

KRALJEVINA SRBA, HRVATA I SLOVENACA

UPRAVA ZA ZAŠTITU



INDUSTRIJSKE SVOJINE

KLASA 30(6)

IZDAN 1. SEPTEMBRA 1923.

PATENTNI SPIS BR. 1285.

Elektro-Osmose A. G. (Graf Schwerin Ges.) Berlin.

Postupak za prenošenje takozvanih imun-materija sa specifičnih belančevina na nespecifične ili na takvu belančevinu u kojoj ima drugojačih imun-tela.

Prijava od 22. jula 1921.

Važi od 1. decembra 1922.

Pravo prvenstva od 11. jula 1918. (Nemačka).

U takozvanim imun serumima, t. j. u serumima od životinja koje su imunizirane toksinima bakterija ili kulturama bakterija, dakle u opšte takozvanim antigenima, ili u krvi individua koje su po prebolevanju jedne infekcije stekle imunitet, specifične osobine su, shodno iskustvu, vezane za belančevinu. Te specifične osobine ne raspodeljuju se ravnomerno na belančevine koje se u krvi nalaze, tako da se mora praviti razlika između specifičnih i nespecifičnih belančevina. U antitoksičnim i baktericidnim serumima, kao na pr. serum difterije i tetanusa, ali isto tako i u serumu antistreptokopa, kao i serumu pneumokoka, pokazali su se na pr. kao potpuno nespecifične: belančevina crvenih i belih krvnih zrnaca, fibrinogen, resp. fibrin, i albumini. Kao svojstveni nosioci specifičnih osobina dolaze dakle isključivo globulini u obzir, pa i na ovu grupu belančevina, specifične osobine nisu ravnomerno raspodeljene već postoji jedna gradualna razlika u efikasnosti nerastvornih ili suglobulina i rastvornih ili para odnosno pseudoglobulina, a naime tako da se ovi poslednji imaju po sve smatrati kao glavni nosioci specifičnih sila u imunserumima dok je efikasnost euglobulina relativno manja.

Nadjeno je sada da ovo osobeno

raspodeljivanje specifične efikasnosti počiva na jednom gradueno različitom afinitetu ili sili privlačnosti koju imaju belančevine prema specifičnim imun-telima. Utvrđeno je da fibrinogen i albumin nemaju nikakav, da euglobulin ima slab, a para — ili pseudoglobulin imaju najjači afinitet za specifična imun-tela. Ovo saznanje stečeno je konstatacijom da se uspeva da se odvoje od euglobulina za njih vezana imun-tela, po moću rastvora paraglobulina, pri čemu se može specifična efikasnost preneti na po sebi nespecifične paraglobuline, ili pak paraglobulini malog specifičnog dejstva preobratiti u belančevinu jače efikasnu. Na istom putu uspeva se da se na jednu istu belančevinu fiksiraju kombinacije različitih vrsta imun-tela.

Nadjeno je dalje da prenašanje specifične efikasnosti s jedne belančevine na drugu polazi za rukom ne samo pri upotrebi belančevina jedne iste životinjske vrste nego i tada kad euglobulin vodi poreklo iz krvi jedne životinjske vrste, na pr. serum konja, dok su paraglobulini dobijeni iz krvi ma koje druge vrste, na pr. čovečije krvi.

Postupak u pojedinostima sastoji se u tome što se euglobulin, ponajbolje na elektroosmotskom putu, prevede u nerastvoran oblik, i tako izolovan euglobulin pusti da dejstvuje na paraglobulin,

dobijen isto tako elektroosmotični pri čemu je sasvim svejedno dali odgovarajući paraglobulin ima ili nema specifične osobine iste ili drugojače prirode.

Euglobulini imaju sposobnosti da se vrlo lako i bez ostatka rastvaraju u vodenim rastvorima paraglobulina, u prisustvu i najmanjih količina neutralnih soli. Ako se kakav euglobulin u kome ima specifičnih imun-tela, kao na pr. euglobulin izdvojen na elektroosmotičkom putu iz difteričnog seruma rastvori u rastvoru paraglobulina, pri istovremenom dodatku male količine kunijske soli, nastupa ubrzo prelazak specifičnih imun-tela sa euglobulina na paraglobulin.

Ovo dolazi do svoga izraza na taj način što je rastvor paraglobulina, po udaljavanju euglobulina, stekao one specifične osobine koje su prethodno bile vezane za euglobulin: što će se dakle na pr. iz jednog rastvora euglobulina iz difteričnog seruma u paraglobulinu iz normalne krvi konja, govečeta ili čoveka, dobiti, po izdvajanju ovih euglobulina, rastvor paraglobulina koji sadrži anti-toksina.

Prema tome, postupak se u pojedinstima sastoji u izdvajanju euglobulina iz specifičnih imun-seruma, dalje u spravljanju paraglobulina iz normalnih ili specifičnih imun-seruma, i treće, u ekstrakciji specifičnih imun-tela iz euglobulina pomoću rastvora paraglobulina, koji pak sa svoje strane mogu poticati bilo iz normalnih bilo iz specifičnih imun-seruma.

Pošto postupak za preradu različitih seruma i pojedinih njihovih kombinacija ima čitav jedan niz zajedničkih tačaka, to će se ovde najpre, pre nego što se udje u izlaganje odredjenih primera, govoriti o onim postupcima koji se pri preradi različitih normalnih i specifičnih seruma uvek na isti način ponavljaju.

1. Dobijanje euglobulina.

Za dobijanje euglobulina upotrebljuje se krvni serum ili krvna plazma bez fibrinogena. Za izdvajanje euglobulina, iz ovih tečnosti upotrebljavalo se je do sada taloženje pomoću sirćetne kiseline ili ugljene kiseline po prethodnom jakom razblaživanju krvnog seruma ili plazme vodom ili pak zbog dialize, tekućom vodom do uklanjanja soli. Ali ovi postupci pružali su velike nezgode. Ta-

lozi kiselina naime ne mogu nikada da se kvantitativno stalože pošto je produkt taloženja, naime euglobulin, ponova rastvoran u najmanjem suvišku kiseline; pokraj toga, morali su serumi ili plazme često biti razblaženi sa vrlo velikim količinama vode, da bi se postiglo optimalno taloženje, usled čega obrada velikih količina biva nepogodna. S druge strane, da bi se postiglo potpuno oslobađanje od soli, morala je dializa biti izvodjena za vreme od više nedelja. Za nju su bile potrebne velike količine vode i ona je pružala uvek opasnost bakteričnog zagađivanja tečnosti bogatih u belančevinama, koje su lako podložne kvarenju.

Nasuprot tome, u pokušajima koji se ovde opisuju, upotrebljavan je, za izdvajanje euglobulina iz krvnog seruma ili plazme, uvek elektroosmotički postupak, koji, na suprot starijim metodama, pruža to preimućstvo da je ovde taloženje euglobulina apsolutno kvantitativno; da je povećavanje volumena tečnosti razblaživanjem vodom nepotrebno, i da je najzad isključena svaka opasnost zagađivanja bakterijama, pa prema tome i opasnost kvarenja specifičnih imun-tela.

Serum ili plazma stavi se u srednji prostor jednog troćeličnog aparata koji se — uporedi sa crtežom — sastoji iz jednog četvrtastog sanduka i koji je u svojoj unutrašnjosti podeljen dvema polu — propustljivim (semi-permeabilnim) membranama ili diaframama *b* i *c* u tri komore. Neposredno iza diafragma zategnute su fine platinske mreže *d* i *e* koje dovode električnu struju ka tečnosti (serumu i plazmi) što se nalazi između obe diafragme. Napon i jačina struje pečešavaju se ovde prema sadržaju seruma u elektrolitima tako da se u početku procesa dobija struja relativno slabog napona i visoke strujine jačine, na kraju procesa pak, struja visokog napona i vrlo slabe strujine jačine. Za početak procesa iznosi napon oko 20 volti, strujina jačina oko 15 ampera. Napon i strujina jačina prolaze tada kroz sve faze, sve dok se ogled, pri naponu od 500 volti i strujinoj jačini od 0,1—0,2 ampera, ne prekine. Celokupno trajanje uticaja električne struje do oslobađanja od elektrolita, iznosi prosečno 2 sata. Reakcija je u srednjem prostoru aparata u početku slabo alkalna, ali po-

sle kratkog vremena postaje neutralna, zatim prelazno jače alkalna, da bi se najzad izmenila u kiselu reakciju. Sa pojavom kisele reakcije počinje taloženje euglobulina koje dostiže svoj maksimum u momentu potpunog osustva soli. I krajnji produkt ima vrlo slabu kiselu reakciju koja je, kao što je poznato, svojstvena za čiste belančevine. Po završetku procesa isprazni se srednji prostor aparata, euglobulini se skupe bilo filtriranjem bilo pomoću centrifuge, i brižljivo isperu u vodi slodnoj od soli. Ispiranje ima za cilj da potpuno odstrani svu rastvornu belančevinu koja se još za talog drži.

Pri upotrebi specifičnog seruma nastupa raspodeljivanje specifičnih imunotela na staloženi euglobulin i na belančevine koje ostaju u rastvoru i to tako da se od prilike jedna petina specifičnih imunotela veže za euglobulin, a ostatak za rastvornu belančevinu. Kvarenje specifičnih imunotela električnom strujom pri preradi seruma u tročeličnom aparatu ne nastupa nikada, što je konstatovano bezbrojnim eksperimentima sa životinjama, bez zamerke.

Difterični serum, sadrži na pr., u 1 cm³ 250 antitoksičnih jedinica (A. J.), pri sadržaju belančevine od 10,0%. U jednom litru seruma bilo je prema tome 250.000 A. J. i 100 gr. belančevine, tako da je 1 gr. belančevine sadržavao tačno 25000 A. J. Elektroosmotskim postupkom dobijeno je iz jednog litra ovog seruma:

30 gr. ostatka (euglobulin) sa 1800 A. J. na 1 gr. — 54000 A. J. i t.
960 sm³ tečnosti (70 gr. rastv. belanč.) sa 280 A. J. na 1 sm³ 196000 A. J. i t.
Svega: 250000 A. J.

Iz ovoga izlazi da nikakvo kvarenje antitoksina nije nastupilo električnim postupkom.

Za dalju preradu, euglobulin se upotrebljava u vlažnom stanju, dakle kao pasta.

2. DOBIJANJE PARAGLOBULINA:

Za dobijanje paraglobulina iz seruma ili plazme, odvoji se najpre euglobulin na elektroosmotskom putu, kao što je to pod 1 opisano, centrifugat smeša zajedno sa vodom od ispiranja, i ta mešavina preradjuje se na poznat način facioniranim taloženjem soli. Tako na pr. dodaje se mešavini ovih centrifugata,

filtrata i vode od ispiranja, ista količina zasićenog rastvora amon-sulfata, i tom prilikom izlučeni paraglobulin skupi filtriranjem ili pomoću centrifuge. Po savetnom ispiranju sa poluzasićenim rastvorom amon-sulfata, rastvori se ovaj talog u vodi i rastvor, u pergamentskim cevima, podvrgne dializi vodom koja u suprotnom pravcu teče, sve dok se ne postigne oslobađanje od soli. Na taj se način dobije jedan rastvor ponajčešće slabo žuto obojen i približno slobodan od soli, koji se za konzerviranje ponajbolje u prostoru sa razredjenim vazduhom i na niskoj temperaturi isparava dok se ne dobije jedan suv preparat lako rastvoran u vodi je trajno nepromenljivo stabilan.

3. EKSTRAKCIJA, SPECIFIČNIH IMUNOTELA IZ EUGLOBULINA POMOĆU RASTVORA PARAGLOBULINA.

Pokazalo se je da se za ekstrakciju specifičnih euglobulina ponajbolje upotrebljuje jedan 5%-ni rastvor paraglobulina. Euglobulin je rastvoran u rastvoru paraglobulina; da bi se ova rastvorljivost povećala, i da bi rastvor u isto vreme stekao potrebnu sposobnost električnog provodjenja, dodaje se rastvoru paraglobulina 0,4 — 0,5% kujnske soli. U ovaj rastvor unese se vlažna pasta euglobulina, i to toliko, da tečnost koja iz toga proizilazi, sadrži paraglobulina i euglobulina odprilike u jednakoj količini, zajedno oko 10%. Mešavina paraglobulina i euglobulina ostaje 24 časa na niskoj temperaturi, ponajbolje u aparatu za hladjenje, i potom se ponova unosi u srednji prostor jednog tročeličnog aparata, i izloži uticaju električne struje. Relacija struje je opet ista kao i ona koja je opisana već prilikom spravljanja euglobulina iz seruma; reakcija prolazi isto tako kroz sve faze od alkalnog do kiselog stanja, i prilikom oslobađanja od soli dolazi se do taloženja euglobulina. Ovaj se opet izdvoji iz tečnosti filtriranjem ili pomoću centrifuge, pri čemu se dobije jedan rastvor paraglobulina slobodan od soli, koji se razlikuje od prvobitnog rastvora samo po tome što on sada ima one specifične osobine koje su ranije bile vezane za euglobulin. Povećavanje koje je na taj način neizbežno, ne može se gravimetrijski dokazati.

Poznatom reakcijom precipitina sa jednim specifičnim anti-serumom može se dobiti izvesnost da rastvor paraglobulina dobijen na ovom putu ne sadrži nikakvu heterogenu belančevinu.

Dalje pojedinosti postupka mogu se ponajbolje videti iz sledećih specijalnih primera.

PRIMERI:

1. Prenašanje antitoksima difterije iz konjskog seruma na čovečju belančevinu izvedeno je kao što sleduje: antitoksin ili serum sadržavao je na 100 delova.

9,8 gr. suve substance
8,9 gr. organske substance
0,9 gr. anorganske substance
8,8 gr. belančevine, a naime
2,3 gr. euglobulina
4,5 gr. paraglobulina
2,0 gr. albumina

Svega: 8,8 gr.

1 cm³ antitoksima ili seruma sadržavao je 250 difteričnih antitoksičnih jedinica (A. J.)

2 litra ovoga seruma obradivani su prema gore opisanom postupku za dobijanje euglobulina. Prema tome je za obradu došlo 176 gr. belančevine sa 500.000 A. J. Na završetku dobijena je jedna vlažna pasta sa 46 gr. suve substance (euglobulin) i 92000 A. J.

Jedan serum iz čovečije krvi sadržavao je na 100 delova:

9,4 gr. suve substance
8,4 gr. organske substance
1,0 gr. anorganske substance
8,4 gr. belančevine, a naime
2,2 gr. euglobulina
2,0 gr. paraglobulina
4,2 gr. albumina

Svega 8,4 gr.

U serumu se nije mogao dokazati ni najmanji trag difteričnog antitoksina.

Iz jednog litra seruma izdvoji se najpre suglobulin prema elektroosmotskom postupku, gore pod 1 opisanom. Izlučeni euglobulin se dobro ispere, voda od ispiranja se spoji sa filtratom, t. j. centrifugatom elektroosmotski dobijenog taloga euglobulina, i u cilju uglavljanja albumina, postupi se prema metodi gore pod 2 navedenoj. Na taj način dobijena je jedna potpuno bistra tečnost, koja je isparena u vakumu na niskoj temperaturi, dala 20 gr. sasvim čistog, približno je da je 1 gr. ovog čovečjeg paraglo-

Pošto pribavljajne čovečjeg seruma, koji se može prigodno dobiti iz bolnica u obliku krvoliptenja ili krvi operacija, nije uvek izvodljivo, to se za spravljanje čovečjeg paraglobulina upotrebljuje u prilikama i ascitna tečnost (tečnost trbušne vodene bolesti), koja, prema sastavu, u odnosu na svoj kvalitativni sastav, potpuno se podudara sa krvnim serumom čoveka, i koja se lako može dobiti iz bolnica u proizvoljno velikim količinama.

Sveža ascitna tečnost sadrži, na 100 delova:

6,6 gr. suve substance
1,12 gr. anorganske substance
5,4 gr. organske substance
5,2 gr. belančevine, a naime
1,2 gr. euglobulina
1,5 gr. paraglobulina
2,5 gr. albumina

Svega: 5,2 gr.

Iz dva litra ascitne tečnosti dobijeno je 30 gr. najčistijeg paraglobulina.

Ekstrakcija difteričnog antitoksina iz euglobulina pomoću rastvora paraglobulina, izvodi se na sledeći način: 50 gr. čovečjeg paraglobulina rastvoreno je najpre u 1000 cm³ vode, sa dodatkom 5 gr. kujnske soli. U ovaj rastvor unesu se u formi vlažne paste, euglobulini izolovani iz difteričnog konjskog krvnog seruma, čija je suva supstanca iznosila 46 g. sa sadržajem antitoksina od 92000 jedinica. Iz toga se dobije jedan sasvim potpun rastvor euglobulina. Ova mešavina čovečjeg paraglobulina i euglobulina iz konjskog krvnog seruma ostavi se najpre samoj sebi za vreme od 24 časa, na niskoj temperaturi (aparatus hladjenje) i potom ponova unese u srednji prostor tročeličnog aparatus, i izloži uticaju električne struje. Po ponovnom taloženju euglobulina dobije se jedna bistra tečnost, koja se sastoji iz najčistijeg čovečjeg paraglobulina, a naime njegova celokupna vrednost iznosi opet 50 gr. suve težine.

Pri opredeljivanju antitoksina nadjena je da je 1 gr. ovog čovečjeg paraglobulina sadržavao 1000 antitoksičnih jedinica, dakle 50 gr. 5000 A. J. i prema tome, iz antitoksičnog euglobulina iz konjskog seruma od 92.000 A. J., od prilike polovina antitoksina prenesena je na čovečju belančevinu.

U jednom daljem opitu, unesena je u isti rastvor čovečjeg paraglobulina jed-

na dalja količina od 50 gr. euglobulina dobijenog iz difteričnog konjskog seruma. Sadržaj u antitoksinu ovoga euglobulina iznosio je 100.000 A. J. Po ponovnom elektroosmotskom izdvajanju ovoga euglobulina, dobijen je jedan rastvor čovečjeg paraglobulina sa 50 gr. suve substance, koja je sadržavala u celosti 100.000 A. J. Ovaj rastvor se u prostoru sa razredjenim vazduhom i pri niskoj temperaturi toliko skoncentrisava, da je sada dobijeni rastvor sadržavao na 100 delova 10 gr. čovečje belančevine. 1 cm³ ovoga rastvora sadržavao je 200 A. J. On je prema tome predstavljao jedan serum čiji je sadržaj u antitoksinu bio dovoljno visok, da može naći praktične primene za profilaktičke i terapijske svrhe.

2. Iz dva litra seruma antistreptokoka sa sadržajem u suvoj substanci od 9,7%, koja se sastoji od 8,9% belančevine i 0,8% anogranskih materija, izdvoji se takodje euglobulin na elektroosmotskom putu. Time je dobijena jedna vlažna pasta, čiji sadržaj u suvoj substanci iznosi 60 gr. Biološka proba pokazala je da ovaj euglobulin sadrži oko 25% imuniteta, koja su se mogla konstatovati u prvobitnom serumu antistreptokoka.

S druge strane, iz dva litra seruma pneumokoka, spravljena su 2 litra jedinog rastvora paraglobulina, čiji je sadržaj u suvoj substanci iznosio 48 gr. U ovaj rastvor uneto je 30 gr. euglobulina iz seruma antistreptokoka i sa istovremenim dodatkom od 10 gr. kujske soli, rastvoren. Po ponovnom izdvajanju ovoga euglobulina na elektroosmotskom putu, dobijen je jedan rastvor belančevine, koji se je pokazao kao efikasan, protiv streptokoka isto tako kao i protiv pneumokoka. Po izvršenoj koncentraciji u prostoru sa razredjenim vazduhom i na niskoj temperaturi, mogao je ovaj serum biti upotrebljen za suzbijanje mešovityh infekcija streptokoka i pneumokoka.

Nasuprot tome, elektroosmotsko izdavanje seruma iz antitoksičnih seruma, kao na pr. serum antidiferični — antitetanusni, ili takodje mešoviti serumi sa antitoksičnim i baktericidnim osobinama.

Prenašanje specifičnih efikasnih materija za lečenje ili predohranu imuniteta seruma, sa belančevina, za koje su one u tim serumima slabo vezane, na druge belančevine iz seruma ili krvne tečnosti,

bilo je već do sada poznato na taj način, što se te prve belančevine zajedno sa specifičnim materijama za predohranu stalože ili izdvoje, profiltriraju i t. d. i tada tretiraju serumom, pri čemu materija za predohranu prelazi na belančevine seruma. Poznati postupak koji se je upotrebljavao, izdvajanje, t. j. za prenašanje specifičnih imunomaterija na krvni serum t. j. krvnu plazmu, sastojao se je u tome da se celokupna belančevina iz krvnog seruma pomoću alkohola i sirćetne kiseline staloži, i tako staložena belančevina ekstrahuje se jedinim drugim serumom koji već sadrži iste specifične materije. Izvođenje ovog postupka pak pruža teškoće u toliko što je za svaki krvni serum potreban jedan tačno određen odnos seruma, alkohola i sirćetne kiseline, koji se ima odrediti prethodnim opitima. Dalje, čak i po utvrđivanju ovog odnosa, iskorističavanje imuniteta nije nikada kvantitativno, pošto nešto belančevina, a s time i specifična imuniteta, ostaju u filtratu. Dalje, ekstrakcija voluminoznih taloga je vrlo teška, budući da se prilikom suspenzije u krvnom serumu ili krvnoj plazmi javljaju žilave mase koje se teško izdvajaju filtriranjem, tako da filtriranje i centrifugiranje povlači uvek za sobom znatne gubitke. Tehničko dejstvo postignuto tim poznatim postupkom je pri tom relativno slabo, jer najveći deo antitoksina nije ekstrahovan iz seruma, nego ostaje sa nerastvornom belančevinom, a taj zaostali deo je za svaku terapijsku svrhu neupotrebljiv.

Nasuprot tome, elektroosmotsko izdavanje euglobulina iz krvnog seruma u novom postupku, je veoma pogodno, i potpuno kvantitativno. Pošto je euglobulin potpuno rastvoran u rastvorima paraglobulina u prisustvu soli, to prenašanje imuniteta koja su vezana za euglobulin na paraglobuline, biva daleko lakše i u većim količinama, nego u ranijim postupcima. Kako je dalje izdvajanje euglobulina oslobođenog od antitoksina, iz rastvora paraglobulina postignuto opet na elektroosmotskom putu, može se ono izvesti bez teškoća i bez gubitaka. Isto tako, kako su euglobulini nerastvorni u osustvu soli i pokraj malih tragova kiselina, ne nalazi se, u krajnjem produktu posle druge osmoze, više ništa od prvobitno upotrebljene belančevine za ekstrakciju, u filtratima i centrifuga-

tima, što je od velike važnosti u prenašanju specifičnih imun-tela sa belančevine jedne životinjske vrste na belančevine jedne druge vrste.

PATENTNI ZAHTEVI:

1. Postupak za spravljanje takozvanih imun-materija sa specifičnih belančevina na nespecifične, ili na takvu belančevinu u kojoj ima drugojačih imun-tela, naznačen time, što se iz jednoga imun-seruma izdvoji euglobulin, taj isti eu-

globulin rastvori u krvnom serumu ili još bolje u rastvoru paraglobulina iz krvnog seruma, normalnih ili imuniziranih individua, pa zatim iz ove mešavine ponovo izdvoji euglobulin.

2. Postupak prema zahtevu 1, naznačen primenom različitih vrsta imun-seruma da dobijanje takozvanih multivalentnih seruma t. j. takvih rastvora belančevina koji istovremeno nose različite, antitoksične i baktericidne osobine.