

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВИРУСІНАКТИВУЮЧИХ АГЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ КРОВІ**

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

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

**Резюме.** Досліджували вплив сольвент-детергентних та тіоціанатних антивірусних агентів на активність факторів згортання крові. Ці сполуки суттєво знижували активність досліджуваних ферментів, але негативний ефект мав зворотній характер: після видалення вірусінактивуючих речовин з розчину методом діафільтрації активність всіх ферментів відновлювалася до початкового рівня.

**Ключові слова:** фактори згортання крові, три(н-бутил)фосфат, Тритон X-100, Твін 80, тіоціанат амонію.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВИРУСИНАКТИВИРУЮЩИХ АГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

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

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

**Резюме.** Исследовали влияние сольвент-детергентных и тиоцианатных антивирусных агентов на активность факторов свертывания крови. Эти соединения существенно снижали активность исследуемых ферментов, однако негативный эффект имел обратимый характер: после удаления вирусинактивирующих веществ из раствора методом диафильтрации активность всех ферментов восстанавливалась к изначальному уровню.

**Ключевые слова:** факторы свертывания крови, три(н-бутил)фосфат, Тритон X-100, Твин 80, тиоцианат аммония.

## RESEARCH OF VIRUSINACTIVATING AGENT QUANTITATIVE CONTENT AND ACTIVITY FACTORS COAGULATION

N. Shurko, M. Voronyak, T. Danysh, N. Dultceva, S. Madych

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

**Resume.** *Was investigated the effect of solvent-detergent and thiocyanate antiviral agents on the activity of blood clotting factors. These compounds significantly reduced the activity of the investigated enzymes but the negative effect was reversible: after excision virusinactivating substances from solution by diafiltration method activity of all enzymes was recovered to the original level.*

**Key words:** *blood clotting factors, tri(n-butyl)phosphate, Triton X-100, Tween 80, ammonium thiocyanate.*

Дослідники, які працювали над виділенням та очищенням білків, прагнули розробити та вдосконалити методики для розділення та отримання препаратів із складних біологічних матеріалів, а саме з таких як плазма крові людини і тварин. Перші схеми розділення білків базувалися на використанні хімічних або фізичних засобів преципітації з використанням сульфату амонію, каприлової кислоти, етанолу, поліетиленгліколю, або варіації рН/температури. Наступним етапом була введена хроматографія як селективна і специфічна процедура фракціонування та очищення, спочатку, в основному, ґрунтуючись на використанні іонного обміну, гідрофобної взаємодії та гель-фільтрації [6].

На сьогоднішній день традиційні методи фракціонування плазми за Коном вдало поєднують з сучасними хроматографічними методами одержання білкових препаратів. Завдяки цьому в промислових масштабах одержують ряд достатньо очищених препаратів крові. Але якщо в минулому основна увага приділялась методам одержання та збереження активності препаратів крові, то останніми роками на перше місце вийшла проблема противірусної безпеки, оскільки спиртовий метод фракціонування за Коном практично не впливає на активність вірусів, особливо таких патогенних як віруси гепатитів, ВІЛ, герпесу, цитомегаловірусів, токсоплазмозу та інших [4].

За останні десятиліття були досягнуто значний прогрес щодо вірусної безпеки плазмових препаратів FVIII завдяки збільшенню чисельності методик для знешкодження інфекційних агентів. Вони включають:

- плазмове фракціонування, що забезпечило зниження концентрації вірусних контамінантів шляхом фізичного відокремлення та видалення вірусних частинок від бажаних білків;

- методи фільтрації сконцентрованих плазмових продуктів. Вони включають глибинну фільтрацію, діафільтрацію, ультрафільтрацію, нанофільтрацію;

- методи хроматографії для поділу молекул на основі відмінностей іонного заряду (іонний обмін), розміру (гель-фільтрація) або спорідненості до специфічних антитіл (імуноафінна);

- пастеризація чи теплова обробка, щоб знищити патогенні мікроорганізми;

- сольвент-детергентний метод проти оболонкових вірусів;

- хімічна обробка (висока концентрація солі, використання різних хімічних реагентів, наприклад солей тіоціанату).

Включення різних методів інактивації вірусів у поєднанні з ефективними хроматографічними етапами біоспецифічного виділення та очищення FVIII згортання крові та тромбіну дозволяє отримати препарати високого ступеня чистоти, безпечні у застосуванні стосовно можливої вірусної контамінації [3,5].

На сьогодні для вірусінактивації найбільш ефективно застосовується як сольвент три(*n*-бутил)фосфат, який має найслабший білок-денатуруючий ефект, а як детергент – Тритон X 100, Твін 80 та інші, в основному поліоксетиленові нейонні детергенти. Інактивуюча можливість комбінації таких речовин значна, вона здійснюється швидко і незворотно [3].

Тіоціанатний метод вірусної інактивації застосовує фармфірма Behringwerke при виділенні факторів згортання VIII та IX. Автори даної технології пропонують її застосування також і для санобробки хроматографічних сорбентів. Даний метод покладений в основу одержання препарату фактора IX (Mononine – запатентована торгова назва компанії Acton). За даними літератури цей метод є ефективним і по відношенню до безоболонкових вірусів [2].

**Мета:** дослідити вплив три(*n*-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твін 80 та  $\text{NH}_4\text{SCN}$  на активність факторів згортання крові.

**Матеріали і методи досліджень.** Активність тромбіну визначали за стандартною процедурою згідно вимог Національного інституту здоров'я (National Institute of Health; NIH) по часу зсідання 1 мл 0,1%-ного розчину фібриногену в 0,15 М  $\text{NaCl}$  з 0,01 М тріс- $\text{HCl}$  буфером, при рН 7,3 і додаванні 0,01–0,05 мл розчину тромбіну при температурі 37°C. Визначення активності фактора VIII проводили уніфікованим одностадійним методом [1].

**Результати та їх обговорення.** Щоб дослідити вплив хімічних інактиваторів вірусів на активність факторів в досліджувану реакційну суміш додавали їх забуферені розчини різних концентрацій. Як контроль використали зразки без додавання хімічних реактивів.

При збільшенні в дослідженому розчині концентрації тритону X-100 в межах від 0,001 до 0,025 г/л спостерігалось помітне зростання активності тромбіну (з 1,1 до 1,7 од. НІН/мл), а далі ( при концентраціях тритону X-100 від 0,025 до 0,04 г/л) – падіння активності. Зростання активності тромбіну в межах 1,4–1,7 од. НІН/мл прямо пропорційно залежало від збільшення концентрації Твін 80 (0,0016-0,04 г/л).

Сольвент три(*n*-бутил)фосфат в межах концентрацій 0,0016–0,04 г/л несуттєво (близько 15%) зменшував активність тромбіну.

Тіоціанат амонію (NH<sub>4</sub>SCN) при зміні концентрації в реакційній суміші з 0,0032 до 0,04 моль/л помітно знижував активність тромбіну (падіння становило до 80%).

Всі досліджувані реактиви, в той же час, негативно впливали на активність фактора VIII.

Для визначення зворотності чи незворотності інгібування активності досліджуваних ферментів проводили видалення хімічних реагентів з досліджуваних розчинів поетапно методом ультрадіафільтрації. Діафільтрацію низькомолекулярних домішок здійснювали через фільтри Amicon Ultra-0,5 10кД фірми Milipore шляхом центрифугування на центрифугу Eppendorf 5702R при 4 тис. об./хв. протягом 20 хв та температурі + 4°C (Табл. 1 та 2).

Одержані результати свідчать про те, що застосування NH<sub>4</sub>SCN при виготовленні препарату фактора VIII та тромбіну з метою антивірусної обробки не може мати негативного впливу на його кінцеву активність.

Таблиця 1

**Порівняльна характеристика активності фактора VIII  
у препараті Immunate на різних етапах ультрацентрифугування**

№ п/п	Концентрація NH <sub>4</sub> SCN, М	Час, с	Активність фактора VIII, МО
1 (без центрифугування)	123,0×10 <sup>-3</sup>	> 180	Не визначається
2	61,0×10 <sup>-3</sup>	>180	Не визначається
3	24,0×10 <sup>-3</sup>	90	0,16
4	12,2×10 <sup>-3</sup>	69	0,74
5	2,4×10 <sup>-3</sup>	64	1,15
6 (контроль)	0	63	1,24

**Порівняльна характеристика активності тромбіну  
на різних етапах ультрацентрифугування**

№ п/п	Концентрація NH <sub>4</sub> SCN, М	Час, с	Активність тромбіну, NIH
1 (без центрифугування)	373,0×10 <sup>-3</sup>	> 120	Не визначається
2	78,0×10 <sup>-3</sup>	16,0	1,0
3	56,0×10 <sup>-3</sup>	16,0	1,0
4	5,9×10 <sup>-3</sup>	8,0	4,0
5	0,7×10 <sup>-3</sup>	7,0	6,0
6 (контроль)	0	6,0	6,6

Аналогічний (інгібуєчий, зворотній) ефект сольвент-детергенту та тиоціанату ми спостерігали і для факторів згортання VII, IX, X та плазміногену.

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що високі концентрації інактиваторів знижували активності тромбіну та фактора VIII зворотно. При видаленні їх з реакційної суміші активність факторів відновлювалася. Для прикладу, видалення NH<sub>4</sub>SCN з розчину фактора VIII приводить до повного відновлення його активності.

Ці властивості дозволяють ефективно застосовувати дані вірус-інактивуючі реагенти одночасно в одній технологічній схемі виділення та очищення білків плазми з використанням попереднього фракціонування та біоспецифічної хроматографії на кремнеземних макропористих сорбентах, що дозволить суттєво покращити безпеку препаратів.

#### Література

1. Козлов А.А. Метод определения активности фактора VIII в плазме крови человека и в антигемофильных препаратах / А.А. Козлов // Весник службы крови. – 2006. – № 3. – С. 35–40.
2. Almeida J.D. The effect of sodium thiocyanate on virus structure [Text] / J.D. Almeida, A.F. Bradburne, T.G. Wreghitt // Journal of Medical Virology. – 1979. – Vol. 4 (4). – P. 269–277.
3. A solvent/detergent-treated and 15-nm filtered factor VIII: a new safety standard for plasma-derived coagulation factor concentrates [Text] / A. Related, C. S. Links, P. Porte, M. Nogr  [et al] // C.J.Vox Sang. – 2007. – Vol. 92(4). – P. 327–337.
4. Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates [Text] / M. Morfini, A. Coppola, M. Franchini, G. Di Minno // Blood Transfus. – 2013. – Vol. 11, Suppl. 4 – P. 55–63.

5. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma [Text] / In Seop K., Choi Y. W., Kang Y. [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 18 (5). – P. 997–1003.

6. Radosevich, M. Affinity chromatography – fractionated and DNA-engineered plasma proteins [Text] / M. Radosevich, T. Burnouf // *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.* – 2009. – P. 1–12.