پالایش پلاسما

Plasma Fractionation

دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

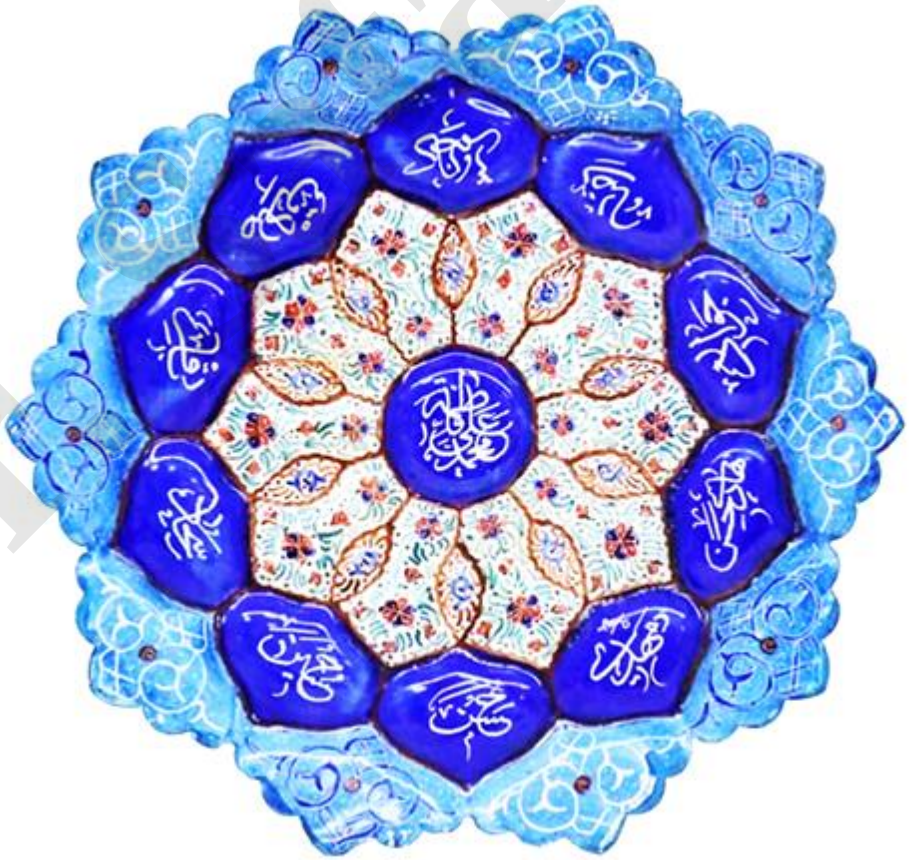
نویسنده، مشاور و مدرّسِ

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

۱۴۰۲

بهترین سلام‌ها و درودهای خداوند، فرشتگان، عرفا و صلحا

تقدیم به روح مطهر خواجه دو عالم، حضرت رسول اعظم (ص) و خاندان گرانقدرش (ع)



Dr Sari Fard

پالایش پلاسما

Plasma Fractionation

دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

Dr. Safari Fard

این کتاب به همت شبکه آموزشی "دنیای شکوفا" منتشر شده است.

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

www.shokofaworld.blogfa.com

www.shokofaonline.blogsky.com

09122137144

سوابق تدریس دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

نویسنده، مشاور و مدرّسِ

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

در بیش از ۱۰۰ دانشگاه، مرکز آموزش عالی، انستیتو، نهاد، سازمان، شرکت و موسسه آموزشی

- دانشگاه فرماندهی و ستاد (دافوس) ارتش جمهوری اسلامی‌ایران
- صنایع الکترونیک ایران (صاایران- وزارت دفاع)
- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- دانشگاه علوم پزشکی ایران
- مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران - دانشگاه علوم پزشکی تهران
- پژوهشکده ژن، سلول و بافت - دانشگاه علوم پزشکی تهران
- مرکز رشد بیوتکنولوژی دارویی- دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- واحد الکترونیکی دانشگاه آزاد اسلامی
- سازمان جهاد دانشگاهی
- مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
- مجتمع فولاد چادرملو- اردکان یزد
- شرکت فولاد غدیر ایرانیان چادرملو- اردکان یزد
- کارخانه گندله سازی سه چاهون- بافق یزد
- شرکت سرمایه گذاری دارویی تامین (تیپیکو)
- شرکت خودروسازی زامیاد

Dr. Safari Fard

- شرکت خودروسازی پارس خودرو
- شرکت خودروسازی سبلان خودرو مایوان (اردبیل)
- شرکت نفت ایرانول
- شرکت داروسازی دکتر عبیدی
- شرکت داروسازی ثامن- مشهد مقدس
- شرکت داروسازی شهید قاضی- تبریز
- شرکت داروسازی هلال ایران (سها)
- شرکت داروسازی فارابی – اصفهان
- شرکت داروسازی شفا
- شرکت داروسازی ابوریحان
- شرکت لابراتوارهای دارویی سینادارو
- شرکت داروسازی لقمان
- شرکت فرآورده‌های پویش دارو
- پارک فناوری سلامت پردیس
- گروه شفا فارمد (برکت)
- گروه شرکت‌های درمان یاب
- گروه صنعتی مینو
- گروه صنعتی مهر ابرار
- شرکت تولید مواد اولیه داروپخش (تماد)
- شرکت داروسازی اکتو ورکو - شهرک صنعتی بهارستان کرج
- شرکت داروسازی فارما شیمی
- شرکت داروسازی ایران هورمون
- شرکت داروسازی جابرابن حیان
- شرکت داروسازی توفیق دارو
- شرکت داروسازی رازک
- شرکت داروسازی شفا
- شرکت شیمی‌دارویی داروپخش
- شرکت داروسازی ارسطو- شهرک صنعتی کاوه، ساوه
- شرکت داروسازی آوه سینا- شهرک صنعتی کاوه، ساوه
- شرکت داروسازی اکسیر- بروجرد
- شرکت طبیب درمانِ پژوهش قلب- کاشان
- شرکت زیست فناوری کوثر- کرج

Dr. Safari Fard

- مجتمع صنایع دینه ایران- قزوین
- شرکت داروسازی آرین سلامت سینا- اشتهارد
- شرکت داروسازی پدیده شیمی‌جم- اشتهارد
- شرکت داروسازی هستی آریا شیمی– اشتهارد
- شرکت داروسازی واریان فارمد- اشتهارد
- شرکت طبیعت زنده (سینره)- اشتهارد
- شرکت داروسازی نشاط دارو - شهرک صنعتی مامونیه ساوه
- شرکت داروسازی سه‌دال نانو- شهرک صنعتی مامونیه ساوه
- شرکت داروسازی کوثر
- شرکت داروسازی فارما زند - محمد شهر کرج
- شرکت داروسازی آنی درمان - شهرک صنعتی بهارستان کرج
- شرکت میلان پارس فارمد- تبریز
- شرکت داروسازی رویان دارو- سمنان
- شرکت داروسازی مصون دارو- شهرک صنعتی سیمین دشت کرج
- شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس- شهرک صنعتی گلگون
- هیات امنای ارزی حمایت از معالجه بیماران
- شرکت توزیع داروپخش
- شرکت کارخانجات داروپخش
- شرکت داروسازی آفا شیمی
- شرکت پخش ممتاز
- شرکت رستاک طب پارسه
- شرکت فرآیند شیمی‌حکیم- شهرک‌های صنعتی قزوین، تاکستان
- شرکت داروسازی بهان سار – شهرک صنعتی کاوه، ساوه
- شرکت فناوری بن یاخته‌های رویان
- پژوهشگاه رویان
- بسیج جامعه پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
- کانون بسیج جامعه پزشکی سازمان انتقال خون ایران
- انجمن تولید کنندگان و صادرکنندگان تجهیزات و ملزومات پزشکی و دارویی
- انجمن علمی‌جراحان عمومی‌ایران
- انجمن پزشکان عمومی‌استان فارس
- انجمن تالاسمی‌ایران
- شرکت نوآوران سلامت ارژنگ

Dr. Safari Fard

- شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون
- شرکت پالایش خون
- ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران
- اداره کل انتقال خون استان تهران
- اداره کل انتقال خون استان خراسان رضوی
- اداره کل انتقال خون استان خراسان شمالی
- اداره کل انتقال خون استان سمنان
- اداره کل انتقال خون استان کهکیلویه و بویراحمد
- مرکز پلاسمافرزیس بیودارو
- مرکز پلاسمافرزیس داروپلاسما ایرانیان- قائمیه
- مرکز پلاسمافرزیس دایا آرین دارو - شهر ری
- مرکز پلاسمافرزیس خوارزمی- اسلام شهر
- موسسه آموزشی افق فارمد
- موسسه آموزشی نوآوران صنعت پویای پیشرو
- موسسه آموزشی آفاق صنعت
- موسسه آموزشی دانش پویان
- موسسه آموزشی تسهیلگران توسعه تفکر
- موسسه آموزشی فیدار دانش
- موسسه آموزشی معیار دانش - اصفهان
- موسسه آموزشی حامیان توسعه - اصفهان
- موسسه آموزشی کاوشگران راستین
- موسسه آموزشی نوین پارسیان - کرج
- موسسه آموزشی بهینه پرداز آرتا - قزوین
- آکادمی‌مدیریت دانش نوین
- مدیریت بهین آفرین رهیار - یزد
- مرکز آموزش و تحقیقات صنعتی ایران

Dr. Safari Fard

پالایش پلاسما

Dr. Saeidfard

دسترسی به خون و فرآورده های خونی ایمن و سالم، یک بخش مهم از درمان های نوین است. در سرتاسر دنیا، هر سال میلیون ها مورد زندگی توسط استفاده مناسب از فرآورده های خونی نجات پیدا کرده یا وضعیت سلامتی بیماران بهبود می یابد. به نظر می رسد که حداقل برای دهه های آینده، دسترسی مناسب به خون و یا فرآورده های مشتق از خون و پلاسما یک بخش مهم و اساسی از پزشکی و درمان باشد. دسترسی به مقادیر کافی به این فرآورده ها در هر کجا که نیاز وجود داشته باشد حق بیماران است.

خون و فرآورده های آن، دارویی حیاتی و شفا بخش برای برخی بیماران و مصدومان است. در حالات و شرایط متعدد، جهت حفظ سلامتی بیمار نیاز به استفاده از خون و یا فرآورده های آن وجود دارد. از جمله استفاده های فرآورده های خونی می توان به جراحی ها ، بیماری های خونی بالاخص بیماری های وراثتی خون نظیر تالاسمی و هموفیلی، سرطان های خون و شیمی درمانیِ آن ها، پیوند اعضاء، سوختگی های شدید، خونریزی های شدید و شوک های هموراژیک اشاره نمود.

تمام کاربرد ها و تاثیرات ذکر شده، بیانگر اهمیت و جایگاه قابل توجه خون و فرآورده های آن است. نظر به اینکه طی چند دهه اخیر مصرف خون کامل سیر نزولی و مصرف فرآورده های خونی سیر صعودی داشته است، امروزه حدود ۹۰٪ موارد انتقال بصورت فرآورده های مختلف خونی و کمتر از ۱۰٪ بصورت خون کامل می باشد. در این بین پلاسمای خون که خود در بردارنده ی طیف گسترده ای از فرآورده های خاص خونی است، دارای جایگاه ویژه ای می باشد. پیشرفت در شناخت کاربرد ها و فواید فراورده های مشتق از پلاسما، در انحصار بودن صنعت تولید فرآورده های پلاسمایی های در دست برخی کشورهای معدود که منجر به اهمیت راهبردی این نوع فن آوری گردیده و همچنین سود آوری بالای آن، جایگاه ویژه ای به این صنعت می بخشد.

پیشرفت های مهمی در زمینه تولید بیولوژیک مشتق از خون در پنجاه سال اخیر حاصل گردیده است. این پیشرفت از شناسایی اولیه در سیستم گروه خونی در سال ۱۹۲۰ آغاز و سپس در خلال بیست سال بتدریج شناسایی گروه های خونی دیگر میسر شد. در آن زمان تنها خون کامل، پلاسما و گلبول های قرمز به عنوان عامل درمانی برای بیماران مورد استفاده قرار می گرفت. ادوین کهن و همکارانش در زمینه فن آوری پالایشگاه پلاسما موثرترین گام ها را در دهه پنجاه میلادی برداشتند. در خلال دهه های اخیر این فن آوری پیچیده تر گردیده و اکنون طیف وسیعی از محصولات تولید می گردند.

هدف مراکز انتقال خون تولید محصولات مختلف پلاسمایی و مصرف اجزای مختلف و ضروری آن، جهت بیماران می باشد و بدین ترتیب از مصرف خون کامل پیشگیری می گردد. این امر عمدتا به دو دلیل می باشد. اول اینکه فرآورده های پلاسمایی در حجم کمتر می تواند قدرت اثر بالاتری داشته باشد و دوم اینکه فرآورده های پلاسمایی، دارای آلودگی بسیار کمتر از خون کامل بوده و مسئله سازگاری خونی در این محصولات کمتر و یا مطرح نمی باشد. امروزه فرآوردههای دارویی مشتق از پلاسما قسمت عمدهای از داروهای مورد مصرف انسان

را تشکیل می دهند و به نظر می‌رسد، علی رغم توسعه فن آوری زیستی و دسترسی به برخی از داروها از طریق روش‌های نو ترکیب، این روند همچنان ادامه خواهد داشت. احتمال دارد که در آینده تقاضا برای داروهای جدیدتر مثل ایمونوگلوبولین های اختصاصی آنتی ترومبین و چسب فیبرین نیز افزایش یابد.

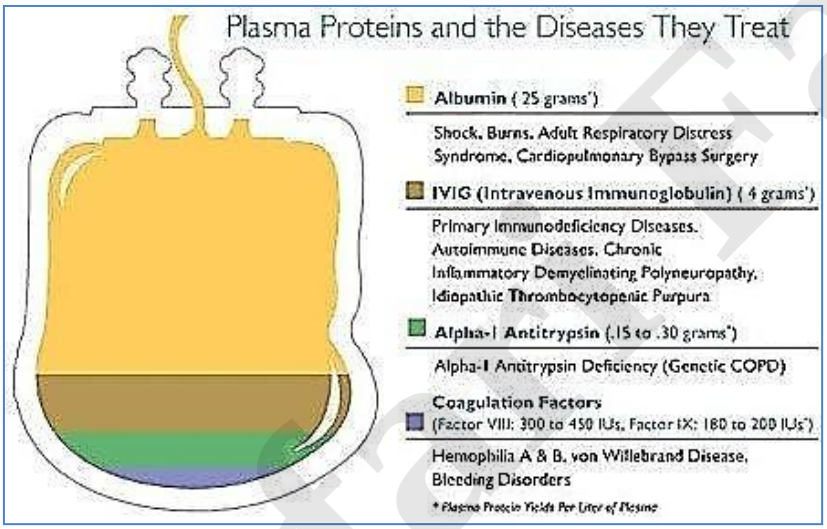
پلاسمای انسانی منبع مناسبی از پروتئین ها می باشد که خاصیت درمانی دارند ومی توانند توسط بیماران مورد استفاده قرار گیرند. به دلیل تنوع فراوان پروتئین ها، محصولات دارویی زیستی گوناگونی را می توان از پلاسمای خون تهیه نمود.

معروف ترین و متداول ترین آن ها که در بیشتر پالایشگاه های پلاسما تولید می گردند به شرح زیر است:

- **فاکتور هشت انعقادی انسانی:** به صورت پودر لیوفیلیزه تولید و نیاز بیماران هموفیلی نوع A را تامین می کند.
- **فاکتور نه انعقادی انسانی:** به صورت پودر لیوفیلیزه تهیه شده، نیاز بیماران هموفیلی نوع B را تامین می کند.
- **آلبومین انسانی:** مهمترین فعالیت فیزیولوژیک آلبومین، مشارکت در پایدار سازی فشار انکوتیک خون و حمل و انتقال مواد (هورمون‌ها، آنزیم‌ها، فرآورده‌های دارویی و سموم) می‌باشد. آلبومین در غلظت های مختلف تهیه و در بیماران قلبی و سوختگی ها و جهت ترمیم و حفظ حجم خون در گردش، در جایی که کمبود حجم ثابت شده است، مورد مصرف قرار می گیرد.
- **ایمونوگلوبولین های وسیع الطیف**
- **ایمونوگلوبولین های اختصاصی یا هیپر ایمیون**

Dr. Safari Fard

- **ایمونوگلوبولین تزریق وریدی نرمال (IVIG)**: محصول گاماگلوبولین وسیع الطیفی است که عمدتاً در بیماری های عفونی، درمان کمبود مادرزادی گاماگلوبولین و بیماری های خود ایمنی، درمان جایگزینی سندروم های نقص ایمنی اولیه و اکتسابی و در موارد کمک به افزایش توانایی سیستم ایمنی بدن مصرف می گردد.
- **فیبرینوژن و فیبرونکتین**
- **چسب فیبرین**



پالایش پلاسما به روش Cohn ابتداء برای به دست آوردن آلبومین طراحی شد که بعد از سال ها زمینه ساز ابداع روش صنعتی جدا سازی طیف وسیعی از محصولات مورد استفاده کلینیکی گردید. امروزه محصولات پروتئینی گوناگون و محصولات IgG هایپرایمیون را می توان از پالایش حجم بزرگی از پلاسما انسانی استحصال نمود.

سر و صدای تکنولوژی استفاده از پلاسما با حجم بالا از یک سو و بازرسی سخت گیرانه از سوی دیگر، این موضوع را می رساند که چرا این تکنولوژی به عنوان روش اصلی و هسته مرکزی در صنعت پلاسما باقی مانده است. در طی سال ها، این فن آوری پیچیدگی فزاینده ای پیدا کرده است و استفاده از روش های کروماتوگرافی بهبود کیفی و کمی تولیدات دارویی پروتئینی را ممکن ساخته است و شکل و شمایل پالایش، با معرفی تکنیک های ویروس زدایی در حین تولید ، همچون کروماتوگرافی و اولترافیلتراسیون تغییر یافته است.

نباید فراموش کرد که داروهای پروتئینی پلاسما گران قیمت بوده و در کشور های در حال توسعه به طور گسترده در دسترس نمی باشند. فاکتور هشت که به عنوان داروی پروتئینی عمده مورد نیاز در کشور های در حال توسعه می باشد در کشور های ثروتمند از نظر اقتصادی

Dr. Safari Fard

زیاد مورد توجه نمی باشد. کاهش استفاده از فاکتور هشت و یا نُه مشتق از پلاسما، در اقتصاد های توسعه یافته (که در آن ها بیماران هموفیلی داروهای نوترکیب مصرف می کنند)، باعث مازاد تولید آن ها در کشور های در حال توسعه می گردد، که از نظر اقتصادی مناسب نیست. این تغییر روش استفاده از محصولات نو ترکیب در کشور های غنی، می تواند باعث شود که کشور های فقیر از عهده هزینه های افزایش یافته محصولاتی که قبلاً توسط کشور های غنی برای آن ها یارانه پرداخت می شد، بر نیایند. به همین دلیل این موضوع حائز اهمیت می باشد که با ابداع تکنولوژی های تولید و ویروس زدایی قابل اجرا در کشور های در حال توسعه ، به این کشور ها اجازه داده شود تا از منابع پلاسمایی محلی خود در شرایط سالم استفاده کنند. [1]

خون چیست ؟

بافت مایع بدن را خون می نامند که بدلیل جریان داشتن در تمام بدن برعکس بافت های دیگر که دارای یک وظیفه خاص هستند، وظایف متعددی به عهده دارد. خون شامل دو بخش عمده است. بخش سلولی که شامل گلبول های قرمز، گلبول های سفید و پلاکت ها می باشد. بخش دیگر مایع پلاسما می باشد که به عنوان بستری برای حرکت سلول های زنده خون و حمل و جابجایی مواد مختلف (از جمله پروتئین ها، لیپیدها، گلوسیدها، املاح معدنی و سایر مواد موجود در خون) به بافت ها به شمار می رود.

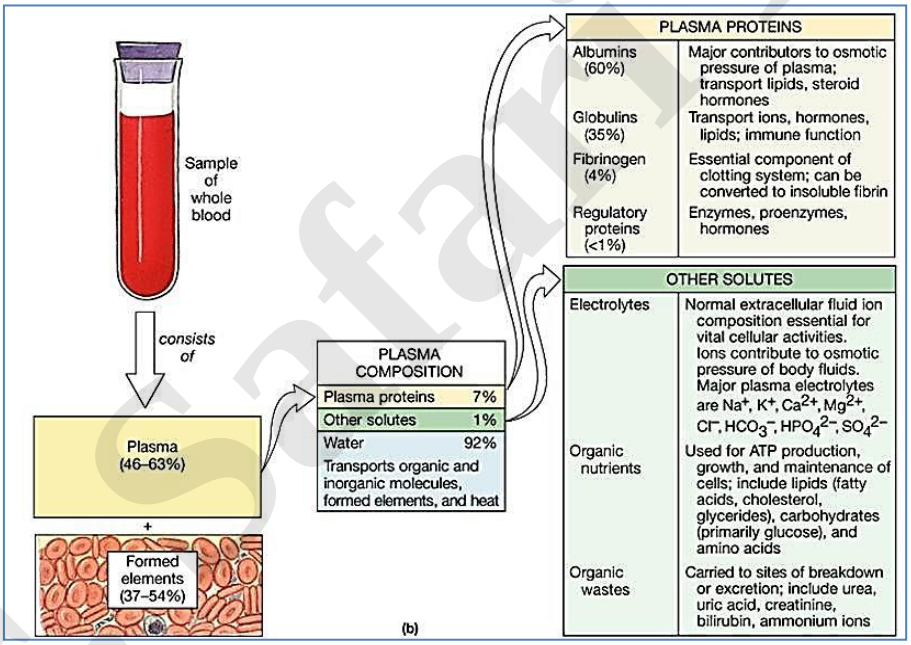
خون ۷ تا ۸ درصد وزن بدن را تشکیل می دهد و با جریان در رگ ها وظیفه مهم رساندن مواد مغذی مثل اکسیژن، گلوکز، ویتامین ها و الکترولیت ها به بافت های مختلف و حمل مواد زاید مثل دی اکسیدکربن، اسیدلاکتیک از بافت ها به اندام هایی که وظیفه دفع یا تبدیل آن ها را به عهده دارند، می باشد. وظیفه مهم دیگر خون تشخیص اجسام خارجی مانند باکتری ها و ویروس ها و دفاع از بدن در مقابل آن ها و از بین بردن آن ها می باشد

بنابراین خون یک بافت ثابت نیست بلکه یک مجموعه است و از دیدگاه پزشکی نیز یک دارو نیست بلکه یک کارخانه تولید دارو است. مصرف کننده خون (بیمار) در موارد بسیار استثنایی به کل خون نیازمند است و بیشتر به سلولی خاص یا پروتئینی با کاربری ویژه احتیاج دارد. در صورت تجویز خون کامل، شاید مشکل وی به نوعی حل گردد ولی مطمئناً به دلیل سرباری بیش از حد مواد و سلول های غیر لازم، مشکلات عدیده ای برای بیمار ایجاد خواهد شد. به همین دلیل در سازمان های انتقال خون های دنیا، بخشی به نام بخش تولید فرآورده های سلولی و پلاسمایی وجود دارد که سلول های زنده خون را از پلاسما جدا کرده و هر قسمت را مستقلاً برای مصرف آماده می نماید.

[1] Burnouf T, Goubran HA, Radosevich M, et al: A minipool process for solvent-detergent treatment of cryoprecipitate at blood centres using a disposable bag system. Vox Sang 91:56 - 62, 2006

پلاسما

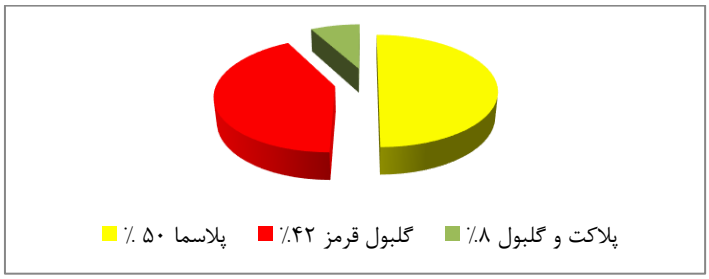
پلاسمای خون انسانی، مایعی است که سلول های خون در آن غوطه ور هستند. پلاسما ماده‌ای حیاتی و منحصر به فرد است که حاوی بیش از ۲۰۰ ترکیب بیوشیمیایی است که هنوز هم بسیاری از آن ها کاملا شناخته نشده اند. ۹۱ تا ۹۲٪ پلاسما را آب و ۶ تا ۸٪ آن را پروتئین ها تشکیل می دهد. پلاسما حاوی پروتئین های مهمی نظیر آلبومین، ایمونوگلوبولین های مختلف، فاکتورهای انعقادی و ضد انعقادی، پروتئازهای بازدارنده و فاکتورهای رشد می باشد. غلظت این مواد نیز طیف وسیعی را شامل می گردد که از ۴۰ g/L درمورد آلبومین تا ۱ Pg/L در مورد فاکتور رشد متغیر است. آلبومین مسئول فشار اسمزی کلوئیدی پلاسما است، ایمونوگلوبولین ها در برابر عفونت ها موثر بوده و فاکتورهای انعقادی در انعقاد خون نقش به سزایی دارند.



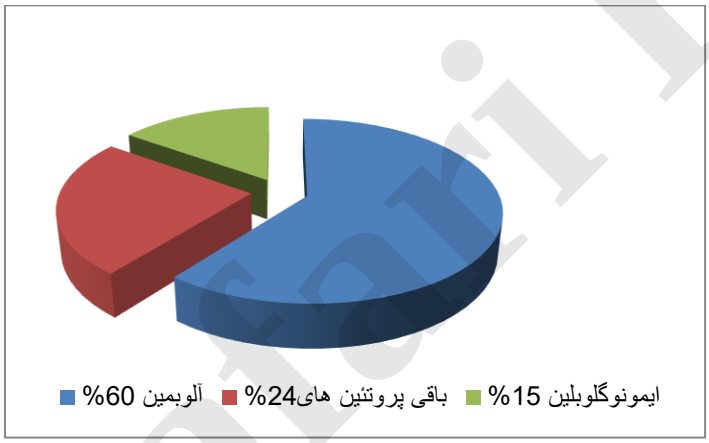
پلاسما حدودا ۵۰ درصد خون را تشکیل میدهد و از آب، الکترولیت ها، ویتامین ها، مواد مغذی و صدها ماده دیگر تشکیل شده است. پروتئین ها که حدود ۷ درصد پلاسما را می سازند و شامل انواع آنزیم ها، هورمون ها و آنتی بادی های مختلف و از مهمترین اجزا پلاسما هستند. هر یک از این پروتئین ها، نقش ویژه ای در فعالیت حیاتی بدن دارند. علاوه بر این ها، هر یک از این پروتئین ها ممکن است در تشخیص و درمان بیماری های مختلف مفید و قابل استفاده باشند. ساختمان و عملکرد تعدادی از این پروتئین ها شناخته شده است و

Dr. Safari Fard

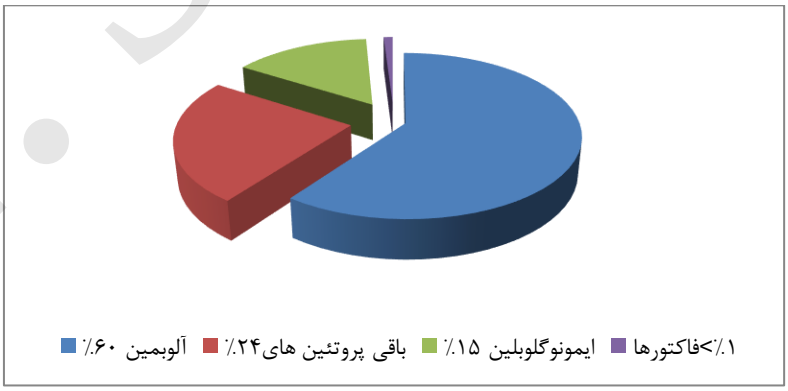
بسیاری از آن ها همچنان به عنوان موضوعات تحقیقاتی و احتمالاً کشف راه های جدید تشخیص و درمان بیماری ها و ساخت داروهای جدید مورد توجه هستند.



اجزای تشکیل دهنده خون



اجزای تشکیل دهنده پلاسما



پروتئین های تشکیل دهنده پلاسما

مزایای فرآورده های پلاسمایی

Dr. Safari Fard

۱- **کم شدن حجم دارو و بازدهی بیشتر:** برای مثال در بیماران هموفیلی به جای استفاده از چند لیترخون برای جلوگیری از خونریزی و جبران کمبود فاکتور ۸ انعقادی می توان از چند میلی لیتر فاکتور ۸ جداسازی شده استفاده کرد که مطمئناً بازدهی بیشتر و موثرتر خواهد داشت.

۲- **خالص سازی دارو:** بیمار، دارویی به مراتب خالص تر و عاری از سلول های خون و دیگر مواد غیر ضروری را دریافت می کند.

۳- **تبدیل شرایط اختصاصی دارو به شرایط عمومی:** مصرف خون کامل به رعایت شرایط کاملاً اختصاصی نیاز دارد مانند سازگاری گروه خون که نیازمند به آزمایش های پیچیده و وقت گیر است، ولی مصرف پروتئین های خالص مانند مصرف داروهای عمومی است و بیمار به راحتی می تواند در شرایطی غیر از مراکز درمانی نیز دارو را مصرف کند.

۴- **طولانی تر شدن عمر دارو:** وجود سلول های زنده در خون کامل اجباراً عمر نگه داری و مصرف آن را بسیار کاهش می دهد و با توجه به عمرسلول ها، حداکثربه چندروز می رسد ولی مدت زمان مصرف پروتئین ها حتی تا چندین سال نیز می تواند باشد.

۵- **نگه داری و حمل و نقل دارو**: نگه داری و حمل و نقل دارو های تهیه شده از پلاسما به دلیل ویژگی هایی چون: ظروف شیشه ای، لیوفیلیزه بودن، حجم کم و تحمل دما، به راحتی امکان پذیراست ونیاز به شرایط سخت نگه داری و حمل کیسه خون ندارد.

۶- **ایجاد تنوع دارویی:** در روش مرسوم مصرف خون کامل، چندین اهدا کننده در خدمت یک بیمار هستند ولی با جداسازی اجزاء پروتئینی آن، هریک جزءخونی می توانددرخدمت بیماری خاص قرارگیرد. بنابراین،خون یک اهداکننده می تواند نیاز چندین بیمار را برطرف نماید.

۷- **گسترش دارویی:** به جای استفاده از چندین کیسه خون در یک محل و برای یک بیمار، محصولات بدست آمده از مشتقات پلاسمایی خون می تواند در محل های مختلف با فاصله زمانی متفاوت در اختیار نیازمندان با مشکلات مختلف قرار گیرد.

تاریخچه صنعت پالایش پلاسما

Dr. Safari Fard

پیشرفت های مهمی در زمینه تولید بیولوژیک مشتق از خون از دهه های گذشته حاصل گردیده است. این پیشرفت از شناسایی اولیه در سیستم گروه خونی در سال ۱۹۲۰ آغاز و سپس در خلال بیست سال بتدریج شناسایی گروه های خونی دیگر میسر گردید. در آن زمان تنها خون کامل، پلاسما و گلبول های قرمز به عنوان عامل درمانی برای بیماران مورد استفاده قرار می گرفت.

هدف مراکز انتقال خون تولید محصولات مختلف پلاسمایی و مصرف اجزای مختلف و ضروری آن، جهت بیماران می باشد و بدین ترتیب از مصرف خون کامل پیشگیری می گردد. این امر عمدتا به دو دلیل می باشد. اول اینکه فرآورده های پلاسمایی در حجم کمتر می تواند قدرت اثر بالاتری داشته باشد و دوم اینکه فرآورده های پلاسمایی، دارای آلودگی بسیار کمتر از خون کامل بوده و مسئله سازگاری خونی در این محصولات کمتر و یا مطرح نمی باشد.

در قرن نوزدهم علاقه و توجه به قسمت مایع و آبکی خون به سرعت افزایش یافت. در آن موقع ثابت شده بود که این قسمت می تواند بعنوان منبع جدیدی از اجزایی باشد که قابل جداسازی هستند. در سال ۱۸۸۸، دانشمند آلمانی Hafmeissres مقالاتی در رابطه با رفتار ها و محلولیت پروتئین های خونی منتشر نمود. وی با استفاده از سولفات آمونیوم مشتقاتی که آلبومین و گلوبولین نامیده شدند، را جدا کرد. اصول تکنیک جداسازی وی که به نام جداسازی رسوبی precipitation-separation شناخته شده می شود، هنوز هم استفاده می شود.

ادوین کهن Edwin Cohn و همکارانش در زمینه فن آوری پالایشگاه پلاسما موثرترین گام ها را در دهه پنجاه میلادی برداشتند. در خلال دهه های اخیر این فنآوری پیچیده تر گردیده و اکنون طیف وسیعی از محصولات مانند فاکتورهای انعقادی، ایمونوگلوبولین ها و آلبومین تولید می گردند.

Dr. Safari Fard

ادوین کهن

پالایش پلاسمای انسانی از طریق فرآیند صنعتی، توسط E.J Cohn در دوران جنگ جهانی دوم ابداع شد[۲] و طی شصت سال گذشته، زمینه فعالیت بین المللی را فراهم آورد.[۳] در عملیات عصر حاضر پالایش پلاسما، از فرآیند پالایش Cohn استفاده می شود [۴] [۵] که در آن از عواملی مانند اثر pH، قدرت یونی و حلال آلی (پلاریته حلال)، برای حلالیت پروتئین ها بهره می گیرند[۶] [۷] تا مشتقات زیادی را به دست بیاورند.

Cohn در دانشگاه شیکاگو، به عنوان فیزیکو شیمیست آموزش دید و برای سال های طولانی یکی از اعضاء دپارتمان فیزیکوشیمی در دانشکده پزشکی هاروارد بود. Cohn از سال ۱۹۲۰ تا اواسط دهه ۱۹۳۰ مشغول تحقیق در موضوعات دیگر بود ولی هرگز از علاقه وی نسبت به پروتئین ها چیزی کم نشد. [۸] [۹] فرآیند پالایش Cohn، برای تولید آلبومین و نیز پروتئین های ارزشمند دیگر، مثل گلوبولین های سرم ایمن و چسب فیبرینی و فیلم فیبرینی همراه با ترومبین در سال ۱۹۴۵ مورد توجه قرارگرفت.[۱۰] در دوره جنگ جهانی دوم صنعت پالایش پلاسما، به تهیه آلبومین محدود شد. [۱۱] [۱۲] مشتقات پروتئینی پلاسما (PPF) در دهه ۱۹۵۰ به عنوان مکمل آلبومین

[2] Blood Program in World War II, ed. G.B. Kendrick, Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1964
[3] Curling, J. and Bryant, C., The plasma fractionation industry. New opportunities to move forward?, Bioprocess International, March, pps. 18-27, 2005
[4] Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Jr., et al., Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, J.Am.Chem.Soc. 68, 459-475, 1946.
[5] Cohn, E.J., The separation of blood into fractions of therapeutic value, Ann.Int.Med. 26, 341-352, 1947.
[6] Edsall, J. T., The development of the physical chemistry of proteins, 1898-1940, Ann.N.Y.Acad.Sci. 325, 52-74, 1979
[7] Hughes, W.L., Interstitual proteins: The proteins of blood plasma and lymph, in The Proteins, ed. H.Neurath and K. Bailey, Volume II, Part B., Chapter 21, pps. 663-754, Academic Press, New York, New York, USA, 1953.
[8] Cohn, E.J., Study on the physical chemistry of proteins I. The solubility of certain proteins at their isoelectric point, J.Gen.Physiol. 4, 697-722, 1922.
[9] . Cohn, E.J., McMeekin, T.L., Edsall, J.T., and Weare, J.H., Studies on the physical chemistry of amino acids, peptides and related substances II. The solubility of a-amino acids in water and alcohol-water mixtures, J.Am.Chem.Soc. 56, 2270-2282, 1934
[10] Anon, Byproducts of plasma fractionation. General consideration, in Blood Programs in World War II, ed. G.B. Kendrick, Chapter 13, pps. 350-369, Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1964.
[11] Palmer, J.W., The evolution of large-scale human plasma fractionation in the United States, in Proceedings of the Workshop on Albumin, February 12-13, 1975, DHEW Publication No. (NIH) 76-925. pps. 255-268, U.S.Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1975.
[12] Finlayson, J.S., Therapeutic plasma fractions and plasma fractionation, Sem.Thromb.Hemost. 6, 1-11, 1979

Dr. Safari Fard

ابداع گردیدند [۱۳] در این دوران کار محدودی در خصوص تهیه فاکتور هشت و ایمونوگلوبولین داخل عضلانی وجود داشت. [۱۴ ۱۵] آلبومین تا دهه ۱۹۶۰ برای پالایش پلاسما یک محصول اقتصادی بود، تا وقتی که فاکتور هشت با خلوص متوسط به عنوان یک مشتق اقتصادی از پالایش پلاسما جهت درمان هموفیلی ابداع گردید. تولید فاکتور هشت به روش نوترکیب در دهه ۱۹۸۰ همراه با ایمونوگلوبولین داخل وریدی باعث شد که این محصول از نظر اقتصادی جایگزین فاکتور هشت گردد. [۱۶]

محصولات دیگر مشتق از پلاسما که در دهه ۱۹۷۰ ابداع شد شامل کمپلکس پروترومبین بود که توسط فاکتور نه حاصل از پلاسما و یا به صورت نوترکیب جایگزین شد. محصولات فاکتور هفت فعال در ترکیب ترکیب جایگزین کمپلکس پروترومبین در بیماری های کبدی کاربرد دارند.

محرک اولیه حرکت به سمت پالایش پلاسما، آلبومین سرم انسانی(HAS) بود که بوسیله پالایش اتانول پلاسما بدست می آمد و در مقادیر کافی به عنوان افزایش دهنده حجم پلاسما در جبهه های جنگ جهانی دوم مورد استفاده قرار می گرفت. ادوین کهن از Charles Janeway درخواست کرد تا ترکیبات پلاسما را در محل آزمایشگاه آزمایش کند. شرکت Armour در شیکاگو، به تصور تولید آلبومین ارزان و پایان ناپذیر از منبع حیوانی، در صدد تولید سرم آلبومین گاوی (BSA) خالص از پلاسمای گاو بود. بیمارانی کهBSA دریافت نمودند دچار بیماری شدید سرم (serum sickness) شدند که این کار باعث توقف ناگهانی آزمایش های بالینی بیشتر روی BSA شد. در این میانJaneway در جولای ۱۹۴۱، چند ماه بعد از شکست آزمایش های بالینی با BSA ،آلبومین سرم انسانی (HAS) را به ۸ بیمار در حال شوک و ۳ دانشجوی پزشکی که عمدا" تا سر حد شوک دچار خونریزی شده بودند ، تزریق نمود. شماره سپتامبر مجله پزشکی New England، نتایج عالی را با HSA منتشر کرد و در گزارشی آینده بزرگی را برای روش پالایش Cohn جهت قربانیان جنگ پیش بینی نمود. روش پالایش پلاسما به زودی یک روش معتبر برای تولیدHSA در دنیا شد و توجه بسیاری را در سراسر جهان جلب نمود.

[13] Hink,J.H., Jr., Hidalgo, J., Seeberg, V.P., and Johnson, F.F., Preparation and properties of heat-treated plasma protein fraction, Vox.Sang. 2, 174-178, 1957.
[14] Janaway, C.A., Rosen, E.S., Merler, E., and Alper, C.A., The Gamma Globulins, Little, Brown, Boston, Massachusetts, 1966.
[15] Soulier, J.-P., Gobbi, F., and Larrieu, M.J., Séparation du fibrinogène et du facteur antihemophilique A, Rev.Hémat. 2, 481-496, 1957.
[16] Curling, J. and Bryant, C., The plasma fractionation industry. New opportunities to move forward?, Bioprocess International, March, pps. 18-27, 2005.

Dr. Safari Fard

تزریق آلبومین به مجروح جنگی، جنگ جهانی دوم

بزودی بهینه سازی روش Cohn توسط Kistler و Nitschmann استاندارد گردید. Kistler یک بیوشیمیست درکارخانه اصلی آزمایشگاه مرکزی صلیب سرخ سوئیس بود که بهترین شرایطی را که در آن بهترین محصول بدست می آید را بررسی می کرد و Nitschsmann کرسی بیوشیمی را در دانشگاه Bern در اختیار داشت.

بعد از جنگ، پیشرفت های جدیدی حاصل شد. در سال ۱۹۶۴ Judith pool آمریکایی به طور تصادفی کشف کرد که اگر پلاسمای منجمد شده، به آرامی در درجه حرارت بالای نقطه انجماد ذوب شود، رسوبی حاصل می گردد که شامل مقدار زیادی فاکتور انعقادی ۸ می باشد. کشف "cryoprecipitate" به مفهوم بدست آوردن فاکتور ۸ انعقادی و پیشرفتی برای درمان بیماران با بیماری های انعقادی خون و هموفیلی بود.

همانطور که ذکر شد در اوایل دهه ۱۹۴۰ میلادی، دکتر ادوین کهن روند پالایش پلاسما را در ایالت بوستون کشف کرد.[۱۷] بعد از شناخت موثر بودن و ایمنی آلبومین و این که می توان آن را در مقادیر فراوان تولید نمود، مراکز متعددی جهت پالایش پلاسما در ایالات متحده تاسیس گردید.

[17] . Surgenor David, Edwin J. Cohn, and the Development of Protein Chemistry, Harvard University Press 2002

Dr. Safari Fard

شرکت های دارو سازی آمریکایی که در سالیان ابتدایی صنعت پالایش دخالت داشتند عبارت بودند از:

- Parke Davis که در لس آنجلس تاسیس گردید و اکنون به نام Grifols فعالیت دارد.
- Armour که در نزدیک شیگاگو واقع بود و اکنون به نام CSL Behring فعالیت دارد.
- Cutter در برکلی
- Cutter در لس آنجلس
- Baxter در گلن دال نزدیک لس آنجلس

همچنین برخی موسسات عمومی (غیر خصوصی)، مانند آزمایشگاه بیولوژی میشیگان، مراکزی را بنیاد نهادند تا پلاسمای انسانی را پالایش کنند.

در اروپا مراکز پالایشگاهی در کشورهای مختلف تاسیس گردیدند:[۱۸]

- Behringwerke در آلمان (بخشی از کمپانی دارویی Hoechst)
- Sclavo،Farma Biagini در ایتالیا
- Centre National de Transfusion Sanguine and Institut Merieux در فرانسه
- Grifols در اسپانیا
- Swiss Red Cross Blood Transfusion Service در سویس

در ژاپن شرکت تعاونیGreen Cross اولین مرکز پالایش پلاسما را در آسیا بنیاد کرد.[۱۹]

این مراکز، تولید آلبومین و فرآورده های ایمونوگلوبولین وسیع الطیف (نرمال) و نیز ایمونوگلوبولین های اختصاصی مانند ایمونوگلوبولین ضد کزاز، ایمونوگلوبولین ضد هپاتیت B، ایمونوگلوبولین ضد هاری و سایر ایمونوگلوبولین ها را آغاز کردند. ایمونوگلوبولین Rho(D) در اواخر دهه ۱۹۶۰به همراه فاکتورهای انعقادی VIII و IX عرضه شدند.

پایان جنگ جهانی دوم منجر به تخریب زیرساخت های صنعت پالایش پلاسما شد که طی جنگ بوجود آمده بودند. شرکت های خصوصی منطقه ای که در طی جنگ در گیر پالایش پلاسما بودند به کار خود ادامه دادند و طی ۵۰ سال گذشته، تعدادی از این شرکت های

[18] Starr, Douglas, Blood, an Epic History of Medicine and Commerce, Alfred Knopf, New York, 1999
[19] The Plasma Fractions Market in Japan 2009, in The Plasma Fractions Market in Asia & Pacific – 2009, The Marketing Research Bureau, Orange, Connecticut, 2011

Dr. Safari Fard

خصوصی درگیر پالایش پلاسمای تجاری شدند که عبارتند از CSL در استرالیا، (Probitas) Grifols، Immuno، Octafarmaو Behring در اروپا و Hyland، Cutter، Armour و غیره در ایالات متحده امریکا. همچنین ، فعالیت هایی به صورت پالایش ملی صورت گرفت که به تضمین خودکفایی در خون و فرآورده های خونی کمک می کرد [۲۰] [۲۱] [۲۲]

پالایش پلاسما علی رغم گذشت دهه ها از تولدش، ارتباط خود را برای اقدامات درمانی از دست نداده است. دنیای وسیعی از پروتئین های پلاسمایی مفید برای بیماران وجود دارد. با پیشرفت در قدرت پیشگوئی کننده شاخص های بیوشیمیائی که در آزمایشگاه های پزشکی جهت مشخص کردن التهاب ها، اختلالات ایمنی، اکسیژن رسانی ناقص بافتی و تغییرات در غدد داخلی اندازه گیری می شوند، بیشتر بیماران به مرحله ای از بیماری می رسند که تجویز پروتئین های استخراج شده از اهدا کننده های انسانی سالم، ممکن است باعث ادامه حیات آن ها شده و کیفیت زندگی را بهبود ببخشد.

در زمینه تولید داروهای بیولوژیک، پالایش پلاسما نیازمند توان علمی بسیار بالایی است. ارتقاء سطح دانش و نحوه کاربرد صحیح فن‌آوری آزمایش‌های حساس در تشخیص شاخص‌های آلودگی در پلاسمای اولیه لازمه تولید فرآورده‌های پلاسمایی سالم است. بعلاوه این صنعت نیاز مبرم به انتخاب دقیق فن‌آوری‌های تخلیص پروتیین‌های پلاسما و روش‌های ویروس‌زدایی دارد به نحوی که خواص فیزیولوژیکی و اثرات بالینی این پروتیین‌ها تغییر نکند.

تولید و ساخت این محصولات باید با دقت فراوان و در شرایط محیطی بسیار تمیز انجام گردد. ساخت فرآورده‌های پلاسما به روش های تولیدی پیچیده و چند مرحله‌ای نیاز دارد که شامل رسوب گیری، سانتریفوژ کردن، تخلیص به روش کروماتوگرافی، غیرفعال کردن و جداسازی ویروس‌ها، فیلتراسیون، اولترافیلتراسیون، تقسیم در ظروف مناسب در شرایط عاری از آلودگی و لیوفیلیزاسیون می‌باشد.

علاوه بر این، برخلاف بسیاری از تولیدات تزریقی، فرآورده‌های پلاسما را نمی‌توان در شکل نهایی دارو مثلاً با بکارگیری اتوکلاو استریل نمود بنابراین فرآیند تولید علاوه بر شرایط بسیار تمیز به استفاده صحیح از مراحل فیلتراسیون نیاز دارد تا از عدم آلودگی و پیدایش مواد تب زا ناشی از آندوتوکسین‌ها اطمینان حاصل گردد. بطور کلی در صنعت داروسازی، پالایش پلاسما دارای جدی ترین مقررات و استانداردهای تولید می‌باشد و بهمین دلیل پالایش پلاسما برای کشورهایی که قصد بکارگیری صنعت بیوتکنولوژی را دارند بعنوان اولین قدم تجربه‌ای مناسب خواهد بود.

[20] Farrugia, A., International movement of plasma and plasma contracting, Dev.Biol.(Basal), 120, 85-96, 2005.
[21] Farrugia, A., Evers, T., Falcon, P.-F., et al., Plasma fractionation issues, Biologicals 37, 88-93, 2009.
[22] Cheraghali, A.M. and Abolghasemi, H., Improving availability and affordability of plasma-derived medicines, Biologicals 38, 81-86, 2010.

در دهه‌های اخیر محققین و متخصصین در پالایشگاه ها توانسته‌اند به پیشرفت‌های مهمی در زمینه فرآیندهای جداسازی و تخلیص پلاسما نائل آیند که منجر به افزایش قابل توجه در بازدهی (yield) تولید، ایمنی داروها از نظر عفونت‌های ویروسی و همچنین درجه خلوص شده است. این پیشرفت‌ها حاصل پردازش روش‌های معمول پالایش با الکل و افزودن مراحل کروماتوگرافی اختصاصی است که نتیجه آن تهیه تولیدات درمانی جدید با درجه خلوص بالاتر بوده است. حاصل این پیشرفت‌ها استفاده بهتر و منطقی تر از پلاسمای انسانی و همچنین بهبود صرفه اقتصادی صنعت پالایش بوده است.

چرا روش قدیمی پالایش پلاسما به روش کهن تا بدین مدت معتبر مانده که هنوز روش غالب جهت تولید مشتقات پلاسما می باشد؟ امروزه در معیار آزمایشگاهی، بیوشیمیست ها روش های دقیق تر تخلیص پروتئین را مانند ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی های تعویض یونی، جذب میل ترکیبی، جذب ایمنی و امثال آن، مورد استفاده قرار می دهند. پاسخ این است که هیچ کدام از این روش های آزمایشگاهی الزامات فرایند قابل تکثیر بالک (عمده) را در مقادیر صنعتی ندارند. گذشته از این، نیاز جهانی برایIVIG ۵۰ تن تخمین زده می شود. در ضمن، مراحل ویروس زدائی که یکدیگر را در حالت فعالیتشان تکمیل می کنند، یکی از آن هائی که بصورت ایمن ویروس های پوشش دار را خارج می کنند، نمی تواند در ستون های شستشوی(elution) بزرگ انجام شود. به این دلیل است که پالایش پلاسما به روش کهن در مقیاس بزرگ هنوز مورد استفاده است و مقادیر پائین آن در آزمایشگاه های تحقیقاتی، که به آن ها به عنوان کارخانه های اصلی اشاره شده است ، به حد عالی رسیده است.

Dr. Safari Fard

همانطور که ذکر شد استخراج آلبومین به عنوان جایگزینی برای پلاسما در مجروحان جنگی توسط Cohn ابداع و به عنوان دارو در سال ۱۹۴۱ثبت شد و تا سال ۱۹۶۴ که روش کریوپرسی پیتیت (Cryoprecipitate) توسط جودیت گراهام پول ارایه شد آلبومین مهمترین داروی استخراجی از پلاسما بود. پس از این تاریخ با امکان استخراج ارزان تر فاکتورهای انعقادی، این داروها از جایگاه با ارزشی نزد پزشکان برخوردار شدند. در سال ۱۹۴۳IgG (ایمونوگلوبولین) برای تزریق عضلانی ثبت شد و در درمان هپاتیت C به کار رفت.IgG برای تزریق وریدی (IVIG) در سال ۱۹۸۱ به ثبت رسید و با شناسایی اثرات آن در درمان بیماری ها مصرف آن افزایش یافت و اکنون مهمترین داروی حاصل از پلاسما است و همچنان کاربرد، تولید و مصرف آن رو به افزایش است. ایمونوگلوبولین Rho(D) در اوخر دهه ۱۹۶۰ به همراه فاکتورهای انعقادی VIII و IX عرضه شدند.

بعد از شناخت موثر بودن و ایمنی آلبومین و این که می توان آن را در مقادیر فراوان تولید نمود، مراکز متعددی جهت پالایش پلاسما در ایالات متحده امریکا تاسیس گردید. این مراکز، تولید آلبومین و فرآورده های ایمونوگلوبولین وسیع الطیف (نرمال) و نیز ایمونوگلوبولین های اختصاصی مانند ایمونوگلوبولین ضد کزاز ، ایمونوگلوبولین ضد هپاتیت B ، ایمونوگلوبولین ضد هاری و سایر ایمونوگلوبولین ها را آغاز کردند.

Dr. Safari Fard

تامین پلاسما

در سالیان آغازین این صنعت ، صلیب سرخ و سایر مراکز انتقال خون غیر انتفاعی تامین پلاسما را بر عهده داشتند، اما با گسترش تدریجی مراکز پالایش پلاسما، این موسسات قادر به تامین کافی پلاسمای مورد نیاز نبودند. در نتیجه تمرکز بخش تجاری بر روی جمع آوری پلاسما برای پالایش قرار گرفت و تعداد زیادی سازمان های خصوصی جمع آوری پلاسما در ایالات متحده تاسیس شد. این بخش به دلیل این که در ایالات متحده اهدای پلاسما دو بار در هفته (با فاصله دو روز) برای هر فرد مجاز است و میزان سالیانه ی پلاسمای جمع آوری شده در حدود ۶۵ لیتر می باشد بسیار رشد کرد، این در حالی است که در بیشتر کشورها به دلیل قوانین نظارتی این میزان حداکثر ۱۵ تا ۱۸ لیتر پلاسما در طی یک سال است.

تا اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی، پلاسمای جمع آوری شده در کیسه ها با روند سانتریفیوژ از خون کامل جدا می شد. با معرفی ماشین های خودکار پلاسما فرزیس در دهه ۱۹۸۰ ایمنی و موثر بودن روند اهدا افزایش یافت. پلاسمای جمع آوری شده در این مراکز (پلاسما ی جمع آوری شده به روش پلاسما فرزیس) به نام پلاسمای منبع(source) شناخته می شود و پلاسمای بدست آمده از خون کامل، به نام پلاسمای بازیابی شده (Recovered Plasma) معروف است.

پلاسمای بازیابی شده، ذخیره ی استفاده نشده از داروهای حیات بخش

در مرکز جمع آوری خون، اولویت به تامین مقادیر کافی از اجزای ناپایدار خون، به ویژه گلبول های قرمز و پلاکت ها، داده می شود و پلاسما اهمیت کمتری دارد. با این وجود، پلاسمای بازیابی شده، منبع خوبی از پلاسما برای تولید پروتئین های درمانی است. هر چند که در برخی موارد شاید بهترین نباشد.

در تعدادی از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه، مراکز خون بر روی بیمارستان ها تمرکز دارند که اجزای خونی ناپایدار تامین شود و از پلاسما، غفلت شود. نیاز برای گلبول های قرمز و پلاکت ها سبب می شود که مراکز خون، یک تعداد مشخص از واحد های خونی را برای پوشش دادن بیمارستان ها جمع آوری کنند. مقدار واحدهای خون کامل جمع آوری شده طوری است که به طور متداول مقداری

Dr.Safari Fard

پلاسما که بیشتر به صورت پلاسمای منجمد تازه (FFP) است، به صورت استفاده نشده باقی بماند. تعدادی از واحدهای پلاسمای تازه منجمد برای درمان بیماران مبتلا به بیماری های انعقادی و سایر بیماری ها تحویل بیمارستان ها می گردد، اما پلاسمای مازاد انبار شده و در آخر معدوم می شود. این پلاسما می تواند به مرکز پالایش، خواه بومی و خواه خارجی، ارسال شده تا داروهای مشتق از پلاسمای حیات بخش تولید گردد.

از یک لیتر پلاسما، خواه پلاسمای منبع و خواه پلاسمای بازیابی شده، مراکز پالایشگاهی به طور معمول این بازده تولیدی را دارند: [۲۳]

- ۲۵ تا ۲۸ گرم آلبومین
- ۱۵۰ تا ۲۰۰ واحد بین المللی فاکتور VIII (احتمالا در مورد پلاسمای منبع، بازده بیشتر است زیرا به سرعت بعد از جمع آوری منجمد می گردد)
- ۲۵۰ تا ۳۰۰ واحد بین المللی فاکتورIX
- ۳ تا ۵ گرم ایمونوگلوبولین تزریق داخل وریدی (احتمالا در پلاسمای بازیابی شده، بازده بیشتر است)
- ۲۵۰ واحد بین المللی آنتی ترومبین III
- ۰,۲۰ گرم آلفا- یک آنتی تریپسین

خون در مراکز معتبر خون‌گیری جمع‌آوری می شود و سپس پلاسمای آن جهت استفاده در پالایش جداسازی می‌گردد و ترجیحاً در مدت ۶ ساعت بعد از اهدا در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد و کمتر منجمد می شود . تحت هیچ شرایطی زمان انجماد بیشتر از ۲۴ ساعت پس از اهدا نمی‌باشد.

در برخی نقاط دنیا، به ویژه در کشورهای دارای اقتصادهای نو ظهور، استانداردهای جمع آوری پلاسما مطابق با الزامات مورد نظر پالایشگاه ها نیست. همانطور که این مراکز تحت فشار هستند که قوانین سخت گیرانه و مقررات در مورد کیفیت فعالیت هایشان، به ویژه در مورد کیفیت مواد خام را رعایت کنند و از آن ها پیروی نمایند، پالایشگاه ها هم باید در مورد پلاسمای مورد استفاده خیلی دقت به خرج داده و انتخابی عمل کنند. برای مثال طبق قوانین نظارتی اروپا در حوزه سلامت[۲۴] پلاسمای انبوه شده (plasma pool) برای پالایش باید در مورد HIV ، هپاتیت A، B، C و نیز پارو ویروس B19 مورد آزمایش قرار گیرد. خون جمع آوری شده در بیشتر مراکز در سرتاسر دنیا اغلب قادر به مطابقت با این مقررات نیست و سبب می شود که مقداری از پلاسمای بازیابی شده قابل استفاده نباشد. سایر مشکلات در مورد حمل و نقل و پشتیبانی است که شامل ذخیره سازی پلاسما و حمل آن به مرکز پالایش کننده است.

[23] Plasma Proteins Manufacturing, Plasma Proteins Therapeutics Association (PPTA), www ppta org. Washington DC, 2008
[24] Control Authority Batch Release of Vaccines and Blood Products, European Union's Administrative Procedure for Official Authority Batch Release, European Directorate for the Quality of Medicine and HealthCare, Council of Europe, Strasbourg, 2010

این موانع و مشکلات غیر قابل حل نیستند، همان طور که پالایش قراردادی ما بین شرکت ها خصوصی یا عمومی پالایش کننده و مراکز انتقال خون در برزیل، ایران، هنگ کنگ، سنگاپور، تایوان، تونس و کشورهای دیگر موید این امر است. این مستلزم آن است که مراکز خون، استانداردهای جمع آوری خود را ارتقاء دهند که خود تلاشی ارزشمند در زمینه استفاده بالینی و تجاری از پلاسمای بازیابی شده است. همچنین این موضوع به اهدا کنندگان نیز ارتباط دارد و به آن ها اطمینان می دهد که ماده گران بهای اهدایی آن ها به طور کامل مورد استفاده قرار می گیرد و هیچ جزء آن دور ریخته نمی شود.

در کلمبیا کشوری که استانداردهای جمع آوری خون در بین کشورهای منطقه خود در بالاترین جایگاه قرار دارد، تقریبا دو سوم پلاسمای بازیابی شده مورد استفاده قرار نمی گیرد. این مقدار نزدیک به ۹۰۰۰۰ لیتر پلاسما در هر سال است که ارزش مادی آن نقریبا ۱۲ میلیون دلار می باشد. پالایش این مقدار پلاسما می تواند بیش از ۲۴ میلیون دلار عاید این کشور کند. [۲۵]

برقراری ارتباط نزدیک و مناسب بین مراکز جمع‌آوری پلاسما و مرکز پالایش پلاسما اهمیت به‌سزایی در کیفیت محصول دارد. در واقع پالایشگاه پلاسما باید کاملاً در ارتباط با سازمان انتقال خون باشد تا بتوان هماهنگی لازم را ایجاد کرد. مراکز جمع‌آوری پلاسما مسئول بسیج و انتخاب اهدا کنندگان مناسب و همچنین آزمایش‌های غربال گری دقیق و قابل اعتماد می‌باشد، از طرفی پالایشگاه پلاسما مسئول بازبینی و بازرسی از مراکز جمع‌آوری پلاسما جهت اطمینان از کیفیت مناسب پلاسما است.

پلاسمای حاصل از پلاسمافرزیس، پلاسمای منبع

[25] Separación en Componentes, Componentes transfundidos, y Descarte de Componentes 2009, Cuadros VIII-X, Coordinacion Nacional de Sangre, Instituto Nacional de Salud, Bogota, 2010, p. 13-15

Dr. Safari Fard

در مراکزی که مشتقات پلاسمایی جزئی از صنعت دارویی می‌باشد، ماده اولیه یا پلاسمای مصرفی (تحت عنوان پلاسمای Plasma Source) از طریق پلاسمافرزیز بدست می‌آید که در مقایسه با روش تامین پلاسما از اهدا کنندگان خون، مقادیر بسیار بیشتری از پلاسما حاصل می شود. جمع‌آوری پلاسما از اهداکنندگانی است که معمولاً به آن ها مبالغی تحت عنوان هزینه پرداخت می شود. دراین روش با فرض دسترسی به اهداکنندگان دارای شرایط جسمانی و تغذیه مناسب که بتوانند پلاسمای خود را هر دوهفته یک‌بار اهدا نمایند، حدوداً یک اهداکننده برای تولید ۱۰ کیلوگرم پلاسما به ازاء هر نفر از جمعیت کافی خواهدبود.

هر دوی پلاسمای بازیابی شده و آفرزیس برای تولید صنعتی کلیه محصولات پلاسمایی مناسب هستند. میزان فاکتورهای انعقادی، به ویژه فاکتور هشت در پلاسمای بازیابی شده به دلایل الف) زمان طولانی قبل از فریز کردن صرف عملیات می شود (خون کامل بایستی طی عملیاتی به سلول های خونی و پلاسما جداسازی شود)، ب) نسبت بالای ضد انعقاد و ج) میزان زیاد آلودگی سلولی که ممکن است آنزیم های پروتئولیتیک تاثیر گذار بر پایداری فاکتور های انعقادی آزاد کنند، کمتر از پلاسمای آفرزیس است.

پلاسمای آفرزیس زمانی که از اهدا کنندگان مختلف جمع آوری می شود، حاوی مقدار کمی ایمونوگلوبولین (IgG) می باشد. ظاهراً سیستم آفرزیس مورد استفاده بر ترکیب های پروتئین و کیفیت پروتئین های پالایش شده تاثیر نمی گذارد، اگر چه میزان سلول باقی مانده بر اساس وسیله جدا کننده متغیر است.[۲۶]

صنعت پالایش پلاسما در آمریکا به صورت تجاری بیشتر بر اساس استفاده از پلاسمای حاصل از پلاسمافرزیس است. درکشور چین هم صنعت پالایش پلاسما بر پایه source plasma بنا شده است ولی آن ها در حال بسیج اهداکنندگان به صورت داوطلبانه می‌باشند. با این

[26] Burnouf T, Kappelsberger C, Frank K, et al: Residual cell content in plasma from 3 centrifugal apheresis procedures.Transfusion 11:1522 - 1526, 2003

Dr. Safari Fard

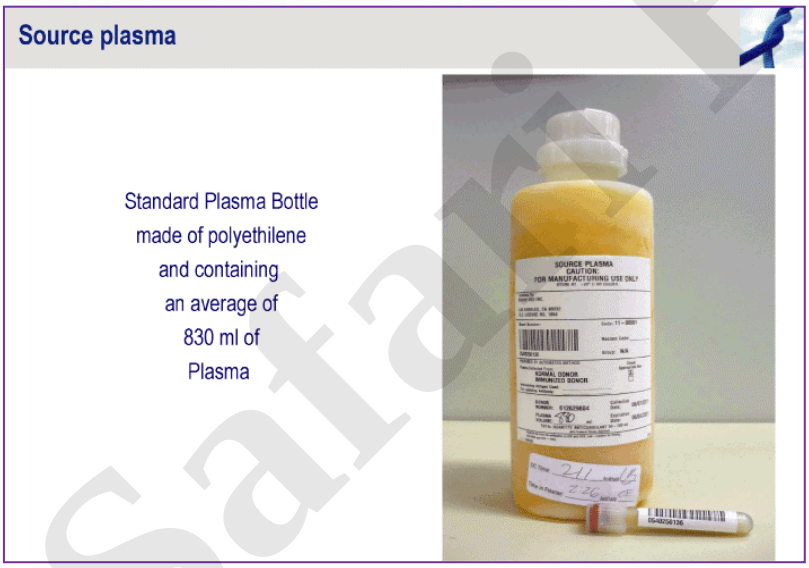
حال در این مرحله مشتقات پلاسما در دنیا به شدت وابسته به جمع آوری پلاسما بصورت تجاری در امریکاست. مثلث ایمنی در ساخت فرآورده های دارویی بیولوژیکی مشتق از پلاسما، باید برای تهیه فرآورده هایی با کیفیت و سالم رعایت شود. ارکان این مثلث عبارتند از :

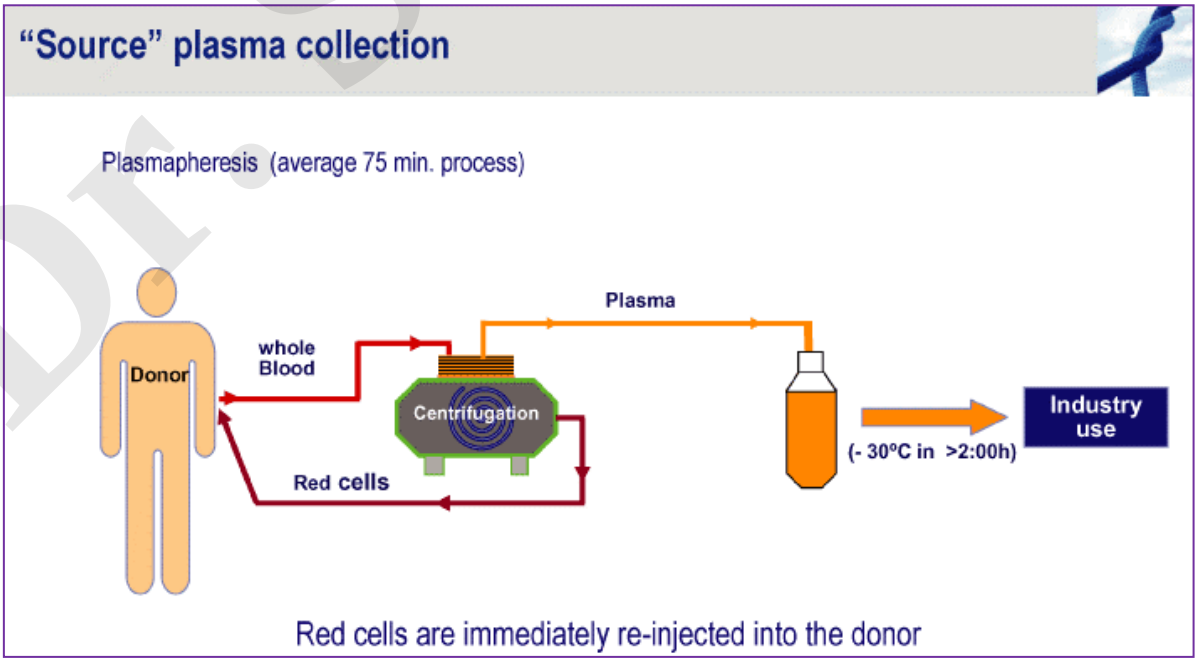
۱. انتخاب اهداکنندگان مناسب

۲. آزمایش هر واحد خون اهدایی، تا اطمینان حاصل شود که کلیه خون های آلوده به پاتوژن های قابل تشخیص و قابل انتقال از طریق انتقال خون حذف می‌شوند.

۳. بررسی مواد حین تولید و فرآورده نهایی تا اطمینان حاصل شود هرگونه آلودگی از بین رفته است.

این سه مورد باید بکار گرفته شوند تا بتوان به محصولاتی با کیفیت بالا و کاملا موثر، دست یافت.





Dr Safari Fard

پلاسمای آفرزیس یا پلاسمای منبع از اهدا کنندگانی جمع آوری می شود که طی یک عملیات، از اهدا کننده گرفته شده و با ضد انعقاد مخلوط گردیده (معمولاً با یک محلول سیترات سدیم ۴٪)، بلافاصله به روش های فیزیکی (سانتریفیوژ کردن، فیلتراسیون و یا ترکیبی از هر دو روش) جداسازی صورت می گیرد [۲۷] و در حداقل زمان در یک ظرف مناسب (کیسه و یا بطری پلاستیکی) جمع آوری می گردد. مدت پلاسما فرزیس بستگی به تعداد چرخه ها (و بیشتر به حجم پلاسمای جمع آوری شده) بستگی دارد. و از ۳۵ دقیقه تا ۷۰ دقیقه متغیر است. حجم پلاسمای آفرزیس ممکن است از ۴۵۰ الی ۸۸۰ میلی لیتر، بسته به قوانین کشوری و دستورالعمل های جمع آوری متغیر باشد. همچنین، پلاسمای آفرزیس می تواند به عنوان محصول جانبی پلاکت فرزیس(پلاسمای همزمان) تهیه شود. روشی که ابتدا برای جمع آوری پلاکت ها به کار می رفت.

هر دوی پلاسمای بازیابی شده و آفرزیس برای تولید صنعتی کلیه محصولات پلاسمایی مناسب هستند. میزان فاکتورهای انعقادی، به ویژه فاکتور هشت در پلاسمای بازیابی شده به دلایل الف) زمان طولانی قبل از فریز کردن صرف عملیات می شود (خون کامل بایستی طی عملیاتی به سلول های خونی و پلاسما جداسازی شود)، ب) نسبت بالای ضد انعقاد و ج) میزان زیاد آلودگی سلولی که ممکن است آنزیم های پروتئولیتیک تاثیر گذار بر پایداری فاکتور های انعقادی آزاد کنند، کمتر از پلاسمای آفرزیس است.

پلاسمای آفرزیس زمانی که از اهدا کنندگان مختلف جمع آوری می شود، حاوی مقدار کمی ایمونوگلوبولین (IgG) می باشد. ظاهراً سیستم آفرزیس مورد استفاده بر ترکیب های پروتئین و کیفیت پروتئین های پالایش شده تاثیر نمی گذارد، اگر چه میزان سلول باقی مانده بر اساس وسیله جدا کننده متغیر است.[۲۸]

شرایط پلاسما

- پلاسما دارای منشاء انسانی می‌باشد و از اهداکنندگان منفرد سالم دریافت می شود.
- پلاسماهایی که محتوای هموگلوبین آن ها قابل رویت است، قابل قبول نمی‌باشد.
- پلاسما قبل از انجماد، فاقد رسوب می‌باشد.
- پلاسما برای پالایش بیش از ۱۵ ماه نگه داری نمی شود.

[27] Burgstaler E: Current instrumentation for apheresis. Apheresis: Principles and practice (ed 2). Bethesda, MD,AABB Press, 2003, pp 95- 130
[28] Burnouf T, Kappelsberger C, Frank K, et al: Residual cell
content in plasma from 3 centrifugal apheresis procedures.Transfusion 11:1522 - 1526, 2003

Dr. Safari Fard

- همراه هر نمونه پلاسما یک لوله حاوی نمونه همان واحد پلاسما وجود دارد که حداقل حجم آن ۲ml است، که می‌تواند برای انجام آزمایش ها تکمیلی استفاده شود.

تهیه پلاسما در ایران

پلاسمای انسانی از پایگاه‌های معتبر سازمان انتقال خون ایران که دارای مجوز رسمی و قانونی برای جمع‌آوری پلاسما هستند تأمین می شود. هریک از پایگاه‌های منطقه‌ای ـ آموزشی مرکز هر استان دارای یک یا چند واحد خون‌گیری در سطح شهر (سیار) می‌باشند که پلاسمای نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده توسط این واحدها در نهایت در پایگاه اصلی جدا می‌گردد. در اکثر استان ها، پایگاه‌های مستقر در سایر شهرهای استان که تحت عنوان پایگاه‌های اقماری شناخته می‌شوند اقدام به خون‌گیری و جداسازی پلاسما می‌نمایند. عملکرد تمامی پایگاه‌ها و مراکز مربوطه و کیفیت فعالیت‌های آن ها یکسان و مطابق با استانداردهای تعیین شده از سوی سازمان انتقال خون می‌باشد و بازرسی مستمر از آن ها انجام می‌گیرد.

داده‌های اپیدمیولوژی مربوط به عفونت‌های قابل انتقال از طریق خون

به منظور اطمینان از عدم آلودگی جمعیت اهداکننده به عفونت‌های قابل انتقال از طریق خون و متعاقب آن تضمین سلامت پلاسما و فرآورده‌های مشتق از پلاسما مورد استفاده برای بیماران، انجام تعدادی از آزمایش ها از نظر عوامل عفونی شامل HCV،HIV و HBV بر روی نمونه‌های خون و پلاسما اجباری است. در برخی استان ها مانند استان های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی، نمونه‌های دریافتی از

Dr. Safarifard

لحاظ HTLVI/II نیز کنترل می گردند. بر اساس نتایج به دست آمده، پلاسمای مناطقی که شیوع بالایی از عوامل عفونی را دارند جمع‌آوری نمی‌شوند.

معیارهای گزینش یا رد اهدا کنندگان

به منظور حفظ سلامت اهدا کننده و همچنین سلامت دریافت کننده فرآورده‌های خونی حاصل از پلاسما، اهداکنندگانی انتخاب می شوند که از سلامت کامل برخوردار باشند، تحت معاینات دقیق پزشکی قرار گیرند و دارای سابقه پزشکی قابل قبول باشند و بر اساس آزمایش ها پزشکی انجام‌شده فاقد هر گونه آلودگی یا عفونت قابل انتقال از طریق خون شناخته شوند.

معاینه اهدا کننده به منظور بررسی شرایط لازم برای اهدا خون طبق استانداردهای ملی سازمان انتقال خون ایران و در راستای حفظ سلامت اهداکنندگان و گیرندگان خون و فرآورده‌های خونی انجام می شود. سوابق مربوط به اهدا کننده در هر مورد اهدا نگه داری می شود که شامل هویت اهدا کننده، نتایج آزمایش ها و امکان ردیابی وی در هر فرآورده پلاسمایی می‌باشد.

برای تکمیل اطلاعات مربوط به هر اهدا کننده: اهدا کننده قبل از اهدا خون فرم پرسشنامه را تکمیل می‌نماید، تحت معاینه پزشک پایگاه قرار می‌گیرد و شرایط فیزیکی، فشار خون، نبض و ... وی بررسی می شود، در صورت قبول اهدا کننده از لحاظ معاینه فیزیکی، پزشک پایگاه با او مصاحبه می‌کند، پس از پذیرش اهدا کننده بر اساس سؤالات مطرح شده و معاینه پزشک، خونگیری از وی به عمل می‌آید و خون او مورد آزمایش ها مورد نظر قرار می‌گیرد.

شرایط لازم پذیرش فرد برای اهدا خون و انجام خونگیری

در زمان اهدا خون و قبل از خونگیری، سابقه پزشکی اهدا کننده بررسی شده و وی مورد معاینه قرار می‌گیرد تا معلوم گردد که اهدای خون برای خود اهدا کننده خطری ندارد. از اهدای خون توسط فردی که نشانه‌هایی از بیماری های قابل سرایت از طریق خون را دارد و همچنین سایر شرایطی که ممکن است سلامت خون یا فرآورده‌های خونی را به خطر اندازد جلوگیری به عمل می‌آید.

احراز هویت اهدا کننده توسط مراکز جمع‌آوری خون و با درخواست مدارک شناسایی معتبر و یا از طریق تطبیق اطلاعات فرد با اطلاعات قبلی که ممکن است در مورد وی در سوابق سازمان موجود باشد انجام می‌گیرد.

بر اساس دستورالعمل‌های سازمان انتقال خون نکات زیر در گزینش داوطلبان اهدا خون مدنظر قرارمی‌گیرند:

- اهدا کننده خون باید حداقل ۱۸ سال سن و حداکثر ۶۵ سال سن داشته باشد.
- اهدا کننده مجاز نیست در طی ۸ هفته بیش از یک بار اهدای خون کامل داشته باشد.

Dr. Safari Fard

- غلظت هموگلوبین یا هماتوکریت قبل از اهدای خون تعیین می شود و هموگلوبین نباید کمتر از ۱۲/۵ گرم در دسی‌لیتر و هماتوکریت نباید کمتر از ۳۸٪ باشد.
- درجه حرارت بدن فرد نباید از ۳۷/۵ درجه سانتی گراد بالاتر باشد.
- فشار خون سیستولیک اهدا کننده باید ۱۸۰-۹۰ میلی‌متر جیوه و فشار خون دیاستولیک وی ۱۰۰-۵۰ میلی‌متر جیوه باشد.
- اهدا کنندگان مبتلا به بیماری قلبی، کبدی یا ریوی یا با سابقه سرطان یا تمایل به خونریزی غیر طبیعی از اهدا خون منع می‌شوند، مگر اینکه توسط پزشک مربوطه برای اهدای خون مناسب تشخیص داده شوند.
- افراد دارای علائم رفتارهای مخاطره آمیز مثل مسمومیت با الکل یا وجود نشانه‌های آشکار اعتیاد، اعتیاد به الکل، وجود شواهد تزریق بر روی بازوها و یا وجود سایر نشانه‌های مشخص استفاده از داروهای تزریقی (مخدر) از اهدا خون منع می‌شوند.
- از افرادی که سابقه سیفلیس، سوزاک یا درمان سیفلیس و سوزاک دارند خون دریافت نمی شود.
- افراد دارای سابقه فامیلی بیماری کروتسفلد جاکوب (CJD) یا سابقه دریافت بافت یا مشتقات بافتی که می‌توانند منبع احتمالی عامل CJD باشند، از اهدا خون منع می شوند.
- از اهدا خون توسط کسانی که در طی ۱۲ ماه گذشته بافت‌های انسانی یا مشتقات خونی که به عنوان منبع شناخته شده عوامل بیماری‌زای قابل انتقال از راه خون می‌باشند را دریافت نموده‌اند جلوگیری به عمل می‌آید.
- اهداکنندگان در صورتی که سابقه‌ای از بیماری های ویروسی یا سابقه آزمایشگاهی هپاتیت B، هپاتیت C، HTLV، HIV در گذشته یا حال را داشته باشند، از اهدا خون به صورت دائم منع می‌شوند.
- افرادی که از داروهای پیشگیری ضد مالاریا استفاده کرده‌اند به مدت سه سال بعد از قطع دارو از اهدا منع می‌شوند، ولی اهدا کننده‌ای که به طور قطعی مبتلا به مالاریا بوده است، از اهدا خون منع می شود. افراد دارای سابقه بیماری شاگاس یا بابزیوز از اهدا خون منع می شود.
- اهدا کنندگانی که در یکسال گذشته سابقه‌ای از موارد زیر داشته‌اند باید از اهدا خون یا فرآورده‌های خونی به مدت ۱۲ ماه منع شوند:
  - خالکوبی، حجامت، طب سوزنی، الکترولیز و سایر موارد مشابه
  - تماس غشاء مخاطی با خون
  - سوراخ شدن غیر استریل پوست اهدا کننده با ابزار یا وسایل آلوده به خون یا مایعات بدن فرد دیگر

Dr. Safari Fard

- هم خانه شدن یا داشتن تماس جنسی با افراد علامت‌دار از نظر هپاتیت‌های ویروسی یا داشتن آزمایش مثبت تائید شده برای HBsAg
- تماس جنسی با فرد مبتلا به عفونت HIV یا در معرض خطر زیاد برای عفونت HIV
- قرار گرفتن در وضعیت تأدیبی (مثل حبس و زندان) بیش از ۷۲ ساعت متوالی
- استفاده داخل بینی کوکائین
- تماس جنسی با افراد HCV مثبت که دارای هپاتیت آشکار بالینی ظرف ۱۲ ماه گذشته باشند
- آلودگی با ویروس نیل غربی (WNV)

غربال گری اهدا کنندگان

اهدا کنندگان در نظر گرفته شده در پی آموزش های لازم آماده سازی می شوند و تحت یک مصاحبه پزشکی قرار می گیرند تا از عدم وجود خطر و علائم بیماری های عفونی اطمینان حاصل شده و تاییدیه مناسب بودن برای اهدا پلاسما جهت پالایش را داشته باشند. از اهدا کنندگانی که دارای یک مورد خطر آفرین از نظر سلامتی باشند خواسته می شود تا خود را از اهدا خون حذف نمایند. اطلاعات پزشکی اهدا کنندگان جمع آوری و بایگانی می گردد. ارزیابی مداوم بومی شناسی جمعیت اهدا کنندگان در بعضی موارد قانونی نیاز است.[۲۹] این امر برای ایجاد سطح زمینه (شیوع و شدت بیماری) کمک می کند و منجر به شناخت شناساگر های عفونی مثل آنتی بادی های HIV1 و HIV2، آنتی بادی های ویروس هپاتیت C(HCV)، آنتی ژن سطحی هپاتیت B(HBsAg) در جمعیت اهدا کنندگان می شود. همچنین این موضوع وسیله خوبی برای تشخیص زود هنگام بیماری های نوظهور، امکان مداخله زود هنگام (مثل روش های غربال گری اهدا کننده و یا الزامات لازم برای روش های آزمایش اضافی) را فراهم می آورد.

اهدا کنندگان واجد شرایط اهدا پلاسما برای پالایش افرادی هستند که شرایط شان با معیارهای اهدا خون (مثل سن و تعدد اهدا)، مطابقت داشته، احتمال خطر و عوامل عفونی مربوط به خون را نداشته و با الزامات تعریف شده از سوی پالایش کننده و قوانین نظارتی ملی(NRAs) کشور جمع آوری کننده پلاسما همخوانی دارد.

در بسیاری از موارد، واجد شرایط بودن اهدا کنندگان خون کامل و اهدا کنندگان آفرزیس، جدای از تعداد اهدا که برای اهدا کنندگان پلاسما فرزیس بیشتر است، یکی باشد. معیارهای حائز شرایط در داخل اطلاعات مربوط به احتمال انتقال عوامل عفونی توسط محصولات

[29] CHMP. Guideline on epidemiological data on blood transmissible infections. For inclusion in the Guideline on the Scientific data requirements for a Plasma Master File. (EMEA/CPMP/BWP/3794/03). EMEA/CPMP/BWP/125/04, January 2005. http://www.emea.eu.int: European Medicine Agency,2005

Dr. Safari Fard

پولد پلاسما(که ممکن است از آن هایی که به وسیله ترکیب های خونی منتقل می شوند متفاوت باشد) نهفته است. معیارهای خاص ممکن است برای جمع آوری پلاسمای هیپرایمیون که برای تهیه ایمونوگلوبولین هیپرایمیون به کار می رود، مثل روش هایی برای ایمن نمودن اهدا کنندگان دارای تیتر پایین آنتی بادی وجود داشته باشند. [۳۰]

راهبرد کلی برای ایمنی

اهدا کننده پس از مراجعه به پایگاه انتقال خون ابتدا تابلوها و راهنماهای آموزشی را که بر روی دیوار یا مکان مخصوص پذیرش نصب شده است مطالعه می‌نماید. پس از آگاهی از مراحل و شرایط اهدا خون به مسئول پذیرش اهدا کننده مراجعه نموده و با ارائه کارت شناسایی معتبر اقدام به ثبت نام می‌کند. جزوات آموزشی مربوط به مراحل و شرایط اهدای خون و خود حذفی محرمانه را دریافت می‌کند. اهدا کننده پس از مطالعه جزوات ارائه شده، قسمت مربوط به آگاهی از مراحل انتقال خون و سلامت اهدا کننده را امضاء می‌نماید. همچنین او باید رضایت نامه جهت اهدا خون موجود در فرم اهدا کننده را نیز امضاء نماید.

سپس پزشک پایگاه با او پس از ارائه کارت شناسایی معتبر مصاحبه می‌نماید. اهدا کننده باید به سؤالات پزشک اهداکنندگان بطور دقیق و صحیح پاسخ دهد و اطلاعات خواسته شده را در اختیار پزشک قرار دهد و چنانچه در مصاحبه، اهدای خون برای اهدا کننده و گیرنده خون خطری نداشته باشد مورد معاینه فیزیکی و آزمایش هموگلوبین قرار می‌گیرد و چنانچه از این نظر نیز با شرایط اهدای خون مطابق بود پزشک اجازه خون‌گیری را صادر می‌نماید.

در صورت پذیرش اهدا کننده، پزشک با توجه به سیاست‌های پایگاه و برنامه روزانه، نوع کیسه خون‌گیری را انتخاب نموده و لیبلی را که مختص اهدا کننده است بر روی کیسه خون و فرم ثبت نام و لوله‌های آزمایش نصب می‌نماید. همچنین فرم خود حذفی محرمانه را هم در اختیار اهدا کننده می‌گذارد تا چنانچه اهدا کننده خود را واجد شرایط اهدا خون نداند، آن را پس از تکمیل و قبل از انجام خون‌گیری به صندوق مربوطه بیاندازد. لازم به ذکر است کلیه عملیات ثبت نام اهدا کننده و نتایج حاصل از مصاحبه و معاینه بصورت رایانه ای و با استفاده از نرم‌افزار مربوطه انجام می‌گیرد.

در مرحله بعد اهدا کننده به قسمت خون‌گیری مراجعه می‌نماید و پس از ارائه کارت شناسایی معتبر، مسئول خون‌گیری او را به سمت جایگاه مربوطه هدایت کرده تا خون‌گیری انجام شود. مسئول خون‌گیری فرم ثبت نام را با کیسه خون‌گیری و لوله‌های آزمایش از نظر

[30] WHO: Recommendations for the production, quality control and regulation of plasma for fractionation. http://www.who.int/bloodproducts, 2005

Dr. Safari Fard

یکسان بودن اطلاعات مطابقت می‌دهد و سپس از اهدا کننده پس از انجام ضدعفونی بازو، خون‌گیری می‌نماید و زمان خون‌گیری را ثبت می‌نماید.

پس از اتمام خون‌گیری، کیسه خون در درجه حرارت مناسب برای تهیه فرآورده مربوطه قرار می‌گیرد. چنانچه از کیسه خون، برای تهیه پلاسما و کرایو طبق برنامه پیش‌بینی شده استفاده شود، در دمای ^0C۱-۶ و چنانچه برای تهیه پلاکت استفاده شود، در دمای ^0C۲۰-۲۴ نگه داری می‌گردد. خون کامل برای تهیه پلاسما و کرایو می‌تواند در دمای ^0C۲۰-۲۴ نیز نگه داری گردد. سپس کیسه‌های خون برای تهیه فرآورده به بخش فرآورده و لوله‌های آزمایش برای انجام آزمایش ها لازم به آزمایشگاه روتین منتقل می‌شوند.

کیسه‌های خون در بخش فرآورده، برحسب نوع کیسه و فرآورده مورد نظر سانتریفوژ می‌شوند. ثبت زمان جداسازی در این قسمت ضروری می‌باشد. پلاسما پس از سانتریفوژ کیسه خون، توسط اکستراکتور extractor از گلبول‌های قرمز جدا می شود. در مورد کیسه‌هایی که برای تهیه پلاکت استفاده می‌شوند، مجدداً سانتریفوژ شده و پلاکت کنسانتره(PRP) از پلاسما جدا می‌گردد. پس از جداسازی، کیسه‌های پلاسما سریعاً منجمد می‌شوند.

عملیات انجماد توسط سه نوع فریزر انجام می‌گردد:

- Blast freezer (۳۰ ˚C-)
- تانک الکل (۴۰ ˚C- تا ۳۰-)
- Deep freezer (۸۰˚C-)

منجمدسازی پلاسما بهتر است به گونه‌ای باشد که در کمتر از یک ساعت، دما در مرکز یا Core کیسه پلاسما به ۳۰˚C- برسد. پس از انجماد کیسه های پلاسما در سردخانه ۳۰˚C- در قسمت قرنطینه نگه داری و طبقه‌بندی می شود تا نتایج آزمایش ها آماده شوند.

لوله‌های آزمایش به بخش روتین منتقل می‌شوند. روی لوله اول که حاوی EDTA است آزمایش ها مربوط به گروه‌بندی خون انجام می‌گیرد (تعیین گروه خونی ABO type،back type، cell type و تعیین Rh). لوله دوم که حاوی لخته و سرم می‌باشد جهت انجام آزمایش ها مربوط به مارکرهای ویروسی به روش ELISA و سیفیلیس استفاده می شود. این آزمایش ها شامل HBsAg، Anti HCV، Anti HIV، Anti HTLVI،II (مختص برخی از استان های کشور) و تست راژینی RPR می‌باشد.

براساس نتایج به دست آمده و با استفاده از الگوریتم مربوطه و تهیه پولدهای ۵ تایی از نمونه‌های منفی با کمک نرم‌افزار موجود در پایگاه‌ها و همچنین آزمایش مجدد نمونه‌های پولد شده منفی در بخش QC نتیجه نهایی کلیه نمونه‌ها تهیه شده و به بخش ریلیز ارسال می‌گردد.

Dr. Safari Fard

در بخش ریلیز کلیه نمونه‌های دارای واکنش(reactive) جدا شده و برای معدوم کردن به بخش مربوطه منتقل می‌شوند و نمونه‌های تایید شده به سردخانه ۳۰°C- منتقل شده و در آنجا طبقه‌بندی و نگه داری می‌شوند. سپس پلاسماهای ارسالی جهت پالایش براساس اطلاعات رایانه ای جداسازی شده و در جعبه‌های بیست‌تایی قرار می‌گیرند. در هر جعبه لوله‌های آزمایش مربوط به هر کیسه پلاسما جهت انجام آزمایش PCR هم قرار گرفته و بسته‌بندی می شود و در مواردی که نمونه خون جهت انجام PCR موجود نباشد لوله متصل به کیسه پلاسما که حاوی پلاسما می‌باشد برای این منظور در نظر گرفته می شود.

جعبه‌های آماده توسط بازرسین ویژه پلاسما مورد بازرسی قرار می‌گیرند و کلیه اسناد و مدارک مربوط به سلامت و تهیه پلاسما مورد ارزیابی و مطابقت قرار می‌گیرند. پس از تایید بازرسان، جعبه‌های پلاسما توسط کانتینرهای حمل پلاسما مجهز به دستگاه سنجش دما و آلارم به ستاد مرکزی منتقل می‌شوند و در سردخانه ۳۰°C- نگه داری و طبقه‌بندی می‌گردند. سپس کلیه اسناد و مدارک مربوط به پلاسمای ارسالی مجدداً مورد بررسی سیستم فنی مرکزی قرار گرفته و اطلاعات مربوط به پلاسماها به مسئولین ارسال پلاسما ارسال می شود. جعبه‌های ارسالی پس از مطابقت با مشخصات و اطلاعات مربوطه، پالت‌بندی شده و در کانتینرهای حمل پلاسما مجهز به سیستم پایش دما، برای ارسال به مرکز ذخیره سازی پلاسما قرار می گیرند. کلیه پلاسماها پس از پالت‌بندی و آمادگی برای ارسال، ابتدا توسط کارشناسان مربوطه مجدداً بررسی و گواهی سلامت صادر می‌گردد و پس از کسب مجوزهای لازم از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و معاونت غذا و دارو و همچنین اقدامات لازم جهت کسب مجوز از وزارت بازرگانی و ادارات گمرک مربوطه و پس از انجام تشریفات گمرکی و بهداشتی به شرکت پالایش کننده در خارج از کشور ارسال می‌گردند.

هر یک از پایگاههای ارسال کننده پلاسما، دارای یک سیستم کیفی براساس استانداردهای ISO 9001-2000 می‌باشند و بخش تضمین کیفیت با مسئول مشخص با هماهنگی گروه راهبری سیستم مدیریت کیفیت کلیه اقدامات کیفی را تحت کنترل دارد. همچنین هر یک از پایگاه‌های ارسال کننده پلاسما دارای یک بخش کنترل کیفی بوده که مقاطع بحرانی در حصول کیفیت فرآورده را مورد ارزیابی و آزمایش قرار می‌دهد و در پایگاه‌هایی که سیستم تمام اتوماتیک الیزا راه‌اندازی نشده‌اند، پولدهای ۵ تایی از نمونه‌های منفی توسط این بخش مورد آزمایش قرار می‌گیرد. همچنین کلیه نمونه‌های دارای واکنش جهت ارزیابی مجدد و مطابقت با کیسه خون مربوطه و اطمینان از جداسازی کیسه‌های خون آلوده نیز به این بخش منتقل می‌گردند.

کلیه اقدامات انجام شده در پایگاه‌های انتقال خون توسط یک سیستم نرم‌افزاری و رایانه ثبت و ضبط می‌گردند. کلیه اهداکنندگان که از نظر آزمایش ها دارای واکنش(reactive) بوده‌اند توسط بخش کنترل کیفی مورد آزمایش مجدد قرار گرفته، با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی تأیید کننده بررسی می‌گردند و چنانچه مورد تأیید واقع شد اطلاعات آن برای ادامه بررسی و معاینات پزشکی به اطلاع اهدا

Dr. Safari Fard

کننده رسانده می شود. اطلاعات مربوط به این اهداکنندگان و سایر اهداکنندگانی که در معاینات و مصاحبه‌های پزشکی از اهدای خون معاف شده‌اند در سیستم رایانه ثبت تا از اهدا مجدد ایشان در آینده ممانعت گردد.

کلیه اطلاعات مربوط به اهداکنندگانی که در دفعات قبلی اهدا از نظر آزمایش ها سالم بوده‌اند و پس از اهدای مجدد از نظر بیماری های منتقله از راه خون دارای واکنش می‌شوند بصورت خودکار توسط رایانه مشخص و از ارسال پلاسمای قبلی که از نظر آزمایش منفی بوده است جلوگیری می‌نماید و در صورت ارسال به ستاد مرکزی توسط ارسال فرم‌های مخصوص از ارسال آن به خارج از کشور ممانعت می‌گردد. در صورت ارسال این گونه فرآورده ها به خارج از کشور، اطلاعات در طی زمان مشخص به پالایشگاه مربوطه ارسال می‌گردد تا در پروسه تولید قرار نگیرد. همچنین چنانچه آزمایش های انجام شده در پالایشگاه حاکی از واکنش در یک نمونه باشد اطلاعات آن از پالایشگاه به ستاد مرکزی ارسال و پس از بررسی اهدا کننده مربوطه اطلاعات آن برای انجام اقدامات بعدی ثبت و ضبط می‌گردد (Look back & Tracing back).

کلیه تجهیزات مورد استفاده در تهیه خون و فرآورده‌های آن توسط سیستم کیفی بصورت مستمر و در فواصل زمانی معینی کالیبره و گواهی‌نامه دریافت می‌نماید و کلیه تجهیزات سرمایشی برای انجماد سریع و نگه داری پلاسما سالانه توسط سیسم کیفی ستاد مرکزی معتبرسازی (Validate) شده، گواهی‌های مربوطه صادر می‌گردد.

کلیه کیسه‌های خون و همچنین کیت‌های آزمایشگاهی برای غربال گری خون‌های اهدایی علاوه برداشتن گواهی‌نامه‌های بین‌المللی و سوابق مصرف در انتقال خون‌های معتبر دنیا، از نظر صحت و دقت قبل از ارسال به کلیه پایگاه ها توسط بخش کنترل کیفی ستاد مرکزی مورد بررسی قرار گرفته و در صورت تأیید ارسال می‌گردند.

در کلیه پایگاه‌های ارسال کننده پلاسما، بخش کنترل کیفی ۱٪ کلیه محصولات را مطابق با دستورالعمل‌ها مورد آزمایش قرار داده و اطلاعات آن بصورت ماهانه به ستاد مرکزی ارسال و مورد بررسی قرار می‌گیرند و همچنین کلیه نتایج حاصل از کنترل های مربوط به کیت‌های آزمایشگاهی و تمام موارد مثبت و تایید شده نیز بصورت ماهانه به ستاد مرکزی ارسال می‌گردند تا از نظر مطالعات اپیدمیولوژیک و صحت و دقت آزمایش ها مورد بررسی قرار گیرند.

کلیه فعالیت‌ها از ثبت نام اهداکنندگان تا ارسال پلاسما به خارج از کشور دارای SOPهای مربوطه بوده و توسط سیستم تضمین کیفیت تحت کنترل می‌باشند و کلیه مدارک حاصله نیز طبق استانداردهای سازمان انتقال خون ایران نگه داری می‌گردند. اطلاعات ثبت شده در رایانه‌ها نیز به همین صورت با Back up روزانه و ماهانه و سالانه نگه داری می‌گردند.

Dr. Safari Fard

نحوه بازرسی از پایگاهها به طرق مختلف صورت می‌پذیرد:

- ممیزی سیستم مدیریت کیفیت ISO 9001-2000 بطور ادواری توسط سیستم تضمین کیفیت پایگاه
- بازرسی از عملکرد پایگاه ادواری موردی توسط گروههای مشخص از کارشناسان فنی کنترل کیفی، اداری مالی و حراست
- بازرسی بین‌المللی توسط شرکت‌های پالایش کننده پلاسما بصورت ادواری
- بازرسی و ممیزی بین‌المللی توسط مؤسسه پل‌ارلیخ و ادارات فدرال و دولتی آلمان ادواری
- بازرسی ادواری سیستم مدیریت کیفیت ستاد مرکزی
- ممیزی بین‌المللی مؤسسات گواهی‌دهنده سیستم مدیریت کیفیت خارجی بصورت ادواری
- بازرسی کنترل کیفی و فنی ستاد مرکزی نیز بصورت ادواری موردی چه به صورت مستقل چه به همراهی بازرسان ارزیابی عملکرد

پلاسمای هایپرایمیون

به منظور تولید پلاسمای هایپرایمیون(برای مثال پلاسمای حاوی آنتی بادی ضد هاری)، پلاسماهای اهدایی از طریق روش پلاسما فرزیس تهیه می‌گردد. تهیه این نوع پلاسماها از مراحل زیر تشکیل شده است :

۱- پذیرش اهدا کننده، به همان صورتی است که در مورد اهدا خون کامل انجام می‌پذیرد به عبارتی کلیه مراحل ثبت نام، مصاحبه و معاینات پزشکی مطابق اهداکنندگان خون کامل است چه در خصوص شرایط اهداکنندگان و چه در شرایط معافیت موقتی یا دائم آن.

۲- چنانچه اهدا کننده از نظر پزشکی برای اهدای پلاسما قابل قبول تشخیص داده شد، اهدا کننده قبل از انجام امور پلاسما فرزیس مورد ارزیابی آزمایشگاهی از نظر بیماری های عفونی قابل سرایت از طریق پلاسما و همچنین آزمایش ها مربوط به بررسی وضعیت میزان پروتئین‌ها قرار می‌گیرد.

۳- چنانچه در آزمایش ها مورد قبول واقع گردید مراحل واکسیناسیون (برای مثال واکیناسیون علیه بیماری هاری) در فواصل مشخص برای وی صورت می‌پذیرد.

Dr.Safari Fard

۴- پس از انجام واکسیناسیون بر طبق دستورالعمل پیوست مجدداً اهدا کننده مورد ارزیابی پزشکی قرار می‌گیرد و چنانچه دارای شرایط قابل قبول بود پلاسمافرزیس برای وی انجام می‌گیرد.

در هر جلسه پلاسما فرز با توجه به معیارهای آمده در دستورالعمل پیوست با استفاده از کیسه‌های مخصوص پلاسما فرز ابتدا خون کامل از اهدا کننده دریافت و سپس با جداسازی پلاسما توسط سانتریفوژهای یخچال دار کاملاً مشابه با فرآیند جداسازی پلاسما از خون کامل، در اهدا کنندگان معمولی صورت می‌گیرد و مجدداً پس از تزریق گلبول قرمز به اهدا کننده، خون کامل دریافت و چرخه قبلی انجام می‌پذیرد و در نهایت دو کیسه پلاسما حاصل می شود. به عبارتی در یک جلسه پلاسما فرزیس دوبار و هر بار به میزان تقریباً ۵۰۰ میلی‌لیتر خون کامل دریافت و سپس جداسازی پلاسما، گلبول قرمز مجدداً به اهدا کننده بازگردانده می شود.

پلاسماهای تهیه شده از طریق برچسب‌های مشابه آنچه که در اهداکنندگان خون کامل آمده است ردیابی و چیدمان می‌گردد. پلاسماها بلافاصله بعد از تهیه، با انجماد سریع در ظرف کمتر از یک ساعت به $-30^{0}C$ رسانده می‌شوند و سپس در مکان های مخصوص قرنطینه در سردخانه‌های $-30^{0}C$ نگه داری می‌گردند.

ریلیز پلاسما

ریلیز پلاسما به روش retested می‌باشد. به عبارتی بعد از آنکه اهدا کننده مجدداً برای اهدا پلاسما در فاصله کمتر از یک ماه مراجعه نمود، مورد آزمایش ها غربال گری قرار می‌گیرد و چنانچه آزمایش ها غربال گری وی به فاصله سه ماه از تهیه پلاسمای اولیه نیز منفی گزارش گردد، پلاسمای اولیه آزاد می‌شود و به قسمت آماده ارسال پلاسما تغییر مکان می‌دهد. چنانچه در انجام آزمایش ها غربال گری، در هر فاصله زمانی یکی از شاخص‌های ویروسی مثبت یا واکنش‌دار گزارش شوند، کلیه پلاسماهای قبلی گرفته شده از اهدا کننده معدوم می‌گردد. حداکثر میزان دریافت پلاسما از هر اهدا کننده ۱۲ لیتر در سال و حداکثر ۲۴ جلسه می‌باشد و اهدا کننده در هر هفته حق اهدا پلاسما بیش از ۲ بار و به فاصله کمتر از ۴۸ ساعت را ندارد. اهداکنندگان معمولاً در هر ماه دوبار مراجعه و پس از انجام معاینات و آزمایش ها مورد نیاز، پلاسمافرز بر روی آن ها انجام می‌گیرد.

اهداکنندگان پلاسمافرزیس از میان جمعیت‌های سالم و با رعایت کامل استانداردها و آزمایش ها مختلف انتخاب می‌شوند و به طور مداوم از نظر شرایط پزشکی تحت نظارت می‌باشند. با توجه به طولانی بودن مدت پلاسما فرزیس، مبلغی حداکثر به میزان هزینه‌های رفت و برگشت مستقیماً به اهدا کننده پرداخت می‌گردد.

Dr. Safari Fard

شرایط بسته‌بندی پلاسماها و ارسال آن به خارج از کشور و نحوه حمل و نقل آن به همان صورتی است که در خصوص پلاسماهای اهداکنندگان معمولی، اعمال می‌گردد.

کیفیت و ایمنی پلاسما

به منظور بررسی سلامت خون‌های اهدایی، علاوه بر انتخاب Donor توسط پزشکان واحد اهداکنندگان و برقراری سیستم خود حذفی محرمانه، آزمایش‌های غربال گری بر روی نمونه‌های گرفته شده از خون‌های اهدایی، صورت می‌گیرد. آزمایش‌های غربال گری شامل این موارد هستند:

۱- آزمایش HBsAg به طریق ELISA

۲- آزمایش anti-HIV 1/2 Ag

۳- آزمایش anti-HCV

۴- آزمایش RPR

۵- آزمایش anti-HTLVI،II (فقط در برخی استان ها)

کلیه خون‌های اهدایی از نظر شاخص‌های فوق مورد بررسی قرار می‌گیرد و چنانچه نتیجه بدون واکنش (non reactive) حاصل گردید، خون اهدایی و فرآورده‌های حاصل از آن قابل مصرف می‌باشد و چنانچه نتیجه دارای واکنش(reactive) بود، آزمایش‌های تکمیلی شامل Double check از نمونه اولیه و نمونه موجود در لوله متصل به کیسه خون انجام می شود.

به منظور حفظ تضمین کیفیت کلیه پایگاه‌های انتقال خون که دارای سیستم‌های تمام اتوماتیک الایزا نمی باشند، می‌بایست کلیه نمونه‌های خونی که بدون واکنش می‌باشند به صورت پولدهای پنج (۵ تایی) مجدداً برای HBsAg، anti-HIV 1/2 Ag و anti-HCV مورد آزمایش قرار گیرد.

کلیه پلاسماهای ارسالی به کارخانجات پالایش پلاسما در خارج از کشور چه از طریق نمونه‌گیری از لوله‌های متصل به کیسه و چه لوله‌های آزمایش ارسال شده مورد آزمایش‌های NAT، ذیل قرار می‌گیرد:

۱- NAT برای HCV RNA

۲- NAT برای HIV RNA

۳- NAT برای HBV DNA

Dr. Safari Fard

۴- NAT برای B19 DNA

۵- NAT برای HAV RNA

این آزمایش‌های بر روی مینی پول‌های (mini pools) ۹۶۰ تایی انجام می‌پذیرد که در صورت مثبت بودن با بدست آوردن نمونه پلاسمای مثبت بطور انفرادی، پلاسمای مورد نظر از چرخه تولید خارج می‌گردد. میزان حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) کیت‌های مورد استفاده توسط مراکز معتبر کشور پالایش کننده پلاسما تایید شده است.

شرایط نگه داری و حمل و نقل پلاسما

کلیه پلاسماهای جداسازی شده از خون کامل در فاصله زمانی حداکثر ۲ ساعت تحت انجماد سریع قرار گرفته و دمای هسته مرکزی آن ظرف مدت کمتر از ۱ ساعت به ۳۰°C- رسانده می شود و بلافاصله تمامی این پلاسماها در قسمت قرنطینه سردخانه ۳۰°C- قرار می گیرند. پس از آماده شدن نتایج آزمایش ها، پلاسماهای فوق از قسمت قرنطینه به قسمت ترخیص شده، منتقل می‌گردند و پلاسماهای آلوده نیز به قسمت دفع ضایعات بیولوژیک انتقال می‌یابند. کلیه پایگاه‌های ارسال کننده پلاسما دارای سردخانه‌های ۳۰°C- به پایین (≤۳۰°C-) بوده که به طور مداوم از نظر دما مورد پایش قرار می‌گیرند. این پایش‌ها توسط دستگاه‌های الکترونیکی با رسم نمودار صورت می‌پذیرد.

عملیات انتقال، نگه داری و بسته‌بندی پلاسما جهت ارسال به خارج از کشور

جعبه‌های حاوی پلاسما از پایگاه‌های سراسر کشور با استفاده از ناوگان زمینی زنجیره سرد به سردخانه شرکت ارسال کننده پلاسما جهت پالایش (برای مثال شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون) انتقال می‌یابند. کارشناسان سازمان انتقال خون ایران اسناد فنی پلاسماهای دریافتی را بررسی و لیست بسته‌بندی محموله پلاسما را تنظیم نموده و به سردخانه ویژه نگه داری پلاسما عودت می‌نمایند. کارکنان سردخانه ابتدا پالت خالی را وزن کرده، سپس پلاسماها را مطابق با لیست دریافتی در آن قرار می‌دهند. بسته‌بندی پالت‌ها با قرار دادن یک صفحه مقوایی بر روی آن به عنوان سقف محموله و محصور نمودن آن با لایه‌های پلاستیکی با استفاده از Shrink pack کامل می‌گردد. در انتها پالت تکمیل شده را توزین کرده و اطلاعات بدست آمده را جهت تنظیم لیست بسته‌بندی ثبت می‌نمایند.

مدیر بازرگانی با استفاده از اسناد بسته‌بندی و اطلاعات ارائه شده از سردخانه در مورد وزن پالت‌ها، وزن ناخالص، خالص و حجم پلاسمای ارسالی را محاسبه و در لیست بسته‌بندی وارد می‌نماید.

Dr. Safari Fard

هر پالت حاوی ۷۵ کارتن و هر کارتن حاوی حداکثر ۲۰ واحد پلاسما به همراه لوله‌های آزمایش پلاسما می‌باشند. هر محموله پلاسما حاوی حداکثر ۳۰ پالت و حداکثر ۲۲۵۰ کارتن و حداکثر ۴۵۰۰۰ واحد پلاسما می‌باشد.

پس از تکمیل بسته‌بندی، گواهی سلامت توسط مدیر عامل سازمان انتقال خون صادر و نسخه اصل آن به مرکز صاد کننده پلاسما (شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون) ارسال می‌گردد. در گواهی سلامت قید می‌گردد که پلاسماهای ارسالی از پایگاه‌های کشور، مطابق با ضوابط و استانداردهای رایج سازمان انتقال خون ایران جمع‌آوری گردیده است و اطلاعات کامل شامل نام پایگاه، تعداد کارتن و نوع پلاسمای ارسالی از هر پایگاه در آن درج شده است.

پس از صدور گواهی سلامت، مکاتبات لازم برای اخذ مجوز صادرات پلاسما با معاونت غذا و دارو و مدیر کل اداره نظارت بر امور دارو صورت می‌گیرد. سپس نامه درخواست اداره کل نظارت بر امور دارو ممهور به مهر و امضا مدیر کل جهت صدور مجوز صادرات پلاسما به گمرک جمهوری اسلامی ایران ارائه شده و مجوز صادرات به دو زبان فارسی و انگلیسی صادر می‌گردد. پس از آماده شدن و تحویل مجوزها به واحد بازرگانی شرکت صادر کننده پلاسما، هماهنگی‌های لازم با کارشناسان گمرک جهت شمارش و رویت محموله‌های پلاسما و بازرسی و پلمب آن ها به عمل می‌آید. در انتها، پالت‌های پلاسما در کانتینرهای ویژه حمل پلاسما با سردخانه ۲۵°C- تا ۳۰°C- قرار می‌گیرند. سه Data logger جهت ثبت مداوم دمای داخل سردخانه در پالت‌های شماره ۱، ۱۵ (میانه کانتینر) و ۳۰ (جلوی کانتینر) قرار می‌گیرند. پس از تکمیل بارگیری، کارشناسان گمرک، کانتینر ویژه حمل پلاسما را پس از بررسی و تنظیم اسناد پلمپ کرده و محموله به همراه اسناد فنی مربوطه به شرکت‌های خارجی پالایش پلاسما ارسال می‌گردند.

حفظ دما

کلیه سردخانه‌های ۳۰°C- دارای یک اتاقک قبل از سردخانه با درجه حرارت ۱°C-۶ می‌باشد تا از افزایش دما در هنگام باز و بسته شدن درب سردخانه ۳۰°C- جلوگیری به عمل آید. این سردخانه‌های ۱°C-۶ نیز توسط سیستم‌های الکترونیکی مورد پایش قرار می‌گیرند. هر یک از سردخانه‌های فوق توسط مسئولین کنترل کیفی مرکز حداقل یک بار در سال معتبرسازی می‌گردند و گواهی نامه آن توسط کنترل کیفی ستاد مرکزی و معاونت فنی و کنترل کیفی صادر می‌گردد.

حمل پلاسما از پایگاههای انتقال خون به سردخانه ستاد مرکزی توسط کامیون‌های دارای سردخانه ۲۰°C- به پایین(۲۰°C- ≤) با پایش مداوم دما به صورت رسم نمودار و گراف انجام می‌گیرد. به علاوه به منظور مراقبت بیشتر از حفظ دمای داخل سردخانه کامیون از Logger ثبت دما در درون جعبه‌های پلاسما نیز استفاده می شود. پلاسماها پس از رسیدن به سردخانه مرکزی در درون سردخانه ۳۰°C-

Dr. Safari Fard

≤ نگه داری می‌گردند. این سردخانه‌ها نیز مجهز به سیستم‌های الکترونیک ثبت دما به طور مداوم می‌باشند. کلیه عملیات پالت‌بندی و آماده نمودن برای حمل پلاسما به خارج از کشور در درون این سردخانه‌ها صورت می‌پذیرد.

حمل پلاسما از سردخانه ستاد مرکزی به کشورهای اروپایی توسط تریلرهای مجهز به سردخانه‌های ۲۰°C- ≤ انجام می شود و توسط سیستم‌های الکترونیکی و Logger هایی که در درون جعبه‌های پلاسما کار گذاشته شده‌اند، مورد پایش قرار می‌گیرد.

طبق دستورالعمل‌های موجود پلاسمای منجمد باید در همه حال در ۲۰°C- و پائین‌تر نگه داری شود. به‌طور تصادفی ممکن است دمای نگه داری در یک مورد یا بیشتر از ۲۰°C- بالاتر رود ولی در هرحال پلاسمای مورد استفاده برای پالایش دارای شرایط زیر است:

- کل مدت زمانی که در آن دمای پلاسما از ۲۰°C- بالاتر است، نباید از ۷۲ ساعت بیشتر شود.
- دما نباید بیشتر از یک مورد از ۱۵°C- بالاتر رود.
- دما هیچگاه نباید از ۵°C- بالاتر رود.

روش‌های اجرایی برای مدت زمان نگه داری در انبار

پس از جداسازی و انجام انجماد سریع بر روی پلاسما، پلاسماها در سردخانه‌های ۳۰- درجه سانتی گراد دسته‌بندی و نگه داری می‌گردند و تا زمان آماده شدن جواب آزمایش‌ها در قرنطینه می‌باشند. پس از آماده شدن جواب آزمایش‌های غربال گری، مسئولین ترخیص پلاسما با مطابقت مشخصات آزمایش‌ها با هر یک از کیسه‌های پلاسما اقدام به ترخیص مواد بدون واکنش در آزمایش‌ها می‌کنند و موارد دارای واکنش جداسازی شده و به قسمت دفع ضایعات بیولوژیک فرستاده می‌شوند. پلاسماهای ترخیص شده در بخش دیگری از سردخانه به نام پلاسمای آماده ارسال قرار می‌گیرند و پس از بازرسی بازرسان ویژه پلاسما از ستاد مرکزی آماده حمل می‌گردند. ظرف یک تا سه روز و پس از جداسازی و انجماد پلاسما ترخیص آن انجام می‌گیرد.

زمان ترخیص تا زمان ارسال پلاسما به ستاد مرکزی، بسته به تعداد پلاسماهای تهیه شده متغیر است ولی همیشه زمان نگه داری تا ارسال بیش از شش ماه نخواهد بود. پس از ارسال پلاسما از پایگاه‌ها به ستاد مرکزی که حداکثر ظرف سه روز انجام می‌پذیرد، پلاسما در ستاد مرکزی در سردخانه ۳۰- درجه سانتی گراد و کمتر نگه داری، طبقه‌بندی و پالت‌بندی و پس از آماده شدن کلیه مدارک مربوطه و صدور گواهی سلامت از سازمان انتقال خون، گمرک و اداره بهداشت در قرنطینه نگه داری می‌گردند.

این مدت زمانی، بسته به تعداد پلاسماهای جمع‌آوری شده و قراردادهای تولید دارو حداکثر شش ماه می‌باشد و در طی این زمان چنانچه مواردی از Look back به ستاد مرکزی ارسال گردد، پلاسماهای مورد نظر جدا شده و به بخش کنترل کیفی سازمان ارسال می‌گردند.

Dr. Safari Fard

پس از ارسال پلاسماها به خارج از کشور که حداکثر ظرف هفت تا ده روز صورت می‌پذیرد، پلاسما حداقل به مدت دو ماه در انبارهای ذخیره‌سازی شرکت پالایش‌گر برای بررسی زمانی Look back های ارسالی نگه داری می‌گردند.

آزمایش عوامل بیماری زا

عوامل مختلف بیماری زا به عنوان عوامل بالقوه آلوده کننده خون انسان تشخیص داده می شوند.[۳۱] باکتری ها ، انگل ها ، ویروس های داخل سلولی به وسیله محصولات پلاسمایی منتقل نمی شوند زیرا آن ها طی مراحل انجماد و گرما دهی نابود می شوند و یا طی مراحل فیلتراسیون با فیلترهای ۰,۲ الی ۱ میکرومتر مورد استفاده در زمان تولید محصولات پالایشی خارج می شوند. ویروس های بیماری زای پلاسما شامل HCV,HIV ، ویروس هپاتیت B(HBV) ، ویروس نیل غربی(WNV) ، ویروس هپاتیت A(HAV) و پارو ویروس B19(B19) می باشند. تمهیدات مختلف سلامتی به کار گرفته شده در چرخه تولید محصولات پالایشگاهی، از انتخاب اهدا کننده تا تلخیص محصول صنعتی ، بر علیه عوامل میکروبی دارای اهمیت است و آزمایش های ویروسی در سلامت تولیدات پلاسمایی مورد توجه بوده است.[۳۲] [۳۳] [۳۴]

افزایش آزمایش های ویروسی پلاسما برای پالایش در جهت حذف احتمال آلودگی ویروسی است که به وسیله فرآیند های اعتبار سنجی شده انجام می گیرد. بعضی از این آزمایش ها توسط جمع آوری کنندگان خون و بقیه به وسیله مراکز پالایش کننده انجام می شود. پلاسما های اهدایی بایستی از بابت آنتی ژن HIV-1,2 ، آنتی HCV-Ag,HBs منفی باشند. ارزیابی های ژنومی آزمایش های اسید نوکلئیک برای

[31] Dodd RY: Current safety of the blood supply in the United States. Int J Hematol 80:301 - 305, 2004
[32] WHO: Recommendations for the production, quality control and regulation of plasma for fractionation. http://www.who.int/bloodproducts, 2005
[33] Burnouf T, Radosevich M: Reducing the risk of infection from plasma products: Specific preventative strategies. Blood Rev 14:94 - 110, 2000
[34] Farrugia A: Guide for the assessment of clotting factor concentrates for the treatment of hemophilia. www.wfh.org.Montreal, World Federation of Hemophilia, 2004, p 55

Dr. Safari Fard

وجود آنتی ژن P_{24} ویروس HIV و WNV که برای سلامتی ترکیب های خونی غیر ویروسی غیر فعال شده طراحی شده اند(NAT) برای مراحل حذف ویروس ها ی پوشش دار مورد بحث می باشند. پولد پلاسمای صنعتی(معمولاً پلاسمای فاقد کرایو که اولین فراکشن پولد پلاسمای هموژن می باشد) مورد آزمایش قرار می گیرد تا عدم وجود سرولوژیکی و یا ژنومی شناساگرهای ویروسی HCV.HBV,HIV,HAV.B19 مورد تایید قرار گیرد.

علی رغم غربال گری سخت گیرانه اهدا کنندگان و آزمایش های اهدا، ویروس های بیماری زا ممکن است در پولد پلاسما مورد استفاده در پالایش وجود داشته باشند. بنابر این مراحل غیر فعال سازی و حذف ویروس ها که طی ساخت تولیدات پلاسمایی اعمال می شوند و مواردی که در زیر توضیح داده شده است نقش بسیار حیاتی در تضمین سلامتی آن ها بازی می کند.

هر واحد خون / پلاسما از نظر چنانچه از نظر HBsAg، anti-HIV1/2 ، anti-HCV و/یا سیفلیس مثبت باشد از پروسه پالایش حذف می شود. انجام آزمایش ها با استفاده از کیت‌های معتبر و دارای تائیدیه از مراکز معتبر انجام می‌گیرد. آزمایش ها براساس دستورالعمل استاندارد انجام می شود و عملکرد صحیح کیت‌های مورد استفاده بوسیله نمونه‌های کنترل مثبت و منفی تائید می شود. نمونه‌های پلاسما مورد آزمایش غربال گری اولیه قرار می‌گیرند. اگر نتیجه اولیه منفی باشد آن نمونه پذیرفته می شود. اما اگر نتیجه آزمایش اولیه مثبت بود آنگاه آزمایش تکرار می شود. با انجام آزمایش مجدد تفسیر نهایی از تجزیه و تحلیل ۲ آزمایش صورت گرفته به دست می‌آید. اگر ۲ آزمایش انجام شده دارای نتایج مثبت بود، نمونه مثبت قلمداد می شود. اما اگر آزمایش اول مثبت و آزمایش دوم منفی باشد، نمونه منفی گزارش می شود. آزمایش‌های تکمیلی یا تائیدی بیشتر و اختصاصی‌تر جهت تائید نتیجه مثبت آزمایش‌های غربال گری انجام می‌گیرد.

تهیه ، انجماد ، انبار کردن و انتقال پلاسما

محافظت فاکتور هشت در طی جمع آوری خون و یا پلاسما برای خیلی از پالایش گرهایی که فاکتور انعقادی تولید می کنند مهم می باشد. پلاسمای آفرزیس را می توان به سرعت فریز نمود تا سلامتی فاکتور هشت تضمین گردد. بر عکس خون کامل بایستی سانتریفیوژ شده و مواد مختلف آن جدا سازی گردند. وقتی دمای خون بعد از جمع آوری به $4\ ^{\circ}C$ رسانده شد ، بایستی پلاسمای آن را جدا کرده و برای محافظت فاکتور هشت در عرض ۶ تا ۸ ساعت منجمد گردد. اما وقتی در $-20^{\circ}C$ سانتی گراد ثابت با استفاده از وسیله ای شبیه صفحات برتاندیول به سرعت سرد می گردد، فاکتور های انعقادی آن برای مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت پایدار می مانند. پلاسمای منجمد شده

Dr. Safari Fard

در طی ۷۲ ساعت برای تولید آلبومین و IgG مناسب است. [۳۵] بعد از جدا کردن اجزای سلولی پلاسما به دست آمده برای پالایش برحسب قوانین ملی بایستی به سرعت در دمای $-20^{\circ}C$، $-25^{\circ}C$ و $-30^{\circ}C$ منجمد شود. [۳۶]

پلاسمای مورد استفاده برای تهیه آلبومین و IgG ممکن است در پایین تر از $-20^{\circ}C$ در طی ۷۲ ساعت پس از جمع آوری منجمد شود. [۳۷] در دستورالعمل های فدرال ایالات متحده ، پلاسمای آفرزیس بلافاصله بعد از جمع آوری بایستی در $-20^{\circ}C$ یا خنک تر نگه داری شود. منجمد کردن سریع پلاسما ، جهت اطمینان از یخ زدن سریع قسمت خارجی و دمای $-20^{\circ}C$ قسمت مرکزی آن ، فاکتور هشت موجود در آن را محافظت نموده و مهم تر از انجماد متداول می باشد. [۳۸]

دمای نگه داری پلاسما $-20^{\circ}C$ و پائین‌تر می‌باشد. در طی مدت نگه داری، دما به صورت مرتب کنترل می شود. تجهیزات فنی مناسب برای ثبت بی‌وقفه دمای نگه داری به کار گرفته می شود و الگوی دمایی در طی نگه داری حفظ می شود. فریزرها دارای سیستم هشدار دهنده هستند.

نقل انتقال بین قاره ای و داخل قاره ای پلاسما برای پالایش متداول است و اغلب انجام می گیرد. رعایت الزامات لازم (بسته بندی، برچسب زنی، دمای ثبت شده حمل و نقل data logger نمونه های لازم برای انجام آزمایش های اضافی و غیره) به هنگام بارگیری و حمل با کشتی مورد بازرسی قرار می گیرد. پلاسما بلافاصله در فریزر متحرک قرنطینه می شود. اسناد (مثل تاییدیه امضاء شده در مبداء و کنترل پلاسما، زمان جمع آوری، تعداد ظروف بارگیری شده، اطلاعات آزمایش های ویروس شناسی و ایمنی شناسی، کیت های مورد استفاده در آزمایش ها و تعداد سری های تولید) مورد بازرسی قرار گرفته و با شرایط واقعی بار مورد حمل مطابقت داده می شود. آزمایش های اضافی، مثل آزمایش اسید نوکلئیک (NAT) به عنوان مثال (B19, HAV, HBV, HIV, HCV) و یا تعیین آماری فاکتور هشت و محتویات پروتئینی با تهیه نمونه از پلاسمای اهدا شده ممکن است انجام شود. تنها پلاسما های اهدا شده ای که از نظر کیفی با الزامات کیفی و آزمایش ها مطابقت داشته باشند برای پالایش مورد استفاده قرار می گیرند.

قبل از ذوب ممکن است برای چند ساعت پلاسما به دمای کنترل شده رسانده شود تا ذوب آن تسهیل گردد. روش های مختلف سازگار با فرآیند بهداشتی برای کاهش خطرات زیستی، برای باز کردن بسته های پلاسما ابداع شده است. پلاسما های فریز شده را از ظروف کیسه خود خارج کرده و برای رسوب کرایو آن ها را با هم مخلوط (پولد) می کنند و مراحل بعدی پالایش انجام می شود. تولیدات بینابینی به دست آمده در طی تولید برای تهیه پولد و انجام عملیات ذخیره می گردند. محصولات نهایی فیلتراسیون استریل شده، در شرایط آسپتیک

[35] WHO: Recommendations for the production, quality control and regulation of plasma for fractionation. http://www.who.int/bloodproducts, 2005
[36] Anonymous: Monograph of human plasma for fractionation 01/2005:0853 corrected. Strasbourg, European Pharmacopeia,2005
[37] Anonymous: Monograph of human plasma for fractionation 01/2005:0853 corrected. Strasbourg, European Pharmacopeia,2005
[38] Sward-Nilsson A-M, Persson P-O, Johnson U, et al: Factors influencing Factor VIII activity in frozen plasma. Vox Sang 90:33-39, 2006

Dr. Safari Fard

داخل ظروف خود به عنوان محصول نهایی ریخته می شوند و یا بطری های حاوی آلبومین تحت پاستوریزاسیون نهایی قرار داده می شوند. اکثر محصولات پلاسمایی به جزء آلبومین و بعضی تولیدات IgG، طی ۳ تا ۶ روز بسته به خصوصیات فیزیکی ماده و حجم آن در سرما به صورت پودر در می آید. (Freeze Dried) سری های تولید شده قرنطینه می گردند تا از نظر کیفی تحت کنترل های لازم قرار گیرند و پرونده محصول مورد بررسی قرار می گیرد. سری تولید مطابق با اختصاصات، بر چسب زده شده و در بعضی از کشور ها سری های تولیدی ممکن است با مجوز های قانونی ترخیص گردند. چرخه تولید محصولات پالایشی از چند هفته تا چند ماه طول می کشد.

قرنطینه‌سازی پلاسما

فرآورده‌های پلاسمایی پس از اطمینان از منفی بودن جواب آزمایش‌های غربال گری، با حفظ زنجیره سرد به صورت اولیه ترخیص و به قرنطینه منتقل می‌شوند. پلاسماها در قرنطینه به مدت ۹۰ روز نگه داری می‌شوند و پس از طی مدت مذکور مجدداً به دنبال مراجعه فرد اهدا کننده برای اهدای مجدد خون و انجام آزمایش‌های غربال گری بر روی نمونه خون جدید، در صورت منفی بودن تمام آزمایش‌ها، فرآورده پلاسمایی قبلی از قرنطینه ترخیص نهایی شده و برای مصرف صنعت پلاسما به ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ارسال می شود. پس از آماده شدن نتایج آزمایش‌های غربال گری، فرآورده‌هایی که نتیجه هر یک از آزمایش‌هایشان مثبت است از سایرین جدا و طبق دستورالعمل مربوط به ضایعات بیولوژیک دفع می‌شوند.

سیستم ردیابی هر اهدا و Look back

کلیه پایگاه‌ها دارای دستورالعمل اجرایی استاندارد برای Look back هستند تا در صورتیکه در هر یک از اهداکنندگان تغییر سرمی seroconversion مشاهده شود، قادر به ردیابی پلاسمای اهدایی و حذف پلاسمای اهدا کننده از چرخه پالایش باشند.

آزمایش بر روی مخلوط پلاسما (Plasma Pool)

در آزمایش برروی مخلوط پلاسما ، نمونه‌ای از پلاسمای اولیه که از مخلوط کردن صدها یا هزارها واحد پلاسمای اهدایی تهیه شده است به روش‌های مرسوم از نظر anti-HIV ، anti-HCV و HBsAg آزمایش می‌گردد. امروزه با وجود آن که حساسیت این آزمایش‌ها با

آزمایش PCR بر روی مخلوط‌های "کوچک" پلاسما (mini-Pool)

Dr. Safari Fard

یکی از راهکارهای جدید مبتنی بر اصول علمی ، انجام آزمایش PCR است که بر روی نمونه مخلوطی از ۱۰۰ تا ۵۰۰ واحد پلاسمای اهدایی قبل از مخلوط شدن در حجم تولید کلان انجام می‌گردد. با این راهکار تشخیص و حذف مواردی که از نظر شاخص‌های ویروسی مثبت هستند امکان پذیر خواهدبود.

برتری روش آزمایش بر روی حجم کم پلاسما در مقابل حجم زیاد در افزایش حساسیت آن است و موارد مثبت قبل از ورود به فرآیند تولید شناسایی و حذف می‌گردند.

اسناد همراه پلاسما

- **فهرست اهدا کنندگان پلاسما:** فهرست اهدا کنندگان پلاسما به صورت واضح و خوانا همراه محموله پلاسما می‌باشد. هر اهدا دارای یک شماره اهدا، تاریخ اهدا، حجم کیسه خون و شماره جعبه حاوی پلاسما می‌باشد. نام تهیه کننده لیست، پست سازمانی و امضاء وی بر روی این فهرست وجود دارد.
- **تائیدیه سرولوژی:** در این تائیدیه کلیه آزمایش های انجام شده بر روی هر واحد پلاسما به همراه کیت مورد استفاده ذکر می‌شوند و تائید می‌گردد که نتایج کلیه آزمایش ها منفی بوده است.
- **فهرست بسته‌بندی:** در این فهرست، مشخصات کامل محموله پلاسمای ارسالی جهت پالایش شامل تعداد واحدهای پلاسما، نوع پلاسما، تعداد جعبه‌ها، شمارهٔ جعبه‌ها و وزن جعبه‌ها ذکر می شود که توسط مدیر پایگاه تائید و امضاء می شود.
- **گواهی سلامت:** همراه هر محموله، سندی حاوی تعداد جعبه‌های حاوی پلاسما، تعداد واحدهای پلاسما، نوع فرآورده‌ها و پایگاه‌های ارسال کننده پلاسما می‌باشد که تائید می‌کند پلاسماهای ارسالی از پایگاه‌های کشور مطابق استاندارد رایج سازمان انتقال خون در پایگاه‌ها تهیه شده و مستندات توسط حوزه معاونت فنی و کنترل کیفی بررسی گردیده و مناسب جهت قرار گرفتن در فرآیند تولید می‌باشد. گواهی سلامت توسط مدیر عامل سازمان انتقال خون ایران تائید می‌گردد.

پیروی از اصول GMP

Dr. Safari Fard

تولید پلاسما برای پالایش مطابق با اصول صحیح تولید(GMP) باید به عنوان یک بخش جدایی ناپذیر از روند تولید فرآورده های پلاسما محسوب گردد. اطمینان از ایمنی و کیفیت تک تک پلاسما های اهدا شده حائز اهمیت است زیرا هر پلاسما ی اهدایی با مقدار زیادی از پلاسما های دیگر مخلوط شده و از آن ها داروهایی تولید می شود که به صدها بیمار تزریق می گردد. ویژگی های به کار گرفته شده بوسیله مؤسسات خون برای جمع آوری، آزمایش و فرآوری پلاسما برای پالایش باید به طور دقیق توسط مراکز پالایش کننده پلاسما تعریف و مشخص شده و توسط مؤسسات قانونی ناظر، تائید شده باشد. این الزامات مرتبط با پالایش پلاسما ممکن است با الزامات پلاسمای تزریقی به بیماران متفاوت باشد.

روند صنعتی پالایش پلاسما باید باید تحت شرایط بهداشتی دقیق در مؤسساتی که مجوز دارند انجام شود. مراحل تولید مورد استفاده برای جداسازی اجزاء مختلف در یک روند مداوم و یک پارچه مطابق با اصول GMP انجام می گیرد. اجزاء اصلی که بوسیله رسوب در سرما cryoprecipitation و رسوب توسط اتانول سرد cold ethanol precipitation به دست می آیند به محصولات درمانی مختلفی تبدیل می شوند که بوسیله کروماتوگرافی تخلیص میگردند. در طی روند تولید برای غیر فعال سازی یا حذف ویروس های پوشش دار یا بدون پوشش که ممکن است بصورت بالقوه در ماده اولیه (پلاسما) وجود داشته باشند مراحل پیش بینی شده و اعتبار سنجی باید بکار گرفته شوند. مطالعات تجربی نشان می دهند که مراحل متعدد پالایش پلاسما با حذف پریون ها ارتباط دارد. هنگام استفاده از فن آوری های رایج تولید و تحت نظارت دقیق، فرآورده های پلاسمایی به سطح بالایی از کیفیت و ایمنی می رسند.

فرآیند صنعتی پالایش پلاسما باید تحت شرایط بهداشتی بسیار در تجهیزات (استقرار پالایش پلاسما) منطبق با اصول GMP اجرا گردد. امکانات باید دارای مجوز باشند و به طور منظم از سوی مقامات مسئول نظارتی مورد بازرسی نظارتی قرار گیرند، همچنین ارائه مجوز بازاریابی برای محصولات الزامی است. در هر مرکز دارویی، برخی از جنبه ها مهم است که غالبا باید در طراحی و بهره برداری از یک کارخانه پالایش پلاسما وجود داشته باشد. توجه خاص GMP با توجه به ماهیت بیولوژیکی و فرآیند تولید این محصولات بر این واقعیت است که مجموع پلاسماهای خام، ماده مورد نیاز برای تولید طیف وسیعی از مشتقات [۳۹] است. برای مثال، طراحی دقیق تاسیسات برای اطمینان از روند منطقی درمورد محصولات، اپراتورها، مواد زائد و غیره، برای جلوگیری از خطرات ناشی از آلودگی های متقاطع، به ویژه پس از ویروس زدایی است. در پالایش ترجیحا باید نواحی خاصی برای ویروس زدایی درانتهای مراحل اختصاص داده شده باشد. عدم امکان برای عقیم سازی ترمینال باکتریایی در پروتئین ها نظارت دقیق بر فیلتراسیون آسپتیک و مراحل مربوط به فرآیند پالایش را ایجاب می کند.

[39] WHO:Quality Assurance of Pharmaceuticals. A Compedium of
Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection , Volumn 2, Second Updated Edition. Geneva, WHO, 2007

Dr. Safari Fard

پلاسمای انسانی به عنوان یک منبع برای تولید مقدار زیادی از فرآورده های دارویی که برای درمان بیماری ها و صدمات تهدید کننده سلامت، مانند خونریزی و بیماری های ایمنولوژیک مورد استفاده قرار می گیرد. روند صنعتی چند مرحله ای برای جداسازی پروتئین های پلاسمایی و دارویی گوناگون به عنوان پالایش شناخته می شود. سری های کاری (batches) پالایش پلاسما دارای حجمی معادل ۴۰۰۰-۲۰۰۰ لیتر هستند که از مخلوط کردن پلاسمای به دست آمده از هزاران اهدا کننده بدست می آید.تهیه پلاسما برای پالایش مطابق با اصول GMP ،یکی از عناصر کلیدی در کیفیت و ایمنی فرآورده های دارویی مشتق از پلاسما است. خصوصیات کیفی پلاسما برای پالایش باید توسط مؤسسات پالایش کننده پلاسما به طور دقیق تعریف شده و توسط مؤسسات نظارتی تائید شده باشد.

معیار های ویژه برای کنترل خطرات عفونی شامل این موارد می باشند:

۱) معیار های انتخاب اهدا کننده خون و پلاسما

۲) روش های جدید استفاده برای آزمایش خون و پلاسمای اهدایی

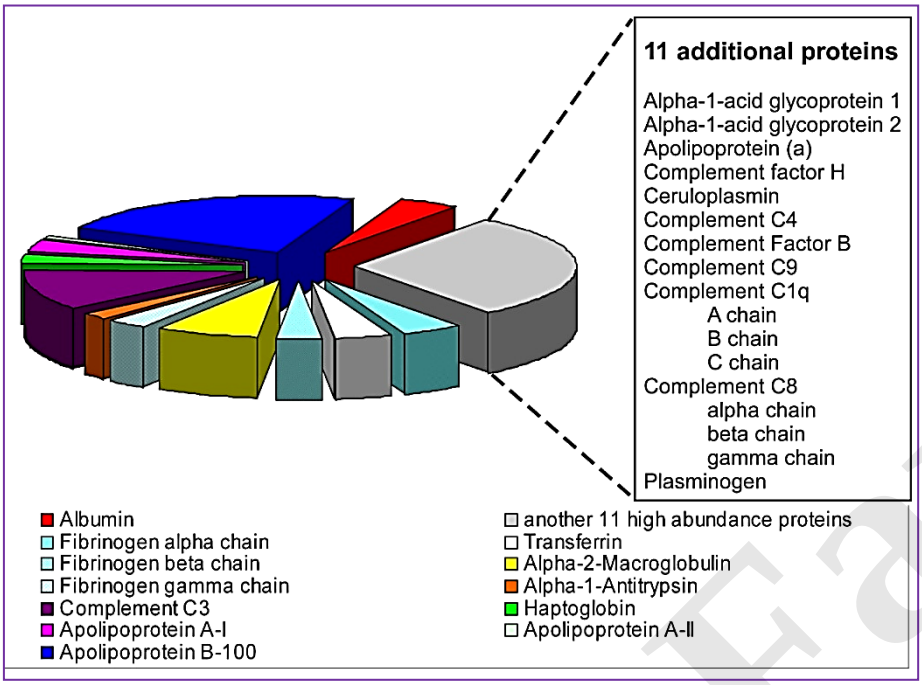
۳) بررسی اپیدمیولوژیکی جهت اهدا کننده

۴) رعایت اصول GMP بوسیله مؤسسات خون

۵) وجود سیستم اطلاعات بعد از اهدا خون

سایر جنبه های کیفی که ممکن است بر روی میزان کیفیت یا میزان فرآورده های پالایش شده تاثیر بگذارند، شامل پارامترهای عملیاتی مورد استفاده برای جداسازی پلاسما ، میزان منجمدسازی و دمای نگه داری پلاسما می باشد.

Dr. Safari Fard



پلاسما، منبع فرآورده های دارویی گوناگون

پلاسمای انسانی، ممکن است به عنوان محصول دارویی مورد استفاده قرار گیرد (که به نام پلاسمای بالینی/کلینیکی یا پلاسمای منجمد تازه FFP شناخته می شود) و یا به عنوان ماده اولیه برای تولید محصولات پالایش شده دارویی به کار رود (که به نام فرآورده های پلاسمایی و یا مشتقات پلاسمایی نامیده می شود). این ماده پیچیده زیستی، شامل صدها پروتئین است که اعمال فیزیولوژیکی زیادی را پوشش می دهند. نقش بسیاری از ترکیب ها ی آن هنوز شناخته شده نیست. قسمت عمده ای از پروتئین ها ، یعنی آلبومین و ایمونوگلوبولین IgG در حدود ۳۵ و ۱۰ گرم در لیتر می باشد ، که حدود ۸۰٪ کل پروتئین های پلاسما را تشکیل می دهد. مقادیر کمی از پروتئین ها شامل مهار کننده های پروتئازی ، مثل آلفا- یک آنتی تریپسینAAT (۱/۵گرم در لیتر) و آنتی ترومبین AT (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) و فاکتورهای انعقادی، مثل فاکتور هشتFVIII (در حد چند نانو گرم در لیتر) در پلاسما موجود می باشند که دارای فعالیت فیزیولوژیکی مهمی می باشند.

مشتقات پلاسما به فرآورده هایی می گویند که از حجم بزرگی از پلاسمای جمع آوری شده از اهدا کنندگان مختلف استخراج می شوند مصرف اصلی پلاسما در پالایش پلاسما (Fractionation) شامل استخراج وخالص سازی صنعتی پروتئین ها و عرضه آن ها به صورت دارو می باشد. مهمترین مواد موجود در پلاسمای انسانی که به صورت دارو در اختیار بیماران قرار می گیرند. پروتئین های مختلف پلاسما هستند که بدلیل تنوع فراوان، می توانند در بهبود یا رفع کمبود در بیماران نقش بسزایی داشته باشند.

نقش اصلی پروتئین‌های مشتق از پلاسما که در پزشکی مصارف درمانی دارد عبارتند از:

Dr. Safari Fard

- جایگزین نمودن برخی از مولکول‌ها که بصورت مادرزادی یا اکتسابی در بیماران کاهش یافته است مثل مصرف فاکتور هشت انعقادی در بیماران هموفیل A
- جلوگیری یا کند کردن روند بیماری که معمولاً وابسته به سیستم ایمنی است مانند استفاده از ایمونوگلوبولین اختصاصی ضد Rh برای جلوگیری از ایجاد حساسیت در مادرانی که Rh منفی داشته و نوزاد Rh مثبت بدنیا آورده اند یا تزریق ایمونوگلوبولین وریدی در بیمارانی که از ITP (Idiopathic thrombocytopenia Purpura) رنج می‌برند.

اگرچه بیشتر از ۳۰۰ پروتئین مختلف در پلاسما وجود دارد، در حال حاضر فقط ۲۵ تای آن ها برای اهداف درمانی شناخته شده و از لحاظ اقتصادی قبل دسترس است. این داروها برای درمان بیماری های تهدید کننده زندگی یا صدمات بدنی مانند خونریزی و اختلالات انعقادی، بیماری های ایمونولوژیکی، موارد عفونی و بیماری های تحلیل برنده بافتی مورد استفاده قرار می گیرند. مهمترین فرآورده های مشتق از پلاسما فاکتورهای انعقادی مانند فیبرینوژن، کنسانتره فاکتورVIII،کنسانتره فاکتورIX، مخلوط کنسانتره کمپلکس پروترومبین،کنسانتره فاکتور VIIa، کنسانتره فاکتور von willebrand و ترومبین، آلبومین، ایمونوگلوبولین های چند ظرفیتی و فوق ایمنی (یا اختصاصی)، چسب ها (selants) و مهار کننده های پروتئاز هستند. [۴۰] محصولات کمتر شایع آنتی ترومبین برای فقر ارثی یا اکتسابی، مهار کننده های پروتئاز مانند کنسانتره مهار کننده C-1 استراز برای آنژیو ادم ارثی، آلفا-۱ آنتی تریپسین برای نقص مادرزادی و فیبروز کیستیک، پروتئین C فعال برای نقص مادر زادی و عفونت، کنسانتره فاکتور XI برای نقص مادرزادی، کنسانتره فاکتور VII برای نقص مادرزادی، کنسانتره فاکتور XIII برای نقص مادرزادی، چسب ها (selants) مانند چسب فیبرین به عنوان عامل منعقد کننده و آپوترانسفرین به عنوان پروتئین هدف برای شیمی درمانی و یا برای کمبود ترانسفرین می باشند.

محصولات تازه با پتانسیل درمانی که در حال توسعه هستند شامل کنسانتره فاکتور V و کنسانتره فاکتور X برای نقص مادرزادی، محلول هموگلوبین برای حمل و نقل اکسیژن، هاپتوگلوبین برای درمان سوختگی، لکتین اتصالی مانوز برای فقر ایمنی، a- اسید گلیکوپروتئین به عنوان عامل ضد عفونی، Butyrylcholine esterase برای جبران سوء مصرف کوکائین، پروتئین C-reactive به عنوان عامل ضدباکتری و hemopexin برای درمان همولیز می باشند. علاوه بر این تحولات، تحقیقات و تلاش مداوم جهت استخراج پروتئین بیشتر از پلاسما برای درمان بیماران در حال انجام است.[۴۱]

[40] Cheraghali AM, Abolghasemi H. Improving availability and affordability of plasma-derived medicines. Biologicals. 2010 Jan;38(1):81-6.
[41] Paul F. W. Strengers, Clinical application of plasma derived medicines: current situation and future trend, IRANIANJOURNAL OF BLOOD AND CANCER, volume3 number 3, 159-169, 2011

Dr. Safari Fard

فرآورده های پلاسمایی

- **پلاسمای منجمد تازه (Fresh Frozen Plasma–FFP)**

برای تهیه پلاسمای منجمد تازه، کیسه های خون کامل را با دور تند سانتریفیوژ کرده و پلاسما را جدا می کنند. سپس پلاسمای جدا شده را به سرعت منجمد می نمایند. انجماد بایستی در سیستمی صورت گیرد که پلاسما در ظرف مدت یک ساعت در برودت کمتر از ۳۰- درجه سانتی گراد منجمد شود. برای تهیه این فرآورده باید حداکثر تا ۶ ساعت بعداز اهدای خون اقدام کرد. خون هایی که زمان جمع آوری آن ها بیش از ۱۰ دقیقه طول بکشد برای تهیه فرآورده های پلاسمایی جهت مصرف مستقیم بالینی مناسب نیستند. روش تهیه باید قابل اطمینان بوده تا فرآورده دارای حداکثر فاکتورهای انعقادی و حداقل عناصر سلولی خون(گلبول قرمز , پلاکت و گلبول سفید) باشد.

واحدهای خون کاملی که برای تهیه FFP بکار می روند باید در حین فرآیند خون گیری با ماده ضد انعقاد به خوبی مخلوط شوند چون هرگونه فعالیت سیستم انقعادی باعث کاهش فعالیت این فاکتورها در پلاسمای حاصل خواهد شد. این فرآورده همانند یک پلاسمای نرمال دارای فاکتورهای انعقادی پایدار (۲و۷و۹و۱۰)، آلبومین و ایمونوگلوبولین می باشد و حاوی حداقل ۷۰٪ فاکتور VIII اولیه و نیز به همین مقدار از سایر فاکتورهای انعقادی ناپایدار (مانندV) می باشد.

پایداری محصول بستگی به دمای نگه داری آن دارد. دمای مطلوب ۳۰- درجه سانتی گراد یا پائین تر است ولی می توان در ۱۸- درجه سانتی گراد نیز نگه داری کرد که چنانچه در این برودت نگه داری شود می توان تا یکسال به عنوان منبعی غنی از فاکتورهای انعقادی پایدار و غیر پایدار از آن استفاده کرد.

Dr. Safari Fard

در هنگام استفاده از FFP باید آن را در ۳۷ درجه سانتی گراد ذوب و پس از ذوب شدن در عرض ۲ تا ۳ ساعت مصرف کرد. چنانچه پلاسمایی را که پس از ذوب شدن مورد استفاده قرار نگیرد، می توان در یخچال در دمای ۱ تا ۶ درجه سانتی گراد قرارداد و تا ۲۴ ساعت نیز از آن به عنوان پلاسمای تازه بهره برد. هر واحد پلاسمای تازه بین ۲۰۰ تا ۲۸۰ سی سی حجم داشته و هر سی سی از آن دارای ۰/۷ تا ۱ واحد فعالیت انعقادی از هر کدام از فاکتورهای انعقادی است. علاوه بر این، هر سی سی FFP تازه حاوی ۱ تا ۲ میلی گرم فیبرینوژن است. در تزریق پلاسما احتیاجی به کراس مچ نیست ولی هم گروهی سیستم ABO بین اهدا کننده و گیرنده را باید رعایت کرد و چنانچه پلاسمای هم گروه بیمار یافت نشود، می توان از پلاسمای اهداکننده گروه AB به عنوان دهنده همگانی پلاسما استفاده نمود، چون این افراد فاقد آنتی A و آنتی B هستند.

میزان درمانی پلاسما جهت تصحیح فاکتورهای انعقادی ۸ cc تا ۱۰ cc به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار است و در هیچ زمانی نباید بیشتر از ۱۰ تا ۱۵ سی سی به ازای هر کیلوگرم مورد استفاده قرار گیرد چون باعث افزایش حجم خون در بیمار شده و سبب بروز اختلالات قلبی ریوی می شود.

مهم ترین کاربردهای پلاسمای تازه منجمد:

۱) در بیمارانی که کاهش همزمان چندین فاکتور انعقادی دارند مانند بیماری های کبدی: میزان فاکتورهای انعقادی به ویژه فاکتورهای وابسته به ویتامین k که عبارت است از پروتئین C , پروتئین S و فاکتورهای ۲و۷و۹و۱۰ در بیماری های کبدی کاهش می یابند و باعث افزایش زمان پروترمبین (PT) می شوند . هنگامی که آزمایش زمان پروترومبین بیمار بیش از ۱۶تا۱۸ثانیه شود و PTT بیمار بیش از ۵۵ تا ۶۰ ثانیه شود احتیاج به تزریق FFP است چون در غیر این صورت امکان خونریزی در بیمار وجود دارد.

۲) متعاقب ترانسفوزیون ماسیو وتعویض خون: چنانچه بیمار حجمی معادل حجم خون خود در کمتر از ۲۴ ساعت دریافت کند به آن ترانسفوزیون ماسیو گویند. در ترانسفوزیون ماسیو، فاکتورهای انعقادی و پلاکت های بیمار با تزریق خون رقیق شده و غلظت کاهش می یابد. بنابراین در این موارد به علت پدیده رقت امکان خونریزی وجود دارد و توصیه می شود که در این حالت به ازای هر ۵ واحد تزریق خون یک واحد FFP و پلاکت نیز تزریق شود .

۳) بیماران مبتلا به انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC): در بیماران مبتلا به DIC به علت مصرف شدن فاکتورهای انعقادی و پلاکت ها گرایش به خونریزی به وجود می آید و در این حالت باید به این بیماران FFP و پلاکت تزریق کرد. در DIC غلظت فاکتورهای انعقادی ۵ ، ۸ و فیبرینوژن بشدت کاهش می یابد چنانچه غلظت فیبرینوژن کمتر از ۸۰ میلی گرم درصد باشد تزریق FFP یا کرایو توصیه می شود.

Dr. Safari Fard

۴) جبران سریع فاکتورهای انعقادی در بیمارانی که میزان زیادی وارفارین مصرف کرده اند: در بیمارانی که وارفارین مصرف می کنند میزان کارایی فاکتورهای ۲و۷و۹و۱۰ کاهش می یابد لیکـــن چنانچه بیماران فوق خونریزی داشته یا به عمل جراحی فوری نیاز داشته باشد می توان با تزریق پلاسمای تازه فاکتورهای فوق را در بیمار به سرعت جبران نمود.

۵) جایگزینی با پلاسمای بیمار در مبتلایان به سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) و ترومبوتیک

- **رسوب کرایو (Cryopversiptate)**

کرایو بخشی از پلاسمای تازه بوده که در سرما غیر محلول است. برای تهیه این فرآورده نخست باید حداکثر ظرف ۶ ساعت پس از اهدای خون FFP را تهیه کرد. انجماد کامل واحدهای پلاسما نباید بیش از یک ساعت به طول بکشد. پلاسمای تازه منجمد در ۱۸- درجه سانتی گراد و یا ترجیحاً در ۳۰- درجه سانتی گراد نگه داری می شود. حداکثر زمان استفاده از FFP یکسال است. در عرض این مدت یکسال، در هر زمان می توان از آن کرایو تهیه کرد. واحدهای FFP که برای تهیه کرایو به کار می روند باید حداقل ۲۰۰ سی سی حجم داشته باشند. چنانچه FFP در حرارت ۴ درجه سانتی گراد ذوب شود، تولید رسوب سفید رنگی به نام کرایو می کند. پلاسمای ذوب شده در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه با دور تند سانتریفیوژ شده و سپس قسمت اعظم پلاسمای فاقد کرایو- Cryo poor plasma CPP را به یکی از کیسه های اقماری منتقل کرده و تنها ۱۰ تا ۱۵ سی سی از آن را روی رسوب کرایو باقی می گذارند.

کرایو را پس از تهیه باید هرچه زودتر مصرف نمود و یا حداکثر در عرض دو ساعت پس از تهیه در دمای ۳۰- درجه سانتی گراد منجمد کرد. کرایو باید از طریق فیلتر ۲۰۰-۱۷۰ میکرونی (صافی استاندارد) تزریق شـود. کیســه های کـرایو و FFP را بـاید به صورت افقی منجمد و آن ها را به حالت عمودی نگه داری کرد. فرآورده در دمای ۳۰- درجه سانتی گراد و حداکثر تا یکسال قابل نگه داری است.

هر کیسه کرایو در برگیرنده اجزا مختلف زیر است:

۱) فاکتور ۸ انعقادی: ۱۲۰-۸۰ واحد

۲) فاکتورفون ویلبراند: ۴۰ تا ۷۰٪ غلظت اولیه

۳) فاکتور ۱۳: به میزان ۲۰ تا ۳۰ درصد غلظت اولیه

۴) فیبرینوژن: ۱۵۰ تا ۲۵۰ میلی گرم

۵) فیبرونکتین: حدود ۵۵ میلی گرم

Dr. Safari Fard

میزان مصرف کرایو معمولاً یک واحد (کیسه) به ازاء هر ۷ تا ۱۰ کیلوگرم وزن بدن می باشد. برای مصرف، ابتدا کرایو باید در ۳۷ درجه سانتی گراد ذوب شود و پس از ذوب شدن نباید دوباره منجمد گردد و لازم است هر چه سریع تر مصرف شود. پس از ذوب شدن فقط تا ۴ ساعت در دمای اتاق قابل نگه داری و مصرف و در صورت عدم مصرف به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۶-۱ درجه سانتی گراد قابل نگه داری است.

مهم ترین کاربردهای اصلی کرایو،کمبود فیبرینوژن (اکتسابی یا مادرزادی)، بیماری فون ویلبراند، کمبود فاکتور سیزده انعقادی، و هیپرفیبرینوژنولیز می باشند. کاربردهای احتمالی کرایو، خونریزی در بیماران اورمیک، هموفیلی A (در صورتی که فاکتور VIII:C کنسانتره در دسترس نباشد) و موارد کاهش شدید فیبرونکتین هستند. فیبرونکتین گلیکو پروتئینی است که به عنوان اپسونین عمل می کند و تصور می شود که باکتری ها را می پوشاند و بدین وسیله باکتری ها به راحتی توسط فاگوسیت ها از بدن پاک سازی می شوند. در بیماران دچار سوختگی و مبتلا به شوک تروماتیک، فیبرونکتین به شدت کاهش می یابد در نتیجه درمان جایگزین با استفاده از کرایو در بیمارانی که کمبود شدید فیبرونکتین دارند ممکن است به معکوس شدن روند سپتی سمی در این بیماران کمک کند.

- **آلبومین**

آلبومین فراوان ترین پروتئین موجود در پلاسما است که در حفظ اسمولاریته (Osmolarity) خون نقش اساسی دارد. آلبومین در کبد ساخته می شود و غلظت آن در خون ۴۰ mg/ml است که ۴۰ درصد آن در نقل و انتقال ملکول‌های دیگر نقش دارد. آلبومین از زنجیره‌ای از ۵۸۵ آمینواسید تشکیل شده و با ۱۷ پل دی سولفیدی ایجاد یک پروتئین کروی نسبتاً پایدار می‌نماید. با توجه به وزن مولکولی حدود ۶۶۵۰۰ آلبومین، حدود ۸۰٪ فشار آنکوتیک کلوئیدی خون را سبب می‌شود

آلبومین از لحاظ کمی مهم ترین پروتئین پلاسما می باشد. غلظت ۵-۴ گرم آلبومین بروزن بدن (کیلو گرم)، برابر ۴۴-۳۸ گرم آلبومین بر پلاسما (لیتر) است. توزیع در بخش داخل عروقی ۴۵-۴۰٪ و درفضاهای خارج عروقی ۶۰-۵۵٪ است .آلبومین دارای ویژگی های هیدروفیلی قوی می باشد و ۱ گرم آلبومین به۱۸ میلی لیتر آب متصل می شود. با توجه به ساختار خاص آن، عبورآلبومین از غشای مویرگی و حفظ فشار اسمزی کلوئیدی و ساختار سه بعدی آن به اتصال مواد فارماکولوژیک و فیزیولوژیک کمک می کند.

در بدن انسان بین ۳۰۰ تا ۵۰۰گرم آلبومین وجود دارد و روزانه ۱۵ گرم (۲۰۰ میلی گرم برای هر کیلو وزن بدن) آلبومین در کبد ساخته می شود. هر جا که بدن محتاج به آلبومین بیشتری باشد تولید آلبومین با مصرف مواد مغذی تا ۲ برابر بالا می رود. نیمه عمر آلبومین ۲۰ روز است و ۴ درصد آلبومین بدن روزانه تخریب و تجدید می شود.

Dr.Safari Fard

آلبومین انسانی ۸۰-۶۰٪ از فشار اسمزی کلوئیدی را حفظ می کند و نقش مهمی در انتقال مایع خارج عروق و فضاهای داخل عروقی به عنوان مثال افزایش دهنده حجم دارد. حمل و نقل و عملکرد اتصالی آلبومین شامل مواد آندوژن از قبیل بیلی روبین، اسیدهای چرب، فلزات، و هورمون ها است. این عملکرد ها برای جلوگیری از اثرات سمی بیلی روبین و حلالیت اسیدهای چرب آزاد در پلاسما مهم هستند. حمل ونقل و عملکرد اتصالی برای مواد خارجی مانند داروها، بر فعالیت های درمانی آن ها دارد. نقش پاک کنندگی آلبومین به عنوان مثال از بین بردن رادیکال ها و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی است. در نهایت، آلبومین برای جلوگیری از تغییرات در غشاءسلولی حائز اهمیت است. دیگر خواص حفاظتی آلبومین از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی، میل اتصال، مهار آپوپتوزیس و تنظیم پاسخ التهابی مهم هستند

آلبومین آخرین جزء بدست آمده در پروسه پالایش پلاسما و یکی از رایج ترین فرآورده های مشتق از آن است. با فهم بهتر پاتوفیزیولوژی بیماری ها، استفاده از آلبومین در روندهای بالینی بیشتر مورد چالش قرار گرفته و علی رغم گذشت شش دهه از تحقیقات بالینی، ارزش تجویز آلبومین به مقدار زیادی مورد پرسش واقع شده است. به هر حال کاربردهای رایج آلبومین شامل درمان جایگزینی حجم، افزایش فشار آنکوتیک کلوئیدی، حفظ سطوح آلبومین سرم (در موارد هیپوآلبومینمی) به عنوان یک مولکول ناقل، پاک کننده رادیکال های آزاد و حفظ یکپارچگی غشایی، مدیریت تغییرات مایعات به عنوان عامل اسموتیک در بیماران دچار سوختگی شدید و بیماری های کبدی همراه آسیت می باشد. [۴۲]

از آنجا که آلبومین در شخص سالم نمی تواند مویرگ ها را ترک کند لذا نقش کلیدی در نگه داری فشار آنکوتیک در عروق خونی دارد. فشار آنکوتیک نیرویی است که آب را از محلول های با غلظت کمتر به محیط های با غلظت بیشتر، از راه یک غشاء تراوای انتخابی می کشد. غلظت آلبومین در جریان خون بیشتر از بیرون آن است، در نتیجه آب بدرون عروق خونی کشیده می شود. آلبومین آب را جذب می کند و این در عروق خونی باقی مانده و به بافت ها نشت نمی کند. در این راه مقدار آب در جریان خون تقریبا" ثابت و پایدار باقی می ماند.

آلبومین مسئول حمل و نقل مواد در خون، هم مواد داخلی بدن و هم مواد خارجی مانند داروها می باشد. عمل کرد دیگر آلبومین نگه داری سیالیت خون است. آلبومین برای درمان و جلوگیری از اشکال متفاوت شوک برای مثال در هنگام از دست دادن خون یا اتساع عروق که حجم خون گردشی ناکافی است و برای اطمینان از جریان کافی خون به بافت ها تجویز می گردد. کم شدن حجم خون ممکن است در نتیجه خونریزی حاد، بعنوان مثال در نتیجه جراحی ، سوختگی یا مسمومیت خونی باشد.

[42] Rajnish KJ, Chakravorty N, Chakravorty D, Bhattacharya PK, Yadava A, Agarwal RC. Albumin: an overview of its place in current clinical practice. Indian Journal of Anaesthesia 2004;48:433–6.

Dr. Safari Fard

دو نوع عمده از محلول های آلبومین وجود دارد: آلبومین ۵-۴٪ و آلبومین ۲۵-۲۰٪ است. آلبومین ۵-۴٪با ایمنی به عنوان افزایش دهنده حجم استفاده می شود. باید توجه داشت از بهترین جایگزین های پلاسما در مواقع خونریزی، آلبومین ۵٪ است که جهت بالا بردن حجم خون مصرف می‌شود و تا حد امکان باید از مصرف پلاسما اعم از CPP و FFP جلوگیری شود، زیرا این فرآورده‌ها نیز مانند خون کامل خطر انتقال انواع بیماری‌ها مانند HIV، HCV،HBV را دارا می‌باشند. مصرف آلبومین ۵٪ بیش از آلبومین ۲۰٪ است و در اکثر موارد، آلبومین ۵٪ می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد زیرا غلظت تقریباً مشابه میزان غلظت آلبومین در پلاسما می‌باشد و غلظت بالاتر آن (۲۰٪) در حالات خاصی مانند سیروز کبدی، سندروم نفروتیک و بیمارانی که بواسطه نارسایی قلبی، نمی‌توانند افزایش با عروق را تحمل کنند و نوزادان نارس و بیماران دیالیزی که باید آلبومین یا میزان سدیم کم بکار ببرند، مصرف می‌گردد. لذا در مواردی که آلبومین ۵٪ می‌تواند مصرف شود بهتر است از آلبومین ۲۰٪ استفاده نشود.

چون ویسکوزیته آلبومین پائین است ، محلولی مناسب برای راه‌اندازی پمپ‌های دیالیز و دستگاههای قلب مصنوعی محسوب می شود. به همین دلیل متخصصین کودکان نیز مصرف آلبومین را ، بجای پلاسما که در آن فیبرینوژن عامل اصلی افزایش ویسکوزیته است ، در درمان hyperviscosity ترجیح می‌دهند.

یکی از موارد مصرف جدیدتر آلبومین استفاده از آن بعنوان پایدارکننده در محصولات فاکتور هشت نوترکیب و همچنین فاکتورهایی است که با استفاده از آنتی بادی منوکلونال تولید می‌گردند.

مهمترین کاربرد های آلبومین

- کاهش حجم خون(Hypovolemia)
- کاهش آلبومین خون (Hypoalbuminemia)
- پیشگیری از افت حجم خون در سیروز (Prevention of Central Volume Depletion in Cirrhotic Ascites)
- بیماری ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome)
- بیماری OHSS (Ovarian Hyperstimulation Syndrome)
- بیماری همولیتیک نوزادان HDN (Hemolytic Disease of the Newborn)
- ناشی از ادم ناشی از نفروز حاد کلیه (Acute Nephrosis)
- شوک عفونی(Septic shock)

Dr. Safari Fard

درحال حاضر سالانه بیش از ۲۵۰ تن آلبومین در جهان مصرف می شود. به عنوان مثال در بیمارستآن های ژاپن برای هر یک میلیون نفر جمعیت ۱۰۰۰ کیلوگرم آلبومین مصرف می شود. در حالی که در آلمان و بلژیک ۵۰۰ کیلوگرم و در انگلستان تنها ۱۵۰ تا ۲۰۰ کیلوگرم آلبومین برای یک میلیون نفر مصرف می‌گردد. اختلافات اقتصادی یکی از عوامل ایجاد چنین تفاوت‌هایی در الگوی مصرف باشد ولی بی شک عامل اصلی عدم آگاهی از کاربرد صحیح این فراورده پلاسمایی است.

پلاسمایی که جهت ساخت این محصول و ایمونوگلوبولین مصرف می شود شرایط کیفی ساده‌تری نسبت به پلاسمای مورد مصرف در تولید فاکتورهای شکننده و ناپایدار انعقادی دارد. بنابراین می‌توان پلاسمای جدا شده از گلبول قرمز خون‌های اهدایی را که دارای شرایط لازم برای FFP (پلاسمای تازه منجمد) نباشد برای تولید و ساخت آلبومین استفاده کرد.

آلبومین که از حجم‌های بالا و از مخلوط کردن تعداد زیادی پلاسمای اهدا شده تهیه می شود بصورت محصول نهایی در حرارت ۶۰°c برای ۱۰ ساعت پاستوریزه می‌گردد و تاریخچه نیم قرن مصرف آن نشانگر ایمنی کامل از نظر آلودگی های ویروسی است.

آلبومین سابقه بسیارخوبی از لحاظ ایمنی و قدرت اثر درمیان داروهای بیولوژیک دارد و بدین علت است که در سراسر دنیا تقاضا برای آن است.

روش‌های متعدّدی جهت خالص‌سازی آلبومین از پلاسمای انسانی پیشنهاد گردیده است که این روش‌ها مبتنی بر خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژی آن می‌باشد. از مهم‌ترین خواص آلبومین از نظر خالص‌سازی می‌توان از بار منفی آن در pH فیزیولوژیک و هیدروفیل بودن که حلالیت زیادی در آب به آن می‌بخشد یاد نمود. از جمله روش‌های پیشنهادی، استفاده از ریوانول- آمونیوم سولفات جهت رسوب دادن آلبومین می‌باشد. اساس روش مبتنی بر رسوب دادن بوسیله ریوانول و اضافه نمودن سدیم کلراید ۵٪ و بازیابی ریوانول بوسیله ذغال فعال و مرحله بعدی خالص‌سازی آلبومین بوسیله رسوب دادن با محلول‌های آمونیوم سولفات می‌باشد. روش دیگر استفاده از دی اتیل اتر بعنوان رسوب دهنده پروتئین می‌باشد که به علّت شدیداً آتش‌گیر بودن این ترکیب، از این روش زیاد استفاده نمی‌شود. همچنین می‌توان به استفاده از پلی اتیلن گلیکول- PEG اشاره نمود. گرچه بیشتر این روش ها به همراه استفاده از اتانول سرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگری که اخیراً مورد استفاده قرار گرفته، کروماتوگرافی تبادل یونی و رسوب دادن با PEG می‌باشد که در این روش از PEG 6000 و سفاروز استفاده می‌شود.

- **فاکتورهای انعقادی**

جلوگیری از خون ریزی پس از جراحت و کمک به بهبودی بدن، بستگی به انعقاد خون دارد. انعقاد طبیعی خون باعث محدود شدن کبودی بعد از جراحت شده و سبب توقف خونریزی به داخل ماهیچه ها و مفاصل که می تواند به دنبال جراحت های جزئی در اثر فعالیت های روزانه زندگی بوجود آید، می گردد. انعقاد طبیعی خون بستگی به فعل وانفعالات مواد داخل خون دارد. برخی از این ها، فاکتورهای انعقادی نامیده می شوند.اگر یکی از این فاکتورهای انعقادی به میزان کافی موجود نباشد ممکن است موجب خونریزی های طولانی شود. یک شخص مبتلا به هموفیلی دارای فاکتور انعقادی کمتر از حد طبیعی می باشد.

پیدایش لخته خون، مرکب از فیبرین، پلاکت ها و گلبول‌های قرمز حاصل میان کنش بیش از ۲۰ گلیکوپروتئین است. هردو مسیر انعقادی در جهت ایجاد لخته خون فعال می‌شوند و فاکتور VIII یک کوفاکتور[۴۳] غیر آنزیمی حیاتی و مهم در این مراحل پی در پی انعقاد[۴۴] است. کمبود فاکتورهای دیگر مثل فاکتور VII ، IX ، X ، II و کوفاکتور V نیز می‌تواند عامل خونریزی باشد. با این وجود به غیر از کمبود فاکتورهای VIII و IX سایر این خونریزی‌ها از نظر بالینی از اهمیت کمتری برخوردارند، لذا از نظر تولید صنعتی نیز تولید این فاکتورها اهمیت کم‌تری دارد.

بیشتر اختلالات ارثی انعقادی ناشی ازکمبود یک فاکتور انعقادی منفرد می باشد، که شایع ترین آن ها کمبود های فاکتورVIII (هموفیلی A)، فاکتور فون ویلبراندVWF ، و فاکتور IX (هموفیلی B) است. یک فرد مبتلا به هموفیلی نسبت به یک فرد عادی خونریزی سریع تری ندارد اما مدت آن طولانی تر است. همو فیلی اغلب منحصرا" روی مردان اثر می گذارد ودر همه جوامع یافت می شود. هموفیلی معمولا بوسیله بانوانی که خودشان مشکل خونریزی ندارند، منتقل می گردد. در حدود یک سوم افراد مبتلا به هموفیلی هیچ سابقه فامیلی از اختلال را ندارند.

هموفیلی A نوعی بیماری خونریزی دهنده مادرزادی است که حدوداً در ۷ الی ۱۰ مورد از هر ۱۰۰ هزار موالید ذکور مشاهده می‌گردد یا به عبارتی دیگر ۳ تا ۵ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر از کل جمعیت ظاهر می شود. این بیماری نیز مانند هموفیلی B از الگوی توارثی مغلوب و وابسته به جنس تبعیت می‌نماید. بهمین دلیل بیماری در مردان ظاهر می شود و زنان می‌توانند ناقل ژن معیوب باشند.

با شناخت ژن مربوط به VIII:C مشخص شده است که میزان (وقوع) جهش در این ژن بالا بوده بطوری که ۲۰ درصد از موارد بیماری مادرزادی بصورت جهش‌های "نو" (de novo) رخ می‌دهد و این پدیده عامل اصلی ثابت ماندن تعداد (موارد) بیماری علی رغم مرگ و میر این بیماران بعلت بیماری ایدز و خونریزی‌های شدید می‌باشد. در اکثر بیماران مبتلا به نوع شدید بیماری میزان فاکتور VIII کمتر از ۱

[43] Co-factor
[44] Coagulation cascade

درصد بوده و سابقه همآرتروز و هم توم و همچنین استعداد خونریزی‌های مغزی و شدت خونریزی بر اثر ضربه‌های خفیف گزارش شده است.

در مواردی نادر کمبود فاکتور VIII انعقادی بصورت اکتسابی دیده می شود که در واقع ناشی از اختلال در سیستم ایمنی است. این حالت که علت آن ظهور اتوآنتی‌بادی‌ها در گردش خون می‌باشد در بیماری هایی نظیر لوپوس، آرتریت رومائید، حاملگی و درمان بامتیل دوپا یا پنی‌سیلین مشاهده شده است.

دسترسی به فاکتورهای انعقادی خالص و تغلیظ شده که از اواسط سال‌های ۱۹۵۰ به بازار عرضه شده و به تدریج در سال‌های اخیر به صورت خالص تر و مؤثرتر تهیه گشته، بطور محسوسی درمان هموفیلی، آرتریت‌های وابسته به آن و در نهایت روند بیماری را بهبود بخشیده است. مقدار فاکتور VIII تزریقی کاملاً وابسته به شدت بیماری و میزان خونریزی است ولی هدف اصلی، رسیدن به میزان ۳۰٪ الی ۵۰٪ فاکتور هشت در گردش خون می‌باشد که به صورت تزریق فاکتور هشت، یک یا دوبار در روز انجام می گیرد به نحوی که مقدار فاکتور VIII به مقدار ۲۵-۱۵ درصد در هر بار تزریق افزایش دهد. هزینه فاکتورهای انعقادی به تنهایی ۵۰ تا ۸۰ درصد کل هزینه درمانی هموفیلی را تشکیل می‌دهد.

شدت هموفیلی

هموفیلی از لحاظ شدت متفاوت است و این تفاوت بستگی به مقدار فاکتور انعقادی موجود در خون دارد. همه افراد مبتلا در یک خانواده خاص، دارای یک میزان فاکتور انعقادی هستند. محدوده طبیعی FVIIIو FIX در صورتی که میزان متوسط برای جمعیت غیر هموفیل ۱۰۰٪ باشد، ۵۰٪ تا ۲۰۰٪ است .

در هموفیلی حاد، سطح FVIII یا FIX کمتر از ۱٪ است. خونریزی داخل مفاصل، ماهیچه ها وسایر بافت ها با کوچکترین یا حتی بدون هیچ جراحتی (خونریزی خود بخودی) و نیز با جراحی یا کشیدن دندان، می تواند رخ دهد. هموفیلی حاد نوع A از هر ۱۶۰۰۰ نفر یک نفر را مبتلا می کند. در هموفیلی متوسط، سطح فاکتور FVIII یا FIX بین ۱٪ تا ۵٪ می باشد. خونریزی بدنبال جراحت های کوچک و اعمال جراحی و کشیدن دندان رخ می دهد. در هموفیلی خفیف، سطوح فاکتور VIIIیا فاکتور IX بین ۶-۵۰ ٪ است.خونریزی معمولا" فقط با جراحت های بزرگ، اعمال جراحی و کشیدن دندان مرتبط است. تشخیص تا زمان بزرگسالی امکان ندارد، مگر هنگامی که خونریزی شدید غیر قابل توضیح بدنبال یکی از این وقایع رخ دهد.

Dr. Safari Fard

وراثت هموفیلی

هموفیلی یک اختلال ارثی انعقاد خون است. ژنی که که کنترل کننده تولید فاکتورهای انعقادی۸ و ۹ می باشد روی کروموزوم X حمل می شود. در هر بارداری که یک زن حامل ژن هموفیلی باشد، احتمال ۱ به ۲ وجود دارد که ژن هموفیلی انتقال پیدا کند و زمانی که اتفاق رخ دهد فرزند پسر هموفیل و فرزند دختر حامل ژن هموفیلی خواهد بود.

- هر پسر ۵۰٪ شانس ابتلا به هموفیلی دارد.
- هر دختر ۵۰٪ شانس ناقل بودن دارد.

اگر پدر هموفیل باشد همه دختران او ناقل خواهند بود وهیچ یک از پسرها هموفیل نخواهند بود.

- همه پسرها سالم خواهند بود.
- همه دخترها ناقل خواهند بود.

اگر مردی که هموفیل است با زنی که ناقل است ازدواج کند احتمال این که دختری هموفیل داشته باشد وجود دارد.

مدیریت هموفیلی

هموفیلی یک عارضه برای تمام طول عمر محسوب می شود که در حال حاضر هیچ درمانی برای آن وجود ندارد. هرچند با پیشرفت فراگیر مراقبت و تمهیداتی که در زمینه تهیه فاکتورهای انعقادی صورت گرفته، حتی برای افراد مبتلا به هموقیلی حاد این امکان وجود دارد که خونریزی را کنترل کرده و یک زندگی نسبتا" طبیعی داشته باشند. برای خونریزی های داخل مفاصل و ماهیچه ها وبرای همه نوع جراحی از جمله ختنه و کشیدن دندان، نیاز به درمان است. همچنین ممکن است برای خونریزی های داخلی سایر بافت ها وبعد از تصادف ها و جراحی ها هم درمان لازم باشد.

مدیریت هموفیلی نیازمند توجه ویژه از طرف مراکز سلامت ملی است. داروهای ضد هموفیلی گران بوده و بسته به شدت و نوع رژیم درمانی ممکن است ۴۵ تا ۹۳٪ هزینه درمانی را شامل شود. ابتلا توام به عفونت های HIV، HCV با افزایش مرگ و میر و بالا رفتن مصرف فاکتورهای انعقادی در بیماران هموفیل همراه است. [۴۵]

در حال حاضر دو روند اصلی برای درمان جایگزینی در بیماران هموفیل وجود دارد. در روش درمانی " هنگام نیاز On Demand" فاکتورهای انعقادی برای توقف خونریزی در هنگام نیاز مورد استفاده قرار می گیرند. اما در روش درمانی " درمان پیشگیری کننده Prophylactic "،

[45] Tencer T, Friedman HS, Li-McLeod J, Johnson K. Medical costs and resource utilization for hemophilia patients with and without HIV or HCV infection. Journal of Managed Care Pharmacy 2007;13:790–8.

Dr. Safari Fard

تجویز منظم فاکتورهای انعقادی برای پیشگیری از وقوع خونریزی صورت می گیرد. درمان پیشگیری کننده گرانتر از درمان هنگام نیاز است، اما باید توجه داشت در نوع دوم درمان، خونریزی قبل از اینکه درمانی صورت بگیرد رخ دهد.

جایگزینی فاکتور

هموفیلی بوسیله جایگزین کردن فاکتور ناقص انعقادی خون با محصولی که از پلاسمای اهداکننده انسانی و یا به صورت مصنوعی توسط مهندسی ژنتیک بدست آمده است، درمان می شود. درمان باید بلافاصله پس ازشروع خونریزی انجام شود. درد، اغلب پس از چند دقیقه تسکین می یابد. در بعضی موقعیت ها ممکن است نیاز به دوز های مجدد باشد، مثلا" اگر درد و تورم مفصل یا عضله ادامه پیدا کند و یا در زخم های دهان که خونریزی اغلب به مدت چند ساعت متوقف شده و سپس دوباره شروع می شود، وقتی که بخیه وجود دارد، یا پس از جراحت سر، نیاز به دوزهای مجدد است.

برنامه های تزریق خانگی بصورت گسترده در بسیاری از کشورها استفاده می شود. در این برنامه ها که تحت نظارت متخصصین و پرستاران بیمارستان ها است، به والدین یا بیماران آموزش داده می شود تا فرآورده های خونی را خودشان تزریق کنند. این عمل، درمان زود هنگام را تضمین کرده و به بیمار و خانواده استقلال می دهد. این کار همچنین باعث کاهش رفت و آمد بیمار به بیمارستان و در نتیجه کاهش بار مالی، احساسی و اجتماعی شخص مبتلا به هموفیلی، خانواده او و جامعه می شود.

فراهم سازی درمان سالم و موثر برای اختلالات انعقادی، یکی از اصلی ترین فعالیت های شرکت پالایش کننده پلاسما می باشد.

مهمترین داروهای انعقادی مشتق از پلاسما در سرتاسر دنیا، فاکتور هشت انعقادی (FVIII)، فاکتور نه انعقادی (FIX)، فاکتور فون ویلبراند، فیبرینوژن، چسب فیبرین (حاوی کنسانتره های ترومبین خالص و غنی از فیبرینوژن)، کنسانتره کمپلکس پروترومبین (PCC: مخلوط فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K شامل فاکتورهای انعقادی IX ، II ، X ، پروتئین C، پروتئین S و گاهی اوقات فاکتور VII)، فاکتور XIII ، کنسانتره فاکتور XI و کنسانتره های اختصاصی سرشار از فاکتور VII که حاوی مقادیر کاهش یافته از سایر فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K هستند، می باشند. کنسانتره های ترومبین انسانی تهیه شده توسط فعال کردن کنسانتره کمپلکس پروترومبین (PCC)، در بازار قابل دسترس بوده و به عنوان جزئی از چسب فیرینی[۴۶] مورد استفاده قرار می گیرد.

تشخیص کمبود اختصاصی یک فاکتورمعین بهترین راه است که اجازه انتخاب مناسب ترین محصول را به جای استفاده از کرایوپرسی پیتیت یا کنسانتره فاکتور VIII می دهد.

[46] Fibrin Sealant

گرایش های آینده

پیشگیری و درمان در منزل برای بیماران یکی از گرایش های عمده است، استفاده پیشگیرانه از محصولات پلاسمایی در درمان با فاکتورVIII، فاکتورIX ، کنسانتره فاکتور ون ویلبراند و ایمونوگلوبولین زیرجلدی، در حال افزایش است . درمان در منزل با این محصولات بیمار را قادر می سازد که مستقل تر باشند و بهبود کیفیت زندگی در حال افزایش است. مطالعات نشان داده اند که درمان در منزل دارای اثر مثبت تری به بستری در بیمارستان دارد، غیبت کمتر در مدرسه و محل کار، و ناتوانی کمتر ناشی ازآن موثرتر است.

افزایش نیمه عمر در گردش خون

با استفاده از محصولات جدید و مفید فاکتورهای ا نعقادی پیشرفته در مطالعات انجام شده بر روی افزایش زمان اقامت مولکول در بدن بیمار، بیمار را به کاهش تعداد تزریقات در هفته قادر ساخته که چالش عمده افزایش نیمه عمر فاکتور VIII در گردش خون است. برای یک فرد مبتلا به هموفیلی، این می تواند این مفهوم را برسانند که تعداد تزریقات را از سه به دو و یا حتی یک بار یک هفته کاهش داده است. یک روش، تغییر پروتئین فاکتور VIII در محل های اتصال آن به گیرنده های سلولی است که معمولا به حذف فاکتور VIII از گردش منجر می شود. مطالعاتی در حال انجام است که در آن گیرنده های درگیر در این فرآیند و از جمله بهبود مولکول فاکتور VIII باید طراحی شود. یکی دیگر از استراتژی ها در استفاده از فن آوری لیپوزوم PEGylated برای به دست آوردن زمان بقای طولانی مدت برای پروتئین فاکتور VIII می باشد. [۴۷] اولین آزمایش های بالینی در حال انجام است و در صورت موفقیت، به معنی یک بهبود عمده برای بیماران و خانواده هایشان این است که عمرشان طولانی تر خواهد شد. این هنوز روشن نیست که آیا افزایش نیمه عمر محصول و یا مکانیسم های دیگردر افزایش طول عمر نقش بازی می کند.

یکی دیگر از حوزه پژوهش با هدف دستیابی به فعالیت های بیشتر پروتئین فاکتورVIII می باشد. قوی تر شدن پروتئین فاکتور VIII ممکن است منجر به استفاده در یک دوز درمانی پایین تربشود و به این ترتیب ممکن است در هزینه صرفه جویی گردد.

اگر میزان فعالیت اختصاصی[۴۸] فاکتور هشت در پلاسما یک واحد باشد، این فعالیت در کرایو ۳۰ واحد خواهد بود. با وجود آن که مصرف پلاسما یا کرایوی لیوفیلیزه با کیفیت مناسب به هنگام خونریزی‌های حاد می‌تواند میزان فاکتور هشت را به اندازه‌ای افزایش دهد که خونریزی شدید یا خونریزی در هنگام اعمال جراحی را مهار نماید ولی این عمل به هیچ وجه از نظر درمانی کافی نخواهد بود. به همین

[47] Baru M, Carmel-Goren L, Barenholz Y, et al. Factor VIII efficient and specific non-covalent binding to PEGylated liposomes enables prolongation of its circulation time and haemostatic efficacy. Thromb Haemost. 2005;93(6):1061-1068
[48] Specific activity

دلیل در کشورهای پیشرفته این فرآورده‌ها علی رغم هزینه ناچیزشان با تولیدات صنعتی جدید که با استفاده از روش‌های ویروس زدایی از ایمنی بیشتری نیز برخوردارند کاملاً جایگزین شده اند. این مشتقات ممکن است دارای درجه خلوص متوسط یا بالا باشند که میزان خلوص آن ها از ۱۰ تا ۵۰ واحد در هر میلی‌گرم پروتئین در مورد داروهای با درجه خلوص بالا متغیر است. داروهای با درجه خلوص بالا را با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی تهیه می‌نمایند که در آن قسمت آنتی ژنیک فاکتور هشت و فاکتور ون ویلبراند بصورت یک مجموعه خالص می‌گردند. در روش‌هایی که از آنتی بادی های منوکلونال برای خالص سازی روی ستون‌های کروماتوگرافی میل ترکیبی[۴۹] استفاده می شود فعالیت فاکتور هشت به میزان ۲۰۰۰ واحد در هر میلی‌گرم پروتئین افزایش می‌یابد.

به نظر می‌رسد که فاکتور هشت نوترکیب که در رده‌های سلولی مختلف با روش‌های بیوتکنولوژی تولید می شود بسیاری از مسائل مربوط به فرآورده‌های پلاسما را حل کند. این نوع محصولات منبع فراوان و نامحدودی جهت تولید فاکتور خالص است که خطر انتقال آلودگی‌های ویروسی را نیز به همراه ندارد، در حالی که در مورد فرآورده‌های پلاسما خطر آلودگی احتمالی یک اهدا کننده از میان ۲۵۰۰۰ پلاسمای اهدایی جهت تولید ممکن است وجود داشته باشد. مطالعات بالینی وسیعی بر روی این محصولات انجام گرفته است که نتایج آن نشانگر مؤثر بودن و داشتن نیمه عمر طبیعی در بدن بیماران می‌باشد.

تنها مشکل این داروهای نوترکیب جدید در مقایسه با تولیدات پلاسمایی احتمال بیشتر ظهور آنتی بادی های علیه فاکتور VIII توسط آن ها است. چنین محصولات بیوتکنولوژی هنوز هزینه بسیار بالائی را در بر دارند. علی رغم آن که به نظر می‌رسد در کشورهای پیشرفته جهان این نوع محصولات بازار اصلی را به خود اختصاص دهند باید به خاطر داشت که سلامت داروهای حاصل از پلاسما که امروزه با روش‌های ویروس‌زدایی متعدد احتمال آلودگی در آن ها بسیار کاهش یافته، سیاست گزاران را حتی در پیشرفته ترین کشورها متوجه این امر می‌نماید که دسترسی کافی به داروی مناسب نباید تحت الشعاع هزینه‌های بی رویه فن آوری بسیار پیشرفته‌ای قرار گیرد که صرفه اقتصادی آن ها هنوز به اثبات نرسیده است.

افزایش مصرف ناشی از کاربرد روش‌های جدید درمان و پیشگیری برای بیماران هموفیل فاکتور هشت را بصورت محصولی مهم و کلیدی در مراکز پالایش پلاسما در کشورهای پیشرفته تبدیل نموده است. این مسایل میزان نیاز به پلاسمای اولیه را جهت پالایش پلاسما به مراتب افزایش داده به طوری که امروزه برای تهیه فاکتور VIII لازم تقریباً ۲۰ میلیون لیتر پلاسما در سال مورد نیاز است. این مقدار پلاسما به مراتب بیشتر از نیاز جهانی به پلاسما برای تولید آلبومین ، فاکتور IX و ایمونوگلوبولین است.

[49] Affinity chromatography

Dr. Safari Fard

- **فاکتور هشت انعقادی (Factor VIII)**

در کلیه روش‌های رایج تولید فاکتور VIII بدون در نظر گرفتن درجه خلوص نهایی آن، از رسوب کرایو (cryoprecipitate) بعنوان اولین مرحله تولید استفاده می شود. رسوب کرایو از ذوب کردن پلاسمای منجمد در درجه حرارت کنترل شده بدست می‌آید. کلیه پالایشگاه های صنعتی پلاسما، رسوب کرایو را بصورت انبوه (bulk) از صدها یا هزاران لیتر پلاسما تهیه می‌کنند. قبل از بازکردن کیسه‌های پلاسما آن ها را در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتی گراد قرار می‌دهند تا دمای آن ها به حدود ۷- درجه سانتی گراد برسد و پلاسما از جداره کیسه جدا شود این عمل، بازکردن کیسه‌ها را در مرحله بعد تسهیل می‌نماید. در روش‌های دیگر کیسه‌ها را برای چند ثانیه در ازت مایع قرار می‌دهند. پس از جدا کردن کیسه‌ها، پلاسمای منجمد در تانک‌های استیل پوشش دار در حرارت ۱/۵ تا ۳/۵ درجه سانتی گراد ذوب می شود. مقدار متوسط بازیافت رسوب کرایو از هر لیتر پلاسما معادل۶ تا ۱۰ گرم است. رسوب حاوی کرایو شامل تعدادی پروتئین های انعقادی، از جمله فاکتور انعقادی ۸ می باشد. این پروتئین اولین محصول بدست آمده از پالایش پلاسما است. رسوب کرایو را می‌توان در ۳۰- درجه سانتی گراد بصورت منجمد نگه داری کرد و یا بلافاصله در مسیر فرآیند تولید فاکتور هشت قرار داد. دربخش بالایی رسوب حاوی کرایو، مقدار معینی از پلاسمای فاقد کرایو[50] باقی می ماند که از آن فاکتور IX انعقادی و کمپلکس پروترومبین به دست می آید.

انجام روندهای کاری بر روی خون قبل از جداسازی اجزاء، سیکل انجماد و نگه داری پلاسما، به ویژه در حفظ نگه داری زنجیره سرد، می تواند بر روی بازیابی پروتئین ناپایدار به ویژه فاکتور VIII موثر باشد.[51]

بازیافت فاکتور هشت بستگی زیادی به کیفیت پلاسمای اولیه و همچنین روش‌های ویروس‌زدایی بکار رفته دارد. امروزه با روش‌های متداول می‌توان بطور میانگین مقدار ۱۳۰ تا ۲۰۰ واحد بین‌المللی فاکتور هشت را از هر لیتر پلاسما تخلیص نمود. واحد بین المللی به عنوان فعالیت فیزیولوژیکی موجود در یک میلی لیتر پلاسما تعریف می شود. عواملی که فعالیت فاکتور VIII را کاهش می دهند عبارتند از: روند رسوب در سرما(۳۰٪کاهش) ، تخلیص به روش کروماتوگرافی(۲۰٪ الی ۳۰٪ کاهش) و غیر فعال سازی ویروسی به روش حرارتی(۱۵٪ الی ۳۰٪ کاهش).

لازم به یادآوری است که میزان بازدهی کمپلکس پروترومبین/ PCC از هر لیتر پلاسما در حدود ۳۰۰ تا ۵۰۰ واحد بین المللی است (برحسب فعالیت فاکتور IX موجود در آن ذکر می‌گردد) که در مورد فاکتور IX خالص ۲۰۰ تا ۳۵۰ واحد بین المللی در هر لیتر پلاسما می‌باشد.

[50] Cryo-poor plasma
[51] WHO: Recommendations for the Production, Quality Control and Regulation of Plasma for Fractionation, 2005; available at http://www.who.int/bloodproducts

کمتر از یک قرن پیش متوسط طول عمر قابل انتظار برای یک بیمار هموفیلی ۱۰ سال بود. به عنوان نتیجه ی حاصل از توانائی های جدید در تولید فاکتور انعقادی ۸ و در دسترس بودن بیش از حد آن، در حال حاضر عمر متوسط و امید به زندگی در بین مبتلایان به هموفیلی بویژه در جوانان حالت نرمال داشته و این افراد می توانند به زندگی معمولی ادامه دهند.

مراحل تولید

- مرحله جذب (adsorption) مثلاً به هیدروکسید آلومینیوم یا رسوب‌گیری (مثلاً به PEG درحرارت ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی گراد) به منظور جداسازی فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K که در رسوب کرایو ممکن است محبوس شده باشند.
- مرحله ویروس زدایی (مثل استفاده از S/D یا پاستوریزاسیون)
- یک مرحله کروماتوگرافی با استفاده از کروماتوگرافی براساس تعویض یون، اندازه ملکولی یا استفاده از میل ترکیبی (ایمونوافینیتی) با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضدفاکتور VIII و آنتی‌بادی ضد VWF و سپس کروماتوگرافی تعویض یون به منظور جداسازی پروتئین‌های ناخالصی که درسرما رسوب می‌کنند (مانند فیبرینوژن ، فیبرونکتین و....) و در نتیجه تهیه فاکتور VIII خالص‌تر
- طی مراحل فرمولاسیون
- فیلتراسیون استریل با فیلترهای 0.22 mm
- تقسیم در شیشه‌های مناسب
- لیوفیلیزاسیون

- **فاکتور ون ویل براند**

چون در فاکتورVIII تخلیص شده از طریق کروماتوگرافی، تمام و یا قسمتی از VWF حذف می شود، محصولات فاکتورVIII موثر در درمان بیماری (VWD) خلوص پایینی دارند(خلوص متوسط) که طی مراحل رسوب دادن از رسوب کرایو تهیه می گردد و استخراج VWF و فاکتورVIII به نسبت بیش از ۱ می باشد. خلوص کم و مواد پروتئینی زیاد این محصولات از نظر کلینیکی ، انتخاب روش غیر فعال سازی ویروسی را به پاستوریزاسیون و یا حرارت خشک ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت محدود می کند. یک محصول VWF با خلوص بالا، به طور گسترده فاکتورVIII را خالی می کند بنابر این برای درمان بیماری ون ویل براند اختصاصی می باشد. این

Dr. Safari Fard

ماده به وسیله یک کروماتوگرافی سه مرحله ای(همراه شده با فرآیند تخلیص فاکتورVIII و فیبرینوژن) با استفاده از دو مرحله تعویض یونی و پولیش ژلاتین غیر متحرک (برای حذف فیبرونکتین) تهیه می شود.[۵۲] کاهش ویروسی به وسیله SD ، نانوفیلتراسیون ۳۵ نانو متری ، و حرارت خشک نهایی در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت صورت می گیرد.

- **فاکتور نه انعقادی (XI)**

کمبود مادرزادی فاکتور IX انعقادی عامل بیماری هموفیلی B یا بیماری کریسمس (Christmas Disease) است که از نظر علایم بالینی از هموفیلی A قابل تمایز نیست. الگوی توارثی این بیماری نیز همانند هموفیلی A بصورت مغلوب و وابسته به جنس است ولی فراوانی آن بسیار کمتر از هموفیلی A است، به طوری که هموفیلی A ، ۸۵ درصد و هموفیلی B، ۱۵ درصد از موارد بیماری را تشکیل می‌دهد. مشکلات تهیه مقدار کافی دارو برای درمان این گروه بیماران بسیار کمتر از هموفیل A است.

فاکتور IX یا فاکتور کریسمس یک گلیکوپروتئین وابسته ویتامین K تک زنجیره‌ای با وزن مولکولی حدود ۶۸ کیلو دالتون می‌باشد که در کبد سنتز می‌گردد. درمسیر انعقادی فاکتور IX بوسیله فاکتور Xla در مسیر داخلی فعال می‌گردد. فاکتور IX فعال به همراه فاکتور VIII فعال، فسفولیپیدها و Ca^{2+} و فسفولیپیدها پروترومبین را به ترومبین فعال تبدیل می نماید. سپس ترومبین فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل می‌کند که باعث ایجاد لخته می‌گردد. فاکتور IX در درمان جانشینی اختصاصی در هموفیلی نوع B یا در درمان بازدارنده‌های فاکتور IX استفاده می شود.

فاکتور IX با دیگر پروتئین های وابسته ویتامین K درخواص شیمیایی شریک می‌باشد. بیشترین فاکتور IX غلیظ توسط کلسیم فسفات و جذب با تبادل کننده‌های آنیونی تهیه می شود که شامل فاکتورهای انعقادی دیگر II ، VII و X می شود که از این فرآورده تحت عنوان پروترومبین کمپلکس یاد می‌نمایند که در درمان کمبود کلی یا جزئی فاکتور II ، VII و X بعلت کمبود ویتامین K یا بیماری مادرزادی می‌تواند مفید واقع شود.

محصول کمپلکس پرو ترومبین(PCC) از مخلوط نمودن فاکتور های انعقادی وابسته به ویتامین K ، که در آن فاکتور نه، فاکتور دو، فاکتور ده و پروتئین های C و S با فعالیت اختصاصی پایین بین ۰/۵ و ۲ واحد بین المللی در میلی گرم، به دست می آید.[۵۳] تعداد کمی از فرآورده

[52] Burnouf-Radosevich M, Burnouf T: Chromatographic preparation of a therapeutic highly purified von Willebrand factor concentrate from human cryoprecipitate. Vox Sang 62:1 - 11, 1992
[53] . Pejaudier L, Kichenin-Martin V, Boffa MC, et al: Appraisal of the protein composition of prothrombin complex concentrates of different origins. Vox Sang 52:1 - 9, 1987

های دارای فاکتور هفت هستند که میزان آن کمتر از فاکتور نه می باشد. روش تولید بر اساس روش ابداعی دهه ۱۹۶۰ بوده که در آن با استفاده از جذب دی اتیلن آمینو اتیل (DEAE) سفادکس و یا (DEAE) سلولزی، پلاسمای فاقد کرایو استفاده می شود.[۵۴]

کمپلکس پروترومبین متراکم (PPSB) علاوه بر هموفیلی نوع B در درمان بیماران هموفیل A که دارای مقادیر زیاد مهارکننده‌های فاکتور VIII می‌باشند نیز مصرف می شود. این دارو در درمان بیماران دیگر نظیر بیمارانی که دچار انواع اکتسابی کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K شده اند، افرادی که به علت استفاده از مقادیر زیاد وارفارین (Warfarin) دچار کمبود فاکتورهای انعقادی گشته‌اند، بیماران دچار سوء جذب گوارشی و بیماران مزمن کبدی نیز مصرف می شود و مؤثر است.

محصولات با خلوص بالای فاکتور نه که در اواخر دهه ۱۹۸۹ ابداع شد[۵۵]، باعث گردید تا احتمال رخ داد ترومبوآمبولیسم در مقایسه با PCCدر بیماران هموفیلی Bکاهش یابد. فاکتور نه از تخلیص PCC با استفاده از کروماتوگرافی تغییر یونی به همراه افینیتی شلات فلزی و هپارین ساکن و یا آنتی بادی مونوکلونال به دست می آید. با این عملیات محصول فاکتور نه با فعالیت اختصاصی بین ۱۰۰ الی ۱۵۰ واحد بین المللی در میلی گرم و بازده ۲۰۰ الی ۳۰۰ واحد بین المللی در لیتر پلاسما تولید می شود.

محصولات با خلوص بالای فاکتور نه که در اواخر دهه ۱۹۸۹ ابداع شد[۵۶] باعث گردید تا احتمال رخ داد ترومبوآمبولیسم در مقایسه با PCC در بیماران هموفیلیB کاهش یابد. فاکتور نه از تخلیص PCC با استفاده از کروماتوگرافی تغییر یونی به همراه افینیتی شلات فلزی و هپارین ساکن و یا آنتی بادی مونوکلونال به دست می آید. با این عملیات محصول فاکتور نه با فعالیت اختصاصی بین ۱۰۰ الی ۱۵۰ واحد بین المللی در میلی گرم و بازده ۲۰۰ الی ۳۰۰ واحد بین المللی در لیتر پلاسما تولید می شود.

- **فیبرینوژن**

پنج فرآورده مجوز دار استفاده از فیبرینوژن در درمان فیبرینوژنمی و یا کمبود آن وجود دارد.[۵۷]

محصولات تهیه شده به روش قدیمی با استفاده از رسوب دهی چند مرحله ای پلاسما و کرایوپرسی پیتت با استفاده از اتانول و گلایسین انجام می شود در صورتی که محصولات جدید دیگر به وسیله کروماتوگرافی تخلیص می گردند. کاهش ویروسی توسط روش های SD،

[54] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. J Chromatogr B Biomed Appl 664:3 -15, 1995
[55] Burnouf T, Michalski C, Goudemand M, et al: Properties of a highly purified human plasma factor IX:c therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography. Vox Sang 57:225 - 232, 1989
[56] Burnouf T, Michalski C, Goudemand M, et al: Properties of a highly purified human plasma factor IX:c therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography. Vox Sang 57:225 - 232, 1989
[57] Kasper CK, Costa e Silva M: Registry of clotting factor concentrates. Montre´al, World Federation of Hemophilia, 2005, pp 1-13

Dr. Safari Fard

که اغلب به وسیله نانوفیلتراسیون ۳۵ نانو متری و یا حرارت خشک نهایی تکمیل می شود، حاصل می گردد. پاستوریزاسیون تک مرحله ای در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ساعت برای یک محصول به کار می رود.

- **چسب های فیبرینی**

چسب های فیبرینی غنی از فیبرینوژن و ترومبین های خالص شده می باشند. وقتی دو ماده با هم مخلوط می شوند ، یک چسب لخته قوی، بند آورنده خون، پوشاننده، التیام دهنده فوری و یا در عرض چند ثانیه بوجود می آورد که کار برد آن به صورت موضعی در عملیات جراحی می باشد. فیبرینوژن ، به روش های رسوب دهی از رسوب کرایو و یا فراکشن Cohn I به دست می آید. فراکشن Iممکن است حاوی فیبرونکتین ، VWF و یا فاکتور سیزده باشد که اعمال فیزیولوژیکی دیگری را ایجاد کنند. [۵۸]

غیر فعال سازی ویروسی در فراکشن های فیبرینوژن، به وسیله SD، پاستوریزاسیون، روش بخار گرم و یا نانوفیلتراسیون انجام می گیرد. محصولات فیبرینوژن ۸۰ گرم در لیتر بوده و ممکن است در حضور یک ماده ضد فیبرینولتیک ، فرموله شود.

- **کمپلکس پروترومبین**

محصول کمپلکس پرو ترومبین (PCC) از مخلوط نمودن فاکتور های انعقادی وابسته به ویتامین K که در آن فاکتور نه، فاکتور دو، فاکتور ده و پروتئین های C و S با فعالیت اختصاصی پایین بین ۰/۵ و ۲ واحد بین المللی در میلی گرم، به دست می آید.[۵۹] تعداد کمی از فرآورده های دارای فاکتور هفت هستند که میزان آن کمتر از فاکتور نه می باشد. روش تولید بر اساس روش ابداعی دهه ۱۹۶۰ بوده که در آن با استفاده از جذب دی اتیلن آمینو اتیل (DEAE) سفادکس و یا (DEAE) سلولزی ، پلاسمای فاقد کرایو استفاده می شود. [۶۰]

تغییر دهنده های یونی پروتئین ها را به همراه باقی مانده های گاما-کربوکسی گلوتامیک اسید استخراج می کنند، در صورتی که پروتئین های پلاسمای بالک، مثل آلبومین، IgG و یا AT و AAT در فراکشن باند نشده باقی می مانند. رسوب گیری با تری کلسیم فسفات برای یک محصول استفاده می شود. اکثر مواقع ، کاهش ویروس به وسیله روش SD (TnBP-Tween 80) ، تکمیل شده به وسیله نانو فیلتراسیون ۳۵ و یا ۱۵ نانو متری و یا توسط حرارت خشک نهایی حاصل می شود. غیر فعال سازی ویروس توسط روش SD نیاز به یک

[58] Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T: Fibrin sealant: Scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. Vox Sang 72:133 - 143, 1997
[59] Pejaudier L, Kichenin-Martin V, Boffa MC, et al: Appraisal of the protein composition of prothrombin complex concentrates of different origins. Vox Sang 52:1 - 9, 1987
[60] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. J Chromatogr B Biomed Appl 664:3 -15, 1995

مرحله کروماتوگرافی تغییر یونی مکرر داشته تا عوامل غیر فعال کننده ویروس را از محیط خارج نماید. فاکتور نه به میزان ۲۵۰ الی ۳۸۰ واحد بین المللی در لیتر فرآوری می شود.

- **فاکتور هفت انعقادی (Factor VII)**

سه محصول خاص از فاکتور غنی فاکتور هفت و میزان فاکتورهای دیگر انعقادی کاهش یافته وابسته به ویتامین K ، اخیراً برای کنترل خونریزی در بیماران دارای کمبود این مواد، مجوز استفاده دریافت کرده اند. فرآیند ساخت شامل کروماتوگرافی تغییر یونی و یا آلومینیوم هیدروکسید جذبی، به دنبال روشی شبیه به روش PCC و فاکتور نه می باشد غیر فعال سازی ویروس توسط روش SD ، دمای بخار و یا گرمای خشک حاصل می شود.

- **فاکتور هفت فعال**

در ژاپن برای تولید انبوه فاکتور هفت فعال مشتق از پلاسما روش جدیدی ابداع شده است.[۶۱] در این روش، فاکتور هفت به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی و ایمونوافنیتی تخلیص می شود و به وسیله خود فعال سازی در رزین تعویض یونی و انکوباسیون در حضور یون کلسیم به مدت ۱۸ ساعت در ۱۰ درجه سانتی گراد به فاکتور هفت فعال شده تبدیل می شود. این محصول تهیه شده به وسیله نانوفیلتراسیون و حرارت خشک ویروس زدایی شده و برای درمان بیماران هموفیلی تولید کننده آنتی بادی بر علیه فاکتور هشت و یا فاکتور نه به کار می رود.

- **فاکتور یازده (Factor XI)**

اخیراً دو محصول فاکتور یازده برای بیماران دارای نقص این فاکتور مورد استفاده قرار می گیرد. یکی از آن ها خلوص پایین داشته که به وسیله کروماتوگرافی از پلاسما فاقد کرایو بر روی سلولز DEAE و هپارین ساکن تهیه می شود. بعد از فریز درایرینگ ، محصول به وسیله

61

Dr. Safari Fard

حرارت خشک غیر فعال سازی ویروسی می گردد. در محصول دیگر فاکتور یازده از فیلتر گذرانده شده و سپس توسط کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص می گردد. [۶۲] این محصول به وسیله SD و فیلتراسیون ۱۵ نانو متری ویروس زدایی می شود.

- **فاکتور سیزده (Factor XIII)**

این فاکتور یک ترانس گلوتامیناز است که با اتصال به پلیمر شل فیبرین، مرحله نهایی آبشار انعقادی را کاتالیز می کند و آن را به ساختاری محکم تبدیل می نماید. نسل اولیه فاکتور سیزده برای درمان بیماران دارای کمبود فاکتور سیزده از جفت استخراج شده، اما دو محصول از پلاسما به دست آمده است. یکی از فراکشن الکل سرد از مایع رویی رسوب کرایو تخلیص می شود که به وسیله سیترات سدیم رسوب داده شده و به وسیله حرارت فیبرینوژن آن خارج می شود. محصول در محلول سوربیتول پاستوریزه شده و جهت خارج کردن سوربیتول از محیط، اولترافیلتر می شود، با بنتونیت جذب می گردد و سپس لیوفیلیزه می شود. محصول دیگر از مراحل رسوب دهی به دست آمده و پاستوریزه می گردد. همچنین فاکتور سیزده، ترکیبی از چسب های فیبرینی می باشد. حضور فاکتور سیزده برای تشکیل باند های متقاطع زنجیره های گامای فیبرین و تحکیم آن ها کمک می کند و به احتمال زیاد در بهبود وضعیت انعقاد موثر است. [۶۳]

- **فرآورده IgG**

ایمونوگلوبولین هاترکیبات طبیعی بدن انسان هستتند . IgGسالم ودست نخورده یک نقش محوری دردفاع سیستم ایمنی بدن ایفا می کند که عمدتا در پاسخ آنتی بادی ثانویه است. طیف آنتی بادی درپلاسما نشان دهنده وضعیت ایمنی در یک لحظه معین، به عنوان یک نتیجه از عفونت های طبیعی و اثرات واکسن است.

ایمونوگلوبولین ها یا گاما گلوبولین ها نقش کلیدی دفاع در مقابل بیماری های عفونی را دارند. ایمونوگلوبولین یک واژه عمومی برای همه آنتی بادی ها در خون است. آن ها خودشان را به پاتوژن ها می چسبانند، به عنوان مثال به باکتری هامی چسبند. این سبب می شود تا دیگر سلول ها یا مولکول های سیستم ایمنی، متجاوزین را کشته یا حذف کنند. بیمارانی که قادر نیستند خودشان ایمونوگلوبولین کافی تولید کنند سیستم ایمنی به خطر افتاده دارند و در نتیجه سیستم دفاعی آن ها در برابر پاتوژن ها ضعیف است. ضعف ایمنی می تواند مادرزادی یا اکتسابی باشد، بعنوان مثال بیماری های خونی یا پیوند مغز استخوان. این بیماران از عفونت های مکرر آسیب می بینند. لذا تجویز منظم ایمنوگلوبولین ،معمولا" هر سه تا چهار هفته لازم است تا از این مسئله جلوگیری شود. بیماران با فقر ایمنی مادرزادی (اولیه)

[62] Burnouf-Radosevich M, Burnouf T: A therapeutic, highly purified factor XI concentrate from human plasma. Transfusion 32:861 - 867, 19
[63] Dickneite G, Metzner HJ, Kroez M, et al: The importance of factor XIII as a component of fibrin sealants. J Surg Res 107:186- 195, 2002

باید توسط ایمنوگلوبولین در تمام عمر درمان شوند. حتی بیمارانی که کمبود ایمنوگلوبولین هم ندارند می توانند از مزایای درمان با آن بهره ببرند. انواع بیماری هایی که همراه با عکس العمل های قطعی ایمنولوژیکی و التهابی هستند می توانند با تزریق وریدی ایمنوگلوبولین درمان شوند.این ایمنوگلوبولین ها به طور وسیعی به صورت وریدی جهت درمان بیماری های خونی و تعدادی از بیماری های عصبی که می توانند توسط واکنش های خود ایمنی ایجاد شده باشند، استفاده گردد.

IgG1و IgG2 شایع ترین مشتق شده از چهار زیر گروه IgG هستند. مهم ترین فعالیت های بیولوژیک آنتی بادی ها مربوط به عملکرد موثر شان است که هدف آن غیر فعال کردن یا حذف عوامل عفونی و محصولات آن ها، به عنوان مثال باکتری ها، ویروس ها و سموم می باشد.

ایمونوگلوبولین‌ها فرآورده‌هایی درمانی هستند که در واقع متشکل از مخلوطی از IgG است که انواع اولیه آن بصورت تزریق عضلانی بوده و اخیراً پس از حل مشکلات مربوط به ترکیبات ضد کمپلمان در این فرآورده نوع تزریق وریدی آن نیز ساخته شده است که خواهان بیشتری نیز دارد. هر دو نوع محصول وریدی و عضلانی به صورت پلی والان (وسیع الطیف) و اختصاصی وجود دارند.

با وجود احتمال کاهش میزان مصرف آلبومین در کشورهایی که مصرف آن تاکنون بالا بوده است، پیش بینی می شود میزان مصرف ایمونوگلوبولین های وریدی به علت کاربرد آن ها در درمان های پیشگیرانه با تغییر در ایمنی (Prophylactic inmunomodulation) افزایش خواهدیافت.

حداقل استانداردهای مورد قبول سازمان بهداشت جهانی (WHO) مورد ایمونوگلوبولین‌ها به شرح زیر است:

- باید از مجموعه ای شامل بیش از ۱۰۰۰ واحد اهدایی تهیه شده باشد.
- حاوی بیش از ۹۰٪ ملکول سالم ایمونوگلوبولین و کمترین مقدار ممکن از IgA باشد.
- درحد امکان عاری از ملکول‌های شکسته (fragments) و انواع ملکول‌های مجتمع (aggregate) باشد.
- حداقل تغییرات بیوشیمیایی را داشته باشد.
- دارای فعالیت‌های نرمال ناحیه c، اپسونیزاسیون، ثبوت مکمل‌ها (complement fixation) و سایر فعالیت‌های بیولوژیک ملکول IgGباشد.
- حاوی تمامی زیرگروه های IgG طبیعی سرم باشد.
- عاری از پروتئین کینازهای (Protein Kinase) وابسته به c-AMP، کینین‌ها و پلاسمیوژن ها باشد.
- حاوی میزان معینی آنتی‌بادی علیه حداقل یک ویروس و یک باکتری باشد.

Dr. Safari Fard

- از نظر انتقال آلودگی‌های ویروسی ایمن باشد.
- برای بیمار قابل تحمل بوده و حساسیت زا نباشد.

حصول پلی والان IgG، برای مصارف داخل وریدی و یا داخل عضلانی از فراکشن II، روند پالایش پلاسما از پلاسمای فاقد کرایو در اتانول سرد به غلظت ۲۵٪ حاصل می شود. محصولات IgG از رسوبات اتانولی فراکشن های بالا دستی، مثل محلول رویی فراکشن III و یا رسوب فراکشن های II+III به دست می آید. از فراکشن های IgG بینا بینی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی ، کاپریلیک اسید و یا رسوبات پلی اتیلن گلایکول ، مواد پروتئینی زاید ، آنزیم های پرتئولتیک یا تجمیع شده ها جدا سازی می شوند. درمورد برخی از فرآورده ها از روش پالایش ترکیبی، اتانل و کروماتوگرافی برای تخلیص استفاده می‌گردد. درجه خلوص اکثر فرآورده های IgG بیش از ۹۸ درصد است. گرچه در برخی از فرآیندهای تولید می‌توان مقدار ۲/۵ تا ۳ گرم IgG را از هر لیتر پلاسما تهیه کرد، روش‌های اخیر با کاربرد وسایل و فن‌آوری نوین امکان رسیدن به ۳/۵ تا ۵/۵ گرم IgG را از هر لیتر پلاسما مهیا کرده است.

اکثر روش های غیر فعال سازی ویروسی فعلی، انکوباسیون PH پایین، پاستوریزاسیون یا SD – حلال شوینده می باشند. تیمار اسید کاپریلیک، اخیراً در تولید محصولات IgG انسانی معرفی شده است که یک فرآیند غیر فعال سازی ویروسی IgG می باشد. روش اختصاصی حذف ویروس، به وسیله نانوفیلتراسیون ۱۵ الی ۳۵ نانو متر معمولاً جهت افزایش اطمینان از حذف ویروس های فاقد پوشش به کار می رود، مخصوصاً وقتی تیمار کننده های غیر فعال ویروسی، ویروس های دارای پوشش لیپیدی را هدف قرار می دهند. از فرآوری IgG با روش پالایش قدیمی اتانول همراه با سانتریفیوژ کردن، مقدار ۲/۷ الی ۳/۲ گرم در لیتر IgG حاصل می شود. فیلتراسیون ضخیم(Depth Filtration) و یا تخلیص با کروماتوگرافی فراکشن های بالا دستی میزان محصول را تا ۳/۵ الی ۵/۵ گرم در لیتر و یا بیشتر بهبود بخشیده است. روش های کروماتوگرافی کلی برای تولید محصولات IgG هایپرایمیون به طور فزاینده ای به کار می روند.

اصولاً فرآیندهای تولید ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی تفاوتی با ایمونوگلوبولین‌های عضلانی یا وریدی وسیع الطیف ندارد و اختلاف تنها در کمتر بودن حجم پلاسمای اولیه به علت دسترسی کمتر به پلاسماهای اختصاصی فوق ایمن (hyperimmune) است.

بیمارانی که قادر نیستند خودشان ایمونوگلوبولین کافی تولید کنند سیستم ایمنی به خطر افتاده دارند و در نتیجه سیستم دفاعی آن ها در برابر پاتوژن ها ضعیف است. ضعف ایمنی می تواند مادرزادی یا اکتسابی باشد، بعنوان مثال بیماری های خونی یا پیوند مغز استخوان. این بیماران از عفونت ها ی مکرر آسیب می بینند. لذا تجویز منظم ایمنوگلوبولین، معمولا" هر سه تا چهار هفته لازم است تا از این مسئله جلوگیری شود. بیماران با فقر ایمنی مادرزادی (اولیه) باید توسط ایمنوگلوبولین در تمام عمر درمان شوند. ایمنوگلوبولین تولید شده هم به

صورت IV (وریدی) و هم به صورت (IM) عضلانی است.حتی بیمارانی که کمبود ایمنوگلوبولین هم ندارند می توانند از مزایای درمان با آن بهره ببرند. انواع بیماری هایی که همراه با عکس العمل های قطعی ایمنولوژیکی و التهابی هستند می توانند با تزریق وریدی ایمنوگلوبولین درمان شوند.این ایمنوگلوبولین ها به طور وسیعی به صورت وریدی جهت درمان بیماری های خونی و تعدادی از بیماری های عصبی که می توانند توسط واکنش های خود ایمنی ایجاد شده باشند، استفاده گردد.

- **هایپر ایمونوگلوبولین ها یا ایمونوگلبولین های اختصاصی**

ایمونوگلوبولین های اختصاصی یا هیپرایمیون (hyperimmune) جهت جلوگیری یا درمان برخی از بیماری‌ها موجود است. این محصول از پلاسمای اهداکنندگان تهیه می‌گردد که دارای تیتر بالایی از آنتی‌بادی‌های معینی هستند. معمولاً این اهداکنندگان قادرند که پلاسمای خود را یک یا دو بار در هفته بصورت پلاسمافرزیس اهدا نموده بدون آن در عارضه‌ای برای آن ها بجا گذارد.

این فرآورده ها، IgG هایی هستند که از اشخاصی که قبلا به عفونتی مبتلا شده اند و یا افرادی که سیستم ایمنی آن ها بر علیه یک عامل بیماری زا فعال و تحریک شده است، به دست می آید. در پلاسمای این اشخاص آنتی بادی بر علیه یک عامل بیماریزای خاص مثل ویروس هپاتیت B به مقدار زیاد وجود دارد. با استحصال این نوع آنتی بادی به عنوان دارو در درمان بیماری های مربوطه استفاده می شود. مصرف این داروها محدود است، ولی ارزش اقتصادی بالایی دارند. داروهای مهم این دسته داروها عبارتند از:

- Anti RhD
- ایمونگلبولین ضد کزاز عضلانی
- ایمونگلبولین ضد کزاز وریدی
- ایمونگوبولین ضد هاری
- ایمونگوبولین ضد هپاتیتB

ایمونوگلوبولین‌های ضد Rh که در پیش‌گیری از بیماری همولیتیک نوزادان و سایر شرایطی که موجب حساسیت در سیستم Phesus می گردد کاربرد فراوان دارد، به نظر می‌رسد که از میان گاماگلوبولین های اختصاصی، این محصول اولین دارویی باشد که با نوع تهیه شده از طریق بیوتکنولوژی جایگزین گردد.

ایمونوگلوبولین ضد هپاتیتB که در مواقع آلودگی تصادفی با ویروس هپاتیت B مانند ورود اتفاقی سوزن آلوده به بدن (needle-stick injury)استفاده می شود مصارف دیگر در جلوگیری از انتقال آلودگی مادر به نوزاد و جلوگیری از آلودگی مجدد در پیوند کبدی است.

Dr. Safari Fard

ایمونوگلوبولین ضد آبله مرغان یا Varicella-Zoster که در پیشگیری از آلودگی افراد در معرض خطر، مثل نوزادان یا بیمارانی مصرف می شود که تحت درمان با داروهای سرکوب‌گر سیستم ایمنی (immune suppressors) یا شیمی درمانی باشند.

از مصارف جدید گاماگلوبولین وریدی استفاده از آن در درمان بیماری های التهابی و خود ایمنی می‌باشد. اولین مشاهدات در دهه ۱۹۸۰ حاکی از موفقت آمیز بودن تزریق وریدی مقادیر زیاد گاما گلوبولین در درمان (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura) ITP به ویژه در کودکان بوده است و از آن زمان مطالعات و بررسی‌های بالینی متعددی در جهت افزایش کاربرد این دارو انجام گرفته است. در ITP اپسونیزه شدن پلاکت با اتوآنتی‌بادی‌ها و حذف سریع این سلول‌ها بوسیله طحال باعث کاهش شدید این سلول ها می‌گردد. در برخی از انواع این بیماری گلیکوپروتئین‌های سطحی سلول GPIb/IX GPIIb.IIIa آنتی ژن هدف برای تولید اتوآنتی بادی هستند و در این موارد علاوه بر کاهش تعداد پلاکت به دلیل نقص در فعالیت پلاکت‌های موجود خونریزی شدیدتری بروز می‌نماید. این بیماری در کودکان معمولاً به دنبال عفونت حاد مجاری تنفسی بروز می نماید. در حالی که در بزرگسالان چنین ارتباطی دیده نمی شود. در ۸۰٪ موارد بیماری در کودکان عارضه حاد بود و خود به خود مهار می شود (self limiting) در حالی که در بزرگسالان این حالت تنها در ۱۰٪ تا ۲۰٪ موارد مشاهده می گردد. تزریق IVIg در بیماران با شمارش پلاکت کمتر از 30000/dl که دچار خونریزی شدید می‌گردند و در معرض خطر می‌باشند قبل از عمل جراحی پیشنهاد می شود.

بعضی از بیماری هایی که مصرف IVIG در آن ها موفقیت آمیز بوده است عبارتند از موارد هموفیلی ناشی از وجود آنتی بادی های خود ایمنی ، سندرم گیلن باره، بیماری کاوازاکی (Kawasaki) پلی میوزیت و موارد دیگر نشان داده شده است.

بسیاری از محصولات ایمونوگلوبولین تزریق داخل وریدی حاوی مقدار ناچیزی از IgA و IgM می باشند. اگر چه IgA ممکن است واکنش آنافیلاکتیک شدید در بیماران با آنتی بادی های ضد IgA ایجاد کنند، تعداد موارد منتشر شده از این عارضه جانبی، که ممکن است پس از درمان با فرآورده های خونی دیگر رخ دهد، بسیار جزئی است. در پیشگیری از این عارضه جانبی، قبل از هر درمان با IVIG میزان IgA در بیمار باید تعیین بشود. IVIG همچنین حاوی مقدار بسیار کم از محلول CD4، CD8 و مولکول HLA و برخی سیتوکین ها است.

سایر داروهای پروتئینی پلاسمایی بالقوه

سایر ترکیب های پروتئینی در میزان های کوچک به صورت تجربی و آموزشی پالایش شده اند. در مرحله بعدی پالایش پلاسما، مهار کننده های پروتئاز با غلظت بالا حاصل می شود. این پروتئین ها قادرند تا آنزیم های پروتئاز (آنزیمهای تجزیه کننده پروتئین) که در

Dr. Safari Fard

طی پروسه انعقاد، تجمع پلاکت های خونی و فعالیت سیستم مکمل آزاد می شوند، را مهار کنند. مهار کننده های پروتئاز از کاهش عملکرد این پروسه ها ممانعت می کنند.

- **ممانعت کننده C_1 (C_1-Esterase Inhibitor)**

C1-esterase که یک پروتئین مهاری است و در طول پالایش پلاسما بدست می آید، برای درمان فازهای حاد آنژیوادم به طور اولیه در ناحیه گلو و دستگاه گوارش ، در بیماران با کمبود مادر زادی و یا اکتسابی ممانعت کننده C_1 به کار می رود. فقدان این پروتئین سبب عود ضایعات زیر جلدی ، آنژیو ادم قسمت های نرم صورت،گلو، دست ها و پا ها و مسیرهای گوارشی می شود که می تواند منجر به نارسایی های جدی تنفسی و ناهنجاری های روده ای گردد.

فرم ارثی فقدان C1-esteraseinhibitor یا آنژیو ادم ارثی (HAE) خیلی نادر است و به نسبت ۱ در ۲۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ نفر شایع می باشد. فرم اکتسابی یا آنژیو ادم اکتسابی (AAE) حتی خیلی نادر تر بوده و معمولا" در بیماران با بیماری های مزمن مانند بیماری های اتو ایمیون یا بیماری های بدخیم مشاهده می شود. بر خلاف بیماران HAE، مبتلایان به AAE، مهار کننده C1-esterase را تولید می کنند اما این ها بطور وسیع توسط اتو آنتی بادی ها که بر علیه این مهار کننده هستند، از بین می روند.

در اروپا سه نوع از این ماده مورد تایید قرار گرفته است. تولیدات مربوطه بعد از استخراج PCC و آنتی ترومبین به وسیله کروماتوگرافی از پلاسمای عاری از کرایو تخلیص می شوند. غیر فعال سازی ویروسی به وسیله پاستوریزاسیون ، حرارت بخار و یا SD با ترکیبی از نانوفیلتراسیون انجام می گیرد.

- **ممانعت کننده داخلی آلفا تریپسین (ITI : Inter α – Trypsin Inhibitor)**

یک ممانعت کننده سرین پروتئازی می باشد. ظرفیت ممانعت کنند گی آن به وسیله بیکونین ایجاد می شود که یک کوندروئتین – ۴ – سولفات پروتئوگلیکان است، که به طور کووالان به زنجیره های دراز H_1 و H_2 خود متصل می شود، اما می تواند با ایجاد شکاف پروتئولتیک آزاد شود. ممانعت کننده آنتی تریپسین داخلی از پالایش کمپلکس پرو ترومبین بر روی یک تعویض کننده یونی به دنبال هپارین غیر متحرک به دست می آید و غیر فعال سازی ویروسی آن از طریق SD انجام می گیرد. ITI به عنوان منبعی از بیکونین بوده که ممکن است جهت کنترل فرآیند های التهابی عمل کند. در یک مدل خوکی شوک اندوتوکسینی، ITI ، جریان خون ، اکسیژناسیون و پارامترهای

انعقادی را بهبود بخشید.[۶۴] تجویز ITI بلافاصله بعد از عفونت باکتریایی خون و یا تکرار تزریق در ساعات بعدی(۱۰ و ۲۰ ساعت) باعث پایداری عروقی و کاهش چشمگیر مرگ و میر در موش های مدل می گردد.[۶۵]

در حال حاضر آلفا – یک آنتی تریپسین های تایید شده زیادی وجود دارند. برای مثال: سه تا در ایالات متحده می باشند. آلفا – یک – آنتی تریپسین برای درمان بیماران دارای آمفیزم ریوی ثانویه که کمبود مادر زادی این ماده را دارند به کار می رود. چون آلفا – یک – آنتی تریپسین دارای خواص فیزیکو شیمیایی مشترک زیادی، مثل وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک با آلبومین دارد ، سخت خواهد بود که روش هایی را برای تولید طراحی کرد که در آن آلفا – یک – آنتی تریپسین بر فرآیند تولید آلبومین تاثیر گذار نباشد.

اکثر مواد تهیه شده، از فراکشن IV 1-4 به دست می آیند. تخلیص این فراکشن زاید پر زحمت بوده و به وسیله رسوب دهی با پلی اتیلن گلایکول و کروماتوگرافی تغییر یونی ، حدود ۰/۲ گرم در لیتر فرآوری می شود. مواد تهیه شده ابتدایی در دهه ۱۹۹۰ ابداع شده و به وسیله پاستوریزاسیون ، غیر فعال سازی ویروسی صورت گرفت ، اما در حال حاضر ، مراحل حذف ویروسی با استفاده از SD و نانوفیلتراسیون صورت می گیرد. مطالعات اخیر ایزوالتروفوکوسینگ دلایلی را فراهم آورده است مبنی بر این که واریان های آلفا – یک – آنتی تریپسین anodal حداقل در یکی از محصولات مورد تایید FDA موجود بوده است. حذف لیزین با بار مثبت در انتهای C ، مربوط به اثر فعالیت کربوکسی پپتیداز ، دلیلی بر این شیفت مهاجرتی ایزوالتروفوکوسینگ است. تحت شرایطی ، وقتی درخواست کلینیکی برای آلبومین کاهش می یابد ، استخراج آلفا – یک – آنتی تریپسین از فراکشن های بالا دستی ، مثل محلول رویی فراکشن II+III ، یک روند منطقی است.[۶۶]

- **آنتی ترومبین(Anti Thrombin)**

این ماده اولین محصول استخراج شده از پلاسما به طریق افینیتی کروماتوگرافی بود. در محصول به دست آمده از پلاسمای عاری از کرایو ، معمولاً از کروماتوگرافی تغییر یونی برای خارج کردن ترکیب های PCC استفاده می شود. به دنبال آن آنتی ترومبین توسط هپارین ساکن گرفته می شود. غیر فعال سازی ویروسی به روش قدیم با پاستوریزه کردن در حضور سیترات سدیم و یا ترکیبی از ساکاروز و گلایسین و همچنین با استفاده از SD صورت می گیرد. چون حرارت ممکن است به طور ناقص باعث دناتوره شدن آنتی ترومبین شود ، در مرحله

[64] Jourdain M, Carrette O, Tournoys A, et al: Effects of inter-alpha-inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. Am J Respir Crit Care Med 156:1825 - 1833, 1997
[65] Wu R, Cui X, Lim YP, et al: Delayed administration of human inter-alpha inhibitor proteins reduces mortality in sepsis. Crit Care Med 32:1747-1752, 2004
[66] Burnouf T, Constans J, Clerc A, et al: Biochemical and biological properties of an alpha 1-antitrypsin concentrate. Vox Sang 52:291 - 297, 1987

دوم برای خارج کردن ملکول های دیگر از روش جذب در روی هپارین ساکن استفاده می شود. فرآوری محصول بین ۲۵۰ و ۳۵۰ واحد در لیتر پلاسما می باشد. فراکشن IV-1 یک ماده شروع کننده جایگزین است ، ولی میزان محصول به دست آمده از آن بسیار کم است.

- **ترانسفرین**

ترانسفرین ، پروتئین عمده پلاسمایی است که آهن به آن متصل می شود و ممکن است از اثرات سمی سلولی و یا از اثرات سوء تجمع آهن متصل نشده به ترانسفرین جلوگیری نماید. یک آپوترانسفرین لیپیدی به وسیله کروماتوگرافی تعویض دو یونی و اولترافیلتراسیون از فراکشن IV کهن/ Cohn به دست می آید. اطمینان از عدم وجود ویروس با استفاده از تیمار SD، نانوفیلتراسیون، رسوب دهی با پلی اتیلن گلایکول حاصل می شود. محصول دارای قدرت اتصال به آهن بوده و در سرم دارای اثر ممانعت کنند گی از رشد باکتری می باشد. در بیمارانی که به آن ها سلول های بنیادی(Stem Cells) پیوند زده شده است این ماده از ظهور آهن غیر متصل به ترانسفرین جلوگیری کرد.

- **آپولیپوپروتئین A-1**

آپولیپوپروتئین A-1 یک ترکیب پروتئینی اساسی از لیپوپروتئین ها با چگالی بالای پلاسما می باشد. این ماده از انباشت کلسترول در ماکروفاژها که در دیواره شریان ها نشت می کنند جلوگیری می کند. آپولیپوپروتئین A-1 در آزمایشگاه از لیپاز و لیپوپروتئین لیپاز کبدی ممانعت می کند. این ماده به روش رسوب دادن، از فراکشن III کهن به دست می آید.[۶۷]

- **پلاسمین**

پلاسمین، یک آنزیم فیبرینولتیک عمده در پلاسما می باشد. یک معرف فیبرینولتیک جدید از مدل های حیوانی به دست آمده است جایی که پلاسمین از طریق یک کاتتر جهت درمان انسداد جریان شریانی به طور مستقیم در لخته به کار رفت.

- **پروتئین C فعال شده**

پروتئین C فعال شده می تواند در درمان عفونت باکتریایی خون با ارزش باشد و این از ملاحضات کلینیکی استفاده از این داروی نوع نوترکیبی آن استنباط می شود. تا حالا موردی از استفاده پروتئین C فعال شده مشتق از پلاسما برای درمان بیماران دیده نشده است،

[67] Peitsch MC, Kress A, Lerch PG, et al: A purification method for apolipoprotein A-I and A-II. Anal Biochem178:301- 305, 1989

Dr. Safari Fard

گرچه روشی برای تهیه این ماده، با خلوص بالا از پلاسمای عاری از کرایو عرضه شده، که در آن از ایمونوافینیتی و کروماتوگرافی تعویض یونی و غیر فعال سازی ویروسی به روش SD استفاده شده است.[۶۸] همچنین برای پیدا کردن مواد جایگزین داروهایی که در حال حاضر مورد استفاده هستند نیاز به تحقیق بیشتر می باشد. دو ماده پروتئین C صنعتی در اروپا و یکی در ژاپن وجود دارد. در یک فرآیند ، PCC تحت آبشار تخلیص در سه تغییر یونی قرارمی گیرد. [۶۹]

در صورتی که در فرآیند دیگر ، فرآیند های کروماتوگرافی ایمونوافینیتی و افینیتی با تغییر یونی ترکیب می شوند. حذف ویروسی به وسیله SD حاصل می گردد، که می تواند با نانو فیلتراسیون ۱۵ نانو متری و یاتیمارحرارت بخار ترکیب شود.

روند کاری پالایش پلاسما

Dr. Safari Fard

[68] Orthner CL, Ralston AH, Gee D, et al: Large-scale production and properties of immunoaffinity-purified human activated protein C concentrate. Vox Sang 69:309 - 318,
[69] Radosevich M, Zhou FL, Huart JJ, et al: Chromatographic purification and properties of a therapeutic human protein C concentrate. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 790:199- 207, 2003

پلاسمای انسانی جمع آوری شده، ممکن است به عنوان محصول دارویی مورد استفاده قرار گیرد (به نام پلاسمای کلینیکی، یا پلاسمای منجمد تازه FFP) و یا به عنوان ماده اولیه برای تولید محصولات پالایش شده دارویی به کار رود (به نام فرآورده های پلاسمایی و یا مشتقات پلاسمایی). این ماده پیچیده زیستی، شامل صدها پروتئین است که اعمال فیزیولوژیکی زیادی را پوشش می دهند. نقش بسیاری از ترکیب های آن هنوز شناخته شده نیست. قسمت عمده ای از پروتئین ها یعنی آلبومین و ایمونوگلوبولین IgG در حدود ۳۵ و ۱۰ گرم در لیتر می باشد که حدود ۸۰٪ کل پروتئین های پلاسما را تشکیل می دهند. مقادیر کمی از پروتئین ها شامل مهار کننده های پروتئازی، مثل آلفا- یک آنتی تریپسین(AAT) 5.1 گرم در لیتر و آنتی ترومبین (AT) 300 میلی گرم در لیتر و فاکتورهای انعقادی مثل فاکتور هشت (FVIII) در حد چند نانو گرم در لیتر در پلاسما موجود می باشند که دارای فعالیت فیزیولوژیکی مهمی هستند.

روش های مربوط به استفاده از حلال های آلی برعکس املاح معدنی، اساس تهیه مشتقات پروتئینی پلاسما به مقیاس وسیع هستند. برای ساخت محصول از مشتقات پروتئینی پلاسما می بایست ابتدا پروتئین های محلول در پلاسما را به تفکیک با روش Cohn نامحلول ساخته و سپس با دستگاه و سیستم های مختلف جداسازی، خالص سازی و ویروس زدایی کرد و در نهایت فرموله نموده، مطابق استانداردهای جهانی بسته بندی نمود. این فعالیت ها نیاز به امکانات، تجهیزات صنعتی و مهم تر از همه پرسنل متخصص دارد که در مجموعه ای به نام پالایشگاه پلاسما گردآوری و فعالیت نمایند.

در چند سال اخیر، پیچیدگی عملیات پالایش به وسیله موارد زیر افزایش پیدا کرده است:

- جدا سازی پروتئین های جدید از فراکشن های موجود مثل رسوب کرایو، پلاسمای فاقد کرایو و فراکشن های مختلف

Dr. Safari Fard

- ورود کروماتوگرافی به فرآیند پالایش اتانول که باعث افزایش کیفیت فرآورده ها شده است
- استفاده از مراحل غیر فعال سازی و یا حذف ویروسی

اخیراً حدود ۲۰ نوع پروتئین مختلف دارویی پلاسما برای درمان بیماری های تهدید کننده زندگی و یا جهت درمان آزردگی های مداوم و خونریزی و نواقص انعقادی، بیماری های سیستم ایمنی و بیماری های عفونی، بیماری های تخریب بافتی و نیاز های بی شمار کلینیکی به کار گرفته شده اند.[۷۰]

تولید داروهای زیستی از پلاسما، شامل مراحل به هم پیوسته ای است که پس از تهیه یک فرآورده، اقدام به تهیه فرآورده بعدی می گردد. در ابتدا فاکتورهای انعقادی، سپس ایمونوگلوبولین ها و در نهایت آلبومین بدست می آید. کیفیت تولید در هر مرحله می تواند در مرحله بعدی موثر باشد. به فرآیندی که برای جداسازی پروتئین های دارویی پلاسما به کار می رود، پالایش گفته می شود. از پالایش پلاسما حدود ۷۰ نوع فاکتور مختلف به دست می آید. روش های جدید پالایش پلاسما توام با مراحل مختلف صنعتی، جهت جداسازی محصولات دارویی خاص به کار می رود. مراحل توام با اعتبار سنجی، عوامل عفونی موجود در پلاسما جمع آوری شده را غیر فعال و حذف می نماید. این فرآیند صنعتی پیچیده تحت شرایط بهداشتی بالا توسط تجهیزات مجوز دار (مراکز پالایشگاهی پلاسما) انجام می شود که با عملیات مطلوب تولید (GMP)و پیروی از اصول تضمین کیفیت انجام می گردد.

بعد از سال ها، پالایش پلاسما از فعالیت های بومی حاصل از نیاز های منطقه ای به عملیات صنعتی جهانی با استاندارد های منظم تبدیل شده است. این الزامات سخت گیرانه از جمع آوری پلاسما برای پالایش شروع شده و به مراحل تولید و توزیع رسیده ختم می شود.

فرآیند تبدیل پلاسما به محصولات مختلف شبیه به پالایش نفت خام به محصولات مختلف آن است. این تشابه به خوبی توسط Burnouf در یک مقاله، به نام اقتصاد پالایش پلاسما ارائه شده است.[۷۱] همانند تصفیه نفت، مشتقات مختلف از پلاسما بدست می آیند و برای عملیات دیگر هدایت می شوند.

Curran صنعت نفت را به چهار تکنولوژی مجزا تقسیم می کند:[۷۲]

- استخراج نفت خام

[70] WHO: Recommendations for the production, quality control and regulation of plasma for fractionation. http://www.who.int/bloodproducts, 2005
[71] Burnouf, T., Plasma proteins: Unique biopharmaceuticals - Unique economics, Pharmaceutical Policy & Law 7, 209-218, 2005-2006.
[72] Curran, L.M., Waste minimization procedures in the petroleum industry, J.Hazardous Mat. 29, 189-197, 1992.

Dr. Safari Fard

- انتقال آن به پالایشگاه
- فرآیند پالایش
- فروش

چنین تقسیم بندی در صنعت پالایش پلاسما نیز وجود دارد و شامل مراکز اهدا خون، فرآیند حمل و نقل توسط زنجیره سرد تا فرآیند پالایش و توزیع و فروش می باشد.

روش های متنوعی جهت جداسازی پروتئین ها و خالص سازی آن ها ابداع و بکار گرفته می شود. از این روش ها می توان به رسوب به کمک اتانول سرد (روش Cohn)، استفاده از املاح معدنی (مانند سولفات آمونیوم و سولفات سدیم)، کروماتوگرافی(مانند کروماتوگرافی بر روی ستون، تعویض کننده های یونی، ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی جذبی و کروماتوگرافی میل ترکیبی آنتی بادی مونوکلونال)، ژل فیلتراسیون، استفاده از مواد آلی (مانند رسوب با ریوانل و اسید کاپریلیک)، بهره گیری از پلی مرهای محلول (مانند پلی اتیلن گلیکول) و الکتروفورز اشاره کرد.

در روش صنعتی پالایش پلاسما، کیسه های پلاسما (برای یک سری تولید ۲۰۰۰ الی ۴۰۰۰ لیتری) تحت شرایط بهداشتی باز شده و در تانک استیل مخصوص خرد و ذوب ریخته می شوند تا در دمای ۱ درجه تا ۴ درجه سانتی گراد پلاسماهای منجمد ذوب و خرد شوند. با استفاده از سانتریفیوژ های یخچال دار در دمای منفی ۳۰ درجه سانتی گراد و یا سردتر روند جداسازی اجزای مختلف پلاسما صورت می گیرد. برای به دست آوردن فاکتورهای حساس انعقادی (مثل کمپلکس فاکتور ۹ و ترکیب های آن)، ممانعت کننده های پروتئازی مثل AT و ممانعت کننده C1 پلاسمای فاقد کرایو بلافاصله از کروماتوگرافی عبور داده می شود.

در طی عملیات پالایش، غلظت الکل از صفر درصد شروع و نهایتاً تا ۴۰ در صد افزایش می یابد و PH از خنثی به اسیدی و تا ۴/۸ تغییر می کند و دمای محیط عملیات نیز تا ۵- درجه سانتی گراد کاهش می یابد. روش Cohn پنج مرحله ی کاری دارد و در هر مرحله، محصولات آن مرحله رسوب کرده و جدا سازی می شود. آلبومین که یک پروتئین با وزن ملکولی پایین است، بیشترین حلالیت و کمترین نقطه ایزو الکتریک را دارد و آخرین محصولی است که رسوب داده می شود، یا از فاز مایع استخراج می شود. پالایش پلاسما به روش Cohn، روش جداسازی به وسیله الکل یا جداسازی به وسیله الکل سرد (cold alcohol fractionation) نیز نامیده می شود.

مراحل ساخت به منظور جداسازی فراکشن های مختلف به صورت مداوم و یکپارچه اجرامی شود.

شروع رسوب پلاسما در ۴-۱درجه سانتی گراد وادامه رسوب گیری در اتانول سرد برای تهیه فرآورده های دارویی خالص و مجزا و ادامه عملیات با روش هایی مانند فن آوری کروماتوگرافی پی گیری می گردد. [۷۳] در انتها ، اتانول بوسیله روش انجماد- خشک کردن (freeze-drying) یا اولترافیلتراسیون جدا می شود و دو باره بازیافت می گردد .

پیش از اضافه شدن اتانول به پلاسما، پروتئین های قابل رسوب در سرما در شرایط سرد جدا می شوند: پلاسمای منجمد به آرامی در شرایط سرما ذوب می شود تا رسوب کرایو که سرشار از فیبرینوژن ، فاکتور VIII ، فاکتور فون ویلبراند ، فاکتورXIII ، و فیبرونکتین می باشد، جدا گردد. چندین فاکتور انعقادی دیگر مانند فاکتورIX و مهار کننده های پروتئاز (به عنوان مثال : مهار کنندهC1 استراز) ممکن است پیش از ادامه فرایند (مرحله پس از جدا کردن کرایو) بوسیله پالایش الکل جهت بهره برداری از پلاسمای اهدایی در بیشترین حد ممکن ، توسط کوماتوگرافی جدا شوند.

پنج متغیر در محلولیت افتراقی پروتئین ها در مخلوط آب- الکل مورد استفاده قرار می گیرند:

- تغییر غلظت اتانول از محدوده ۸٪ تا ۴۰٪
- مقایر PH از محدوده ۴/۵ تا ۷/۴
- درجه حرارت از محدوده ۵- تا ۷- درجه سانتی گراد
- تغییر قدرت یونی از ۰/۱۴ تا ۰/۰۱
- غلظت های پروتئین از ۵/۱٪ در شروع تا ۰/۸٪ در مراحل بعدی فرآیند

معمولا" فرآیند با استفاده از روش مخلوط کردن ترکیبات در تانک های مجهز به همزن انجام می شود و جریان مداوم پالایش تحت کنترل خودکار در بیشتر کارخانه های تولید کننده ممنوع شده است. در انتها، اتانول بوسیله روش انجماد- خشک کردن (freeze-drying) یا اولترافیلتراسیون جدا می شود و دو باره بازیافت می گردد.

در مراکز پالایش پلاسما، انواع فرآورده های پلاسمایی از پلاسمای خون با بهره گیری از اصول پالایش بدست می آید. این روند آماده سازی، شامل یکسری مراحل طولانی نظارت دقیق می باشد. هر مرحله یک محصول واسطه تولید می کند که بعدا" تبدیل به محصول نهایی می شود که می تواند به بیماران تجویز شوند.

[73] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends.J Chromatogr B Biomed Sci Appl1995;664:3–15

Dr. Safari Fard

یک روش کلیدی شامل اتصال اختصاصی پروتئین ها به ستون های جداسازی می باشد. همینطور، تولید با استفاده از تفاوت در حلالیت پروتئین های مختلف پلاسما، در شرایط گوناگون غلظت الکل اضافه شده، شدت اسیدیته (مقدار PH)، درجه حرارت و غلظت نمک، صورت می گیرد. پالایش با استفاده از الکل در تانک های بزرگ انجام می شود. مرحله به مرحله ، اجزا مختلف از پلاسما حاصل می شوند که هر جزء جدا شده با دیگر پروتئین های پلاسما که هنوز در حالت محلول هستند، فرق می کند. پر کردن داروهای مشتق شده از پلاسما در محل های کنترل شده و محیط های بسته (Aseptic) که به صورت اتاق تمیز با خلوص هوای تعریف شده است، انجام می گیرد. از یک سیستم اتوماتیک جهت پر کردن ویال ها و بستن در آن ها استفاده می شود.

بعضی پروتئین ها در مقادیر زیاد در پلاسما ظاهر می شوند. به عنوان مثال تقریبا" ۴۰ گرم آلبومین در یک لیتر پلاسما وجود دارد. با این حال غلظت پروتئین های دیگر، خیلی کم است. به عنوان مثال کمتر از یک میلی گرم فاکتور انعقادی ۸ در هر لیتر از پلاسما وجود دارد. مفهوم آن این است که مقدار آلبومین حاصله در طی پالایش پلاسما خیلی زیادتر از مقدار انواع دیگر فاکتور های انعقادی است.

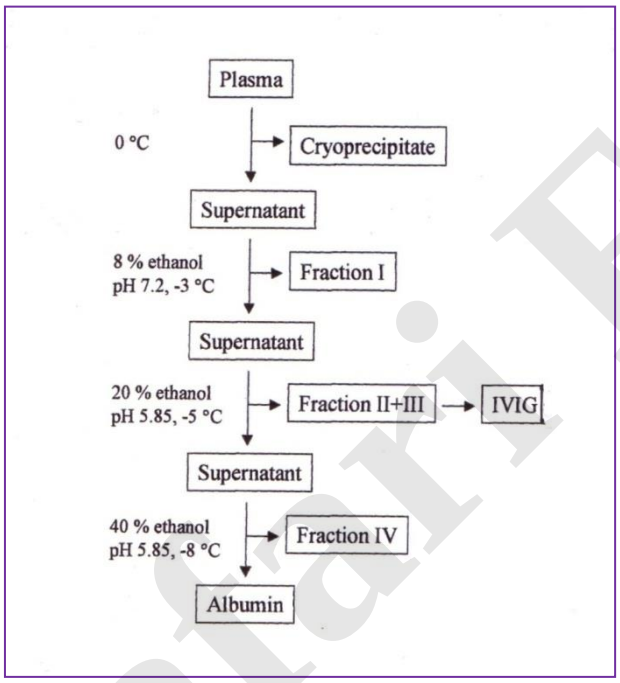
به طور متوسط ۹ تا ۱۰ هفته طول می کشد تا پلاسما به محصول نهایی تبدیل شود و این زمان واقعی مورد نیاز جهت تولید محصول می باشد. از آنجا که ذخیره پلاسما و مدیریت موجودی کالا نیز باید در نظر گرفته شود. لذا به دلیل انجام اقدامات جلوگیری کننده از آلودگی های ویروسی، در نهایت در حدود ۶ ماه طول می کشد تا محصولات پلاسمایی قابل دسترس باشند.

در طی اولین مرحله از روند پالایش، سه محصول انعقادی خون به دست می آید که فاکتور های انعقادی ۸ و ۹ و کمپلکس پروترومبین می باشند. در مراکز پالایش پلاسما، پلاسمای منجمد شده داخل تانک های ویژه با روش خاص و کنترل شده ای ذوب می شود. ذوب آرام پلاسما در یک درجه حرارت دقیق بالای نقطه ی انجماد، تولید Cryoprecipitate می کند. کرایو پرسی پیتیت شامل تعدادی پروتئین های انعقادی، از جمله فاکتور انعقادی ۸ می باشد. این پروتئین اولین محصول بدست آمده از پالایش پلاسما است. این فاکتور انعقادی جزء اصلی از مجموعه فاکتور های انعقادی است که همراه با پلاکت های خونی نقش کلیدی را در روند انعقادی خون بازی می کنند و میزان از دست دادن خون، ناشی از حوادث منجر به خونریزی را محدود می کند.

بعد از جدا سازی رسوب کرایو، محلول باقی مانده بنام " پلاسمای فاقد کرایو cryo-poor plasma " نامیده می شود که از آن فاکتور ۹ انعقادی به دست می آید. در مرحله بعدی پالایش پلاسما، مهار کننده های پروتئاز با غلظت بالا حاصل می شود. این پروتئین ها قادرند تا آنزیم های پروتئاز (آنزیم های تجزیه کننده پروتئین) که در طی پروسه انعقاد، تجمع پلاکت های خونی و فعالیت سیستم مکمل آزاد می شوند، را مهار کنند. مهار کننده های پروتئاز از کاهش عملکرد این پروسه ها ممانعت می کنند.

Dr. Safari Fard

در مراحل ثانویه در پروسه پالایش پلاسما، ایمنوگلوبولین و آلبومین به ترتیب تولید می شوند. برای این پروتئین های پلاسمایی، جدا سازی به کمک الکل، اصلی ترین پروسه ی خالص سازی است، که با عنوان پالایش الکلی یا اتانولی (روش پالایش کهن)معروف است. این روش بر اساس تفاوت در حلالیت پروتئین های پلاسمایی ناشی شده از تفاوت در غلظت الکل اضافه شده، است. فاکتور های کلیدی دیگر شامل تغییرات درجه حرارت ، مقدار PH و غلظت یون می باشند.



مراحل پالایش پلاسما در تهیه فرآوردههای پلاسمایی

تمامی فرآورده های پلاسمایی از مخازن پلاسمایی با روش های گوناگون تهیه می شوند. احتمال آلودگی مخازن پلاسمایی به ویروس های مختلف، همیشه وجود دارد. روش هایی مانند استفاده از حرارت خشک و مرطوب، فن آوری حلال/ شوینده، پاستوریزاسیون، نانو فیلتراسیون، انکوباسیون در pH اسیدی و استفاده از بتا پروپیولاکتون به همراه یا بدون اشعه UV، برای کاهش خطر انتقال ویروس ها توسط فرآورده های پلاسمایی بکار گرفته می شوند.

یکی از تغییرات اساسی در استخراج پروتئین های پلاسما به کشف دانشمند امریکایی، جودیت پول، مربوط می شود. او متوجه شدکه اگر پلاسمای منجمد در دمای نزدیک به نقطه انجماد ذوب شود، رسوبی تشکیل می دهد که حاوی مقدار قابل توجهی فاکتور VIII است. این کشف یعنی کرایوپرسی پیتیت (Cryoprecipitate) در پلاسما، در دسترسی بیماران هموفیلی به فاکتورVIII تحول بزرگی ایجاد کرد و محصول اصلی پالایش پلاسما که تا آن زمان آلبومین بود، جای خود را به فاکتورهای انعقادی داد.

Dr. Safari Fard

در دهه‌های اخیر محققین و متخصصین در پالایشگاه های پلاسما توانسته‌اند به پیشرفت‌های مهمی در زمینه فرآیندهای جداسازی و تخلیص پلاسما نائل آیند که منجر به افزایش قابل توجه در بازدهی (yield) تولید، ایمنی داروها از نظر عفونت‌های ویروسی و همچنین درجه خلوص شده است. این پیشرفت‌ها حاصل پردازش روش‌های معمول پالایش با الکل و افزودن مراحل کروماتوگرافی اختصاصی است که نتیجه آن تهیه تولیدات درمانی جدید با درجه خلوص بالاتر بوده است. نتیجه کاربرد این فن آوری ها استفاده بهتر و منطقی تر از پلاسمای انسانی و همچنین بهبود صرفه اقتصادی صنعت پالایش بوده است.

در مقایسه با بیوتکنولوژی صنعتی امروزی، روش های سنتی برای پالایش پلاسما ، به نظر کاملا ابتدایی می آیند. با وجود این، بایستی توجه داشت که روش پالایش Cohn، زمینه ساز ارتقاء تکنولوژی های پالایشی اخیر مورد استفاده برای بیوتکنولوژی تجاری قرن ۲۱ بوده است.

• رسوب گیری	تخلیص پروتئین و پالایش
• سانتریفیوژ نمودن با سرعت کم در حجم زیاد	جداسازی جامد از مایع
• فیلتراسیون در حجم زیاد	
• اولترافیلتراسیون	جداسازی جامد از مایع
(مثل: استفاده از غشاءهای kda ۱۰۰ – ۳)	حذف اجزاء با وزن ملکولی کم (اتانل و نمک) و غلیظ نمودن پروتئین‌ها
• دیالیز	تنظیم باقرها
• فیلتراسیون استریل با فیلترهای mm ۰/۲۲-	حذف باکتری
• کروماتوگرافی (مانند: تعویض یون ، میل ترکیبی و جداسازی بر حسب اندازه مولکولی)	تخلیص پروتئین و پالایش
• عملیات ویروس زدایی(مانند انکوباسیون با مواد شیمیایی و حرارتی)	از بین بردن عفونت زایی ویروس‌ها
• نانوفیلتراسیون (nanofiltration)	حذف آلودگی ویروسی
• تقسیم دارو در شرایط عاری از میکروب	تقسیم محصول نهایی استریل شده در شیشه‌های دارویا سرنگ
• لیوفیلیزاسیون	پایدارنمودن پروتئین به وسیله "آب‌گیری"
• اتوکلاو	استریل نمودن تجهیزات

روند تهیه فرآوردههای پلاسمایی

تجهیزات پالایش پلاسما

Dr. Safari Fard

فرآیند صنعتی پالایش پلاسما باید تحت شرایط بهداشتی بسیار در تجهیزات (استقرار پالایش پلاسما) منطبق با اصول GMP اجرا گردد. امکانات باید دارای مجوز باشند و به طور منظم از سوی مقامات مسئول نظارتی مورد بازرسی نظارتی قرار گیرند ، و همچنین ارائه مجوز بازاریابی برای محصولات الزامی است. در هر مرکز دارویی، برخی از جنبه ها مهم است که غالبا باید ، در طراحی و بهره برداری از یک کارخانه پالایش پلاسما وجود داشته باشد. توجه خاص GMP با توجه به ماهیت بیولوژیکی و فرآیند تولید این محصولات بر این واقعیت است که مجموع پلاسماهای خام، ماده مورد نیاز برای تولید طیف وسیعی از مشتقات است. [۷۴]

این به معنی این است، برای مثال، طراحی دقیق تاسیسات برای اطمینان از روند منطقی درمورد محصولات، اپراتورها، مواد زائد و غیره، برای جلوگیری از خطرات ناشی از آلودگی های متقاطع، به ویژه پس از ویروس زدایی است. در پالایش ترجیحا باید نواحی خاصی برای ویروس زدایی درانتهای مراحل اختصاص داده شده باشد. عدم امکان برای عقیم سازی ترمینال باکتریایی در پروتئین ها نظارت دقیق بر فیلتراسیون آسپتیک و مراحل مربوط به فرآیند پالایش را ایجاب می کند.

کروماتوگرافی

پرکاربردترین شیوه جداسازی مواد تجزیه‌ای کروماتوگرافی است که در تمام شاخه‌های علوم کاربردهایی دارد. کروماتوگرافی گروه گوناگون و مهمی از روش‌های جداسازی مواد را شامل می شود و امکان می‌دهد تا اجزای سازنده نزدیک به هم مخلوط های کمپلکس را جدا، منزوی و شناسایی کند. بسیاری از این جداسازی‌ها به روش‌های دیگر ناممکن است.

[74] WHO:Quality Assurance of Pharmaceuticals. A Compedium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection , Volumn 2, Second Updated Edition. Geneva, WHO, 2007

روش کروماتوگرافی در دهه ۱۹۴۰ معرفی شد، با وجود این استفاده از آن بیشتر به اواسط و یا اواخر دهه ۱۹۸۰ مربوط می شود. کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی جذبی به طور گسترده جهت گرفتن پروتئین ها بر اساس pH فیزیولوژیکی و قدرت یونی به کار برده شد.

کروماتوگرافی برای چهار هدف خاص مورد استفاده قرار می گیرد:

- بهبود خلوص محصولات
- تخلیص پروتئین های حساس
- بهینه کردن بازیابی پروتئین
- حذف موارد غیر فعال کننده ویروسی

با وجود آن که پالایش با الکل به عنوان روش اصلی در تهیه فرآورده های پلاسمایی در بسیاری از مراکز هنوز بکار می‌رود، کاربرد روش‌های کروماتوگرافی مانند تعویض یونی و میل ترکیبی در فرآیندهای تولید انبوه تأثیر بسزایی در تهیه بسیاری از فرآورده‌های دارویی داشته است. مهمترین مزیت کاربرد کروماتوگرافی در طراحی فرآیندهای جدید در تولید، دستیابی به فرآورده‌های خالص تر، سالم تر و افزایش بازدهی بوده است.[۷۵]

کروماتوگرافی تفکیکی توسط Gordon و همکاران وی در سال ۱۹۴۳ ، جهت جداسازی اسیدهای آمینه ابداع شد و در سال ۱۹۵۱ توسط Martin و Porter برای پروتئین ها به کار رفت.[۷۶] کروماتوگرافی جذبی برای جداسازی پروتئین ها، روی سلیکاژل، در سال ۱۹۴۹ توسط Shepard و Tiselius گزارش شد. مقاله بعدی مربوط به واکنش آب گریزی کروماتوگرافی بود.[۷۷] سپس، استفاده از کروماتوگرافی در اولین مرحله فرآیند الکلی پالایش ارائه گردید که Cihn و همکارانش آن را ابداع کردند و این بایستی ۴۰ سال قبل از استفاده Michael Griffin و همکارانش در بخش Hyland وابسته به Baxter از کروماتوگرافی ایمونوافینیتی باشد که برای تخلیص فاکتور هشت پلاسما و توسط گروه های دیگر برای آلبومین و IgG استفاده شد.[۷۸] [۷۹] [۸۰]

---

[۷۵] دکتر فریدون علاء و همکاران، مترجم: دکتر حوری رضوان، سیاست های پالایش پلاسما در کشورهای در حال توسعه، جنبه های فنی و نیازهای زیر بنایی، موسسه فرهنگی انتشاراتی زهد، تهران ۱۳۷۹

[76] Martin, A.J.P. and Porter, R.B., The chromatographic fractionation of ribonuclease, Biochem.J. 49, 215-218, 1951.

[77] Shepard, C.C. and Tiselius, A., The chromatography of proteins. The effect of salt concentration on the adsorption of proteins to silica gel, Discussions of the Faraday Society, No. 7, 275-283, 1949.

[78] Addiego, J.E., Jr., Gomperts, E., Liu, S.L., et al., Treatment of hemophilia A with a highly purified factor VIII concentrate prepared by anti-FVIIIc immunoaffinity chromatography, Thromb.Haemost. 67, 19-27, 1992.

[79] Fourcart, J., Saint-Blancard, J., Girot, P., and Boschetti, E., Préparation de l'albumine et des immunoglobulines G par fractionnment chromatographique direct du plasma humain sur DEAE et CM - Trisacryl M, Rev.Franc.Trans.Immunohematol. 25, 7-17, 1982.

[80] Berglöf, J.H., Eriksson, S., and Curling, J.M., Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma, J.Appl.Biochem. 5, 282-292, 1983

Dr. Safari Fard

مراحل ساخت به منظور جداسازی فراکشن های مختلف به صورت مداوم و یکپارچه اجرامی شود .نمونه ای از طرح پالایش پلاسما را در یک مقاله که به تازگی منتشر شده است، می توان مشاهده نمود. [۸۱] شروع رسوب پلاسما در ۴-۱درجه سانتی گراد وادامه رسوب گیری در اتانول سرد برای تهیه فرآورده های دارویی خالص و مجزا و ادامه عملیات با روش هایی مانند فن آوری کروماتوگرافی پی گیری می گردد. [۸۲] بررسی روش های تخلیص کروماتوگرافیک بر پایه تعویض رسوبی وافینیتی معکوس و ایمنوافینیتی استوار است. [۸۳] [۸۴]

کروماتوگرافی در اوایل دهه ۹۰ میلادی برای تولید فاکتورVIII ، فاکتورIX ، فاکتور von Willebrand ، پروتئینC ، مهارکننده های پروتئاز (α-۱ آنتی تریپسین، آنتی ترومبین و مهار کننده C1) مورد استفاده قرار گرفت. اخیرا افزایش مقدار فرآورده های ایمنوگلوبولینG (IgG) تخلیص شده به وسیله روش های توام پالایش بااتانول ومراحل متعدد کروماتوگرافی صورت گرفته است که سبب بهبود تولید فرآورده های پلاسمایی و برای حذف موثر آلاینده های (IgA ، وآنزیم های پروتئولیتیک) شده است. [۸۵]

توصیف کروماتوگرافی

کروماتوگرافی متکی بر حرکت نسبی دو فاز است ولی در کروماتوگرافی یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می شود و دیگری را فاز متحرک می‌نامند. اجزای یک مخلوط به وسیله جریانی از یک فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می شود. جداسازی‌ها بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزای مختلف نمونه استوارند.

روش های کروماتوگرافی

روش‌های کروماتوگرافی را می توان ابتدا برحسب ماهیت فاز متحرک و سپس برحسب ماهیت فاز ساکن طبقه‌بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد . بدین ترتیب فرآیند کروماتوگرافی به چهار بخش اصلی تقسیم می شود . اگر فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذب سطحی و اگر فاز ساکن ، مایع باشد کروماتوگرافی را تقسیمی می‌نامند.

مزیت روش های کروماتوگرافی

[81] Burnouf T: Modern plasma fractionation.Transfus Med Rev2007;21:101–117
[82] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends.J Chromatogr B Biomed Sci Appl1995;664:3–15
[83] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends.J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1995;664:3–15
[84] Burnouf T, Goubran H, Radosevich M: Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma.J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998;715:65–80
[85]

Dr. Safari Fard

با روش های کروماتوگرافی میتوان جداسازی‌هایی را که به روش‌های دیگر خیلی مشکل می‌باشند انجام داد. زیرا اختلافات جزئی موجود در رفتار جزئی اجسام در جریان عبور آن ها از یک سیستم کروماتوگرافی چندین برابر می شوند. هرقدر این اختلاف بیشتر شود قدرت جداسازی مواد بیشتر و برای انجام جداسازی مواد نیاز کمتری به وجود اختلافات دیگر خواهد بود. کروماتوگرافی جذب سطحی دارای انواع مختلفی می باشد که درصنعت پلاسما جهت دستیابی به خلوص بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کروماتوگرافی تبادل یونی از پرکاربردترین نوع کروماتوگرافی در صنعت پلاسما می‌باشد. که به دوصورت تعویض آنیونی و یا کاتیونی می‌باشد.

مکانیزم کروماتوگرافی تبادل یونی

جداسازی در کروماتوگرافی تبادل یونی توسط یک جذب بازگشت پذیر صورت می‌گیرد که اغلب شامل دو مرحله میباشد. در مرحله اول جذب نمونه صورت می‌گیرد و مواردی که متصل نشده‌اند توسط بافر آغازین ، به بیرون از ستون شسته می‌شوند. درمرحله دوم مواد جذب شده از ستون آزاد و از یکدیگر جدا می‌شوند. با توجه به اینکه میزان بار مواد متفاوت با یکدیگر یکسان نمی‌باشد ، لذا آن ها نسبت به تبادل کننده یون با هم متفاوت می‌باشد و این امر ، موجب می‌گردد جداسازی مواد از یکدیگر صورت پذیرد. این تمایلات مواد نسبت به تبادل کننده یونی توسط شرایط مختلفی از قبیل قدرت یونی و pH میتواند کنترل گردد. از آنجا که تفاوت بار ترکیبات بیولوژیک قابل توجه می‌باشد ، و با توجه به اینکه کروماتوگراشفی تبادل یونی قادر به جداسازی نمونه‌های با اختلاف کم در خصوصیات می‌باشد ، لذا روشی مؤثر جهت جداسازی دو پروتئین حتی با اختلاف فقط در یک امینواسید می‌باشد. حتی نتیجه عمل را با توام نمودن ژل فیلتراسیون (که بستگی به پارامتر دیگری مثل اندازه مولکولی دارد) با تبادل کننده یونی می‌توان بهبود بخشید.

در کروماتوگرافی تبادل یونی می توان ماده مورد نظر را انتخاب نمود تا متصل گردد و ناخالصی‌ها از ستون عبورنماید یا ناخالصی ها در ستون جذب شوند و ماده مورد نظر از ستون عبور نماید. معذالک معمولا بهتراست ابتدا ماده مورد نظر در ستون جذب گردد زیرا موجب می شود جداسازی با ضریب بالاتری صورت گیرد.

مراحل کروماتوگرافی تبادل یونی شامل به تعادل رساندن تبادل کننده یونی ، اضافه نمودن و جذب ماده نمونه ، تغییردادن شرایط بمنظور ایجاد جداسازی انتخابی ، و احیاء مجدد تبادل کننده یونی می باشد.

از تبادل کننده های یونی که بیشتر در کروماتوگرافی تبادل یونی مورد استفاده قرار می‌گیرد میتوان از سفادکس ، سفاروز و سفاسل نام برد که با متصل شدن گروههای عاملی به آن ها فاز ساکن مناسبی جهت کروماتوگرافی ستونی یونی بدست می‌آید.

Dr. Safari Fard

مهمترین نقش آلبومین سرم، تنظیم حجم پلاسما و نقل و انتقال مولکول‌های کوچک، برخی داروها، اسیدهای چرب، هورمون‌ها و آنزیم ها می‌باشد. ۵۰ تا ۶۰٪ پروتئین پلاسما را "آلبومین" تشکیل می‌دهد.

آلبومین از زنجیره‌ای از ۵۸۵ آمینواسید تشکیل شده و با ۱۷ پل دی سولفیدی ایجاد یک پروتئین کروی نسبتاً پایدار می‌نماید. با توجه به وزن مولکولی حدود ۶۶۵۰۰ آلبومین، حدود ۸۰٪ فشار آنکوتیک کلوئیدی خون را سبب می‌شود، آلبومین به صورت محلول با غلظت های ۴/۴-۵ ، ۵، ۲۰ و ۲۵ درصد عرضه می‌گردد که دو قلم ۵ و ۲۰٪ تولیدی پالایشگاه پلاسما در ایران است.

آلبومین علاوه بر افزایش حجم پلاسما می‌تواند در سوختگی ها، جراحی، خونریزی و یا سایر مواردی که موجب کاهش حجم خون می‌گردند، مصرف شود. نکته‌ای که قابل توجه است این می‌باشد که بهترین جایگزین پلاسما در مواقع خونریزی، آلبومین ۵٪ است که جهت بالا بردن حجم خون مصرف می‌شود و تا حد امکان باید از مصرف پلاسما اعم از CPP و FFP جلوگیری شود، زیرا این فرآورده‌ها نیز مانند خون کامل خطر انتقال انواع بیماری‌ها مانند HBV, HCV, HIV را دارا می‌باشند. همچنین در موارد سندروم نفروتیک، سیروز کبدی، هیپوآلبومینمی، هیپر بیلیروبینمی و نوزادان نارس می تواند مصرف شود.

مصرف آلبومین ۵٪ بیش از آلبومین ۲۰٪ می‌باشد و در اکثر موارد آلبومین ۵٪ می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد زیرا غلظت تقریباً مشابه میزان غلظت آلبومین در پلاسما می‌باشد و غلظت بالاتر آن (۲۰٪) در حالات خاصّی مانند سیروز کبدی، سندروم نفروتیک و بیمارانی که بواسطه نارسایی قلبی، نمی‌توانند افزایش با عروق را تحمّل کنند و نوزادان نارس و بیماران دیالیزی که باید آلبومین یا میزان سدیم کم بکار

Dr. Safari Fard

ببرند، مصرف می‌گردد. لذا در مواردی که آلبومین ۵٪ می‌تواند مصرف شود بهتر است از آلبومین ۲۰٪ استفاده نشود در غیر اینصورت باید آلبومین ۲۰٪ با آب مقطر استریل، محلول ۹٪ کلرید سدیم یا محلول پنج درصد دکستروز تزریقی رقیق گردد.

تولید آلبومین

روش‌های متعدّدی جهت خالص‌سازی آلبومین از پلاسمای انسانی پیشنهاد گردیده است که این روش‌ها مبتنی بر خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژی آن می‌باشد. از مهم‌ترین خواصّ آلبومین از نظر خالص‌سازی می‌توان از بار منفی آن در pH فیزیولوژیک و هیدروفیل بودن که حلالیت زیادی در آب به آن می‌بخشد یاد نمود. از جمله روش‌های پیشنهادی، استفاده از ریوانول- آمونیوم سولفات جهت رسوب دادن آلبومین می‌باشد. اساس روش مبتنی بر رسوب دادن بوسیله ریوانول و اضافه نمودن سدیم کلراید ۵٪ و بازیابی ریوانول بوسیله ذغال فعال و مرحله بعدی خالص‌سازی آلبومین بوسیله رسوب دادن با محلول‌های آمونیوم سولفات می‌باشد. روش دیگر استفاده از دی اتیل اتر بعنوان رسوب دهنده پروتئین می‌باشد که به علّت شدیداً آتش‌گیر بودن این ترکیب، از این روش زیاد استفاده نمی‌شود. از روش‌های دیگر می‌توان به استفاده از «پلی اتیلن گلیکول- PEG» اشاره نمود. گرچه بیشتر این روش ها به همراه استفاده از اتانول سرد مورد استفاه قرار می‌گیرد. روش دیگری که اخیراً مورد استفاده قرار گرفته، کروماتوگرافی تبادل یونی و رسوب دادن با PEG می‌باشد که در این روش از PEG 6000 و سفاروز استفاده می‌شود.

تولید به روش اتانول سرد (کهن)

برای تولید یک فراورده که دارای مصرف کلینیکی می‌باشد خلوص آن دارو باید متناسب با کاربرد آن باشد. لذا در تولید این گونه فرآورده‌ها خلوص مطلق موردنظر نمی‌باشد، بلکه باید محصول مطابق با استانداردهای موجود باشد و نیز بتوان روشی اتخاذ نموده که تولید انبوه را امکان‌پذیر سازد. روشی که در پالایشگاه پلاسما جهت تولید آلبومین بکار می‌رود استفاده از اتانول سرد جهت جداسازی آلبومین و استفاده از اولترافیلتراسیون به منظور جداسازی الکل و تغلیظ آلبومین جهت فرمولاسیون می‌باشد.

پلاسمای مورد استفاده Fresh Frozen Plasma (FFP) می‌باشد، اتانول مصرفی از نوع تجاری با خلوص ۹۴ تا ۹۶ درصد است، مواد شیمیایی مصرفی شامل سدیم استات، استیک اسید گلاسیال ۱۰۰٪ ، سدیم کلراید، سدیم هیدروکساید و اکتانوئیک اسید می باشد که همه Analytical grade می‌باشند. آب مصرفی در طول پروسه، آب مقطر دیونیزه (Pyrogen free water) می‌باشد.

پلاسما مورد استفاده Fresh Frozen Plasma (FFP) می‌باشد، اتانول مصرفی از نوع تجاری با خلوص ۹۴ تا ۹۶ درصد است، مواد شیمیایی مصرفی شامل سدیم استات، استیک اسید گلاسیال ۱۰۰٪ ، سدیم کلراید، سدیم هیدروکساید و اکتانوئیک اسید می باشد که همه

Dr. Safari Fard

Analytical grade می‌باشند. آب مصرفی در طول پروسه، آب مقطر دیونیزه (Pyrogen free water) می‌باشد. بافر استات مورد مصرف در طی فرآیند، طبق روش cohn تهیه می‌گردد (pH=4):

اسید استیک CH3COOH + استات سدیم CH3COONa

۴۳۵۶ گرم استات سدیم +۹۱۵۰ cc اسید استیک + تا ۴۰ لیتر آب مقطر

در این حالت، بافر در بهترین شرایط ظرفیت بافری است و اگر ۱cc از آن را با ۸۰cc آب مقطر مخلوط کنیم، باز هم pH در ۴ باقی می‌ماند.

متد Cohn

فراکسیون	محدوده مقادیر	پروتئین‌ها
I	5-10%	فیبرینوژن، فاکتور ۸، فیبرونکتین، فاکتورهای کمپلمان CIq , CIr , CIs
II+III	25%	IgA , IgG , IgM و فاکتورهای II , VII , IX , X و β گلوبولین‌ها
IV-1	5-10%	IgM ، آنتی‌ترومبین III، آلفا یک آنتی تریپسین، α و β گلوبولین‌ها
IV-4	5-10%	ترانسفرین، سرولوپلاسمین، هاپتوگلوبولین، گلوبولین‌های α و β
V	50-60%	آلبومین، گلوبولین‌های α و β

جداسازی آلبومین

پلاسمای نرمال انسانی منجمد شده (FFP)، در تانک خرد و ذوب گردیده (melting) و سانتریفوژ گشته، رسوب حاصل شاملِ FVIII (کرایو پرسی پتیتیت) می‌باشد. بافر استات طبق روش Cohn تهیه شده و به Super جهت تنظیم pH حدود ۶/۹ اضافه می‌گردد. همچنین جهت گرفتن FIX ژل سفادکس اضافه می شود. پس از سانتریفوژ، pH محلول روئی بدست آمده توسط بافر استات تنظیم می‌گردد و میزان الکل محلول به ۸٪ افزایش داده می‌شود. باز عملِ سانتریفوژ انجام می‌شود و فراکشن I شامل فیبرینوژن جدا می‌گردد، میزان الکل

Dr. Safari Fard

سوپر I و pH محلول تنظیم گردیده و پس از ۱۰ ساعت فراکشن و سوپر I + II حاصل می‌شود که این فراکشن جهت تهیه گاماگلوبولین‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

Super حاصله (I+II) سانتریفوژ شده و محلول حاصله توسط فیلترِ "پرس کارلسون ۴۰ ×۴۰ سانتی‌متر" فیلتر می‌گردد و فراکشن IV شامل α و ß گلوبولین، سرولوپلاسین و هاپتوگلوبولین و ترانسفرین و همچنین سوپر IV حاصل می‌شود. پس از سانتریفوژ سوپر IV، فراکشن V+VI شامل آلبومین و سوپر دارای آب و الکل به دست می‌آید که الکل سوپر مجدداً بازیابی می‌گردد.

جهت فرمولاسیون آلبومین ۵٪ از همین خمیر V+VI استفاده می‌شود، ولی جهت تهیه آلبومین ۲۰٪ ، خمیر V از VI جدا می‌گردد. خمیر V+VI در ۶/۵ برابر وزنی آب مقطر حلّ گردیده، سانتریفوژ گشته و فراکسیون VI جدا می‌گردد. سوپر حاصله سانتریفوژ می‌گردد و فراکشن V که جهت فرمولاسیون آلبومین ۲۰٪ بکار می‌رود بدست می‌آید.

در روش Cohn، با تغییر دادن درجه حرارت، قدرت یونی، pH و غلظت اتانول، پلاسما به فراکشن های مختلف تجزیه می‌گردد. آلبومین نسبت به دیگر پروتئین های پلاسما در pH پائین تر و با غلظت اتانل بیشتر رسوب می کند. جهت جداسازی آلبومین به روش اتانول سرد با تنظیم سه پارامتر غلظت اتانول، درجه حرارت و pH که بالطبع میزان قدرت یونی با تغییر آن تغییر می‌یابد، پروسه انجام می‌شود. غلظت الکل می‌تواند از صفر تا ۴۰٪ و pH از خنثی تا ۴/۶۵ تغییر یابد، همچنین درجه حرارت می‌تواند تا ۱۰°C- کاهش یابد.

	درجه حرارت	pH	اتانول	"Cohn"
فراکشن I	-۳	۷/۲۰	۸٪	
II+III	-۵	۶/۹۰	۲۵٪	

Dr. Safari Fard

IV	-۵	۵/۸۰	۴۰٪	
V+VI	-۵	۴/۸۰	۴۰٪	
V	-۵	۵/۲۰	۴۰٪	

در این متد برای پائین آوردن دمای خارجی دستگاه‌ها از متانول استفاده می گردد و الکل بکار رفته برای جداسازی محصولات، اتانول می‌باشد که به پلاسما و Superهای مختلف بدست آمده افزوده می‌شود. مقدار اتانول مقدار نیاز برای هر مرحله با استفاده از فرمول زیر بدست می آید:

$$\text{مقدار الکلی که باید به محیط افزوده شود} = \text{حجم اولیه سوپر یا پلاسما} \times \frac{\text{درصد الکل قدیم} - \text{درصد الکل جدید}}{\text{درصد الکل جدید} - \text{درجهٔ الکل مصرفی}}$$

فرمولاسیون آلبومین

جهت فرمولاسیون آلبومین ۵٪ از خمیر V+VI و آلبومین ۲۰٪ از خمیر V استفاده می گردد. در هر دو حالت، خمیر در دو برابر وزنی آب مقطر حل می گردد. جهت اجتناب از آلودگی باکتریایی در pH حدود ۴/۷ پروسه فرمولاسیون شروع می گردد. ابتدا محلول توسط فیلترهای مختلف و تحت فشار، فیلتر شده و محلول پروتئینی با غلظت ۱۰٪ جهت اولترافیلتر بدست می‌آید.

اولترافیلتراسیون

دمای محلول پروتئینی بدست آمده در تانک در ۲۰ °C توسط مدار متانول اتیلن گلیکول ثابت نگه داشته می‌شود و با افزودن ۶ حجم آب مقطر اولترافیلتراسیون در ۰/۵ بار فشار صورت می گیرد و پس از جداسازی الکل و املاح، عمل تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون ادامه می‌یابد.

فرمولاسیون اولیّه

پس از اتمام اولترافیلتراسیون، محلول نگه دارنده (Stabilizer) لازم که "سدیم کاپرلات" می‌باشد از واکنش کاپریلیک اسید (= اکتانوئیک اسید) و سدیم هیدروکسید بدست می‌آید و جهت آلبومین ۲۰٪ غلظت 0.03 M و جهت آلبومین ۵٪ غلظت 15 MM آن اضافه می گردد و pH محلول در این مرحله توسط سدیم‌هیدروکسید به ۶/۹ افزایش داده می‌شود.

Dr. Safari Fard

فرمولاسیون نهایی

پس از اندازه‌گیری میزان پروتئین کلّ و آلبومین و سدیم و پتاسیم توسط دستگاه‌های اسپکتروفتومتر و فلیم فتومتر، مقدار پروتئین و سدیم با افزودن آب مقطر و محلول سدیم کلراید تنظیم می‌گردد. میزان سدیم در آلبومین ۵٪ حداکثر ۱۴۵ میلی‌مول در لیتر و در آلبومین ۲۰٪ حداکثر ۱۲۰ میلی‌مول در لیتر تنظیم می‌گردد.

فیلتراسیون استریل

فیلتراسیون توسط فیلتر ذغالی AKS-4 که دارای سطوح فعال می‌باشد (جهت جذب پروتئین‌های ناخواسته) و فیلتر FKS ، صورت می‌گیرد و سپس توسط فیلتر کارتریج میلی‌پور $^{\mu}$۱/۲ و در نهایت توسط فیلتر استریل کارتریج میلی‌پور $^{\mu}$ ۰/۲۲ تحت فشار 0.4 بار فیلتر می‌گردد.

پاستوریزاسیون

پاستوریزاسیون آلبومین می‌تواند در بن ماری و یا کابینت هوای گرم که به خوبی هوا در آن در گردش باشد، صورت گیرد. باید توجه داشت که پاستوریزاسیون در درجه حرارت دقیقاً یکنواختی انجام پذیرد. آلبومین تهیه شده در نهایت در ۶۰°C (۵/۵-۵۹/۶۰) به مدت ده ساعت پاستوریزه گردیده و به مدت دو هفته در ۳۲°C نگه داری می‌گردد (انکوباسیون). پس از گذشت این مدّت نمونه‌های مختلف جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه‌های کنترل کیفی ارسال می‌گردد، مانند آزمایشگاه‌های بیوشیمی، میکروبیولوژی، ویروس‌شناسی و سرولوژی و انعقاد. در ضمن جهت بررسی پیروژنیسیته نمونه ها به بخش حیوانات ارسال می‌شود و این نمونه‌های آلبومین جهت بررسی وجود یا عدم وجود فعّالیت پیروژنی و تب‌زائی به حیوانات آزمایشگاهی تزریق می‌گردد. پس از حصول از اطمینان محصول تولید شده و دریافت پاسخ از آزمایشگاه‌های مختلف، فرآورده، جهت انجام بسته‌بندی و صدور آماده می‌گردد.

آلبومین دارای بالاترین حلالیت و کمترین وزن مولکولی و پائین‌ترین نقطه ایزوالکتریک در مقایسه با پروتئین‌های اصلی پلاسما می‌باشد و آخرین پروتئینی است که با افزایش غلظت اتانول از صفر به ۴۰٪ رسوب می‌کند. این افزایش غلظت همراه با کاهش pH می‌باشد که تقریباً pH از خنثی شروع می‌شود و به ۴/۶۵ ختم می‌شود و همچنین درجه حرارت تا منهای ۱۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد. پروتئین‌های دیگر مانند فیبرینوژن و ایمونوگلوبولین‌ها در مراحل زودتر به ترتیب فراکشن I و فراکشن II+III رسوب می‌کنند. این در حالی است که

Dr. Safari Fard

آلبومین در تمام مراحل در Super باقی می‌ماند و در شرایط مختلف از خمیر جدا می‌گردد، بسیاری از پروتئین‌های ناخواسته در فراکشن IV جدا می‌گردند. جدا کردن آلبومین در مرحله V توسط کاهش pH تا ۴/۶ که نزدیک pH ایزوالکتریک آن می‌باشد صورت می‌پذیرد.

استفاده از اتانل جهت جداسازی فراکشن ها چند ویژگی خاص دارد، اوّل اینکه با وجود الکل، رشد باکتری بسیار کاهش پیدا می‌کند و دیگر اینکه به سهولت با تبخیر قابل جداسازی است. اتانل چون یک آبگیر قوی است، در پروسه تولید عمل آبگیری را انجام داده و باعث رسوب بهتر فراکشن‌ها می‌شود، همچنین در مواقعی که نیاز به پائین آمدن دما تا حدّ زیر صفر می‌باشد، اتانول به عنوان یک مبرّد داخلی عمل کرده و دمای پلاسما یا سوپرهای مختلف حاصله را پائین می‌آورد.

به علت غلظت بالای آلبومین در پلاسما، منطقی‌ترین راه جهت جداسازی این پروتئین پیدا کردن بهتری شرایط از لحاظ pH و غلظت اتانول و قدرت یونی می‌باشد که منجر به اختلاف زیاد حلّالیت آن با دیگر پروتئین‌ها پلاسما می‌گردد و جداسازی آن را به کمک رسوب دادن ممکن می‌سازد. در فرمولاسیون، مشکل آلودگی باکتریایی در بعضی از بچها مشاهده می شودکه یکی از عوامل ممکن است تنظیم pH اولیه در حدود ۶/۵ باشد. این عمل می‌تواند با توجه به طولانی بودن پروسه، شرایطی ایجاد رشد باکتریایی را فراهم سازد. با تغییر این pH در حدود ۴/۷ در شروع پروسه و تنظیم pH نهائی درجه ۶/۹ (بلافاصله قبل از فیلتر استریل) با توجه به اسیدی بودن pH محیط، در طول پروسهٔ فرمولاسیون، امکان آلودگی باکتریایی از بین می رود.

در گذشته جهت جداسازی اتانول و آب از محلولِ پروتئینی از دستگاهِ "سنتزی ترم" استفاده می‌گردید که این دستگاه امکان تبخیر اتانول را در درجه حرارت حدود ۶۰°C و فشار منفی ممکن می‌ساخت، ولی یکی از بهترین روش‌هایی که امکان جداسازی را برای حجم‌های زیاد ممکن می‌سازد، استفاده از اولترا فیلتر می‌باشد که قادر به جداسازی حلال و نمک‌ها می‌باشد. این روش موادّ محلول و معلق را بر اساس عبور از فیلترهای بسیار ریز جدا می‌سازد که می‌توان از آن به عنوان الک مولکولی نیز یاد نمود که مولکول‌های بزرگتر از اندازه سوراخ‌های فیلتر قادر به عبور نمی‌باشند، جهت اولترافیلتراسیون آلبومین غشاءهایی با محدودیت جهت مولکول‌های با وزن مولکولی ۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون مناسب می‌باشد و بقیه مولکول‌های بزرگتر قابل عبور نمی‌باشند.

در فرمولاسیون آلبومین از Stabilizer استفاده می‌گردد. استفاده از آن به منظور جلوگیری از دناتوره شدن حرارتی آلبومین می‌باشد که این عمل می‌تواند در حین پاستوریزاسیون (که به منظور غیرفعال نمودن ویروس‌هایی مانند هپاتیت B، هپاتیت C و HIV صورت می‌گیرد) رخ می‌دهد. معمولاً از سدیم اکتانوئیک (کاپریلیت) و سدیم N–استیل تریپتوفانیت با غلظت مساوی استفاده می‌نمایند، در این مرکز در نظر است با آزمایش‌های مداوم، میزان استابیلایزر را به حداقل لازم کاهش دهند.

Dr. Safari Fard

همچنین در نظر است که با تغییراتی در پروسه بتوان از فراکسیون V+VI علاوه بر آلبومین ۵٪ در تولید آلبومین ۲۰٪ نیز بجای فراکسیون V استفاده نمود. در صورت عملی شدن این طرح، پروسه تولید دو مرحله کوتاه تر خواهد شد و با توجه به صرفه‌جویی در زمان و مواد شیمیایی بسیار اقتصادی خواهد بود.

Back wash در مورد دستگاه اولترافیلتر

با استفاده از سیستم Back wash روی اولترافیلتر استفاده مکرر از فیلترها امکان‌پذیر گردید و لذا ضرورت تعویض فیلترها مشاهده نشد. دستگاه توسط محلول‌های سرم فیزیولوژی و سدیم هیدروکسید ۰/۵ نرمال و ۰/۲ نرمال شسته می‌شود و هر هشت سری ساخت، یکبار عمل Back wash توسط آب مقطر و تحت 3 Bar فشار صورت می‌گیرد. با این متد امکان استفاده مجدد از فیلترها نیز گردید. در طول فعالیت واحد پالایش در زمان انتقال خون، به تدریج تغییراتی در پارامترهای درصد الکل، pH و درجه حرارت در پروسه جداسازی فراکشن‌های پلاسمائی با متد Cohn صورت گرفته است. این تغییرات باعث بهتر شدن فرآیند و بالا رفتن راندمان کاربری گردیده است.

جلوگیری از دناتوراسیون فرآورده در پروسه تولید

از لحاظ کنترل هرچه بهتر پروسه تولید باید درنظر داشت که حلالیت پروتئین‌ها بوسیله افزایش الکل یا استن یا دیگر حلال‌های آلی محلول در آب کاهش می‌یابد. این افزایش حلالیت در حرارت معمول باعث دناتوراسیون پروتئین می‌گردد، لذا با کاهش درجه حرارت می‌توان از این دناتوره شدن پروتئین جلوگیری نمود، به این منظور در طول پروسه، درجه حرارت تا منهای ۱۰°C کاهش داده می‌شود. عوامل بسیار دیگری می‌تواند در دناتوره شدن پروتئین نقش داشته باشد، از جمله اضافه کردن محلول ها در حین فرمولاسیون، از قبیل محلول سدیم هیدروکسید، سدیم کلراید و سدیم کاپرلیت. اگر این محلول‌ها روی سطح محلول آلبومین اضافه گردد چون در یک نقطه باعث تغییرات شدید شرایط شیمیایی می‌گردد، باعث دناتوره شدن پروتئین می‌شود و این مشکل از طریق اضافه کردن محلول‌ها در زیر محلول آلبومین یعنی در عمق تانک برطرف و تقریباً میزان پروتئین دناتوره شده در انتهای پروسه صفر می‌گردد. دیگر عوامل که می‌توانند در دناتوره شدن پروتئین تأثیر داشته باشند، مخلوط نمودن یکنواخت و سرعت افزایش محلول‌ها و شکل ظرف و همزن و همچنین ارتعاشات می‌باشد که می‌تواند در تشکیل پلیمر اگریگیت‌ها تأثیر داشته باشد.

ویروس زدایی

Dr. Safari Fard

دسترسی به خون و فرآورده های خونی ایمن و سالم، یک بخش مهم از درمان های نوین است. در سرتاسر دنیا، هر سال میلیون ها مورد زندگی توسط استفاده مناسب از فرآورده های خونی نجات پیدا کرده یا وضعیت سلامتی شان بهبود می یابد. به نظر می رسد که حداقل برای دهه های آینده، دسترسی مناسب به خون و یا فرآورده های مشتق از پلاسما یک بخش مهم و اساسی از پزشکی و درمان باشد. دسترسی به مقادیر کافی به این فرآورده ها در هر کجا که نیاز وجود داشته باشد حق بیماران است.

شبیه هر مداخله پزشکی، تزریق خون و فرآورده های خونی در ذات خود همراه با برخی خطرات است. در این بین بیماری های اکتسابی همراه با عوامل بیماری زای مشتق از خون مانند عفونت های میکروبی و ویروسی مهمترین خطرات هستند. در حال حاضر در بیشتر کشورها، حتی جاهایی که خون در دسترس است، بیشتر گیرندگان خون در معرض خطر ابتلا به عفونت های منتقله از راه خون (TTIs :Transfusion Transmissible Infections) می باشند. این خطرات نتیجه شرایط نامناسب تامین خون از اهدا کنندگان و روش های نادرست انتخاب و استفاده از خون های آزمایش نشده است.

بروز HIV در دهه ۱۹۸۰ اهمیت اطمینان از ایمنی خون را به اندازه تامین کافی خون نشان داد. نه تنها دستیابی به خون و فرآورده های خونی و امکان دسترسی همه بیماران نیازمند انتقال خون به آن ها مهم است، بلکه بهبود ایمنی خون و فرآورده های آن هم حائز اهمیت فراوان است.[۸۶]

در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل ۱۹۸۰ بیماران هموفیلی شروع به استفاده از فرآورده های جدید برای درمان بیماری خود نمودند. فاکتورهای تغلیظ شده مشتق از پلاسما این فرآورده های جدید بودند. متاسفانه برخی صنایع داروسازی مواد اولیه خود را از ارزان ترین نوع پلاسما انتخاب کردند تا بتوانند بیشترین محصولات را عرضه نمایند. این فعالیت ها به زودی چالش هایی را در مورد فرآورده های خونی ایجاد نمود. در طی سالیان ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ صدها بیمار از طریق خون و فرآورده های خونی مبتلا به عفونت شدند. این مسئله تا آن حد جدی بود که تا ۶۴٪ افراد مبتلا به هموفیلی در برخی کشورهای پیشرفته از راه تزریق فرآورده های خونی مبتلا به HIV شدند.[۸۷]

در کشور کانادا، ابتلا به HIV و هپاتیت C بزرگترین فاجعه سلامت همگانی در تاریخ این کشور بود. تخمین زده می شود که که تزریق فرآورد های آلوده، سبب ابتلا بیش از ۱۰۰۰ نفر به HIV و بیشتر از ۳۰۰۰ نفر به هپاتیت C شد.[۸۸]

علی رغم پیشرفت های مشخص در ایمنی خون و فرآورده های خونی در کشورهای در حال توسعه ، هنوز ایمنی و سلامتی خون یک نگرانی برای این کشورها است. در برخی از این کشورها بیشتر خون های اهدایی در مورد HIV ، HCV و HBV مورد آزمایش قرار نمی

[86] Cheraghali AM, Abolghasemi H. Plasma fractionation, a useful means to improve national transfusion system and blood safety: Iran experience. Haemophilia (2009), 15, 487–493

[87] Weinberg PD. Legal, financial, and public health consequences of HIV contamination of blood and blood products in the 1980s and 1990s. Ann Intern Med 2002; 136: 312–9.

[88] Wilson K. Variant Creutzfelt-Jakob disease and the Canadian blood system after the tainted blood tragedy. Soc Sci Med 2007; 64: 174–85.

Dr. Safari Fard

گیرند. در مطالعه ای که بر روی بانک های خون در سال ۲۰۰۰ انجام شد، مشخص گردید که ۸۷٪ خون ها از نظر HBV، ۹۵٪ از نظر HIV و فقط ۶٪ از نظر HCV مورد آزمایش قرار گرفته اند. این گزارش تخمین می زند که بیشتر از ۱۰٪ اشخاص مبتلا به HIV در کشورهای در حال توسعه به وسیله خون یا فرآورده های خونی آلوده به ویروس، مبتلا به این بیماری شده اند. [۸۹]

از آنجا که ثابت شده فرآیند تخلیص به تنهایی جهت اطمینان از سلامت تولیدات از نظر عفونت ویروسی کافی نیست، کاربرد تکنیک‌های اختصاصی کاهش ویروس در فرآیند تولید فرآورده‌های پلاسما ضروری است. هدف اصلی، غیرفعال نمودن ویروس‌های پوشش‌دار (enveloped) قابل انتقال از پلاسما مثل HIV و HBV و HCV است. دراین رابطه کاربرد روش‌های S/D یا پاستوریزاسیون مناسب است. اگر مشتقات پلاسما تحت شرایط استاندارد و با رعایت نکات و شرایط GMP و کنترل جدی و مستمر در مراحل مختلف تولید، تهیه گردند خطر انتقال آلودگی این گونه ویروس‌ها تقریباً صفر خواهدبود. با نظارت فنی مناسب کاربرد صحیح این فن‌آوری ها در پالایشگاههای تازه تأسیس نیز امکان‌پذیر است.

مراحل کاری پیش بینی شده و معتبرسنجی شده در مراحل تولید هر فرآورده برای غیر فعال سازی ویا حذف عوامل ویروسی عفونی که می تواند در پلاسمای اولیه موجود باشد به کار گرفته می شود، زیرا روش های آزمایش روی پلاسما های اهدایی از حساسیت و اختصاصی بودن کافی برخوردار نیست. [۹۰] برخی از روش های ویروس زدایی در هنگام تولید فرآورده های پلاسمایی اعمال می شوند مانندااستفاده ازروش حلال – شوینده،پاستوریزاسیون یا نانوفیلتراسیون وبرخی روش های دیگربرروی فرآورده های نهایی اعمال می شوند مانندروش های غیر فعال سازی حرارتی. برخی از روش ها مانند استفاده از pH پائین در تولید ایمنوگلوبولین های داخل وریدی به کار گرفته می شدند که در حال حاضر مشخص شده که سبب افزایش تاثیر روند غیر فعال سازی ویروسی می شوندنکته مهم این است که روش های ویروس زدایی باید قبلا در مقیاس های کوچک اعتبار سنجی شده باشندو تاثیر قابل ملاحظه ای در حذف یا غیر فعال سازی ویروسی نشان دهند [۹۱] [۹۲]

کانون اصلی توجه با در نظر گرفتن خصوصیات ایمنی، انتقال عوامل عفونت زا مخصوصا" ویروس ها و پریون ها می باشد. جهت کاهش خطر عوامل عفونت زا، انتخاب پلاسما از اهدا کننده های داوطلب و اهدا کنندگانی که پول دریافت نمی کنند، اجباری می باشد. این به ویژه زمانی ممکن است مهم باشد که پلاسما از کشورهای مختلف با خصوصیات ایمنی محدود آورده شده باشد. مراکز پالایش خط مشی

[89] Weinberg PD. Legal, financial, and public health consequences of HIV contamination of blood and blood products in the 1980s and 1990s. Ann Intern Med 2002; 136: 312–9.
[90] Burnouf T, Radosevich M: Reducing the risk of infection from plasma products: Specific preventative strategies.Blood Rev 2000;14:94–110
[91] WHO:Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures Intended to Assure the Viral Safety of Human Blood Plasma Products. Geneva, WHO, 2003
[92] Note for Guidance on Virus Validation Studies: the Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (revised)CPMP/BWP/268/9 5London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), 1996; available at http://www.emea.europa.eu/pdf/human/bwp/026895en.pdf

مستثنی کردن اهدا کنندگان داوطلب دارای خطر را از اهدای خون و غربال گری خون های اهدائی برای محدوده ویروس های ناشی از خون، دنبال می کنند.

روش های کاهش ویروس، شامل غیر فعال سازی (که ویروس ها نابود می شوند) و مراحل حذف (که ویروس ها و ذرات پروتئین ها به اجزای مختلف تجزیه می شوند) می باشند. استفاده از یک و ترجیحاً دو روش کاهش ویروسی، اخیراً به عنوان "استاندارد طلایی" برای کلیه تولیدات پلاسما به کار می رود. اولین روش برای غیر فعال سازی اکثر ویروس های بیماری زا (HCV,HBV,HIV) به کار می رود و روش دوم مرحله حذف ویروس های فاقد پوشش می باشند که برای حصول اطمینان مضاعف از سلامتی محصول از نظر عدم وجود کلیه عوامل بیماری زا هستند.

اکثر روش های حذف ویروسی با عملیات پالایش پروتئین ها، به طور هم زمان صورت می گیرد (عملیات حین تولید) ، اما اخیراً روش های غیر فعال سازی ویروسی به طریق حرارت دهی ابداع شده اند که برای محصولات نهایی استفاده می شوند. جهت ایجاد روش های حذف ویروسی، پالایش گر ها به مجوز های لازم جهت استفاده از ویروس های مشخص مدل در اعتبار سنجی نیاز دارند. تاثیر قدرت روش های کاهش ویروسی در محل ، با حذف انتقال ویروس نیل غربی WNN مثال زده می شود. [۹۳] مشابه آن، نشان داده شده است که در محصولات پلاسمایی، با روش غیر فعال سازی ویروسی پایه کورناویروس عامل سندروم حاد ریه که دارای پوشش لیپیدی است غیر فعال می گردد. [۹۴]

روش های غیر فعال سازی ویروسی در حین تولید

روش حلال شوینده (SD) دراواسط دهه ۱۹۸۰ ابداع شد [۹۵] و به عنوان معمول ترین روش غیر فعال سازی ویروسی محصولات پلاسمایی محسوب می شود. محلول های پروتئینی به مدت ۴ الی ۶ ساعت در ۲۴ الی ۲۷ درجه سانتی گراد در حضور ۰,۳٪ الی ۱٪ تری- ان- بوتیل فسفات(TnBP) و ۱٪ توین ۸۰ و یا تریتون X-100 انکوبه می شوند. به طور عادی، ویروس های دارای پوشش لیپیدی در عرض چند دقیقه غیر فعال می شوند و فعالیت عملی اکثر پروتئین های حساس پلاسما به استثنای بعضی از ممانعت کننده های سرین پروتئازی به خوبی محافظت می گردد، اما ویروس های فاقد پوشش (که اکثراً برای انسان کمتر بیماری زا هستند) با این روش غیر فعال نمی گردند.

[93] Kreil TR: West Nile virus: Recent experience with the model virus approach. Dev Biol (Basel) 118:101 - 105, 2004
[94] Yunoki M, Urayama T, Yamamoto I, et al: Heat sensitivity of a SARS-associated coronavirus introduced into plasma products. Vox Sang 87:302 - 303, 2004
[95] Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, et al: Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipidenveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations.Transfusion 25:516 - 522, 1985

به وسیله جذب کروماتوگرافی و یا رسوب دادن خاص پروتئین ها و یا جذب انتخابی در روی پشتیبان کروماتوگرافی آب گریز، معرف های حلال شوینده تا سطح مقادیر ناچیز در میلیون خارج می شوند.

پاستوریزاسیون دیگر روش معمول غیر فعال سازی ویروس می باشد که در آن از حرارت دادن محلول های پروتئینی به مدت ۱۰ ساعت در ۶۰ درجه سانتی گراد استفاده می شود که این عمل باعث انهدام پروتئین های ویروسی شده و در نتیجه، مانع تکثیر ویروس ها می گردد. [۹۶] پاستوریزاسیون می تواند هم ویروس های پوشش دار و هم ویروس های فاقد پوشش را غیر فعال نماید، اما مواد پایدار کننده که برای ممانعت از کاهش فعالیت پروتئین ها مورد نیاز هستند. ممکن است سرعت و شدت غیر فعال سازی ویروس را کاهش دهند. [۹۷]

مواد پایدار کننده را به وسیله فیلتراسیون، رسوب دادن پروتئین ها و یا کروماتوگرافی از محیط خارج می کنند. یک شرکت، از گرمای بخار برای این منظور استفاده کرده است.

شدت غیر فعال سازی ویروسی، با دما ، زمان و فشار تغییر می کند. وقتی از روش غیر فعال سازی بر اساس حرارت استفاده می شود، احتمال تشکیل آنتی ژن های جدید که می توانند ایمونوژنیسیته پروتئین را افزایش دهند، ممکن است ملاحضه گردد.

انکوباسیون PH پایین، معمولاً در PH ۴، در دمای ۳۰ الی ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت بیش از ۲۰ ساعت در اوایل دهه ۱۹۸۰ معرفی شد که اجازه تزریق داخل رگی IgG را می دهد. این روش غیر فعال سازی باعث غیر فعال شدن اکثر ویروس های دارای پوشش لیپیدی می شود.

روش انکوباسیون و رسوب دادن اسید کاپریلیک(اکتانوئیک) در PH کمتر از ۶ روشی است که اخیراً برای IgG انسانی معرفی شده است در این روش ویروس های دارای پوشش لیپیدی غیر فعال می گردند.[۹۸]

روش غیر فعال سازی ویروسی پس از تولید

در پالایش مدرن پلاسما، از روش حرارت برای محصولات لیوفیلیزه استفاده می شود(حرارت خشک). این روش برای فاکتورهای انعقادی به کار می رود. در این روش در حضور پایدار کننده های پروتئین(Stabilizers) محصول به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و یا ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شود. با این روش ایمنی و سلامت محصول بر علیه HAV و ویروس

[96] Nowak T, Niedrig M, Bernhardt D, et al: Inactivation of HIV, HBV, HCV related viruses and other viruses in human plasma derivatives by pasteurisation. Dev Biol Stand 81:169 - 176, 1993

[97] . Ng PK, Dobkin MB: Pasteurization of antihemophilic factor and model virus inactivation studies. Thromb Res 39:439 - 447, 1985

[98] Dichtelmuller H, Rudnick D, Kloft M: Inactivation of lipid enveloped viruses by octanoic acid treatment of immunoglobulin solution. Biologicals 30:135 - 142, 2002

Dr. Safari Fard

های دیگر حساس به حرارت حاصل می شود، ولی برای حذف ویروس B19 کفایت نمی کند. پاستوریزاسیون (محلول) نهایی به مدت ۱۰ ساعت در ۶۰ درجه سانتی گراد روش "استاندارد طلایی" برای محصولات آلبومین می باشد. اسیدهای چرب، کاپریلات و ترپتوفانات که آلبومین را از دناتوره شدن در اثر حرارت، محافظت می کنند ، در مقادیر سازگار برای مصارف دارویی اضافه می گردند.

روش حذف ویروس

نانو فیلتراسیون، یک روش فیلتراسیون ویروسی خاص می باشد که برای محلول های پروتئینی به کار می رود در این روش از غشاهای ۱۵ الی ۷۵ نانو متری چند لایه ای ، و یا سیستم های مشابه استفاده می شود. [۹۹] این روش در اواسط دهه ۱۹۹۰ معرفی شد و برای حذف ویروسی کلیه محصولات به جزء آلبومین مورد قبول واقع شده است. نانوفیلتراسیون به عنوان مکمل روش غیرفعال سازی اصلی به کار می رود و ایمنی بر علیه ویروس های فاقد پوشش و عوامل عفونی مقاوم دیگر را افزایش می دهد. همچنین، حذف ویروسی می تواند هنگام رسوب دادن پروتئین ها، کروماتوگرافی و یا در مراحل فیلتراسیون اتفاق بیافتد. در این مراحل میزان ویروس از محصول پروتئینی کاهش می یابد. بررسی این روش های ویروس زدایی سخت است بنابر این به عنوان روش های مستقل که بتواند ایمنی کافی ایجاد کنند ضمانت اجرایی ندارند.

پریون ها

در حال حاضربه احتمال بسیار زیاد بیماری Creutzfeldt– Jakob Disease (vCJD) ممکن است از راه تزریق فرآورده های خونی منتقل شود وسبب ایجاد نگرانی هایی درموردایمنی فرآورده های مشتق از پلاسمای مجتمع شده، می شود. [۱۰۰] [۱۰۱]

مطالعات تجربی متعدد بر روی عفونت هایی که بیشتر آن ها بر پایه نفوذ مواد عفونی مشتق از مغز به درون اجزای پلاسمایی انجام شده، نشان داده که تعدادی از مراحل پالایش ، پالایش اتانول،فیلتراسیون عمقی"کروماتوگرافی"و نانو فیلتراسیون با غشا چند لایه ۳۵ نانومتری یا کمتر، بیش از Logs ۵–۲ از پریون های افزوده شده را حذف نماید. [۱۰۲] [۱۰۳] [۱۰۴] باتوجه به این که سطح عفونت زایی پریون درخون

[99] Burnouf T, Radosevich M: Nanofiltration of plasmaderived biopharmaceutical products. Haemophilia 9:24 - 37, 2003
[100] Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S,Mackenzie J, Will RG: Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.Lancet2004;363:417–421
[101] WHOGuidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies, 2006; available at http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf
[102] Foster PR, Welch AG, McLean C, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A,MacDonald S, Bailey AC: Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human plasma products.Vox Sang2000;78:86–95
[103] Flan B, Arrabal S: Manufacture of plasma-derived products in France and measures to prevent the risk of vCJD transmission:Precautionary measures and efficacy of manufacturing processes in prion removal.Transfus Clin Biol2007;14:51–62
[104] Burnouf T, Padilla A: Current strategies to prevent transmissionof prions by human plasma derivatives.Transfus Clin Biol2006;13:320–28

Dr. Safari Fard

احتمالا کمتر است (نزدیک به ۱۰ واحد عفونی در هر میلی لیتر)[۱۰۵] خطر انتقال (vCJD) بوسیله فرآورده های پلاسمایی انسان ضعیف به نظر می رسد. با این حال باید اقدامات پیشگیرانه انجام گرددزیرا ماهیت بیوشیمیایی ماده عفونی در خون انسان تا کنون (۲۰۰۸) شناخته نشده است[۱۰۶]

روش های حذف پریون

در حال حاضربه احتمال بسیار زیاد بیماری (vCJD) Creutzfeldt– Jakob Disease ممکن است از راه تزریق فرآورده های خونی منتقل شود وسبب ایجاد نگرانی هایی درموردایمنی فرآورده های مشتق از پلاسمای مجتمع شده، می شود.[۱۰۷] مطالعات تجربی متعدد بر روی عفونت هایی که بیشتر آن ها بر پایه نفوذ مواد عفونی مشتق از مغز به درون اجزای پلاسمایی انجام شده، نشان داده که تعدادی از مراحل پالایش (پالایش اتانول، فیلتراسیون عمقی کروماتوگرافی و نانو فیلتراسیون با غشا چند لایه ۳۵ نانومتریبا کمتر، می تواند بیش از Logs ۲–۵ از پریون های افزوده شده را حذف نماید. [۱۰۸] باتوجه به این که سطح عفونت زایی پریون درخون احتمالا کمتر است (نزدیک به ۱۰ واحد عفونی در هر میلی لیتر)[۱۰۹] خطر انتقال (vCJD) بوسیله فرآورده های پلاسمایی انسان ضعیف به نظر می رسد.با این حال باید اقدامات پیشگیرانه انجام گردد، زیرا ماهیت بیوشیمیایی ماده عفونی در خون انسان تاکنون (۲۰۰۸) شناخته نشده است.

واریانت کروتز فیلد جاکوب می تواند توسط مواد حاوی گلبول های قرمز خون منتقل گردد، اما تا به امروز انتقال از طریق پلاسما و یا محصولات پلاسمایی تشخیص داده نشده است. بر اساس طبیعت زیستی پریون ها، به نظر می رسد که آن ها به روش های معمول غیر فعال سازی ویروسی مورد استفاده در پالایش پلاسما، مقاوم باشند. روش های شناخته شده برای غیر فعال سازی پروتئین های پریون همراه شده با آنسفالیت های اسپونژی فورم(PrPTSE) مثل اکسیداسیون، استفاده از باز قوی، معرف های قوی و دمای بالا، پروتئین های پلاسما را نابود می کند و در نتیجه نمی تواند از آن ها استفاده کرد. بنا به مطالعات محصولات پالایشی حاصل از فرآیند های جدید به نظر می رسد دارای اطمینان کافی در حذف عملی PrPTSE داشته باشند.[۱۱۰]

[105] WHO:WHOGuidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies , 2006; available at http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf
[106] WHOGuidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies , 2006; available at http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf
[107] Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S,Mackenzie J, Will RG: Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.Lancet2004;363:417–421
[108] Foster PR, Welch AG, McLean C, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A,MacDonald S, Bailey AC: Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human plasma products.Vox Sang2000;78:86–95
[109] WHOGuidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies , 2006; available at http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf
[110] Flan B, Aubin JT: Evaluation de l'efficacite´ des proce´de´s de purification des proteins plasmatiques a` e´liminer les agentstransmissibles non conventionnels. Virologie 9:S45-S56, 2005

بر اساس آنسفالوپاتی اسپونژی فورم قابل انتقال(TSE) ، مدل های Spiking ابداع شد، دانش در مورد ظرفیت فرآیند های تولید پروتئین های پلاسمایی برای حمل پریون ها به سرعت رشد می کند اما خیلی چیز های ناخواسته نامعلوم مانده است، زیرا طبیعت زیستی پلاسمای انسانی با عامل عفونی همراه شده است.[۱۱۱]

فرآیندهای زیادی برای تولید فاکتور هشت، فیبرینوژن ، فاکتور ون ویل براند(VWF) ، فاکتور ۹ ، IgG و محصولات آلبومین شناخته شده است که توانایی انتقال پریون ها را دارند. [۱۱۲] در کل فرآیند های پالایش چند مرحله ای، به نظر می رسد یک فاکتور دخیل برای کاهش PrPTSE باشند. در طی مراحل خالص سازی استاندارد پروتئین مثل رسوب دادن با اتانول و یا پلی اتیلن گلایکول (PEG) ، کروماتوگرافی تغییر یونی و فیلتراسیون قوی، ۲ الی بیش از ۵ لگاریتم حذف پریون Spiked اتفاق می افتد. [۱۱۳] مکانیزم حذف که ممکن است شامل مکانیزم جذب باشد هنوز کامل شناخته شده نیست و چنین به نظر می رسد که تحت نام PH و غلظت مواد راسب شونده باشد. فرآیند جداسازی ممکن است منعکس کننده تجمع پریون ها در اثر خاصیت آب گریزی و غیر محلول بودن پریون ها باشد.

قدرت حذف غشاهای نانو فیلتر با منافذ سایز کمتر از ۷۵ و یا ۳۵ نانو متر به شده مورد توجه است. [۱۱۴] شدت حذف پریون ها بستگی به اندازه منافذ فیلتر ها و به احتمال زیاد واحد های PrPTSE دارد. حذف پریون ها با غشاء ۱۵ نانومتری در مقایسه با ۳۵ نانومتری بهتر است. طبیعت و منشاء عوامل Spiking مورد استفاده برای شفافیت مطالعات PrPTSE از اهمیت ویژه ای برخوردار است برای این که Spik های مختلف، در اندازه و خصوصیات متفاوت هستند. هموژن مغز و یا فراکشن های مشتق از مغز حیوانات عفونی، معمولاً به عنوان مواد PrPTSE Spiking، استفاده شده است. روش های بسیار قابل اطمینان و کمی PrPTSE بر اساس ارزیابی های زیستی حیوانی استوار است، که نیاز به حیوانات زیاد و یک دوره زمانی طولانی تر از ۹ ماه دارد. روش های ایمونوشیمی آزمایشگاهی مثل یک ارزیابی وسترن بلات، حداقل به عنوان اولین شناساگر حضور PrPTSE مورد استفاده قرار گرفته و با تشخیص رشته مقاوم به پروتئاز، با عفونت ارتباط پیدا می کند. بنابر این احتمال انتقال vCID به وسیله محصولات پلاسمای انسانی غیر محتمل است، اما احتیاط لازم بایستی به عمل آید چون که طبیعت بیوشیمیایی عوامل عفونی در خون انسان ناشناخته می باشند.

پیشرفت در علم ویروس شناسی به پالایش کننده های پلاسما کمک می کند تا محصولات سالم تری تولید کنند. می دانیم که ویروس های هپاتیت A, B, C ،ویروس های نیل غربی، ویروس های H5N1 ، خطرناک هستند و نباید در محصولات پلاسمایی وجود داشته باشند، اما چگونه می توانیم عدم وجود آن ها را ثابت کنیم ؟ پالایش کننده ها باید قادر باشند تا نمونه خاصی را با ویروس مدل نشاندار کنند و

[111] WHO guidelines on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies. http://www.who.int/bloodproducts, 200
[112] Flan B, Aubin JT: Evaluation de l'efficacite´ des proce´de´s de purification des proteins plasmatiques a` e´liminer les agentstransmissibles non conventionnels. Virologie 9:S45-S56, 2005
[113] Burdick MD, Pifat DY, Petteway Jr SR, et al: Clearance of prions during plasma protein manufacture. Transfus Med Rev 20:57 - 62, 2006
[114] Tateishi J, Kitamoto T, Mohri S, et al: Scrapie removal using Planova virus removal filters. Biologicals 29:17 - 25, 2001

پس از طی مراحل تولید، مقدار ویروس خارج شده از نمونه نشاندار را تعیین نمایند. پیشرفت قطعی با ویروس های مدل انجام گرفت، مثلا" ویروس Semliki Forest ، مدلی برای هپاتیت B و ویروس های دیگر است. رسوب فرکشنIII به روش Cohn به طور شاخصی باعث کاهش $\log_{10}$ از ویروس های دارای پوشش چربی(LE) و بدون پوشش چربی(NLE) می شود، در حالیکه مرحله کاهش PH به ۴/۴ مشخصا" غیر فعال شدن متغیر ویروس هایLE و بطور یقین غیر فعال نشدن ویروس هایNLE را نشان می دهد. جهت محصولات ایمونوگلوبولین، یک اثر کاهش دهنده ویروس توسط آنتی بادی های خنثی کننده بر علیه پارووویروسB19 و ویروس هپاتیتA ، شرح داده می شود. گرچه محصولات ایمونوگلوبولین دارای سابقه عالی ایمنی هستند، قانون گذاران اروپائی، انجام مراحل اضافی و موثر کاهش ویروس در فرایند تولید را برای اطمینان از سلامتی آن ها، و نیز نانوفیلتراسیون در ابتدای فرایند را توصیه می شود. امید می رود که چنین الزامات اضافی ایمنی باعث افزایش قیمت محصولات و یا کاهش تاسف انگیز ترکیبات فعال در محصول نهائی، نخواهد شد.

غیرفعال کردن ویروس ها در شرکت اوکتافارما

بسته به نوع محصول، روش های مختلف حذف و یا غیر فعال کردن ویروس ها مورد استفاده قرار می گیرند. آزمایش اهدا کنندگان و پلاسماهای اهدایی فقط می تواند ویروس های شناخته شده و ویروس هائی را که به خاطر آن ها غربال گری انجام می شود، را رد یابی کند. غیرفعال سازی ویروس ها یک گام جلوتر می باشد. نهادهای بین المللی مرتبط با حوزه سلامت همگی انجام مضاعف غیرفعال کردن ویروس ها را در محصولات پلاسمایی، توصیه می کنند.

شرکت اکتافارما از چندین روش مختلف معتبر سنجی شده حذف وغیر فعال سازی، استفاده می کند:

- حلال/شوینده(SD)
- پاستوریزه کردن
- روش حرارت خشک
- PH4
- نانوفیلتراسیون

Dr. Safari Fard

روش SD بطور سریع و بازگشت ناپذیر همه ویروس های دارای پوشش چربی، مانند HIV,HBV,HCV را غیر فعال می کند. استفاده از روش SD ، با تخریب پوشش چربی و محل های مربوط به اتصال ویروس، باعث جلوگیری از آلودگی سلولهای هدف وتکثیر ویروس ها در داخل بدن، می شود.

پاستوریزاسیون یک روش غیرفعال سازی با طیف وسیع می باشد که DNA یا RNA های ویروس های پوشش دار وبدون پوشش را هدف قرار می دهد.در طی روند پاستوریزاسیون، فرآورده ها در شکل مایع و در حضور پایدار کننده ها حرارت داده می شوند. از پاستوریزاسیون برای غیرفعال سازی آلبومین استفاده می شود.

روش حرارت خشک هر دو نوع ویروس های پوشش دار و بدون پوشش را غیر فعال می سازد. اکتافارما از این روش بعنوان مرحله دوم غیرفعال سازی ویروس در تولید Octanate استفاده می کند.

انکوباسیون طولانی در PH ۴ می تواند سبب غیر فعال کردن ویروس های پوشش دار و بدون پوشش گردد. محصول Octagam شرکت اوکتافارما یک انکوباسیون ۲۴ساعته را در PH ۴ تحمل می کند.

نانو فیلتراسیون یک روش معتبرسازی شده برای حذف ویروس های پوشش دار و بدون پوشش است. در مرکز اوکتافارما از این روش بعنوان مرحله دوم غیرفعال سازی در تولید Nanotiv و Octanine F استفاده می شود.

علاوه بر این ها، سلامت ویروسی محصولات پلاسمایی بوسیله خنثی سازی ایمنی افزایش داده شده است. از آنجا که محصولات مشتق از پلاسما از پلاسماهای مخلوط (pooled) ساخته شده اند، آنتی بادی های اهداکننده بر علیه عفونت ها در مواد اولیه وجود دارند. این آنتی بادی ها قادرند تا با ویروس هایی که بطور بالقوه وارد پلاسمای مخلوط شده اند، ترکیب شده و آن ها را خنثی کنند و بدین ترتیب از تکثیر ویروس در خارج یا داخل بدن جلوگیری کرده و یا آن را محدود نمایند.

روند صحیح تولید (GMP)

برای تمام محصولات مشتق از پلاسما ،کیفیت بالا یک امر حیاتی است. این امر تنها می تواند از طریق یک سیستم یکپارچه وکامل از مدیریت کیفیت که در برگیرنده همه جنبه هایی که به صورت مجزا و بهم پیوسته تولید را تحت تاثیر قرار می دهند، بدست آید. موسسات پالایش کننده پلاسما در تطابق اکید با چنین سیستم کیفیت فعالیت می کند و وفادار به هر دو اصل GMP و cGMP می باشد.

Dr. Safari Fard

عناصر اصلی GMP عبارتند از: کنترل تغییرات، بازرسی و صلاحیت تامین کننده ها ، برنامه خود بازرسی، آموزش، مستندسازی، بررسی سالانه محصول، مدیریت انحرافات،کیفیت/معتبرسازی،کالیبره کردن، تعمیر و نگه داری پیشگیرانه.

GMP متداول (cGMP) همان گونه که از نامش پیداست، ثابت نیست ومنعکس کننده تطبیق استانداردهای کیفی با جدید ترین اطلاعات، فن آوری وعملیات است. آنچه امروزرایج ومتداول است لزوما فردا رایج ومتداول نخواهد بود.

در پاسخ به این الزامات، شرکت های پالایش کننده مانند شرکت اوکتافارما به طور مستمر، تجهیزات، سیستم ها و اقدامات فنی خود را توسعه داده و نوسازی می کند و با ایجاد محدودیت های زیاد برای اهدا کنندگان پلاسما، آزمایش های اضافی را بر روی اهدا کنندگان پلاسما انجام می دهد و بطور مستمر بر روی ظرفیت های حذف / غیرفعال کردن ویروس ها در مراحل تولید سرمایه گذاری می کند. اجرای این استانداردها، تضمین کننده پیشرفت مداوم cGMP است.

تضمین کیفیت و کنترل کیفیت

متعاقب تولید، همه محصولا ت پلاسمایی متحمل یک سری آزمایش های سخت کنترل کیفیت، می شوند که شامل شاخص های ویروسی(PCR, ELISA)، به منظور اطمینان از انطباق با مشخصات محصول می باشند. تا زمان دریافت و تائید تمام نتایج آزمایش ها ی کنترل کیفیت، محصولات در قرنطینه نگه داری می شوند. فقط سری کارهائی که توسط افراد ذیصلاح تحت بررسی گسترده قرار گرفته باشند، برای فروش ومصارف درمانی ترخیص می شوند.

- ✓ ذخیره سازی و حمل و نقل کنترل شده

با علم به اینکه کیفیت، ایمنی، کارائی و بازده پلاسما و مشتقات آن بستگی به یکپارچگی زنجیره دما دارد، لذا موسسات پالایش کننده موارد زیر را در نظر می گیرند:

- کنترل دمای نگه داری پلاسمای مبدا و محصولات نهایی همراه با پایش مداوم ومعتبر سازی شده درجه حرارت.
- در حالت قطع برق، همه فریزرها /سردخانه ها دارای یک سیستم پشتیبانی اضطراری هستند.
- نقل و انتقال توسط کامیون های سرپوشیده و یخچال دار که تضمین کننده کنترل درجه حرارت هستند (در مورد محصولات نهایی، این برای مقاصد انتخابی قابل اجرا است)
- همه پلاسما های دریافتی و محصولات نهایی همراه با ثبت کننده های کامپیوتری درجه حرارت حمل می شوند.

الزامات کیفی

Dr. Safari Fard

رعایت الزامات لازم (بسته بندی، برچسب زنی، دمای ثبت شده حمل و نقل، مانند دستگاه های ثبت کننده دما data loggers، دسترسی به نمونه های لازم برای انجام آزمایش های اضافی و غیره) به هنگام بارگیری و حمل با کشتی مورد بازرسی قرار می گیرد. پلاسما بلافاصله در فریزر متحرک قرنطینه می شود. اسناد (مثل تاییدیه امضاء شده در مبداء و کنترل پلاسما، زمان جمع آوری، تعداد ظروف بارگیری شده، اطلاعات آزمایش های ویروس شناسی و ایمنی شناسی، کیت های مورد استفاده در آزمایش ها و تعداد سری های تولید) مورد بازرسی قرار گرفته و با شرایط واقعی بار مورد حمل مطابقت داده می شود. آزمایش های اضافی، مثل آزمایش اسید نوکلئیک (NAT) به عنوان مثال B19,HAV,HBV,HIV,HCV و یا تعیین آماری فاکتور هشت و محتویات پروتئینی با تهیه نمونه از پلاسمای اهدا شده ممکن است انجام شود.

تنها پلاسماهای اهدا شده ای که از نظر کیفی با الزامات کیفی و آزمایش ها مطابقت داشته باشند برای پالایش مورد استفاده قرار می گیرند. قبل از ذوب ممکن است برای چند ساعت پلاسما به دمای کنترل شده رسانده شود تا ذوب آن تسهیل گردد. روش های مختلف سازگار با فرآیند بهداشتی برای کاهش خطرات زیستی، برای باز کردن بسته های پلاسما ابداع شده است. پلاسما های فریز شده را از ظروف کیسه خود خارج کرده و برای رسوب کرایو آن ها را با هم مخلوط (پولد) می کنند و مراحل بعدی پالایش انجام می شود.

تولیدات بینابینی به دست آمده در طی تولید برای تهیه پولد و انجام عملیات ذخیره می گردند. محصولات نهایی استریل فیلتر شده شیشه ای در شرایط آسپتیک داخل ظروف خود به عنوان محصول نهایی ریخته می شوند و یا بطری های حاوی آلبومین تحت پاستوریزاسیون نهایی قرار داده می شوند. سری های تولید شده قرنطینه می گردند تا از نظر کیفی تحت کنترل های لازم قرار گیرند و پرونده محصول مورد بررسی قرار می گیرد. سری تولید مطابق با اختصاصات، بر چسب زده شده و در بعضی از کشور ها سری های تولیدی ممکن است با مجوز های قانونی ترخیص گردند.

برنامه پالایش قراردادی پلاسما

Dr. Safari Fard

تهیه مشتقات ایمن و کافی پلاسمایی برای پوشش دادن نیاز های مردم تمام کشورها ، نیازمند توجه ویژه و پشتیبانی اقتصادی و فنی می باشد، که به خوبی برنامه ریزی شده است. انتخاب ها شامل واردات فرآورده های آماده پلاسمایی و یا محصولات تهیه شده از پلاسمای جمع آوری شده در همان منطقه است. یکی از راه کارها، توجه به پالایش محلی پلاسما است که به وسیله ساختن و راه اندازی تاسیسات پالایش پلاسما یا امکاناتی که به طور منطقه ای مورد حمایت قرار گرفته است، انجام می گیرد. چنین تاسیساتی می تواند یا فرآورده های نهایی و یا فرآورده های حد واسط را که بعدا در مجتمع دیگری ، فرایند نهایی بر روی آآن ها انجام می گیرد تولید نماید.

راه کار دیگر برای اطمینان از دستیابی به فرآورده های پلاسمایی، برنامه پالایش قراردادی پلاسما است که پلاسماهای محلی به یک یا چند پالایشگاه پلاسما فرستاده شده و پلاسما مطابق با توافق از پیش تعیین شده، پالایش می گردد و تمام و یا بخشی از فرآورده های نهایی به کشور تامین کننده پلاسما باز گردانده می شود.

هزینه ایجاد برنامه پالایش قراردادی پلاسما در مقایسه با تاسیس و راه اندازی یک پالایشگاه پلاسما خیلی کمتر است. در موقع عدم وجود پالایشگاه محلی، دسترسی به فرآورده های پلاسمایی که از پلاسمای محلی تهیه می شود، با بستن قرارداد پالایش پلاسما در زمان کوتاه تری قابل حصول است.

برنامه پالایش قراردادی پلاسما تحت شرایط خاصی می تواند به عنوان مرحله مقدماتی برای تاسیس پالایشگاه پلاسما عمل کند. این فاصله زمانی می تواند برای تمرکز بیشتر بر منطق احداث یک پالایشگاه محلی، افزایش ظرفیت بالقوه در زمینه جمع آوری پلاسما، طراحی مناسب، کیفیت سازی، معتبر سازی امکانات و آموزش کارکنان محلی استفاده شود.

نکات مهم

Dr. Safari Fard

هر تصمیمی که در مورد برنامه پالایش قراردادی پلاسمای گرفته می شود، باید همراه با روند تصمیم گیری دقیق و صحیح باشد. علاوه بر رعایت الزاماتی که سلامت و مقرون به صرفه بودن تولید فرآورده های خونی را تضمین می کند، موارد خاص دیگری مرتبط با ساخت فرآورده های پلاسمایی وجود دارند که باید در نظر گرفته شوند. این موارد عبارتند از:

- ارزیابی دقیق از نیاز ها و خواسته های بالینی و تعریف واضح از نوع و کیفیت فرآورده های پلاسمایی مورد نیاز برای برای درمان مناسب بیماران.
- جمعیت کافی اهدا کنندگان خون و یا پلاسما ، منطقه ای یا ملی ، برای تضمین تامین مناسب و کافی ماده اولیه سالم برای پالایش پلاسما.
- وجود سازمان کارا برای جمع آوری خون در سطح ملی. انتخاب اهدا کننده خون و یا پلاسما، روندهای جمع آوری، روش های انجام آزمایش ها، مدیریت اهدا، ذخیره سازی و حمل و نقل پلاسما بایستی از پروسه تعریف شده تضمین کیفیت (راهنما های بین المللی) پیروی کند.
- پلاسمای مورد نیاز برای پالایش، باید معیار های مورد نیاز ایمنی و کیفیت را به عنوان ماده اولیه جهت تولید فرآورده های پلاسمایی را داشته باشد. الزامات موسسه پالایش کننده پلاسما و بازرسی های منظم دارویی رعایت شود. همچنین ردیابی پلاسما بین اهدا پلاسما و فرآورده های نهایی پلاسمایی یک عامل کلیدی است که باید در نظر گرفته شود.
- یک ساختار مشورتی حرفه ای- ملی با صلاحیت، به همراه کارشناسان محلی کافی برای ارائه توصیه ها در مورد برنامه باید در روند تصمیم گیری دخالت داشته باشند .
- یک نهاد قانونی بهداشت در سطح ملی (MRA) که قادر به ارزیابی و تنظیم موضوعات پیچیده مرتبط با کیفیت و ایمنی فرآورده های دارویی مشتق از انسان باشد.
- موازنه اقتصادی کل برنامه باید بدقت ارزیابی گردد تا اطمینان حاصل شود که برنامه، پارامترهای مختلف هزینه ها در جهت مقرون به صرفه بودن پوشش می دهد.

ارزیابی امکان پذیری

Dr. Safari Fard

برنامه پالایش قراردادی پلاسما باید بر پایه اصول تولید قراردادی فرآورده های دارویی بوده و برنامه ریزی ها باید الزامات تدوین شده توسط نهاد قانونی بهداشت در سطح ملی را رعایت نماید. مسئولیت و وظایف هر بخش دخیل در این قرارداد (شامل تامین کنندگان پلاسما و شرکت های پالایش کننده) باید به وضوح در اسناد فنی اختصاصی، مشخص شده باشد. پارامترهای مورد توجه عبارتند از:

۱- منبع تامین پلاسما

برنامه پالایش قراردادی پلاسما، در صورتی که تضمین در مورد تامین و مداوم پلاسمای وجود دارد، در نظر گرفته شود. در بیشتر موارد، جائی که دسترسی به پلاسما موقتی است ، بستن چنین قراردادهایی توصیه نمی شود. ظرفیت استفاده از پلاسمای بدست آمده از اهدا خون کامل و نیاز احتمالی به جمع آوری پلاسما از طریق روند آفرزیس باید ارزیابی شود.

۲- حجم پلاسما

بایستی تامین مداوم حداقل پلاسما برای پالایش، قبل از تصمیم گیری در مورد پالایش قراردادی پلاسما، مد نظر قرار گیرد. توافقات برای پالایش پلاسما اغلب حداقل در حجم ۳۰۰۰۰ لیتر پلاسما در سال را شامل می شود. البته مثال هایی از توافقات بلند مدت با حجم های کمتر در مجتمع های پالایش کننده معظم، هم وجود دارد. از نظر فنی حداقل مقدار مورد پذیرش، بستگی به سایز بچ کاری در دو سطح متفاوت دارد : الف- در مرحله مخلوط کردن (Pooling) پلاسما و روند پالایش بالک (به طور عادی از ۱۰۰۰ تا ۴۰۰۰ لیتر به ازای هر بچ) و ب- در مرحله پایانی تولید فرآورده های پلاسمایی، چون محصولات حد واسط از چندین مخلوط پلاسما با منشاء یکسان تهیه می شود .

سری های کاری (batches) پالایش پلاسما، معمولا حجمی معادل ۲۰۰۰ تا ۴۰۰۰ لیتر دارند و از مخلوط کردن پلاسمای هزاران اهدا کننده بدست می آید. تهیه پلاسما برای پالایش مطابق با اصول GMP، یکی از عناصر کلیدی در کیفیت و ایمنی فرآورده های مشتق از پلاسما است. خصوصیات کیفی پلاسما برای پالایش باید موسسات پالایش کننده پلاسما به طور دقیق تعریف شده و توسط موسسات نظارتی تایید شده باشد.

۳- دوره قرارداد

Dr. Safari Fard

بایستی تضمینی بدست آید، که شرکت پالایش کننده بتواند متعهد شود که قرارداد را برای حداقل دوره زمانی موافقت شده و مطابق با درخواست های تامین کننده پلاسما انجام دهد. اگر حجم پلاسما کافی باشد، عاقلانه است برای چنین کشورهایی که با بیش از یک شرکت پالایش کننده پلاسما قرارداد ببندند تا انعطاف پذیری وجود داشته و اطمینان از تامین فرآورده های پلاسمایی به صورت مداوم و به طور متنوع وجود داشته باشد.

پرونده اولیه فرآورده و خصوصیات

اصول کلی پالایش پلاسما به خوبی تدوین شده اند و در روش های مشابه انجام می گیرند. البته تفاوت های زیادی در روند تولید فرآورده های پلاسمایی وجود دارد. روش های غیر فعال سازی ویروسی و سایز هر بچ ممکن است بر روی بازده محصول تاثیر داشته باشند. بنابراین در هنگام گفتگو برای بستن قرارداد با پالایشگاه ، نکات ذکر شده باید مورد توجه قرار گیرند و قوانین مرتبط رعایت شوند. بعلاوه کشورهای در حال توسعه ممکن است با محدودیت های اقتصادی یا ویژگی های جمعیتی بیماران خود مواجه شوند که مانع از استفاده آن ها از راهکار های بالینی کشورهای پیشرفته می شود. برای مثال دوزهای مورد استفاده برای فاکتور هشت انعقادی تغلیظ شده (VIII) و ایمونوگلوبولین داخل وریدی (IVIG) حداقل در ابتدا، کمتر از دوز مصرف شده در کشورهایی می باشد که از نظر پزشکی پیشرفته تر هستند. همچنین گرایش های بالقوه در مصرف فرآورده و تاثیر احتمالی سایر درمان ها و فن آوری ها باید در تصمیم گیری درست مورد ارزیابی قرار گیرند.

الزامات قانونی

فعالیت پالایش قراردادی پلاسما، بخش های مختلف را برای اطمینان از کیفیت و ایمنی ماده اولیه ، پلاسما برای پالایش، و فرآورده های نهایی شامل می شود.

الف- روند های جمع آوری خون و یا پلاسما

قبل از انتخاب پلاسما بعنوان ماده اولیه برای فرآورده های دارویی، باید الزامات کیفی در تمامی مراکز جمع آوری رعایت شود. این الزامات بوسیله روندهای بازرسی و نظارت قانونی که مطابق با اصول صحیح تولید (GMP) است ، نشان داده می شود.

تامین کننده پلاسما: بازرسی و نظارت قانونی

Dr. Safari Fard

با توجه به این که جمع آوری پلاسما برای پالایش، بخش مهمی از فرآیند تولید فرآورده های مشتق از پلاسما را تشکیل می دهد ، اطلاعات زیر باید در دسترس باشند:

- خصوصیات اپیدمیولوژیکی جمعیت اهدا کننده
- معیارهای انتخاب اهدا کننده خون و یا پلاسما
- روند های جمع آوری و انجام آزمایش ها
- روش های فرایند ، نگه داری و حمل و نقل

این اطلاعات بایستی معیارهای قابل قبول MRA ملی را در کشورهای مبدا عرضه کننده پلاسما و پالایش کننده پوشش دهد. در مقابل باید شرکت پالایش کننده از معیارهای پلاسمای NMRA در کشور خودش ، پیروی نماید.

روند های تائید شده که در بالا به آن ها اشاره شد، بر پایه معیارهای کیفی هستند که مربوط به پلاسمای مورد استفاده برای پالایش است. در نتیجه، ممکن است موقعیتی بوجود آید که در آن برخی از مراکز جمع آوری پلاسما، از الزامات مربوط به جمع آوری اجزا حساس خون که مورد نیاز محلی است، رضایت داشته باشند، ولی تمایلی به جمع آوری پلاسما جهت پالایش نداشته نباشند. البته معیارهای مهم برای آزمایش اهدا کننده، رعایت می گردد، اما ممکن است معیارهای قابل قبول در مورد جنبه های مختلف پشتیبانی ، نظیر زمان های جداسازی ، منجمد کردن، ذخیره سازی و وضعیت حمل و نقل موجود نباشند.

ب- روندهای های پالایش پلاسما

مقامات قانون گذار موسسه های بهداشت ملی هر کشور باید گواهینامه امکانات پالایش را صادر نمایند. توصیه می شود که مقامات قانون گذار کشورهای تامین کننده پلاسما، قبل از بستن قرارداد، کیفیت و ایمنی فرآیند مراکز پالایش پلاسما را ارزیابی کنند.

یکی از اولین مراحلی که بایستی قبل از تصمیم گیری در مورد پالایش پلاسما انجام گیرد ، تائید این موضوع است که فرآورده های پلاسمای تولیدی بوسیله پالایش کننده قراردادی، از نظر ویروسی غیر فعال شده و مجوز های محصول تکمیل گردیده است.

معیارهای ویژه برای کنترل خطرات عفونی شامل ۱) معیارهای انتخاب اهدا کننده خون و یا پلاسما ۲) روش های مورد استفاده برای آزمایش خون و یا پلاسمای اهدایی ۳) بررسی اپیدمیولوژیک جمعیت اهدا کننده ۴) پیروی از اصول GMP توسط موسسات خون و ۵) وجود سیستم اطلاعات بعد از اهدای خون، می باشند .

Dr. Safari Fard

در طی روند تولید هر محصول، برای غیر فعال سازی یا حذف ویروس های پوشش دار و یا بدون پوشش که ممکن است بالقوه در ماده اولیه (پلاسما) وجود داشته باشند، مراحل پیش بینی شده و معتبر سنجی شده بکار گرفته می شود. مطالعات تجربی اخیر نشان می دهد که مراحل متعدد روند پالایش پلاسما، با حذف پریون ها ارتباط دارد.

سایر جنبه های کیفی که ممکن است بر روی میزان کیفیت یا بازیابی فرآورده های پلاسمایی پالایش شده تاثیر بگذارند، شامل پارامترهای عملیاتی مورد استفاده برای جداسازی پلاسما، میزان فریزینگ و دمای نگهدای پلاسما هستند.

بسته به سیاست خاص هر کشور، ممکن است قبل از روند تولید در موسسه پالایش کننده پلاسما، بازرسی مورد نیاز باشد. برای مثال این بازرسی ممکن است جهت تشخیص چگونگی جدا سازی سری کار(بچ) بین پلاسما از منابع مختلف انجام می شود. چنین بازرسی هایی باید با همکاری مقام های قانون گذار مسئول ، جهت اعطای گواهینامه به موسسه پالایش کننده باشد.

الزامات استاندارد کیفی

در بازارهای جهانی فرآورده های پلاسمایی، الزامات استاندارد کیفی در مورد پلاسما مورد استفاده برای پالایش خیلی مهم تر از سطوح ملی یا منطقه ای هستند.[۱۱۵] این الزامات کیفی حتی در برنامه پلایش قراردادی پلاسما (که پلاسمای جمع آوری شده در یک منطقه یا کشور، در کشور دیگری پالایش می شود)، باید در نظر گرفته و اجرا گردد. [۱۱۶]

روند صنعتی پالایش پلاسما باید تحت شرایط بهداشتی کامل انجام گیرد. در موسساتی که دارای مجوز هستند، مطابق با اصول GMP مراحل تولید مورد استفاده برای جداسازی اجزای مختلف در یک روند مداوم و یکپارچه انجام می گیرد. اجزای مهم جدا شده، توسط روش های رسوب در سرما-۴ تا ۱ درجه سانتی گراد (cryoprecipitation) و رسوب توسط اتانول سرد(cold ethanol precipitation) یا با استفاده از روش های کروماتوگرافی به محصولات درمانی ویژه ای تبدیل شده و خالص می گردند.[۱۱۷]

تولید پلاسما برای پالایش مطابق با اصول صحیح تولید GMP باید به عنوان یک بخش جدایی ناپذیر از روند تولید فرآورده های پلاسما محسوب شود. اطمینان از ایمنی و کیفیت تک تک پلاسماهای اهدا کنندگان، حائز اهمیت است، زیرا هر عدد پلاسمای اهدایی یا انبوهی از پلاسماها برای پلایش مخلوط شده و از آن ها داروهایی تهیه می گردد که به صدها بیمار تزریق می شود.

[115] Farrugia A: International movement of plasma and plasma contracting. Dev Biol (Basel) 2005; 120 :85–96
[116] WHO: Recommendations for the Production, Quality Control andRegulation of Plasma for Fractionation, 2005; available at http://www.who.int/bloodproducts
[117] Burnouf T: Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1995; 664: 3–15

ویژگی های بکار گرفته شده بوسیله موسسات خون برای جمع آوری، آزمایش و نگه داری پلاسما برای پالایش باید به طور دقیق توسط مراکز پالایش کننده پلاسما تعریف و مشخص شده و توسط موسسات قانونی ناظر، تایید شده باشد. این الزامات مرتبط با پالایش پلاسما ممکن است با الزامات مربوط به پلاسمای تزریقی به بیماران متفاوت باشد.

در اروپا، اطلاعات مربوط به تمام روند جمع آوری پلاسما برای پالایش در موسسه جمع آوری کننده پلاسما در پرونده هایی که Plasma master File نامیده می شود، ثبت می گردد.[۱۱۸] [۱۱۹] این پرونده یک بخش جدایی ناپذیر سند مجوز بازار برای این فرآورده های دارویی مشتق از پلاسما است.

دارنده فرآورده های تهیه شده از پالایش قراردادی پلاسما، باید با الزامات بازار فروش در منطقه خود منطبق باشند و روندهای دریافت مجوز محلی را انجام دهند. روند اخذ مجوز، شامل این موارد است:

- پرونده کامل اطلاعات پلاسما (Plasma master file)
- پرونده کامل اطلاعات شرکت (Site/establishment master file)
- پرونده ثبت هر فرآورده به صورت جداگانه (Individual products registration file)

همانطور که در بالا اشاره شد این روند اخذ مجوزها ممکن است نیازمند بازرسی های اختصاصی امکانات مورد استفاده جهت جمع آوری و پالایش پلاسما باشد. همچنین نهاد قانونی بهداشت در سطح ملی (MRA) فرآورده های پلاسمایی را تنظیم می کند. هر موسسه ای که با فرآورده های پلاسمای خونی سروکار دارد و در توزیع آن دخیل است، بایستی الزامات منطقه ای برای ذخیره سازی ، توزیع و ردیابی فرآورده های دارویی را رعایت نماید.

ملاحظات اقتصادی

در مورد جنبه های اقتصادی مرتبط به توافق پالایش قراردادی، نکات زیر می تواند در تخمین موارد اقتصادی برنامه و عوامل دخیل در قیمت فرآورده های پلاسمایی مفید باشند:

- هزینه جمع آوری پلاسما ، شامل جذب اهدا کننده
- روندهای انجام آزمایش بر روی اهدا های منفرد

[118] CHMP: Guideline on Requirements for Plasma Master File (PMF) Certification. CPMP/BWP/4663/03, 2004; available at http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/466303en.pdf
[119] CHMP: Guideline on the Scientific Data Requirements for a Plasma Master File (PMF). EMEA/CPMP/BWP/3794/03, 2004; available at http://www.emea.europa.eu/pdf/human/bwp/373403en.pdf

Dr. Safari Fard

- ذخیره سازی پلاسما
- حمل پلاسما (بستگی به شرائط، از راه دریایی یا هوایی) به مجتمع پالایش کننده
- هزینه آزمایش های سرولوژی و NAT بر حسب نیاز
- هزینه پالایش بر حسب واحد فرآورده ساخته شده (برای مثال هر گرم آلبومین و IgG ، و واحد بین المللی FVIII و FIX) یا هر لیتر پلاسمای پالایش شده. یک حداقل بازده تضمین شده بایستی در هزینه گنجانده شود.
- حمل فرآورده ها به کشور تامین کننده پلاسما
- هزینه های ثبت فرآورده های پلاسمایی
- هزینه های توزیع
- مخارج درمانی و بازار/ فروش
- امور اجرایی و هزینه های کلی

معمولا قیمت پلاسما و هزینه های پالایش، نشان دهنده هزینه های اصلی فرآورده هستند. هزینه پلاسما به دو عامل بستگی دارند: یکی اینکه آیا پلاسما از خون های اهدایی که جهت تهیه گلبول های قرمز دریافت شده اند بدست آمده است که این می تواند باعث اشتراک هزینه ها شود و دوم اینکه آیا برنامه جمع آوری ویژه ای برای پلاسمای مورد نیاز جهت پالایش پلاسما وجود دارد.

هزینه های فرآیند پالایش پلاسما که به وسیله شرکت های پالایش کننده، دریافت می شود بر اساس معیارهای زیر هستند:

- حجم کلی پلاسمای پالایش شده، اندازه هر بچ در مرحله مخلوط سازی(pooling) و اتمام تولید فرآورده های نهایی
- تعداد فرآورده های ساخته شده و باز یابی شده.
- فن آوری خالص سازی و روش های ویروس زدایی که بر روی بازیابی یا بازده مشتقات پلاسمایی تاثیر دارند.

ممکن است لازم باشد مبالغی به سومین گروه که حق امتیاز فن آوری محصول را دارند، پرداخت شود. هزینه های توزیع و بازار فروش، به عوامل محلی بستگی دارد، مانند این موضوع که آیا شبکه انتقال خون در امر توزیع دخالت دارد یا اینکه یک توزیع کننده مشخصی بکار گرفته شده است.

Dr. Safari Fard

ممکن است موقعیتی ایجاد شود که در طی توافق نامه پالایش قراردادی، موسسه پالایش کننده مجاز گردد تا بخش یا قسمتی از محصولات تهیه شده از روند پالایش را برداشت کند. این امر در صورتی امکان دارد که یا فرآورده های حاصله در کشور تامین کننده پلاسما بیش از حد نیاز باشد و یا این توافق منجر به کاهش هزینه پالایش شود.

Dr. Safari Fard

فهرست دوره‌های آموزشی

دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

- سیستم مدیریت کیفیت (QMS)
- سیستم مدیریت کیفیت دارویی (PQS)
- اصول بهینه تولید (GMP) مقدماتی
- اصول بهینه تولید (GMP) پیشرفته
- ده فرمان طلایی GMP
- اصول بهینه تولید (GMP) ویژه مراکز انتقال خون
- اصول بهینه تولید (GMP) ویژه مراکز پلاسمافرزیس تولیدی
- اصول بهینه تولید (GMP) تولید داروهای استریل در شرایط آسپتیک
- اصول بهینه تولید (GMP) داروهای هازارد و تحت کنترل
- عملیات صحیح آزمایشگاهی (GLP)
- مدیریت ریسک کیفی (QRM)
- عملیات صحیح انبارداری فرآورده‌های دارویی (GSP)
- عملیات صحیح توزیع فرآورده‌های دارویی (GDP)

Dr. Safari Fard

- عملیات صحیح انبارداری/ توزیع فرآورده‌های دارویی (GSDP)
- خودبازرسی(Self-Inspection)
- فن آوری اتاق تمیز (Cleanroom)
- شناسایی و کنترل آلودگی در اتاق تمیز
- گانینگ و فرآیندهای ورود/ خروج در فضاهای تمیز (Gowning)
- رفتار درست کارکنان در اتاق تمیز
- نظافت و بهداشت شخصی کارکنان بخش‌های تولیدی
- مدیریت بهداشت و ایمنی شغلی(HSE)
- بهداشت و ایمنی شغلی (HSE) ویژه آزمایشگاه
- بهداشت و ایمنی شغلی (HSE) ویژه انبار
- بهداشت و ایمنی شغلی(HSE) ویژه بخش‌های تولیدی
- اصول نظافت، تمیزکاری و پاک‌سازی اتاق تمیز (Cleanroom Cleaning)
- اصول نظافت، تمیزکاری و پاک‌سازی انبار
- نظافت و پاک‌سازی تجهیزات و تاسیسات بخش‌های تولیدی
- نظافت و پاک‌سازی تجهیزات و تاسیسات بخش‌های اداری
- استریلیزاسیون، ضدعفونی، پاک‌سازی محیط و تجهیزات
- الزمات نظام آراستگی (5S)
- الزمات نظام آراستگی (5S) ویژه بخش‌های اداری
- الزمات نظام آراستگی (5S) ویژه بخش تولید
- الزمات نظام آراستگی (5S) ویژه انبار

Dr. Safari Fard

منتخبی از سوابق تدریس دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

Management, QMS, GMP, GLP, GSP, HSE, Cleanroom

در بیش از ۱۰۰ دانشگاه، مرکز آموزش عالی، سازمان، شرکت و موسسه آموزشی

۰۹۱۲۲۱۳۷۱۴۴

دکتر علی اصغر صفری فرد (Ph.D)

نویسنده، مشاور و مدرّسِ

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

09122137144

safarifardas@Gmail.com

Dr. Safari Fard

Dr. Safari Fard

شبکه آموزشی دنیای شکوفا

GMP, GLP, GSP, QRM, HSE, Cleanroom

t.me/shokofa_world

eitaa.com/shokofa_world

www.shokofaworld.blogfa.com

www.shokofaonline.blogsky.com

09122137144