تهیه اجزاء پروتئینی پلاسما

مجله نظام پزشکی
سال پنجم ، شماره ۲ ، صفحه ۱۰۱ ، ۲۵۳۵

دکتر حسن حکیمی ـ محسن ابوالحسنی *

مقدمه:

واژه Fractionnement عبارت ازجداکردن پروتئینهای پلاسما بطرق مختلف میباشد.

باپیشرفتهائی که در تهیه اجزاء پروتئین‌های پلاسما حاصل شده تاکنون تعداد زیادی از این پروتئینها بطور خالص جدا گشته و اثرات بالینی و نقش حیاتی آنها دقیقاً مورد مطالعه قرار گرفته واهمیت هر کدام ازآنها مشخص شده است.

ازاین نظرامروزه از تجویز پلاسما خودداری کرده اجزاء مختلف آن را بکار میبرند.

برای اولین‌بار درسال ۱۸۴۱، از سولفات آمونیوم برای جدا کردن گلبولین و سرم آلبومین استفاده شد. تقریباً صد سال بعد Cohn (۳) در جریان جنگ دوم جهانی از اتانول برای تهیه مقادیر زیاد آلبومین استفاده کرد.

البته نباید فراموش کرد که عمل‌تهیه‌اجزاء پروتئینی‌پلاسمابمقیاس وسیع را باید مدیون پیشرفتهائی که در روشهای مربوط به‌تولید سرما حاصل شده‌است، دانست. زیرا سانتریفوژکردن ودر نتیجه جدا کردن اجزاء مختلف پلاسما در سرما و لیوفیلیزه کردن فرآورده‌های حاصل باعث جلوگیری ازآلودگی میکروبی وتغییر ماهیت (Dénaturation) پروتئینها میشود . در ۳۵ سال گذشته روشهای زیادی برای تهیه اجزاء پروتئین پلاسما پیشنهاد شده‌اند که مهمترین آنها عبارتند از:

۱ـ املاح معدنی = مانند سولفات‌آمونیوم، سولفات سدیم.
۲ـ حلالهای‌آلی = کلروفرم ـ استن ـ اتانول.
۳ـ تعویض‌کننده یونها = مانند مخلوطی از رزینهای تعویض‌کننده‌آنیون، کاتیون، سلولز وسفادکس تعویض‌کننده یون.
۴ـ موادآلی مانند دیوانل واسیدکاپریلیك.
۵ـ پلیمرهای محلول: مانند پلی‌اتیلن گلیکول(۹) (PEG)
۶ـ الکتروفورز Préparative.
۷ـ Gel filtration باسفادکس‌های مختلف.

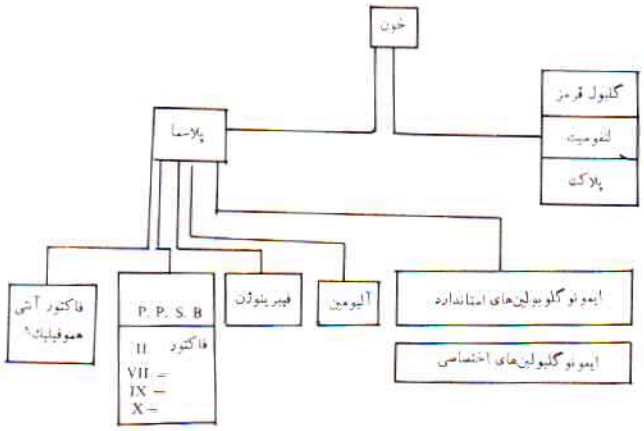
هدف:

هدف تهیه اجزاء پروتئینهای پلاسما تهیه مشتقات مختلف پلاسما بطور خالص وتغلیظ‌آنها میباشد. مزیتی که این فرآورده‌ها نسبت به‌پلاسما دارند این است‌که با استفاده از مشتقات تهیه شده هم در تجویز مقادیر زیاد پلاسما و همچنین از تجویز پروتئینهای غیرضرور میتوان جلوگیری‌کرد و نتیجهٔ بهتری گرفت بعلاوه از یك واحد پلاسما تعداد بیشتری از بیماران استفاده خواهند نمود.

مثلا سابقاً درمورد سوختگی برای جبران هیپوپروتئینمی، پلاسما تجویز میشد در صورتیکه بیمار فقط به آلبومین پلاسما احتیاج داشت ونیازی‌به‌دیگرپروتئینها ازقبیل گاماگلبولین ـ فیبرینوژن‌ـ فاکتور آنتی‌هموفیلیك A و فاکتورهای انعقادی (P.P.S.B.) موجود در پلاسما نداشت واکنون با جداکردن تمام موادنامبرده از همان یك واحد پلاسما، ۵ بیمار استفاده خواهندکرد.

علاوه برمواد فوق سایرپروتئینهای پلاسمارا ازقبیل هاپتوگلوبین سروپوپلاسمین، سیدروفیلین، ترانسفرین، پلاسمینوژن‌وα_2 ماکرو گلبولین وغیره نیز میتوان جداکردکه خواص درمانی آنها تحت مطالعه میباشد.

* انستیتو پاستور ایران ـ تهران .



نمودار ۱ ـ بطور کلی فرآورده‌های حاصل از خون و در نتیجه مشتقات پلاسما را که مصرف درمانی دارند نشان میدهد.

مواد و روش کار:

الف ـ پلاسما:

برای تهیه گاماگلبولین و آلبومین علاوه بر پلاسمای تازه میتوان از پلاسمای خونهای تاریخ گذشته و پلاسمای جفت استفاده کرد. برای تهیه فاکتور آنتی هموفیلیك A و فیبرینوژن منحصراً از پلاسمای تازه استفاده میشود. کیفیت و نوع پلاسما در تهیه مشتقات خیلی مهم است و کنترلهائی که روی پلاسما انجام میگیرد بشرح زیر میباشند:

۱ـ تجسس پادگن (آنتی‌ژن) استرالیائی: از تمام خونهائی که برای تهیه اجزاء پروتئینی استفاده میشوند تجسس پادگن استرالیائی بعمل آمده وفقط از پلاسماهای سالم استفاده میشود.

۲ـ شمارش ژرم ـ پلاسماهائی که از خون وریدی تهیه میشوند فاقد ژرم بوده و یا اینکه تعداد آنها خیلی کم است ولی تعداد ژرمها در پلاسمای تهیه شده از خون جفت خیلی زیاد بوده و در بعضی موارد حتی به ۲۰۰۰۰۰ در میلی لیتر هم میرسد.

۳ـ اندازه گیری PH.

۴ـ اندازه گیری پروتئین.

۵ـ اندازه گیری عیار آگلوتینینهای ضد A و ضد B.

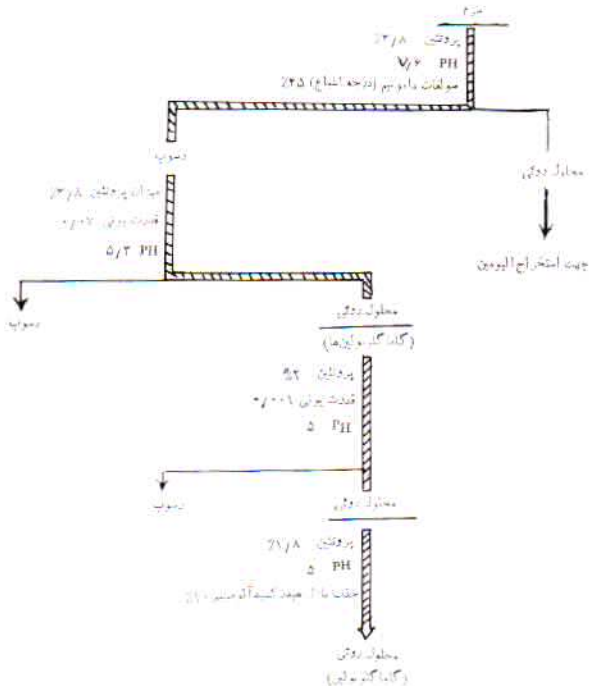
ب ـ اتانول: از الکل اتیلیك ۹۶ درجه سرد (۱۵ ـ تا ۲۰ـ درجه) استفاده میشود.

پ ـ آب مقطر: برای جلوگیری از ورود مواد تب‌زا (پیروژن) از آب مقطر تازه تهیه شده و سرد (۴ـ۱ درجه) استفاده میشود.

روش کار ـ روشهای زیادی برای تهیه اجزاء پروتئینی پلاسما (۱۲) بکار میروند که بطور اختصار مهمترین آنها را شرح میدهیم:

۱ ـ املاح معدنی

بوسیله املاح معدنی مانند سولفات سدیم و سولفات آمونیم (نسبت بغلظت آنها) پروتئینهای مختلف را میتوان رسوب داد. استفاده از سولفات آمونیم برای تهیه اجزاء پروتئینی بمقیاس زیاد توسط Behringwerke (۱۰) جهت تهیه گاماگلبولین انجام گرفت. ایراد بزرگی که به این روش وارد است اینستکه جهت جدا کردن املاح موجود در فرآورده حاصل باید آن را بمدت زیادی دیالیز کرد و در اثر این عمل مواد تب‌زا (پیروژن) وارد فرآورده میشوند که فعلا از این روش بیشتر در آزمایشگاهها استفاده میشود. در نمودار شماره ۲ این روش بطور خلاصه نشان داده میشود:

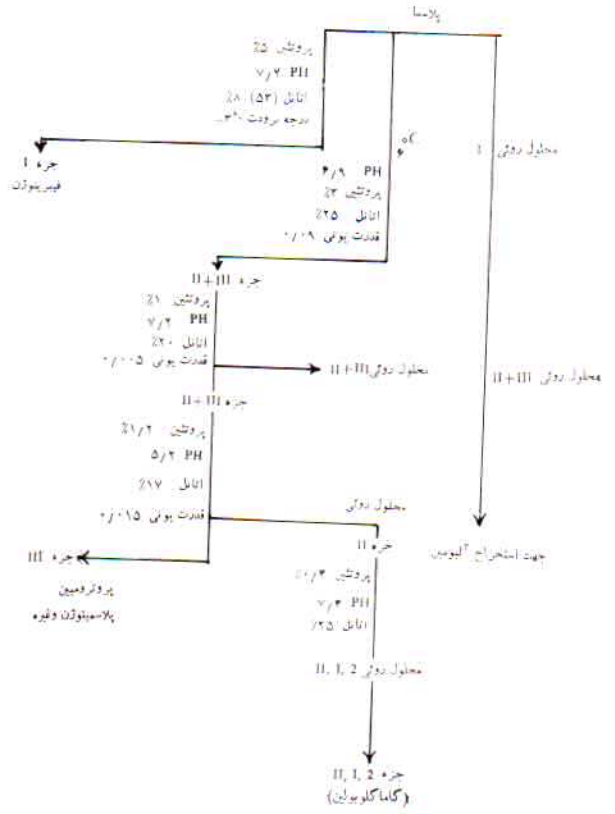


نمودار ۲

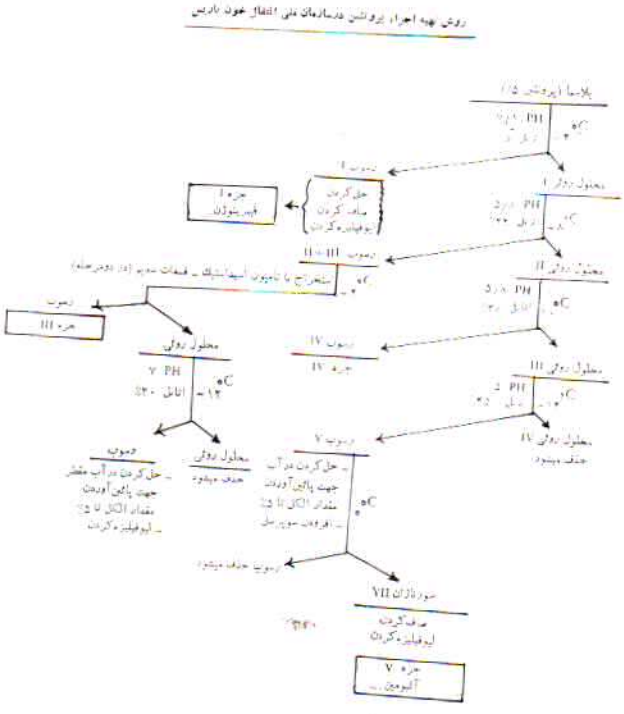
۲ـ حلالهای آلی

روشهای مربوط به استفاده از حلالهای آلی برعکس املاح معدنی اساس تهیه مشتقات پروتئینی پلاسما بمقیاس وسیع گردیده‌است. این امر افتخار بزرگی برای (۳) COHN وهمکاران او میباشد که بنیان‌گذار این روش شده‌اند. گاماگلبولین حاصل ازاین روش دارای ناخالصی کمتری است. مزیتی که حلالهای آلی نسبت باملاح معدنی دارند اینستکه عمل تهیه اجزاء پروتئینی در درجات حرارت زیر صفر انجام میگیرد واحتیاجی هم بعمل دیالیز ندارد.

روش Cohn (۳) (methude 6+9) بطور خلاصه در (نمودار ۳) نشان داده شده‌است:



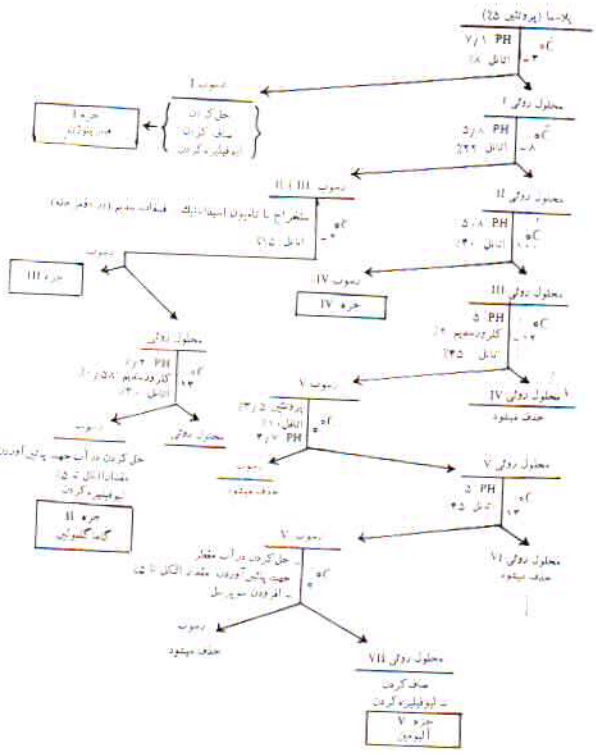
نمودار ۳



نمودار ۴

بعدها توسط خود Cohn ودیگرمحققین تغییرات زیادی دراین روش کـه برپایهٔ روش اصلی استوار بوده، داده شد. یکی‌ازاین روشها روش (۸) Nitschmann & Kistler است که درمرکز انتقال خون پاریس (C.N.T.S.) بامختصر تغییراتی که در این روش داده‌اند ازآن استفاده میکنند (نمودار ۴).

روشی‌که در انستیتو پاستور ایران معمول است همان روشی است که درمرکزملی انتقال‌خون پاریس عمل میشود ولی چون‌انستیتو به‌پلاسمای تازه دسترسی ندارد وازپلاسمای خون جفت وخونهای تاریخ گذشته استفاده میکند و این پلاسماهـا بعلت همولیز رنگی هستند درنتیجه برای‌بدست‌آوردن فرآورده‌های‌عاری‌ازهموگلوبین مختصرتغییری دراین روش داده شده است افزودن‌کلرورسدیم در مرحله رسوب دادن گاماگلبولین وآلبومین بعلت شکستن کمپلکس هموگلوبین با پروتئینهای مذکـور می‌باشد و پس از جدا شدن هموگلوبین از کمپلکس در محیط بشکل محـلول باقیمانده ولی آلبومین وگاماگلبولین درآن شرایط بنقطه ایـزوالکتریك خود رسیده ورسوب می‌کنند این‌روش در(نمودار۵) نشان داده میشود:



نمودار ۵

۳ـ تعویض‌کننده‌های یون

تعویض کننده‌هـای یون که جهت جدا کـردن پروتئین‌ها در کروماتوگرافی(۴) بکار میروند ممکن است مصنوعی (رزین) و یاطبیعی (سلولز)باشند. البته سلولز نسبت به‌رزین‌مصرف بیشتری دارد.

قدرت جذب پروتئین بوسیله تعویض‌کننده یون بستگی به PH تامپون دارد واین قدرت جذب نیزمربوط بمیزان باراالکتریکی ملکول پروتئین میباشد. جداکردن پروتئینها با تغییر PH تامپون یا افزایش غلظت (ملاریته) یونهای تامپون انجام میگیرد.

از تعویض‌کننده یونها مثل D.E.A.E. Sephadex-A50 درتهیه مشتقات پلاسما مانند P.P.S.B. (۱۸)

(Prothrombine, Proconvertine, Facteur Stuart et Facteur Anti-hemophilique B)

میتوان درمقیاس وسیع نیز استفاده کرد. مزیتی که این روش در مورد تهیه P.P.S.B. نسبت بروش فسفات تری‌کلسیك دارد این است که از پلاسمای خون حاوی A.C.D. میتوان استفاده کرد و سیترات سدیم مانع عمل جذب این فاکتورها روی سفادکس نمیشود در صورتیکه سیترات مانع جذب این فاکتور روی‌فسفات تری‌کلسیك میشود وبرای جلوگیری ازاین عمل خون رااجباراً باید روی رزین گرفت . در نتیجه پس از جدا کردن پلاسما گلبولها را نمیتوان مصرف‌کرد و باید دور ریخته شوند.

تعویض‌کننده آنیونها روی پروتئینهای پلاسمای انسانی اثرات متفاوتی دارند مثلا گاماگلبولینهاکه بیشتر خاصیت بازی دارند معمولاً کمتر جذب میشوند در صورتیکه Orosomucoide و آلبومین روی آنها بخوبی جذب میشوند. از این روش برای خالص‌کردن‌آنزیمها ـ پادتن ـ پادگن‌ها و پروتئینهای حامل و هورمونها میتوان در آزمایشگاه استفاده کرد.

۴- مواد آلی

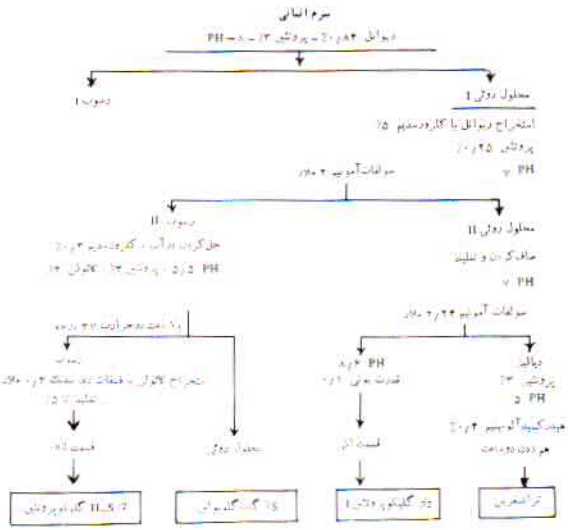
علاوه برحلالهای آلی از مواد آلی دیگری مثل ریوانل و اسید کاپریلیك میتوان‌برای جداکردن مشتقات‌پروتئینی پلاسما استفاده کرد.

ریوانل(2- éthoxy 6,9-diaminoacridine lactate) بوسیله Smetana & Hrejsi (۵) مورد استفاده قرارگرفته‌که در آن ۳/۵ حجم ازمحلول ریوانل درآب مقطر (باغلظت ۰/۴ درصد) را بایك‌حجم‌ازپلاسمایاسرم‌مخلوط‌کرده و رسوب را باسانتریفوژ جداکرده، سپس ریوانل موجود درمحلول را باجذب روی ذغال حیوانی‌جدا میکنند. ابتدا تصور میشدکه این روش از نظرسرعت عمل برای تهیه‌گاماگلبولین خالص روش خوبی باشد (در یك مرحله) زیرا فکر میکردندکه تمام پروتئینها بجز گاماگلبولینها دراثر ریوانل رسوب میکنند ولی بعداً معلوم شدکه محلول روئی تقریباً دارای ۸۰ درصد IgG و ترانسفرین و β_2 گلیکوپروتئین میباشد (۱).

ریوانل معرف خوبی برای جدا کردن پروتئینهای موجود در اجزاء III و IV بعنوان محصولات فرعی تهیه مشتقات پروتئینی ازقبیل ترانسفرین (۱) ـ هاپتوگلوبین (۱۵ـ۱۱) ـ سرولوپلاسمین (۱۶) وترومبین (۷) و α_2 ماکروگلبولین(۱۴) وپلاسمینوژن میباشد. حتی با ریوانل میتوان پروتئینهای خیلی ظریف و شکننده را مانند β_1-c-globuline یا آنزیمها را جدا کرد.

دیگر رنگهای آکریدینی را نیز برای جدا کردن پروتئینها آزمایش کرده‌اند ولی ریوانل بهمه آنها برتری داشته است.

بطورخلاصه روشی‌که بوسیله Heide & Haupt ارائه شده نشان داده میشود (نمودار ۶).



نمودار ۶

۵- پلیمرهای محلول: (۹)

پلی‌اتیلن گلیکول (P.E.G.):

عمل رسوب دادن دراین روش بوسیله غیرمحلول کردن ترکیبات پروتئینی دراثرمکانیسم جایگزینی وتغلیظ ملکولها دربین فضاهای بین ملکولی P.E.G. انجام میگیرد. هیچگونه واکنش شیمیائی بین پروتئین و P.E.G. انجام‌نمیگیرد. بعلت‌خاصیت‌کشش سطحی و جذب پروتئینها در سطح ملکولهای P.E.G. تغییر ماهیت (Dénaturation) پروتئینها بحداقل میرسد. پروتئینهای مختلف پلاسما را میتوان با افزایش‌تدریجی غلظت P.E.G. وتامپونهائی با PH متفاوت رسوب داد.

در PH خنثی پروتئینهای مختلف نسبت به تحرك الکتروفورزی آنها رسوب میکنند .

P.E.G.موجود دراجزاء مختلف جدا شده ازپلاسما (Fraction) را میتوان با افزودن سولفات آمونیم (با غلظت ۳۳ درصد) و

سانتیریفوژکردن آن جداکرد در اثر این عمل پروتئین رسوب کرده و P.E.G. در محلول روئی میماند با استفاده از P.E.G. میتوان فاکتور آنتی هموفیلیك A را بصورت خیلی غلیظ وعاری از ناخالصی فیبرینوژن و سایر فاکتورهای انعقادی تهیه کرد.

۶- الکتروفورز Préparative

دراین روش از خاصیت دوقطبی بودن پروتئینهای پلاسما استفاده میکنند وآنها را تحت تأثیر میدان الکتریکی قرار میدهند و در نتیجه بار الکتریکی که دارند از هم جدا میشوند الکتروفورز Préparative روشهای متفاوتی‌داردکه عبارتند از:

۱- الکتروفورز روی‌کاغذ.

۲- » روی ستون (پودرسلولز)

۳- » Pévicon که پلی مرکلرور استات پلی ونیل میباشد.

پس از عمل الکتروفورز قسمتهای مختلف جدا شده را بریده و پروتئین را با حلال مناسبی جدا میکنند این روش بیشتر در آزمایشگاهها بکار میرود.

۷- Gel filtration باسفادکسهای مختلف

ژلها دارای خاصیتی هستند که خیلی هیدروفیل میباشند در موقع صاف‌کردن سرم عمل جدا شدن پروتئینها مربوط به PH وتامپون نبوده، بلکه بستگی بوزن ملکولی و درشتی یا کوچکی ملکول دارد در نتیجه ابتدا ملکولهای درشت‌تر وسپس بتدریج ملکولهای کوچك‌تر از ژل خارج میشوند سفادکس دارای اشکال متفاوتی است مثلا سفادکس آنیونی بصورت D.E.A.E - Sephadex و سفادکس کاتیونی CMS-Sephadex میباشد. این روش نیز بیشتر درآزمایشگاهها بکار میرود.

بعنوان مثال برای تهیه IgG خالص که کاملا عاری از ناخالصی و حتی ملکولهای IgG بهم پیوسته (Agregée) باشد از سفادکس G-200 استفاده میشود و از این طریق حتی میتوان مقدار IgG بهم پیوسته را محاسبه نمود(۲).

بحث :

یکی از مشکلات عمده تهیهٔ پلاسمای کافی برای تهیه اجزاء پروتئینی‌میباشد وبرای این منظورباید عوامل زیر درنظر گرفته شوند:

۱- تشویق مردم به اهداء خون از طریق رادیو ، تلویزیون، نشریات ونشان دادن فیلمهای مربوط، توسط گروههای سیار.

۲- ازدیاد پلاسمافرز (Plasmapherèse).

۳- افزایش استفاده ازگلبولهای جداشده (Cullot globulaire) وجلوگیری از مصرف خون تام.

۴- جمع‌آوری هرچه بیشتر خون جفت.

در مورد تهیه گاما گلبولین از جفت‌کامل مشکلاتی وجود دارندکه عبارتنداز:

۱- احتمال وجود مواد A و B گروههای خونی.

۲- پادگن نسجی (Antigène tissulaire)

۳- پایداری (Stabilité)

برای جلوگیری از ورود پادگن نسجی ، انستیتو پاستور ایران فقط ازخون جفت استفاده کرده وازبکاربردن جفت‌کامل‌خودداری میکند برای اطلاع از وجود مواد A و B درپلاسما قبل از جدا کردن اجزاء پروتئین عیارآگلوتینینهای ضد A و ضد B بعمل میآید و درصورت بالابودن عیارآنها با اختلاط مقداری پلاسمای گروه مخالف اثر آن را خنثی میکنند.

خطراتی‌که فرآورده‌های حاصل‌ازمشتقات پلاسمارا تهدید میکنند مربوط بدو عامل زیرمیباشد.

۱- داخل شدن مواد تبزا (Pyrogéne)

تهیهٔ اجزاء پروتئینی بمقیاس وسیع را نمیتوان در محیط استریل انجام داد وبهمین علت این‌عمل باید در درجه حرارت زیر صفر و بوسیله الکل انجام‌گیرد در نتیجه خطرآلودگی ضمن‌کارخیلی کم شده وبحداقل میرسد واگر این عمل در درجات بالای صفر انجام‌گیرد خطرآلودگی بسیار زیاد است.

مواد تب زا جزء دسته لیپوپلی ساکاریدها و پلی پپتیدها هستند . سموم میکروبی و مواد تبزا را درحین تهیه فرآورده‌ها نمیتوان جداکرد وحتی دربعضی موارد این‌مواد تغلیظ شده وبعلت تشابه و قرابت ساختمان شیمیائی آنها با پروتئینها بافرآورده‌های مختلف رسوب میکنند.

۲- تغییر ماهیت (Dénaturation) **پروتئینها:**

ظاهرشدن کدورت‌درمحلولهای‌قابل‌تزریق‌آلبومین وگاما گلبولین ویا در فیبرینوژن مربوط بطرز تهیه و تغییرات نامطلوب وشدید PH، درجه‌حرارت و روش لیوفیلیزاسیون بوده‌که باعث تشکیل ملکولهای بهم پیوسته(Agregée) و در نتیجه تغییر ساختمان شیمیائی آنها میشود این ملکولها نسبت بپروتئین اولیه کمتر محلول بوده و رسوب میکنند البته‌کدورت حاصله درفرآورده‌ها ممکن است منشاء میکربی نیز داشته باشند وبرای تشخیص این دومیتوان ازنمونه‌های مذکورکشت داد.

فرآورده‌های تهیه شده در انستیتو پاستور ایران

۱- فیبرینوژن

فیبرینوژن تهیه شده در انستیتو پاستور بصورت لیوفیلیزه بوده و هرشیشه‌حاوی۲-۱/۵ گرم‌فیبرینوژن‌است. البته مقدارفیبرینوژن

بعد از اندازه‌گیری در روی برچسب نوشته می‌شود . مقدار فیبرینوژن هر شیشه تقریباً ۵-۴ بار بیشتر از پلاسمای هم حجم آن میباشد فیبرینوژن با روش Perfusion تجویز میشود. طول نیمه عمر آن تقریباً ۶-۵ روزاست. پس‌ازحل‌کردن پودرلیوفیلیزه درحلال آپیروژن (محلول ۳ درصد گلوکز) بلافاصله‌آن را باید مصرف‌کرد وحداکثر تانیم ساعت بعد از حل‌کردن میتوان آنرا نگهداشت اگر احیاناً در این مدت رسوبی (Particule) ظاهر شود بوسیله صافی گرفته‌خواهد شد وخطری ایجاد نخواهدکرد.

موارد استعمال

موارد استعمال آن در فیبرینولیز حاد و فیبرینوژنمی ارثی می‌باشد.

الف ـ فیبرینولیز حاد :

فیبرینولیز حاد در موارد زیرپیش می‌آید:

۱ـ فیبرینولیزپزشکی: که خیلی نادر است وفقط دربعضی موارد Purpura ، سرطان پروستات و یا پانکراس دیده می‌شود.

۲ـ فیبرینولیز جراحی: که در جراحیهای گلو و جراحیهای زنان دیده میشود.

۳ـ فیبرینولیزهائی‌که بعد از زایمان طبیعی ایجاد می‌شوند.

برای درمان فیبرینولیز حاد حداقل ۲ گرم فیبرینوژن لازم است گاهی تا مقدار ۸-۶ گرم نیز باید تزریق نمود.

ب- فیبرینوژنمی ارثی:

این مورد نیزخیلی نادراست وافراد مبتلا را میتوان بافیبرینوژن مداواکرد.

کنترلهائی‌که روی این فرآورده‌ها انجام می‌گیرند بشرح زیر می‌باشند:

- کنترل میکربی
- (Toxicité)
- آزمون پیروژنی
- اندازه‌گیری مقدار پروتئین
- Coagulabilité
- پایداری (Stabilité)

(ایمونوگلبولین) گاماگلبولین :

گاماگلبولین‌تهیه‌شده درانستیتوپاستورایران‌فرآورده لیوفیلیزه‌ای ازمحلول ۱۶/۵ درصد* گاماگلبولین مشتق ازپلاسمای انسانی می‌باشدکه دارای ۲/۲۵ درصد گلیکوکول بعنوان پایدارکننده ویك درصد تیومرسال بعنوان نگهدارنده می‌باشد.

گاماگلبولینی‌که اکنون تهیه میشود گاماگلبولین استانداردبوده ولی تهیه گاماگلبولین اختصاصی‌فعلا مقدورنیست. ازنظر طرزتهیه وروش‌کارهیچ فرقی‌بین تهیه گاماگلبولین‌استاندارد و گاماگلبولین اختصاصی وجود ندارد و مشکل اصلی نبودن افراد و داوطلب برای اهداء خون است‌که امید است با اقداماتی‌که انجام خواهد گرفت افراد داوطلبی پیدا شوندکه با تزریق واکسن عیارپادتن آنها را بالا برده و با پلاسما فرز از آنها بتوان گاماگلبولین اختصاصی نیز تهیه‌کرد. ایمونوگلبولین تهیه شده از راه عضلانی تزریق میشود. مقدار مصرف آن ۰/۲ میلی لیتر برای هرکیلو گرم وزن بدن بعنوان پیشگیری و ۰/۵ میلی لیتر برای هرکیلو گرم وزن بعنوان معالجه می‌باشد در مورد اشخاص ضعیف و یا ناقهین مقدار فوق را میتوان بدو برابرافزایش داد ولی مقدارهر تزریق نباید از ۱۰ میلی لیتر تجاوزکند در هر صورت تجویز بیش ازاین مقدار را میتوان در۲ یا ۳بار بفاصله ۲۴ تا۴۸ساعت تزریق‌کرد.

موارد استعمال (۱۷)

درموارد زیر مصرف میشود: سرخك ـ سرخچه ـ هپاتیت‌عفونی- سوختگیهای‌وسیع - بعد ازاعمال هرجراحی - عفونتهای‌میکربی- مخملك - زخم اثنی‌عشر - پیشگیری‌بیماریهای‌عفونی درنزداشخاص ضعیف‌ومراکزاجتماع‌کودکان ـ سیاه‌سرفه - اوریون- پولیومیلیت عوارض بعد از واکسیناسیون (ضد آبله ـ ضد هاری) حالات آلرژیك آگاما و هیپوگاماگلبولینی و تمام سندرمهای کمبود پادتن .

کنترلهائی که روی این فرآورده انجام می‌گیرند بشرح زیر می‌باشند:

۱ـ کنترل میکربی

۲ـ (Toxicité)

۳ـ اندازه‌گیری مقدار پروتئین

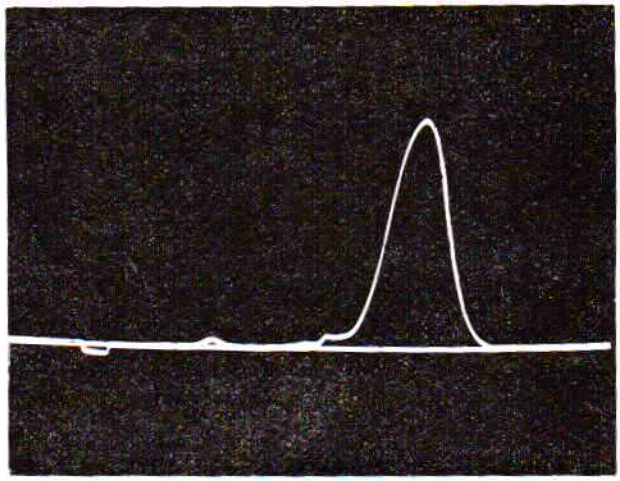
۴ـ پایداری

۵ـ الکتروفورز: برای تعیین درجه خلوص گاماگلبولین از فرآورده‌حاصله، الکتروفورزبعمل میآید درجه خلوص قابل‌قبول فارماکوپه‌ها ۹۰ درصد میباشد.

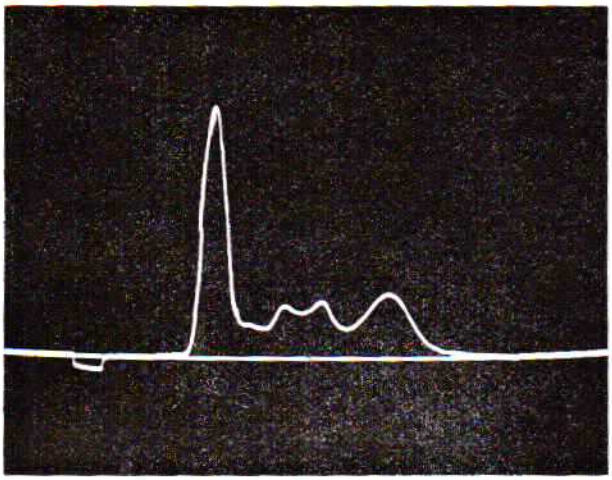
درجه خلوص گاماگلبولین تهیه شده در انستیتو پاستور ۹۸-۹۰ درصد می‌باشد و حتی در بعضی مواردکه از پلاسمای تازه وریدی استفاده میشود میزان خلوص آن به ۹۹/۵ درصد نیز میرسد.

درشکل‌های زیر الکتروفورز پلاسما قبل‌ازتهیه اجزاء پروتئینی و الکتروفورزگاماگلبولین حاصل از این پلاسما با هم مقایسه شده‌اند. میزان خلوص گاماگلبولین ۹۹/۵ درصد میباشد:

* غلظت ۱۶/۵ درصد مناسب‌ترین غلظتی است‌که توسط آمریکا وکشورهای اروپائی و همچنین سازمان بهداشت جهانی برای گاماگلبولین انتخاب‌شده است.



شکل ۱ - منحنی مربوط به الکتروفورز گاما گلبولین.
(بعد از جدا کردن اجزاء پروتئینی پلاسما)



شکل ۲ - منحنی مربوط به الکتروفورز پلاسما
(قبل از جدا کردن اجزاء پروتئینی)

۶- تعیین عیار پادتن سیاه سرفه و سرخچه:

تعیین عیار از این نظر انجام میگیرد که اگر احیاناً و برحسب اتفاق عیار پادتن یك دسته از گاما گلبولین بالا باشد ازاین دسته بعنوان گاما گلبولین اختصاصی استفاده شود. نتیجه تعیین عیار بشرح زیر میباشند:

دسته شماره	عیار پادتن سرخجه	عیار پادتن سیاه سرفه
۲۰	۱/۱۲۸۰	۱/۴۰
۲۱	۱/۵۱۲	۱/۶۰
۲۲	۱/۵۱۳	۱/۴۰
۲۳	۱/۱۲۸۰	۱/۸۰
۲۴	بین ۱/۲۵۶۰ و ۱/۱۲۸۰	۱/۸۰
۲۵	۱/۵۰۰۰	۱/۴۰
۲۶	ضعیف‌تر از ۱/۱۲۸۰	۱/۸۰

با توجه به نتایج حاصله عیار پادتن سرخجه دسته شماره ۲۵ با مقایسه با دسته‌های دیگر بالاتر بوده وازآن بعنوان گاما گلولین اختصاصی برعلیه سرخجه میتوان استفاده کرد عیار پادتن سیاه‌سرفه در تمام نمونه‌ها بسیار کم وناچیز میباشد.

۳- آلبومین

آلبومین تهیه شده درانستیتو پاستور در شیشه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری با غلظت ۱۷/۵ درصد میباشد و حاوی ۱۷/۵ گرم آلبومین است. هرشیشه آلبومین معادل نیم‌لیتر پلاسما میباشد. آلبومین عاری از پادگن استرالیائی است زیرا مدت ۱۰ ساعت در حرارت ۵۶ درجه نگهداری شده است. این آلبومین را مدت ۵ سال در ۴+ درجه و دوسال درحرارت ۲۱ درجه میتوان نگهداری کرد. آلبومین را بی نگرانی از گروه خونی شخص دریافت کننده می‌توان تزریق کرد. آلبومین را بدو طریق زیر می‌توان تجویز کرد:

۱- آلبومین ۱۷/۵ درصد را بوسیله پرفوزیون با سرعت کم در حدود ۲-۱ میلی لیتر در دقیقه.

۲- این آلبومین را میتوان با ۲۵۰ میلی لیتر سرم‌فیزیولوژیك یا گلوکز ایزوتونیك مخلوط کرده و تجویز کرد محلول رقیق‌شده را باید بلافاصله مصرف کرد.

موارد استعمال : در موارد زیر میتوان مصرف کرد:

شوکهای هموراژیك - سوختگیهای وسیع- آماس مغزی - سندروم‌های نفروتیك - سیروزها و سایر موارد هیپوپروتئینمی - در سوختگیهای وسیع مقدار آلبومین تجویز شده برحسب درجه سوختگی متفاوت است و بطورکلی از فرمول زیر برای محاسبه مقدار لازم آلبومین میتوان استفاده کرد:

مقدار لازم آلبومین = $P \times S \times 0,2$

P = وزن بدن برحسب کیلوگرم

S = درصد سطح سوختگی

کنترلهائی که‌روی این‌فرآورده‌انجام میگیرند بشرح زیر میباشند:

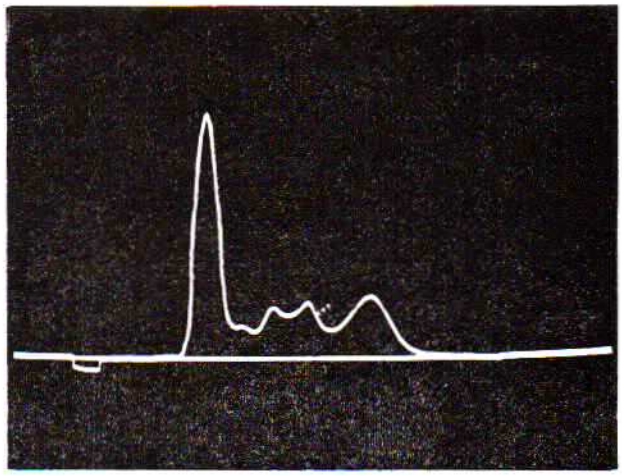
۱- کنترل میکربی.

۲- (Toxicité)

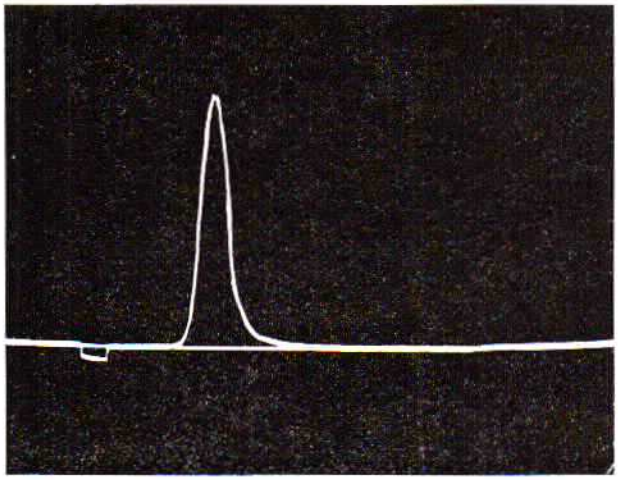
۳- آزمون تب زائی.

۴- اندازه گیری مقدار پروتئین.

۵- الکتروفورز درصفحه مقابل الکتروفورز آلبومین حاصل از این پلاسما مقایسه شده‌اند. آلبومین تهیه شده کاملا عاری‌ازناخالصی می‌باشد.



شکل ۳ - منحنی مربوط به الکتروفورز پلاسما
(قبل از جدا کردن اجزاء پروتئینی)



شکل ۴ - منحنی مربوط به الکتروفورز آلبومین حاصل
بعد از جدا کردن پروتئینها

۶- اندازه گیری فسفاتاز الکالن.

۷- اندازه گیری سدیم.

۸- اندازه گیری پتاسیم.

بطور کلی علاوه بر کنترلهائی که در انستیتو پاستور ایران روی تمام فرآورده‌ها انجام میگیرد برای حصول اطمینان بیشتر نمونه‌ها نیز برای کنترل بمرکز انتقال خون پاریس (C.N.T.S.) فرستاده میشود.

درخاتمه لازم میداند از مؤسسات و افرادی که در پیش برد این هدف همکاری داشته‌اند تشکر وقدردانی نماید:

۱- مرحوم دکتر ناموری سرپرست وقت انستیتو که بنیان گذار عمل تهیه اجزاء پروتئینی پلاسما در انستیتو پاستور بوده‌اند.

۲- مرکز خون ارتش بمناسبت همکاری در اهداء پلاسما وشرکت درتهیه فرآورده‌ها.

۳- مرکز ملی انتقال خون پاریس بمناسبت کمك و راهنمائی در روشهای مربوط به تهیه اجزاء پروتئینی پلاسما و کنترل فرآورده‌ها.

REFERENCES

1. Boettcher, E. W.; Kistler P. & Nitchmann H. Method of isolating the beta-metal combining globulin from human blood plasma Nature,181 : 490(1958).
2. Brummelhuis H. G, I., Kreeftenberg, I. G., Vogelaar E. F., and Krynen H. W. Studies on the preparation and stability of Immunoglobulin concentrates. Bibl. haemat. No: 38, part 2, P. 868-872 (Karger Basel 1971).
3. Cohn, E. J., Strong L. F., Hughes W. L., Mulford JR. D. J., Ashworth J. N., Melin M. and Taylor H. L. Preparation and properties of serum and plasma protein. IV, A system for the separation into fractions of the proteih and Lipoprotein component of Biological tissues and fluids. J, Amer. Chemical Soc. 8:459-475, 1946.
4. Cuatrecasas P. & Anfinsen C.B. Affinity chromatography. Ann. Rev. Bioch. 40;259_278. (1971).
5. Horejsi A., & Smetana R. The isolation of & globulin by rivanol. Acta Medica Scand. 155:65(1967).
6. Heide K., & Haupt H. Darstllung nach nicht thrapeutisch angewandter plasma_protein. Behringwerk-Mitteil. 161 (1964).
7. Miller K.D. Rivanol resin and the isolation of thrombin. Nature 184;450 (1959),
8. Nitschmann H., Kistler P., & Lergier W. Vereinfachtes verfahren zur gewinnung van humanen albumin und Gamma-globulin au blut_plasma mittel alkoholfailung, Helv, Chim. Acta. 1954, 37,867.

9. Polson A., & Ruiz_ Brava C. Fractionation of plasma with polyethylen glycol Vox Sang. 23;107_108 (1972).

10. Schultz H.E., Schonenberger M. & Matheka H. J. Zurkenntnis der Gammaglobulire und antitoxishen immunoglobuline. Behringwerk-Mitteilungen, 1952 26,21.

11. Steinbuch M. Les technique d'isolement de l'haptoglobin. Nouv. Rev. Franç. Hémat. 2:448(1962).

12. Steinbuch M. & Audran. R. Technique de purification des immuno _ globulines. Transfusion 1965, 8' No: 2

13. Steinbuch M. Précipitation methodes in plasma Fractionation. Vox Sang 23:92.106 (1972).

14. Steinbuch M. & Blatrix C. Preparation de l'α:-macroglobuline comme Sous-produit du fractinnement Rev. Franç Transfusion. 13;131 (1973).

15. Steinbuch M & Pejaudier L. The behaviour of haptoglobin during routin fractionation. Nature 184; 362(1959).

16. Steinbuch M. & Quentin M. Preparation of ceruloplasmin. Nature 183:323(1958).

17. Utilisation dese immunoglobulines humains. OMS. Ser. Rapp. Tech. NO: 327(1966).

18. Wickerhauser M. Large scale preparation of prothrombin complex for clinical use. 13th Cong. Hematology, Munich 1970.