استخلاص مادة الثرموبلاستين من أدمغة الأرنب لاستخدامها في قياس زمن البروثرومبين مع امكانية تصنيعه محلياً

الدكتور راشد جدي عبد الله/ دكتوراه اختصاصي بالكيمياء الحياتية/السريرية والهرمونات

مقدمة :

مادة الثرومبوبلاسين عبارة عن بروتين سكري ينمو من بروتين وجزء من الشحم المفسفر تستخدم كعامل مؤثر مهم في تخثر بلازما الدم (دم الإنسان) مسببة خثرة تسمى بخثرة البروثرومبين والزمن الحاصل لحين حصول الخثرة في بلازما الدم يسمى زمن التخثر أو زمن البروثرومبين والذي يتدخل بشفاء أمراض خطيرة تصيب حياة الإنسان .

قامت عدة محاولات لاستخلاص هذه المادة حيث كانت أول محاولة من قبل العالم الطبيب Quieck 1932 – 1939 حيث بدأ باستخراج هذه المادة من أدمغة الأبقار ثم أجريت تحسينات بإضافة عوامل مساعدة من المادة المذكورة أعقبه العالم Owem 1959 بتحسين الطريقة واستخراجها من أدمغة الأغنام والقردة الميتة واستخدم العالم Biggs 1975 المادة من الطيور الى أن تمكن كل من (Lewis) و (Dacie) 1976 من استخراج المادة من أدمغة الأرانب المخصصة للتجارب وبعض الحيوانات الأخرى وأعقبه العالم H. Varly أستاذ الكيمياء الحياتية في العالم معتمداً على طريقة Quieck مضيفاً إليها الكالسيوم كعامل مساعد ومستخدماً أدمغة الأرانب المخصصة للتجارب .

ولانقطاع المادة عن العراق من 1991 تقدمنا بهذا البحث بمحاولة استخراجها من أدمغة الأرانب البرية إنشاء الله .

المواد وطريقة العمل :

تم الحصول على الأرانب من المعهد الفني في الكوت وتم الحصول على الأرانب البرية من المزارعين بجوار منطقة الكوت والسبب في استخدام الأرانب البرية دون غيرها من الحيوانات لكونها تحتوي على أقل نسبة من الدهون والكولسترول الموجودة في أدمغة الأبقار والأغنام وحتى الأرانب المخصصة للتجارب رغم أخذنا نماذج من أدمغة هذه الحيوانات لغرض المقارنة.

استخلاص مادة الثرومبوبلاستين :

وقد شملت الطريقة ما يلي :

1- يؤخذ خلاصة دماغ الأرنب المذبوح وينظف من الأوردة والشرايين الظاهرة والأعصاب والدم المتخثر تنظيفاً جيداً.

2- تؤخذ الكمية المتبقية من خلاصة دماغ الأرنب على أن لا تقل 200 – 250 غم ويمزج مع الأسيتون ويخلط خلطاً جيداً ويترك في وعاء واسع ثم يسحب السائل ويترك الراسب الذي هو خلاصة دماغ الأرنب البري وتتكرر هذه العملية ثلاث مرات إذا ما أريد الحصول على مسحوق نقي.

3- أو يغسل مرة واحدة وتأخذ كمية مقدارها450 ملغم من خلاصة دم الأرنب المغسولة وتوضع في 5 مل من محلول الفينول المحلى (9 غمالتر كلوريد الصوديوم) مضافاً اليه في أنبوبة أختبار 1 غم التر فينول .

4- ضع الأنبوبة الحاوية على الخلاصة في حمام مائي بدرجة56 درجة مئوية لمدة عشر دقائق مع المزيج المستمر .

5- أعمل تدوير للمعلق بجهازالمنبذة (center fug) لمدة نصف دقيقة 1000 دورة في الدقيقة وتجنب التدوير الطويل .

6- أسحب الجزء المعلق وهو الجزء الفعال في محلول الثرومبوبلاستين النسيجي حيث يبقى هذا صالحاً للأنتقال لمدة يومين .

7- أجري الأختبار في لقياس زمن البروثرومبين بأستخدام المرحلة الواحدة للـ Queick .

8- زمن البروثرومبين الطبيعي في هذه العملية الذي سجل رسمياً من 12.5 الى 14 ثانية .

طريقة العمل

إن الطريقة التي أستخدمت هي طريقة Queick

الخطوات والمقادير :

1- لتحضير Naoxzalak m/10 نأخذ 1.34 غم تذاب في الماء المقطر ويكمل الحجم الى 100 سي سي .
2- لتحضير $CaCl_2$ M/4 نأخذ 0.28 غم من كلوريد الكالسيوم اللامائي وتذاب بقليل من الماء المقطر ثم نكمل الحجم الى 100 سي سي كذلك .
3- مسحوق أو سائل الثرومبوبلاستين ويحضر كما هو في الاختراع أعلاه .

خطوات العمل

1- أضف 0.2 مل من أوكسيلار الصوديوم في أنبوبة أختبار بلاستك أ, زجاجي وأضف عليها الدم المسحوب قدره 1.8 سي سي لتأمين الحصول على البلازما النقية وتوجد الآن تيوبات معدة لهذا الغرض بعضها مضاف إليها الهيبارين والبعض الآخر مضاف إليها مادة EDTA ثم تغلق فوهة الأنبوبة وترج بخفة الى الأعلى والأسفل .
2- توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق .
3- تؤخذ 0.1 ملي لتر أو 0.5 مل لتر من (أجل البحث العلمي استخدم 0.5 ملي لتر) واستخدم 0.1 من أجل المختبرات الحكومية والأهلية والمستشفيات والأطباء المختبرين .
4- إذا حدث لك حدث طارئ يعارض ولم تستطع أن تسحب الراشح(البلازما) لغرض التحليل فبإمكانك سحب كل كمية البلازما ونقلها اتيوب معقم و وضعها في الثلاجة في درجة +4 يمكنك استخدامه لأعطاء نتيجة الى المريض أو للبحث العلمي لمدة يومين .

5- أخذنا لكل نموذج في التطبيق العملي أنبوبتان اختبار وللقياس أنبوبة واحدة لغرض المقارنة .
6- ولكن خذ أنبوبة اختبار واحدة وضع فيها 0.1 بلازما .
7- أضف 0.1 مل من مادة الثرومبوبلاستين .
8- أضف 0.1 من كلوريد الكالسيوم واخلطها جيداً .
9- حرك أنبوبة الاختبار بحركة مستمرة شاقولية الى الأسفل و وضع عمودي دون سقوط المحتويات ودون التوقف .
10-منذ بداية الحركة أعلاه أضغط العد التصاعدي للثواني في الساعة المعدة لهذا الغرض .
11-سجل ثانية رؤية التخثر .

ملاحظة : إذا كانت المواد (البلازما ، كلوريد الكالسيوم ، الثرومبوبلاستين) في الثلاجة يجب أن توضع في درجة حرارة الغرفة حتى تصل 37 وحين ذلك يمكن الاستخدام .

المناقشة

تناول هذا البحث واحداً من المواضيع العلمية والاقتصادية المهمة والتي لم تطرق سابقاً في العراق بل لم تطرق في الشرق الأوسط هو عملية استخلاص الثرومبوبلاستين من أدمغة الأرانب وخاصة البرية منها والتي هي متوفرة بكثرة في بلادنا إضافة الى الأرانب المخصصة للتجارب وكذلك إيجاد عدة (kit) كاملة لقياس زمن التخثر في الدم الذي ضل معطلاً طيلة أعوام قبل هذا البحث حيث تشكل هذه المادة جزء حيوي كامل في اتمام التحليل والذي هو أحد التحاليل المهمة جداً حيث تعاني المؤسسات المختبرية الأهلية والحكومية والمستشفيات من هذا النقص .

لقد أظهرت نتائج هذا البحث بأنه يمكن الحصول ما لا يقل عن 100 غرام كمسحوق أو في سائل من أقل حجم لخلاصة دماغ أرنب حيث تستخدم كمية قليلة القدر 300 ملي غرام وهذا يكفي لعشرات من التحاليل وهذه عملية اقتصادية من الناحية التطبيقية .

إن استخدام المادة كمسحوق هي خالية من الكولسترول والشحوم والمواد العالقة مثل المواد المعقدة والمتخثرة تكفي لانجاز الاختبار بصورة تامة . لقد جاءت نتائج الاختبار

في مختبرات السيطرة التابعة لوزارة الصحة ودائرة اليرموك الطبية وهي الأولى في العراق جاءت مفرحة ومشجعة بنجاح تحضير هذه المادة وماسواتها مع المنتوج العالمي .

النتائـج

لقد أظهرت نتائج الاستخلاص بأنه يمكن الحصول على 100 – 150 غم من مادة الثرومبوبلاستين في كل عملية خلاصة لدماغ الأرنب وقد وجدت كمية قليلة تقدر بـ 200 الى 300 ملغم تكفي لقياس زمن التخثر لأختبارات عديدة .

إن جواب السيطرة النوعية في وزارة الصحة وجواب دائرة اليرموك الطبية التي مديرها هو وكيل وزير الصحة جاء مفرحاً للغاية بمساواة هذا الناتج المحضر محلياً مع المنتوج العالمي إن تحضير عدة (kit) محورة وبسيطة ومبتكرة لأول مرة يدخل في تركيبها الثرومبوبلاستين المستخلص محلياً مع المواد الأخرى كانت ناجحة مختبرياً في عملية الاختبار والـ 150 غم المحضرة محلياً تكفي لأكثر من 3000 اختبار .

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات :

1. إن النتيجة التي حصل عليها هذا البحث في إمكانية استخلاص مادة الثرومبوبلاستين من أدمغة الأرانب وبطريقة مبتكرة واقتصادية واستخدام هذه المادة ضمن عدة لقياس زمن البروثرومبين .
2. إيجاد عدة بسيطة لقياس زمن البروثرومبين يدخل في محتوياتها مادة الثرومبوبلاستين
3. نوصي بتصنيح هذه المادة محلياً وبعبوات تكفي 25 أو 50 اختبار
4. تم استخدام هذه المادة والعدة في جميع مختبرات التحليلات في محافظة واسط ومختبرات الصحة العامة التابعة لوزارة الصحة ودائرة اليرموك وبنجاح .

التوصيات :

1. أوصي باستخدام مستخلص أدمغة الأرانب بمقدار 250ملغم تكفي لـ 25 اختبار و 500 ملغم تكفي لـ 50 اختبار .
2. نوصي بعملية تصنيعه محلياً ليكون كبديل لمسحوق الثرومبوبلاستين المستورد

الخلاصة :

تم استخلاص مادة الثرومبوبلاستين من خلاصة أدمغة الأرانب البرية وتم اختيار الأرانب البرية دون سواها بعد مقارنة اختبار طويلة ووجد انها أي الأرانب البرية في أدمغتها هي أقل من غيرها من الدهون والشحوم المعقدة وتم تنظيف الخلاصة من الدم والمواد المتخثرة والجلد والشعر والعظام والطبقات الشحمية والشرايين الظاهرة وحتى الدقيقة بعد معاينة سريرية دقيقة جداً تم تنظيفه بالأسيتون وأخرى بالفينول وتم إذابته بالفينول وتسخينه بدرجة 56 ولم يتم تسخينه أكثر من هذه الدرجة الحرارية لكون إن الإنزيمات تتلف في درجة الحرارة العالية .

تم اختبار المادة المستخلصة مقارنة مع منتوج شركة Biemer وشركة Geigy وان النتائج جاءت مطابقة تماماً للخط البياني للمسحوق المستورد .

تقدمت بهذا البحث الى المؤتمر الطبي العراقي الثالث في 4 – 5 كانون الأول حصل هذا البحث على المرتبة الأولى والجائزة الأولى في العراق في هذا المؤتمر والوثائق الرسمية تشهد بذلك والله ولي التوفيق .

المصادر

1. Gregg. I. A. (1967) . Nature , 214 , 29 .
2. Hanger , F. M. (139) clin . Invest , 18 , 261 .
3. Hanger , F. M. and Patek , A. J. (1941) , Amer , J. med. Sei . 202, 48 .
4. Herbert , F. K. and Davison . G. (1938) Quart J. Med. N. S. 7 ,355.
5. Hutchinson , J. H. and Labby , D. H. (1962) , J. Lab. Clin, Med., 60,170.
6. H. Varly clinical Biochemistry , 1976 .
7. Jendrassik, L. and Grif, P. (1938) , Biochem. Z., 297, 81 .

8. Kaplowitz, N., Kok, E. and Javitt , N. B, (1973), J. Amer. Med Ass. 255, 292 .

9. Katz. W. A. and Scarf , M. (1964), Amer. J. med Sei , 248 , 545.

10. King E. J and Airken, R.S. (1940) , Lancet, 2 , 543 .

11. King E. J and Coxon , V. J. (1950), J. clin, path, 3 , 248 .

12. Kingsbury, F. P., Clark , G. P. Williams , G. and Post, A. L. (1926), H. Lab. Clin Med , 1, 981