✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۰، ۴۱، ۴۲ بهار ۱۳۷۸

امکان استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول در تهیه سرم هترولوگ ضد دیفتری

● فاطمه مفضلی ● حسین ذوالفقاران ● مرتضی مهین‌پور ● رضا ایزدپناه
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۷۷

چکیده

در این طرح ابتدا تمام ایمنوگلبولین‌های پلاسمای اسبی (پلاسمای اسبهای هیپرایمن شده با توکسوئید دیفتری) با غلظت ۱۵٪ پلی‌اتیلن گلیکول از بقیه فراکسیونهای پلاسما رسوب داده شد. سپس رسوبها جمع‌آوری و در سرم فیزیولوژی با هم حجم پلاسمای اولیه حل و در معرض هضم آنزیماتیک با پپسین نامحلول قرار گرفت که نتیجه آن جدا شدن قطعات $F(ab)_2$ از قطعات FC شد. قطعات $F(ab)_2$ توسط ۲۹٪ پلی‌اتیلن گلیکول رسوب داده و توسط سانتریفوژ از محلول جدا و در مقابل ۱۰٪ نمک طعام دیالیز و توسط ژل سفادکس ۲۰۰ خالص سازی شد. استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و پپسین نامحلول درجداسازی $F(ab)_2$ پادزهر دیفتری سبب شد تا سرم ضد دیفتری تهیه شده به روش پیشنهادی دارای ۸۰٪ فعالیت پادزهر دیفتری موجود در پلاسما و درجه خلوص آن بیش از ۵۰٪ سرم ضد دیفتری تهیه شده به روش متداول روش (Pope) افزایش داشته باشد.

مقدمه

سروتراپی و سرم درمانی در درمان بسیاری از بیماریهای میکروبی و ویروسی انسان و دام تجویز شده‌اند. به طورکلی فرآورده‌های بیولوژیکی محتوی ماده مؤثر پادزهر به لحاظ اهداف پیشگیرانه و درمان دارای نقش بسیار مهمی می‌باشند و در حال حاضر تهیه و تولید فرآورده‌های سرم درمانی از جایگاه درخور توجهی برخوردار هستند. بدن انسان در برابر آلودگی‌های میکروبی از راههای متعدد دفاع می‌کند و مهمترین آنها دو خط دفاعی محکم ترشح پادتن (ایمنی اکتسابی) در بدن و دیگری استقرار ایمنی یاخته‌ای می‌باشد. ایمنی اکتسابی به نوع فعال و غیر فعال تقسیم می‌شود. ایمنی که بعد از عفونت و یا واکسیناسیون در بدن پدید آید و حاصل فعالیت بدن فرد است ایمنی فعال نام دارد. ایمنی غیر فعال نتیجه انتقال پادتن فرد ایمن که در جریان ایمنی فعال ایجاد شده است به بدن فرد غیر ایمن می‌باشد. هر گاه منشاء انتقال این پادتنها سرم انسانی که واکسینه‌شده و یا به طور طبیعی به بیماری عفونی مبتلا شده و دوره نقاهت را سپری می‌کنند باشد پادتن‌ها را هم جنس‌واگر منشاء پادتن‌ها سرم حیوانات ایمن شده باشند پادتن‌ها را ناهم جنس می‌نامند. سرمهای (پادتن‌ها) ناهمجنس دارای عوارض جانبی متعدد می‌باشند که به واکنش‌های سرمی معروفند. مهمترین این واکنش‌ها آنافیلاکسی است که در تزریق مجدد سرم با پادتن همان نوع دام اغلب ایجاد می‌شود و آنافیلاکسی را واکنش نوع یک هم می‌نامند. یکی دیگر از عوارض جانبی سرمهای ناهمجنس در تزریق‌های مکرر بیماری سرم است که به آن واکنش نوع دوم نیز می‌گویند، علت این بیماری تزریق پروتئین‌های غیر اختصاصی است که در هنگام تصفیه به همراه پادتن‌ها جدا شده‌اند (۱). تاکنون روشهای جهانی تصفیه سرمهای ناهمجنس به خصوص در درمان عفونت‌های دیفتری و کزاز براساس روش پارافن جو و روش اصلاح شده پوپ انجام می‌پذیرد در این روش ابتدا تمام پلاسمای حاوی پادزهر را که منبع آنها پلاسمای اسب می‌باشد تحت تأثیر پپسین محلول (۲) قرار می‌دهند آنگاه محصولات هضم را توسط غلظت مشخصی از سولفات آمونیوم در درجه حرارت بالا (۱۵) رسوب داده از محلول جدا می‌کنند (۱۴). در مرحله دوم قطعات $F(ab)_2$ پادزهر را که توسط پپسین از قطعات FC جدا شده‌اند با غلظت بالاتری از سولفات آمونیوم رسوب داده و دیالیز می‌نمایند. تا به صورت محلول درآید. این روش تصفیه روش پرکار و نیاز به زمان زیاد دارد. بازدهی در این روش بیشتر از ۴۰ تا ۴۵ درصد نمی‌باشد و میزان IU در هر میلی‌گرم ازت پروتئین نیز حداکثر ۱۳۰ می‌باشد. بنابرآنچه در بالا ذکر شد و با توجه به اهمیت استفاده از سرمهای درمانی ناهمجنس به خصوص در ارتباط با پاره‌ای از ضد زهرها ما را بر آن داشت تا برای اولین بار در ایران روشی را در تصفیه سرمهای ناهمجنس ارائه دهیم تا درجه خلوص بیشتر و عوارض جانبی کمتری داشته باشد.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 40, 41, 42 PP: 153-155**

A study of polyethylen glycol for preparation of heterologous antidiphthria serum.

By: Mofazali, F.; Zolfagharian, H.; Mahinpour, M.; Izadpanah, R., Razi Vaccine and Serum Research Institute

This method consists of three main steps. In the first step the PEG (polyethylen glycol) (5-15% W/V) was used to precipitate the whole immunoglobulin from the defibrinated plasma containing diphtheria antitoxin. In the second step imunoglobulin was digested with insoluble pepsin and PEC (11% W/V) that was used to percipitate the FC fragment and separated it from $F(ab)_2$ fragment. In the last step $F(ab)_2$ fragment was precitated by PEG (to 29% W/V) and purified by dialyses and chromtography (gel filteration sephadex G 200). Our observation showed 80% recovery by this method and purification of this serum was increased about 50% as compared to the serum that was prepared by routine method.

مواد و روشها

منبع پادزهر دیفتری (آنتی توکسیک دیفتری) اسبهای هیپرایمن شده و توکسوئید به کار برده شده از فرآورده‌های مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی می‌باشد. پپسین نا محلول از کمپانی سیگما و پلی اتیلین گلیکول با وزن ملکولی ۶۰۰۰ از کمپانی Fluka مورد استفاده قرار گرفته است.

اندازه‌گیری پروتئین‌ها به روش بیوره (۳)، اندازه‌گیری ازت پروتئین به روش میکروکجدال (۹)، اندازه‌گیری آلبومین به روش گرین برگ (Greenberg) (۱۰) و بررسی فراکسیونهای پلاسما توسط الکتروفورز (۱۱) انجام گرفته است. عیار سرم تولید شده به صورت In vitro (۱۹) و فعالیت آن از طریق Invivo (۱۵) اندازه‌گیری شده است. ابتدا فیبرینوژن از پلاسمای حاوی پادزهر دیفتری توسط کلرورکلسیم با غلظت ۴٪ و حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت در حال همزدن جدا شد.

در مرحله بعد تمام ایمنوگلبولین‌ها در pH برابر ۷ توسط پلی‌اتیلن گلیکول تا غلظت ۱۷٪ رسوب و به وسیله سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ R.P.M به مدت ۱۵ دقیقه از بقیه فراکسیونهای سرم (پلاسمای دفیبرینه) جدا شد. رسوب فوق در سرم فیزیولوژی با دو برابر حجم پلاسمای اولیه حل و ایمنوگلبولین‌ها با غلظت ۱۵٪

پلی‌اتیلن گلیکول در pH برابر ۷ رسوب داده و توسط سانتریفوژ با همان دور قبلی از محلول جدا شد.

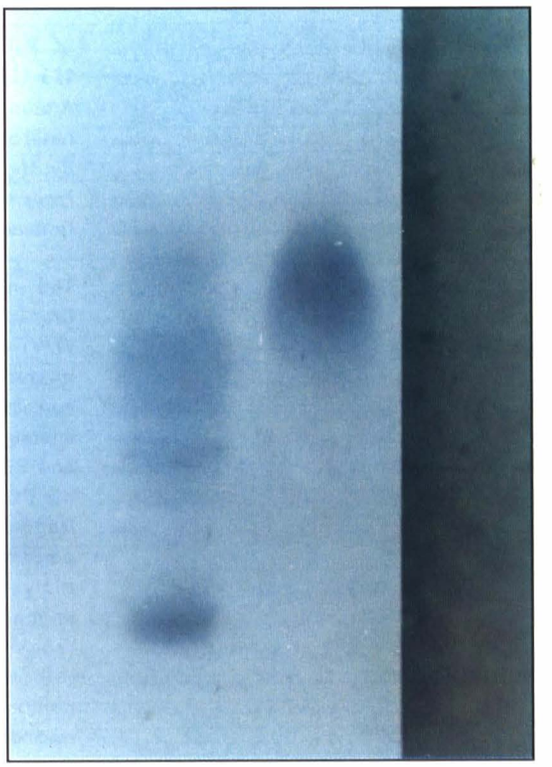
رسوب در ۱۸۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شده pH محلول ۳/۱ و درجه حرارت آن را به ۳۱ درجه سانتیگراد رسانده و به ازاء هر میلی لیتر پلاسما ۲ واحد آنزیم اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه عمل هضم انجام گرفت. باقیمانده هضم در pH برابر ۴/۸ و ۱۱٪ پلی‌اتیلن گلیکول از محلول جدا و قطعات $F(ab)_2$ پادزهر دیفتری باقیمانده در محلول در pH برابر ۷ و ۲۹٪ پلی‌اتیلن گلیکول رسوب داده، رسوب جمع‌آوری و در مقابل ۱۰٪ نمک طعام دیالیز و با عبور از ژل سفادکس ۲۰۰ خالص سازی شد. که در نتیجه ۱۲۰ میلی لیتر سرم ضد دیفتری با عیار ۱۵۰۰ LF در هر میلی‌لیتر به دست آمد مراحل تصفیه در شمای (۱) نشان داده شده است.

همزمان با روش فوق ۹۰۰ میلی‌لیتر از همان پلاسما به روش متداول (Pope) تصفیه شد. که نتیجه آن ۴۵ میلی‌لیتر سرم با عیار ۲۰۰۰ LF (Lime of floculation) در هر میلی‌لیتر آن بوده است.

نتایج

در آغاز رسوب پروتئین‌های پلاسمای حاوی آنتی توکسیک دیفتری در pH برابر ۷ توسط غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول مورد مطالعه قرار گرفت که در نتیجه ۵٪ پلی‌اتیلن گلیکول تمام فیبرینوژن از پلاسما به صورت رسوب جدا شد تا غلظت ۱۵٪ پلی‌اتیلن گلیکول تمام ایمنوگلبولین‌ها رسوب کرده بالاتر از غلظت ۱۵٪ پلی‌اتیلن گلیکول آلبومین شروع به رسوب کرده در آمده، به طوریکه تا غلظت ۲۰٪ پلی‌اتیلن گلیکول بیشترین مقدار آلبومین از پلاسما جدا می‌شود. از رسوب مرحله دوم (ایمنوگلبولین‌ها) الکتروفورز شد. همانطور که در شکل شماره ۱ پیداست اثری از آلبومین یا فیبرینوژن در آن دیده نمی‌شود. این نشان دهنده آن است که جداسازی فیبرینوژن و ایمنوگلبولین‌ها و آلبومین از یکدیگر بسیار مناسب بوده است. بعد از عمل هضم همانطور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده در حدود ۸۱٪ پادزهر دیفتری موجود در پلاسما در معرض هضم قرار گرفته و تبدیل به قطعات $F(ab)_2$ شده و در این مرحله مقدار IU (International unit) در هر میلی‌گرم ازت پروتئین برابر با ۱۵۶ شد.

ترسیب نهائی و خالص‌سازی قطعات $F(ab)_2$



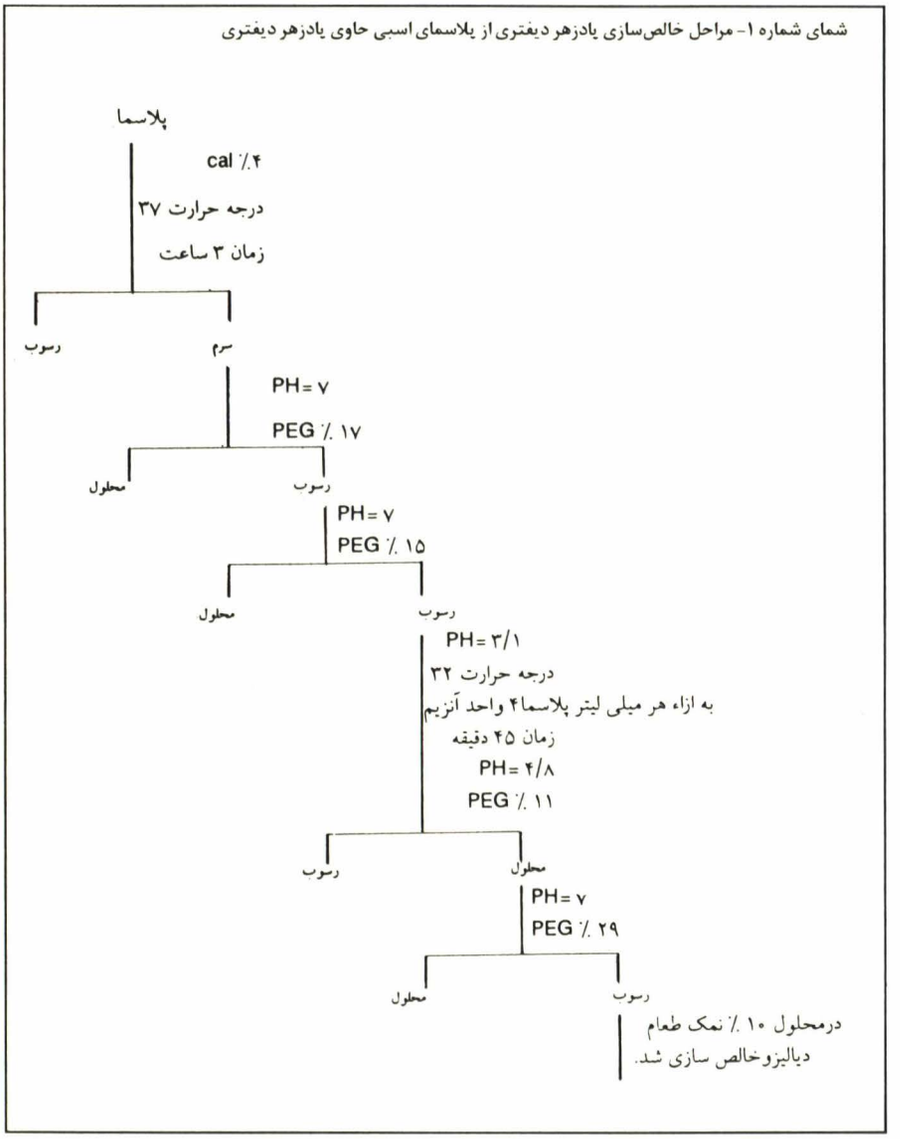
تصویر شماره ۱- عکس گرفته شده از الکتروفورز مقایسه ایمنوگلبولین‌های جدا شده را با پلاسما را نشان می‌دهد

پادزهر دیفتری تقریباً به صورت کمی و بدون کاهش بازدهی صورت گرفت و نسبت IU در هر میلی گرم ازت پروتئین این قطعات خالص سازی شده برابر ۱۸۷ می‌باشد. در روش متداول (روش Pope) که تمام پلاسما در معرض هضم با آنزیم قرار می‌گیرد بازده پادزهر دیفتری که از محصولات هضم جدا می‌شود ۴۵-۴۰٪ و نسبت IU در هر میلی‌گرم ازت پروتئین برابر با ۱۲۱ می‌باشد. مقایسه بین نتایج دو روش نشان می‌دهد که اولاً در مقادیر فعالیت‌ها افزایشی معادل ۵۰٪ وجود داشته است که این افزایش فعالیت حاکی از خالص‌سازی بهتر و بیشتر پادزهر دیفتری از پلاسمای حاوی آن می‌باشد و از طرفی دیگر علاوه بر خالص سازی بهتر بازدهی این روش به مراتب بهتر از روش متداول می‌باشد (جدول شماره ۲).

بحث

نمکها و ترکیبات آلی حلال در آب مانند سولفات آمونیم و اتانل تنها ترکیباتی نیستند که پروتئین‌های پلاسما را بدون تغییر ساختمان فضائی از یکدیگر جدا کنند بلکه پلی‌مرهای با وزن ملکولی بالا و محلول در آب نیز می‌توانند سبب جداسازی پروتئین‌های پلاسما شوند (۱۳ و ۷) در میان این پلی‌مرها پلی‌اتیلن گلیکول دارای گرانروی کمتر و مناسب‌ترین پلی‌مر جهت جداسازی پروتئین‌های پلاسما می‌باشند. پلی‌اتیلن گلیکول دارای وزنهای ملکولی متفاوت بوده و بهترین آنها جهت ترسیب پروتئین‌های پلاسما وزن ملکولی ۶۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ می‌باشد. در بررسی‌هائی که در مقایسه بین ترسیب پروتئین‌های پلاسما توسط سولفات آمونیوم (۶-۸) و پلی‌اتیلن گلیکول انجام شد به وضوح ارزش بالای پلی‌اتیلین گلیکول در جداسازی پروتئین‌های پلاسما مشخص شد. به طوریکه در جداسازی فیبرینوژن با غلظت ۵ درصد در یک مرحله تمام فیبرینوژن از پلاسما جدا شده بدون آنکه مقدار قابل توجهی از ایمنوگلبولین‌ها رسوب نمایند و در ترسیب ایمنوگلبولین‌ها نیز با دو مرحله ترسیب بیش از ۹۰ درصد ایمنوگلبولین‌ها رسوب کرده بدون آنکه اثری از آلبومین در آن دیده شود. این بازدهی به مراتب بیشتر از ترسیب گلبولین‌ها توسط سولفات آمونیم می‌باشد چراکه جداسازی ایمنوگلبولین توسط سولفات آمونیم نیاز به ۴ تا ۵ مرحله خالص‌سازی دارد با توجه به جداسازی ایمنوگلبولین‌ها توسط پلی‌اتیلن گلیکول بدون آنکه اثری از فیبرینوژن یا آلبومین در آن دیده شده باشد می‌توان گفت که این پلیمر رسوب دهنده‌ای مناسب برای جداسازی پروتئین‌های پلاسما با حلالیت‌های مختلف مانند ایمنوگلبولین‌ها و یا آلبومین می‌باشد. برای هضم ایمنوگلبولین‌ها جدا شده توسط پلی‌اتیلین گلیکول از پپسین پیوند خورده با آگاروز که به صورت نامحلول در آمده (۴) و مزیت آن نسبت به پپسین محلول آنست که تمام ملکولهای آنزیم بعد از عمل هضم به سادگی از مخلوط هضم جدا می‌شود و نیازی به درجه حرارت‌های بالا برای غیر فعال کردن آن نیست. همچنین نتایج به دست آمده حاکی از آن است که بیشترین پادزهر دیفتری با آنزیم فوق می‌تواند هضم شود. به طوریکه بازده قبل از عمل هضم و بعد از آن ۹۰ درصد می‌باشد، هضم پادزهر دیفتری توسط پپسین نامحلول موجب تشکیل قطعات $F(ab)_2$ همراه با قطعات FC می‌باشد (۱۷) که می‌توان قطعات FC را با غلظت ۱۱ درصد پلی‌اتیلن گلیکول از محلول به صورت رسوب جدا نموده خالص‌سازی قطعات $F(ab)_2$ را می‌توان توسط کروماتوگرافی با ژل سفادکس ۲۰۰ و یا توسط غلظت ۲۹ درصد پلی‌اتیلن گلیکول و سپس دیالیز در مقابل محلول ۱۰٪ نمک طعام انجام داد. قطعات $F(ab)_2$ به دست آمده در روش فوق دارای ۸۰ درصد فعالیت پادزهر دیفتری موجود در پلاسما و مقدار IU (International unit) در هر میلی‌گرم پروتئین برابر با ۱۸۷ می‌باشد در صورتیکه پادزهر جدا شده به روش ترسیب با سولفات آمونیم و پپسین محلول مقدار (روش Pope) IU در هر میلی‌گرم ازت پروتئین برابر با ۱۲۱ و بازدهی آن حدود ۴۰ درصد می‌باشد که مقایسه این مقادیر حاکی از ارزش روش پیشنهادی فوق است. جدول شماره ۲ از این روش در تصفیه سرمهای درمانی ناهمجنس ضدگزاز، ضد دیفتری، ضد مارگزیدگی و ضد عقرب‌گزیدگی نیز می‌توان استفاده نمود.

شمای شماره ۱- مراحل خالص‌سازی یادزهر دیفتری از پلاسمای اسبی حاوی یادزهر دیفتری



جدول شماره ۱- داده‌های مربوط به مراحل مختلف خالص‌سازی یادزهر دیفتری از پلاسما

	ازت پروتئین $\frac{mg}{ml}$	فعالیت یادزهر دیفتری $\frac{IU}{ml}$	$\frac{IU}{mg\ N.p}$	بازدهی
پلاسما	۱۲	۲۵۰	۲۱	۱۰۰
پلاسما دیفیبرینه	۱۱	۲۵۰	۲۷	۱۰۰
ترسیب مرحله اول	۲/۵	۲۴۴	۹۷	۹۷
ترسیب مرحله دوم	۲	۲۳۰	۱۱۸	۹۲
ترسیب مرحله اول بعد از هضم	۱/۳	۲۰۴	۱۵۶	۸۱
ترسیب‌مرحله‌دوم‌و خالص‌سازی	۸	۱۵۰۰	۱۸۷	۸۰

جدول شماره ۲- مقایسه درجه خلوص و بازدهی سرمهای ناهمجنس تهیه شده در دو روش پیشنهادی و متداول

	ازت پروتئین $\frac{mg}{ml}$	فعالیت یادزهر دیفتری $\frac{IU}{ml}$	$\frac{IU}{mg\ N.p}$	بازدهی
پلاسما	۱۲	۲۵۰	۲۱	۱۰۰
روش پیشنهادی	۸	۱۵۰۰	۱۸۷	۸۰
روش متداول	۱۶/۵	۲۰۰۰	۱۲۱	۴۰

منابع مورد استفاده

۱- میرشمسی، حسین، ۱۳۶۸. پیشگیری و درمان با واکسن و سرم، ص ۱۴۵-۱۰۵.

2- Anson M.L. and Mirsky A.E., 1933. Thestimation of pepsin wiht hemoglobin. J. gen. physioloj - 16, 59-63.

3- Baver. D., 1982. Clinical laboratory methods 1982. (494-469).

4- Berson J.H. and Wissler R.V., 1977. The use of agarose bound pepsin for the preparation of $F(ab)_2$ fragment of IgG immunochemistry 14 1977. 305-312.

5- Busdy T.F. and Inghan K.C., 1986. Separation of macromolecules by ultrafiltration removal of polyethylene glycol from human albumin, J.Biochem. Biochem. Biophys. Meth. 2 191-206.

6- Curling J.M., Breglof J., Linguist L.D., and Eriksson S.A., 1977. Chromatography jprocedure for the purification of the human plasma albumin, J.Vox sang 33 97-107.

7- Curling(ed) J.M., 1980. Methods of the plasma protein fractionation Academic press Newyork.

8- Gambal D., 1977. Simple rapid procedure for isolation serum albumin Biochem. Biophys. Acta 25 97-107.

9- Gradwohls Clinical Laboratory methods and diagnosis Volume on 1970, 41-42

10-Ibid Volume one 1970, 44-46.

11- Lbid volume one 1970. 97-107.

12- Longas M.O., Neman J., and Johnson A.J., 1980. An improved method for the purification of human fibrinogen int. J. Biochem. 11 9980. 559-565.

13- Polson A., Ptgilter G.M., Largier J.F., Mears G.E.F. and Joubert F.J., 1964. The fractionation of protein mixtures by liner polymers of high molecular weight Biochem. Biophys. Acta 82 463-475.

14- Pope C.G., 1938. Disaggreation of protein by enzymes Br. J. exp. Path. 19 245-251.

15- Pope C.G., 1933. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. Heat denaturation after partial enzyme action. Br. J. Br. J. exp. Path. 20 201-212.

16- Rose and Kridman, 1976. Manul of clinical immunology 453-455.

17- Sterberrg M. and Hershberger D., 1976. Separation of protein with polyacrylic acid biochem. Biophys. Acta 345. 195-206.

18- Tomono T., Suzuki T. and Tokunaga E., 1976. Cleavage of human serum immunoglobulin G by and immobolized pepsin preparation. Biochem. Biophys. Acta. 66 186-192.

19- W.H.O. manual per the production and control of vaccincs Diphteria toxoid 9.1978.