

ВИКОРИСТАННЯ СИНЕРГІЧНОГО ЕФЕКТУ ВІРУСІНАКТИВУЮЧИХ АГЕНТІВ У СУЧАСНИХ ТЕХНОЛОГІЯХ ОДЕРЖАННЯ ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ КРОВІ ТА ФІБРИНОЛІЗУ

**В.Л. Новак, М.І. Вороняк, Т.В. Даниш, Н.А. Дульцева,
С.Є. Мадич, Л.В. Орлова, Н.О. Шурко**

ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України", Львів

***Резюме.** В результаті виконання роботи одержані наступні науково-практичні результати: вперше в технологію переробки плазми крові на окремі білкові продукти з використанням фракціонування за Коном, сольового та ПЕГ-перееосадження, а також хроматографічного очищення на біоспецифічних барвник-кремнеземних макропористих сорбентах, впроваджено тіоціанатний метод інактивації вірусів; застосування для вірусної інактивації в одній технологічній схемі різних за механізмом впливу хімічних агентів (спиртового, ПЕГ-осадження, тіоціанатного, сольвент-детергентного) за рахунок їх синергізму значно збільшує кінцевий антивірусний ефект одержання білкових препаратів.*

***Ключові слова:** плазма крові, фракціонування, біоспецифічна хроматографія, вірусінактивуючі агенти, синергізм.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНЕРГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВИРУСІНАКТИВУЮЩИХ АГЕНТОВ В СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ПОЛУЧЕНИЯ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА

**В.Л. Новак, М.И. Вороняк, Т.В. Даныш, Н.А. Дульцева,
С.Е. Мадыч, Л.В. Орлова, Н.О. Шурко**

ГУ "Институт патологии крови и трансфузионной медицины
НАМН Украины", г. Львов, Украина

***Резюме.** В результате выполнения работы получены следующие научно-практические результаты: впервые в технологию переработки плазмы крови на отдельные белковые продукты с использованием фракционирования по Кону, солевого и ПЭГ-перееосаждение, а также хроматографической очистки на биоспецифических краситель-кремнеземных макропористых сорбентах, введен тиоцианатный метод вирусной инактивации; применение для вирусной инактивации в одной технологической схеме различных по механизму воздействия химических агентов (спиртового, ПЭГ-осаждения, тиоцианатного, сольвент-детергентного) за счет их синергизма значительно увеличивает конечный антивирусный эффект получения белковых препаратов.*

Ключевые слова: плазма крови, фракционирование, биоспецифическая хроматография, вирусуинактивирующие агенты, синергизм.

USING OF SYNERGISTIC EFFECT OF VIRUS INACTIVATING AGENTS IN MODERN TECHNOLOGY OBTAINING OF BLOOD CLOTING AND FIBRINOLYSIS FACTORS

V. Novak, M. Voronyak, T. Danysh, N. Dultceva,
S. Madych N., L. Orlova, N. Shurko

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine,
NAMS of Ukraine», Lviv, Ukraine

Summary. *As a result of work are obtained following scientific and practical results: at first in blood plasma processing technology for separate protein products with the use of fractionation by Cohn, salt- and PEG-precipitation and also chromatographic purification on dye-silica biospecific macroporous sorbents, implemented thiocyanate method of viruses inactivating. Application for viral inactivation in a technological scheme different in action mechanism chemical agents (alcohol, PEG-precipitation, thiocyanate, solvent-detergent) due of their synergy the final receiving antiviral effect of protein preparations increases.*

Key words: *blood plasma, fractionation, biospecific chromatography, virus inactivating agents, synergy.*

Для вірусінактивації в трансфузіології найчастіше використовують пастеризацію, сольвент-детергентний метод (великомасштабне фракціонування пулів плазми), обробку УФ-метиленим синім (одноразові донації крові), β -пропіолактон, нанофільтрацію, пепсинізацію при низьких значеннях рН (при одержанні імуноглобулінів), різні вдосконалені види термоінактивації (обробка гарячою парою, термоінактивація в сухих препаратах, термоінактивація під тиском), нанофільтрацію.

Сольвент-детергентний метод (SD) набув найбільшого поширення через свою ефективність, однак він дієвий лише стосовно оболонкових вірусів (зокрема, гепатитів В та С, СНІД) [1].

Тіоціанатний метод вірусної інактивації [2] застосовує фармфірма Behring (тепер Behringwerke) при виділенні факторів згортання VIII та IX на МАВ-сорбентах (з лігандами-моноклональними антитілами). Розробники цієї методики пропонують її застосування також і для санобробки хроматографічних сорбентів після процедури виділення білкових сполук. Даний метод покладений в основу препарату фактора IX (Monopine), що випускається в США компанією Amoug. За даними літератури цей метод є ефективним і по відношенню до безоболонкових вірусів.

В нашій лабораторії проводились дослідження по впливу інактивуєчих агентів (сольвент-детергентного та тиоціанатного) на кількісний вміст та активність факторів протромбінового комплексу та фібринолізу, одержаних на етапах попереднього сольового та ПЕГ-фракціонування.

Поєднання сольвент-детергентного та тиоціанатного методів вірусної інактивації в одній технологічній схемі виділення та очищення білків плазми з використанням попереднього фракціонування та біоспецифічної хроматографії на кремнеземних макропористих сорбентах дозволить суттєво покращити безпеку препаратів, що будуть одержані.

Важливою проблемою залишається пошук ефективного способу відділення сольвенту і детергенту від продуктів переробки плазми крові, знаходження оптимальних місць застосування обробки в різноманітних схемах фракціонування плазми, виділення та очищення білкових препаратів крові.

Застосування препаратів плазми крові, одержаних з використанням SD-технології видалення вірусів, в трансфузійній практиці викликає певні побоювання відносно цитолітичних впливів та потенційної токсичності залишків SD-реагентів, що можуть бути присутніми в препаратах. Так, відомо [1], що триалкілфосфати володіють токсичною чи подразнюючою дією на мембрани клітин шкіри чи слизової.

На початку 90-х років питання потенційного накопичення SD-реагентів в препаратах крові було досить серйозною проблемою. Доведено, що оптимальними для видалення SD-компонентів з білкових розчинів є хроматографічні методи. Звичайно, застосування методів афінної хроматографії, як найспецифічніших та найефективніших для виділення та очищення білкових факторів, виглядає найпривабливішим і для відділення сольвенту та детергента.

Одержані нами результати переконують в тому, що метод хроматографії з використанням макропористих кремнеземних сорбентів дозволяє одержувати препарати білкових факторів без присутності в них Тритону X-100 та три(п-бутил)фосфату [3–6].

Нами вперше в технологію переробки плазми крові на окремі білкові продукти з використанням фракціонування за Коном, сольового та ПЕГ-переосадження, а також хроматографічного очищення на біоспецифічних барвник-кремнеземних макропористих сорбентах, впроваджено тиоціанатний метод інактивації вірусів.

Тиоціанат (ціансульфанід, сульфоціанат, тиоціанід, роданід) (SCN^-) відноситься до хаотропних агентів та металохелаторів. Властивості цього іону зумовлені негативним зарядом присутніх сірки та азоту. Цей хаотропний агент являє собою речовину, яка руйнує структуру, викликаючи

денатурацію макромолекул, таких як білки та нуклеїнові кислоти. Розчини хаотропних речовин збільшують ентропію системи, впливаючи на нековалентні внутрішньомолекулярні взаємодії (водневі, ван-дер-Ваальсівські, гідрофобні зв'язки). Макромолекулярна структура і функція залежить від загального ефекту цих сил, тому збільшення концентрації розчинених хаотропних речовин в біологічній системі денатурує макромолекули, знижує ферментативну активність. Третинна структура білка залежить від гідрофобних взаємодій амінокислот всієї послідовності білка. Розчинені хаотропні речовини зменшують загальний гідрофобний ефект гідрофобних ділянок. Це спричинює зміну його третинної структури, викликаючи денатурацію. Аналогічно, хаотропи діють на гідрофобні області подвійних ліпідних шарів; якщо досягається критична концентрація розчиненої хаотропної речовини (в гідрофобній ділянці подвійного шару), то цілісність мембрани порушується, і клітина лізується [7].

Авторами винаходу [2] передбачено застосування комбінації хімічних сполук та фізичних чинників для забезпечення антивірусного захисту лабільних білкових продуктів плазми крові, не викликаючи їх денатурацію. Для цього препарат піддавали обробці хімічною сполукою, зокрема, натрію тіоціанатом, з наступною ультрафільтрацією. Метод може бути застосований до плазми, сироватки, концентратів плазми, кріопреципиту, кріосупернатанту, продуктів субфракціонування плазми, що містять віруси гепатитів та імунодефіциту людини. Зокрема, запропонований метод придатний для інактивації *Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)* та *HIV-1*.

Проведений нами модельний експеримент по визначенню дії тіоціанату на активність тромбіну став основою для подальших досліджень його впливу на інші ферменти – серинові протеїнази трипсинового типу – фактори VII та IX, плазміноген. Ця сполука суттєво знижувала активність досліджуваних ферментів, але негативний ефект мав зворотній характер: після видалення тіоціанату з розчину методом діалізації активність всіх ферментів відновлювалася до початкового рівня. Аналогічно (негативною та зворотньою) виявилася дія іонів тіоціанату на активність фактора VIII.

Наші дослідження підтверджують раніше опубліковані спостереження [8]. Так було встановлено, що синергічний ефект по інактивації вірусів спостерігається при комбінації хаотропно ефективної солі, такої як, тіоціанат, з полієфіром (поліетиленгліколь), зі збереженням біологічної активності препарату. Таким чином, стійкі віруси, такі як вірус коров'ячої віспи або парвовірус, в даному випадку інактивуються значно швидше за менших концентрацій тіоціанату в порівнянні з обробкою тільки тіоціанатом.

Отже, нами продемонстровано, що застосування для вірусної інактивації в одній технологічній схемі різних за механізмом впливу хімічних агентів (спиртового, ПЕГ-осадження, тіоціанатного, сольвент-детергентного) за рахунок їх синергізму значно збільшує кінцевий антивірусний ефект препаративного одержання білкових препаратів – факторів згортання крові та фібринолізу.

Література

1. Pat. 6034073 US, A01N 57/26, 43/16, 43/08. Solvent detergent emulsions having antiviral activity./ Wright D.C.- Publ. 7.03.2000.
2. Pat. 5213803 US, A61K 8/19. Antiviral composition and method./ POLLOCK J, DOCHERTY J – Publ. 25.05.1993.
3. Даниш Т. В. Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами – активними барвниками тріазинового ряду / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, Н. А. Дульцева, Н. О. Шурко // Вісник Львівського університету. – 2008. – Вип. 47. – С. 63–69. – (Серія біологічна.)
4. Новак В.Л. Зменшення інфекційного ризику препаратів плазми крові: специфічні превентивні стратегії / В.Л. Новак, Т.В. Даниш // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2008. – № 5. – С. 41–43.
5. Новак В.Л. Вірусна безпека при виготовленні препаратів плазми крові – сучасні тенденції./ В.Л. Новак, Т.В. Даниш // Журнал академії медичних наук, 2009. – Т. 15, № 1. – С. 165–174.
6. Даниш Т. Одержання барвник-лігандних афінних сорбентів, придатних для виділення та очищення факторів згортання крові / Т. Даниш // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11. – № 1–2. – С. 356–360.
7. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells / Bhaganna, Prashanth; Volkens, J. M. Rita; Bell, N. W. Andrew [et al.] // Microbial Biotechnology – 2010. – Vol. 3, № 6. – P. 701–716.
8. Pat. 5770199 US, A61L 2/0088. Method for virus inactivation in the presence of polyalkylene glycol as well as the pharmaceutical preparation obtained therewith / J. Eibl, F. Dorner, N. Barrett. – Publ. 23.06.1998.