بنام خدا

۶۹۷۸

۷۴/۸/۲۹

WG
۳۰۰

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دانشکدهٔ پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجهٔ تخصصی

در رشتهٔ قلب و عروق

موضوع :

درمان ترومبولیتیک در انفارکتوس حاد میوکارد

استاد راهنما :

دکتر محمدرضا معتمدی

نگارش :

لئون مرادیانس

۱۳۸۵ /۱۱/ ۲۸

شماره پایان‌نامه: ۴۲۱۹ سال تحصیلی ۷۴-۷۳

۹۳۷۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه:

ترومبولیز در انفارکتوس حاد میوکارد..... ۱

فصل اول:

مروری کلی بر ساختمان مولکولی

پلاسمینوژن - پلاسمین ۸

فصل دوم:

فعال کننده‌های پلاسمینوژن ۲۵

فصل سوم:

درسهائی که از تجربیات عمدهٔ بالینی

می‌آموزیم..... ۷۷

فصل چهارم:

معیارهای استفاده از داروهای ترومبولیتیک

در انفارکتوس حاد میوکارد ۹۳

مقدمه :

ترومبولیز در انفارکتوس حاد میوکارد

THROMBOLYSIS IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

بررسی‌های انجام شده روی مُدل‌های تجربی انفارکتوس حاد میوکارد (Acute Myocardial Infacrction or AMI) نشان داده‌اند که برقراری مجدد جریان خون (یا Reperfusion) در میوکاردی که بطور قابل برگشت ایسکمیک شده است باعث محدود شدن نکروز میوکارد می‌شود. بررسی‌های بالینی انجام شده نیز در تائید این مطلب بوده‌اند و نشان داده‌اند که بکارگیری درمان ترومبولیتیک و ریپرفیوژن ناشی از آن باعث می‌شود که میوکارد بیشتری از نابودی نجات یابد و در آینده عملکرد بطن چپ بهتر باشد و در نتیجه آن به طول عمر بیمار افزوده گردد. (improved survival) این استراتژی درمانی بر این فرضیه استوار است که نکروز میوکارد پس از انسداد شریان کورونر بصورت یک پدیدهٔ مرحله به مرحله ایجاد می‌شود و می‌توان هر مرحله را قبل از تکمیل شدن و شروع مرحلهٔ بعدی متوقف کرد در نتیجه مقدار میوکاردی را که می‌توان پس از برقراری مجدد گردش خود از نابودی نجات داد به عوامل زیر وابسته است: اول آنکه از ابتدا وسعت ناحیه اسکمیکِ در حال نکروز چقدر بوده است و دوم اینکه قبل از شروع ریپرفیوژن، ایسکمی برای چه مدتی برقرار بوده است و با چه سرعتی از صدمه بافتی به سمت نکروز غیر قابل برگشت پیش رفت کرده است. در حال حاضر از نظر کار بالینی و درمانی فقط قادریم که عامل دوم از دو عامل فوق را تغییر دهیم و در آن مداخله کنیم و آن بدین صورت است که زمان بین شروع ایسکمی و برقراری درمان آنتی‌ترومبوتیک را تا حد امکان کوتاه کنیم. ریپرفیوژن اگر ۲ الی ۴ ساعت پس از شروع علایم حمله قلبی انجام شود می‌تواند اندازهٔ ناحیه انفارکته را تقلیل دهد و بدنبال آن فانکشن بطن چپ را بهبود بخشد و بیمار پیش‌آگهی بهتری خواهد داشت ولی اگر درمان را دیرتر از این زمان شروع کنیم قادر نخواهیم بود که مقدار قابل توجهی از میوکارد را از نابودی نجات دهیم. از طرف دیگر سرعت پیش روی نکروز با شدت ایسکمی رابطه مستقیم دارد (و یا اینکه می‌توانیم بگوئیم با پرفیوژن میوکارد باقی ماندهٔ سالم

نسبت عکس دارد) و بیماران با ایسکمی شدید اغلب شانس موفقیت کمی برای ریپرفیوژن دارند و در آنها انفارکتوس مراحل پی‌درپی نکروز را طی می‌کند ولی در بیمارانی که پرفیوژن میوکارد آنها بخاطر ناکامل بودن انسداد عروقی، منقطع و متناوب بودنِ (Internittent) انسداد و یا وجود یک شبکه غنی از عروق کولاترال کندتر پیش رفت می‌کند، درمان ترومبولیتیک حتی اگر دیرتر هم شروع شود باز ممکن است مفید باشد.

چونکه مسیر مشترک و نهائی در انسداد عروق کرونر تشکیل ترومبوس برروی پلاک آترواماتوی زخمی می‌باشد حل کردن لختهٔ (Thrombolysis) مسدود کننده می‌تواند یک اقدام درمانی مؤثر باشد. در سالهای ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ بررسی‌های متعددی در مورد این نوع درمان انجام شد و نتیجه‌گیری شد که تجویز داروی ترومبولیتیک وریدی در انفارکتوس حاد میوکارد مؤثر نمی‌باشد. علت این نتیجه‌گیری نادرست احتمالاً آن بوده است که در تحقیق‌های فوق‌الذکر به فاصله زمانی کوتاهِ موجود بین شروع ایسکمی و ایجاد شدن تغییرات نکروتیک غیر قابل برگشت در ناحیه انفارکته توجه نمی‌شده است. اغلب موارد درمان آنقدر دیر شروع می‌شد که نمی‌توانست بافت میوکارد را از نابودی نجات دهد (حتی در مواردی تا ۷۲ ساعت تأخیر در شروع درمان وجود داشته است). فقدان اثرات درمانی مطلوب از یک طرف و اعتقاد به این که ترومبوز علت پاتوژنیک انفارکتوس میوکارد نمی‌باشد باعث گردید که درمان ترومبولیتیک کنار گذاشته شود. پس از آنکه در اواخر دههٔ هشتاد متوجه شدند که ترومبوزکورونرو انسداد عروقی کامل و یا نسبی ناشی از آن در اغلب موارد علت AMI می‌باشد و برقراری مجدد گردش خون ناحیه گرفتار می‌تواند نجاتبخش باشد، این درمان مجدداً رایج گردید البته این بار محدودیت زمانی برای مؤثر بودن درمان در نظر گرفته شد.

در ابتدا بای‌پس اورژانس رگ کورونری (CABG) بعنوان اولین اقدام درمانی برای رفع سریع تنگی و گرفتگی عروقی انجام می‌شد ولی انجام این عمل جراحی در همهٔ موارد و در همهٔ مراکز امکان پذیر نبود و علاوه بر این در صورت امکان‌پذیر بودن عمل جراحی زمان تلف شده بین شروع علایم و برقراری گردش خون مجدد کورونری بسیار طولانی بود بهمین علت نیاز به

ریپرفیوژن غیر جراحی شدیداً حس می‌شد. پس از آنکه نشان داده شد که تزریق داروهای ترومبولیتیک در داخل کرونر می‌تواند باعث باز شدن رگ بشود دوران درمانهای ترومبولیتیک شروع شد و مدت کمی پس از آن PTCA متداول گردید. عیب دو روش اخیر از دست دادن زمان «طلائی» مؤثر بودن درمان بود. بهمین دلیل تجویز داروهای ترومبولیتیک از طریق وریدهای محیطی مجدداً مورد توجه قرار گرفت با این تفاوت که بر خلاف دو دهه قبل این بار درمان را سریعاً پس از پیدایش علایم شروع می‌کردند و از پروتوکل‌های با دوز بسیار بالاتر از سابق استفاده می‌کردند. در حال حاضر ترومبولیز وریدی سریعترین و متداولترین روش برای برقراری مجدد گردش خون کورونری می‌باشد.

داروهای ترومبولیتیک THROMBOLYTIC AGENTS

ترومبولیز از طریق پلاسمین اعمال می‌شود. پلاسمین یک پروتئاز غیر اختصاصی سرینی (Serine protease) می‌باشد. و از فعال شدن پلاسمینوژن، که در کبد ساخته می‌شود و در گردش خون محیطی وجود دارد، ایجاد می‌گردد. پلاسمن باعث دگرده (Degrade) شدن فیبرین می‌شود (ترومبولیز) و همچنین می‌تواند پروتئین‌های دیگری نظیر فیبرینوژن فاکتورهای انعقادی V و VIII و VII و برخی هورمونها را تجزیه کند فاکتورهای فعال کننده پلاسمینی چه آندوژن (داخلی intrinsic و خارجی extrinsic) و چه اگزوژن اغلب شناخته شده‌اند. عوامل فعال کننده داخلی شامل فاکتور VII، کالیکرئین و کینین می‌باشد که در پلاسما بصورت غیر فعال یا پیش عامل (Precursor) وجود دارند. عوامل خارجی فعال کنندهٔ پلاسمینوژن منشاء سلولی و بافتی دارند (کلیّه سلولهای آندوتلیال) و بنظر می‌رسد که بصورت موضعی عمل می‌کنند. فعال کننده‌های اگزوژن مواد فارماکولوژیکی هستند که از آنها برای تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین فعال استفاده می‌شود. این‌ها کلاً در سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند. ۱ـ استرپتوکینازو مواد وابسته به آن ۲ـ اوروکیناز و هم خانواده‌های آن ۳ـ فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (Tissue plasminogen activator, t-PA)

استرپتوکیناز و ترکیبات وابسته به آن

استرپتوکیناز یکی از محصولات متابولیزم استرپتوکوک بتا- همولیتیک گروه C است و یکی از فعال کننده‌های غیر مستقیم پلاسمینوژن به پلاسمین می‌باشد. یک مولکول استرپتوکیناز بصورت کووالانت با یک مولکول پلاسمینوژن ترکیب می‌شود و تشکیل «کمپلکس فعال کننده» (یا "activator complex") را می‌دهد. سپس این فعال کننده یک مولکول دوم پلاسمینوژن را، به پلاسمین که یک آنزیم پروتئولیتیک است تبدیل می‌کند. هم پلاسمینوژن آزاد موجود گردش خون و هم پلاسمینوژن متصل به لخته، هر دو به پلاسمین تبدیل می‌شوند ولی بنظر می‌رسد که پلاسمین متصل به لخته نقش مهمتری ایفا می‌کند. بخش اعظم پلاسمین موجود درگردش خون بسرعت توسط آنتی‌پلاسمین‌های خون غیرفعال می‌شود و از خون پاک می‌شود و یا اینکه فیبرینوژن و فاکتورهای دیگر انعقادی را تجزیه می‌کند و «حالت لیتیک» (یا "lytic state") ایجاد می‌کند که از مشخصه‌های این حالت هیپوفیبرینوژنمی، افزایش FDP سرم، طولانی شدن زمان ترومبین (TT) و طولانی شدن PTT می‌باشند. این تغییرات وابسته به دوز می‌باشند و از علل ایجاد خونریزی پس از تجویز استرپتوکیناز می‌باشند. نیمهٔ عمر استرپتوکیناز هشتاد (۸۰) دقیقه است ولی بنظر می‌رسد که نیمهٔ عمر کمپلکس فعال کنندهٔ پلاسمینوژن طولانی‌تر از این، و چیزی در حد چندین ساعت باشد. همچنین طول مدت دوام اثرات فیبرینولیتیک سیستمیک از زمان حضور استرپتوکیناز و کمپلکس فعال کننده آن در خون بیشتر است و فیبرینوژن پلاسما حدود ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تجویز استرپتوکیناز هنوز مختل است بطوری که پس از ۲۴ ساعت به مقداری در حدود ۱۰۰mg/dl افزایش می‌یابد (حداقل مقدار لازم برای انعقاد).

آنتی‌ژنیسیتهٔ استرپتوکیناز هم از نکات مهمی است که هنگام مصرف آن باید مدّنظر باشد. چون افراد در طول عمرشان بطور بسیار شایعی با استرپتوکوک تماس دارند و بطور قطع دچار عفونت‌های ناشی از آن هم شده‌اند پس از تجویز استرپتوکینازیک واکنش ایمیونولوژیک حافظه‌ای (anamenstic) رخ می‌دهد و تیترآنتی‌بادیهای ضد استرپتوکیناز بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. شدت این پاسخ ایمنی متغیر است ولی عموماً از پنج روز پس از تجویز شروع

می‌شود و تا شش ماه ادامه دارد. در طی این فاصلهٔ زمانی تجویز مجدد استرپتوکیناز بی‌اثر است. و فقط در صورت تعیین تیترآنتی‌بادی‌های ضد استرپتوکیناز، بطور آزمایشگاهی می‌توانیم بدرستی مشخص کنیم که چه دوزی از استرپتوکیناز لازم است تا بر آنها غلبه کند. چون این بررسی آزمایشگاهی چندین ساعت وقت می‌برد توصیه می‌شود اگر کسی بین ۵ روز تا ۶ ماه پس از تجویز استرپتوکیناز مجدداً به درمان ترومبولیتیک نیاز پیدا کند به وی داروی دیگری با این خاصیّت تزریق شود. علی‌رغم حضور آنتی‌بادی‌های خنثی کننده، آلرژی شدید نسبت به استرپتوکیناز در کار بالینی بسیار کم دیده می‌شود.

با استفاده از تکنولوژی مهندسی مولکولی انواع جدیدی از مولکول استرپتوکیناز تهیه شده است که این مولکول را بصورت کووالان به ترکیبات دیگر پیوند می‌دهند یکی از این‌ها گروه آسیل (acyl) است و هنگامی که آن را به کمپلکس فعال کننده استرپتوکیناز - پلاسمینوژن اضافه کنند باعث غیرفعال شدن آن می‌شود. ترکیبات آسیله جدید یا APSAC (Acylated Streptokinase - Plasminogen activator Complex) فقط هنگامی فعال می‌شود و می‌تواند پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل کند که گروه آسیل از روی آن برداشته شود یا deacylated شود.

پس از ایجاد این تغییر قسمت فعال کمپلکس آشکار می‌شود و می‌تواند پلاسمین فعال تولید کند. چون سرعت دی‌آسیلاسیون در حضور فیبرین بسیار بیشتر از سرعت این واکنش در داخل گردش خون می‌باشد، APSAC پس از تزریق در خون وریدی محیطی نسبتاً غیرفعال می‌ماند تا آنکه به محل تشکیل لخته برسد، هر چند این ترکیب هم در خون محیطی کم‌کم مصرف می‌شود و در نهایت شدت اثرات APSAC مشابه استرپتوکیناز می‌باشند. یکی از مزایای APSAC نسبت به استرپتوکیناز آن است که می‌توانیم APSAC را بصورت یک دوز و سریعاً (bolus) تزریق کنیم چون فعال شدن سیستمیک دارو کند است و پلاسمین بتدریج ایجاد می‌شود و تزریق سریع آن باعث افت فشار خون نمی‌شود. به جز این مطلب بقیه خواص و اثرات ترومبولیتیک APSAC مشابه استرپتوکیناز می‌باشد و هر دو دارو خاصیت آنتی‌ژنتیک دارند و با

آنتی‌بادی ضد استرپتوکیناز غیر فعال می‌شوند.

اوروکیناز و مواد مشابه آن

اوروکیناز توسط سلولهای توبولی کلیه ساخته می‌شود و بهمین خاطر برای انسان خاصیت آنتی‌ژنیک ندارد. خود یک فعال کنندهٔ مستقیم سیستم فیبرینولیتیک است و احتیاجی به تشکیل کمپلکس ابتدائی ندارد خواص ترومبولیتیک آن مشابه استرپتوکیناز می‌باشند ولی بنظر می‌رسد که از نقطه نظر اثر بر روی لخته نسبت به استرپتوکیناز اختصاصی‌تر است. قیمت بسیار گران این دارو از معایب آن است.

اوروکیناز یک زنجیره‌ای (Single-Chain Urokinase) یا پرواورکیناز (Prourokinase) آنزیم پیش سازِ (Zymogen precursor) اوروکیناز می‌باشد. تا حدودی نسبت به لخته اختصاصی‌تر است و در حضور فیبرین اوروکیناز آزاد می‌کند. در برخی از بررسی‌های تجربی انجام شده روی انفارکتوس حاد میوکارد اوروکیناز تک زنجیره‌ای بعنوان یک داروی ترومبولتیک بدون عوارض لیتیک سیستمیک کارائی خود را بخوبی نشان داده است.

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی Human Tissue Plasminogen Actirator (t-PA)

t-PA در بافتهای متعدد بدن انسان ساخته می‌شود، از جمله در سلولهای آندوتلیال مفروش کننده سطح داخلی عروق، و در پاسخ به برخی محرک‌های فیزیولوژیک از این سلولها به داخل گردش خون رها می‌شود. این محرک‌ها عبارتند از فعال شدن سلسله واکنش‌های انعقادی، استاز خون وریدی و استرس. برای اولین بار t-PA ازکشت سلولهای ملانوم انسانی بدست آمده پس از آن توانستند کروموزوم مسئول ساخت آن را مشخص و جدا سازند و از آن به طریقهٔ کلونینگ (Cloning), t-PA را سنتز کنند. در حال حاضر t-PA از طریق تکنولوژی نوترکیبی (Recombinant DNA) روی کشت سلولهای پستانداران (غیر انسانی) تهیه می‌شود. این نوع t-PA را rt-PA می‌نامند. و درجهٔ خلوص آن به ۹۹٪ t-PA حاصل از سلولهای انسان می‌رسد

آن را به صورت دو زنجیره‌ای و تک زنجیره‌ای تهیه می‌کنند که نوع اخیر از پس از تجزیه آنزیماتیک پیوندهای دی‌سولفید در نوع دو زنجیره‌ای حاصل می‌شود.

t-PA از دو نظر با اوروکیناز و استرپتوکیناز تفاوت اساسی دارد: ۱ـ نیمهٔ عمر پلاسمائی t-PA بسیار کوتاه و در حد ۵ دقیقه است و ۲ـ تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین در حضور فیبرین بسیار تسریع پیدا می‌کند و در این واکنش فیبرین بعنوان کوفاکتور عمل می‌کند. و در حضور فیبرین این واکنش حدود پانصد برابر سریعتر صورت می‌گیرد. پس از آنکه t-PA تجویز شده به فیبرین متصل گردید از تجزیه توسط آنتی‌پلاسمین‌های داخل گردش خون محافظت می‌شود و شروع به حل کردن لخته می‌کند. این حالت اختصاصی بودن t-PA برای فیبرین را clot selectivity می‌گویند. در ابتدا از دوزهای پائین t-PA استفاده می‌کردند و با این دوزها اثرات سیستمیک t-PA بسیار ناچیز بود ولی چون clot selectivity وابسته به دوز می‌باشد، هنگامی که از دوزهای بالاتر استفاده شود این خاصیت از دست می‌رود و مُمکن است که خوّاص سیستمیک ظاهر شوند. در هر صورت این تظاهرات سیستمیک ناشی از t-PA شدت خفیف تا متوسط دارند.

فصل اول:

مروری کلّی بر ساختمان مولکولی پلاسمینوژن - پلاسمین

سیستم پلاسمینوژن (Pg) و پلاسمین (Pm) از نقطه نظرهای مختلفی بررسی شده است از جمله ساختمان بیوشیمیائی، مکانیزم عمل آنزیمی، مهارکننده‌های آن، ژنتیک انسانی و تنظیم فیزیولوژیک آن. در این جا از ساختمان و عمل Pg و Pm به همراه واکنش‌های مهارکننده‌ها و فعال کننده‌های این سیستم صحبت خواهد شد. این مطالب در هفت قسمت توضیح داده می‌شوند.

۱ـ انواع شایع مولکول Pg، نظم قرارگرفتن نواحی فعال آن یا (Domain Organiztion) و ساختمان کلی و فعالیت مولکول Pg.

۲ـ واکنش Pm با فیبرین و ترکیبات دیگر ماکرو مولکولی.

۳ـ فعال کننده‌های Pg و مکانیزم عمل آنها.

۴ـ اتصال Pg و Pm به سلولهای ماکرومولکولها.

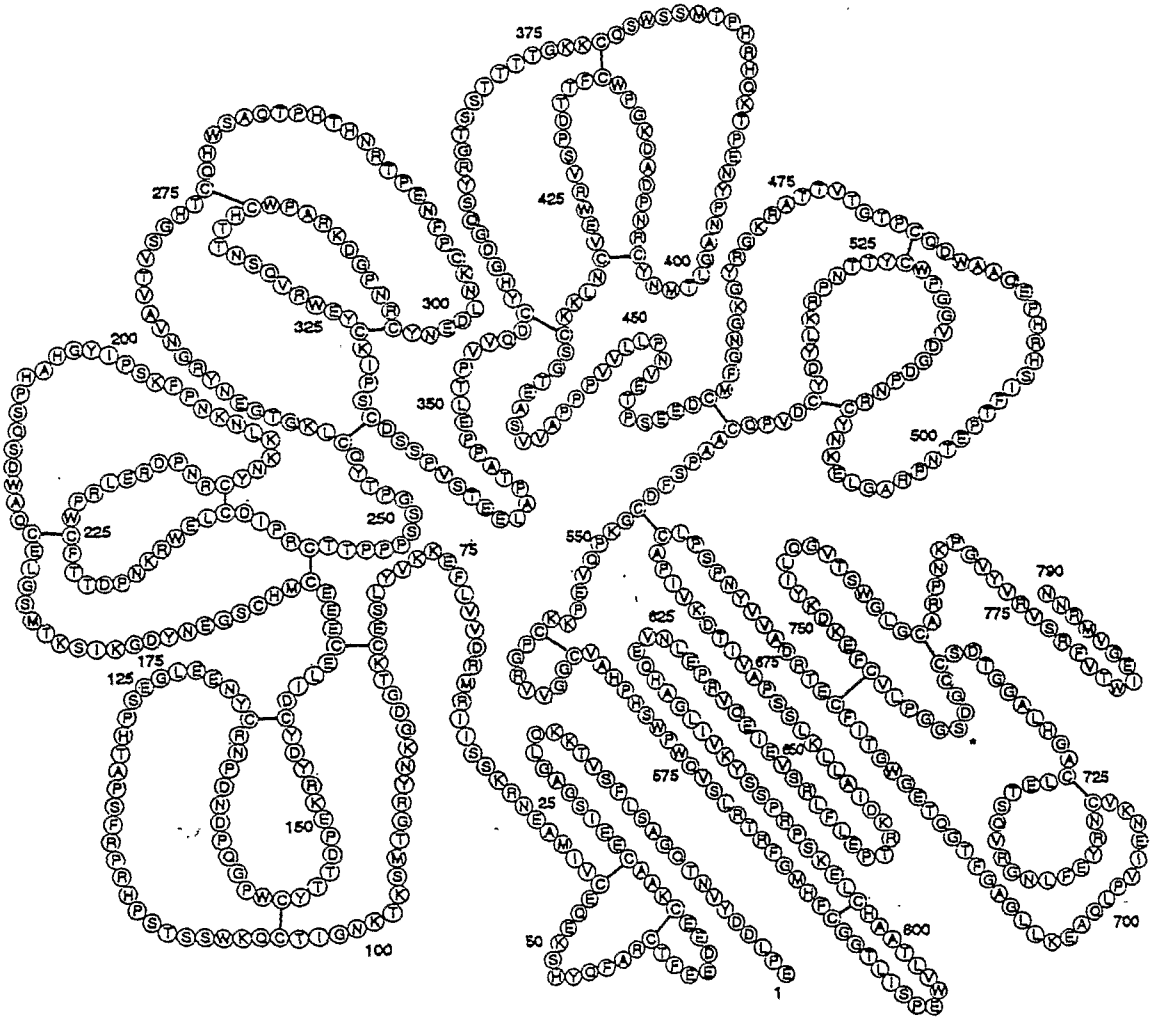
۵ـ مهارکننده‌های Pm.

۶ـ بررسی‌های کمی و کیفی در مورد Pg و Pm.

۷ـ مسائل ژنتیک مطرح در مورد Pg و انواع Mutant و recombinant ملولکول.

ساختمان پلاسمینوژن (Pg)

بین سالهای ۱۹۷۰ تا ۱۹۷۸ توانستند با استفاده از تمایلِ (affinity) اختصاصی مولکول Pg به لایزین - سفاروز (Lysine - Sepharose) ترتیب قرارگرفتن ۷۹۰ آمینواسید مولکول Pg را پیدا کنند. بجز چند مورد اشتباه کوچک که بعدها توسط روش‌های ژنتیک اصلاح شد (که مهمترین آنها افزودن یک مولکول آمینواسید ایزولوسین در موقعیت ۶۷ بود) توانستند شکل مولکول Pg را کاملاً مشخص کنند همانطور که شکل ۱-۱ ملاحظه می‌شود یک مولکول کامل پلاسمینوژن را می‌توان به دو قسمت کلی تقسیم کرد یکی نیمهٔ سنگین با انتهای آمینواسیدی



شکل ۱-۱ : ساختمان اولیه پلاسمینوژن

(heavy amino-acid terminal region) که خود شامل پنج ناحیه (domain) است و هر کدام از این نواحی یا دومن‌ها سه پیوند دی‌سولفید مشابه (Homologous) ولی متمایز از هم دارند این نواحی را از این پس کرینگل (Kringles) می‌نامیم. نیمهٔ دوم مولکول، که به اولی متصل است، انتهای سبک و کاتالینیک مولکول است (lighter catalytic C-terminal domain).

پلاسمینوژن دو زنجیره‌ای هنگامی فعال می‌شود که فعال کننده‌های آن (UPA,t-PA, SK-Pg complex) یک پیوند اختصاصی را در قسمت Arg 560 - Val 561 راکه خود داخل یک حلقه نوناپپتیدی (nonapeptide) و پیوند دی سولفیدی که بین Cys557 - Cys565 قرار دارد قطع کنند (شکل ۱-۱).

انواع مولکولی پلاسمینوژن انسانی

از روی تفاوتهای ساختمانی در قسمت N-terminus و شدت گلیکوزیلاسیون در انسان ۴ نوع Pg شناخته شده است. دو فرم عمده که در قسمت انتهای آمینواسیدی (N-terminus) در موقعیت یک، اسیدآمینه گلوسین دارند (Glu 1) کلاً GluPg نام دارند دو فرم دیگرکه با Lys78 و یا Val79 شروع می‌شوند کلاً Lys-Pg خوانده می‌شوند. در هنگام فعالیت کاتالیتیک، Lys-Pg سریعاً از Glu-Pg ساخته می‌شود. هر کدام از این‌ها از روی شدت گلیکوزیلاسیون به دو گروه تقسیم می‌شوند، Glu-Pg بر دو نوع است: PLG2, PLG1. در نوع PLG1 پلی‌ساکاریدها هم به نیتروژن وصل می‌شوند (N-linked) مثلاً در موضع Asn288 و هم به اکسیژن (O-linkud) مثل Thr345. در حالی که در PLG2 پلی ساکاریدها فقط به اکسیژن وصل می‌شوند. این دو نوع در مقدار اسید سیالیک متصل به آنها (sialization) نیز با هم تفاوت دارند.

پلاسمینوژن‌های انسانی تولید شده توسط پروتئاز :

علاوه بر انواع فوق از طریق پروتئولیز نیز توانسته‌اند Pgهای با وزن مولکولی پائین بدست آورند اولین نوع گزارش شده "mini-Pg" از طریق تجزیه Pg با الاستاز پانکراس خوک تهیه گردید. که با قطع پیوند آمیدی Val442-Val443 بدست آمده است. این پیوند محل ارتباط کرینگل‌های k5 و k4 بوده است. بهمین خاطر این Pg فاقد کرینگل‌های ۱ تا ۴ می‌باشد. (وزن مولکولی Pg حاصل ۳۸۰۰۰ است).

مولکولهای mini-Pg در حالت in vivo در انسان هم دیده می‌شوند انواعی از این مولکولهای مشابه mini-Pg در بیماران شوک سپتیک دیده شده‌اند. انواع مولکولهای کوچکتر هم ساخته شده‌اند با مجاور کردن Pg باپلاسمین انسانی در PH = ۱۰/۵ پیوند بین Arg530-Lys531 قطع می‌شود و micro-Pg حاصل می‌شود که فاقد k1 تا k5 می‌باشد و وزن مولکولی آن ۲۹۰۰۰ است این نوع خواص منحصر به فردی دارد که بعداً توضیح داده خواهد شد.

ساختمان و عمل کرینگل‌ها (Kringles)

قسمت غیر پروتئازی یا زنجیرهٔ سنگین Pg شامل یک پپتید فعال کننده (آمینواسیدهای ۱ الی ۷۶) می‌باشد و بدنبال آن پنج دومن مشابه قرار دارند که ساختمانشان از حلقه‌های سه تائی و پیوندهای دی‌سولفیدی تشکیل شده است و به آنها کرینگل Kringle می‌گویند. این پنج قسمت هرکدام وزن مولکولی نزدیک به ۱۰۰۰۰ دارند و بین آنها شباهت بسیار زیادی دیده می‌شود همچنین با دومن‌های موجود در پروترومبین، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی و ادراری تشابهاتی دارند.

پلاسمینوژن طبیعی دارای ناحیه‌ای است که تمایل زیادی برای اتصال به لایزین دارد (LBS یا Lysin Binding Site) و علاوه بر آن ۵ ناحیه دیگر با آفینیتی کمتر هم دارد. ناحیه با تمایل زیاد (tight binding site) روی کرینگل اول قرار دارد. پارامترهای مربوط به این اتصالات پس از تجزیه مولکول عوض می‌شوند ولی کماکان خاصیت اتصال به لایزین در هرکدام از این قسمت‌ها باقی می‌ماند. نشان داده شده است که این نواحی اتصالی برای چسبیدن مولکول Pg و Pm به فیبرین و α۲ - آنتی‌پلاسمین و ماکرومولکولهای دیگر لازم می‌باشند. بنابراین عمل کرینگل‌ها بخش مهمی از پروسه فیبرینولیز را تشکیل می‌دهد.

جداسازی کرینگل‌های پلاسمینوژن انسانی: پس از تجزیه Pg با الاستاز خوکی و کروماتوگرافی روی lysine-sepharose مولکول اصلی سه تکه می‌شود: تکه‌های اول و دوم پلاسمینوژن یعنی سه کرینگل اول، آمینواسیدهای ۳۵۳-۷۹ و K4 شامل آمینواسید ۳۵۴ تا ۴۳۹، به لایزین سفاروز وصل می‌شوند در حالی که "mini-Pg" یعنی K5 و زنجیرهٔ Bکه خاصیت پروتئازی دارد وصل نمی‌شود. K1 و K5 را می‌توان با روش‌های اختصاصی‌تر از تکه‌های مربوطه هم جداکرد. چون K4 راحت‌تر از بقیه از Pg جدا می‌شود بیشترین بررسی‌ها روی آن انجام شده است.

با استفاده از روش NMR توانسته‌اند در K4, K5 و K1 محل‌های متصل شونده به لایزین

یا LBS را کاملاً مشخص کنند در همهٔ این‌ها قسمت مذکور خاصیت هیدروفوب دارد. mini-Pg که شامل K5 می‌باشد با وجود آنکه هنگام کروماتوگرافی به لایزین - سفاروز وصل نمی‌شود ولی توانسته‌اند محل LBS را با استفاده از NMR در آن مشخص کنند. علاوه بر اتصال به فیبرین (Fn) اعمال اثر مهاری توسط آلفا ۲ آنتی‌پلاسمین (α_2-anti Pm)، کرینگل‌های پلاسمینوژن قادرند که باعث چسبندگی نوتروفیل‌ها به سلولهای آندوتلیان بشوند. برای این عمل هم LBS بسیار مهم است چون آنالوگهای لایزین باعث مهار آن می‌شوند.

شکل ساختمانی مولکول کامل Pg

شکل فضائی مولکول Pg طوری است که دومن‌های زنجیرهٔ A در نزدیکی قسمت پروتئاز قرار دارند و در آن شیارهائی به اندازه ۳۹Å وجود دارند. زایموژن در حالت کامل خود ۷ ناحیه فعال دارد که ۵ تای آنها در نواحی مختلف کرینگل‌ها قرار دارند و ۲ تای باقی مانده مربوط به قسمت سرین پروتئاز می‌باشند. بنظر می‌رسد که انتهای آمینواسیدی مولکول (یعنی ۷۷ اسید آمینهٔ اول) در تشکیل ساختمان متراکم مولکول شرکت نمی‌کنند.

پس از وصل شدن به لایزین و یا مولکولهای مشابه آن (مثلاً ε-aminocoproic acid) ساختمان در هم تنیده Glu-Pg از هم باز می‌شود. و در این حالت کرینگل‌ها از همدیگر فاصله می‌گیرند. برای ایجاد این تغییر ساختمانی لایزین باید با نقاط اتصال ضعیف در کرینگل‌ها باند شود. آنیونها خصوصاً یون کلر در غلظت‌های فیزیولوژیک آن سبب می‌شوند که فرم بسته و در هم تنیده Pg تثبیت شود. در فرم باز شده مولکول شعاع شیارها ۵۶Å است. خواص Lys-Pg نیز مشابه این می‌باشند فقط در آن ۷۷ اسید آمینهٔ انتهائی توسط فعالیت آنزیمی مولکول Pm فعال از زایموژن اولیه جدا شده است. بدنبال برداشته شدن این پپتید یک واکنش اختصاصی بین انتهای نیتروژنی (N-terminal peptide) و زنجیرهٔ A که باعث تثبیت شدن شکل مولکول می‌گردد از بین می‌رود. هر چند Lys-Pg مکانهای اتصال به لایزین (Lysine Binding Site) را در خود حفظ می‌کند فرم تثبیت شده مولکول فرم باز آن می‌باشد و پس از اتصال به لایزین و یا آنالوگهای

آن تغییر چندانی در مولکول ایجاد نمی‌شود. تغییر شکل از فرم بسته به فرم باز (یا گسترده) باعث می‌شود که Pg راحت‌تر تحت تأثیر آنزیم‌های فعال کننده قرار گیرد و پس از قطعه قطعه شدن به فرم فعال تبدیل گردد. علاوه بر این فرم گسترده قادر است با سرعت بیشتری به لایزین موجود روی Fn اتصال پیدا کند. واکنش اصلی بین Pg و Fn از طریق نقاط اتصال به لایزین از نوع محکم (Strong LBS) که روی کرینگل 1 قرار دارد صورت می‌گیرد. بنابراین غلظت‌هائی از لایزین و یا آنالوگ‌های آن (مثلاً ε-aminocaproic acid, EACA) که باعث باز و گسترده شدن شکل فضائی Glu-Pg بشوند مانع اتصال آن به فیبرین می‌گردند و بنابراین خاصیت آنتی‌فیبرینولیتیک دارند.

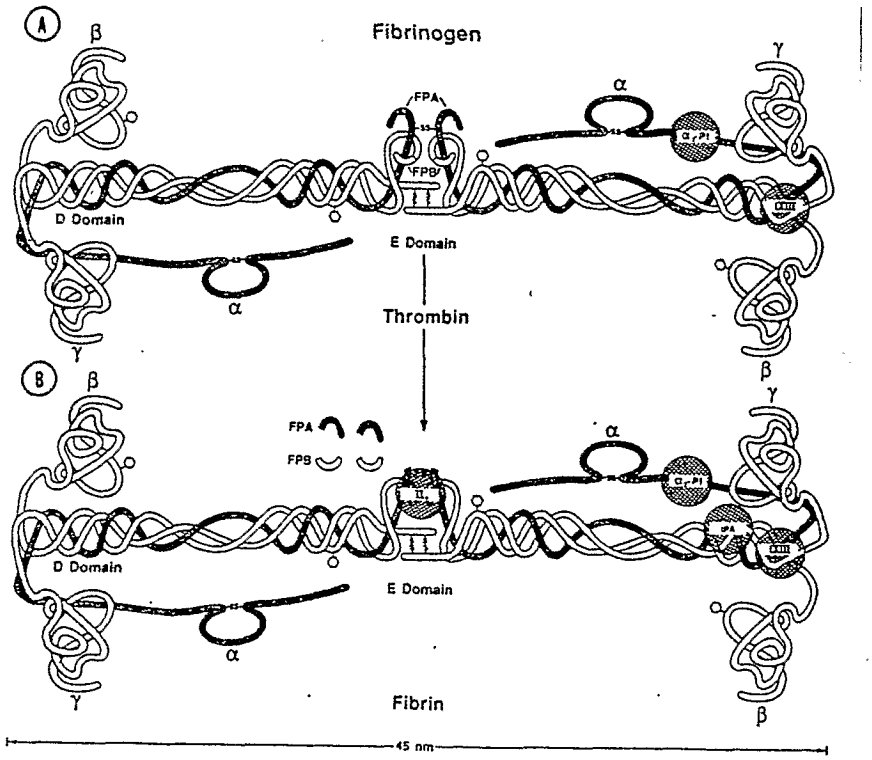
سوبستراهای (Substrates) فیزیولوژیک پلاسمین

حملهٔ پلاسمین (Pm) به Fg و Fn

فیبرینوژن با وزن ۳۴۰۰۰۰ دالتون و فیبرین (Fn) که فرم پلی‌مریزهٔ Fg می‌باشد مهمترین موادی هستند که فعالیت پروتئولیتیک Pm روی آنها اعمال می‌شود. در شرایطی که غلظت فیبرینوژن پلاسما ۳ mg/mL باشد فیبرینوژن قادر خواهد بود که با نسبت یک به یک با مولکولهای Pg وصل شود. این امر باعث می‌شود که نقاط خاصی روی Fg/Fn در معرض حمله قرار گیرند. و بدین ترتیب Pm قادر می‌شود که روی نقاط مشخص از این مولکول اثر کند و آنها را از هم جدا کند. لازم است قبل از ادامه مطلب خلاصه‌ای از ساختمان Fg و مکانهائی را که در آن تحت اثر Pm قرار می‌گیرند بیان می‌شود.

فیبرینوژن موجود در گردش خون از سه زنجیرهٔ پلی پپتیدی درست شده است بنابراین $A\alpha$ و $B\beta$ و γ که هر کدام بترتیب از ۶۱۰ و ۴۶۱ و ۴۱۰ آمینواسید درست شده‌اند. این زنجیره‌ها از طریق پیوند S-S بهم وصل می‌شوند. این مجموعه به نوبه خود از طریق یک سری پیوندهای S-S دیگر به مجموعهٔ مشابهی وصل می‌شود و تولید یک مولکول Fg می‌کند که وزن آن ۳۴۰ کیلودالتون است و در واقع یک دایمر (Dimer) از دو مولکول ترایمر (Trimer) می‌باشد.

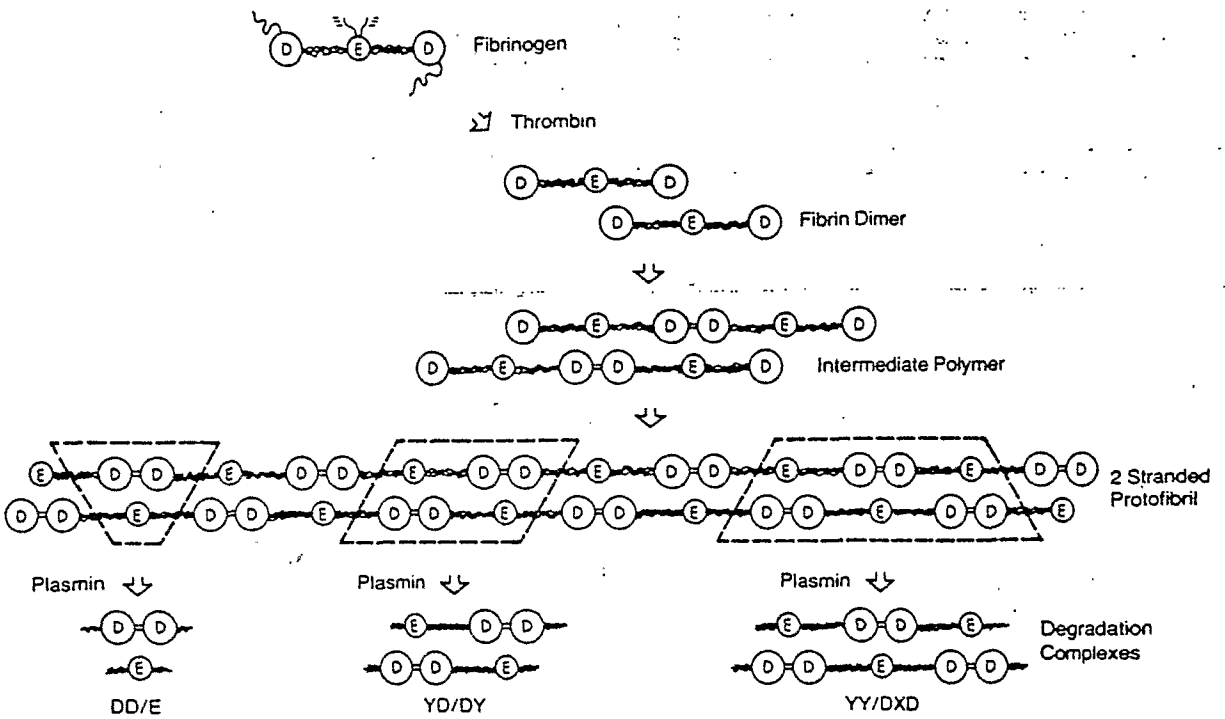
پیوندهای S-S موجود بین پپتیدهای ترایمر اولیه نزدیک انتهای نیتروژنیِ (N-terminal) زنجیره‌های $A\alpha$ و γ قرار دارند و به آنها دومن E (E-domain) می‌گویند. نمای کلی ساختمان مولکول در شکل (۲-۱) نشان داده شده است.



شکل ۲-۱ : مدل شماتیک فیبرینوژن (Fg) و فیبرین (Fn). Fg از سه زوج زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی تشکیل شده است: $A\alpha$ و $B\beta$ و γ که از طریق پیوندهای دی سولفید به هم متصل می‌شوند و یک ساختمان دایمر متقارن می‌سازند. بخش انتهائی NH_2 از هر شش زنجیره، در قسمت مرکزی کنار هم قرار می‌گیرند و دومن مرکزی یا E (central or E domain) از مولکول را تشکیل می‌دهند، که خود شامل فیبرینوپپتیدهای FPA و FPB است و هنگام فعال شدن و تبدیل به فیبرین، تحت اثر آنزیمی ترومبین (IIa) از بقیه مولکول جدا می‌شوند. در هر کدام از زنجیره‌های γ و $B\beta$ نیمهٔ کربوهیدراتی در یک سایت مشخص قرار گرفته است. ترومبین بعنوان آنزیم عمل می‌کند و FPA و FPB را از بقیه مولکول قطع می‌کند و آنها را رها می‌سازد و در این واکنش Fg به Fn(β) تبدیل می‌شود. بر روی دومن مرکزی Fn - β و α یک سایت ثانوی اتصال برای ترومبین وجود دارد که غیر سوبسته‌ائی است که در محل آمینواسیدهای 42-15β می‌باشد. نقاط اتصال برای IIa و t-PA و f XIII و α_2-PL بترتیب روی Fg و Fn مشخص شده‌اند.

ترومبین بترتیب، ابتدا یک پپتید ۱۶ آمینواسیدی (FpA) از انتهای نیتروژنی (N-terminus) زنجیرهٔ $A\alpha$ - ی فیبرینوژن جدا می‌کند و سپس از زنجیرهٔ ($B\beta$) یک پپتید ۱۴ آمینواسیدی جدا می‌کند. این تغیرات باعث می‌شوند که نواحی جدیدی از قسمت مرکزی

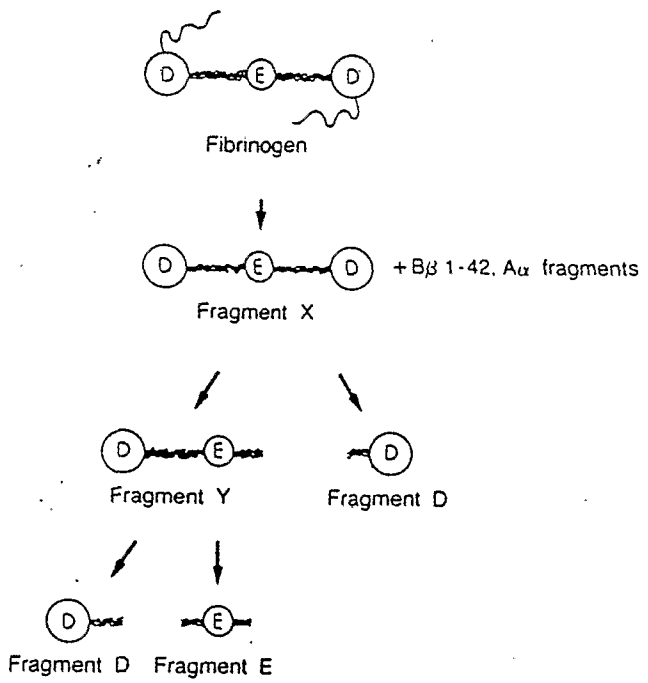
E-domain آشکار شوند. این قسمت قادر است با D-domain موجود روی دو عدد مولکول Fn دیگر مرتبط شوند و به این ترتیب موکلول فیبرین با پیوندهای ضعیفی پلی‌مریزه می‌شود (شکل ۳-۱).



شکل ۳A-۱ : پلی‌مریزاسیون، اتصال جانبی (Cross-Linking) و تجزیهٔ فیبرین بترتیب تحت اثر ترومبین، فاکتور VIII و پلاسمین صورت می‌گیرد نشان داده شده است. پس از آزاد شدن فیبرینوپپتیدها توسط ترومبین در مرحله اول دو مونومرفیبرین هر کدام نصف مولکول دیگر را می‌پوشانند (half-overlap Fn) و یک دایمر درست می‌کنند. به هر انتهای آن به ترتیب مشابهی مونومرهای بیشتری اضافه می‌شوند و در طی این روند پلی‌مر واسطه‌ای و سپس فیبریلِ ابتدائی (یا protofibril) درست می‌شوند. تحت اثر فاکتور $VIII_a$ اتصالات جانبی بین دومن انتهائی از زنجیره‌های γ-ی کنار هم تشکیل می‌شوند. تحت اثر پلاسمین روی پروتوفیبریل دو رشته‌ای یک سری کمپلکس حاصل می‌شود که با پیوندهای غیر کووالانت به هم وصل هستند (قسمت پائین شکل) کوچکترین آنها DD/E است. حضور قطعات بزرگتر از DD (مثل DY) که بصورت غیر کووالانت به نواحی مکمل خود از یک رشته دیگر فیبرین متصل می‌باشند، الگوی ابتدائی قطعات F DP درشت‌تر را تشکیل می‌دهد.

به این طریق دومن‌های D در کنار هم قرار می‌گیرند و پلی‌مری درست می‌کنند که پیوندهایش غیر کووالانت است در مرحله بعد فاکتور XIIIa، یا ترانس گلوتامیناز (Transglutaminase) بعنوان کاتالیزور وارد عمل می‌شود Gln و Lys موجود در D-domain پیوند شیمیائی محکم برقرار می‌کند واکنش مشابهی هم بین زنجیره‌های گامای مولکول Fn رخ

می‌دهد. پلاسمین قادر است که حدود ۶۰ پیوند شیمیائی را در مولکول 340KD فیبرینوژن قطع کند و از این تعداد ۵ الی ۶ عدد را خیلی سریع کاتالیز می‌کند. ترتیب قطع شدن زنجیره‌ها به این صورت است که اول زنجیر $A\alpha$ سپس $B\beta$ و در آخر γدگرده می‌شوند. اولین محل قطع شدن در نزدیکی انتهای قطبی کربنی (Polar C-terminal) در زنجیرهٔ $A\alpha$ می‌باشد و در اولین واکنش مهم $\frac{۲}{۳}$ دیستال زنجیرهٔ $A\alpha$ برداشته می‌شود. در مرحلهٔ دوم قسمت N - ترمینال از زنجیرهٔ $B\beta$ قطع می‌شود که با اندازه‌گیری قطعهٔ حاصل می‌توان شدت اثر Pm روی Fg را ارزیابی کرد. نشان داده‌اند که اگر زنجیرهٔ $A\alpha$ از فیبرینوژن حدود ۳/۵ برابر حالت طبیعی فسفریله شده باشد (محتوای فسفر غیر آلی آن بالا باشد) سرعت اثر Pm روی آن ۲ برابر کندتر می‌شود.



شکل ۱-۳B : تخریب غیر قرینه فیبرینوژن توسط پلاسمین. ساختمان اصلی عبارت است از: سه دومن کروی شکل که از آنها قطعات D و E حاصل می‌شوند، رشته‌های مارپیچی α-helix که باعث اتصال این دو به هم می‌شوند و زنجیرهٔ بلند $A\alpha$ که بصورت زایدهٔ جانبی از هر ترمینال (قسمت D) امتداد می‌یابد. قطعهٔ X شامل هر سه دومن می‌باشد ولی زنجیرهٔ جانبی $A\alpha$ و پپتید $B\beta$1-24 را از انتهای نیتروژنی زنجیرهٔ $B\beta$ را از دست داده است. قطعه y شامل دومن مرکزی E به همراه یکی از دومن‌های جانبی D می‌باشد که توسط زنجیرهٔ مارپیچی به هم وصل می‌شوند. با قطع زنجیرهٔ مارپیچی باقی‌مانده قطعه y به قطعات D و E تقسیم می‌شود.

با ادامهٔ واکنش قطعه قطعه شدن Fg تکه‌های پلی‌پپتیدی بزرگی حاصل می‌شوند که

مجموعاً به آنها قطعات X یا X-Fragment می‌گویند. که جرم آنها بین ۳۳۷ تا ۲۴۶ کیلو دالتون می‌باشد. و بصورت $X_{2a}...X_{5a}...X_{12}$ مشخص می‌شوند. این قطعات اغلب قابل لخته شدن می‌باشند. ولی لخته درست شده از این قطعات بخاطر از دست دادن C - ترمینال و نداشتن اتصالات بین این ترمینالها نسبتاً ضعیف است. قطعات X می‌توانند بطور فعال وارد ساختمان لخته‌های قدیمی و لخته‌های جدیدِ در حال تشکیل شدن شوند و باعث شکنندگی آنها بشوند. هنگامی که از داروهای اختصاصی برای لخته استفاده شود، مثل t-PA، مقدار زیادی از این قطعات X تشکیل می‌شود. این مسئله توضیح می‌دهد که چرا بروز حوادث و عوارض خونریزی دهنده ناشی از t-PA، که یک داروی اختصاصی برای لخته است، به اندازه داروهائی است که برای فیبرین اختصاصی نمی‌باشند. قطعات X برای مدت کوتاهی در خون باقی می‌مانند و پس از آن مجدداً خود آنها نیز تجزیه می‌شوند و قطعات مشخصی بنامهای P1, E, D یا قطعهٔ ناپایدار Y که از هستهٔ مرکزی D-E درست شده است تشکیل می‌دهند. در صورتی که Fg مدت زمان بیشتری در معرض Pm باشد نهایتاً به قطعات همگن‌تری تجزیه می‌شود بنامهای D1 (۹۴ KD))، D2, D3 (۷۶ KD). در حالتی که فیبرین پلی‌مریزه تحت اثر Pm قرار گیرد قطعات D-D حاصل می‌شوند.

پس از ایجاد اتصالات کوالانت بین مولکولهای Fg و تشکیل Fn نقاط مورد حملهٔ آن (attack sites) کمتر در دسترس Pm قرار می‌گیرند و بهمین خاطر در مورد Fn واکنش کندتر پیش می‌رود و مواد حاصل نیز متفاوتند. قطعاتی مانند DD و DY و YY و تکه‌های ناپایدار بزرگتر اختصاصی تجزیه فیبرین می‌باشند.

مواد ضد پلاسمین و منع کننده‌های آن (Pm inhibitors)، در شرایط عادی و فیزیولوژیک بر روی پلاسمین آزاد موجود در گردش خون راحت‌تر از هنگامی اثر می‌کنند که Pm به فیبرین وصل شده باشد. بهمین خاطر است که مواد منع کننده پلاسمین Fg را بهتر از فیبرین از لیز شدن محافظت می‌کنند. ولی در شرایط پاتولوژیک مانند درمانهای ترومبولیتیک سطح پلاسمینِ تجمع یافته آنقدر بالا می‌رود که دیگر مواد Pm inhibitor کارآئی خود را از دست می‌دهند و Fg هم به