دکتر احمد رئیسی
دکتر علی اسدی‌پور
دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تحقیقات جدید در مورد فیبرینولیتیک‌ها

خلاصه:

فیبرینولیتیک‌ها داروهائی هستند که قادرند لخته تشکیل شده در جریان خون را بوسیله کاتالیز نمودن واکنش تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین، حل نموده و جریان طبیعی گردش خون را مجدداً در عروق مسدود شده برقرار نمایند.

معمولاً استرپتوکیناز (SK)، که یک محصول کاتابولیکی استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک گروه C می‌باشد، واوروکیناز (UK)، که در بافت کلیه و ادرار انسان یافت می‌شود، بعنوان عوامل فیبرینولیتیک مورد مصرف قرار می‌گیرند.

عیب این داروها این است که پلاسمینوژن را در تمام سیستم گردش خون به پلاسمین تبدیل می‌کنند. در این صورت علاوه‌بر حل نمودن لخته تشکیل شده، باعث انهدام فیبرینوژن و برخی از فاکتورهای انعقادی و در نتیجه افزایش خطر خونریزی می‌گردند که در مواردیکه جراحی‌های اورژانسی در حین درمان ضرورت پیدا کند، مشکلات عدیده‌ای را به همراه خواهد داشت.

امروزه تلاش محققین براین است که داروهائی را بعنوان فیبرینولیتیک معرفی نمایند که بتوانند بر روی لخته فیبرین متمرکز شده و بدون انهدام سیستمیک فیبرینوژن و فاکتورهای انعقادی و افزایش خطر خونریزی، تنها لخته فیبرین را از بین ببرند.

برخی از این داروها عبارتند از:

tPA

Saruplase

Magnetic Urokinase

Conjugated compounds

مقدمه:

ترومبوآمبولیسم یکی از اختلالاتی است که بعلت لخته شدن خون در عروق اتفاق افتاده و در صورت عدم درمان صحیح و سریع، می‌تواند عوارض وخیمی برجای گذاشته و حتی به مرگ منجر شود.

فیبرینولیتیک‌ها داروهائی هستند که با حل نمودن لخته تشکیل شده از عواقب خطرناک آن جلوگیری می‌نمایند. در سال ۱۹۸۰ SK و UK رسماً بعنوان بهترین عوامل فیبرینولیتیک انتخاب شدند. معهذا عوارض ناشی از آنها که خونریزی یکی از شایع‌ترین آنهاست محققین را برآن داشت تا داروهای دیگری را به این منظور معرفی نمایند. زیرا به دلیل کوتاه بودن زمان گردش خون و پخش شدن سریع دارو در آن، تجویز موضعی این داروها (مثلا داخل کرونری) نیز نتوانسته است عارضه خونریزی را کاهش دهد.

از طرف دیگر تجویز موضعی این داروها به سرعت عملی نبوده و در مواردی نیز به مرگ و میر بیماران منجر خواهد شد. در نتیجه داروی اولیه بایستی دارای خصوصیات زیر بوده و از طریق ورید تجویز

ردد.[1] ۱- نسبت به لخته فیبرین حالت انتخابی داشته باشد. ۲- نیمه عمر دارو در گردش خون کوتاه باشد. ۳- نیمه عمر دارو در روی لخته نسبتاً طولانی باشد. ٤- موجب انهدام سیستمیک فیبرینوژن و فاکتورهای انعقادی نگردد. ٥- سیستم هموستاز را مختل ننماید. ٦- غیر آلرژیک باشد.[2]

فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA)

یک سرین پروتئاز طبیعی است که سیستم فیبرینولیتیک را در حالت فیزیولوژیک فعال نموده و امروزه با تکنولوژی (rDNA) تهیه می‌شود.

تمایل tPA جهت اتصال به پلاسمینوژن آزاد گردش خون بسیار پائین است (K_m=٦/٥×۱۰$^{-5}$M) در حالیکه تمایل آن جهت اتصال به فیبرین بسیار بالا است. (K_m=۱/٦×۱۰$^{-7}$M)

از طرف دیگر کمپلکس حاصله (فیبرین - tPA) نیز تمایل زیادی جهت اتصال به پلاسمینوژن دارد. (K_m=۱/٤×۱۰$^{-7}$M)[2].

با در نظر گرفتن این نکته که غلظت پلاسمینوژن آزاد در گردش خون ۰/۲×۱۰$^{-5}$M بوده و غلظت tPA نیز در شرایط فیزیولوژیک پائین می‌باشد. پلاسمینوژن توسط tPA به پلاسمین تبدیل نمی‌شود. ولی در صورت وجود ترومبوس، tPA ابتدا با فیبرین باند شده و کمپلکس حاصل به پلاسمینوژن متصل می‌شود که در این صورت در مجاورت لخته پلاسمینوژن به پلاسمین تبدیل شده و لخته فیبرینی نابود می‌شود. نکته‌ای دیگر که محاسن tPA را افزایش می‌دهد این است که پلاسمین تولید شده از محلی به فیبرین متصل شده است که آلفا - دو - آنتی‌پلاسمین در حالت معمول به آن متصل شده و آن را منهدم می‌نماید. به همین دلیل نیمه عمر پلاسمین حاصله ۱۰۰ برابر پلاسمین آزاد می‌باشد.[2]

بطوریکه نیم ساعت پس از قطع انفوزیون tPA وضعیت سیستم هموستاز به حالت طبیعی برمی‌گردد(۲).

این دارو در ٦۰٪ موارد موجب بهبودی در بیماران گردیده است در حالیکه SK تنها در ٤٥٪ موارد اثربخشی داشته است.[3]

بطوری کلی بنظر می‌رسد که tPA با داشتن این مزایا نسبت به SK داروی فیبرینولیتیک مناسب‌تری است.

پرو - اوروکیناز (Pro - UK)

این ترکیبات که از نظر ساختمانی یک UK تک زنجیره‌ای است بوسیله تکنیک rDNA تهیه شده و تحت عنوان Saruplase به بازار عرضه می‌شود.[5]

اگر چه اندکس درمانی آن کمتر از tPA است ولی مطالعات نشان می‌دهد که در دوزهای موثر به میزان کمتری موجب فعال شدن سیستمیک پلاسمینوژن می‌گردد.

Pro-UK در پلاسما یا محیط بافری بوسیله یک سوبسترای آمیدولیتیک بی‌اثر می‌شود. در حالیکه در این شرایط UK موثر است. معهذا انکوباسیون این ترکیب با پلاسمینوژن منجر به تولید پلاسمین و UK می‌گردد.

لذا می‌توان گفت که فعال شدن پلاسمینوژن حاصل واکنشهای زیر می‌باشد.

Pro - Uk + Plasminogen → Plasmin

Plasmin + Pro - UK → Uk

UK + Plasminogen → Plasmin

در پلاسما مهارکننده‌ای وجود دارد که می‌تواند واکنش اول را مهار نماید. لذا این واکنش تنها در صورتی قابل انجام است که این مهارکننده غیرفعال گردد.

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که در حضور فیبرین این مهارکننده بی‌اثر شده و اثر فیبرینولیتیک دارو ظاهر می‌شود. لذا این ترکیب نیز یک فیبرینولیتیک انتخابی می‌باشد(۱)

فعال کننده‌های آسیله شده

در این مطالعه پلاسمین و برخی از فعال کننده‌های پلاسمینوژن از قبیل UK و کمپلکس SK-پلاسمینوژن از محل اکتیوسایت توسط استرهای آمیدینوفنیل مشتقات اسیدبنزوئیک آسیله شده و مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

ترکیبات آسیله شده در پلاسما دارای نیمه عمر طولانی‌تری بوده و اختلالات هموستاتیک کمتری از خود نشان می‌دهند. تجربه نشان می‌دهد که این مشتقات قبل از دآسیله شدن غیرفعالند و دآسیلاسیون تنها زمانی صورت می‌گیرد که ترکیب آسیله شده به فیبرین متصل گردد. به همین دلیل پلاسمین تنها در مجاورت فیبرین تولید شده و ترکیب اثر انتخابی فیبرینولیز اعمال می‌نماید (البته این اثر در مورد انسان کمتر از حیوانات آزمایشگاهی مشاهده شده است)(۵)

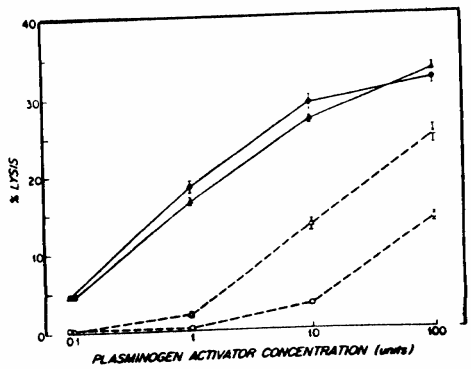
ترکیبات کنژوگه شده

تحقیقات گسترده‌ای جهت هدف‌دار کردن داروها، از طریق اتصال آنها به آنتی‌بادیهای اختصاصی، در حال انجام است. داروهای فیبرینولیتیک نیز از این قاعده مستثنی نبوده و تلاش جهت اتصال آنها به آنتی‌بادیهای مختلف همچنان ادامه دارد:

یکی از این آنتی‌بادیها که برای زنجیره بتای فیبرین اختصاصی است، آنتی‌بادی مونوکلونال 59D8 نام دارد که با پیوند دی سولفیدی به UK و tPA اتصال داده شده و فعالیت فیبرینولیتیکی ترکیبات حاصله، UK-59D8 و tPA - 59D8 و همراه با UK تنها و tPA تنها مورد ارزیابی قرار گرفته است.(۶)

در یک مطالعه که انهدام فیبرین توسط این چهار ترکیب در محیط سفاروز بررسی گردیده است، نتایج نشان می‌دهد که فعالیت فیبرینولیتیکی tPA ۱۰ برابر UK می‌باشد. بعنوان مثال برای حصول ۱۵٪ انهدام فیبرین ۱۰۰ واحد UK لازم است، در حالیکه ۱۰ واحد tPA جهت این عمل کافی است.

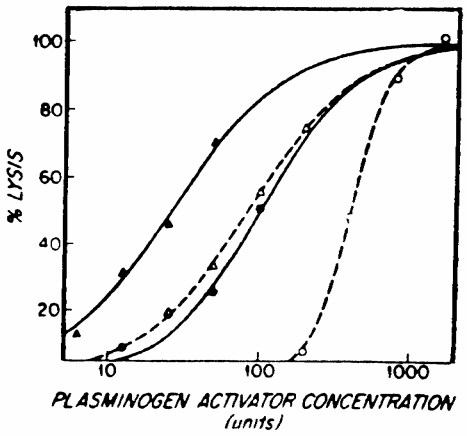
59D8 - UK و 59D8 - tPA دارای فعالیت مشابهی بوده و ۱۰۰ برابر UK و ۱۰ برابر tPA قدرت دارند. (تصویر شماره ۱)(۶)



تصویر شماره ۱- اندازه گیری قدرت انهدام لخته در محیط سفاروز پس از ۷۵ دقیقه (میانگین و انحراف معیار ۳ نمونه نشان داده شده است).

tPA-59D8 ●
UK-59D8 ▲
UK ○
tPA △

در مطالعه‌ای دیگر که قدرت این ترکیبات در انهدام لخته در پلاسما مورد بررسی قرار گرفته است نتایج نشان می‌دهد که بطور متوسط قدرت ٤/٥UK-59D8 برابر UK و قدرت tPA-59D8 ۳/۲ برابر tPA و قدرت UK-59D8 معادل tPA می‌باشد. (تصویر شماره ۲)

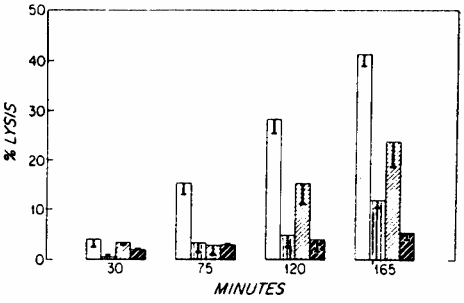


تصویر شماره ۲- اندازه‌گیری قدرت انهدام لخته در پلاسما پس از ۹۰ دقیقه (هر نقطه نشان دهنده میانگین مربوط به ۳ نمونه است).

tPA △ tPA-59D8 ▲

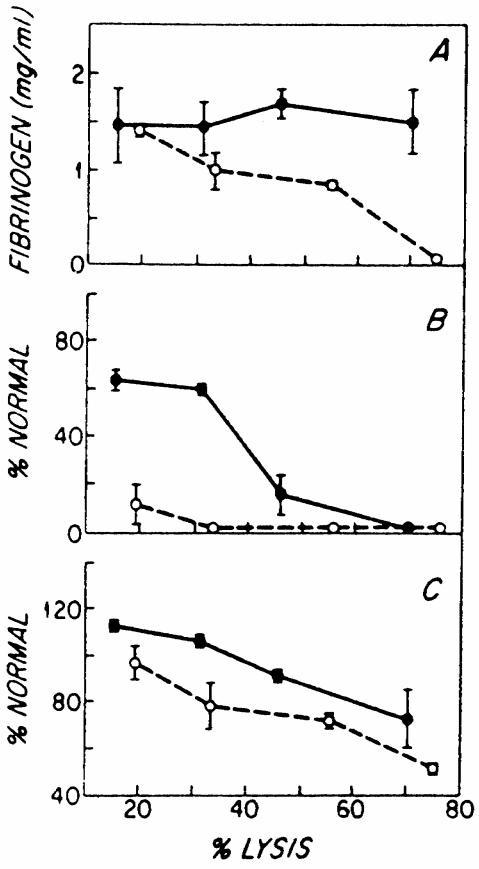
UK ○ UK-59D8 ●

البته همانطوری که در تصویر مشاهده می‌شود، افزایش قدرت ترکیبات کنژوگه در غلظتهای پائین بیشتر قابل توجه است.



تصویر شماره ۳- میزان انهدام لخته در پلاسما در زمانهای مختلف توسط غلظتهای متفاوتی از فیبرینولیتیک‌ها (میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است).

فعالیت فیبرینولیتیکی نسبی این چهار ترکیب در زمانهای مختلف نیز در پلاسما بررسی و ثابت شده است. مزیت دیگر این دارو کوتاه بودن نیمه عمر آن در گردش خون است (۸-۵ دقیقه در انسان) که افزایش قدرت ترکیبات کنژوگه نسبت به UK و tPA در طول زمان آزمایش قابل مشاهده می‌باشد.



تصویر شماره ٤- اثر tPA ,tPA-59D8 روی غلظتهای فیبرینوژن (A) آلفا دو آنتی‌پلاسمین (B) و پلاسمینوژن (C) پس از انحلال مقادیر مشخصی از لخته در مقایسه با نمونه‌های کنترل.

(هر نقطه نشان دهنده میانگین مربوط به ۳ نمونه است).

(تصویر شماره ۳)

نکته دیگری که بایستی بررسی شود این است که آیا افزایش در قدرت فیبرینولیتیک ترکیبات کنژوگه با اثر انتخابی فیبرینولیز همراه می‌باشد یا خیر؟

به این منظور میزان انهدام فیبرینوژن، آلفا - دو - آنتی‌پلاسمین و پلاسمینوژن متعاقب تجویز این چهار ترکیب بررسی گردید.

براساس نتیجه حاصله هنگامیکه tPA - 59D8 یا Uk - 59D8 با فعالیت برابر به ترتیب به جای tPA یا UK تجویز شده است، در مصرف فیبرینوژن و آلفا-دو-آنتی‌پلاسمین کاهش چشمگیری مشاهده گردیده و مصرف پلاسمینوژن نیز کاهش یافته است. (تصویر شماره ٤)[۶] (بعلت مشابه بودن نتایج تصویر مربوط به UK-59D8 و UK حذف شده است).

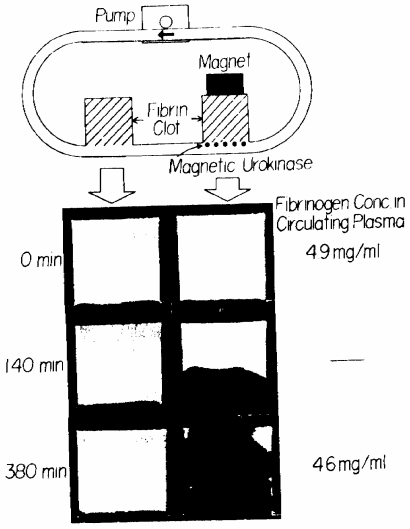
اوروکیناز مغناطیسی (Mag-UK)

بدنبال تحقیقات جهت هدف‌دار کردن داروها، از جمله کنژوگه کردن دارو با آنتی‌بادیهای اختصاصی، در این مطالعه شیوه‌ای جدید پیشنهاد شده و کمپلکسی از UK، ماگنتیت و پلی‌اتیلن گلیکول تهیه گردید.

این کمپلکس توسط نیروی مغناطیسی به طرف لخته خون هدایت و اثر انتخابی فیبرینولیز نشان داده است. دستگاهی که جهت این مطالعه in vitro درنظر گرفته شده بود (مطابق تصویر شماره ۵) عبارتست از:

یک لوله سیلیکونی که به دو اطاقک حاوی لخته فیبرین متصل شده است. در داخل لوله پلاسمای گاوی محتوی پلاسمینوژن توسط یک پمپ به گردش درآمد. پس از افزودن Mag-UK به سیستم یک آهن‌ربا روی یکی از اطاقکها قرار گرفت. در زمانهای مختلف از این اطاقک‌ها فتوگراف تهیه شده و میزان انهدام لخته مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان می‌دهد که لخته موجود در اطاقکی که آهن‌ربا در روی آن قرار گرفته است پس از ۱٤۰ دقیقه نصف و پس از ۳۸۰ دقیقه کاملا از بین رفته است، در



تصویر شماره ۵- اثر انتخابی فیبرینولیزبوسیله اوروکیناز مغناطیسی. قسمت بالاکه وسیله مربوط به این اندازه‌گیری را نشان می‌دهد از دو اطاقک حاوی لخته فیبرین که بوسیله یک لوله سیلیکونی بهم متصل شده‌اند تشکیل شده است.

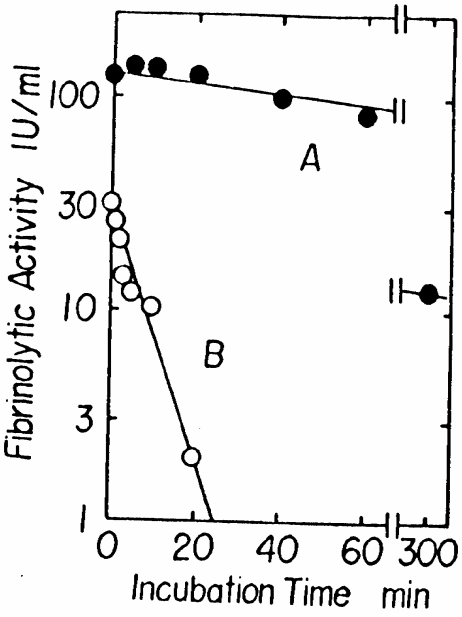
پلاسمای محتوی پلاسمینوژن بوسیله یک پمپ درون سیستم به گردش درآمد. مقدار مشخصی اوروکیناز مغناطیسی به سیستم تزریق گردیده و یک آهن‌ربا در بالای اطاقک سمت راست قرار گرفت.

در زمانهای مختلف از اطاقک فتوگراف تهیه شد (سمت چپ تصویر) قسمت‌های روشن نشان دهنده لخته فیبرین و قسمت‌های تیره موید انحلال لخته در طول زمان می‌باشد.

همچنین در شروع و پایان آزمایش غلظت فیبرینوژن قابل لخته شدن در پلاسما اندازه‌گیری شده است (سمت راست تصویر).

حالیکه لخته موجود در اطاقک دیگر همچنان دست نخورده باقی مانده است. (تصویر شماره ۵)

همچنین در شروع و پایان آزمایش غلظت فیبرینوژن قابل لخته شدن در پلاسما نیز تعیین گردید که موید باقی ماندن بیش از ۹۵٪ فیبرینوژن قابل لخته شدن پس از ۳۸۰ دقیقه می‌باشد. (تصویر شماره ۵) در یک مطالعه دیگر فعالیت فیبرینولیتیکی UK و Mag-UK با گذشت زمان مورد بررسی قرار گرفت. به



تصویر شماره ۶- مقایسه پایداری اوروکیناز با اوروکیناز مغناطیسی. اورکیناز و اوروکیناز مغناطیسی با فعالیت برابر با پلاسمای فاقد پلاسمینوژن مخلوط گردیده و در حرارت ۲۵c نگهداری گردید. در زمانهای مختلف از دو مخلوط نمونه‌برداری و فعالیت فیبرینولیتیک هر کدام مشخص گردید.

منحنی A مربوط به اوروکیناز مغناطیسی و منحنی B مربوط به اوروکیناز می‌باشند.

این منظور مقادیر مشخصی از این دو ترکیب (با فعالیت برابر) به دو نمونه پلاسمای فاقد پلاسمینوژن اضافه گردیده و مخلوط در درجه حرارت اطاق نگهداری و در زمانهای مختلف پایداری آنها بررسی گردید. براساس این نتایج، در حالیکه فعالیت فیبرینولیتیکی Mag-UK به دلیل وجود پلی‌اتیلن گلیکول، که یک ماکرومولکول صناعی است به تدریج کاهش می‌یابد، فعالیت UK بدلیل وجود مهارکننده‌های پلاسمائی به سرعت کاهش یافته و پس از ۴۰ دقیقه کاملا از بین می‌رود. (تصویر شماره ۶)

بدین ترتیب این مطالعات نشان می‌دهد که این کمپلکس می‌تواند بعنوان یک فیبرینولیتیک انتخابی طولانی‌الاثر عمل نماید.[۷]

از طرف دیگر پیشنهاد می‌شود که استفاده از نیروی مغناطیسی جهت هدف‌دار کردن داروهای دیگر درآینده مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد.

مآخذ:

1. *Eisenberg, P.R.; Jaffe, A.S.: coronary thrombolysis, practical consideration; Cardiology clinics; 5 (1): 129-141, 1987.*

2. *Bergmann, S.R., et al: coronary thrombolysis with tissue type plasminogen activator; Cardiology clinics; 5 (1): 101-111, 1987.*

3. *Sherry, S.: the fibrinolytic system and its pharmacologic activation for thrombolysis; Cardiology clinics; 5 (1): 1-111, 1987.*

4. *Reynolds, James E.F. the extra pharmacopeia; 29 the edition. Pharmaceutical press, london. p 1074, 1989.*

5. *Robinson, A.K.; Collen, D.: Activation of the fibrinolytic system. Cardiology clinics; 5 (1): 13-19, 1987.*

6. *Marschall, S.R.et al: Conjugation to an monoclonal antibody enhances the fibrinolytic potency of tissue plasminogen activator; Biochemistry; 4 (27): 1153-1157, 1988.*

7. *Yoshimoto, T.etal: Magnetic Urokinase. Bio Chemical and Biophysical Research Communictions. 152 (2): 739-743, 1988.*