جداسازی و تخلیص آلبومین از پلاسمای انسانی با رویکردهای مستقیم و تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی و مقایسه کیفیت فرآورده‌های نهایی

مریم باقری، هاشم خرسند محمدپور، کامران موسوی حسینی*

گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۶ ویرایش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۹/۱۲/۰۱

زمینه و هدف: با توجه به نقش‌های متعدد آلبومین در بدن، تزریق فرآورده دارویی آن به‌عنوان یکی از راهکارهای درمانی یا مدیریتی در شرایطی نظیر خونریزی‌های شدید، سوختگی‌ها، نارسایی‌های کبدی و بیماری‌های همولیتیک نوزادان در دستور کار پزشکان قرار می‌گیرد. با در نظر گرفتن این موضوع که آلبومین، فراوان‌ترین پروتیین پلاسما محسوب می‌شود، طراحی یک روش مناسب برای تخلیص آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعه پیش رو، به بررسی دو روش مستقیم و تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی در تخلیص آلبومین از پلاسمای انسانی و مقایسه کیفیت فرآورده‌های نهایی حاصل شده به هر دو روش می‌پردازد.

روش بررسی: این مطالعه از بهمن ۱۳۹۷ تا مهر ۱۳۹۸ در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفت. در این پژوهش، ۱۰ کیسه حاوی پلاسمای انسانی به‌صورت تصادفی گردآوری و برای تخلیص پروتیین آلبومین با روش‌های مستقیم و تلفیقی کروماتوگرافی تبادل یونی به‌کار گرفته شد و خلوص فرآورده‌های نهایی، به واسطه انجام تست‌های الکتروفورز استات سلولز و SDS-PAGE مقایسه گردید. نمونه حاصل از روش تلفیقی، پاستوریزه شد و به منظور بررسی تجمعات پلیمری، آنالیز HPLC برروی آن انجام گرفت.

یافته‌ها: فرآورده نهایی حاصل شده با روش تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی برخلاف روش مستقیم از خلوص مناسبی برخوردار بود با میانگین حدود ۹۵٪ و میزان پلیمر موجود در آن نیز توسط آنالیز HPLC کمتر از ۵٪ برآورد گردید ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: به واسطه رقیق نمودن پلاسما و متعاقبا کاهش قدرت یونی، می‌توان تنها با بهره‌گیری از دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی، آلبومین را با درجه خلوص مناسب از پلاسمای انسانی جداسازی نمود.

کلمات کلیدی: آلبومین، کروماتوگرافی تعویض یونی، پلاسما.

*نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، گروه بیوتکنولوژی پزشکی.
تلفن: ۸۲۰۵۲۱۶۰-۰۲۱
E-mail: mkmousavi@yahoo.com

مقدمه

پلاسمای انسانی، ماده‌ای حیاتی و منحصر به فرد است، چرا که حاوی انواع مختلفی از پروتیین‌ها می‌باشد و علیرغم آن که اهمیت بالینی برخی از آن‌ها مشخص گردیده، هنوز هم بسیاری از آنها کاملا شناخته نشده‌اند.[1] امروزه فرآورده‌های مشتق از پلاسما، قسمت عمده‌ای از داروهای مورد مصرف انسان را تشکیل می‌دهند.[2-4] به دلیل قابلیت تولید چند محصول از یک ماده اولیه واحد، پالایش پلاسمای انسانی، هنوز هم مهمترین رویکرد بیوتکنولوژیک برای تولید این فرآورده‌ها محسوب می‌شود.[5] در تهیه داروهای مشتق از پلاسما، ویژگی‌های پلاسمای اولیه تاثیر بسزایی در کیفیت محصولات نهایی دارد.[6] یکی از مهمترین پروتیین‌های پلاسما، آلبومین

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

(Albumin) می‌باشد که با غلظت تقریبی g/dl ۵-۳/۵، عنوان فراوان‌ترین پروتیین موجود در پلاسمای افراد سالم را به خود اختصاص داده است. این پروتیین که سنتز آن را کبد بر عهده دارد، تنظیم‌کننده اصلی فشار انکوتیک (Oncotic pressure) محسوب می‌شود.[۷] از این‌رو به منظور بازگرداندن و حفظ حجم جریان خون در مواردی نظیر سوختگی‌ها، اعمال جراحی، خونریزی و تعویض پلاسما که حجم خون کاهش می‌یابد و نیز در شرایطی مانند سندرم نفروتیک، سیروز کبدی، هیپوآلبومینمی و سندرم زجر تنفسی حاد مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۸] افزون‌براین، باتوجه به نقشی که در اتصال به بیلی‌روبین و انتقال آن به محل دفع دارد، استفاده از آن در مراحل درمان بیماری‌های همولیتیک نوزادان در دستور کار پزشکان قرار می‌گیرد.[۵] از سوی دیگر، در عرصه تحقیقات نیز آلبومین از جایگاه خاصی برخوردار است و از آن به‌عنوان مکمل در محیط کشت سلول‌های جانوری، پایدارکننده و بیوکروماتوگرافی استفاده می‌شود.[۷] باتوجه به کاربردهای بی‌شمار آلبومین در بالین و نیز تحقیقات و با در نظرگرفتن این موضوع که جایگزین مناسب دیگری برای آن توصیه نشده است.[۹] پیش‌بینی می‌شود نیاز جهانی به این فرآورده دارویی به‌طور مداوم رو به افزایش باشد. از این‌رو، پژوهشگران از دیرباز تاکنون راهکارهای مختلفی را برای تهیه این فرآورده پروتیینی به‌کار گرفته و یا طراحی و ابداع نموده‌اند. روش اتانول سرد (Cold Ethanol process) یکی از پرکاربردترین روش‌ها در جداسازی ماکرومولکول‌های پلاسما می‌باشد.[۸و۱۰و۱۱] روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی معمولا جهت خالص‌سازی بیشتر پروتیین‌ها به‌کار می‌رود.[۱۲-۱۵] روش‌های ترسیبی از دیگر روش‌های جداسازی پروتیین‌ها می‌باشند.[۱۶] به‌تازگی روش‌های مبتنی بر مهندسی ژنتیک نیز جهت تهیه پروتیین‌ها کاربرد پیدا نموده است.[۱۷] حتی امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تهیه پروتیین‌ها استفاده می‌گردد.[۱۸]

از ابتدای پیدایش صنعت پالایش پلاسما تاکنون، تولید آلبومین تجاری عمدتا با فرآیند اتانول سرد صورت گرفته و ضمنا پیشرفت‌های زیادی با تمرکز بر روی دست‌یابی به خلوص بالاتر، بازدهی بیشتر، پایداری و بازیابی سایر پروتیین‌ها حاصل شده است. پالایش پلاسما با رویکرد اتانول سرد محاسن متعددی دارد که یکی از آنها، ایمنی مناسب محصولات تولید شده می‌باشد، زیرا این روش در شرایط باکتریواستاتیک (Bacteriostatic) (غلظت بالای اتانول و pH پایین) انجام می‌پذیرد و به‌واسطه جداسازی فراکشن‌های جانبی، بار ویروسی نیز کاهش می‌یابد. افزون‌بر این، روشی مناسب برای تولید فرآورده‌های دارویی در مقیاس صنعتی است و فرآیند تولید و محصولات تهیه شده نیز مورد تایید می‌باشند. از سوی دیگر، لزوم نیاز به تجهیزات سرمایشی که غالبا فراهم نمودن آنها هزینه زیادی در بر دارد و نیز لزوم بازیابی اتانول مصرفی، از معایب این روش محسوب می‌شود. در ضمن این رویکرد، برای جداسازی پروتیین‌هایی که به مقادیر اندک در پلاسما حضور دارند و نیز پروتیین‌های حساس مناسب نیست.[۵و۱۹و۲۰] باتوجه به این امر که در حال حاضر، به‌دلیل افزایش تقاضا برای ایمونوگلوبولین‌ها و فاکتورهای انعقادی، صنعت پالایش پلاسما از نظر اقتصادی به تولید این دو محصول ارزشمند (به‌ویژه ایمونوگلوبولین‌ها) وابسته گشته است، از این‌رو به‌کارگیری یک روش مناسب برای تهیه هم‌زمان این مشتقات پلاسمایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.[۹]

در سال‌های اخیر، با تغییرات قابل‌توجهی که در تجهیزات فرآیندهای بیولوژیکی صورت پذیرفت، روش کروماتوگرافی برای تهیه محصولات دارویی مشتق از پلاسما مورد توجه واقع شد و به منظور توسعه رویکرد اتانول سرد مورد استفاده قرار گرفت. هم اکنون نیز امکان جایگزین شدن روش کروماتوگرافی ستونی (Column chromatography method) به جای فرآیند اتانول سرد در صنعت پلاسما وجود دارد و احتمالا در آینده‌ای نزدیک، امکانات و تجهیزات کروماتوگرافی شکل غالب این صنعت را تشکیل خواهد داد. از مزایای تکنیک کروماتوگرافی می‌توان دست‌یابی به خلوص بالا، اجرای شرایط ملایم و عدم وجود مراحل جداسازی جامد از مایع را نام برد که در این حالت انتظار می‌رود بازدهی فرآیند جداسازی کاهش نیابد. افزون‌براین، رویکرد بیان شده برای تولید در مقیاس صنعتی نیز مناسب می‌باشد.[۵و۹]

از آنجایی که فرآیند پالایش پلاسما طولانی و زمان‌بر است، به‌نظر می‌رسید هنگامی که تهیه دیگر فرآورده‌های خونی مدنظر نباشد، بتوان تنها با تکیه بر رویکرد کروماتوگرافی تعویض یونی آلبومین را با خلوص مناسب از پلاسمای انسانی جداسازی نمود، بدون آنکه ایمونوگلوبولین‌ها از دست بروند. اما آیا برای دست‌یابی به این هدف وجود تنها یک مرحله کروماتوگرافی (روش مستقیم) کافی بود؟ بنابراین، ما در مطالعه پیش رو بر آن شدیم تا با استفاده از رزین‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

تعویض یونی، اقدام به جداسازی و تخلیص آلبومین از پلاسمای انسانی به دو صورت مستقیم و تلفیقی نماییم و خلوص فرآورده‌های نهایی حاصله و همچنین بازدهی هر دو رویکرد را با هم مقایسه کنیم. لازم به بیان است که درطی این فرآیند ایمونوگلوبولین‌ها نیز از دست نرفتند و به‌نظر می‌رسد که بعدا بتوان با طراحی یک روش مبتنی بر کروماتوگرافی آن‌ها را نیز تخلیص نمود.

روش بررسی

دریافت نمونه‌ها، شرایط ذخیره سازی، معیارهای ورود به مطالعه و ملاحظات اخلاقی: ۱۰ عدد کیسه حاوی پلاسمای انسانی (Fresh Frozen plasma) به‌صورت تصادفی ساده انتخاب و از مرکز نوآوری سازمان انتقال خون دریافت گردید. سپس نمونه‌های پلاسما به آزمایشگاه مرکز تحقیقات منتقل و در فریزر (Jal tajhiz, Iran) با دمای ۲۰ °C- ذخیره شدند. معیار ورود به مطالعه در این پروژه، براساس اصول و استانداردهای کنترل کیفی فرآورده‌های پلاسمایی سازمان انتقال خون در نظر گرفته شد، به‌عبارت دیگر کیسه‌های سالم محتوی پلاسمای شفاف و بدون شکستگی که از اهداءکنندگان مستمر دریافت و از نظر آلودگی با ویروس‌های HIV، HBV و HCV بررسی شده و منفی بودند و مطابق پروتکل سازمان انتقال خون آزاد شده بودند، وارد این مطالعه شدند. لازم به بیان است که برای انجام این پژوهش از اهداءکنندگان مستمر نمونه خون مجددی دریافت نشد، بنابراین همان رضایت‌نامه اخذ شده در مرکز نوآوری سازمان انتقال خون مبنی بر استفاده از نمونه‌های اهداءکنندگان در صورت لزوم، مدنظر قرار گرفت. در ضمن نتایج حاصل از این مطالعه ارتباط مستقیمی با اهداءکنندگان نمونه‌های مورد استفاده ندارد.

تهیه CPP: محتویات تمام کیسه‌های حاوی پلاسمای دریافتی پس از ذوب شدن داخل یک بشر بزرگ مخلوط گردید و به‌منظور جداسازی رسوب کرایو، با دور g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۱ °C سانتریفیوژ (Centrifuge, Sigma, USA) شد و پس از جداسازی رسوب تشکیل شده، پلاسمای فاقد کرایو (CPP) در مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این که هدف این مطالعه جداسازی پروتیین آلبومین (pI=۴/۸) بود، pH معادل ۵/۵ برای آماده‌سازی نمونه در نظر گرفته شد. در ادامه، درجات رقت متفاوتی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰) از نمونه CPP با افزودن آب دیونیزه تهیه و pH آنها با استفاده از بافر استات ۴/۸ مولار که همان بافر مورد استفاده در روش Cohn است روی ۵/۵ تنظیم شد. پس از انجام سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۲۰ دقیقه، ۱ °C) و جداسازی رسوب تشکیل شده در هر نمونه، مراحل کروماتوگرافی تعویض یونی نمونه‌های مذکور و همچنین نمونه CPP رقیق نشده، با استفاده از رزین DEAE- سفارز (DEAE -Sepharose resin, GE healthcare, United States) صورت پذیرفت. سپس بازده جداسازی آلبومین محاسبه گردید و درباره انتخاب درجه رقت مناسب تصمیم‌گیری شد. در انتها، نمونه‌های CPP با بافر استات ۲۰ و ۱۵ mmol به میزان ۲۰ برابر رقیق و پس از تنظیم pH روی ۵/۵ و جداسازی رسوب حاصله با انجام سانتریفیوژ، وارد ستون کروماتوگرافی گردیدند و بازده جداسازی آلبومین در مورد آنها نیز محاسبه شد.

مراحل انجام کروماتوگرافی تعویض یونی: روش مستقیم، حجم محاسبه شده از محلول رزین DEAE- سفارز DEAE – FF (Separose FF resin, GE healthcare, United States) در داخل ستون Pharmacia XK16 با ارتفاع ۳۰ cm قرار گرفت و با استفاده از بافر استات ۱۵ mmol با pH معادل ۵/۵ متعادل شد. سپس سوپرناتانت (Supernatant) نمونه CPP رقیق شده با بافر استات (۱۵ mM، pH=۵/۵) با سرعت ۶- ml/m ۵ وارد ستون گردید و خروجی ستون گردآوری شد. مرحله Washing توسط بافر آغازین و به منظور خارج نمودن پروتیین‌هایی که با اتصالات ضعیف به رزین وصل شده بودند، انجام پذیرفت و در مرحله Elution آلبومین متصل شده به رزین با به‌کارگیری محلول سدیم کلراید ۰/۲ مولار جدا شد. در نهایت نیز رزین استفاده شده با عبور دادن محلول ۱ مولار سدیم کلراید و سپس آب دیونیزه بازیابی و در محلول اتانول ۲۰٪ ذخیره گردید.

روش تلفیقی: حجم محاسبه شده از محلول ژل CM-Sepharose FF (GE healthcare, United States) داخل ستون Pharmacia XK16 با ارتفاع ۳۰ cm قرار گرفت و مراحل متعادل نمودن ستون، آماده‌سازی و Load نمونه، Washing و Elution مطابق آن چه که در روش مستقیم بیان شد، انجام پذیرفت. سپس خروجی حاصل شده از Load نمونه در ستون CM- سفارز، وارد ستون DEAE- سفارز گردید و پس از انجام. مراحل Wash و Elution، رزین‌های مورد استفاده، احیا شدند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

سنجش غلظت پروتیین تام: برای اندازه‌گیری غلظت پروتیین تام در نمونه‌ها، از (Total Protein Assay Kit 500-0006, Bio-Rad, USA) که براساس متد برادفورد (Bradford method) طراحی شده است، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. محلول آلبومین سرم گاوی ۵٪ نیز برای آماده‌سازی نمونه‌های استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش غلظت آلبومین: برای اندازه‌گیری غلظت آلبومین در نمونه‌ها، از کیت تعیین کمی آلبومین (Albumin quantification kit, Ziest Chem Diagnostics, Tehran, Iran) که براساس متد رنگ‌سنجی BCG طراحی شده است، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. محلول آلبومین سرم گاوی ۵٪ نیز به‌عنوان نمونه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای ارزیابی خلوص فرآورده‌های نهایی، نسبت مقادیر آلبومین به پروتیین تام در فرآورده‌های مورد نظر محاسبه شد. برای ارزیابی بازده فرآیند جداسازی، نسبت مقدار آلبومین در فرآورده نهایی به مقدار آلبومین در پلاسمای اولیه محاسبه شد.

الکتروفورز استات سلولز (Cellulose acetate electrophoresis): به‌منظور بررسی الگوی باندهای پروتیینی موجود در نمونه‌های حاصل از کروماتوگرافی، آنالیز الکتروفورز با استفاده از غشای استات سلولز صورت پذیرفت. در این آنالیز، کاغذ استات سلولز (۷۶×۶۰ mm) در بافر باربیتال (Barbital buffer) خیسانده و سپس نمونه‌گذاری برروی آن انجام شد. الکتروفورز به‌مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ۱۸۰ ولت انجام گرفت و در نهایت باندهای پروتیینی توسط محلول Ponceau S رنگ‌آمیزی شدند. پس از انجام مراحل رنگ‌بری، تثبیت و شفاف‌سازی، غشای مورد استفاده در فور خشک و با استفاده از دستگاه دانسیتومتر (Densitometer, Helena laboratories, France)، اسکن باندهای پروتیینی انجام شد.

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE): به‌منظور بررسی دقیق‌تر الگوی باندهای پروتیینی، الکتروفورز نمونه‌های حاصل از کروماتوگرافی با استفاده از روش SDS-PAGE در سیستم بافری ناپیوسته شامل ژل متراکم‌کننده (۵٪) و ژل جداکننده (۱۰٪) صورت پذیرفت.

برای این تست، نمونه‌ها به‌مدت شش دقیقه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$ حرارت داده شدند. سپس به میزان ۲۰ µl از هر نمونه به‌همراه شاخص وزن مولکولی به چاهک‌های ژل منتقل گردید و الکتروفورز به مدت ۱۸۰ دقیقه در اختلاف پتانسیل ثابت ۱۲۰ ولت انجام شد. پس از اتمام زمان الکتروفورز، کاست حاوی ژل باز و ژل از آن جدا شد. سپس مراحل رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ (Coomassie brilliant blue R-250, Merck, Germany) انجام پذیرفت و پس از رنگ‌بری، باندهای پروتیینی مورد بررسی قرار گرفتند.

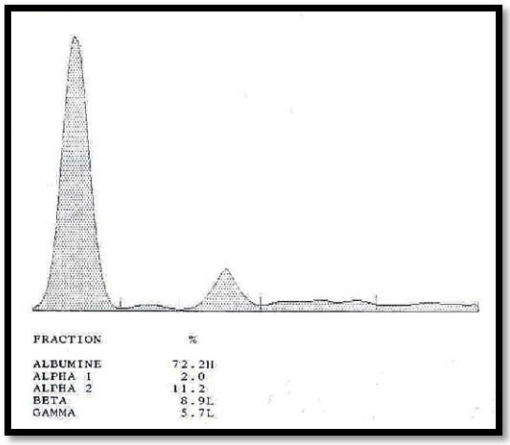
پاستوریزاسیون: یکی از مراحل مهم در تهیه فرآورده‌های بیولوژیکی دارویی مشتق از پلاسمای انسانی اعمال مرحله ویروس‌زدایی بر روی فرآورده می‌باشد.[۲۵-۲۱] موثرترین روش برای ویروس‌زدایی آلبومین روش پاستوریزاسیون می‌باشد. بدین منظور از مقاومت‌دهنده‌های حرارتی سدیم کاپریلات و سدیم اناستیل دی‌ال تریپتوفان با غلظت ۰/۰۱۶ مولار استفاده گردید.[۲۶] پس از افزودن، نمونه تخلیص شده طی مدت ۱۰ ساعت در بن‌ماری (Bain-marie, Optima, Germany) با دمای ۶۰ $^{\circ}C$ حرارت داده شد. سپس به‌منظور آماده ساختن فرآورده حرارت‌دیده برای آنالیز HPLC، فیلتراسیون با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرون، صورت پذیرفت. کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC): پس از پاستوریزاسیون فرآورده نهایی، به‌منظور بررسی میزان پلیمر و تجمعات پروتیینی ایجاد شده در آن، آنالیز HPLC انجام گرفت. در این آنالیز، از ستون TSKgel G3000SWXL و بافر فسفات ۰/۱ مولار برای متعادل ساختن ستون مذکور استفاده شد. نمونه موردنظر توسط محلول سدیم کلراید ۹ g/l تا غلظت نهایی ۱ g٪ رقیق و با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر گردید. سپس به میزان ۱۰ لاندا از نمونه به‌وسیله سرنگ هامیلتون (Hamilton Syringe به High-performance liquid chromatography) (HPLC), Waters, USA) تزریق شد و در نهایت پیک‌های مربوطه در کروماتوگرام نمایان شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

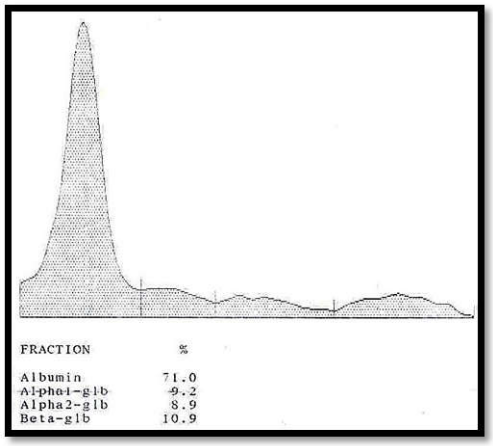
جدول ۱، نتایج حاصل از رقیق‌سازی نمونه CPP با بافر استات و نیز بازده جداسازی آلبومین پس از انجام مراحل روش مستقیم کروماتوگرافی تعویض آنیونی را نشان می‌دهد.

داده‌های حاصل شده نشان می‌داد که با رقیق نمودن CPP و متعاقبا کاهش قدرت یونی و هدایت الکتریکی، بازده جداسازی آلبومین در روش مستقیم کروماتوگرافی افزایش می‌یافت و در درجـه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]



شکل ۱: الگوی باندهای پروتیینی دومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش مستقیم در الکتروفورز استات سلولز



شکل ۲: الگوی باندهای پروتیینی سومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش مستقیم در الکتروفورز استات سلولز

جدول ۱: نتایج مربوط به رقیق‌سازی نمونه‌های CPP با بافر استات

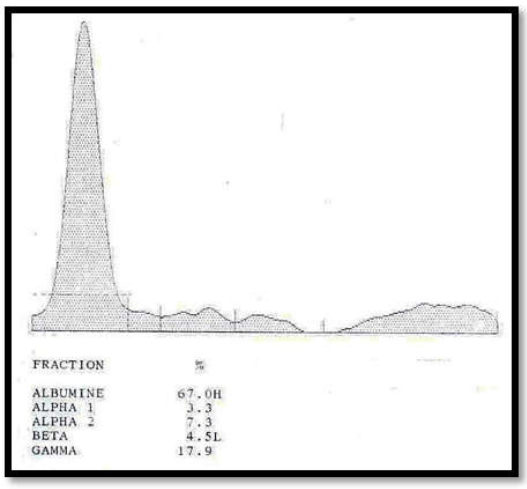
درجه رقت	مولاریته بافر استات	مشخصات نمونه پیش از افزودن بافر		مشخصات نمونه پس از افزودن بافر		بازده ستون در جداسازی آلبومین
		هدایت الکتریکی	pH	هدایت الکتریکی	pH	
صفر	٤/٨ M	١١/١١ mS/cm	٧/٦٢	١٣/٩٥ mS/cm	٥/٤٩	٪١٧
پنج	٤/٨ M	١١/٧٨ mS/cm	٧/٥٨	٥/١٨ mS/cm	٥/٥٣	٪٣١
١٠	٤/٨ M	١١/٥٩ mS/cm	٧/٦٣	٣/٦١ mS/cm	٥/٥٠	٪٥٦
١٥	٤/٨ M	١٢/١٤ mS/cm	٧/٧٤	٢/٤٧ mS/cm	٥/٤٩	٪٧٢
٢٠	٤/٨ M	١٢/٠٩ mS/cm	٧/٧١	١/٨٩ mS/cm	٥/٥١	٪٨٨
٣٠	٤/٨ M	١١/٦٥ mS/cm	٧/٦٢	١/٠٦ mS/cm	٥/٤٨	٪٨٩
٢٠	٢٠ mM	١١/٨٠ mS/cm	٧/٥٩	٢/٣٧ mS/cm	٥/٥٣	٪٨٤
٢٠	١٥ mM	١١/٠٥ mS/cm	٧/٦٥	٢/١٠ mS/cm	٥/٥٦	٪٩١

جدول ۲: نتایج مربوط به مقادیر پروتیین تام و آلبومین در نمونه‌های مربوط به روش مستقیم

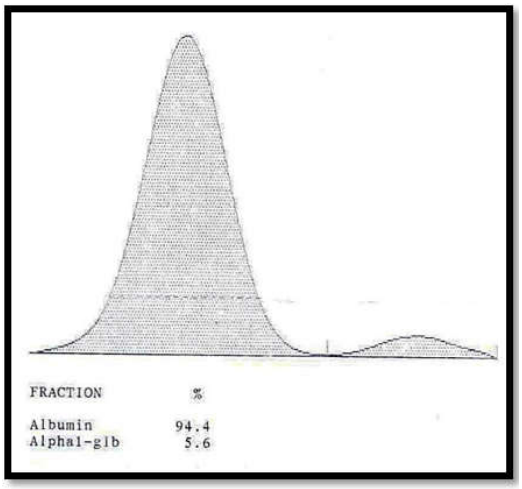
مشخصات نمونه	غلظت پروتیین تام (g/١٠٠)	غلظت آلبومین (g/١٠٠)	حجم نمونه (mL)
سوپرناتانت CPP رقیق شده با بافر استات ۱۵ mmol پس از سانتریفیوژ و رسوب‌گیری	٠/٢٢	٠/١٤٣	١٨٠
اولین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution	صفر	صفر	١٥
دومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution	٢/٦٥	١/٨٥	١١
سومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution	٠/١٩٧	٠/١٤٨	٢٠

P<٠/٠٥ معنادار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]



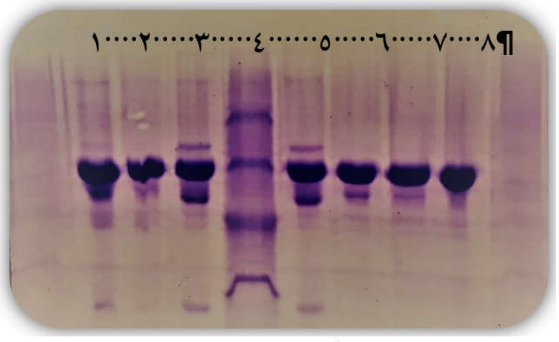
شکل ۳: الگوی باندهای پروتیینی خروجی ستون CM- سفارز در مرحله elution روش تلفیقی در الکتروفورز استات سلولز



شکل ٤: الگوی باندهای پروتیینی خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش تلفیقی در الکتروفورز استات سلولز

رقت ۲۰ و هدایت الکتریکی کمتر از ۲ میلی‌زیمنس (Milli Siemens)، بهترین بازده جداسازی حاصل گردید. از آن‌جایی که این نتیجه با به کارگیری بافر استات ۱۵ mmol نیز به‌دست آمد، این بافر در ادامه کار برای آماده‌سازی نمونه CPP جهت ورود به ستون کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۲، نتایج مربوط به تعیین مقادیر پروتیین تام و آلبومین در نمونه‌های مربوط به روش مستقیم کروماتوگرافی تعویض یونی را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

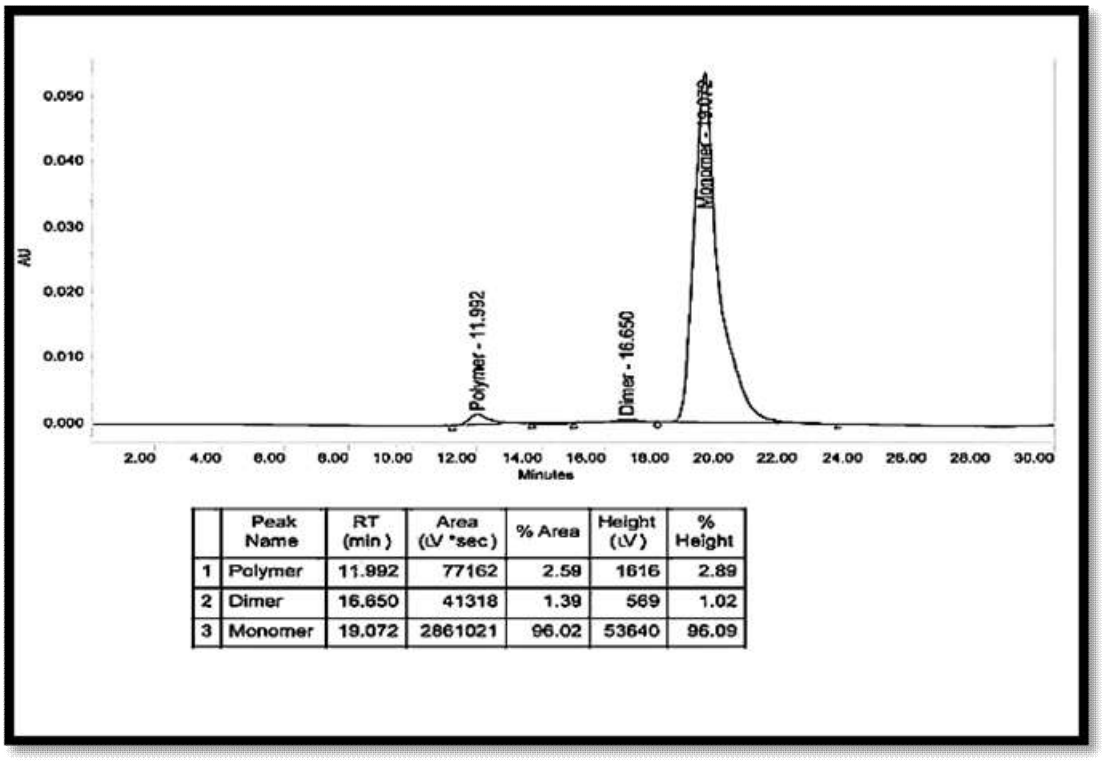
با توجه به نتایج جدول فوق، خلوص فرآورده نهایی حاوی آلبومین ۷۰/٤٤٪ و بازده جداسازی آلبومین با این روش ۹۰/۵۵٪ محاسبه گردید. شکل‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب نتایج الکتروفورز دومین و سومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله Elution را نشان می‌دهند. جدول ۳، نتایج مربوط به تعیین مقادیر پروتیین تام و آلبومین در نمونه‌های مربوط به روش تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). باتوجه به نتایج جدول فوق، خلوص فرآورده نهایی حاوی آلبومین ۹٦/۳۱٪ و بازده جداسازی آلبومین با این روش ۲٤/٦۲٪ محاسبه گردید. شکل‌های ۳ و ٤ به‌ترتیب نتایج الکتروفورز خروجی ستون CM- سفارز و خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله Elution را نشان می‌دهند. شکل ۵، نتیجه SDS-PAGE نمونه‌های مربوط به روش مستقیم و تلفیقی



شکل ۵: الگوی SDS-PAGE مربوط به تخلیص آلبومین با روش‌های مستقیم و تلفیقی کروماتوگرافی تبادل یونی

۱- سومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش مستقیم. ۲- دومین خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش مستقیم. ۳- سوپرناتانت CPP رقیق شده با بافر استات mmol ۱۵ پس از سانتریفیوژ و رسوب‌گیری. ٤- پروتیین سایز مارکر. ۵- سوپرناتانت CPP رقیق شده با بافر استات mmol ۱۵ پس از سانتریفیوژ و رسوب‌گیری.
٦- خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش تلفیقی.
۷- خروجی ستون DEAE- سفارز در مرحله elution روش تلفیقی پس از پاستوریزاسیون.
۸- نمونه آلبومین کمپانی CSL Behring.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]



	Peak Name	RT (min)	Area (uV *sec)	% Area	Height (uV)	% Height
1	Polymer	11.992	77162	2.59	1616	2.89
2	Dimer	16.650	41318	1.39	569	1.02
3	Monomer	19.072	2861021	96.02	53640	96.09

شکل ٦: الگوی باندهای مربوط به پلیمر، دیمر و مونومر فرآورده آلبومین تهیه شده با روش تلفیقی کروماتوگرافی تبادل یونی در HPLC

جدول ۳: نتایج مربوط به مقادیر پروتیین تام و آلبومین در نمونه‌های مربوط به روش تلفیقی

مشخصات نمونه	غلظت پروتیین تام (g/۱۰۰)	غلظت آلبومین (g/۱۰۰)	حجم نمونه (mL)
سوپرناتانت CPP رقیق شده با بافر استات ۱۵ mmol پس از سانتریفیوژ و رسوب‌گیری	۰/۲۱۷	۰/۱۷	۱۵۰
خروجی ستون CM– سفارز در مرحله elution	۰/۱۵۰	۰/۰۹۹	٦۰
خروجی ستون DEAE– سفارز در مرحله elution	۰/۱٦۳	۰/۱۵۷	٤۰

کروماتوگرافی تعویض یونی را نشان می‌دهد. شکل ٦ کروماتوگرام مربوط به آنالیز HPLC نمونه آلبومین تهیه شده با روش تلفیقی پس از پاستوریزاسیون را نشان می‌دهد که حاکی از خلوص آلبومین مونومر به میزان ۹٦/۰۹٪ است.

بحث

تهیه آلبومین به‌عنوان یک داروی بیولوژیک همواره مدنظر بوده است.[۲۷و۲۸] به‌کمک پالایش پلاسما جداسازی اولیه اینگونه پروتیین‌ها

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

ممکن گشته است.[۲۹و۳۰] در به‌کارگیری روش کروماتوگرافی تعویض یونی به جهت تخلیص مشتقات پلاسمایی، یکی از مهمترین نکاتی که باید مورد توجه قرار بگیرد، انتخاب یک درجه رقت مناسب برای نمونه اولیه به‌منظور کاهش قدرت یونی می‌باشد.

به‌دلیل آنکه پلاسما حاوی غلظت بالایی از یون‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و غیره است، نمی‌توان انتظار داشت آن را به‌صورت مستقیم و بدون رقیق‌سازی با بافر مناسب وارد ستون کروماتوگرافی نمود و نتیجه مطلوبی حاصل کرد، چرا که یون‌های مذکور با اتصال به رزین مورد استفاده، ظرفیت آن را کاهش می‌دهند.

از سوی دیگر، وجود شمار زیادی از پروتیین‌های متنوع در پلاسما، می‌تواند روند اتصال پروتیین مورد نظر به رزین را با اختلال مواجه سازد که این امر روی خلوص فرآورده نهایی و همچنین بازدهی ستون تاثیر منفی می‌گذارد.

از این‌رو در این مطالعه، به‌منظور کاهش غلظت یون‌ها و پروتیین‌های موجود، درجات رقت متفاوتی از نمونه CPP با بافر استات تهیه شد و بازدهی ستون مورد بررسی قرار گرفت. شاید این سوال پیش بیاید که با توجه به نقش نمک‌ها در پایداری ساختمان پروتیین‌های محلول از جمله آلبومین، آیا رقیق نمودن پلاسما پیش از ورود به ستون کروماتوگرافی رویکرد قابل قبولی است؟ در جواب این سوال باید گفت که مساله پایداری این پروتیین، هنگام نگهداری طولانی‌مدت شکل دارویی متداول آن (۵٪ یا ۲۰٪) مورد توجه قرار می‌گیرد. این در حالی است که با توجه به رقیق شدن پلاسما به میزان ۲۰ برابر، غلظت آلبومین موجود تا حد زیادی کاهش پیدا می‌کند و در ضمن زمان ماندن نمونه در ستون کروماتوگرافی چندان زیاد نیست. از این‌رو، پیش‌بینی می‌شود که فرآورده آلبومین حاصل از کروماتوگرافی مشکلی از لحاظ پایداری نداشته باشد.

همان‌طور که انتظار می‌رفت، رویکرد مستقیم کروماتوگرافی تعویض یونی کارایی قابل قبولی در جداسازی آلبومین نداشت. اما در رویکرد تلفیقی، با انجام یک مرحله کروماتوگرافی تعویض کاتیونی و به‌دنبال آن حذف مقدار قابل‌توجهی از ناخالصی‌ها (عمدتا ایمونوگلوبولین‌ها)، نتایج قابل‌قبولی حاصل شد. تفاوت چشمگیر این پژوهش با سایر کارهای مشابه، استفاده صرف از روش کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد، بدون آن که از رویکرد دیگری برای حذف ناخالصی‌ها استفاده شود، اما مطالعاتی نیز وجود دارند که کروماتوگرافی تعویض یونی را به‌عنوان هسته اصلی و یا در مراحل نهایی تخلیص آلبومین مورد استفاده قرار داده‌اند به‌عنوان مثال طی پژوهشی که توسط Curling و همکارانش در سال ۱۹۷۷ صورت پذیرفت، آلبومین از پلاسمای خون انسانی به‌روش کروماتوگرافی تعویض یونی با بازده تقریبا ۹۵٪ و خلوصی که بالاتر از الزامات فارماکوپه بود (در حدود ۹۶٪) جداسازی گردید. در این روش، نمونه Cryosupernatant طی دو مرحله توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول ۴۰۰۰ رسوب داده شد و رسوب مرحله دوم به‌منظور تخلیص آلبومین ابتدا با ستون تعویض آنیونی (DEAE-Sephadex A50) و سپس با ستون تعویض کاتیونی (SP-Sephadex C50) مواجه گشت.

در این مطالعه، تیمار اولیه پلاسما با پلی‌اتیلن‌گلیکول در pH=8، منجر به ترسیب قسمت اعظمی از ایمونوگلوبولین G و همچنین ترکیباتی با وزن مولکولی بالا نظیر لیپوپروتیین‌ها و فیبرینوژن شد و بی‌تردید حذف ناخالصی‌های مذکور پیش از مراحل کروماتوگرافی، در افزایش خلوص فرآورده نهایی تاثیر زیادی داشته است. از سوی دیگر، انتخاب مناسب‌ترین pH و قدرت یونی در مراحل کروماتوگرافی تعویض آنیونی میزان از دست رفتن آلبومین را تا حد ممکن کاهش و در ادامه بازده فرآیند تخلیص را افزایش داده و کروماتوگرافی تعویض کاتیونی در مرحله دوم خلوص فرآورده نهایی را به بالاترین حد ممکن رسانده است.[۱۲]

در یک مطالعه مشابه که توسط Vasileva و همکاران انجام پذیرفت، آلبومین با به‌کارگیری تنها یک مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی با خلوص تقریبی ۹۹٪ و بازدهی حدودا ۹۵٪ از پلاسمای انسانی جداسازی شد.[۱۳]

در این پژوهش نیز ابتدا با افزودن پلی‌اتیلن‌گلیکول طی دو مرحله بخشی از ناخالصی‌های موجود از جمله ایمونوگلوبولین G- حذف و سپس رسوب مرحله دوم با ستون تعویض آنیونی (QAE-Sephadex A50) مواجه گردید.[۱۳] از نقطه‌نظر مقایسه، در مطالعه ما به جای استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول برای حذف ناخالصی‌ها در مراحل بالادستی، یک مرحله کروماتوگرافی تعویض کاتیونی (CM-Sepharose FF) انجام پذیرفت که نتیجه آن جداسازی قسمت زیادی از ایمونوگلوبولین G بود و این امر به نوبه خود یک مزیت محسوب می‌شود، چرا که از یک سو تعداد مراحل تخلیص کاهش می‌یابد و از سوی دیگر پروتیین ارزشمندی نظیر ایمونوگلوبولین G با ترکیب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

دیگری آلوده نمی‌شود و به‌نظر می‌رسد که بتوان در آینده با طراحی یک روش مبتنی بر کروماتوگرافی آن را نیز تخلیص نمود. از سوی دیگر، حذف خمیر کرایو در مراحل ابتدایی این پژوهش و انجام یک مرحله سانتریفیوژ بعد از تیمار CPP با بافر استات و متعاقبا ترسیب قسمتی از ناخالصی‌های پروتیینی، در بالا بردن خلوص فرآورده نهایی تاثیرگذار بوده است.

در ضمن نتایج SDS-PAGE در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که متعاقب افزودن سدیم کاپریلات و انجام فرآیند پاستوریزاسیون و سپس فیلتراسیون، خلوص فرآورده آلبومین نهایی حاصل شده با روش تلفیقی افزایش می‌یابد. تنها نکته منفی این پژوهش کاهش بسیار زیاد بازیابی آلبومین در روش تلفیقی می‌باشد. از آنجایی که این کاهش در اولین مرحله کروماتوگرافی رقم خورد، به نظر می‌رسد که علت آن، مناسب نبودن pH یا هدایت الکتریکی نمونه اولیه باشد که در این صورت احتمالا با افزایش میزان pH و یا کاهش درجه رقت، این موضوع برطرف می‌گردد.

طی پژوهشی که توسط Tanaka و همکارانش در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت، تخلیص آلبومین با به‌کارگیری روش اتانول سرد به همراه کروماتوگرافی مایع صورت پذیرفت، به این صورت که پلاسمای فاقد کرایو طی دو مرحله با به استفاده از اتانول ترسیب داده شد و سوپرناتانت مرحله دوم که فاقد ایمونوگلوبولین G و حاوی آلبومین با خلوص تقریبی ۷۰٪ بود برای جداسازی نهایی این پروتیین با ستون تعویض آنیونی (DEAE-Sepharose FF) مواجه گشت که نتیجه آن جداسازی آلبومین با خلوص ۹۶٪ بود. در وهله بعد، خروجی ستون تعویض آنیونی به‌منظور ترسیب اسیدهای چرب حرارت داده شد و فرآورده حاصله به‌منظور جداسازی تجمعات پروتیینی و پلیمرها از ستون (Sephacryl S-200 HR) نیز عبور کرد. خلوص فرآورده نهایی به‌دست آمده با این روش تقریبا ۹۹٪ و بازده فرآیند جداسازی ۲۵ g/l پلاسما برآورد گردید. در ضمن وجود هیچگونه پلیمری در این فرآورده گزارش نشد که علت این امر، انجام ژل فیلتراسیون در انتهای فرآیند تخلیص بود.[۳۱] مطالعه مشابهی نیز توسط Raoufinia و همکاران در سال ۲۰۱۸ صورت پذیرفت و طی آن نتایج قابل قبولی در رابطه با خلوص فرآوده نهایی آلبومین حاصل گردید.[۳۲] در این دو مطالعه نیز، حذف قسمت زیادی از ناخالصی‌های پروتیینی به کمک روش اتانول سرد در بهبود خلوص فرآورده‌های نهایی تاثیر بسزایی داشته است اما تعداد مراحل انجام کار در پژوهش پیش رو کمتر و نتایج مربوط به خلوص فرآورده‌های نهایی تقریبا مشابه است. افزون‌براین، در روش اتانول سرد، به دلیل جداسازی فاز جامد (خمیر) از مایع، از دست رفتن مقادیری از پروتیین‌ها و متعاقبا کاهش بازدهی فرآیند تخلیص، امری اجتناب‌ناپذیر است، اما به‌نظر می‌رسد که استفاده صرف از روش کروماتوگرافی تعویض یونی در صورت بهینه‌سازی مسیر انجام فرآیند بتواند این مشکل را برطرف کند.

در انتها نیز باید اذعان داشت که اگرچه در این مطالعه میزان پلیمر فرآورده نهایی کمتر از ۵٪ (مطابق الزامات فارماکوپه) بود، اما احتمالا با خودکار نمودن مسیر فرآیند کروماتوگرافی، این میزان به کمترین حد ممکن کاهش پیدا کند؛ چرا که در این حالت زمان ماندن نمونه در ستون کوتاه‌تر و احتمالا میزان تغییر کانفورماسیون پروتیین مورد نظر نیز کمتر می‌گردد. افزون‌براین، تغلیظ نهایی فرآورده آلبومین به میزان ۵٪ و یا ۲۰٪ که شکل دارویی متداول آن می‌باشد پیش از فرآیند پاستوریزاسیون، می‌تواند در بهبود نتایج HPLC نقش داشته باشد.

در این مطالعه مشخص شد که به واسطه رقیق‌سازی نمونه CPP با بافر استات و متعاقبا کاهش قدرت یونی تا حدود کمتر از دو میلی‌زیمنس، جداسازی آلبومین از پلاسمای انسانی با خلوص مناسب طی انجام دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی (کاتیونی-آنیونی) امکان‌پذیر می‌گردد. همچنین پس از پاستوریزاسیون فرآورده نهایی، میزان پلیمر موجود با روش HPLC بررسی و کمتر از ۳٪ برآورد شد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی تحت عنوان "مقایسه کیفیت فرآورده‌های حاصل از جداسازی و تخلیص آلبومین از پلاسمای انسانی با روش‌های مستقیم و تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی" مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با شناسه IR.TMI.REC.1397.031 اخلاق در پژوهش می‌باشد. بودجه این تحقیق توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام شده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

References

1. Mousavi Hosseini K, Pourmokhtar M, Jalili MA, Nasiri S. Immunoglobulin A preparation from human pooled plasma using plasma fractionation and ion exchange chromatography. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(2):75-9.
2. Mousavi Hosseini K, Nasiri S. Preparation of factor VII concentrate using CNBr-activated Sepharose 4B immunoaffinity chromatography. *Med J I.R. Iran* 2015;29:170.
3. Nasiri S, Mousavi Hosseini MK. Infusible platelet membrane versus conventional platelet concentrate: benefits and disadvantages. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(2):87-93.
4. Mousavi Hosseini K, Nikougoftar ZM. Preparation of plasminogen by affinity chromatography. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(4):163-7.
5. Organization WH. Plasma fractionation programmes for developing countries: technical aspects and infrastructural requirements1999.
6. Shooshtari MM, Mousavi Hosseini K. Evaluation of the plasma quality after filtration. Daru: journal of Faculty of Pharmacy, *Tehran Univ Med Sci* 2010;18(2):114-7.
7. Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* 2012;33(3):209-90.
8. Mousavi Hosseini K, Nasiri S, Heidari M. Separation of Albumin from the Human Plasma by Ethanol and Low Temperature. *J Advances in Med Biomed Res* 2013;21(85):74-84.
9. Bertolini J, Goss N, Curling J. Production of plasma proteins for therapeutic use: John Wiley & Sons; 2012.
10. Cohn E, Strong L. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946;68:459-75.
11. Hao YI. A Simple Method for the Preparation of Human Serum Albumin 1. *Vox Sanguinis* 1979;36(5):313-20.
12. Curling J, Berglöf J, Lindquist LO, Eriksson S. A chromatographic procedure for the purification of human plasma albumin. *Vox sanguinis* 1977;33(2):97-107.
13. Vasileva R, Jakab M, Hasko F. Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin. *J Chromatogr A* 1981;216:279-84.
14. Raoufinia R, Mota A, Nozari S, Aghebati Maleki L, Balkani S, Abdolalizadeh J. A methodological approach for purification and characterization of human serum albumin. *J Immunoassay Immunochem* 2016;37(6):623-35.
15. Vargas M, Segura Á, Herrera M, Villalta M, Angulo Y, Gutiérrez JM, et al. Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation. *Biotechnol Prog* 2012;28(4):1005-11.
16. Iwata T, Iwata H, Holland JF. Isolation of Albumin from Human Serum by Means of Trichloroacetic Acid and Ethanol: A Comparison of Methods. *Clin Chem* 1968;14(1):22-30.
17. Kobayashi K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals* 2006;34(1):55-9.
18. Halabian R, Roudkenar MH, Jahanian-Najafabadi A, Mousavi Hosseini K, Tehrani HA. Co-culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing lipocalin 2 with HK-2 and HEK293 cells protects the kidney cells against cisplatin-induced injury. *Cell Biol Int* 2015;39(2):152-63.
19. Raoufinia R, Mota A, Keyhanvar N, Safari F, Shamekhi S, Abdolalizadeh J. Overview of albumin and its purification methods. *Adv Pharm Bull* 2016;6(4):495-507.
20. Deniz A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe J Biol Chem* 2011;39(4):315-41.
21. Mousavi Hosseini K, Dinarvand R, Pourmokhtar M, Rezvan H, Jalil MA. Pasteurization of IgM-enriched immunoglobulin. *DARU J Pharm Sci* 2004;12(1):40-3.
22. Nazari S, Shahabi M, Mousavi Hosseini K. Pathogen inactivation of blood derived biological medicines. *Tehran Univ Med J* 2017;75(4):251-8.
23. Pourmokhtar M, Dinarvand R, Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Jalili MA. Solvent-detergent treatment of IgM-enriched immunoglobulin. *DARU* 2003;11(2):47-51.
24. Elikaei A, Sharifi Z, Hosseini SM, Latifi H, Mousavi Hosseini K. Inactivation of model viruses suspended in fresh frozen plasma using novel methylene blue based device. *Iran J Microbiol* 2014;6(1):41-5.
25. Nazari S, Jalili MA, Shahabi M, Fallah Tafti M, Nasiri S, Mouradi M, et al. Virus reduction of human plasma-derived biological medicines. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2017;12:e13943.
26. Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Motallebi Z, Chabokpey S, Mirbod V. Study of the heat-treated human albumin stabilization by caprylate and acetyltryptophanate. *Iran Biomed J* 2002;6(4):135-40.
27. Yari F, Mousavi Hosseini K. Simultaneous purification and polymerization method for bovine serum albumin preparation. *Ital J Biochem* 2007;56(2):163-5.
28. Mousavi Hosseini K, Heidari M, Yari F. The preparation of albumin as a biological drug from human plasma by fiber filtration. *Tehran Univ Med J* 2011;69(5):283-8.
29. Mousavi Hosseini K, Pourmokhtar M, Habibi Roudkenar M, Shahabi M. Human plasma derived drugs separation by fractionation of plasma with polyethylene glycol. *Iran J Biotechnol* 2014;12(3):82-5.
30. Mousavi Hosseini K, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. *Iran J Biotechnol* 2016;14(4):213.
31. Tanaka K, Shigueoka E, Sawatani E, Dias G, Arashiro F, Campos T, et al. Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(11):1383-8.
32. Raoufinia R, Balkani S, Keyhanvar N, Mahdavipor B, Abdolalizadeh J. Human albumin purification: A modified and concise method. *J Immunoassay Immunochem* 2018;39(6):687-95.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2021; Vol. 78, No. 12: 806-816 Original Article

Isolation and purification of albumin from human plasma by direct and combined approach of ion-exchange chromatography and comparison of the final products quality obtained by both methods

Mariam Bagheri M.Sc.
Hashem Khorsand Mohammadpour M.Sc.
Kamran Mousavi Hosseini Ph.D.*

Department of Medical Biotechnology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

Abstract

Received: 27 Jul. 2020 Revised: 03 Aug. 2020 Accepted: 11 Feb. 2021 Available online: 19 Feb. 2021

Background: Due to multiple roles of albumin in the body, injection of its medicinal product as one of the therapeutic or management strategies under conditions such as severe bleeding, burns, liver failure, and neonatal hemolytic diseases is on the physicians' agenda. Considering that albumin is the most abundant plasma protein, designing an appropriate method to purify it is highly important. There are several methods such as human plasma fractionation, chromatographic, or Salting-out methods for the isolation and purification of the human albumin. The present study investigates a direct and combined ion-exchange chromatography approach for purification of albumin from human plasma and compares the quality of the final products obtained by both ion-exchange chromatographic methods.

Methods: This study was carried out from January 2019 to October 2019 at the Blood Transfusion Research Center, High institute for research and education in transfusion medicine, affiliated with the Iranian Blood Transfusion Organization. For this study, 10 human plasma bags were randomly collected. After thawing, all 10 human plasma bags were pooled, and in order to separate cryo paste, it was centrifuged at 4000 g for 10 minutes at the temperature of 1 Centigrade degree. Then the obtained cryo poor plasma was used to purify the albumin protein by direct and combined methods of ion-exchange chromatography. The purity of the final products was compared by cellulose acetate electrophoresis and SDS-PAGE tests. The sample obtained by the combined approach was pasteurized and HPLC analysis was performed to investigate any polymer aggregates.

Results: In contrast to the direct method, the final product obtained by combined ion-exchange chromatography had a good purity by the average of about 95% and the amount of polymer was estimated to be less than 5% by HPLC analysis ($P<0.05$).

Conclusion: By diluting the plasma and subsequently reducing the ionic strength, albumin can be separated from human plasma with a high degree of purity only by two steps of ion-exchange chromatography.

Keywords: albumin, ion-exchange chromatography, plasma.

*Corresponding author: Department of Medical Biotechnology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-82052160
E-mail: mkmousavi@yahoo.com

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-22]