



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85575

(13) U

(51) МПК

A61K 35/14 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 06373**

(22) Дата подання заявки: **23.05.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2013, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Орлова Олена Анатоліївна (UA),
Кондрашев Сергій Олександрович (UA),
Гусакова Віра Яковлевна (UA),
Лазарчук Оксана Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**Орлова Олена Анатоліївна,
кв. Дружби, 12, кв. 140, м. Луганськ, 91040
(UA),
Кондрашев Сергій Олександрович,
кв. Ватутіна, 75 кв. 4, м. Луганськ, 91034
(UA),
Гусакова Віра Яковлевна,
вул. Оборонна, 1-а, м. Луганськ, 91011 (UA),
Лазарчук Оксана Олександрівна,
кв. Героїв Брестської фортеці, 3, кв. 52, м.
Луганськ, 91033 (UA)**

(54) СПОСІБ КОНСЕРВАЦІЇ ТРОМБОКОНЦЕНТРАТУ

(57) Реферат:

Спосіб консервації тромбоконцентрату включає додавання до суспендуючого середовища до інкубату донорських тромбоцитів. Як суспендуюче середовище додають розчин модифікований амінокислотами.

UA 85575 U

Корисна модель належить до засобів заготівлі тромбоконцентрату з додаванням суспендуючого розчину, модифікованого амінокислотами та може знайти застосування в трансфузійній терапії при лікуванні різних захворювань.

Консервовані тромбоцити - необхідний елемент корекції тромбоцитопенії, в першу чергу, в онкологічній та гематологічній практиці. Завдяки можливості трансфузії донорських тромбоцитів проводиться пересадка кісткового мозку, агресивні види хіміо- та променевої терапії [2, 6]. Умови зберігання тромбоцитів повинні бути розраховані на збереження їх оптимальної життєдіяльності і функції протягом усього періоду зберігання [1, 3, 4]. Строк придатності тромбоцитів, які отримані із збагаченої тромбоцитами плазми у полімерних контейнерах та консервовані за рецептурою "СРДА-1" та "Глюгіцир", обмежений 24 годинами, а при умові постійного перемішування на автоматичних мішалках - 72 годинами. При цьому необхідно дотримуватися певного температурного режиму [5].

Додавання суспендуючого розчину модифікованого амінокислотами при заготівлі тромбоконцентрату має ряд переваг, а саме: подовжується термін збереження функціональної повноцінності клітин до 5-7 діб, що значно розширює умови застосування концентрату тромбоцитів не лише в обласному центрі, але й у віддалених районах. А за умови впровадження додавання суспендуючого розчину до тромбоконцентрату служба крові могла б забезпечити лікувальну мережу високоякісним та ефективним компонентом крові.

Задача корисної моделі полягає в удосконаленні консервації тромбоконцентрату.

Поставлена задача виконується наступним чином: розглянуто зміни в енергетичному стані, фосфоліпідному та вуглеводному обміні, агрегаційно-коагуляційній здатності плазменно-тромбоцитарної ланки консерванту тромбоцитів при зберіганні в суспендованому середовищі, модифікованого амінокислотами.

Досліджували суспензію тромбоцитів, виділену з венозної крові групи 0 (I) донорів-чоловіків віком 20-36 років. Суспензію готували в асептичних умовах з урахуванням мінімізації адгезії кров'яних пластинок: був виключений контакт останніх з лабораторним склом, використовували лабораторне обладнання з полімерних матеріалів.

Досліджувана група зразків 1 - тромбоконцентрат в 100 %-ній аутологічній плазмі з додаванням амінокислот, що входять до складу розчину для інфузій "Нефротект" (FRESENIUS KABI, Австрія (табл. 1). Останні були додані в інкубат з метою надання "будівельного матеріалу" для білкових компонентів розмножуються клітин, оскільки описані процеси реплікації тромбоцитів *in vitro* і включення амінокислот у контрактильні білки тромбоцитів.

Групами контролю слугували: група зразків 2 - тромбоконцентрат в 100 %-ній аутологічній плазмі, група 3 - тромбоконцентрат у зваженому розчині SSP+ з 20 % аутологічної плазми.

Тестування зразків, що зберігалися при температурі $+(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в настільному пристрої струшування платівок HELMER системи зберігання тромбоцитів PC 100 (HELMER LABS, USA and CANADA), здійснювалось протягом 5-ти діб з моменту заготівлі, щодня.

Концентрацію аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) та фосфоліпідний склад мембран тромбоцитів визначали методом тонкошарової хроматографії. Концентрацію малонового діальдегіду оцінювали за реакцією взаємодії тіобарбітурової кислоти з низькомолекулярними діальдегідами. Рівень лактату визначали з використанням діагностичного набору "Lactatemono" (AUDITDIAGNOSTICS, Ірландія), активність лактатдегідрогенази - з використанням діагностичного набору "ЛДГ" (Філісіт-діагностика, Україна). Для визначення рівня загального білка використовували набір реактивів "Загальний білок" (Філісіт-діагностика, Україна), концентрації сечової кислоти - з використанням діагностичного набору "Сечова кислота" (Філісіт-діагностика, Україна). Активність каталази визначали за реакцією перекису водню з молібдатом амонію.

Агрегаційну здатність тромбоцитів до колагену в кінцевій концентрації 2 мг/мл та до АДФ в концентрації 10 мкМ вивчали з використанням діагностичних наборів "Коллаген" и "АДФ" виробництва ООО "Технология-стандарт", Росія, за допомогою аналізатору агрегації тромбоцитів AP 2110.

Оскільки сумарний вміст АТФ, АДФ, АМФ (Σ АН) - це інтегральний показник енергетичного процесу консервованих тромбоцитів, то він може відображати стан функціональної рівноваги енергозалежних анаболічних і катаболічних реакцій, що протікають в клітині. Встановлено тенденцію до зниження сумарної кількості аденілових нуклеотидів на початку терміну спостереження. Достовірне зменшення Σ АН спостерігали в групі зразків 1 з 2-ої доби; в групах 2, 3 - з 3-ої доби (табл. 2). Додавання амінокислот до суспендованого середовища мало позитивний вплив на рівень Σ АН, який на всіх етапах спостереження був істотно вище в групі зразків 1, ніж у групах 2 і 3. Даний факт можна пояснити тим, що при амінокислотному обміні в

клітині збільшується кількість оксалоацетата, α -кетоглутарата і т.п., які поповнюють внутрішньоклітинний субстрат циклу трикарбонових кислот.

У позаклітинному компартменті тромбоконцентрату досліджували рівень сечової кислоти (СК) і неорганічного фосфору (Фн) як катаболітів аденілових нуклеотидів. Рівень СК в зразках безпосередньо після їх заготівлі достовірних відмінностей не мав. Більш низький виявився показник концентрації неорганічного фосфору (Фн) у зразку 3. Однак очікуваним було його підвищення в середовищі з SSP+, так як в ній є надлишок неорганічного фосфору порівняно з донорською плазмою. Можна припустити, що з моменту переміщення донорських тромбоцитів *ex vivo* → *in vitro* вже з першої доби неорганічний фосфор більш активно втягується в процес ресинтезу АТФ і АДФ в розчині SSP+, ніж в аутоплазмі.

У групах зразків 2 і 3 рівень МДА в інкубаті зростав на 3-ю добу, в той час як, у групі 1 - на 5-у добу, що свідчить про меншу швидкості наростання пероксидації ліпідів в мембрані клітин, популяція яких поміщена в суспендуюче середовище з амінокислотами (табл. 3).

В зразках груп 2 та 3 відмічена стійка тенденція до наростання активності лактатдегідрогенази; даний показник достовірно зростав на 5-у добу, а в інкубаті 1 групи не було виявлено достовірного збільшення активності даного ензиму, що може бути ознакою наявності більшої кількості функціонально повноцінних клітин в зразку з додаванням амінокислот.

Було встановлено мінімальне зниження активності каталази з 1-ої по 3-ю добу для зразка 1, в порівнянні з іншими групами зразків.

Альбумін як антиоксидант являє собою полідентантний хелатуючий ліганд. Встановлено зниження рівня загального білка на третю добу спостережень: в плазмі групи 1 - на 16,8 %; групи 2 - 17,2 %; групи 3 - на 20 %. В зразках 1-ої групи загальний білок витрачався менш інтенсивно. Не виключено, що амінокислоти склали конкуренцію білку донорської плазми в процесах синтезу білкових структур тромбоцитів.

В суспендованому середовищі з додатково введеними амінокислотами консервовані донорські тромбоцити здатні виконувати агрегаційну функцію в більш пізні терміни зберігання (табл. 4).

Доведено, що введення амінокислот до інкубуючого донорські тромбоцити середовища сприяє збереженню рівня аденілових нуклеотидів, фосфоліпідного складу, активності антиоксидантних ензимів, показників пероксидації ліпідів та агрегаційної функції кров'яних пластинок на більш пізніх термінах зберігання тромбоконцентрату.

Таким чином, заявлено спосіб консервації тромбоконцентрату з додаванням суспендуючого розчину модифікованого амінокислотами, як більш ефективного засобу для подовження терміну збереження функціональної повноцінності клітин до 5 діб.

Таблиця 1

Амінокислотний склад тромбоцитів зразку групи 1

амінокислоти	вміст в розчині "Нефротект", г/л	вміст у зразках групи 1, г/л
L-аланін	6,20	0,124
L-аргінін	8,20	0,164
L-цистеїн	0,40	0,008
L-валін	8,70	0,174
L-гістидін	9,80	0,196
Гліцин	5,305	0,106
Гліцил-L-тірозін	3,155	0,063
L-ізолейцин	5,80	0,116
L-лейцин	12,80	0,256
L-лізин	12,00	0,240
L-метіонін	2,00	0,040
L-пролін	3,00	0,060
L-серін	7,60	0,152
L-тірозін	0,60	0,012
L-треонін	8,20	0,164
L-триптофан	3,00	0,060
L-фенілаланін	3,50	0,070

Таблиця 2

Динаміка показників кількості аденілових нуклеотидів в процесі зберігання тромбоконцентрату

зра- зок	Показники	1-а доба	2-а доба	3-я доба	4-а доба	5-а доба
1	<u>Внутрішньоклітинний компартмент:</u>					
	АТФ, мкмоль/мл	5,314±0,072	5,104±0,039*↓	5,092±0,039*↓	4,976±0,038*↓	4,752±0,029*↓
	АДФ, мкмоль/мл	2,884±0,048	2,764±0,039*↓	2,654±0,034*↓	2,448±0,039*↓	2,208±0,028*↓
	АДФ, мкмоль/мл	1,474±0,013	1,420±0,014*↓	1,384±0,010*↓	1,332±0,020*↓	1,300±0,007*↓
	АМФ, мкмоль/мл	0,956±0,019	0,920±0,014	1,054±0,008*↑	1,204±0,008*↑	1,244±0,009*↑
2	<u>Внутрішньоклітинний компартмент:</u>					
	АТФ, мкмоль/мл	5,030±0,037	4,978±0,0325	4,820±0,042*↓	4,686±0,055*↓	4,460±0,038*↓
	АДФ, мкмоль/мл	2,786±0,039	2,724±0,033	2,580±0,039*↓	2,324±0,038*↓	2,082±0,034*↓
	АДФ, мкмоль/мл	1,368±0,011	1,354±0,007	1,296±0,008*↓	1,284±0,014*↓	1,254±0,007*↓
	АМФ, мкмоль/мл	0,876±0,014	0,900±0,018	0,944±0,016*↑	1,078±0,010*↑	1,124±0,008*↑
3	<u>Внутрішньоклітинний компартмент:</u>					
	АТФ, мкмоль/мл	5,014±0,012	4,948±0,027	4,856±0,046*↓	4,876±0,032*↓	4,428±0,042*↓
	АДФ, мкмоль/мл	2,800±0,035	2,784±0,027	2,600±0,041*↓	2,360±0,032*↓	2,182±0,033*↓
	АДФ, мкмоль/мл	1,280±0,014	1,224±0,020*↓	1,180±0,009*↓	1,196±0,009*↓	1,118±0,014*↓
	АМФ, мкмоль/мл	0,934±0,020	0,940±0,022	1,076±0,008*↑	1,184±0,009*↑	1,130±0,007*↑

Примітки: * - відмінності достовірні в порівнянні з показником перших діб спостереження, $p < 0,05$ (↓, зниження щодо вихідного показника; ↑ підвищення щодо вихідного показника).

Таблиця 3

Концентрація МДА у суспензії тромбоцитів на різних етапах спостереження, мкмоль/л

Доба спостереження	Номер зразку		
	1	2	3
1	0,963±0,101	1,139±0,065	0,958±0,081
2	1,043±0,100	1,319±0,095	1,112±0,090
3	1,107±0,094	1,500±0,101*	1,192±0,075*
4	1,123±0,075	1,546±0,103*	1,224±0,092*
5	1,240±0,072*	1,617±0,096*	1,378±0,120*

Примітка: * - відмінності достовірні в порівнянні з показником 1-х діб спостереження, $p < 0,05$

Таблиця 4

Показники здатності консервованих тромбоцитів до агрегації

Агоніст	Зниження ступеня агрегації		Зниження швидкості агрегації	
	Група зразків 1	Група зразків 2	Група зразків 1	Група зразків 2
Колаген	3-я доба	2-а доба	Тенденція до зниження	Тенденція до зниження
АДФ	4-а доба	2-а доба	4-а доба	2-а доба

Джерела інформації:

- 5 1. Исследование морфологии тромбоцитов при заготовке тромбоконцентратов на сепараторах крови / С.В. Варламова, М.М. Петров, Т.Г. Сарычева [и др.] / Проблемы гематологии и переливания крови. 2005. - №3. - С. 40-41.
2. Козинец Г.И. Практическая трансфузиология / Г.И. Козинец // М.: Практическая медицина. - 2005. - 544 с.

3. Малыш П.Н. К вопросу об эффективности гемоконсервантов // Укр. журн. клініч. та лаб. медицини. - 2009. - Т. 4, № 1. - С. 49-53.

4. Никитин И.К. Кровь, компоненты крови: хранение, фракционирование, качество и стандарты / И.К. Никитин, Г.И. Козинец // Гематология и трансфузиология. - 2002. - Т.47, №4. - С. 36-40.

5. Перехрестенко П.М. Гемотрансфузійні середовища та оцінка їх придатності для клінічного застосування / П.М. Перехрестенко, Г.Т. Глухенька, М.К. Алгазінова // Укр. журн. гематології та трансфузіології. - 2003. - №1. - С 35-39.

10 6. Трансфузионные среды: прикладные и фундаментальные аспекты / Б.Е. Мовшев, В.М. Витвицкий, И.Л. Лисовская [и др.] // Гематология и трансфузиология. - 2001. - №3. - С. 74-82.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб консервації тромбоконцентрату, що включає додавання до інкубату донорських тромбоцитів, який **відрізняється** тим, що як суспендуюче середовище додають розчин модифікований амінокислотами.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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