Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0418U001751

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 31-05-2018

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Шурко Наталія Олегівна

2. Shurko Natalia Olehivna

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: ні

Шифр наукової спеціальності: 03.00.04

Назва наукової спеціальності: Біохімія

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 22-05-2018

Спеціальність за освітою: біохімія

Місце роботи здобувача: Державна установа "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України"

Код за ЄДРПОУ: 02012088

Місцезнаходження: вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Львівська обл., 79044, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія медичних наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 35.368.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології тварин НААН

Код за ЄДРПОУ: 30995014

Місцезнаходження: вул. Василя Стуса, 38, м. Львів, Львівська обл., 79034, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія аграрних наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Державна установа "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України"

Код за ЄДРПОУ: 02012088

Місцезнаходження: вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Львівська обл., 79044, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія медичних наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 76.03.31

Тема дисертації:

1. Одержання високоактивного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням афінної хроматографії на барвник-кремнеземних носіях

2. Preparation of highly active concentrate of blood coagulation factor VIII with the use of affinity chromatography on dye-silica carriers

Реферат/анотація:

1. 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 із активними барвниками в ролі лігандів, придатних для очищення фактора VIII зсідання крові; використанню різних хімічних речовин в ролі вірус-інактивуючих агентів у процесі очищення; розробці схеми отримання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора та вивченню його біохімічних властивостей. Встановлено, що процес очищення фактора VIII відбувається завдяки явищу негативної афінної сорбції. Фактор VIII не сорбується жодним зі синтезованих сорбентів. Проте, його питома активність у супернатані зростає, що пов'язано з сорбцією із досліджуваного розчину нецільових білків. Серед досліджуваних сорбентів виділено 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. Виявлено, що на сорбцію білків впливає pH розчину (вищий ступінь очищення досягається при pH 7,4). Виявлено, що при виборі хроматографічного сорбенту важливим є не лише вибір ліганду, але й властивості самої матриці. Так, зокрема, продемонстровано, що найкраща сорбція нецільових білків досягалася на сорбенті з розміром пор 750 Å (найвищий ступінь очищення фактора VIII). Проведено дослідження впливу методів попереднього фракціонування у поєднанні з методом негативної афінної сорбції для створення схеми отримання високоочищеного препарату фактора VIII з плазми крові. Встановлено, що попереднє фракціонування барій цитратом, алюміній гідроксидом (III) та ПЕГ-4000 забезпечує видалення факторів протромбінового комплеку, фібриногену, фібронектину, ліпопротеїдів, денатурованих білків, альбуміну тощо. На цьому етапі досягли стократного очищення препарату фактора VIII (від 0,017±0,001 до 1,88±0,11 МО/мг білка для сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ). Продемонстровано, що застосування іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та афінної хроматографії на відібраних кремнеземних макропористих сорбентах забезпечує одержання фактора VIII з Кріопреципітату зі ступенем очищення від 129 до 242 разів та збереженням до 73–76 % від вихідної прокоагулянтної активності. Основні втрати від вихідної активності фактора VIII і фон Вілебранда (до 27 %) відбувалась на етапі іонообмінної хроматографії. Оскільки, очищення фактора на кремнеземних сорбентах відбувалось завдяки явищу негативної афінної хроматографії, це забезпечувало практично сто-відсотковий (96,34 %) вихід продукту та є ще однією суттєвою перевагою даного методу в технології отримання очищеного препарату. Виявлено, що поєднання етапів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії забезпечує ступінь очищення в межах 239–700 разів, залежно від типу вибраного сорбента. Найкращий результат досягли у досліді використання Діасорб-Активний пурпуровий 4 ЖТ. Для одержання вірус-безпечного препарату досліджено можливість застосування відомих ефективних методів антивірусної обробки: сольвент-детергентного та тіоціанатного. Запропоновано етапи включення кожного з методів у схему отримання препарату та способи видалення вірус-інактивуючих агентів. Оптимальне місце застосування цих методів є перед етапом кріоосадження, оскільки основна їх частина залишається у супернатанті.

2. The dissertation is devoted to development 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 chemicalsas virus-inactivating agents in the process of purification, and to development of a scheme for obtaining a highly active virus-safe 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 phenomenon of the negative affinity adsorption. Factor VIII is not absorbed by any of the synthesized sorbents. However, its specific activity increases in the supernatant. This is due to its sorption from the investigated solution of additional proteins. A group of studied sorbents is isolated, which shows the best binding of additional proteins: Diasorb-Active purple 4GT, Diasorb-Procion Gelb M4R, Diasorb-Procion Blue HB, Diasorb-Procion Blue MXR and Diasorb-Active bright blue KH. It was determined that the pH of the solution affects the sorption of protein (the highest level of specific activity of factor VIII was at pH 7.4). It has been established that in choosing a chromatographic sorbent, not only the choice of the ligands is important, but also the properties of the matrix. It was demonstrated that the best sorption of additional proteins was achieved on a sorbent with a pore size of 750 Å (the highest degree of the factor VIII purification). To create a scheme for obtaining a highly purified preparation of the blood coagulation factor VIII from blood plasma, the research was conducted on combinations of the pre-fractionation method with the method of negative affinity sorption. It was determined that the pre-fractionation with barium citrate, aluminum hydroxide (III), and PEG-4000, provides removal of factors of prothrombin complex, fibrinogen, fibronectin, lipoproteins, denatured proteins, albumin etc. At this stage, we have reached hundredfold purification of the factor VIII preparation (for example, from 0.017±0.001 to 1.88±0.11 IU/mg protein for sorbent Diasorb-Active purple 4GT). It has also been demonstrated that the use of ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and affinity chromatography on selected sorbents allows obtaining factor VIII from Cryoprecipitate with a degree of

purification of 129 to 242 times and preservation of up to 73–76 % of the initial procoagulant activity. The main losses from the initial activity of factor VIII and the von Willebrand's factor (up to 27 %) occurred at the stage of ion-exchange chromatography.The phenomenon of negative affinity sorption provides almost 100.0 % (96.34 %) yield of the product. This is another significant advantage of this method in the technology of obtaining a purified preparation of the coagulation factor VIII. 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. The best result was achieved when using Diasorb-Active purple 4GT. To get the virus-safe preparation, the possibility of using known effective methods of antiviral treatment: solvent-detergent and ammonium thiocyanate, was investigated. Stages of inclusion of each of these methods in the scheme of purification of the coagulation factor VIII and methods of removal of virus-inactivating agents are proposed. The optimal application of these methods is prior to the cryopreservation stage, because most of the factors remain in the supernatant.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Даниш Тарас Васильович
2. Danysh Taras Vasylovych

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Луцик Максим Дмитрович
2. Lootsik Maxim Dmytrovich

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Савчук Олексій Миколайович
2. Savchuk Olexiy Mykolayovych

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради Влізло Василь Васильович

Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні Влізло Василь Васильович

Відповідальний за підготовку облікових документів

Реєстратор

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності



Юрченко Т.А.