sub>2</sub>C<sub>8</sub> 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 these antibodies.

#### Results

Primary observations with human pooled plasma showed that in the presence of plasminogen activators (t-PA, u-PA and SK), A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> and A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> can enhance activation of fibrinolytic system, but A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> has no effect on this system. According to D-dimer assay, it was shown that the lytic effects of A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> and A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> 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<sub>5</sub>E<sub>10</sub> and A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> antibodies. Moreover, in this test ineffectiveness of A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> on plasminogen activation was confirmed.

#### Conclusions

In conclusion, we suggested A<sub>4</sub>D<sub>10</sub> and A<sub>5</sub>E<sub>10</sub> antibodies by modification of structural form 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