



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98386** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 12231**
(22) Дата подання заявки: **13.11.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **27.04.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.04.2015, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
Малигон Олена Іванівна (UA)
(73) Власник(и):
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)
(74) Представник:
Євтушенко Тамара Григорівна

(54) СПОСІБ ЗАГОТІВЛІ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ СВІЖОЗАМОРОЖЕНОЇ ПЛАЗМИ, ОДЕРЖАНОЇ МЕТОДОМ АВТОМАТИЗОВАНОГО ПЛАЗМАФЕРЕЗУ

(57) Реферат:

Спосіб заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу включає вилучення плазми з кров'яного русла донора, лейкофільтрацію та заморожування. Окремі одиниці крові розділяють фракціонуванням з відцентровою силою 2150 g, часом центрифугування 20 хвилин, при температурі (20-24) °С. Активність Ф. VIII і Ф. IX у плазмі зберігають використовуючи лейкоцитарні фільтри протягом 2-х годин від моменту ексфузії та проводячи її охолодження протягом 4-х годин від моменту ексфузії зі швидкістю охолодження більшою за 3 °С за хвилину. Зберігають плазму при температурі мінус 20 °С - протягом 6 місяців, при мінус 40 °С та мінус 70 °С - більше 24 місяців.

UA 98386 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до гематології та трансфузіології, і може бути використаною для заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу.

Адекватність трансфузійної терапії залежить від повноцінності свіжозамороженої плазми (СЗП), що вимагає впровадження комплексу заходів зі стандартизації та формування вимог до якості компонента. Особливого значення це набуває в умовах збільшення кількості високотехнологічних оперативних втручань з використанням трансфузій СЗП.

Питання заморожування донорської плазми є найбільш дискусійним. Не існує чітких визначень до верхньої температурної межі при зберіганні СЗП, допустимих термінів її придатності. Рекомендації щодо процедури охолодження, яка чинить найбільшу деградує дію на коагуляційні, антикоагуляційні фактори крові, імуноглобулінові комплекси, мають суттєві розбіжності, як у нормативній документації [Наказ МОЗ України №211 "Порядок контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів" від 08.06.2010 р.; Technical Manual, 17th edition (Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks) Hardcover- July 28, 2011; European Committee on Blood Transfusion, 2011], так і в даних літератури, присвяченій відповідній галузі [Голосова Т.В. Карантинизация - дополнительная гарантия вирусной безопасности плазмы и ее препаратов / Т.В. Голосова, И.К. Никитин // Гематология и трансфузиология. - 2004. - № 2. - С. 31-35; Hellstern P. Fresh-frozen plasma, pathogen-reduced single-donor plasma or bio-pharmaceutical plasma? / P. Hellstern // Transfus Apher Sci. - 2008. - Vol. 39 (1). - P. 69-74]. Теза про необхідність проведення охолодження плазми до мінус 30 °С за час, що не перебільшує 60 хвилин, не надає розуміння щодо температури, в яку слід поміщувати плазму в умовах виробництва; не враховує суттєвих відмінностей об'єму компонента, отриманого за різними методами заготівлі.

Заготівля та збереження СЗП, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу, включає наступні маніпуляції: вилучення з кров'яного русла донора, лейкофільтрація та заморожування тощо. Кожен з етапів обробки потребує контролю, адже може спричинити активацію, деградацію (денатурацію) або елімінацію ex vivo білкових комплексів, які становлять головну цінність СЗП [Барышев Б.А. Кровезаменители. Компоненты крови: справочник для врачей. - СПб.: изд-во Н - Л, 2010. - 204 с; Factor IX oligomerization underlies reduced activity upon disruption of physiological conditions / V.L. Simhadri, N. Hamasaki-Katagiri, S.C. Tseng et al. // Haemophilia. - 2014. - Vol. 20 (2). - P. 157-163].

Даний спосіб заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу, є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу корисної моделі поставлено задачу підвищення ефективності заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу.

Задачу, яку поставлено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу, що включає вилучення плазми з кров'яного русла донора, лейкофільтрацію та заморожування, згідно з корисною моделлю, окремі одиниці крові розділяють фракціонуванням з відцентровою силою 2150 g, часом центрифугування 20 хвилин при температурі (20-24)°С; активність Ф. VIII і Ф. IX у плазмі зберігають використовуючи лейкоцитарні фільтри протягом 2-х годин від моменту ексфузії та проводячи її охолодження протягом 4-х годин від моменту ексфузії зі швидкістю охолодження більшою за 3 °С за хвилину; зберігають плазму при температурі мінус 20 °С - протягом 6 місяців, при мінус 40 °С та мінус 70 °С - більше 24 місяців.

Технічний ефект корисної моделі, а саме підвищення ефективності заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу, обумовлений синергізмом сукупності дій та умовами їх виконання, які характеризують медичну технологію, що заявляється.

Спосіб виконують наступним чином: вилучають плазму з кров'яного русла донора методом автоматизованого плазмаферезу з наступною лейкофільтрацією та заморожуванням. Для розділення окремих одиниць крові використовують фракціонування за режимом, що характеризується відносною відцентровою силою 2150 g, часом центрифугування 20 хвилин, температурою (20-24)°С. Для збереження активності Ф. VIII і Ф. IX у плазмі використовують лейкоцитарні фільтри протягом 2-х годин від моменту ексфузії та проводять її охолодження протягом 4-х годин від моменту ексфузії зі швидкістю охолодження більшою за 3 °С за хвилину. Зберігають плазму при температурі мінус 20 °С - протягом 6 місяців, при мінус 40 °С та мінус 70 °С - більше 24 місяців.

Ефективність способу доведена експериментальними дослідженнями.

В дослідженні використана плазма від 140 донорів, серед них 97 (69,3 %) чоловіків та 43 (30,7 %) жінки. Вік донорів становив від 20 до 59 років. Серед донорів 77 (55 %) становили особи, що мешкають у місті.

Матеріалом дослідження була донорська плазма, одержана методом плазмаферезу та первинного фракціонування одиниць крові. Плазмаферез проводили на автоматизованій системі "Autopheresis-C" (Baxter Inc., США) з використанням гемоконсерванту ACD-A і сепарації крові через вмонтований мембранний фільтр. Фракціонування окремих одиниць крові здійснювали за двома режимами центрифугування: I режим ("традиційний") з відносною відцентровою силою 1250 g протягом 20 хвилин при температурі (4-6)°C; - II режим з видаленням тромболойкоцитарного шару - 2150 g протягом 20 хвилин при (20-24)°C, на рефрижераторних центрифугах MPW-400 (Польща).

В роботі були використані системи контейнерів з гемоконсервантами: 500/400 "Глюгцир" 100 мл (BAT "Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий "СИНТЕЗ", Росія); 450/400 CPDA-1 63 мл (Ravimed, Польща); 450/400/400/400 CPD 63 мл (Terumo, Японія). Видалення лейкоцитів проводили протягом 2-х годин від моменту ексфузії з використанням фільтрів "Leukotrap WB-Pall" (Pall Medical, Німеччина), призначених для консервованої крові (ФКК) та "Лейкосеп ПЛ" (ЗАТ НПП "Интер ОКО", Росія) - для виділеної плазми (ФПл).

Після від'єднання контейнера з виготовленою плазмою ваговим методом (ваги SW-2.SD, CAS Corp. Ltd, Республіка Корея) визначали об'єм вилученого компонента.

До контейнера з плазмою, отриманою від одного донора, приєднували трансферний контейнер, в який переводили 56 мл плазми, контейнери герметизували і від'єднували. Плазму розподіляли на 28 зразків (по 2 мл у пластикові пробірки) і проводили їх маркування. Один зразок досліджували на визначення показників якості нативної плазми: концентрації загального білка та білкових фракцій, активності Ф. VIII та Ф. IX, рН, концентрації залишкових еритроцитів, тромбоцитів та лейкоцитів. Інші 27 пробірок від кожного донора розміщували у низькотемпературних камерах. Зразки плазми заморожували в термін, який не перевищував 4 години від моменту ексфузії.

27 зразків розподіляли на групи (по 9 пробірок у кожній): перша група - заморожування та зберігання при температурі мінус 20 °C; друга група - заморожування та зберігання при температурі мінус 40 °C; третя група - заморожування та зберігання при температурі мінус 70 °C.

Заморожені зразки вилучали через 24 години та у подальшому з періодичністю один раз на три місяці для визначення активності Ф. VIII; один раз на шість місяців - для Ф. IX. Перед проведенням досліджень зразки розморожували на водяній бані при температурі 37 °C до видимого повного розморожування.

Забезпечення температурного режиму зберігання зразків СЗП здійснювали за допомогою низькотемпературних холодильників "Дніпро МТО" (Україна). Постійний, щоденний контроль температури у камерах рефрижераторів проводили за допомогою датчика D_s 1921 G-S 5 ("Delta T", Німеччина).

Зміну температури в охолоджуваній плазмі реєстрували диференційною мідь-константановою термопарою (діаметр провідників 0,15 мм), розташованою у геометричному центрі зразка об'ємом 2 мл (дослідні зразки СЗП у пробірках) та 240 мл (виробничі дози СЗП у контейнерах). При вимірюванні еталонний спай термопари розташовували при температурі 0 °C. Похибка вимірювання температури у діапазоні від 20 °C до мінус 40 °C складала не більше 0,35 °C.

Визначення залишкової кількості клітин проводили оптичним методом за допомогою світлового мікроскопа (об'єктив×10, окуляр×10) в лічильних камерах Фукса-Розенталя і Горяєва. Концентрацію загального білка визначали уніфікованим методом, що ґрунтується на вимірюванні спектра поглинального забарвлення продукту при довжині хвилі 540 нм, на спектрофотометрі PV1251C (ЗАТ "Спектроскопія, оптика і лазери - авангардні розробки", Білорусь). Визначення вмісту альбуміну та глобулінових фракцій проводили методом електрофорезу, на обладнанні УЭФ-01 ("Астра", м. Уфа) зі скануванням та комп'ютерною обробкою результатів. Активність Ф. VIII та Ф. IX визначали коагулометричним методом, на аналізаторі показників гемостазу "АПГ4-02П" (ЗАТ НПП "Техномедика", Росія) з використанням контрольних реактивів (НПО "Ренам", Росія). Рівень рН у СЗП визначали потенціометричним методом на рН-метрі Seven Easy (Mettler Toledo, Японія).

Аналіз даних проводили з використанням методів описової статистики. Для кількісних показників параметри статистики наведені як медіани та квартили (Me(Q1;Q3)). Відмінності між показниками незалежних груп оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні (p_u), між залежними групами - парного тесту Вілкоксона (p_v). Нульову гіпотезу відхиляли при

рівні статистичної значимості $p < 0,05$. Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програмного пакета "Statistica 10".

На основі проведеного експериментального дослідження та порівняльного аналізу отриманих результатів вперше визначена взаємодія комплексу сучасних виробничо-технологічних етапів заготівлі СЗП, параметрів її якості і функціональної повноцінності, встановлені ключові фактори виробничих методів заготівлі плазми та донорського забезпечення для формування терапевтично ефективних, імунобіологічно та інфекційно безпечних ресурсів СЗП.

Було встановлено, що активність факторів згортання Ф. VIII та Ф. IX у плазмі, заготовленій методом автоматизованого плазмоферезу, була більшою, ніж активність факторів згортання Ф. VIII та Ф. IX у плазмі, заготовленій за режимом II.

Не зареєстровано вплив гемоконсерванту на концентрацію загального білка, розподіл глобулінів, як на етапі вилучення плазми з одиниць крові, так і при її зберіганні у замороженому стані при температурах мінус 20 °С, мінус 40 °С та мінус 70 °С.

Відомо, що єдиним уніфікованим критерієм якості СЗП є вміст антигемофільного глобуліну А - фактора згортання VIII (Ф. VIII) не менше критичного значення 0,7 МО/мл.

Встановлено, що проведення лейкофільтрації у двогодинний термін від моменту ексфузії не змінює показники активності Ф. VIII та Ф. IX на фоні суттєвого зниження залишкових клітин, сприяє стабільному збереженню факторів згортання у СЗП при її тривалому низькотемпературному зберіганні, у порівнянні з нефільтрованими компонентами.

Дотримання технологічного процесу заморожування плазми зі швидкістю охолодження більшою за 3 °С за хвилину дозволяє зберігати (97-98) % коагуляційних властивостей СЗП від рівня Ф. VIII та Ф. IX до заморожування.

Температурні режими зберігання СЗП при мінус 40 °С та мінус 70 °С забезпечують умови для стабільного підтримання коагуляційних властивостей СЗП, визначених за активністю Ф. VIII та Ф. IX, протягом 24 місяців зберігання і довше.

Температурний режим мінус 20 °С може бути використаний для зберігання зразків СЗП, отриманих методом плазмоферезу та методом фракціонування консервованої донорської крові за режимом центрифугування з відносною відцентровою силою 2150 g протягом 20 хв. при температурі (20-24)°С, протягом обов'язкового 6-місячного терміну карантинізації.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб заготівлі та збереження свіжозамороженої плазми, одержаної методом автоматизованого плазмаферезу, що включає вилучення плазми з кров'яного русла донора, лейкофільтрацію та заморожування, який **відрізняється** тим, що окремі одиниці крові розділяють фракціонуванням з відцентровою силою 2150 g, часом центрифугування 20 хвилин, при температурі (20-24) °С; активність Ф. VIII і Ф. IX у плазмі зберігають використовуючи лейкоцитарні фільтри протягом 2-х годин від моменту ексфузії та проводячи її охолодження протягом 4-х годин від моменту ексфузії зі швидкістю охолодження більшою за 3 °С за хвилину; зберігають плазму при температурі мінус 20 °С - протягом 6 місяців, при мінус 40 °С та мінус 70 °С - більше 24 місяців.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601