



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственная химико-фармацевтический Университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра химической технологии лекарственных веществ

# Системы патогенредукции компонентов крови на основе субстанции рибофлавина



Подготовил: Марсель Карапетян  
Таджатович Студент 5 курса 370 группы  
Руководитель: Певцов Д.Э., главный  
внештатный трансфузиолог Северо-Запада,  
руководитель отделения трансфузиологии  
ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова, к.м.н.  
Лалаев Б.Ю., заведующий кафедрой ХТЛВ  
СПХФУ, к.х.н.,

2022  
Санкт-  
Петербург



# Введение:

**Актуальность:** в настоящее время инфицирование при трансфузии крови и ее компонентов остается одной из серьезных проблем трансфузиологии и медицины, в целом. Решение проблемы инфицирования может стать увеличение доли инактивация патогенных микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов) с применением эффективных систем патогенредукции, в том числе на основе субстанции рибофлавина. Однако, необходимо отметить, что в настоящее время в России не производятся такие системы, объемы производимой субстанции рибофлавина крайне низки и не покрывают даже производство лекарственных препаратов рибофлавина (основные поставщики субстанции Рибофлавина в Россию по данным ГРЛС – Франция, Китай). Таким образом, производство субстанции Рибофлавина и систем патогенредукции компонентов крови остается одной из важных задач фармацевтической отрасли и медицины.



# Введение:

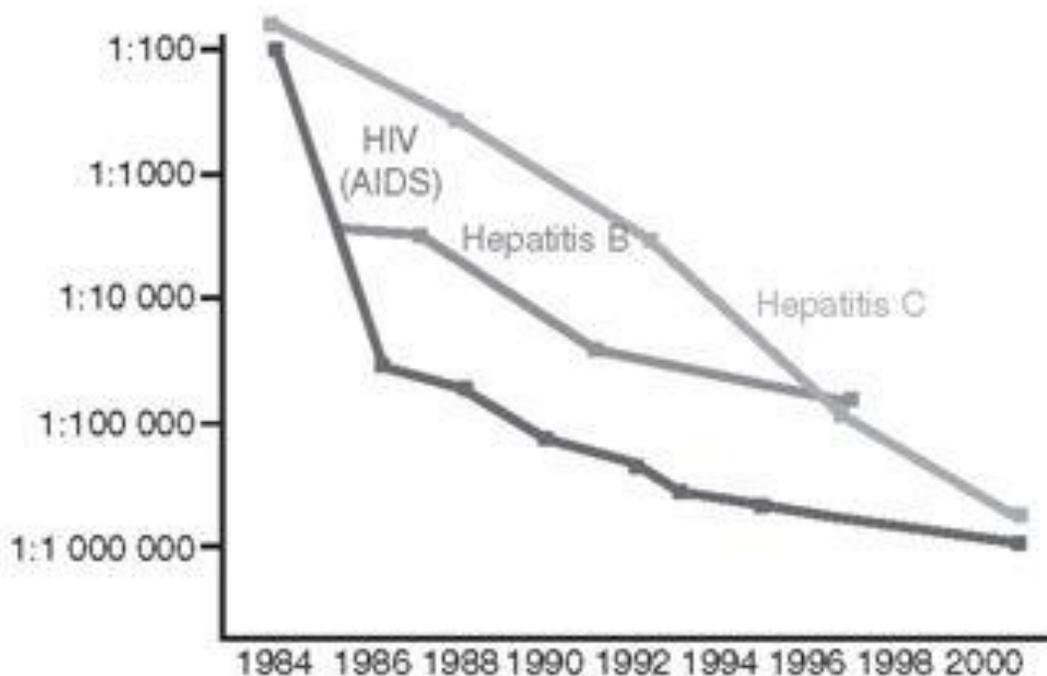
**Цель:** Определить возможности систем на основе субстанции рибофлавина для разработки и промышленного производства отечественных систем патогенредукции для применения в трансфузиологии.

**Новизна:** В России к настоящему моменту работ по разработке и совершенствованию систем патогенредукции компонентов крови на основе субстанции рибофлавина не проводились .

**Практическая значимость:** Разработка и внедрение в производство систем патогенредукции на основе субстанции рибофлавина позволит существенно сократить процессы инфицирования пациентов при трансфузии компонентов крови и существенно сократить затраты на карантинизацию крови и ее компонентов в Санкт-Петербурге и в России в целом.



# Проблема инфекционной безопасности при трансфузиях



**График:** Остаточный риск инфицирования патогенами при трансфузиях компонентов крови историческая динамика

Возбудители	Частота	
	В странах с высоким развитием системы здравоохранения	В странах с низким развитием системы здравоохранения
<b>ВИЧ</b>	1:1468000 – 1:4700000	1:50 – 1:2578
<b>Гепатит В</b>	1:31000 – 1:205000	1:74 – 1:1000
<b>Гепатит С</b>	1:1935000 - 1:3100000	1:2578
<b>Бактерии</b>	1:2000 – 1:8000 (для концентрата тромбоцитов)	Нет данных

**Остаточный риск инфицирования патогенами**



# Методы преодоления инфекционных реакций при трансфузиях

- тщательный отбор доноров крови и ее компонентов
- пропаганда донорства с обязательным акцентом на информированность донора о гемотрансмиссивных инфекциях и его ответственности
- внедрение NAT-тестирования
- внедрение суррогатных маркеров, позволяющих оценить состояние потенциального донора (АЛТ, АСТ)
- карантинизация компонентов крови
- инактивация патогенов в компонентах крови





# Карантинизация

**Суть метода:** компоненты крови выдаются в лечебные учреждения, только после повторного обследования доноров, через 4 месяца после сдачи материала с целью покрытия самого длительного серонегативного окна.

- Применим только для плазмы (от  $-30$  до  $-40^{\circ}\text{C}$ ) и эритроцитарной массы ( $-80^{\circ}\text{C}$ )
- Не применим для концентрата тромбоцитов и лейкоцитарной массы

Наиболее продолжительный серонегативный период у гепатита С от 54 до 120 дней.



Множество холодильников в ПСПБГМУ,  
(их там 30 штук)



# Карантинизация



Свежезамороженная плазма



Холодильная комната для карантинизации в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»



# Патогенредукция

**Инактивация** (редукция) патогенных биологических агентов» - технология обработки компонентов крови, направленная на прекращение репродукции патогенных биологических агентов.

Технология основана на способности света «губительно» влиять на патогены.

- Технология применима в отношении концентратов тромбоцитов и плазмы (ведутся разработки для внедрения в практику системы для инактивации тромбоцитов).

Существуют системы с фотосенсибилизаторами:

- Mirasol (рибофлавин)
- Intercept (амотосален)
- Therflex MB (метиленовый синий)

а также без: Theraflex



УФ-лампы для облучения



# Патогенредукция

## Критерий эффективности – Логарифм (Log)

Log снижение =  $\text{Log} [\text{Титр до обработки} / \text{Титр после обработки}]$

Log 7 = 1/10 000 000 или 99,99999%

Log 6 = 1/1 000 000 или 99,9999%

Log 5 = 1/10 000 или 99,999%

**Log 4 = 1/1000 или 99,99%**

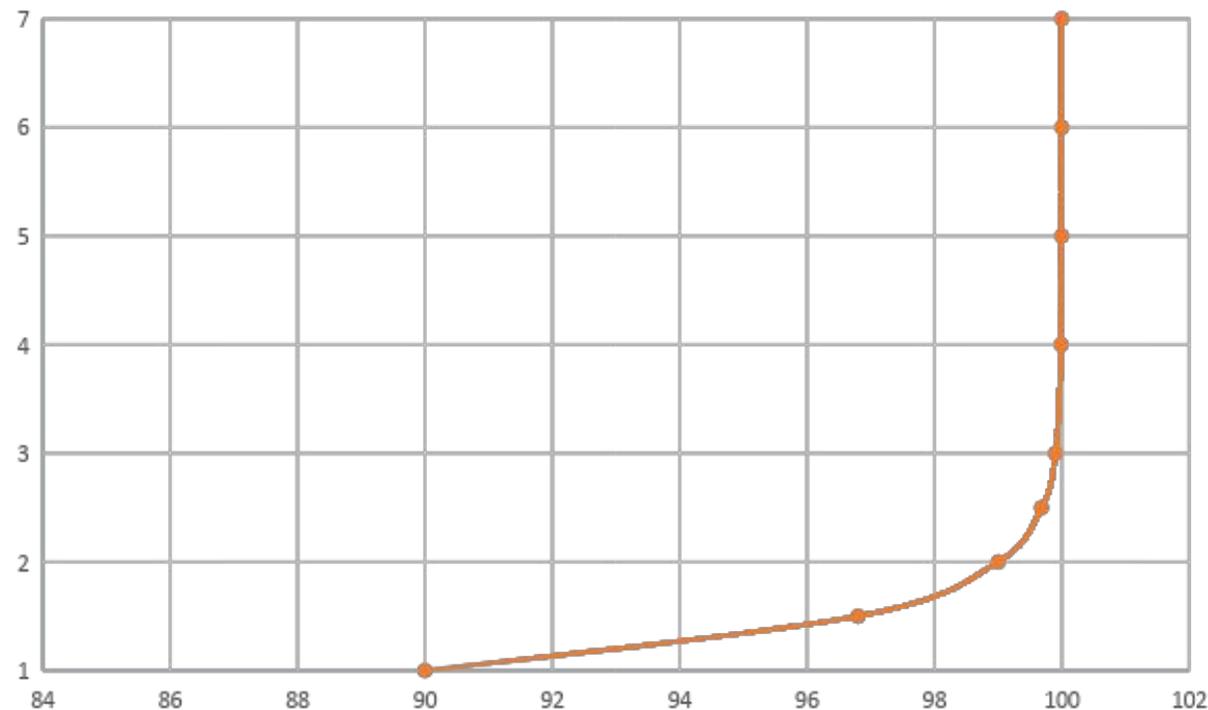
Log 3 = 1/316 или 99,9%

Log 2 = 1/100 или 99%

Log 1,5 = 1/31,6 или 96,68%

Log 1 = 1/10 или 90%

***Оптимальным является значение не менее Log 4***





# Обзор систем патогенредукции представленных на рынке

Система	Фотосенсибилизирующий агент	Основные фотопродукты	Необходимые условия	Дополнительные шаги
Theraflex	Отсутствует	Отсутствует	254 нм	Отсутствуют
Theraflex MB	Метиленовый синий	Azure A Azure B Leuko-MB Thionine	Видимый свет 630 нм	Фильтрация
Intercept	Амотосален (S-59)	Димер амотасалена	320-400 нм	Фильтрация
Mirasol	Рибофлавин	Люмихром	280-400 нм	Отсутствуют



# Эффективность патогенредукции различных систем

Патоген	Системы			
	Theraflex (тромбоциты)	Mirasol (тромбоциты)	Intercept (тромбоциты)	Theraflex MB (для плазмы)
ВИЧ-1	<u>1,4</u>	5,9	> 6,2	> 4,9
Вирус гепатита В	<u>&gt; 2,8</u>	<u>2,5</u>	> 5,5	<u>&gt; 3,0</u>
Вирус гепатита С	> 5,0	> 4,1	> 4,5	-
Вирус западного нила	<u>4,0</u>	5,1	> 6,0	> 5,75
Treponema pallidum	-	-	> 6,8	-
Escherichia coli	<u>&gt; 4,0</u>	4,4	> 6,4	-

Губанова М. Н. и др. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови //Трансфузиология. – 2017. – Т. 18. – №. 3. – С. 15-36.

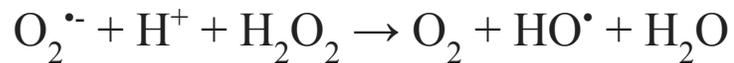
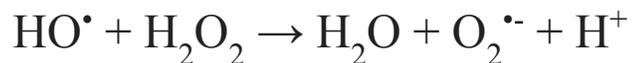
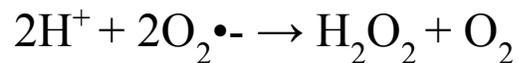
Жибурт Е. Б., Филина Н. Г., Губанова М. Н. Вирусинактивация плазмы //Вестник Национального медико-хирургического центра им. НИ Пирогова. – 2007. – Т. 2. – №. 1. – С. 105-110.

# Типы фотохимических реакций

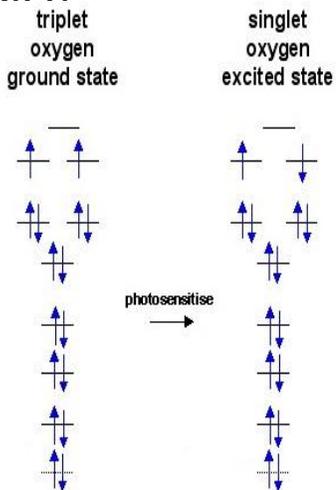
## ФУРОКУМАРИНЫ

### ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ (1 ТИП)

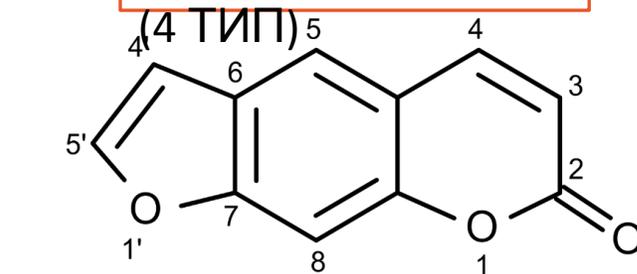
В результате переноса электронов происходит образование супероксиданиона ( $O_2^{\bullet-}$ )



### ОБРАЗОВАНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА (2 ТИПА)

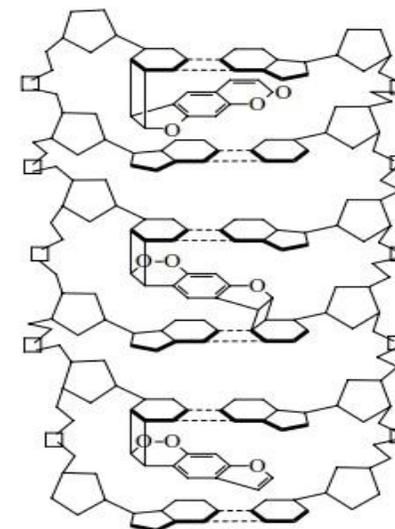


### ПРОДУКТЫ ФОТООКИСЛЕНИЯ ФУРОКУМАРИНОВ (4 ТИПА)



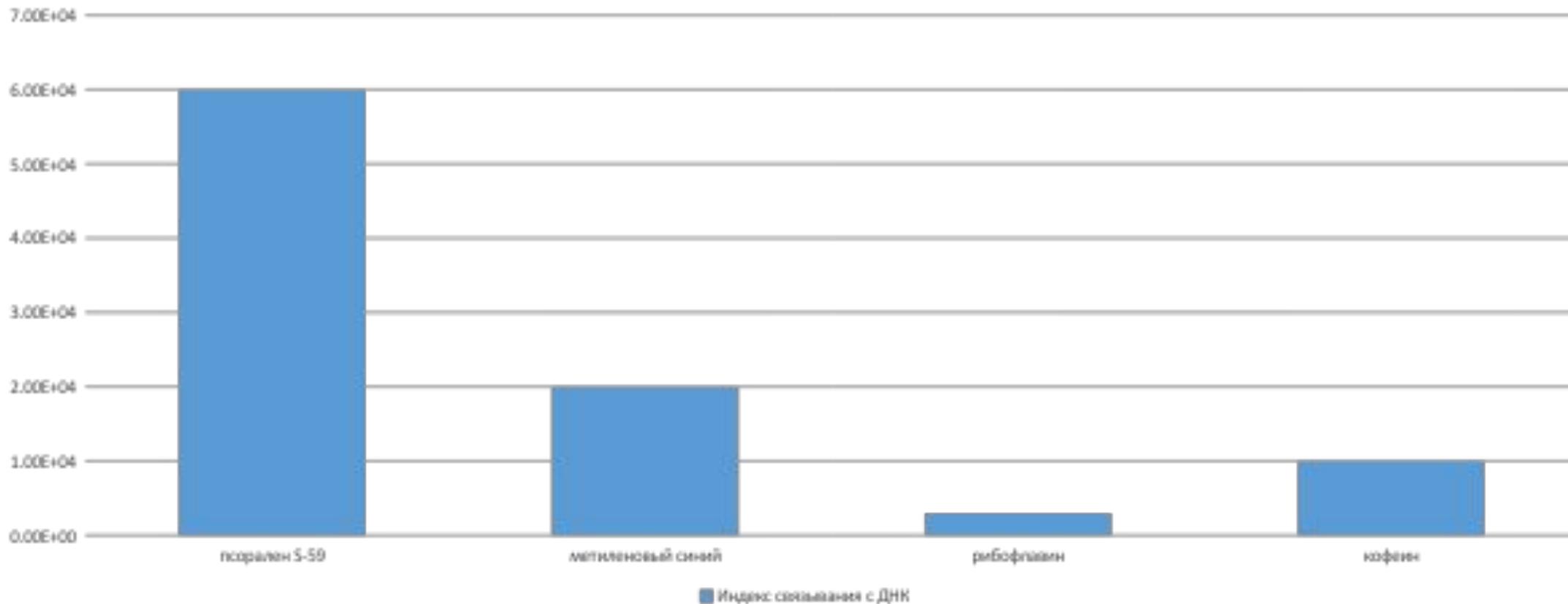
кумарины претерпевает окисление по 3 и 4 положению

### ФОТОАДДУКТЫ С БИОМОЛЕКУЛАМИ (4 ТИПА)





# Способность фотосенсибилизаторов вступать в фотореакции 4 типа

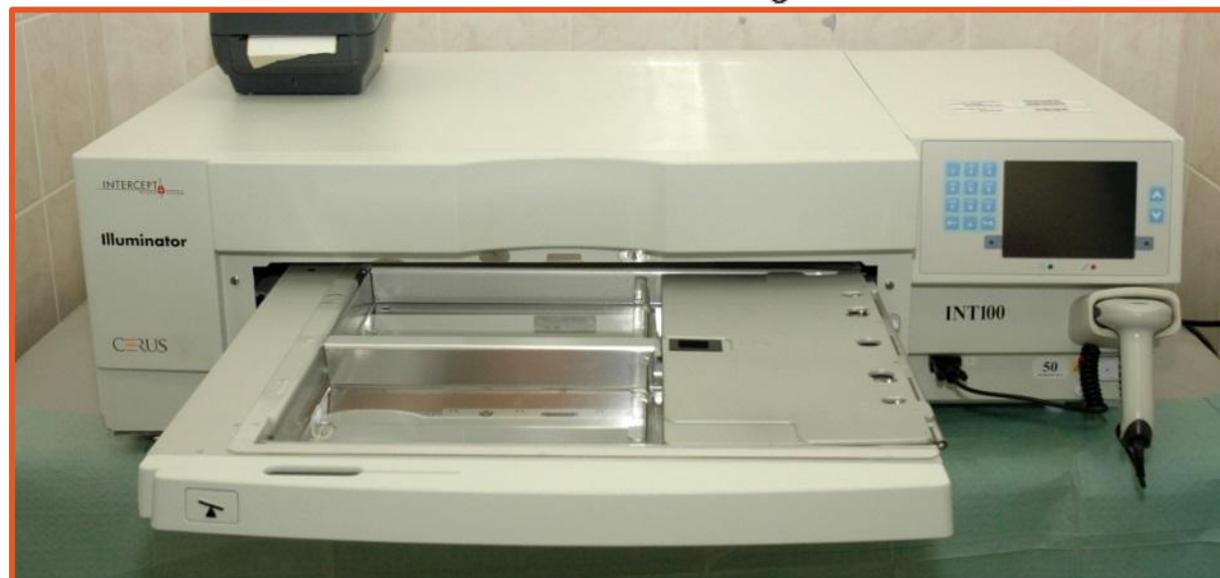
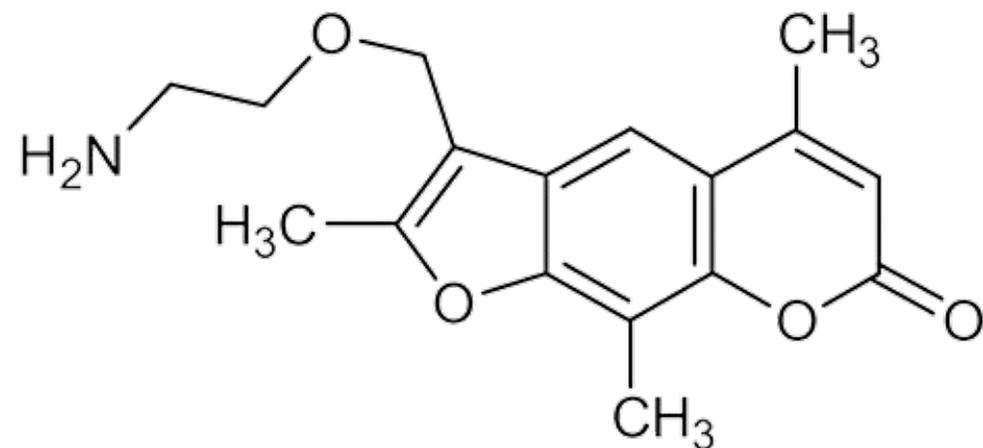


Индекс связывания фотосенсибилизаторов с нуклеиновыми кислотами



# Intercept, Cerus (US)

- Фотосенсибилизатор: амотосален
- Диапазон длин волн: 320-400 нм
- Реализует эффект благодаря фото реакциям 4 типа
- Благодаря своим гидрофильным свойствам способен проникать через мембраны клеток
- Применяется для инактивации плазмы и тромбоцитов
- После процедуры требуется фильтрация, для удаления остатков посралена



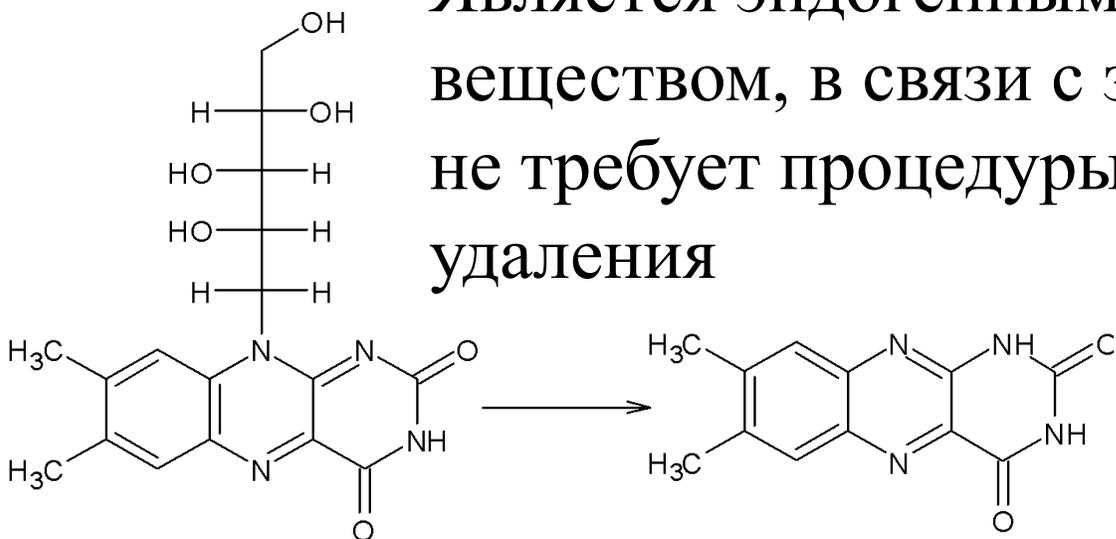
Облучатель Intercept



# Mirasol, TerumoBCT (US)

- Фотосенсибилизатор: рибофлавин
- Эффект опосредован химическими реакциями 1 и 2 типа (происходит окисление остатков гуанина)
- Диапазон длин волн: 280-480 нм

- Является эндогенным веществом, в связи с ЭТИМ не требует процедуры удаления



Переход рибофлавина в люмихром



Патогенредуктор Mirasol в ПСПБГМУ



# Методы синтеза рибофлавина

Существуют два метода синтеза: *микробиологический и химический.*

Микробиологический является наиболее востребованным, так как обеспечивает наибольший выход по сравнению с химическим (мутагенные штаммы способны синтезировать до 6.4 мг/л).

Используют штаммы *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. У данным мутагенных штаммов подавлен механизм ретроингибирования.

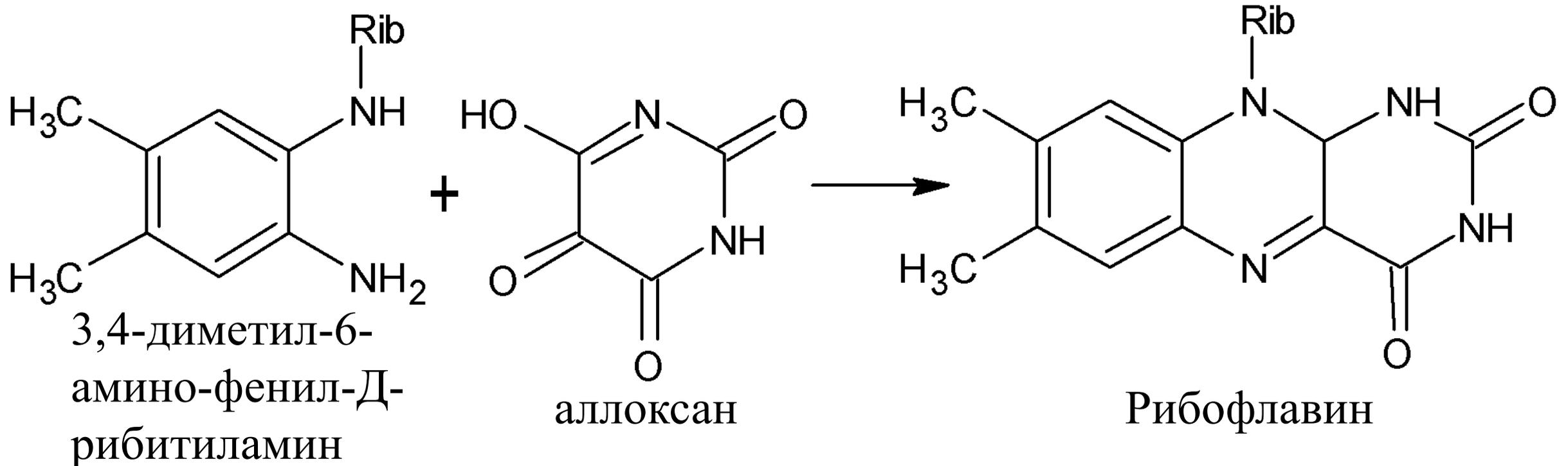
Кроме того выход увеличивает специальный состав культуральной жидкости: соевая мука, сахароза, кукурузный экстракт, карбонат кальция, хлорид натрия, гидрофосфат калия, витамины и технический жир.

Выделяют при pH 4,5-7 в труднорастворимой восстановленной форме с выходом около 90%. Осаждают гидросульфитом натрия.



# Химический синтез рибофлавина

Последним этапом синтеза рибофлавина является конденсация  
3,4-диметил-6-амино-фенил-Д-рибитамина с аллоксаном

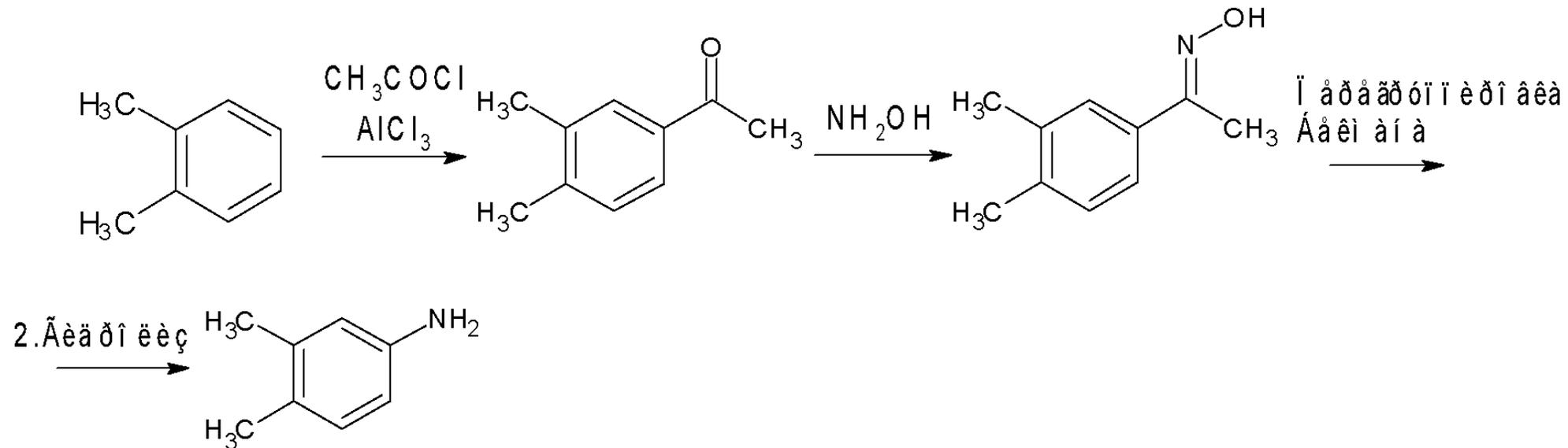




# Химический синтез рибофлавина

Получение 4-о-ксилидина (один из методов, выход на о-ксилол 40%):

1. Метод ацетилирования о-ксилола действием ацетилхлорида в присутствии хлористого алюминия с получением 3,4-диметилацетофенона.
2. Оксим затем превращают в 4-о-ксилидин посредством перегруппировки Бекмана и гидролиза.

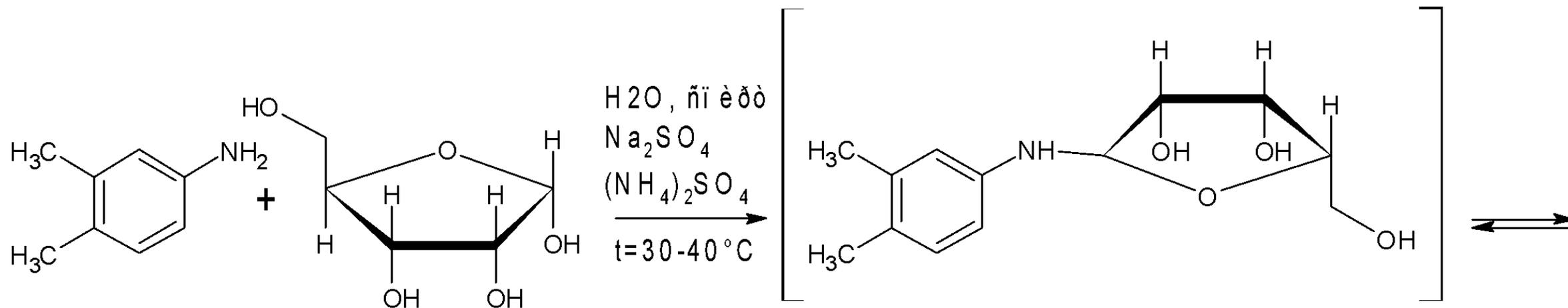




# Химический синтез рибофлавина

Получение 3,4-ксилил-Д-рибитиламина:

1. Конденсация Д-рибозы с 4-о-ксилидином.



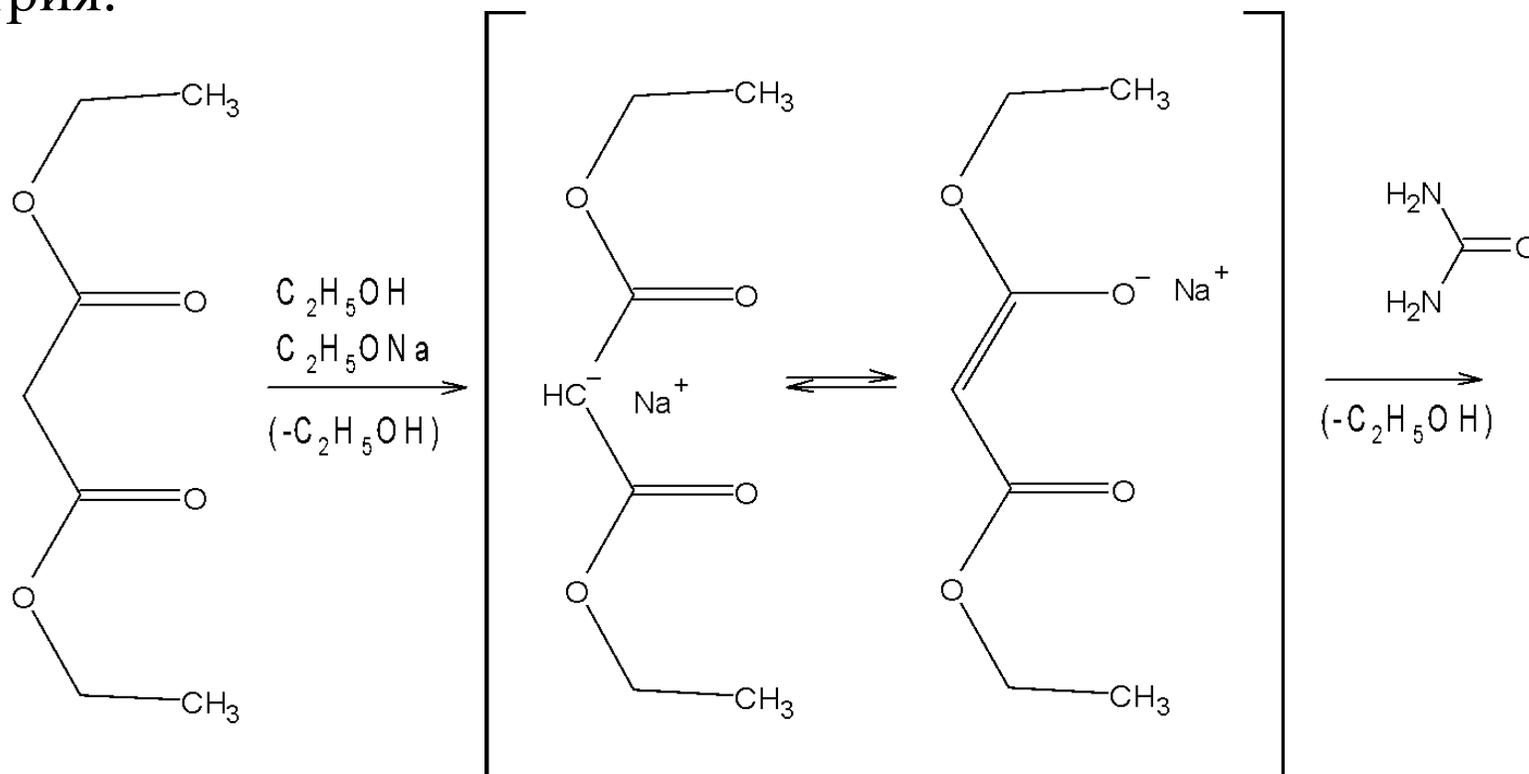




# Химический синтез рибофлавина

Синтез барбитуровой кислоты:

1. Получают взаимодействием малонового эфира с мочевиной в присутствии этилата натрия.

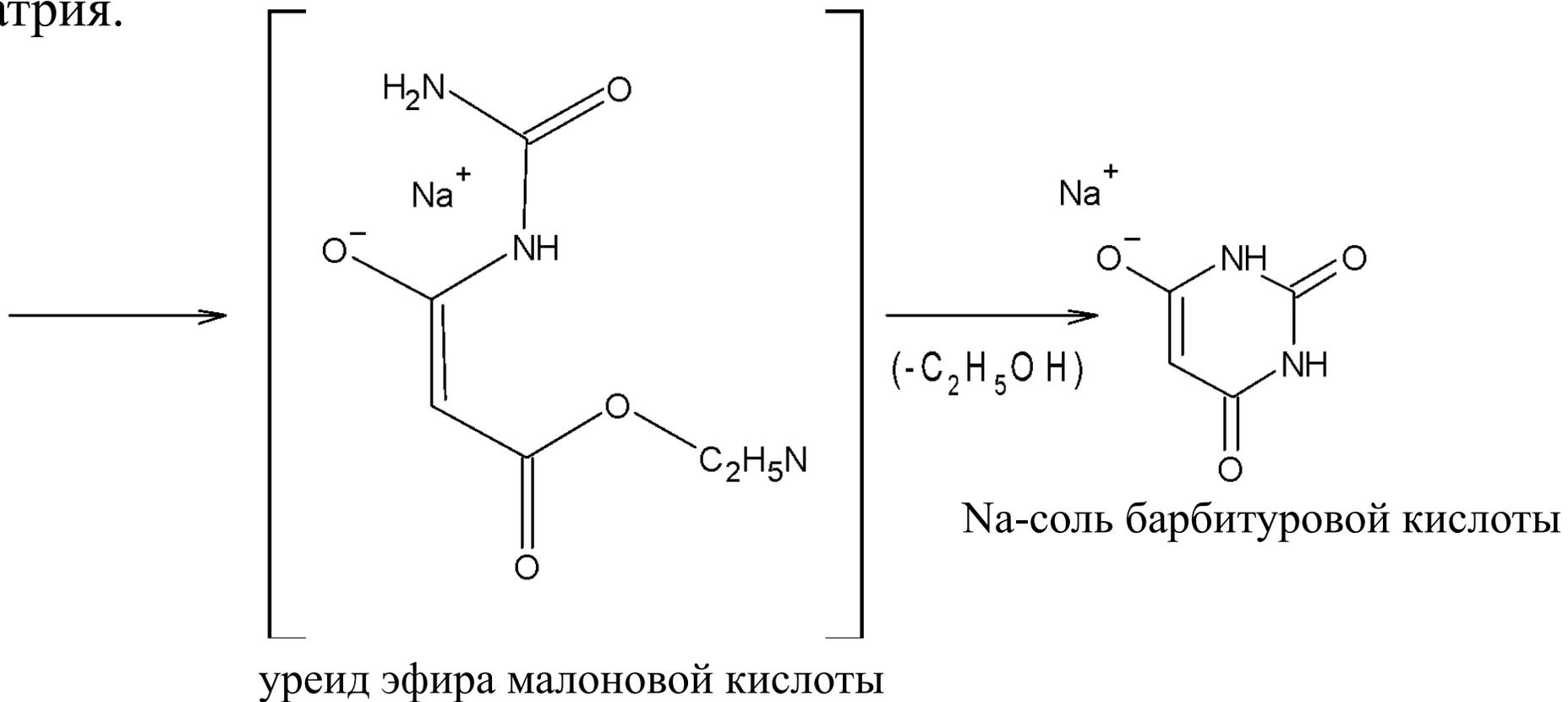




# Химический синтез рибофлавина

Синтез барбитуровой кислоты:

1. Получают взаимодействием малонового эфира с мочевиной в присутствии этилата натрия.





# Рибофлавин в России

В России синтезом рибофлавина по данным ГРЛС занимается завод «Полисан» в Белгороде.

Завод выпускает рибофлавин в составе комбинированного метаболического средства **цитофлавина** (в виде инъекционных, а также пероральных лекарственных форм).

## Показания

У взрослых в комплексной терапии:

- последствия инфаркта мозга;
- другие цереброваскулярные болезни (церебральный атеросклероз, гипертензивная энцефалопатия);
- неврастения (повышенная раздражительность, утомляемость, утрата способности к длительному умственному и физическому напряжению).

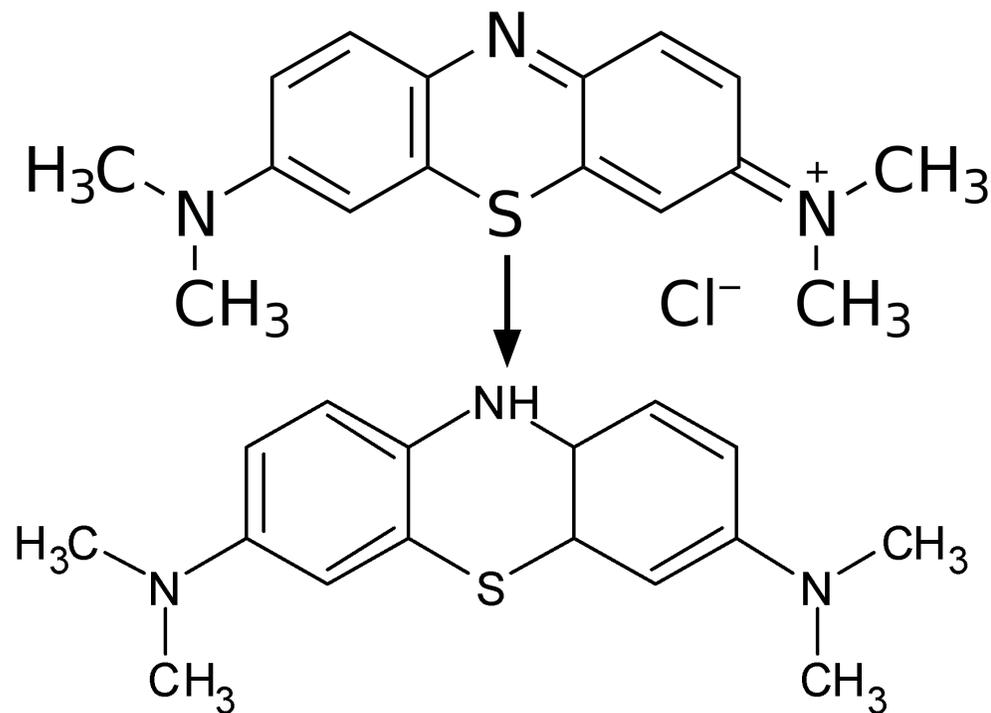




# Theraflex, Macopharma (France)

- Фотосенсибилизатор: метиленовый голубой
- Вступает в фотохимические реакции 1, 2 и 4 типа
- Используется видимый свет 630 нм
- Используется только для инактивации плазмы

В процессе фотолиза метиленового синего образуется множество продуктов, одним из таких является лейкометиленовый голубой.

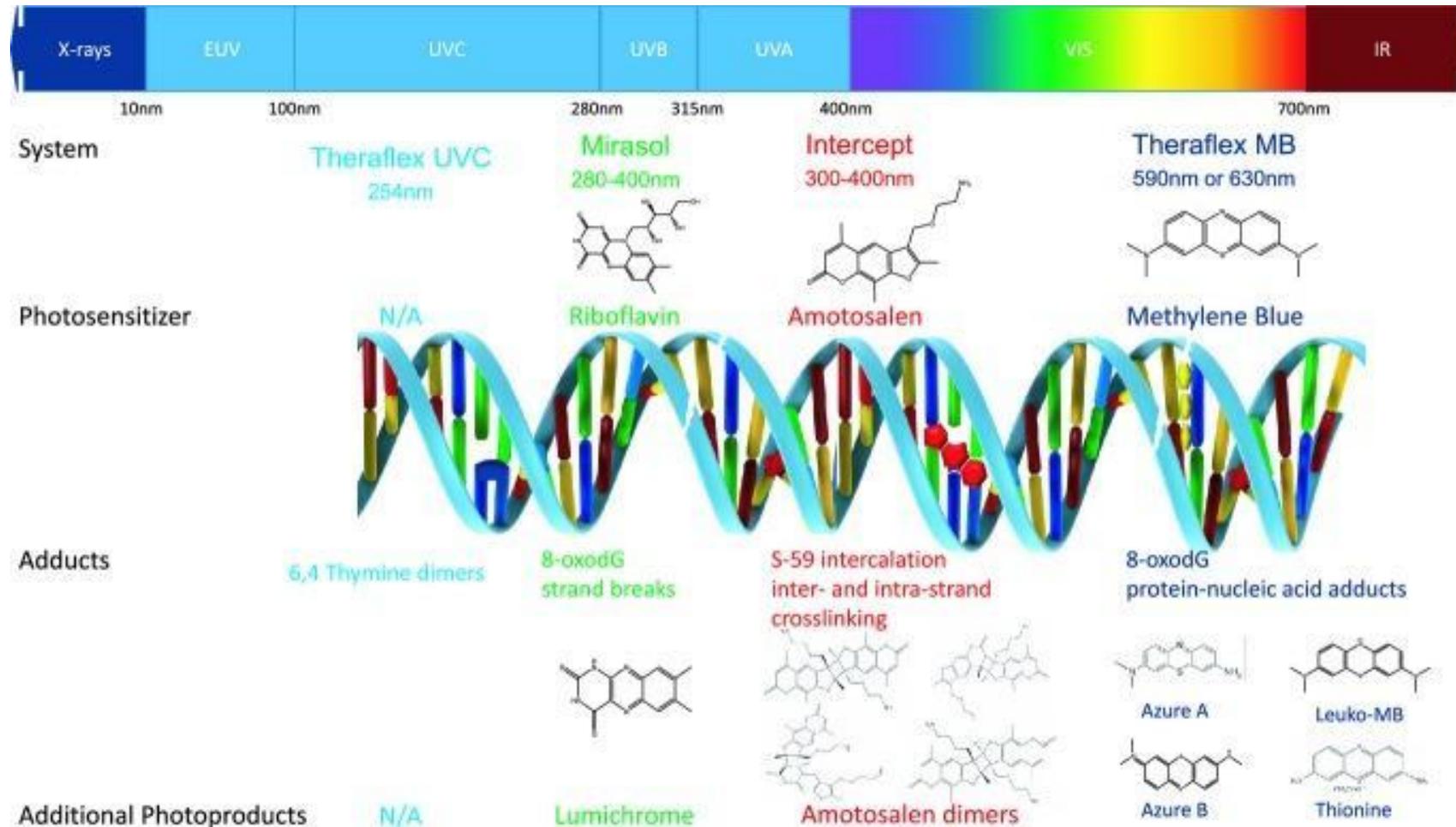


Аппарат «Макотроник»

Необходим фильтр для снижения концентрации метиленового синего (до 0.1- 0.3 мкм)



# Системы патогенредукции





# Исследование

**Цель исследования:** Цель моего исследования выяснить какие методы преодоления инфекционных осложнений используют в Санкт-Петербурге в 2022. Определить какая система является самой часто используемой, а также какой процент плазмы и тромбоцитов проходят процесс патогенредукции.

В Санкт-Петербурге 20 ОПК, среди них 8 федерального уровня и 12 городского. По специально разработанному перечню вопросов проведен анкетный опрос 15 руководителей отделов переливания крови (ОПК) Санкт-Петербурга, из них 6 федерального уровня, а также 9 городского.

## Анкета

**1. Какие компоненты крови вы заготавливаете (множественный выбор) ?**

- Плазма (B05AX03)
- Тромбоциты (B05AX02)
- Эритроциты (B05AX01)

**2. Какой метод профилактики инфекционных осложнений использует ваша станция переливания крови?**

- Карантинизации
- Метод патоген редукции

**3. Какую систему патоген редукции вы используете (если во втором вопросе был выбран в том числе вариант посредством системы патогенредукции) ?**

- Intercept
- Mirasol
- Macopharma (метиленовый синий)

**4. Какой процент плазмы и тромбоцитов проходит карантинизацию и подвергается патоген редукции соответственно (допускается указать количество закупаемых расходных материалов для облучения ежегодно)?**

**5. Какой фактор является лимитирующим и не допускает возможности увеличить объем заготавливаемых плазмы и тромбоцитов?**



# Результаты исследования

По результатам опроса было выявлено что в Санкт-Петербурге патогенредукцию проходят **100%** тромбоцитов, а также не более **10%** плазмы. Кроме того в случае отсутствия оборудования для инактивации, центр крови предпочитает не заниматься заготовкой тромбоцитов (не смотря на то что ПП РФ 797 от 22 июня 2019 года не накладывает таких ограничений).

Страны	Карантинизация %	Патогенредукция %
Люксембург	0	<b>100</b>
Нидерланды	<b>100</b>	0
Германия	<b>100</b>	0
Франция	57	43
Швейцария	80	20
Бельгия	0	<b>100</b>
Чехия	<b>100</b>	0
Румыния	<b>100</b>	0
Болгария	0	0
Польша	69	0

Соотношение карантинизации и патогенредукции плазмы в некоторых странах Европы (2018 год)

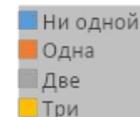
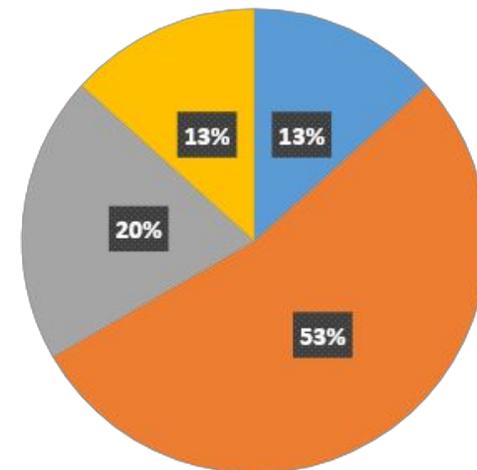


# Результаты исследования

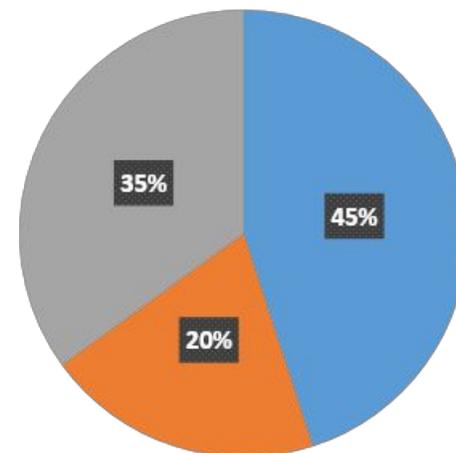
По результатам опроса выявлено:

- 2 центра не владеют ни одной системой патогенредукции
- 2 центра владеют всеми системами патогенредукции
- 5 владеют одной системой патогенредукции
  - Mirasol (x5)
  - Intercept (x2)
  - Theraflex
- 3 владеют двумя системами патогенредукции
  - Intercept и Mirasol (x2)
  - Intercept и Theraflex MB

Количество систем в ОПК



Доля каждой системы патогенредукции





# Заключение

1. Проведен обзор систем патогенредукции компонентов крови в отделениях трансфузиологии и станций переливаний крови Санкт-Петербурга.
2. Установлен объем требуемых систем патогенредукции на основе субстанции рибофлавина.
3. В настоящее время в России объемы субстанции рибофлавина недостаточны для производства систем патогенредукции на основе субстанции рибофлавина (1 производитель: «Полисинтез»)
4. В связи с экономико-политической обстановкой необходимо в ближайшее время наладить производство субстанции рибофлавина и систем патогенредукции на ее основе.



# Литература

Количество систем в ОПК

1. Goodhnought L. T. et al// NEJM – 1999 – Vol. 340 – P. 438-447
2. Madjdpour C. and Spahn D. R. British Journal of Anaesthesia. 2005; 95(1): 33-42
3. Ragimov A. A. et al. Transfusiology. - 2018. pp. 184-187
4. Постановление Правительства РФ от 22 июня 2019 г. N 797
5. Mundt J. M. et al. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies //Photochemistry and photobiology. – 2014. – Т. 90. – №. 5. – С. 957-964.
6. Губанова М. Н. и др. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови //Трансфузиология. – 2017. – Т. 18. – №. 3. – С. 15-36.
7. Жибурт Е. Б., Филина Н. Г., Губанова М. Н. Вирусинактивация плазмы //Вестник Национального медико-хирургического центра им. НИ Пирогова. – 2007. – Т. 2. – №. 1. – С. 105-110.  
*Доля каждой системы патогенредукции*
8. Механизм инактивации патогенов в компонентах крови / М. Т. Карапетян, Н. К. Рудь, Г. С. Степанов, Ю. А. Литвинко // Научные исследования, разработки и практические внедрения : материалы VII Международной научно-практической конференции : в 2 ч., Ставрополь, 31 января 2022 года. – Ставрополь: Общество с ограниченной ответственностью "Ставропольское издательство "Параграф", 2022. – С. 90-97. – EDN KEFOTL.
9. Коротченкова Н. В., Самаренко В. Я. Витамины гетероциклического ряда: строение, свойства, синтез, химическая технология //СПб.: СПХФА. – 2006. – С. 4-13. Стр 28-43
10. Государственный реестр лекарственных средств URL:  
[https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=cf269c31-6e29-4fbb-9a14-c9a698cbf2ad&t=](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=cf269c31-6e29-4fbb-9a14-c9a698cbf2ad&t=) (дата обращения: 11.04.2022).



# Благодарность



Количество систем в ОПК

Выражаю благодарность:

- Кириллу Свечникову за красочные фотографии.
- Георгию Степанову и Юрию Литвинко за помощь в сборе статистики.
- Моим научным руководителям Лалаеву Борису Юрьевичу, а также Певцову Дмитрию Эдуардовичу за исчерпывающие консультации.
- А также многим руководителям отделов переливания крови, что предоставили данные для сбора и анализа статистики.





Система для отбора компонентов крови



Расходный материала для проведения процедуры донорства



Система Mirasol



УФ-лампы (система Mirasol)



Устройство для соединения трубок

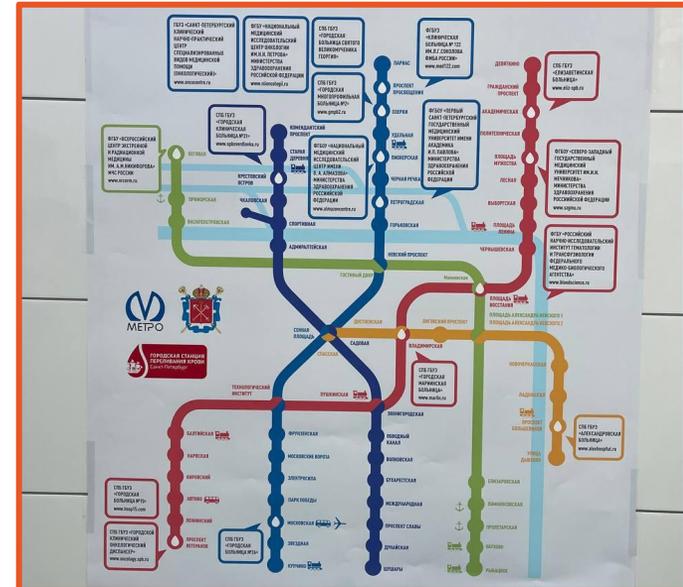


Схема метро со станциями переливания крови

**Спасибо за внимание**