

ВПЛИВ ФОТОДИНАМІЧНОГО МЕТОДУ ВІРУСІНАКТИВАЦІЇ ПЛАЗМИ КРОВІ ДОНОРІВ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

А.С. Тимченко, С.Ю. Сергутіна

Державна установа «Інститут гематології та трансфузіології АМН України», Київ

Резюме. У статті наведені дані щодо впливу різних режимів вірусінактивації плазми крові донорів із застосуванням фотосенсибілізатора метиленового синього й опромінення ультрафіолетовим та видимим світлом на показники системи гемостазу.

Ключові слова: плазма крові донорів, вірусінактивація, система гемостазу, фотосенсибілізатор, ультрафіолетове опромінення, видиме світло.

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО МЕТОДА ВИРУСНАКТИВАЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДОНОРОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

А.С. Тимченко, С.Ю. Сергутіна

Резюме. В статье приведены данные о влиянии различных режимов вирусинактивации плазмы крови доноров с применением фотосенсибилизатора метиленового синего и облучения ультрафиолетовым и видимым светом на показатели системы гемостаза.

Ключевые слова: плазма крови доноров, вирусинактивация, система гемостаза, фотосенсибилизатор, ультрафиолетовое облучение, видимый свет.

INFLUENCE OF PHOTODYNAMIC METHOD OF VIRUS INACTIVATION OF DONOR BLOOD PLASMA UPON INDICATORS OF SYSTEM OF HAEMOSTASIS

A.S. Timchenko, S.Yu. Sergutina

Summary. The data about to influence of different regimes of the virus inactivation of donor blood plasma with used of photosensitizer methylene blue and ultraviolet irradiation and visible light irradiation upon the indicators of system of haemostasis are given in the article.

Key words: donor blood plasma, virus inactivation, system of haemostasis, photosensitizer, ultraviolet irradiation, visible light.

ВСТУП

Проблема вірусної безпеки плазми крові донорів та виготовлених із неї біопрепаратів є гостроактуальною проблемою виробничої трансфузіології у всьому світі. Тому пошук нових ефективних методів знезараження плазми крові має велике соціальне і медичне значення. Одним із найбільш ефективних і недорогих методів вірусінактивації плазми, що використовується європейськими трансфузіологами при виготовленні препаратів із плазми крові, є фотодинамічне її знезараження з використанням фотосенсибілізаторів і опромінення променями певної довжини хвилі світлового спектра [1].

В ДУ "Інститут гематології та трансфузіології АМН України" протягом останніх 8 років були проведені дослідження з вивчення ефективності фотодинамічного метода знезараження гемотрансмисивних вірусів (віруси гепатитів В і С) у плазмі крові донорів для визначення найбільш ефективних режимів їх інактивації. Проведеними попередніми дослідженнями показана висока ефективність цього методу вірусінактивації і можливість його застосування у виробничій трансфузіології служби крові України для знезараження плазми крові донорів, але вплив факторів фотодинамічної вірусінактивації на лабільні білки плазми крові нами був не з'ясований.

Метою дослідження було вивчити вплив фотодинамічної вірусінактивації на лабільні білки

плазми крові (показники системи гемостазу), яка вибирається в Центрах крові України.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У досліджах використовували зразки свіжозамороженої донорської плазми (СЗП), яка отримана з Київського міського Центру крові. Ця плазма згідно «Закону України про донорство крові та її компонентів» № 239/95-ВР від 23.06.1995 була попередньо протестована на антитіла до ВІЛ 1 і 2 типів, вірусного гепатиту С (анти-HCV), поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg). Для дослідження були взяті зразки інфікованої вірусами гепатитів В і С плазми донорської крові.

В якості фотосенсибілізатора (ФС) використовували фенолізиновий барвник метиленовий синій (МС) із молекулярною масою 374 а.о.м. («Merck», Німеччина). УФ-опромінення біопроб плазми донорської крові проводили на експериментальній моделі «Пристрою для знезаражування рідини», яка захищена деклараційним патентом України № 7835 (від 15.07.2005 р.) [2]. Даний пристрій, на відміну від аналогів, дозволяє використовувати дозоване УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм.

Дозу опромінення, яке застосовувалось для фотодинамічної обробки зразків донорської плазми, розраховували за формулою:

$$H = E_{\text{повн}} \times t_{\text{опр}},$$

де H — доза опромінення біопроб, Дж;

$E_{\text{повн}}$ — повна енергетична освітленість, Вт;

$t_{\text{опр}}$ — час опромінення, с.

Контроль дози опромінення проводили напівпровідниковим детектором (кремнієвим фотодіодом) КВАНТ-1 (Україна). УФ-опромінення ($\lambda=254$ нм) та опромінення видимим світлом ($\lambda=640$ нм) зразків контамінованої плазми проводили в дозах 75, 90 і 120 Дж. Підбір доз опромінення проводили при фіксованому об'ємі плазми крові.

Показники системи гемостазу досліджували загальноприйнятими методами [3, 4]. І фазу коагуляційного гемостазу оцінювали за величиною протромбінового часу (ПЧ, за Quick) із підрахунком протромбінового індексу (ПІ). Оцінку внутрішнього й зовнішнього шляхів згортання проводили визначенням активованого часткового (парціального) тромбoplastинового часу (АЧТЧ) і факторів згортання VIII, IX і XI. Кінцевий етап згортання — утворення фібрину, — досліджували за тромбіновим часом (ТЧ, за Biggs і Macfarlane) із підрахунком тромбінового індексу (ТІ) та кількісним визначенням вмісту фібриногену (за Р.А. Рутберг). Фібринолітичну активність плазми крові визначали за часом еуглобулінового лізису згортка (за Kowarzik і Buluck). Схильність плазми крові до гіпер- або гіпокоагуляції досліджували за допомогою визначення часу рекальцифікації (ЧР) плазми (за Н. Bergerhof і L. Roka) та тромботесту (за Фуєте-Іта в модифікації М.А. Котовщикової) [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було проведено 7 серій дослідів із вивчення ефективності різних режимів фотодинамічного знезараження інфікованої вірусами гепатитів В і С донорської плазми. Для цього зразки СЗП, що розтанули при температурі 37 °С, центрифугували при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 20 хв. В асептичних умовах проводили попередню обробку фотосенсибілізатором МС наступним чином: при кімнатній температурі без доступу видимого світла в інфіковану донорську плазму додавали розчин МС, доводили до кінцевої концентрації 10 мкмоль/л і витримували протягом однієї години (ефективність такого режиму застосування МС був установлений нами в попередніх дослідженнях [5, 6]). Після чого плазма розділялась на частини й піддавалась різним режимам обробки.

Для подальших досліджень були відібрані наступні проби плазми:

1. Вихідна свіжозаморожена донорська плазма, яка була попередньо розморожена при температурі 37 °С та відцентрифугована при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 20 хв.

2. Донорська плазма п.1, до якої був доданий ФС МС і доведений до кінцевої концентрації 10 мкмоль/л.

3. Донорська плазма п.2, яка містила ФС МС у вищезазначеній концентрації та була витримана без доступу світла впродовж однієї години.

4–6. Плазма п.3, опромінена УФ-світлом в дозах 75–120 Дж через одну годину після додавання ФС МС.

7–9. Плазма п.3, яка була опромінена видимим світлом в дозах 75–120 Дж через одну годину після додавання ФС МС.

10–11. Плазма п.3, яка була опромінена УФ- і видимим світлом в дозах 90 і 120 Дж через одну годину після додавання ФС МС.

Результати дослідження впливу фізико-хімічних факторів фотодинамічного знезараження вірусів у плазмі крові донорів (ФС МС й опромінення УФ-променями й видимим світлом) на показники системи гемостазу представлені в таблиці

Як видно з отриманих даних, середні показники часу рекальцифікації, тромботесту й вмісту фібриногену у всіх дослідних групах статистично не відрізнялись від вихідних даних. Але, слід зазначити, що ці показники в зразках вихідної плазми були нижчими за загальноприйняті норми [3, 4]. Це свідчить про зменшення прокоагулянтної активності дослідної донорської плазми.

Результати дослідження протромбінового індексу та тромбінового індексу свідчать про вірогідне зниження цих показників у дослідних групах під дією як ФС МС окремо, так і при комбінованому застосуванні фотосенсибілізатора й опромінення УФ-променями й видимим світлом. Проте, середні значення ПІ і ТІ не виходили за межі загальноприйнятої норми. Так, при комбінованому опроміненні в максимальній дозі (120 Дж) фотосенсибілізованої донорської плазми показники ПІ й ТІ склали $95,32 \pm 1,27$ і $92,63 \pm 1,41\%$ відповідно.

При дослідженні факторів згортання (фактори VIII, IX, XI) найбільший вплив вірусінактивуючих агентів спостерігався на ф. VIII. Причому, при однаковому дозовому навантаженні дія видимого світла була більш впливовою, ніж УФО (див. табл.). Максимально активність ф. VIII знижувалась (на 9,0% від показника у вихідній плазмі) при сумісній дії УФО й видимого світла в дозі 120 Дж. Така тенденція спостерігалась і при дослідженні ф. IX. Тоді як активність ф. XI майже не змінювалась при різних режимах обробки інфікованої плазми.

Визначення рівня активованого часткового тромбoplastинового часу не виявило статистично достовірних розбіжностей у жодній дослідній групі в порівнянні з вихідною плазмою, але спостерігалась тенденція до збільшення цього показника.

Оцінку фібринолітичної активності плазми крові проводили за допомогою визначення часу еуглобулінового лізису згортка. Дослідження цього показника показала достовірну відсутність будь-яких змін у всіх групах спостереження, що свідчить про відсутність впливу фізико-хімічного методу вірусінактивації у використаних режимах на дану ланку системи гемостазу.

За даними закордонних дослідників [7, 8], при проведенні вірусінактивації плазми крові, яка була попередньо оброблена МС у концентрації 1 мкмоль/л і опромінена видимим світлом впро-

Таблиця

Вплив фотосенсибілізатора і опромінення на показники системи гемостазу, М±m

Показник	Вихідна плазма	Плазма + MC	Плазма + MC (через 1 год)	Плазма + MC + УФО			Плазма + MC + видиме світло			Плазма + MC + УФО + видиме світло	
				75 Дж	90 Дж	120 Дж	75 Дж	90 Дж	120 Дж	90 Дж	120 Дж
ПІ, %	100,00	98,00±0,52*	98,00±0,73*	96,25±1,31*	96,83±1,05*	97,17±0,75*	96,25±1,44*	96,50±0,96*	96,83±1,22*	95,84±1,33*	95,32±1,27*
ТІ, %	100,00	97,17±1,22*	96,50±1,06*	97,00±0,41*	94,50±1,82*	95,00±1,44*	95,50±0,87*	93,33±1,02*	93,00±1,21*	92,84±1,53*	92,63±1,41*
Фібриноген, г/л	1,75±1,08	1,71±0,10	1,71±0,10	1,75±0,10	1,64±0,09	1,64±0,09	1,75±0,10	1,71±0,09	1,71±0,09	1,75±0,14	1,71±0,15
Тромботест, ступінь	3,43±0,30	3,36±0,30	3,29±0,31	3,38±0,55	3,21±0,32	3,21±0,32	3,38±0,43	3,29±0,33	3,29±0,33	3,33±0,17	3,33±0,17
ЧР, с	162,14±14,05	164,29±14,20	166,14±14,97	171,75±20,77	167,43±14,56	165,71±14,74	166,75±21,38	166,57±14,92	164,57±14,10	154,00±19,73	159,33±24,13
Еуглобуліновий лізис згортка, хв	215,71±7,83	215,71±7,83	215,71±7,83	220,00±7,07	215,71±7,83	215,71±7,83	220,00±7,07	215,71±7,83	215,71±7,83	210,00±17,32	210,00±17,32
АЧТЧ, с	34,93±1,76	35,87±1,71	36,57±1,90	34,25±1,03	36,61±1,82	36,87±1,71	34,25±1,03	37,07±1,72	37,47±1,68	40,47±2,90	40,80±2,65
ф. VIII, %	100,00	97,71±0,71*	95,57±1,11*	96,75±1,11*	94,00±1,72*	93,71±1,71*	95,00±2,04*	92,57±1,52*	92,14±1,50*	91,17±3,84*	91,00±3,96*
ф. IX, %	100,00	99,00±0,38	97,71±0,56*	98,50±0,65	96,57±1,07*	96,29±1,15*	98,25±0,85	95,14±1,30*	95,00±1,29*	92,00±1,15*	91,33±1,33*
ф. XI, %	100,00	99,75±0,25	99,75±0,25	99,75±0,25	99,50±0,50	99,75±0,25	99,75±0,25	99,75±0,25	99,00±0,41	н/п	н/п

Примітки: * — достовірність показників між вихідною плазмою та дослідними зразками плазми $p < 0,05$. н/п — дослідження не проводилось.

довж однієї години, було виявлено, що рівні загального білка, альбуміну, трансферину, гаптоглобіну, α_1 -антитрипсину, імуноглобулінів і факторів комплементу не відрізнялись від їх значень в інтактних зразках розмороженої СЗП. Тоді як рівні факторів V і VIII, за даними T. Zeiler і співавторів, зменшувались майже до нижньої межі норми, але ці зміни показників були пов'язані не тільки з дією фотодинамічних факторів, але й із процесом зберігання і розморожки [7].

За даними X.P. Zhou і співавторів [9], значення ф. VIII, ПЧ і АЧТЧ знижувались не достовірно, тоді як інші досліджені показники (фактори V, XI,

фібриноген) системи гемостазу зовсім не змінювались.

Таким чином, проведеними дослідженнями виявлено несуттєві зміни показників плазматичного ланцюга гемостазу при проведенні дозованої фотодинамічної вірусінактиваци плазми крові донорів із застосуванням фотосенсибілізатора метиленового синього та опромінення ультрафіолетовими променями і видимим світлом.

ЛІТЕРАТУРА

(в редакції)