

پتانسیل آنتی پلاسمینوژن منوکلونال آنتی‌بادی در دستکاری دو سیستم فیبرینولیز و آنژیوژنز

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

چکیده

زمینه و هدف: پلاسمینوژن توسط یک سری 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 فرآیند نقش دارند.

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

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 لیزه، دانشکده

پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی،

صندوق پستی ۱۵۶۸ تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۴۷۱

email: kmansouri@kums.ac.ir

مقدمه

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 ۱-۷۷)، سپس پنج ساختار حلقوی شکل مشابه کرینگل (K1-5) و در نهایت بخش کاتالپتیکی سرین پروتئازی (شامل سه اسید آمینه His⁶⁰³، Asp⁶⁴⁶ و Ser⁷⁴¹) در پایانه کربوکسیلیک قرار دارد. دومین‌های کرینگلی که حاوی جایگاه‌های اتصال به لیزین (LBS) هستند واسطه میان‌کش داخل مولکولی پلاسمینوژن و نیز اتصال پلاسمینوژن و پلاسمین به فیبرین، سوبستراها، فعال‌کننده‌ها، مهارکننده‌ها و غشاء

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، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن یعنی فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA) و

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، بروموفنیل‌بلو، 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 تزریق آنها به صورت 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 به روش افینیتی کروماتوگرافی توسط پروتئین G خالص شدند^{۱۱} و در نهایت با توجه به میزان جذب آنتی‌بادی‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر، غلظت هر یک از آنتی‌بادی‌ها محاسبه شد.^{۱۱،۱۲} به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌های حاصله، ابتدا $100 \mu\text{l}$ گلو- پلاسمینوژن با غلظت $2 \mu\text{g/ml}$ ، (pH 7.4) به مدت 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

سلولی می‌باشند. تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین با شکسته شدن پیوند پپتیدی $\text{Arg}^{561}\text{-Val}^{562}$ توسط فعال‌کننده‌ها صورت می‌گیرد.^{۵،۶} برخی از پروتئین‌های مرتبط با انعقاد و فیبرینولیز در آنژیوزنز نیز نقش دارند.^۷ به علاوه حداقل شش مورد از پروتئین‌های سیستم هموستاتیک حاوی اجزای نهفته ضد آنژیوزنز بدین شرح هستند: آنژیوستاتین (جزء پلاسمین)، آنتی آنژیوزنیک AT، اندوستاتین (دومین پنج کینینوژن با وزن مولکولی بالا) و اجزای ۱ و ۲ از پروترومبین.^۸ از میان پروتئین‌های درگیر در فیبرینولیز و آنژیوزنز ما توجه خود را به پلاسمینوژن معطوف کرده‌ایم که یک نقش کلیدی در هر دو فرآیند دارد. فاکتورهای رشد آنژیوزنیک 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. به علاوه می‌تواند متالوپروتئینازهای (MMPs) متعددی را فعال کند که آنها نیز باعث تجزیه بیشتر ماتریکس خارج سلولی شوند.^۹ آنتی‌بادی‌های منوکلونال معرف‌های مهمی در پژوهش‌های بیومدیkal، 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.^{۹،۱۰}

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 مطالعه 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.

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

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

بررسی مکانیسم اثر مهارى آنتی‌بادی MC₂B₈ بر فعال‌شدن پلاسمینوژن: الف. استفاده از آنالوگ سنتتیک لیزین EACA و روش الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی: بدین منظور 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 بازکننده ساختار پلاسمینوژن) اضافه شد و تمامی لوله‌ها پنج دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد به لوله‌های دوم و چهارم ۱۵μl از غلظت ۸mg/ml آنتی‌بادی MC₂B₈ 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°C 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 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

Tween20، ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در ردیف‌های جداگانه و در شرایط pH 7.4 به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C 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 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 ایمونوتوریدومتری اندازه‌گیری شد. بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر سرعت سیستم فیبرینولیز به‌روش الیزا: بدین منظور ابتدا گلو-پلاسمینوژن انسانی (غلظت نهایی پنج میکروگرم در میلی‌لیتر) 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 (غلظت نهایی 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 V_{max} و K_m فعال شدن پلاسمینوژن از روی نمودار Linweaver-Burk و با استفاده از معادله معکوس Michaelis-Menten، معادله ۱، محاسبه گردید:

آنتی‌بادی A1D12 ضعیف‌تر از آنتی‌بادی MC2B8 متصل می‌شود. در حضور آنتی‌بادی کنترل نامرتب اتصال 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 حالی که 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 MC₂B₈ بر فعال شدن پلاسمینوژن خالص توسط فعال‌کننده‌ها و در نتیجه هیدرولیز سوبسترای سنتتیک S-2251 اثر مهار داشت. طبق منحنی پیشرفت واکنش (Progress curve) فعال شدن گلو-پلاسمینوژن به‌وسیله 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 فعال شدن 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 ماکزیم (V_{max}) فعال شدن 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 آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۳ برابر کاهش یافت. در ارتباط با فعال‌کننده استرپتوکیناز، طبق جدول ۱ آنتی‌بادی A1D12 فاز تاخیری واکنش را کاهش و آنتی‌بادی MC2B8 آن را افزایش داده است. در آزمون مقایسه‌ای انجام شده معلوم شد سرعت اولیه فعال شدن 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 آنتی‌بادی MC2B8 این تمایل را ۲/۲ برابر کاهش می‌دهد. همچنین

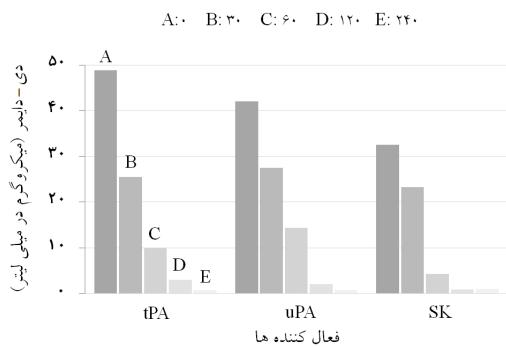
ساعت در بافر PBS قرار گرفتند تا متورم شوند. ذرات متورم شده به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس در زیر هود استریل، بافر فسفات از محیط حذف گردید و به‌جای آن محیط MCDB131 حاوی چهار درصد ESGF اضافه شد و محصولات به‌دست‌آمده تا هنگام استفاده در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

کشت سلول‌های اندوتلیال مغز استخوان انسانی: نخست دودمان سلولی HBMEC^۱ 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) اضافه شد 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 ۲۰۰ IU/ml آپروتینین به محیط کشت رویی و ژل فیبرین اضافه شد. پس از ۵-۳ روز انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷°C و CO₂ پنج درصد فرایند رگزایی بررسی گردید.

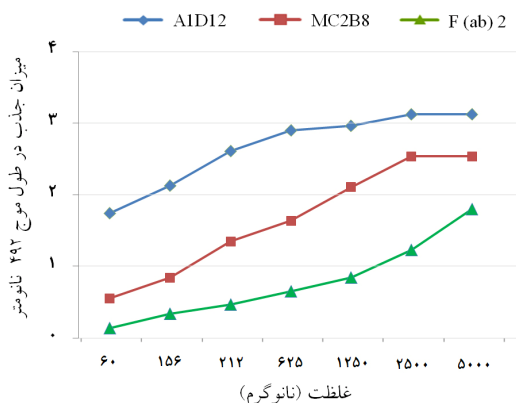
بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها بر فرآیند آنژیوژنز: آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه در رقت‌های نهایی مختلف ۴۸۰-۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محلول فیبرینوژن اضافه شد و همانند مرحله قبلی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در مقایسه با کنترل اثر آنتی‌بادی‌ها بررسی شد.

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)^۲



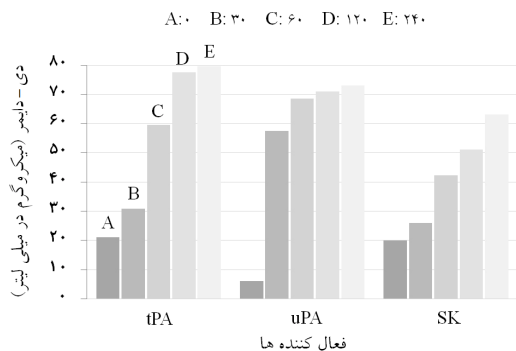
t-PA:tissue Plasminogen Activator, u-PA:ureakinase Plasminogen Activator, SK:Strptokinase
 نمودار-۳: اثر مهار MC2B8 در حضور فعال‌کننده‌های مختلف پلاسمینوژن با غلظت‌های مختلف MC2B8 در آزمایش د-دایمر



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

کاهش می‌یابد. در حضور این فعال‌کننده نیز آنتی‌بادی A1D12 بر تمایل آنزیم به سوپسترا اثری ندارد در حالی که آنتی‌بادی MC2B8 مقدار آن را ۱/۳ برابر کاهش می‌دهد. سرعت ماکزیم فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله tPA در حضور آنتی‌بادی A1D12 و در غلظت یک میلی‌مولار سوپسترا، ۱/۶ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 به میزان ۲/۸ برابر کاهش می‌یابد. فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به وسیله هر کدام از فعال‌کننده‌ها در حضور آنتی‌بادی کنترل (Irrelevant) مشابه شرایط عدم حضور آنتی‌بادی بود.

نتایج اثر آنتی‌بادی مهار MC2B8 بر سرعت هیدرولیز پلاسمین: برای تفسیر بهتر مکانیسم عمل آنتی‌بادی مهار MC2B8، اثر آن بر فعالیت هیدرولیزی پلاسمین مورد سنجش قرار گرفت. در حضور این آنتی‌بادی 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 ۲۴۰ μg/ml مهار می‌کند (شکل ۱). در مقابل مقایسه با کنترل منوکلونال آنتی‌بادی A1D12 در غلظت ۲۴۰ μg/ml فرایند رگزایی به



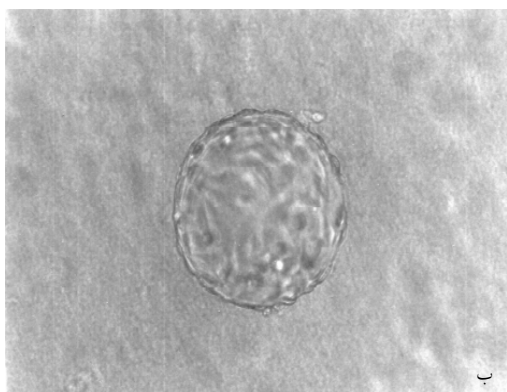
t-PA:tissue Plasminogen Activator, u-PA:ureakinase Plasminogen Activator, SK:Strptokinase
 نمودار-۲: اثر افزایشی آنتی‌بادی A1D12 در حضور فعال‌کننده‌های مختلف پلاسمینوژن با غلظت‌های مختلف A1D12 در آزمایش د-دایمر

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

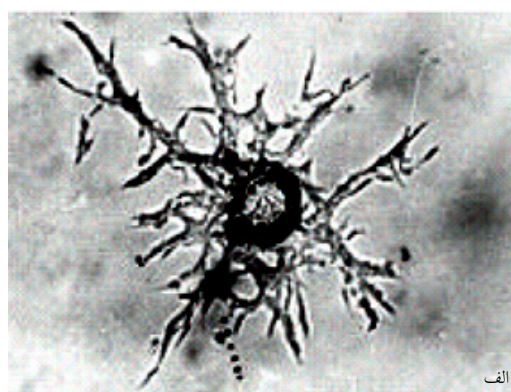
جدول-۱: پارامترهای سینتیکی فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی‌های منوکلونال

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

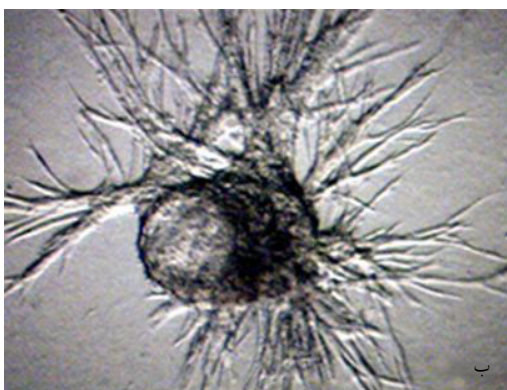
K_M (μM): میزان تمایل آنزیم به سوپسترا، V_{max} (μM/min×1⁻³): سرعت بیشینه فعالیت آنزیم، K_{cat} (s⁻¹×1⁻³): تعداد واکنش‌های کاتالیز شده در واحد زمان، k_{cat}/K_M (s⁻¹μM⁻¹×1⁻⁵): بازده کاتالیتیکی
 t-PA:tissue Plasminogen Activator u-PA:ureakinase Plasminogen Activator



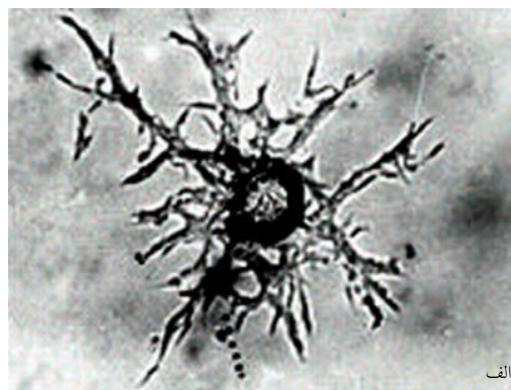
ب- مهار رگزایی در حضور آنتی‌بادی MC2B8 در غلظت ۲۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که بعد از گذشت هفت روز رگزایی مشاهده نشد.



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



ب- تسریع رگزایی در حضور آنتی‌بادی AID12 در غلظت ۲۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که در مقابل مقایسه با کنترل رگزایی را به میزان ۴۰٪ افزایش می‌دهد.



شکل-۲: تاثیر آنتی‌بادی AID12 بر رگزایی. الف- پلیت کنترل و مشاهده رگزایی در روز هفتم.

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 به دست آمده، الگوی مهار آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 بر فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله فعال‌کننده‌ها به علت کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا و کاهش سرعت ماکزیمم، از نوع مهار چندگانه می‌باشد. آنتی‌بادی AID12 به علت 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 به عنوان یک آنتی‌بادی منوکلونال فعال‌کننده محسوب می‌شود. آنتی‌بادی AID12 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 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 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.^{۱۳،۱۴} 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-

ماتریکس و فاکتورهای رشد آنژیوژنیک نظیر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا (TGF- β)، فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (BFGF) در آنژیوژنز شرکت می‌کند. طی دهه گذشته تحقیقات آنژیوژنیک بر تشخیص و تعیین هویت مهارکننده‌های آنژیوژنز و ارزش درمانی آنها در درمان سرطان‌ها و بیماری‌های مرتبط با آنژیوژنز متمرکز شده است. سیستم فعال‌کننده پلاسمین یک هدف بالقوه بدین منظور به حساب می‌آید.^{۱۹،۲۰} بدین منظور استراتژی‌های مختلفی جهت مهار فعال شدن پلاسمینوژن و آنژیوژنز به کار گرفته شده‌اند.^{۲۱،۲۲} 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 متالوپروتیناز (که ظاهراً مهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند) و مهار مسیرهای پیام‌دهی داخل سلولی (جهت اختلال در رشد و بقا 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 VEGF2 است (anti-VEGFR2) و آنتی VEGF اشاره نمود.^{۲۴} 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 به دست آمده در *in vitro* آنتی‌بادی MC2B8 به شکل وابسته به دوز فرآیند آنژیوژنز را مهار می‌کند در حالی که A1D12 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 اپی‌توپ 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 به فردی 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 فعال‌کننده‌ها و گلو- پلاسمینوژن موجب مهار فعال شدن پیش‌آنزیم پلاسمینوژن شود. برای در مکانیسم عمل این آنتی‌بادی، مطالعه واکنش‌پذیری آن با بخش‌های مختلف گلو- پلاسمینوژن و بررسی اثر آن بر میانگش بین پلاسمینوژن و فیبرینوژن، همانگونه که برای آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 انجام شده است، و مطالعه اثر آن بر فعال شدن مینی- پلاسمینوژن لازم است. نتایج حاصل از آزمایش مقایسه اثر بخشی F(ab')₂ آنتی‌بادی A1D12 بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به وسیله 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 فعال شدن گلو- پلاسمینوژن انسانی که فرم پلاسمایی پلاسمینوژن نیز می‌باشد، با انسانی کردن بخش F(ab')₂ این آنتی‌بادی، بتوان از آن به عنوان دارویی در درمان بیماری‌های انسداد عروقی نظیر سکت قلبی استفاده نمود، همانگونه که داروهایی به نام Abciximab و Pexelizumab نیز به همین سبک تهیه شده و در درمان سکت قلبی استفاده می‌شوند. برخی از پروتئین‌های مرتبط با انعقاد و فیبرینولیز در رگزایی نیز نقش دارند^۷ که از جمله آنها می‌توان به پلاسمینوژن اشاره نمود. در حقیقت مراحل اولیه رگزایی حاصل هماهنگی کمپلکس‌های فعال مولکولی مثل واکنش اینتگرین با متالوپروتینازها، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن و سوبسترای آنها و غیره می‌باشد. در مهاجم سلول‌های توموری و تجزیه ساختار عروقی در طی آنژیوژنز، سیستم پروتولیتیک مانند پلاسمینوژن، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن و متالوپروتینازهای 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 پروتولیتیک پروتئین‌های ماتریکس و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال درگیر هستند.^{۱۸} تشکیل پلاسمین یک مرحله اساسی در مهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به منظور تشکیل عروق جدید است. پلاسمین به صورت مستقیم با تجزیه مستقیم فیبرین و ترکیبات دیگر ماتریکس و به صورت غیرمستقیم با فعال کردن متالوپروتینازهای تجزیه‌کننده

است به گونه‌ای 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.^{۲۲،۲۴} 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, Reijkerk A, Meijers JC, Voest EE, Borel Rinkes IH, Gebbink MF. The role of the fibrinolytic system in corneal angiogenesis. *Angiogenesis* 2003; 6: 311-6.
- Reijkerk 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, Reijkerk 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, Abee 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.
۱۲. ملکی علی، میرشاهی منوچهر، پورفتح اله علی اکبر، منصوری کامران. آنتی‌بادیهای مونوکلونال 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 مونوکلونال ضد پلاسمینوژن A2B3، A5E10 و A4D10، 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, Zarnegar 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.
- Reijkerk 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.
- Reijkerk 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.

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

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

Abstract

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

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