

цього, флуоресценції тромбоцитів при фарбуванні РНК-специфічним барвником тіазоловим оранжевим.

4. Серед досліджених показників найбільшу цінність для діагностики ІТП мають показники морфометричної гетерогенності тромбоцитів та відносна кількості ретикулярних тромбоцитів в периферичній крові.

### Література

1. Клетки крови – современные технологии их анализа/ Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров [ и др.]. – М. : Триада-Фарм, 2002. – 200 с.

2. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / [под ред. Е.А. Кост]. – М. : Медицина, 1975. – (издание второе исправленное и дополненное). – 383 с.

3. Diagnostic value of platelet indices and bone marrow megakaryocytic parameters in immune thrombocytopenic purpura / Y.T. Tang, P. He, Y.Z. Li, H.Z. Chen // Blood Coagul. Fibrinolysis.– 2017. – V. 28, №1. – P. 83–90.

4. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure / A. Cybulska, L. Meintker, J. Ringwald, SW. Krause // Br. J. Haematol. – 2017. – V. 177, № 4. – P. 612–619.

*Надійшла 10.10.2017 року.*

УДК 612.151-083:616.151.514.-056.7

## НОВИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ ФАКТОРІВ VIII/ФОН ВІЛЛЕБРАНДА

**Н.О. Шурко**

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,  
Львів*

**Резюме.** Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу. Для лікування цих захворювань використовують препарати FVIII.

**Мета роботи** – дослідити співвідношення факторів VIII/фон Віллебранда на різних етапах технології отримання антигемофільного препарату.

**Методи дослідження:** фракціонування, іонообмінна та барвник-лігандна афінна хроматографія.

**Результати.** У статті наведено результати досліджень очищення комплексу факторів VIII/фон Віллебранда, що є комбінацією попереднього фракціонування з наступними етапами іонообмінної та барвник-лігандної хроматографії. Охарактеризовано основні переваги цього методу.

**Висновки.** Встановлено, що метод афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах забезпечує збереження вихідного (фізіологічного) рівня співвідношення фактора VIII до фактора фон Віллебранда та збереження виходу продукту від вихідного до 96,32%.

**Ключові слова:** фактор FVIII зсідання крові, фактор фон Віллебранда, хроматографія, фракціонування, кремнеземні сорбенти, триазинові барвники.

## THE NEW METHOD FOR OBTAINING A COMPLEX OF FACTORS VIII/VON WILLEBRAND

N.O. Shurko

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

**Resume.** Willebrand's disease together with hemophilia is the most common disease of the hemostasis system. The concentrate of blood coagulation factor VIII is used for the treatment of these diseases.

**Purpose of the work:** investigate the proportion of factors VIII/von Willebrand at various stages of the technology of obtaining an antihemophilic concentrate.

**Methods of research:** fractionation, ionexchange and dye-ligand affinity chromatography.

**Results.** The paper presents the results of studies of purification complex of factors VIII/von Willebrand which is a combination of the method of fractionation with the next steps of ion exchange and dye-ligand affinity chromatography. The main advantages of these methods are described.

**Conclusions.** Installed, that the method of affinity chromatography on silica sorbents provides preservation of the initial (physiological) level of the ratio factor VIII to von Willebrand's factor.

**Key words:** blood coagulation factor VIII, von Willebrand's factor, chromatography, fractionation, silica sorbents, triazine dyes.

**Вступ.** Відомо, що фактор VIII (FVIII) циркулює в плазмі крові разом з іншим глікопротеїном – фактором фон Віллебранда (vWF), утворюючи нековалентний комплекс [1]. Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу [5], а причиною виникнення є дефіцит або аномальна мультимерна будова молекули vWF. Доволі часто у таких хворих спостерігається й зниження активності FVIII, як непрямий наслідок кількісних і якісних змін vWF. Для лікування обох цих захворювань використовують препарати FVIII. Крім цього, слід зазначити, що у лікуванні хвороби Віллебранда використовують і препарат десмопресин, що сприяє вивільненню ендogenous vWF з ендотеліальних клітин. У роботі [77] відмічено, що для лікування хвороби фон Віллебранда 3-го типу та хворих, що не дають відповіді на застосування

десмопресину, використовують комплексні препарати FVIII-vWF. Вміст vWF у цих препаратах, а, відповідно, і співвідношення FVIII/vWF змінюється в дуже широких межах залежно від методів отримання. Проте, слід підкреслити, що найрозповсюдженіший спосіб отримання очищеного препарату FVIII методом іонообмінної хроматографії не дозволяє стандартизувати вміст в ньому vWF [5].

Більшість зареєстрованих препаратів FVIII розроблені для лікування гемофілії А та, відповідно, мають низький вміст vWF. Використання таких препаратів у лікуванні хвороби Віллебранда, перш за все, пов'язане з підвищеним ризиком виникнення тромбозів [1] та може стати причиною основного ускладнення такої терапії – появою інгібіторних антитіл [5, 7].

Дослідження *in vitro* продемонстрували, що використання препаратів FVIII з високим вмістом vWF, знижує ризик виникнення інгібіторів [8]. Клінічні дослідження підтвердили, що використання рекомбінантних препаратів без vWF в 2,5–3 рази збільшує ризик виникнення інгібіторних форм гемофілії [7]. Так, у роботах Mannucci P.M. і Tagariello G. [7, 8] для лікування інгібіторних форм гемофілії А рекомендовано використовувати концентрати FVIII-vWF з високим вмістом vWF. Відносно лікування хвороби Віллебранда немає чіткої відповіді щодо співвідношення цих двох факторів, проте, у роботі Federici A.V. відмічено, що це співвідношення має бути не менше 0,77 [5]. Деякі із дослідників пропонують використовувати фактор фон Віллебранда як стабілізатор FVIII у готових препаратах на противагу альбуміну чи амінокислотам гліцину та лізину, оскільки він є природнім стабілізатором його активності [4], що не вимагає додавання стабілізаторів.

**Метою** роботи було – дослідити співвідношення FVIII/vWF на різних етапах технології отримання антигемофільного препарату.

**Матеріали і методи дослідження.** Вихідною сировиною для досліджень був препарат кріопреципітат – фракція кріоглобулінів, отримана з 1 дози свіжозамороженої плазми (СЗП), розведена до об'єму  $\approx 20$ -30 мл робочого буферного розчину, що містила FVIII ( $>70$  МО/дозу), vWF ( $>100$  МО/дозу), фібриноген ( $\geq 140$  мг/дозу), FXIII, фібронектин та інші.

Визначення активності FVIII здійснювали уніфікованим одностадійним коагулологічним, а фактора фон Віллебранда – аглютинаційним (рістоміцин-кофакторна активність) методами. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250. Синтез сорбентів з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили за методикою «з включенням солі» протягом тривалого часу при лужних значеннях рН [3].

Осадження білків проводили гідроксидом алюмінію (III) та розчином ПЕГ-4000 до кінцевої концентрації 3% та 32% відповідно.

У технологічний процес отримання включили етап іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та барвник-лігандної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах.

**Результати та їх обговорення.** Використання хроматографічних методів у фракціонуванні плазми крові дозволило отримати препарати факторів зсідання (зокрема, FVIII) високого рівня чистоти та питомої активності [4].

Нашими дослідженнями з'ясовано, що FVIII не сорбується жодним зі синтезованих сорбентів, однак питома активність у розчині зростає, а, відповідно, відбувається процес очищення [2, 3]. Тобто, у нашому випадку зростання питомої активності FVIII зсідання крові можна пояснити явищем негативної афінної сорбції. Ми відібрали групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний алий 4ЖТ, Діасорб-Procion blue HB, Діасорб-Procion gelb M4R, Діасорб-Procion blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К [2]. Дані підтверджуються статистично двовибірковим t-тестом з різними дисперсіями при визначенні значущості різниці між групами. При статистичному аналізі встановлено, що існує достовірна відмінність між концентрацією нанесеного білка та сорбованого ( $p \geq 0,95$ ), але не проявляється достовірна відмінність між активністю фактора до нанесення та у супернатанті після сорбції ( $p < 0,95$ ) (рис. 1).

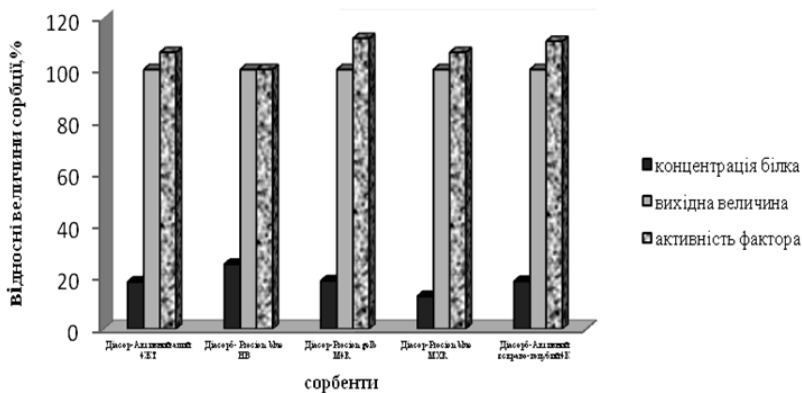


Рис. 1. Порівняльна характеристика зміни концентрації білка та активності FVIII при нанесенні на макропористі кремнеземні сорбенти

При розробці та проведенні етапів виділення та очищення FVIII важливо враховувати співвідношення FVIII/vWF, оскільки воно має важливе значення як у процесі виробництва (захищає FVIII від протеолітичної деградації), так і в клінічному використанні отриманих препаратів фактора.

Проведені нами дослідження цього показника продемонстрували наступне: зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> були незначними (рис. 2), тобто синтезовані нами сорбенти проявляють негативну афінну сорбцію і по відношенню до vWF.

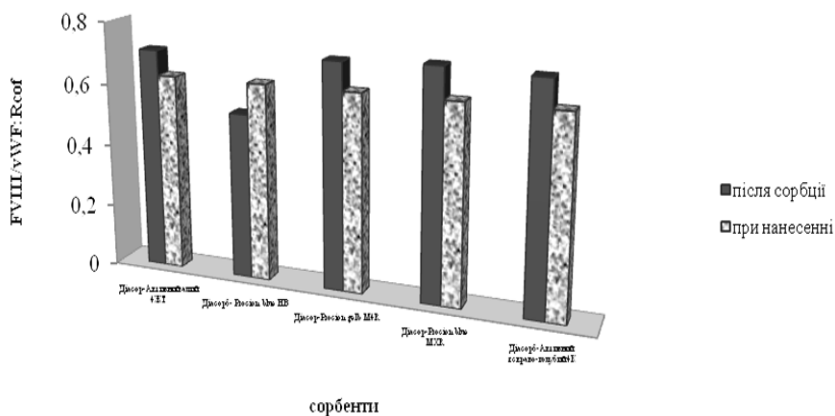


Рис. 2. Зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> у супернатанті під час афінної сорбції з відібраними сорбентами

Розроблена нами схема отримання очищеного FVIII передбачала поєднання методів фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах [9]. Встановлено, що попередні етапи видалення нецільових білків приводять до значно вищого ступеня очищення кінцевого препарату. Це, очевидно, зумовлено тим, що метод іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose використовується також для отримання інших факторів зсідання крові, зокрема, тромбіну, FVII та FIX [6]. Попереднє видалення цих білків нівелює теоретичну можливість їх конкурентного зв'язування з іонообмінником. Крім цього, без попереднього видалення нецільових білків при елюції FVIII частина їх може коєлювати разом з досліджуваним білком.

До етапу проведення негативної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в ролі лігандів співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> зросло відносно вихідного приблизно

вдвічі (табл. 1). На етапі проведення хроматографічного очищення FVIII з використанням макропористих кремнеземних сорбентів з тріазиновоми барвниками в ролі лігандів воно суттєво не змінилось, що надає нам підставу вважати, що синтезовані матриці не сорбують vWF. Визначення співвідношення проводили у двох експериментах:

- без попереднього переосадження домішкових білків;
- з етапами попереднього очищення.

Таблиця 1 – Співвідношення FVIII/vWF на різних етапах очищення FVIII

Зразки	Без попереднього фракціонування	З попереднім фракціонуванням
	FVIII/vWF :R <sub>cof</sub>	FVIII/vWF :R <sub>cof</sub>
Кріопреципітат	0,75	0,78
Елюат з DEAE-Sepharose (0,3 MNaCl)	1,72	1,85
Елюат Діасорб-Активний алий 4ЖТ	1,89	1,73
Елюат Діасорб-ProcionblueHB	1,75	1,75
Елюат Діасорб-Prociongelb M4R	1,73	1,89
Елюат Діасорб-ProcionblueMXR	1,8	1,96
Елюат Діасорб-Активний яскраво-голубий К	1,68	1,78

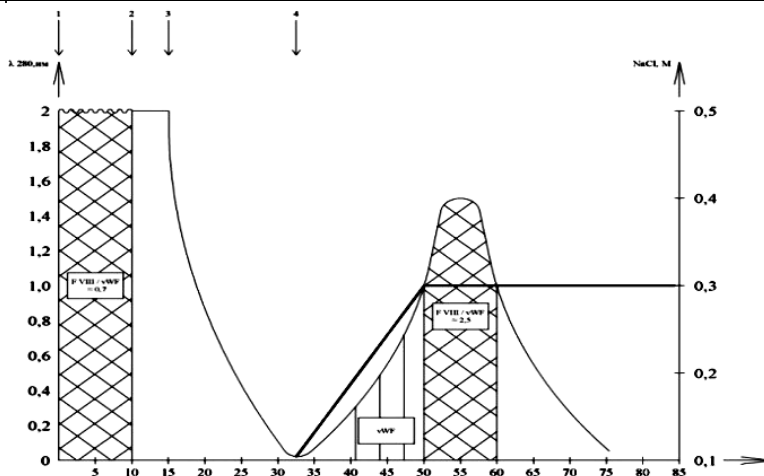


Рис. 3. Іонообмінна хроматографія FVIII/vWF на DEAE-Sepharose

Примітки: 1 – нанесення; 2 – проскок; 3 – промив; 4 – елюція

Для елюції фактора з DEAE-Sepharose ми використали буфер з 0,3 M NaCl, щоб забезпечити коелюцію комплексу FVIII-vWF. Однак, частина vWF елюювалася з першими фракціями (до виходу FVIII). Відповідно, в основній фракції, що містила FVIII зменшилась кількість vWF і, як наслідок, зросло співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>.

На етапі проведення негативної афінної хроматографії, оскільки жоден з цих факторів не сорбується із сорбентами, співвідношення між ними залишається сталим. Отже, використання макропористих кремнеземних сорбентів з тріазиновими барвниками забезпечує не лише зростання питомої активності FVIII, але й не змінює співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>, яке суттєво змінюється на етапі проведення іонообмінної хроматографії.

Встановлено, що основні втрати від вихідної активності FVIII (до 24%) відбувались на етапі іонообмінної хроматографії. Оскільки очищення антигемофільного фактора на кремнеземних сорбентах відбувалось завдяки явищу негативної афінної сорбції втрати від активності на цьому етапі є незначними (3,7%), що є ще одним ваговим аргументом застосування даного методу в технології отримання очищеного препарату.

### Висновки

Розроблений нами метод очищення FVIII зсідання крові на макропористих кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в ролі лігандів має низку переваг над розповсюдженими методами іонообмінної хроматографії у технології отримання антигемофільного препарату.

Оскільки очищення комплексу FVIII-vWF відбувалось завдяки явищу негативної афінної сорбції, вихід продукту на етапі афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками становить 96,32%, а також зберігається початкове співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>.

### Література

1. Выделение комплекса FVIII/фактора Виллебранда из плазмы донорской крови / О.Г. Кутюрова, Т.Л. Дереза, И.А. Скрылева, А.Л. Берковский // Гематология и трансфузиология. – 2014. – № 4 (59). – С. 19–24.
2. Пат. 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові / Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л. – № u201512302, заявлено 11.12.2015; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.
3. Шурко Н.О. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах / Н.О. Шурко, Т. В. Даниш // Біологія тварин. – 2016. – 18 (2). – С. 152–159.
4. Cheng E. Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography / E. Cheng // J Blood Disord Transfus. – 2016. – 7:4 (Suppl). – P. 82.

5. Federici A. B. Highly purified VWF/FVIII concentrates in the treatment and prophylaxis of the von Willebrand disease: the PRO.WILL Study / A.B. Federici // Haemophilia. – 2007. – 13(5). – P.15–24.

6. Hashimoto N. A method for systematic purification from bovine plasma of six vitamin K-dependent coagulation factors: Prothrombin, Factor X, Factor IX, Protein S, Protein C and Protein Z / N. Hashimoto, T. Morita, S. Iwanaga // J. Biochem. – 1985. – V.97. – P. 1347–1355.

7. Mannucci P. M. Drug Therapy: Treatment of von Willebrand disease / P.M. Mannucci // N. Engl. J. Med. –2004. – 351 (7). – P. 683–694.

8. In vitro reactivity of factor VIII inhibitors with von Willebrand factor in different commercial factor VIII concentrates / G. Tagariello, D. Zanotto, P. Radossiet [et al.] // Am. J. Haematol. – 2007. – 82 (6). – P. 460–462.

9. Shurko N. Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation / N. Shurko, T. Danysh // International Journal of laboratory Hematology. – 2017. – Vol. 39 (Issue S2). – P. 109.

*Надійшла 03.11.2017 року.*