

## СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА В ВИРУСИНАКТИВИРОВАННОЙ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ПЛАЗМЕ КРОВИ

Кривов И.А., Рагимов А.А., Салимов Э.Л.

*ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, e-mail: doktor6775@rambler.ru*

В настоящее время согласно рекомендациям отечественных и зарубежных руководств при оказании помощи при кровотечениях и всевозможных тяжелых коагулопатиях пациенты нуждаются в трансфузиологических пособиях. Основная роль отводится свежзамороженной плазме, однако ее применение сопряжено с риском передачи трансмиссивных инфекций. Эту проблему в наше время минимизируют посредством вирусинактивации свежзамороженной плазмы. Лиофилизация свежзамороженной плазмы действительно снимет проблемы, сопряженные с хранением, транспортировкой и подготовкой данного препарата крови к использованию при оказании помощи пациентам. В статье приведены материалы исследования по изучению сохранения коагуляционного потенциала в лиофилизированной плазме, инактивированной двумя различными технологиями, преимущественно применяемыми в настоящее время в современной трансфузиологии: амтосален + облучение ультрафиолетом спектра А; метиленовый синий + видимый свет. В исследовании использовался метод анализа концентрации факторов свертывания крови и других показателей, которые оказывают влияние на все пути свертывания (внешний, внутренний и общий), путем сопоставления образцов вирусинактивированной лиофилизированной плазмы, инактивированной различными технологиями инактивации, как между собой, так и с контрольной группой при использовании размороженной свежзамороженной плазмы. В конечном итоге исследования в показателях между образцами плазмы, инактивированной разнообразными способами, значительных отклонений не обнаружено. По результатам анализа можно сделать вывод, что вирусинактивированная лиофилизированная плазма выступает альтернативой свежзамороженной плазме в полной мере.

Ключевые слова: свежзамороженная плазма, лиофилизированная плазма, безопасность, факторы свертывания крови, инактивация патогенов, амтосален, метиленовый синий, гемостаз.

## COMPARISON OF THE EFFECT OF LYOPHILIZATION ON PLASMA HEMOSTASIS PARAMETERS IN VIRUSINACTIVATED BLOOD PLASMA INACTIVATED BY VARIOUS METHODS

Krivov I.A., Ragimov A.A., Salimov E.L.

*Federal STATE Autonomous educational institution of First Moscow state medical University named after I. M. Sechenov of Ministry of healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, e-mail: doktor6775@rambler.ru*

At present, according to recommendations of Russian and foreign guide-lines, the leading role in providing assistance in haemorrhages and various coag-uloopathies in transfusiological aids is assigned to fresh frozen plasma, but its use is associated with the risks of transmission of vector-borne infections. This prob-lem is nowadays minimized by virus-inactivated fresh frozen plasma. Lyophilisation of fresh frozen plasma will practically eliminate the prob-lems connected with storage, transportation and preparation of this blood prepa-ration for use in patient care. The article presents the data of the study on the conservation of coagula-tion potential in lyophilized plasma inactivated by two different technologies most often used nowadays in modern transfusiology – amotosalene + ultraviolet irradiation of A spectrum and methylene blue + visible light. The study analyzed the concentration of blood-clotting factors and blood-clotting indices influencing the external, internal and general blood-clotting pathways by comparing the samples of virus-inactivated lyophilized plasma inactivated by different inactiva-tion methods both among themselves and with the control group of unfrozen fresh-frozen plasma. As a result of the study no significant differences in indices between plasma samples inactivated by different methods have been revealed. Therefore, virus-inactivated lyophilized plasma can act as a complete alter-native to freshly frozen plasma.

Keywords: fresh frozen plasma, lyophilized plasma, safety, blood-clotting factors, pathogen inactivation, amotosalene, methylene blue, homeostasis.

Свежезамороженная плазма является одним из наиболее распространенных компонентов крови, используемых сегодня в медицинских учреждениях для таких случаев, как кровотечения и тяжелые коагулопатии, а также в качестве источника прокоагулянтов, физиологических антикоагулянтов, активаторов и ингибиторов фибринолиза. Отличительное свойство данного материала – стремление к сохранению в оптимальном соотношении всех составляющих компонентов и регуляторов системы гемостаза плазмы крови, за исключением влияния тромбоцитов. У пациентов с заболеваниями печени при наличии нарушений синтеза прокоагулянтов и ингибиторов свертывающей системы крови применение свежезамороженной плазмы крови предпочтение отдается рекомбинантным концентратам факторов свертывания крови [1].

Вирусинактивированная плазма на данный момент часто используется в практике оказания медицинской помощи. Несмотря на молекулярные и серологические методы скрининга и должный отбор доноров крови, до сих пор существует определенный риск заражения трансмиссивными инфекциями и переливания инфицированных компонентов крови. Это противоречит одному из ключевых принципов сегодняшней трансфузионной терапии, заключающемуся в использовании гемокомпонентов, обеспечивающих как лучший терапевтический эффект, так и безопасность в отношении гемотрансмиссивных инфекций, профилактику иммунологических реакций и осложнений [2].

Для увеличения инфекционной безопасности трансфузии плазмы на протяжении уже многих лет применяются технологии инактивации (редукции) возбудителей. Для инактивации патогенов в плазме крови человека используются два способа по следующим технологиям:

- 1) с амотосаленом (Интерсепт, Церус);
- 2) с метиленовым синим (Терафлекс, Макофарма).

Обе эти технологии относятся к фотодинамическим методам.

Фотодинамические агенты действительно не вызывают реактивности нуклеиновых кислот и действуют, выделяя активные формы кислорода для лизиса вирусных оболочек. Ультрафиолетовый В-свет (УФВ) без добавления фотосенсибилизаторов редуцирует безоболочечные поливирусы в плазме крови. Поэтому данные методы являются перспективными при производстве препаратов плазмы и крови.

Перед переливанием вирусинактивированную плазму нужно разморозить и довести до нужной температуры. Для этого необходимо наличие специализированного оборудования, требуются определенные затраты времени. В полевых условиях использовать свежезамороженную плазму попросту неудобно, учитывая незаменимость оборудования. Также невозможно использовать необходимые материалы и при оказании первой помощи при чрезвычайных обстоятельствах.

Температура хранения лиофилизированной (сублимированной) плазмы находится в пределах 20–26°C. Процесс переливания лиофилизированной плазмы крови не требует наличия специализированного оборудования для разморозки. Следовательно, в значительной мере сокращается период времени на восстановление, так как нет необходимости размораживать материал, как при применении свежемороженой плазмы. Проблема применения в условиях медицинской практики в России лиофилизированной (сублимированной) плазмы заключается в отсутствии производства данного вида продукции.

Таким образом, сочетание инактивации (редукции) вируса и лиофилизации – возможное решение двух важнейших вопросов: полная безопасность и хранение материала при комнатной температуре. Подобное решение вопроса снижает стоимость издержек, связанных с хранением и транспортировкой. Также лиофилизированная плазма имеет перспективы эффективного исследования в условиях оказания медицинской помощи первой необходимости.

Цель работы: изучить воздействие процесса лиофилизации на уровень содержания факторов свертывания и показателей свертываемости в вирусинактивированной лиофилизированной плазме.

### **Материалы и методы исследования**

Образцы для исследования лиофилизированной плазмы были сделаны из свежемороженой. Последняя характеризовалась биологической (гемостатической) полнотой. Все этапы приготовления образцов для экспериментов соответствуют современным стандартам. Всего было создано 100 образцов (n=100) [3–4].

Исследуемые образцы инактивировались по двум методикам:

- 1) редукция с использованием амтосалена и ультрафиолета спектра А;
- 2) вирусинактивация с использованием рибофлавина и УФ-облучения средств спектра В.

На каждое тестирование по каждой методике было взято по 50 образцов.

Ход лиофилизации был следующим: вирусинактивированная плазма помещалась в простерилизованные флаконы (10 мл), далее материал подвергался замораживанию (–30°C). Последующий этап – сублимационная сушка. Она проводилась в немецкой сублимационной установке типа ТГ-50. На установке устанавливались физические параметры эксперимента (давление и температура), велся постоянный контроль за их стабильностью. Полученный лиофилизат содержал остаточной влаги менее 1%.

Флаконы хранились под вакуумом в темном шкафу при комнатной температуре (22–27°C), относительная влажность составляла от 55% до 65%.

Восстановление лиофилизатов проходило методом сольюбилизации образцов. Для этого добавляли воду для инъекций в количественном соотношении 1:1 комнатной температуры.

Восстановленные лиофилизаты испытывались тремя следующим методами:

- «Активность факторов свертывания крови» (измеряли в восстановленной лиофилизированной плазме с помощью коагулометров STA Compact (Франция) и Sysmex 2000i (Япония) (табл. 1);
- «Фибриноген» (количественно определялся с помощью метода Клауса) (табл. 2);
- «Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)» (измерялось методом Pathromtin SL) (табл. 3).

Для контрольной группы были взяты 100 образцов.

Все результаты исследования были представлены в средних величинах со стандартными отклонениями. Статистическую оценку результатов исследования мы проводили с применением дескриптивных статистик при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В итоге проведенного исследования мы отмечали снижение количества вещества фактора VIII в исследуемых образцах (как в контрольной группе, так и в вирусинактивированной плазме, подвергшейся процессу лиофилизации, инактивированной двумя применяемыми методами). Подобный результат выявлен и у второго термолabileного фактора V, как в лиофилизированной свежемороженой плазме, так и в лиофилизированной вирусинактивированной плазме при применении исследуемых технологий вирусинактивации. Остальные факторы свертывания менялись не столь существенно.

В вирусинактивированной плазме после лиофилизации при использовании двух методов инактивации показатели были следующими: фактор II – от 82% до 84%, фактор V – 68% в обеих исследуемых группах, фактор VII – от 92% до 94%, фактор VIII – от 60% до 63%, фактор IX – 72% в обеих исследуемых группах, фактор X – 90% в обеих исследуемых группах (табл. 1).

Таблица 1

Показатели гемостаза плазмы

Образец	Единицы измерения	Физиологическая норма	СЗП	Ллиофилизированная плазма, инактивированная амотосаленом	Ллиофилизированная плазма, инактивированная метиленовым синим
Фибриноген	г/л	1,8–3,5	1,9±0,48	2,1±2	2,3±0,11
Фактор II	%	70–120	93±8	82±3	84±4

Фактор V	%	70–120	85±12	68±8	68±8
Фактор VII	%	70–120	95±8	94±5	92±6
Фактор VIII	%	70–120	74±7	63±9	60±8
Фактор IX	%	70–120	78±8	72±6	72±5
Фактор X	%	70–120	98 ±4	90±2	90±4

Примечание: СЗП – свежемороженая плазма.

В исследуемых образцах после лиофилизации при использовании обоих методов инактивации показатели физиологических антикоагулянтов были следующими: антитромбин III – от 88% до 90%,  $\alpha$  2 антиплазмин – от 87% до 89%, протеин С – от 95% до 96% (табл. 2).

Таблица 2

Показатели физиологических антикоагулянтов плазмы

Образец	Единицы измерения	Физиологическая норма	СЗП	Лиофилизованная плазма инактивированная амотосаленом	Лиофилизованная плазма инактивированная метиленовым синим
Антитромбин III	%	75–125	103±4	88±6	90±4
$\alpha$ 2 антиплазмин	%	75–125	92±3	87±8	89±6
Protein C	%	70–150	100±2	95±4	96±3

Примечание: СЗП – свежемороженая плазма.

В образцах после лиофилизации показатели свертывающей системы были следующими: протромбиновое время (ПВ) находилось в пределах от 19 до 20 сек, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – от 38 до 39 сек (табл. 3).

Таблица 3

Показатели свертывающей системы плазмы

Образец	Единицы измерения	Физиологическая норма	СЗП	Лиофилизованная плазма инактивированная амотосаленом	Лиофилизованная плазма инактивированная метиленовым синим
ПВ	сек	13–18	13±2	20±3	19±3
АЧТВ	сек	26–37	35±1	38±4	39±2

Примечание: СЗП – свежемороженая плазма, ПВ – протромбиновое время, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

Лиофилизация вирусиактивированной плазмы крови различными методами приводила к некоторому улучшению показателей свертывания крови, в частности ПВ и АЧТВ, после сублимации вирусиактивированной плазмы, а также к понижению концентрации факторов V и VIII ниже физиологической нормы. Остальные факторы свертывания оставались

в физиологических нормальных пределах. Достоверной разницы в показателях между испытуемыми образцами плазмы, инактивированной двумя указанными методами, не выявлено.

Проведенное исследование очевидно показало, что после вирусинактивации и процесса лиофилизации плазмы крови в ней наблюдается удлинение протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Также происходит понижение количества вещества фактора V и фактора VIII по сравнению с контрольной группой лиофилизированной свежезамороженной плазмой. Все остальные факторы свертывания крови и показатели не выходят за пределы физиологических нормальных значений. Зависимость была замечена при всех указанных методах испытаний. В результатах не выявлено существенных отклонений независимо от используемого способа вирусинактивации.

«Ранее уже проводились испытания данного типа. Результаты нашего исследования полностью согласуются с результатами, полученными ранее [5–6], а также с более поздними клиническими данными. Лيوфилизированная плазма используется для контроля за кровотечением у пациентов, страдающих гемофилией» [7]. «В эксперименте с участием животных лечение с применением трансфузий лиофилизированной плазмы были позитивные итоги. Наблюдалось повышение ранней выживаемости при политравме и массивных кровотечениях» [8].

Также доказано, что протромбиновое время удлиняется до 70% при множественных травмах с сопутствующим геморрагическим шоком. Применение любого из двух видов плазмы (лиофилизированной или свежезамороженной) – эффективный метод контроля коагулопатии у подобных пациентов [4].

Примечательно, что большая часть исследований, освещающих эффекты лиофилизированной плазмы, была проведена в военных условиях [9–10]. Использование результатов военных исследований для обобщения выводов о клинических эффектах сомнительно, поскольку, в отличие от гражданских условий, в военных условиях объектами изучения являются преимущественно взрослые мужчины молодого возраста. Также существенно отличается друг от друга тип травм. Принадлежность к одному полу и малая разница в возрасте затрудняют сравнение, поэтому необходимо проведение дополнительных исследований, которые покажут эффект от применения лиофилизированной плазмы крови за пределами боевого поля.

Высокие риски инфицирования реципиентов гемотрансмиссивными инфекциями привели к тому, что использование лиофилизированной плазмы резко сократилось в течение 1960-х и 1970-х гг. В настоящее время благодаря различным методам вирусной инактивации

компонентов крови использование лиофилизированной плазмы стало более безопасным, что значительно расширяет возможности ее более широкого применения.

«Лиофилизированная плазма стала гораздо меньше применяться в период между 1960-ми и 1970-ми, так как существовали неоправданно высокие риски инфицирования инфекциями гемотрансмиссивного типа. Современные методы инактивации позволяют более безопасно применять лиофилизированную плазму и вводить материал в массовое потребление» [11].

В источниках детально описывается, как сохраняются коагуляционные белки в плазме крови в условиях сублимационной сушки [12]. В испытаниях проводился анализ количества вещества факторов свертывания крови, которые способны в значительной мере повлиять на пути свертывания. В результате выявлено понижение этих факторов в испытуемых образцах вирусинактивированной лиофилизированной плазмы независимо от пути инактивации. Такой итог совпадает с исследованиями, которые проводили ранее в данной тематике [5–7].

Дополнительно наблюдалось удлинение протромбированного времени и активированного частичного тромбопластинового времени. Предполагается, что причиной служит уменьшение активности действия факторов VIII и V. Важно сказать, что фактор VIII – это тот показатель, по которому проводят контроль качества плазмы крови как в России, так и в Европе, так как он выступает сильно изменяющимся фактором свертываемости [13].

По литературным сведениям, уменьшение наличия фактора VIII независимо от того, была ли проведена вирусинактивация свежемороженой плазмы. В ряде источников показано, что в «размороженной свежемороженой плазме одновременно с фактором VIII снижался фактор V» [14]. В условиях нашего эксперимента количество фактора VIII упало до 60% от первоначальной величины. Однако, по информации из других исследований, «ингибиторы коагуляции в лиофилизированной плазме остаются стабильными» [14].

В результате проведенной работы выявлено, что нет существенной разницы в показателях плазменного гемостаза лиофилизированной плазмы, которая была инактивирована любым из методов. Такие показатели делают возможным вывод, что для лиофилизации можно использовать плазму крови человека, инактивированную любым из исследуемых методов инактивации.

Лиофилизированная (сублимированная) плазма – материал, который снижает затраты дорогостоящей перевозки. Этапы восстановления потребуют в разы меньше временных затрат. Вирусинактивированная лиофилизированная плазма является более удобным для использования препаратом при лечении тяжелой коагулопатии в ситуациях, когда необходимо оказание пациенту экстренной и первой медицинской помощи, или в районах, где отсутствует возможность поддерживать заданные температурные условия для хранения

свежезамороженной плазмы в стабильном состоянии. Действительно, ранняя коррекция коагулопатии плазмой крови является главным фактором выживаемости. Однако имеются сведения о том, что агрессивное и неконтролируемое введение кристаллоидов способно увеличить риск смертности при использовании их для лечения, предшествующего госпитализации. «Плазма крови является методом выбора для предотвращения и значительного снижения смертности у пациентов с коагулопатией при политравме». Наличие лиофилизированной плазмы в арсенале врачей для оказания немедленной помощи пациентам может повысить качество лечения людей с тяжелыми травмами.

Следует отметить, что лиофилизированная плазма также имеет недостатки. Экономически она дороже, чем свежемороженая плазма, на единицу, и ее внедрение в догоспитальное или больничное использование может увеличить расходы. Более того, материально-технические преимущества применения лиофилизированной плазмы могут быть незначительными в городских районах при коротком времени транспортировки. Доказательства того, целесообразно ли использовать короткое время транспортировки для восстановления лиофилизированной плазмы или ускоренной транспортировки, когда в отделении неотложной помощи имеются продукты крови, еще предстоит установить. В настоящее время три научных исследования по оценке применения лиофилизированной плазмы для гражданского использования продолжаются в Норвегии, Франции и Великобритании [15]. Это огромный шаг к расширению знаний о клинических эффектах лиофилизированной плазмы.

**Заключение.** В результате выполненное исследование подтверждает факт, что лиофилизация вирусинактивированной плазмы независимо от метода вирусинактивации не оказывает существенного влияния на уровень содержания факторов свертывания, показатели свертываемости и содержание физиологических антикоагулянтов в плазме. Поэтому по клиническим свойствам вирусинактивированная лиофилизированная плазма может выступать альтернативным вариантом свежемороженой плазмы, но для выявления всех гипотетически свойств и возможных реакций организма нужно проводить ряд дополнительных исследований.

### Список литературы

1. American Association of Blood Banks, American Red Cross, America's Blood Centers, and Armed Services Blood Program. Circular of information for the use of human blood and blood components. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks. Transfusion. 2009. Vol. 48. P. 1711–1714.

2. Чечеткин А.В., Алексеева Н.Н., Тхоржевская З.С. Новое о клиническом применении плазмы (информация о симпозиуме по плазме, предназначенной для непосредственного клинического применения) // Трансфузиология. 2015. Т.16. № 4. С. 53-61.
3. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing. 2015. P. 158-166.
4. Devine D., Sher G. An introduction to new and renewed products for transfusion. Vox Sang. 2018. Vol. 113 (1). P. 6.
5. De Biasi A.R., Stansbury L.G., Dutton R.P., Stein D.M., Scalea T.M., Hess J.R.. Blood product use in trauma resuscitation: plasma deficit versus plasma ratio as predictors of mortality in trauma (CME). Transfusion. 2011. Vol. 51. P. 1925–32.
6. Iapichino G.E., Ponschab M., Cadamuro J., Süßner S., Gabriel C., Dieplinger B., Egger M., Schlimp C.J., Bahrami S., Schöchl H. Concentrated lyophilized plasma used for reconstitution of whole blood leads to higher coagulation factor activity but unchanged thrombin potential compared with fresh-frozen plasma. Transfusion. 2017. Vol. 57 (7). P. 1763-1771. DOI: 10.1111/trf.14123.
7. Maurin O., Martinaud C., Boulesteix G. Management of bleeding in a child with haemophilia in Africa with freeze-dried plasma. Haemophilia. 2012. No 18. P. 38-39.
8. Shuja F., Finkelstein R.A., Fukudome E. Development and testing of low-volume hyperoncotic, hyperosmotic spray-dried plasma for the treatment of trauma-associated coagulopathy. J. Trauma. 2011. No 70. P. 664-671.
9. Sailliol A., Plang S., Martinaud C., Hemovigilance et securite transfusionnelle en operation exterieure. Transfus Clin Biol. 2014. No 21. 229–233.
10. Schlaifer A., Siman-Tov M., Radomislensky I., Prehospital administration of freeze-dried plasma, is it the solution for trauma casualties? J. Trauma Acute Care Surg. 2017. No 83. 675–682.
11. Burnouf T. Recombinant plasma proteins. Vox Sanguinis. 2011. Vol. 100. No 1. P. 68-83.
12. Rock G. A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. Vox Sang. 2011. Vol. 100. P. 169–178.
13. Постановление Правительства РФ от 22.06.2019 N 797 "Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации" // Российская газета. 23 июня 2019 г.
14. Schoenfeld H., Pruss A., Keller M., Lyophilised plasma: Evaluation of clotting factor activity over 6 days after reconstitution for transfusion. J. Clin Pathol. 2010. Vol. 63. P. 726–730.

15. Midwinter M., Crombie N. A multicentre randomised controlled trial of pre-hospital blood product administration versus standard care for traumatic haemorrhage PROTOCOL. Wiley Online Libr . 2017. Vol. 28. P. 346–356.