

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

ШУРКО НАТАЛІЯ ОЛЕГІВНА

УДК 612.151-083:616.151-056.7

**ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОАКТИВНОГО ПРЕПАРАТУ
ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АФІННОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ НА БАРВНИК-КРЕМНЕЗЕМНИХ НОСІЯХ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України».

Науковий керівник – кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
ДАНИШ Тарас Васильович,
ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної
медицини НАМН України»,
завідувач лабораторії біохімії крові.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
ЛУЦИК Максим Дмитрович,
Інститут біології клітини НАН України,
провідний науковий співробітник відділу
регуляції проліферації клітин і апоптозу;

доктор біологічних наук, професор
САВЧУК Олексій Миколайович,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка, завідувач кафедри біохімії Навчально-
наукового центру «Інститут біології та медицини».

Захист відбудеться « 22 » травня 2018 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. Василя Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. Василя Стуса, 38.

Автореферат розісланий « 18 » квітня 2018 року.

**Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради**

О.І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Препарати плазми крові посідають значне місце серед лікарських засобів і відіграють важливу роль у лікуванні цілої низки захворювань (Stonebraker J. S. et al., 2010, 2011; Morfini M., 2017). Відомо, що загальний об'єм плазми, який піддається фракціонуванню на світовому рівні, становить 48,4 млн л на рік (Robertson V. H., 2000). Водночас існує постійний дефіцит плазми для задоволення потреб у терапевтичних препаратах, особливо альбуміну (близько 500 т), імуноглобуліну G (40 т) та фактора VIII (1 кг, 200000 доз) (Curling J. et al., 2005; Burnouf T. et al., 2014). Оптимізація технологій фракціонування білків плазми крові надзвичайно важлива не тільки для зменшення собівартості препаратів, але й для розширення їх асортименту та підвищення якісних характеристик отримуваних продуктів (Burnouf T., 1995).

З метою запобігання дефіциту фактора VIII і кровотеч у пацієнтів із гемофілією А проводять замісну терапію введенням його плазмових або рекомбінантних препаратів (Nord A. et al., 2001; Casademunt E. et al., 2012; Calizzani G. et al., 2013; Farrugia A., 2015; McEneny-King A. et al., 2016). Препарати фактора VIII для клінічного використання представлені на ринку багатьма виробниками Європи, Азії та США (Baxter BioScience (Австрія), Kedrion (Італія), Octapharma (Австрія, Швеція, Франція), Grifols (Іспанія), Behring GmbH (Німеччина), Pfizer (Швеція), GreenCross (Південна Корея), Bayer (Німеччина, США)). Вітчизняний препарат фактора VIII виробляє фірма «Біофарма». Висока вартість препаратів фактора VIII зумовлює їх дефіцит в Україні, а відповідно й низьку ефективність лікування гемофілії А. З огляду на це, розробка й оптимізація методів одержання високоактивних препаратів фактора VIII зсідання крові для збільшення обсягу його виробництва та зниження вартості є актуальною проблемою сьогодення.

Хроматографічні методи, зокрема афінна хроматографія, є найбільш ефективні при одержанні високоочищених препаратів білків плазми крові (Cheng E. et al., 2010; Rodrigues E. S. et al., 2014). Особливу групу лігандів для афінної хроматографії становлять активні, зокрема, тріазинові та вінілсульфонові барвники. На тлі значної кількості досліджень властивостей цих барвників для очищення імуноглобуліну G, альбуміну, нуклеотидзалежних ферментів, факторів протромбінового комплексу (Boer P. M. et al., 1993; Denizli A. et al., 1999, 2001; Kassab A. et al., 2000; Curling J., 2004; Wongchuphana R. et al., 2009) їх застосування для очищення фактора VIII зсідання крові вивчено недостатньо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом наукових досліджень ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» і безпосередньо зв'язана з такими науково-дослідними роботами, виконавцем яких була здобувач: «Одержання біоспецифічних сорбентів на основі пористих силохромних матриць та лігандів тріазинової групи, придатних для виділення високоочищених

препаратів серинових протеїназ з плазми крові» (№ Держреєстрації 0107U001131, 2007–2009); «Дослідити ефективність застосування методів антивірусної обробки у технології виділення та очищення білкових факторів плазми крові з використанням афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах» (№ Держреєстрації 0113U003164, 2013–2015); «Одержати нові біоспецифічні сорбенти на основі кремній-неорганічних матриць і дослідити їх властивості та ефективність застосування у технології фракціонування плазми крові» (№ Держреєстрації 0116U000177, 2016–2018).

Робота була підтримана індивідуальним грантом від Західно-Українського Біомедичного Центру (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC) за темою «Coagulopathy – perspectives of diagnostics and treatment» (2008–2009).

Мета і завдання дослідження. *Мета* роботи полягала в розробці методу одержання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням новосинтезованих біоспецифічних кремнеземних сорбентів з іммобілізованими активними барвниками та дослідження властивостей отриманих препаратів.

Для досягнення поставленої мети в дисертаційній роботі визначено такі основні *завдання*:

- синтезувати нові біоспецифічні сорбенти іммобілізацією активних барвників на кремній-неорганічній матриці та дослідити їх фізико-хімічні властивості;
- вивчити умови сорбції/десорбції фактора VIII синтезованими афінними сорбентами;
- дослідити ефективність використання кремнеземних сорбентів для проведення афінної хроматографії фактора VIII зсідання крові;
- розробити технологічну схему одержання препарату фактора VIII із використанням афінної хроматографії на модифікованих кремнеземних сорбентах;
- визначити оптимальні умови антивірусної обробки препаратів фактора VIII при їх одержанні.

Об'єкт дослідження – процес одержання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими барвниками.

Предмет дослідження – фактор VIII зсідання крові; властивості отриманого препарату фактора VIII; макропористі кремнеземні сорбенти з іммобілізованими активними барвниками та їх властивості.

Матеріали та методи дослідження. У дисертаційній роботі використовували такі методи: хімічного синтезу макропористих кремнеземних сорбентів з активними тріазиновими та вініл-сульфоновими барвниками; ультрадіафільтрації; спектрофотометричні; електрофоретичні; фракціонування білків плазми крові; афінної та іонообмінної хроматографії; коагулологічні та методи з використанням специфічних хромогенних

субстратів визначення активності факторів зсідання крові й кількості імуноглобулінів до фактора VIII; антивірусної обробки сольвент-детергентним і тиоціанатним методами; статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше застосовано афінну хроматографію на макропористих кремнеземних сорбентах з активними барвниками в ролі лігандів для очищення фактора VIII зсідання крові. З'ясовано, що очищення фактора VIII відбувалося завдяки явищу негативної афінної сорбції за умов відповідного рН розчину та розміру пор матриці.

Із 16 синтезованих сорбентів відібрано 5, що є оптимальними для очищення фактора VIII зсідання крові (Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К) (патент на винахід № 94299 «Спосіб очищення фактора VIII», 2011).

Обґрунтовані переваги поєднання етапів попереднього фракціонування плазми крові та кріопреципітату з хроматографією, що дало змогу досягнути значно вищого ступеня очищення (242 та 702 рази, відповідно) за рахунок видалення нецільових білків (патент на корисну модель № 107509 «Спосіб виділення фактора VIII згортання крові», 2016).

Досліджено вплив вірус-інактивуючих речовин на активність фактора VIII зсідання крові та продемонстровано зворотність такого впливу. З'ясовано, що методи визначення активності фактора VIII з використанням специфічних хромогенних субстратів, на відміну від коагулологічних, менш чутливі до наявності домішок і рекомендовані для використання на всіх етапах одержання фактора VIII.

Доведено, що досліджувані сорбенти також не зв'язують фактор фон Віллебранда (vWF), внаслідок чого забезпечується вихідний рівень співвідношення $FVIII/vWF:R_{cof}$.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологічні схеми отримання препаратів вірус-безпечного фактора VIII зсідання крові з використанням етапів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах у поєднанні з етапами антивірусної обробки.

Обґрунтовано доцільність впровадження у практику промислового виробництва методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками для отримання очищених препаратів фактора VIII зсідання крові.

Видано інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Спосіб очищення фактора VIII згортання крові» (Київ, 2010).

Основні результати досліджень та положення роботи впроваджено у практику відділення заготівлі крові та її компонентів Львівського обласного центру служби крові; військово-медичного клінічного центру Західного регіону м. Львів та відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітин НАНУ, м. Львів.

Особистий внесок здобувача. Автор особисто зібрала й проаналізувала літературні джерела на тему дослідження та розробила алгоритм розв'язання поставлених завдань.

Під час виконання експериментальної частини роботи здобувач особисто проводила експериментальні дослідження і первинний аналіз отриманих даних. Разом із науковим керівником сформульовано мету і завдання дослідження, а також пошук шляхів їх вирішення. Автор статистично опрацювала матеріал, проаналізувала, узагальнила та інтерпретувала отримані результати, підготувала до публікації основні матеріали, написала всі розділи дисертації, сформулювала висновки. При аналізі та узагальненні результатів досліджень користувалася порадами наукового керівника – завідувача лабораторії біохімії крові, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Т.В. Даниша.

У процесі проведення окремих етапів досліджень брали участь співробітники лабораторії біохімії крові, деякі дослідження проведені в інших лабораторіях та відділеннях ДУ «Інституту патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» (директор Інституту, Заслужений діяч науки і техніки України, д.мед.н., професор В.Л. Новак; завідувачі: к.б.н., с.н.с. М.І. Вороняк, к.мед.н. Ю.В. Войціцький).

Апробація результатів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи представлено на: XXXth International Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT, Макао, Китай, 2008); I та III міжнародних конгресах з інфузійної терапії (Черкаси, 2008; Київ, 2016); III міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я» (Луганськ, 2009); 18th і 22nd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Innsbruck, Австрія, 2009; Athens, Греція, 2017); ювілейній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини» (Львів, 2010); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченій 80-річчю служби крові Криму (АР Крим, Алушта, 2013); міжнародній науково-практичній конференції «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення» (Київ, 2014); міжнародній науково-практичній конференції «Нове у медицині сучасного світу» (Львів, 2014); 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab, Istanbul, Туреччина, 2014); 8th і 9th Bari International Conference (Bari, Італія, 2014; Rome, Італія, 2017); IV міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України» (Київ, 2015); X ювілейній південно-українській науково-практичній конференції «Вища школа у вирішенні проблем внутрішньої медицини», присвяченій 115-річчю Одеського національного медичного університету (Одеса, 2015); науково-практичній конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках» (Київ, 2015); V науково-практичній конференції з міжнародною

участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку» (Київ, 2016); 29th та 30th International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (Milano, Італія, 2016; Honolulu, Гаваї, 2017); 21th і 22nd Congress European Hematology Association (Copenhagen, Данія, 2016; Madrid, Іспанія, 2017); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії», присвяченій 100-річчю від дня народження професора Б.Ф. Сухомлинова (Львів, 2016); 5 Conferenza Nazionale dei Servizi Transfusionali SIMTI (Firenze, Італія, 2017); 20th Annual Meeting of the ESCV (Lago Maggiore, Італія, 2017).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 43 наукових працях, з яких 10 статей у наукових фахових виданнях України (2 одноосібні), 3 статті у наукових фахових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 3 статті в інших наукових журналах, 2 патенти України (1 – на винахід та 1 – на корисну модель), 1 інформаційний лист, 24 тези доповідей у матеріалах з'їздів та конференцій, у тому числі 12 закордонних.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 194 сторінках комп'ютерного тексту (основна частина – 115 сторінок) і сформована з анотації, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та їх узагальнення, висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Дисертаційна робота ілюстрована 24 таблицями та 28 рисунками на 30 сторінках. Бібліографічний список налічує 254 найменувань (57 кирилицею та 197 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі наведено аналіз результатів досліджень вітчизняних і закордонних авторів щодо структури та функції фактора VIII (FVIII) зсідання крові, фізіологічної ролі та методів його очищення. Описано біосинтез та будову молекули FVIII, взаємодію з фактором фон Віллебранда (vWF), методи його одержання й антивірусної обробки, застосування препаратів фактора для лікування гемофілії А. Проаналізовано перспективи застосування методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах із іммобілізованими активними барвниками для розроблення нового методу одержання високоактивного препарату фактора VIII.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальну частину роботи виконано впродовж 2008–2017 років у лабораторії біохімії крові ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», атестованій на проведення вимірювань у сфері метрологічного нагляду.

На першому етапі роботи провели синтез кремнеземних сорбентів з лігандами-барвниками. Як матрицю використали Діасорб-амінопропіловий (кремнеземна матриця модифікована γ -амінопропіл-триетоксисиланом), до якої додавали водний розчин (10 мг/мл) барвника. Синтез проводили за наявності розчинів натрію хлориду та калію карбонату. Інкубували при

+45 °С 48 год. Сорбенти послідовно відмивали: дистильованою водою, 4М розчином калію хлориду, 25% розчином ізопропанолу, 6М розчином сечовини, дистильованою водою. Одержані сорбенти зберігали в розчині 25% ізопропанолу (Larsson P.-O., 1984).

Синтезовано 16 біоспецифічних кремнеземних сорбентів з такими іммобілізованими активними барвниками: 7 монохлор-тріазинових (Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Reactive Red 120, Діасорб-Reactive Green 5, Діасорб-Reactive Green 19, Діасорб-Активний фіолетовий 4К, Діасорб-Procion Yellow HE3G, Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP), 7 дихлор-тріазинових (Діасорб-Procion Blue MXR, Діасорб-Procion Red MX5B, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Reactive Brown 10, Діасорб-Активний яскраво-голубий К, Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ, Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ) та 2 вініл-сульфонові (Діасорб-Активний бордо 4СГ; Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ).

Хімічну стійкість синтезованих сорбентів оцінено за умов високої іонної сили розчину, наявності полярних розчинників, зміни рН середовища та температури. Міцність зв'язку оцінювали виявленням вільного барвника в розчині за світлопоглинанням при відповідній довжині хвилі для кожного барвника, яке вимірювали на спектрофотометрі DS-11FX («DeNovix», Англія).

Сорбцію/десорбцію FVIII здійснювали batch-методом: до 2 мл сорбенту, врівноваженого 50 мМ Трис-НСІ буферним розчином з рН 7,4 або 8,0, додавали 2 мл розчину досліджуваного зразка (Кріопреципітат чи Immunate). Суміш інкубували 2 год при періодичному перемішуванні. У супернатанті визначали: активність FVIII, IX, vWF, тромбіну, концентрацію фібриногену (Баркаган З. С. зі співавт., 1991; Ro Sen S. et al., 2000; Laffan M. et al., 2004; Козлов А. А., 2006; Красівська В. В. зі співавт., 2014), альбуміну (Dumas V. T. et al., 1997) та сумарного білка (Bradford M. M., 1976).

У роботі використовували референтні нормальну та дефіцитну за факторами VIII та IX плазми (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Німеччина, Helena Biosciences Europe, Велика Британія), набори реагентів для визначення прокоагулянтної активності факторів (АЧТЧ-тест Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Німеччина та Helena Biosciences Europe, Велика Британія), набір для визначення рістоміцин-кофакторної активності фактора фон Віллебранда («Ренам», Росія), набір для визначення активності FVIII методом з використанням хромогенного субстрату Coamatic (Chromogenix, Італія), комерційні препарати FVIII зсідання крові Кріопреципітат (Тернопільський обласний центр служби крові) та Immunate (Baxter, Австрія).

Чистоту отриманих зразків оцінювали вертикальним електрофорезом у тонкому шарі поліакриламідного гелю (Т=10 або 5-15 %, С=3,5 %) з додецилсульфатом натрію (Laemmly U. K., 1970; Горячковский А. М., 1998). Для порівняння використовували комерційний набір білкових маркерів

фірми ThermoFisher PageRuler™ Unstained Protein Ladder (суміш 14 рекомбінантних білків з молекулярною масою від 10 до 200 кДа).

Анти-FVIII антитіла досліджували згідно з методиками Kasper C. et al. (1975) та Salvagno G. L. et al. (2007).

Для створення схеми отримання очищеного препарату FVIII проведено дослідження можливого застосування етапів технологічного процесу.

Поетапне видалення факторів протромбінового комплексу (ППСБ) здійснювали їх співосадженням із цитратом барію та сорбцією на гідроксиді алюмінію (III). Видалення фібриногену, фібронектину, ліпопротеїнів та інших супутніх білків проводили преципітацією ПЕГ-4000 (Cecchi F. et al., 2007).

Іонообмінну хроматографію FVIII зсідання крові проводили на іонообміннику DEAE-Sepharose FAST FLOW (Amersham – тепер GE Healthcare Life Sciences), врівноваженому буферним розчином такого складу: 50 мМ Тріс-НCl, рН 7,4; 10 мМ Na₃C₆H₅O₇; 0,1 М NaCl; 0,7 мМ CaCl₂; 2,0 г/л лізину та 8,0 г/л гліцину. Для елюції FVIII використовували буфер із молярністю 0,3 М NaCl (Странчар А. зі співавт., 2000).

Афінну хроматографію FVIII з відібраними сорбентами здійснювали в скляних колонках розміром (2x5) см², врівноважених 50 мМ Тріс-НCl буферним розчином, рН 7,4. Не зв'язаний сорбентом проскок FVIII збирали фракційно на колекторі фракцій «Діафрак 002» («БіоМарк», Україна).

Застосування ефективних методів антивірусної обробки сольвент-детергентного (Related A. et al., 2007; Roberts P. L., 2008, 2009; Hsieh Y. T. et al., 2016; Marietta M. et al., 2016) та тіоціанатного (Almeida J. D. et al., 1979; Prusiner S. B. et al., 1981; Feldman F. et al., 1995) у схемі одержання препарату FVIII зумовило вивчення впливу вірус-інактивуючих речовин на активність фактора й застосування способів видалення їх із розчину.

Статистичну обробку матеріалу проводили за допомогою пакета прикладних програм Windows-Exel та Statistica 17 ESPP. Використовували описову статистику, кореляційний аналіз і двовибірковий t-тест з різними дисперсіями. Перевірку на нормальність розподілу здійснювали за критеріями Колмогорова-Смірнова. Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні не менше 95 % (P<0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження фізико-хімічних властивостей лігандів та сорбентів.

Для перевірки та оцінки міцності зв'язку матриця–барвник досліджено вплив різних чинників на синтезовані сорбенти. Досліджувані сорбенти за тривалого зберігання (до 5 років) у розчинах з молярністю 0,15М натрію хлорид, до 25% ізопропанолу, рН 7,0–8,0, при температурі +(4±25) °С стабільні (барвник у розчин не вивільнявся), що зумовлено стійкістю ковалентного зв'язку між лігандом та матрицею.

Вивільнення барвника при рН 10,0 зумовлено частковим гідролізом кремнеземної матриці. Хімічна стабільність отриманих сорбентів дає змогу застосовувати розчини з різноманітними властивостями (рН, іонна сила, полярність тощо) для елюції препаратів і промивання колонок з сорбентами.

Синтезовані сорбенти не піддаються руйнуванню під впливом мікроорганізмів (тривале зберігання в нестерильних умовах без втрати сорбційної здатності).

Висока термостійкість надає цим сорбентам суттєвих переваг порівняно з органічними, оскільки процес автоклавування (1,1 атм, 120 °С, 60 хв) забезпечує антивірусну обробку без втрати їх властивостей.

Дослідження сорбції/десорбції фактора VIII. Із досліджуваних сорбентів виділили групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К. З'ясовано, що найкраща сорбція нецільових білків відбувається при рН 7,4 (рис. 1).

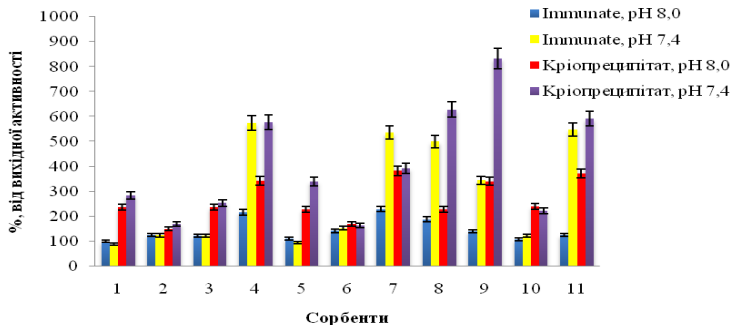


Рис. 1 Зміни активності FVIII при сорбції Криопреципітату та Immunate на синтезованих сорбентах ($M \pm m$, $n=3$)

Примітка. 1 – Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ; 2 – Діасорб-Активний фіолетовий 4К; 3 – Діасорб-Активний бордо 4 СГ; 4 – Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ; 5 – Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ; 6 – Діасорб-Procion Yellow HE3G; 7 – Діасорб-Procion Blue HB; 8 – Діасорб-Procion Gelb M4R; 9 – Діасорб-Procion Blue MXR; 10 – Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP; 11 – Діасорб-Активний яскраво-голубий К.

Констатовано, що FVIII не сорбується жодним зі синтезованих сорбентів, а його питома активність зростає внаслідок сорбції нецільових білків. Під час інкубації досліджуваного розчину препарату FVIII з цими сорбентами упродовж 120 хв питома активність зростала з $0,036 \pm 0,001$ до $0,300 \pm 0,009$ (Криопреципітат) і з $17,45 \pm 0,75$ до $100,12 \pm 5,07$ (Immunate).

Визначення концентрації фібриногену та рівня ристомицин-кофакторної активності vWF після сорбції на відібраних сорбентах показало, що концентрація фібриногену в супернатанті достовірно знижується ($P \leq 0,05$), а рівень vWF достовірно не змінюється.

У результаті проведених досліджень виявлено, що з відібраними сорбентами зв'язуються фактори зсідання крові (II, VII, IX, X), фібриноген, частково альбумін (Denizli A. et al., 2001).

Дослідження сорбційних властивостей хроматографічного сорбенту з матрицею різної пористості. Сорбент із оптимальним розміром пор для очищення FVIII добирали експериментально. Для досліджень використали сорбент Діасорб-Procion Blue HB з розміром пор 250, 500, 750 та 1500 Å, відповідно. Одержані результати представлені в табл. 1 та 2.

Таблиця 1

**Очищення FVIII із Кріопреципітату на сорбенті
Діасорб-Procion Blue HB з різним розміром пор ($M \pm m$; $n=10$)**

Показники	Нанесення (вихідний зразок)	Діасорб-Procion Blue HB			
		250 Å	500 Å	750 Å	1500 Å
Активність FVIII, МО/мл	1,65±0,07	1,27±0,07	1,14±0,05	0,09±0,04	1,16±0,06
Концентрація білка, мг/мл	26,02±0,13	20,02±0,06	12,58±0,10	6,55±0,06	13,60±0,02
Питома активність FVIII, МО/мг білка	0,06±0,03	0,06±0,03	0,09±0,04*	0,14±0,05*	0,09±0,04*
Ступінь очищення, раз	1,00	1,03	1,38	2,17	1,34

Примітка. Тут і в табл. 2: * – різниця з вихідним зразком достовірна ($P \leq 0,01$)

Таблиця 2

**Очищення FVIII із препарату Immunate на сорбенті
Діасорб-Procion Blue HB з різним розміром пор ($M \pm m$; $n=10$)**

Показники	Нанесення (вихідний зразок)	Діасорб-Procion Blue HB			
		250 Å	500 Å	750 Å	1500 Å
Активність FVIII, МО/мл	10,28±0,42	5,25±0,32	6,05±0,22	8,15±0,33	7,60±0,31
Концентрація білка, мг/мл	0,50±0,02	0,20±0,01	0,21±0,01	0,12±0,04	0,39±0,01
Питома активність FVIII, МО/мг білка	20,66±0,64	26,60±0,99*	28,70±0,81*	67,20±0,90*	19,54±0,94
Ступінь очищення, раз	1,00	1,23	1,39	3,25	0,95

На основі отриманих даних зроблено висновок, що для видалення нецільових білків та одержання препарату FVIII з найвищим ступенем очищення оптимальним є сорбент Діасорб-Procion Blue HB з розміром пор 750 Å.

Дослідження впливу вірус-інактивууючих агентів на активність фактора VIII зсідання крові. Для дослідження впливу хімічних інактиваторів вірусів на активність FVIII у досліджувану реакційну суміш додавали їх забуферені розчини різних концентрацій (контроль – зразки без додавання хімічних реактивів). Активність фактора визначали двома методами: коагулологічним та з використанням специфічного хромогенного

пептидного субстрату. Доведено, що всі досліджувані чинники негативно впливали на активність FVIII (визначення як коагулологічним, так і хромогенним методами). Вплив домішок на визначення активності FVIII з використанням хромогенного субстрату був меншим порівняно з коагулологічним методом. Так, при концентраціях різних хімічних чинників (у нашому випадку вірус-інактивуючих речовин: $>0,06$ М тиоціанату амонію; $\geq 2,0$ % три(н-бутил) фосфату; $\geq 1,5$ % Тритону X-100; $\geq 2,0$ % Твіну-80) активність FVIII коагулологічним методом, на відміну від використання хромогенного субстрату, не визначалася. Таким чином, для контролю активності FVIII на різних етапах його одержання, в тому числі й після вірус-інактивації хімічними методами, кращим є застосування хромогенного пептидного субстрату.

Для визначення типу інгібування активності FVIII тиоціанатом амонію видаляли останній з досліджуваних розчинів поетапно методом ультрадіафільтрації через мембранні фільтри Amicon Ultra-0,5 із межею ексклюзії 10 кД (Millipore, США) центрифугуванням на центрифугі Eppendorf 5702R при 2000 g упродовж 20 хв і температурі $+4$ °С. Повне відновлення активності FVIII після видалення тиоціанату амонію з розчину свідчить про зворотність інгібування.

Визначення концентрації вірус-інактивуючих реагентів у досліджуваних білкових розчинах. В процесі отримання препарату потрібно контролювати вміст хімічних вірусних інактиваторів – потенційно-небезпечних для здоров'я людини агентів. З цією метою розроблено методи визначення концентрації вірус-інактивуючих агентів на різних етапах очищення та в готовому препараті.

Для визначення аніонів роданіду використовували його здатність утворювати комплекс із катіонами Fe^{3+} , що визначали фотометрично при 490 нм. Лінійність визначення в межах 0,0005-0,005 моль/л.

Тритон X-100 у розчині визначали за поглинанням світла при 223 нм та 275 нм. Концентрацію Тритону X-100 в розчині визначали за допомогою калібрувальних графіків залежності оптичної густини від його концентрації. Чутливість визначення при 275 нм – 0,0019 %, а при 223 нм – 0,00035 %.

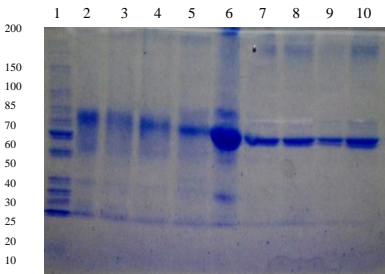
Отримання фактора VIII методом афінної сорбції на кремнеземних сорбентах. У результаті осадження супутніх білків досягнуто підвищення питомої активності FVIII в 1,47 разу. Видалення з досліджуваної суміші факторів системи зсідання крові значно підвищувало стабільність комплексу FVIII/vWF. В одержаному концентраті FVIII не виявлено факторів системи зсідання крові.

На наступному етапі проводили додаткове очищення FVIII з використанням макропористих барвник-кремнеземних сорбентів (batch-метод). При цьому внаслідок сорбції нецільових білків ступінь очищення FVIII зростав приблизно в 100 разів (табл. 3).

Активність FVIII після негативної афінної сорбції (M±m, n=8)

Проба	Концентрація білка, мг/мл	Активність FVIII, МО/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$
Вихідний розчин	64,14±1,06	1,08±0,03	0,17±0,01
Супернатант/сорбент Дісорб-Активний яскраво-голубий К	1,72±0,06	2,82±0,08	16,50±0,70
Супернатант/сорбент Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	1,79±0,03	3,36±0,15	18,80±1,10
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Blue HB	1,65±0,03	2,82±0,08	17,10±0,70
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Gelb M4R	1,64±0,03	2,59±0,08	15,70±0,40

За допомогою електрофоретичного аналізу з'ясовано, що внаслідок інкубації супернатанту свіжозамороженої плазми (після попереднього осадження нецільових білків цитратом барію, гідроксидом алюмінію (III) та ПЕГ-4000) з досліджуваними сорбентами суттєво зменшується кількість супутніх білків, що зумовлює підвищення питомої активності FVIII (треки 7–10, рис. 2).



- 1 – маркерні білки;
- 2 – свіжозаморожена плазма;
- 3 – супернатант після осадження цитратом барію;
- 4 – супернатант після сорбції білків на $Al(OH)_3$ та ПЕГ-4000;
- 5 – вихідна проба для нанесення;
- 6 – Кріопреципітат;
- 7 – Супернатант/сорбент Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ;
- 8 – Супернатант/сорбент Діасорб-Активний яскраво-голубий К;
- 9 – Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Gelb M4R;
- 10 – Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Blue HB.

Рис. 2 Електрофореграма результатів очищення FVIII із плазми крові (10%-ий ПААГ, рН 8,9, 0,1 % SDS)

Отримання фактора VIII хроматографічними методами без попередніх етапів фракціонування. Оскільки, основним хроматографічним методом для одержання комерційних препаратів FVIII є метод іонообмінної хроматографії, його застосовано як додатковий у окремій схемі очищення FVIII. Іонообмінну хроматографію антигемофільного фактора проводили на DEAE-Sepharose при рН 7,4. Як вихідну сировину використали Кріопреципітат свіжозаморожений. Основний пік активності FVIII збирали з елююючим розчином 0,3 М натрію хлорид. Відбирали фракції елюату з найвищою активністю FVIII та проводили хроматографію при рН 7,4 на кремнеземних сорбентах (табл. 4). Із наведених афінних сорбентів

оптимальний результат отримано на Діасорб-Активному пурпуровому 4ЖТ (питома активність FVIII $21,06 \pm 0,96$ МО/мг білка).

Таблиця 4

**Хроматографічне очищення фактора VIII
зсідання крові ($M \pm m$, $n=5$)**

Зразок	Питома активність, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Сумарна активність, МО	Ступінь очищення, рази	Вихід FVIII, %
Кріопреципітат	0,87 \pm 0,02	125,00	1,00	100,00
DEAE-Sepharose, 0,3 М NaCl	81,70 \pm 0,60	95,00	93,91	76,00
Проскок з Діасорб-Procion Blue MXR	134,40 \pm 4,50	92,16	154,60	73,73
Проскок з Діасорб-Procion Blue HB	112,60 \pm 5,70	92,75	129,44	74,20
Проскок з Діасорб-Активний яскраво-голубий К	156,20 \pm 3,80	93,60	179,54	74,88
Проскок з Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	210,60 \pm 9,60	91,80	242,10	73,44
Проскок з Діасорб-Procion Gelb M4R	144,87 \pm 6,29	95,04	166,52	76,03

Отримання фактора VIII хроматографічними методами з додатковим використанням попередніх етапів фракціонування. За результатами попередніх досліджень отримано препарат фактора VIII поєднанням методів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії (табл. 5).

Таблиця 5

Активність FVIII на різних етапах одержання ($M \pm m$, $n=5$)

Зразок	Питома активність, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Сумарна активність, МО	Ступінь очищення, раз	Вихід FVIII, %
Кріопреципітат	0,72 \pm 0,02	147,00	1,00	100,00
Розчин після сорбції на Al(OH) ₃	0,81 \pm 0,01	134,40	1,12	91,43
Розчин Кріопреципітату після сорбції з ПЕГ-4000	0,91 \pm 0,01	113,40	1,26	77,14
DEAE-Sepharose, 0,3 М NaCl	172,40 \pm 2,70	111,80	239,44	76,05
Проскок з Діасорб-Procion Blue MXR	441,30 \pm 26,70	105,60	612,92	71,84
Проскок з Діасорб-Procion Blue HB	247,00 \pm 12,20	110,00	343,06	74,83
Проскок з Діасорб-Активний яскраво-голубий К	438,50 \pm 13,50	105,00	609,02	71,43
Проскок з Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	505,80 \pm 16,80	107,20	702,05	73,87
Проскок з Діасорб-Procion Gelb M4R	359,60 \pm 9,90	109,20	499,44	74,29

Завдяки проведенню попередніх етапів фракціонування, досягнуто вищого ступеня очищення FVIII (удвічі–втричі вище порівняно зі схемою без попереднього фракціонування). Отримані результати свідчать, що видалення нецільових білків (фактори ППСБ, фібриноген тощо), не заважають зв'язуванню FVIII з іонообмінником, що сприяє кращому очищенню досліджуваного білка. Втрати активності не відрізнялись від показників попереднього дослідження, а рівень питомої активності зріс практично вдвічі ($50,58 \pm 1,68$ порівняно з $21,06 \pm 0,96$ МО/мг білка).

Створення технологічної схеми одержання препарату FVIII.

Основними етапами одержання препарату є антивірусна обробка, кріопреципітація, осадження факторів ППСБ гідроксидом алюмінію (III), з ПЕГ-4000, іонообмінна хроматографія на DEAE-Sepharose FAST FLOW, негативна афінна хроматографія на барвник-кремнеземних сорбентах (рис. 3). Доведено, що проведення хімічної вірусної інактивації найкраще здійснювати перед кріопреципітацією плазми, оскільки при цьому значна кількість антивірусних чинників (до 90 %) залишається у супернатанті.



Рис. 3 Технологічна схема отримання FVIII із плазми крові

Оскільки відомо, що під час кріоосадження втрачається близько 30–40 % вихідної активності FVIII, виділення безпосередньо з плазми крові, оминаючи цей процес, забезпечує більший вихід продукту. У цьому випадку важливим є етап осадження білків ППСБ на барій-цитраті. При цьому методи хімічної вірусної інактивації та способи видалення вірус-інактивуючих речовин з розчину слід проводити перед етапом іонообмінної хроматографії, а видалення вірус-інактивуючих речовин досягається методами екстракції, гель-фільтрації.

Наявність нецільових білків на різних етапах одержання фактора VIII зсідання крові. На всіх етапах фракціонування та хроматографії у зразках визначали наявність тромбіну, FIX, фібриногену, vWF:R_{cof}. В отриманих зразках очищеного FVIII на останньому етапі хроматографічного очищення не виявили тромбіну, FIX та фібриногену – потенційно тромбогенних білків. Залишків вірус-інактивуючих речовин (три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80, тіоціанату амонію) не виявлено.

Слід зазначити, що крім активності FVIII на всіх етапах технологічного процесу в досліджуваних зразках виявляли ристоміцин-кофакторну активність фактора фон Віллебранда (vWF:R_{cof}). З'ясовано, що на етапі афінної хроматографії не відбуваються зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R_{cof}. Це є важливою перевагою цього методу у технології отримання очищеного препарату FVIII над методом іонообмінної хроматографії. Характеристика одержаного препарату FVIII із найвищим ступенем очищення наведена в табл. 6.

Таблиця 6

Характеристика отриманого концентрату FVIII зсідання крові (M±m, n=5)

Показники	Очищений FVIII
FVIII МО/мг білка	50,58±1,68
FVIII МО/мл	5,31±0,34
vWF:R _{cof} , МО/мл	3,07±0,18
FVIII/vWF:R _{cof}	1,73±0,21
Концентрація білка, мг/мл, x10 ⁻¹	1,06±0,04
Концентрація альбуміну, мг/мл, x10 ⁻¹	0,67±0,02
Фібриноген, мг/мл	не виявлено
Тромбін, НН/мл	не виявлено
FIX, МО/мг білка	не виявлено
Три(н-бутил)фосфат	не виявлено
Тритон X-100	не виявлено
Тіоціанат амонію	не виявлено
Твін-80	не виявлено
Вихід продукту, %	73,87
Ступінь очищення, рази	702,05
Стабільність при зберіганні у розчині (100 %): кімнатна температура +(4÷8) °C - (30) °C	до 6 год до 24 год до 3 місяців
Стабільність зберігання після ліофілізації (+(4÷8) °C)	до 2 років

Вплив зберігання очищеного препарату FVIII на його біоактивність. З'ясовано, що при кімнатній температурі активність FVIII у розчині знижується на 20 % через 6–8 год зберігання, на 40 % – через 24 год та на 90 % через 48 год. У замороженому стані активність фактора повністю зберігається упродовж місяця, через три місяці зберігання зменшується на 10 %, після року зберігання – на 20–25 %. Повторне заморожування–відтаювання призводило до втрати активності на 5–10 % після кожного наступного циклу. Ліофілізація препарату забезпечує збереження його активності протягом не менше двох років.

Визначення концентрації імуноглобулінів із використанням отриманого препарату фактора VIII. Продемонстровано придатність отриманого препарату для виявлення наявності імуноглобулінів у крові пацієнтів. Застосування неочищених препаратів (зокрема, Кріопреципітату) для кількісного визначення наявності імуноглобулінів за даною методикою малопродатне, оскільки значна частина домішок в препараті заважає проведенню тесту.

Отже, розроблений метод очищення FVIII зсідання крові на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками володіє низкою переваг над розповсюдженими методами іонообмінної хроматографії у технології отримання фактора VIII і може бути впроваджений в практику лабораторного та промислового виробництва, стати основою для розробки терапевтичного препарату, а також для наукових досліджень. Отриманий препарат може використовуватись і з діагностичною метою для виявлення анти-VIII антитіл.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення й експериментальне обґрунтування доцільності використання макропористих кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками у технології отримання FVIII зсідання крові. Досліджено основні властивості цих сорбентів, а також можливість їх використання для фракціонування плазми крові.

1. Синтезовано 16 біоспецифічних кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками (7 монохлор-, 7 дихлор-тріазинові та 2 вінілсульфонові барвники) й досліджено їх основні характеристики та переваги: жорсткість, висока сорбційна ємність, стійкість до дії різних полярних чинників, рН та високої іонної сили розчину, що зумовлено наявністю міцного ковалентного зв'язку між матрицею та лігандом.
2. Доведено, що всі досліджувані сорбенти зв'язують нецільові щодо фактора VIII білки (явище негативної сорбції); при цьому значний вплив на зв'язування мають величина рН та розмір пор матриці. Сорбція нецільових білків є найвищою при рН 7,4 та розмірі пор матриці 750 Å.
3. За результатами досліджень відібрано п'ять сорбентів, для яких характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний

- пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К.
4. Виявлено, що відібрані сорбенти не зв'язують фактор фон Віллебранда, внаслідок чого зберігається вихідний рівень співвідношення FVIII/vWF, що є вагомою перевагою запропонованого методу над методом іонообмінної хроматографії. Вихід продукту на етапі афінної хроматографії становить 96,34 %.
 5. Уперше розроблено схеми отримання очищеного вірус-безпечного препарату фактора VIII у поєднанні методів попереднього фракціонування білків, іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та афінної сорбції на пропонуваніх макропористих кремнеземних сорбентах із методами антивірусної обробки, при яких досягається максимальний ступінь очищення 700 разів.
 6. Показано, що вплив тіоціанату амонію, три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80 на активність FVIII зсідання крові є зворотним і при видаленні їх із реакційної суміші активність фактора VIII відновлюється.
 7. Продемонстровано, що існує тенденція до негативного кореляційного зв'язку середньої сили між концентрацією у розчині тіоціанату амонію та методами визначення активності фактора VIII – коагулологічним ($r=-0,77$) і з використанням хромогенного субстрату ($r=-0,73$). Між методами визначення зафіксовано тісний позитивний кореляційний зв'язок ($r=+0,98$, $P\leq 0,05$). При дослідженні впливу інших вірус-інактивуючих речовин на методи визначення активності фактора VIII констатовано, що між величиною їх концентрації та методами визначення існує тісний негативний кореляційний зв'язок ($r=-0,99$, $P\leq 0,05$). Між методами визначення виявлено тісний прямопропорційний зв'язок ($r=+0,99$, $P\leq 0,01$).
 8. Розроблено методи контролю вмісту хімічних вірусних інактиваторів, зокрема іонів тіоціанату амонію і тритону X-100, на різних етапах очищення та в кінцевому препараті.
 9. Отримано препарат фактора VIII з питомою активністю $50,58\pm 1,68$ МО/мг білка, співвідношенням FVIII/vWF:R_{cof} $1,73\pm 0,21$, з концентрацією альбуміну $0,07\pm 0,01$ мг/мл. Не виявлено залишків фібриногену, тромбіну, фактора IX; залишків вірус-інактивуючих речовин (три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80, тіоціанату амонію); стабільний (без втрати активності) при кімнатній температурі до 6 год, при $+(4\div 8)$ °C – 24 год, у замороженому стані (-30) °C до 3 місяців, після ліофілізації – не менше 2 років. Одержаний препарат фактора VIII придатний для виявлення анти-FVIII антитіл у плазмі крові пацієнтів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Даниш Т. В., Шурко Н. О., Вороняк М. І., Вус М. М. Альтернативні шляхи одержання препаратів фактора VIII згортання крові. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н, 2008. Т. II, вип. 34. С. 87–92.

(Здобувач брала участь у визначенні активності FVIII у субфракціях плазми крові та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).

2. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., **Шурко Н. О.** Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами – активними барвниками триазинового ряду. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2008. Вип. 47. С. 63–69. *(Здобувач провела літературний пошук, синтез сорбентів, підготувала статтю до друку).*
3. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Одноетапний спосіб очищення фактора VIII методом негативної афінної хроматографії з препарату «Кріопреципітат». *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. К.: Атіка-Н, 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 207–209. (Здобувач проаналізувала літературу, провела визначення активності FVIII, підготувала статтю до друку).*
4. Застосування сольвент-детергентного методу інактивації вірусів при одержанні препаратів з плазми крові / М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Л. В. Орлова, **Н. О. Шурко.** *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. К.: Атіка-Н, 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 166–170. (Здобувач провела фракціонування плазми крові, узаклинила отримані дані, підготувала статтю до друку).*
5. Дослідження впливу вірус-інактивуючих агентів на кількісний вміст та активність факторів згортання крові / **Н. О. Шурко**, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 365–369. (Здобувач виконала експериментальні дослідження впливу вірус-інактивуючих речовин на активність FVIII, підготувала статтю до друку).*
6. Використання синергічного ефекту вірус-інактивуючих 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, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 312–316. (Здобувач провела літературний пошук, підготовлено статтю до друку).*
7. **Шурко Н. О.** Фракціонування плазми крові: класичні та хроматографічні методи отримання фактора VIII згортання крові. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2016. Вип.73. С. 347–351.
8. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Дослідження зв'язування фактора VIII зсідання крові з кремнеземними сорбентами різної пористості. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 23–28. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала статтю до друку).*
9. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Фактор VIII зсідання крові: будова молекули та застосування. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 184–192. *(Здобувач брала участь у пошуку та аналізі літературних джерел, підготувала статтю до друку).*
10. **Шурко Н. О.** Новий метод отримання комплексу факторів VIII-фон Віллебранда. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. К.: МПБП «Гордон». 2017. Вип. 39. С. 229–236.*

Статті у фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних

11. **Шурко Н. О.**, Вороняк М. І., Даниш Т. В. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання. *Біологічні студії*. 2014. Т. 8, № 1. С. 197–204. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).
12. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах. *Біологія тварин*. 2016. Т. 18, № 2. С. 152–159. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).
13. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Вороняк М. І. Застосування барвник-лігандної хроматографії для очищення фактора VIII зсідання крові. *Біологічні студії*. 2017. Т.11, № 1. С. 67–74. (Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з синтезованими сорбентами, брала участь в аналізі результатів, підготувала статтю до друку).

Статті в інших журналах України

14. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Негативна афінна хроматографія як спосіб отримання фактора VIII з плазми крові людини. *Медичний форум*. 2015. 4 (04). С. 95–97. (Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з відібраними сорбентами, провела аналіз результатів, підготувала статтю до друку).
15. Терапевтичні препарати факторів зсідання крові в Україні / О. Й. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 51–56. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).
16. Сучасні тенденції у фракціонуванні плазми крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак, Ю. В. Войціцький, Л. Є. Лаповець. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 140–144. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).

Патенти на винахід та корисні моделі

17. Патент України на винахід № 94299 Спосіб очищення фактора VIII / **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – від 26.04.2011 р., Бюлетень № 8. (Здобувач дослідила сорбцію FVIII зі сорбентами, брала участь в оформленні патенту на винахід).
18. Патент України на корисну модель 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.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – № u201512302; заявл. 11.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11. (Здобувач брала участь у розробці технологічної схеми одержання FVIII, в оформленні патенту на корисну модель).

Інформаційний лист

19. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак., М. І. Вороняк, М. М. Вус, С. Є. Мадич, Н. А. Дульцева, Л. В. Орлова. *Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я*. К.: «Укрмедпатентінформ». 2010. №2.

(Здобувач дослідила можливість впровадження додаткового етапу очищення препарату «Кріопреципітат», підготувала матеріали до друку).

Тези наукових доповідей

20. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Одержання фактора VIII згортання крові – основні тенденції / *Укр. хім. журн.* 2008. № 1-2. (Здобувач провела літературний пошук, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
21. **Shurko N.**, Danysh T. Presence of factor VIII in blood Cohn fractions and his purification. *Vox Sanguinis.* 2008. Vol. 95, Suppl. 1. P. 237. (Здобувач провела дослідження активності FVIII на різних етапах фракціонування плазми, підготувала тези до друку).
22. Застосування діасорбу амінопропілового для одержання високоочищених білкових препаратів з плазми крові / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова, С. С. Мадич. *Тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я».* (м. Луганськ, 26–27 берез. 2009 р.). С. 24–25. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
23. **Shurko N.**, Danysh T. A rapid purification of coagulation factor VIII from a cryoprecipitate. *Clin Chem Lab Med.* 2009. Vol. 47. P. 227–228. (Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).
24. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Створення технології виділення та очищення фактора VIII згортання крові з використанням біоімітуючих кремнеземних сорбентів. *Матеріали ювілейної наук.-практ. конф. «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини».* (м. Львів, 27–28 трав. 2010 р.). С. 187–188. (Здобувач узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
25. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Вірусна безпека препаратів фактора згортання крові VIII. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченої 80-річчю служби крові Криму.* (АР Крим, м. Алушта, 23–24 трав. 2013 р.). С. 59–60. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези).
26. **Shurko N. O.**, Danysh T. V. The purification of factor VIII by the method of negative affinity chromatography. *Book Abstract Bari International Conference.* 2014. P. 34. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стендову доповідь).
27. **Shurko N. O.**, Danysh T. V. Negative affinity chromatography as the method purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med.* 2014. Vol. 52. P. 914. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
28. **Шурко Н. О.**, Орлова Л. В., Даниш Т. В. Вірусна безпека антигемофільних препаратів. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Нове у медицині сучасного світу».* (м. Львів, 28–29 листоп. 2014 р.). С. 110–113. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
29. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Корецька Н. Р. Фракціонування плазми крові: основні тенденції. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення».* (м. Київ, 7–8 листоп. 2014 р.). С. 86–88. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).

30. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Розробка методики визначення концентрації тіоціанату амонію у біологічних рідинах. *Тези доп. IV міжнар. мед. конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України».* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 15–17 квіт. 2015 р.). С. 75. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
31. **Шурко Н. О.** Методи отримання плазмових препаратів фактора VIII. *Тези доп. X Ювілейної південноукр. наук.-практ. конф. «Вища школа в рішенні проблем внутрішньої медицини», присвяченої 115-річчю Одеськ. нац. мед. ун-ту.* (м. Одеса, 9 квіт. 2015 р.). С. 140–141.
32. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Афінна хроматографія фактора VIII зсідання крові з використанням тріазинових барвників в якості лігандів. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 21 квіт. 2016 р.). С. 179. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
33. **Шурко Н. О.**, Дульцева Н. А., Даниш Т. В. Застосування вірусних інактиваторів в процесі технології одержання факторів згортання крові та фібринолізу. *Зб. тез наук. праць «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках».* (м. Київ, 2015 р.). С. 96–99. (Здобувач досліджувала вплив вірус-інактивуючих речовин на активність факторів зсідання крові, підготувала тези до друку).
34. Новак В. Л., **Шурко Н. О.**, Миськів І. М. Скринінг донорської крові та її компонентів як основа вірусної безпеки трансфузійної медицини. *Тези доп. III міжнар. конгресу з інфузійної терапії.* (м. Київ, 6–7 жовт. 2016 р.). С. 124–125. (Здобувач провела аналіз результатів поширення вірусних захворювань серед населення України, підготувала тези до друку).
35. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Технологія очищення фактора VIII згортання крові. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 21 квіт. 2016 р.). С. 179. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
36. **Shurko N.**, Danysh T., Danysh O. Effect of thiocyanate on the activity of blood coagulation factor VIII. *Haematologica. Abstract book.* 2016. Vol. 101 (s1). P. 878. (Здобувач дослідила вплив тіоціанату-амонію на активність FVIII, підготувала тези до друку).
37. **Shurko N.**, Danysh T. The method of purification blood coagulation factor VIII. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2016. Vol. 38 (S2). P. 97–98. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
38. **Shurko N.**, Novak V., Danysh T., Voytsitskyu J. La cromatografia di affinità con treazine-colorante come il metodo purificazione del fattore VIII. *Blood Transfusion.* 2017. 15, Suppl. № 1. P. 75–76. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стенодову доповідь).

39. **Shurko N., Danysh T., Novak V.** Affinity chromatography with dye – new method for the purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med.* 55. Special Suppl, June. 2017. P. 731. (Здобувач провела афінну хроматографію, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
40. **Shurko N., Danysh T., Novak V.** The new method of purification factor coagulation VIII. *Haematologica. Abstract book.* 2017. Vol. 102 (s1). P. 881–882. (Здобувач розробила технологічну схему очищення FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
41. **Shurko N., Danysh T.** Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation. *International Journal of laboratory Hematology.* 2017. Vol. 39 (Issue S2). P. 109. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
42. **Shurko N., Novak V., Danysh T.** The basis of viral safety of transfusion medicine: screening of donor blood and methods of virus inactivation. *20th Annual Meeting of the ESCV. (Lago Maggiore, Italy, 13–16 September, 2017). Abstract book.* 2017. P. 177. (Здобувач провела дослідження використання різних вірус-інактивуючих речовин, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
43. **Shurko N., Danysh T., Voroniak M., Novak V.** The advantages of using PEG-precipitation in the isolation and purification of factor coagulation VIII. *Blood Transfusion.* 2017. Vol. 15. Suppl. № 3. P. 492. (Здобувач провела дослідження впливу ПЕГ-4000 у схемі одержання FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).

АНОТАЦІЯ

Шурко Н. О. Одержання високоактивного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням афінної хроматографії на барвник-кремнеземних носіях. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

Дисертація присвячена створенню нового методу отримання очищеного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням макропористих кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками; синтезу та дослідженню властивостей макропористих кремнеземних сорбентів з іммобілізованими активними барвниками, придатних для очищення фактора VIII зсідання крові; використанню різних хімічних речовин для інактивації вірусів у процесі очищення; розробці схеми отримання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора та вивченню його біохімічних властивостей.

У результаті досліджень продемонстровано, що процес очищення фактора VIII відбувається завдяки процесу негативної афінної сорбції. Виявлено, що поєднання етапів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії забезпечує ступінь очищення в межах 239–700 разів, залежно від типу обраного сорбенту.

Ключові слова: кремнеземні макропористі сорбенти, активні барвники, плазма крові, фактор VIII, фактор фон Віллебранда, хроматографія, фракціонування.

АННОТАЦІЯ

Шурко Н. О. Получение высокоактивного препарата фактора VIII свертывания крови с применением аффинной хроматографии на краситель-кремнеземных носителях. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2018.

Диссертация посвящена разработке нового метода получения очищенного препарата фактора VIII свертывания крови с применением макропористых кремнеземных сорбентов с иммобилизованными активными красителями; синтезу та исследованию свойств макропористых кремнеземных сорбентов с активными красителями в качестве лигандов, пригодных для очистки фактора VIII свертывания крови; использованию различных химических веществ в роли вирус-инактивирующих агентов в процессе очистки; разработке схемы получения высокоактивного вирус-безопасного препарата фактора VIII и изучению его биохимических свойств.

Исследованиями установлено, что процесс очистки фактора VIII происходит благодаря явлению негативной аффинной сорбции. Среди исследуемых сорбентов выделена группа, для которой характерно наилучшее связывание нецелевых белков: Диасорб-Активный пурпурный 4ЖТ, Диасорб-Procion Gelb M4R, Диасорб-Procion Blue HB, Диасорб-Procion Blue MXR и Диасорб-Активный ярко-голубой К. Обнаружено, что на сорбцию белков влияет pH раствора и размер пор матрицы. Высшая степень очистки достигается при pH 7,4 и размере пор 750 Å.

Выявлено, что фактор фон Виллебранда также не сорбируется исследуемыми сорбентами, что обеспечивает сохранение исходного соотношения FVIII/vWF:Rcof в препарате (исходное соотношение составляло 0,63, а при нанесении было в пределах 0,53–0,73, в зависимости от сорбента). Это является одним из важных преимуществ предлагаемого процесса очистки фактора VIII по сравнению с методами ионообменной хроматографии.

В эксперименте установлено, что данной группой сорбентов связываются альбумин, факторы протромбинового комплекса и фибриноген.

Проведено исследование влияния методов предварительного фракционирования в сочетании с методом негативной аффинной сорбции для создания схемы получения высокоочищенного препарата фактора VIII из плазмы крови. Установлено, что предварительное фракционирование барий цитратом, алюминий гидроксидом (III) и ПЭГ-4000 обеспечивает удаление факторов протромбинового комплексе, фибриногена, фибронектина, липопротеидов, денатурированных белков, альбумина. На этом этапе

достигли стократной очистки препарата фактора VIII (от $0,017 \pm 0,001$ до $1,88 \pm 0,11$ МЕ /мг белка для сорбента Диасорб-Активный пурпурный 4ЖТ).

Показано, что применение ионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose и аффинной хроматографии с отобранными сорбентами обеспечивает получение фактора VIII с криопреципитата со степенью очистки от 129 до 242 раз и сохранением в 73–76 % от исходной прокоагулянтной активности. Основные потери от исходной активности фактора VIII и фон Виллебранда (до 27%) происходили на этапе ионообменной хроматографии. Поскольку, очистки фактора VIII осуществляется благодаря явлению негативной аффинной хроматографии, это обеспечивало практически стопроцентный (96,34 %) выход продукта и является еще одним преимуществом данного метода в технологии получения препарата.

Обнаружено, что сочетание этапов предварительного фракционирования, ионообменной и аффинной хроматографии обеспечивает степень очистки в пределах 239–700 раз, в зависимости от типа выбранного сорбента.

Предложенным методом получен препарат фактора VIII с удельной активностью $50,58 \pm 1,68$ МЕ/мг белка, соотношением фактора VIII/фон Виллебранда 1,73, который по электрофоретическим характеристикам близок к известным коммерческим препаратам.

Полученный препарат может использоваться для лабораторной диагностики (например, исследование иммуноглобулинов к фактору VIII, как стандартный образец), стать основой для разработки терапевтического препарата, а также для научных исследований.

Ключевые слова: кремнеземные макропористые сорбенты, активные красители, плазма крови, фактор VIII, фактор фон Виллебранда, хроматография, фракционирование.

ANNOTATION

Shurko N. O. Preparation of highly active concentrate of blood coagulation factor VIII with the use of affinity chromatography on dye-silica carriers. – Manuscript.

Thesis for a degree of candidate of biological sciences in the specialty 03.00.04 – biochemistry. – Institute the Animal Biology NAAS, Lviv, 2018.

The dissertation is devoted to creation of a new method to obtain purified preparation of the blood coagulation factor VIII using macropore silica matrix with active dyes as ligands, to synthesis and investigation of properties of a dye-ligand macropore silica suitable for purification of the coagulation factor VIII, to use of various chemicals virus-inactivating agents in the process of purification and to development of a scheme for obtaining a highly active virus-safety preparation of the factor VIII and studying its biochemical properties.

Research results demonstrated that the process of purification of the factor VIII is due to the process of the negative affinity adsorption. It has been found that the combination of pre-fractionation, ion-exchange and affinity chromatography

stages provides a purification rate of 239–700 times, depending on the type of selected sorbents.

Key words: silica macropore sorbents, active dyes, plasma of blood, factor VIII, von Willebrand's factor, chromatography, fractionation.

Підписано до друку 5.04.2018 р. Формат 60×90 1/16.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний.
Обл.-вид. арк. 0,9. Друк на різнографі.
Наклад 100 прим. Зам. № 2376.

Друк: ТзОВ «Компанія „Манускрипт“»
вул. Руська, 16/3, м. Львів, 79008,
тел./факс: (032) 235-52-20, 235-51-40