

сравнению с традиционным подходом. Однако разработка надежной тест-системы для детекции перестроек была ограничена некоторыми методическими сложностями, к которым относятся прежде всего разработка оптимальных смесей олигонуклеотидных праймеров и алгоритм интерпретации результатов секвенирования. В приведенном исследовании разработана и протестирована такая система для детекции клональных перестроек лейкозных клеток при ОЛЛ с использованием высокопроизводительного секвенирования. В отличие от ранее разработанных наборов данная система позволяет детектировать одновременно перестройки всех иммуноглобулиновых локусов, для которых показаны перестройки при ОЛЛ.

Проведенное тестирование системы показало как ее высокую чувствительность, так и достаточно высокую достоверность при сравнении с традиционно используемым аналогом. Дальнейшее развитие данной работы предполагает исследования на большей выборке пациентов и совершенствование программного обеспечения для анализа данных секвенирования. Следующим этапом является создание интегрированной тест-системы, позволяющей проводить не только детекцию перестроек в исходном образце, но и определение непосредственно МОБ в образцах после химиотерапии. Успешная реализация данного проекта приведет к созданию высокопроизводительного метода для высокочувствительного мониторинга МОБ при ОЛЛ.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0118.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015; 125(26): 3996–4009.
2. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257–317.
3. Kotrova M., Muzikova K., Mejstrikova E., Novakova M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fiser K., et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015; 126(8): 1045–7.
4. Wu D., Sherwood A., Fromm J.R., Winter S.S., Dunsmore K.P., Loh M.L., et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(134): 134ra163. doi: 10.1126/scitranslmed.3003656.
5. Wu J., Jia S., Wang C., Zhang W., Liu S., Zeng X., et al. Minimal Residual Disease Detection and Evolved IGH Clones Analysis in Acute B Lymphoblastic Leukemia Using IGH Deep Sequencing. *Front. Immunol.* 2016; 7: 403.
6. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G., Degenhard E., Goebeler M.E., Klinger M., et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012; 120(26): 5185–7. doi: 10.1182/blood-2012-07-441030.
7. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2012; 19(4): 313–8. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283543d5c.
8. Clemente M.J., Przychodzen B., Jerez A., Dienes B.E., Afaible M.G., Husseinadeh H., et al. Deep sequencing of the T-cell receptor repertoire in CD8+ T-large granular lymphocyte leukemia identifies signature landscapes. *Blood*. 2013; 122(25): 4077–85. doi: 10.1182/blood-2013-05-506386.
9. Faham M., Zheng J., Moorhead M., Carlton V. E., Stow P., Coustan-Smith E., et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(26): 5173–80. doi: 10.1182/blood-2012-07-444042.
10. Ladetto M., Brüggemann M., Monitillo L., Ferrero S., Pepin F., Drandi D., et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28(6): 1299–307.
11. Logan A.C., Vashi N., Faham M., Carlton V., Kong K., Buno I., et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(9): 1307–13. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.04.018.

Поступила 10.11.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.382.041

Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ПЛАЗМЫ С СОХРАНЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Применение лиофилизированной плазмы имеет ряд преимуществ перед свежесамороженной плазмой (СЗП) как для оказания трансфузионной помощи в полевых условиях, так и для проведения диагностических исследований системы гемостаза. Выполнение диагностических исследований требует наличия биологических стандартов, плазм-калибраторов и контрольных материалов с высокой стабильностью целевых показателей при хранении лиофилизированных реагентов. Процесс лиофилизации плазмы вызывает значительные изменения коагулологических показателей и сопровождается повышением ее pH. Целью работы являлось получение лиофилизированной плазмы крови человека без выраженных при лиофилизации и хранении изменений активности факторов свертывания крови. Показано, что подкисление пулированной СЗП от не менее 20 доноров перед лиофилизацией до значений pH 7,0–7,1 буферным раствором HEPES в конечной концентрации 50 мМ повышало стабильность факторов системы гемостаза и сохраняло физиологический уровень pH плазмы после лиофилизации. В условиях ускоренного хранения именно такие лиофилизированные плазмы характеризовались большей стабильностью всех определяемых коагулологических показателей. Таким образом, предложенный подход позволяет получать стабильные при хранении лиофилизированные формы диагностических реагентов и контрольных материалов.

Ключевые слова: лиофилизированная плазма; pH; методы стабилизации; факторы свертывания крови; плазм-калибраторы; гемостазиологические стандарты.

Для цитирования: Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г. Получение лиофилизированной плазмы с сохраненной активностью факторов свертывания. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 204–208. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-204-208>

Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Gurvits I.D., Anisimova E.V., Savchenko V.G.

PREPARING LYOPHILIZED PLASMA WITH THE PRESERVED ACTIVITY OF COAGULATION FACTORS

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

The use of a freeze-dried plasma has a number of advantages over fresh frozen plasma (FFP) as for the provision of transfusion care in the field conditions, as well for the carrying out diagnostic studies of the hemostatic system. The execution of diagnostic tests requires for the availability of Biological Standards, plasma calibrator and control material with high stability of target indices in the storage of lyophilized reagents. Plasma lyophilization process causes significant changes in coagulation indices and is accompanied by an increase in plasma pH. The aim of the study was to obtain a freeze-dried human plasma without the pronounced changes in the activity of clotting factors under lyophilization and storage. The acidification of pooled FFP from at least 20 donors before lyophilization to pH values of 7.0–7.1 by HEPES buffer solution at a final concentration of 50 mM was shown to increase the stability of the hemostatic system factors and retain physiological plasma pH after lyophilisation. In conditions of an accelerated storage just so lyophilized plasmas are characterized by the greater stability of all determined coagulation indices. Thus, the proposed approach makes it possible to obtain storage-stable, lyophilized forms of diagnostic reagents and control materials

Key words: freeze-dried plasma; pH; stabilization methods; clotting factors; plasma calibrators; hemostatic standards.

For citation: Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Gurvits I.D., Anisimova E.V., Savchenko V.G. Preparing lyophilized plasma with the preserved activity of coagulation factors. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(4): 204–208. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-204-208>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26 September 2016

Accepted 22 November 2016

Плазма крови человека используется в клинической трансфузионной практике и является объектом диагностики при исследовании нарушений системы гемостаза. В настоящее время наиболее распространенным средством лечения коагулопатий является свежемороженая плазма (СЗП). Однако ее применение в полевых условиях и в труднодоступной местности имеет ряд ограничений, связанных с хранением и транспортировкой при необходимых для обеспечения функциональной полноценности низких температурах. Указанных недостатков лишена лиофилизированная плазма, которая для своего хранения не требует заморозки и отрицательных температур [1–3]. Эффективность плазмы человека после сублимационной сушки/регидратации показана при лечении больных гемофилией [2, 3], массивных кровотечений у военнослужащих в полевых условиях [4]. Клиническое применение лиофилизированной плазмы предполагает обеспечение ее патогенной инактивации, что в настоящее время может быть осуществлено различными методами [4–6]. Лيوфилизированная плазма только тогда пригодна для трансфузии, когда в процессе ее приготовления в ней не нарушается баланс свертывающей и противосвертывающей систем. В США запатентован метод получения стабильной вирус-инактивированной лиофилизированной плазмы, предназначенной для оказания медицинской помощи в полевых условиях. Показано, что наиболее эффективными стабилизаторами являлись глутамин-дипептиды, глутамин и глицин. Кроме обеспечения гемостатического потенциала, проведенная стабилизация белков плазмы повышала их устойчивость к γ -облучению, что позволяло стерилизовать лиофилизированный препарат. Разработанная лиофилизированная

плазма была эффективным средством лечения военнослужащих, получивших ранения в боевых условиях [7].

Важной областью применения образцов лиофилизированной плазмы является использование их для диагностики нарушений гемостаза. Выполнение таких исследований требует наличия биологических стандартов, плазм-калибраторов и контрольных материалов с высокой стабильностью при хранении. Долгосрочная стабильность и упрощенная логистика транспортировки и распределения реагентов достигаются лиофилизацией таких материалов. Оценку стабильности референсных материалов проводят в тесте ускоренного хранения (accelerated degradation tests) по критериям ВОЗ. Особое значение при получении таких материалов имеет процесс лиофилизации и анализ сублимированных реагентов по специфической целевой активности, остаточной влажности, степени окисления, термическим свойствам [1, 7, 8]. Применение качественных лиофилизированных плазм-калибраторов, субстратных плазм, стандартов, контрольных материалов и диагностикумов является также способом стандартизации исследований, обеспечивающим объективность/правильность получаемых результатов при клинической диагностике коагулопатий [1, 8–10]. Одной из основных причин диагностических ошибок при определении параметров свертывающей и противосвертывающей систем крови является недостаточная стабильность используемых в тесте реагентов. Изменения аттестованных значений происходят преимущественно в растворенном состоянии, однако и при хранении лиофилизированных материалов отмечено уменьшение активности различных факторов системы гемостаза [1, 5, 9, 11]. Наиболее выраженные изменения после лиофилизации свежемороженой вирус-инактивированной плазмы человека были характерны для факторов свертывания. Показано, что после сублимационной сушки и через 10 дней ускоренного хранения при 40°C активность факторов FV, FVII, FVIII, FIX и FX значительно снижалась, что вызывало пролонгирование тестов протромбинового времени (ПТВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). При этом наиболее лабильными были FV и FVIII. На активность антитромбина (АТ) III, протеинов С и S лиофилизация значимого влияния не оказывала [1]. Кроме этого в плазме, подвергнутой сублимационной сушке, происходило существенное повышение величины рН с физиологических 7,1–7,4 до щелочных значений порядка 8,5, что, вероятно, и обуславливает снижение активности факторов свертывания [1, 11]. Эти изменения определяют необходимость разработки метода производства лиофилизированной плазмы с повышенной стабильностью факторов гемостаза при температуре окружающей среды, физиологических значениях рН и осмолярности. В настоящее время устойчивость гемостати-

Для корреспонденции:

Берковский Арон Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фракционирования белков крови и стандартизации методов контроля препаратов плазмы ГНЦ Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: aron56@mail.ru.

For correspondence:

Berkovskiy Aron L., MD, PhD, head of the laboratory of the Laboratory of fractionation of blood proteins and standardization of methods for control of plasma preparations of National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: aron56@mail.ru.

Information about authors:

Berkovskiy A.L., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=274100, SPIN-код: 7483-6451, Author ID: 274100; Sergeeva E.V., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=715035, SPIN-код: 9945-5440, Author ID: 715035; Suvorov A.V., http://elibrary.ru/author_profile.asp?id=715044, SPIN-код: 7178-4822, Author ID: 715044; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>, Researcher ID: C-6191-2016, Scopus Author ID: 8532861000.

Таблица 1
Изменения pH плазмы после лиофилизации
в зависимости от pH СЗП до сушки

Образец плазмы	pH плазмы	
	до лиофилизации	после лиофилизации
Без стабилизатора	7,35 ± 0,05	8,2 ± 0,05
Контроль	7,35 ± 0,05	7,8 ± 0,05
Опыт	7,0 ± 0,05	7,35 ± 0,05

ческих показателей в лиофилизированной плазме обеспечивают добавлением к плазме до сушки стабилизатора (преимущественно глицин), а физиологические значения pH – подкислением плазмы лимонной кислотой или добавлением различных буферных растворов [1, 7–9, 12]. Такой стабилизирующей способностью обладает буферный раствор HEPES [13].

Цель работы заключалась в исследовании возможности получения лиофилизированной плазмы крови человека с сохранением активности факторов свертывания крови при лиофилизации и хранении с помощью буферного раствора HEPES.

Материал и методы

Леофилизированную плазму получали из СЗП крови человека, характеризующейся биологической (гемостатической) полноценностью и получаемой согласно существующим требованиям [14–17]. В работе применяли СЗП доноров после карантинизации. Для исключения возможных индивидуальных различий используемых доз СЗП исследование проводили на пулированной плазме, объединяя СЗП от не менее 20 доноров. Получение лиофилизированной плазмы проводили следующим образом.

К пулированной СЗП добавляли 40% буферный раствор HEPES до конечной концентрации в плазме 50 мМ. При этом pH плазмы до лиофилизации оставляли в физиологической области 7,35 ± 0,05 (контроль) или подкисляли до 7,0 ± 0,05 (опыт). Полученную плазму разливали по 1 мл в силиконированные стеклянные флаконы, замораживали в леофильной сушке (“VirTis”, США) со скоростью изменения температуры полки -1 °C в 1 мин от комнатной температуры (24 °C) до -40 °C и выдерживали в течение 3 ч. Первичную сушку проводили при температуре -20 °C в течение 40 ч. Затем температуру повышали до 30 °C и вторичную сушку при этой температуре проводили в течение 10 ч. В этом же режиме проводили лиофилизацию СЗП без добавления стабилизатора.

Измерение активности факторов гемостаза в пробах контрольной и опытной лиофилизированной плазмы после регидратации проводили общепринятыми методами: фибриноген методом Клаусс, FV, FVIII, FIX одностадийным клоттинговым методом на коагулологическом анализаторе ACL Elite Pro (IL, США) и АТIII – хромогенным методом. Определяли также ПВ и АЧТВ. Остаточную влажность в лиофилизированной плазме измеряли по методу Фишера. Указанные показатели измеряли в пробах до и после лиофилизации/регидратации, через 7 сут ускоренного хранения при 37 °C, через 2, 4 и 24 ч хранения в разведенном (рабочем) состоянии при 24 °C. Статистическую оценку полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Леофилизация пулированной СЗП без добавления стабилизатора вызывала существенные изменения показателей гемостаза. При исследовании 5 пулированных СЗП активность FV, FVIII и содержание фибриногена после сублимационной сушки

снижались в среднем на 38, 24 и 12% соответственно. Значения АЧТВ и ПВ после лиофилизации повышались на 16 и 11%. При этом значение pH плазмы увеличивалось от 7,35 до 8,2 (табл. 1). С целью повышения буферной емкости к пулированной СЗП до лиофилизации добавляли стабилизатор, буфер HEPES, до конечной концентрации 50 мМ, не изменяя физиологических значений pH 7,3–7,4. В этом случае изменения показателей гемостаза после сублимационной сушки по сравнению с таковыми в плазме без стабилизатора были менее выраженными (табл. 2, контроль). Активность FV, FVIII и концентрация фибриногена снижались на 18, 17 и 4%, а значения АЧТВ и ПВ увеличились на 6 и 8%. При этом в процессе лиофилизации такой плазмы pH увеличился только до 7,8 ± 0,05. Затем к пулированной СЗП добавляли буферный раствор HEPES таким образом, чтобы до лиофилизации ее pH был равен 7,0–7,1, что обеспечивало в процессе сушки сохранение pH на физиологическом уровне 7,35 ± 0,05. Значения показателей гемостаза в полученной плазме после лиофилизации (опыт) представлены в табл. 2. В этих условиях активности FV и FVIII в процессе лиофилизации снижались в меньшей степени, а содержание фибриногена, величин АЧТВ и ПВ практически не изменялись; различие с таковыми в плазме без стабилизатора было статистически значимым. Остаточная влажность получаемых лиофилизированных плазм не превышала 1,5%.

Суммарные данные по результатам определения pH в семи изученных пулированных плазмах представлены в табл. 1.

На следующем этапе изучали стабильность лиофилизированной плазмы в зависимости от значений ее pH при ускоренном хранении в течение 7 дней при температуре 37 °C. Результаты в виде среднего арифметического для измерений каждого показателя в 7–10 испытуемых плазмах представлены в табл. 2.

Анализ представленных в табл. 2 данных показывает, что лиофилизация снижала активность определяемых факторов свертывания и АТ III и повышала значения ПВ и АЧТВ в плазмах с величинами pH до сублимационной сушки и 7,35 ± 0,05 и 7,0 ± 0,05 (после сушки 7,8 ± 0,05 и 7,35 ± 0,05; контроль и опыт соответственно). Статистически значимое уменьшение после лиофилизации отмечено для FV и FVIII (на 28 и 17%) только в контроле. Отсутствие статистически значимых изменений других определяемых показателей после лиофилизации в контроле может быть обусловлено стабилизирующим действием буфера HEPES и менее щелочным значением pH по сравнению с pH СЗП без стабилизатора после лиофилизации. Вызываемые сублимационной сушкой изменения величин всех гемостазиологических показателей в опытных плазмах были менее выражены по отношению к таковым и в плазме без стабилизатора и в контроле. Уменьшение активности FV и FVIII после лиофилизации плазм с pH до сушки 7,0–7,1 (после сушки 7,3–7,4) составляло только 15 и 5%.

Значительные различия величин коагулологических показателей между контрольными и опытными плазмами отмечены при их хранении в течение 7 дней при 37 °C. По сравнению с показателями в плазме до лиофилизации в контроле активности FV, FVIII и FIX статистически значимо снижались на 49, 45 и 24% соответственно, а значения ПВ и АЧТВ увеличились на 14 и 18%. В плазмах с физиологической величиной pH после сушки (опыт) эти изменения составляли 18, 12, 12, 4 и 4% соответственно. Различия степени стабильности коагулологических показателей при ускоренном хранении между контрольными и опытными плазмами были статистически значимыми ($p < 0,05$) для FV, FVIII и АЧТВ.

Таблица 2

Изменения коагулологических показателей в процессе лиофилизации и при ускоренном хранении лиофилизированной плазмы с pH до сушки 7,3 ± 0,05 (контроль) и 7,0 ± 0,05 (опыт)

Время определения	Коагулологические показатели													
	FV, %		FVIII, %		FIX, %		фибриноген, г/л		ПВ, с		АЧТВ, с		АТIII, %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До лиофилизации	128	133	95	108	112	108	2,5	2,61	13,1	13,4	33	31,7	103	98
После лиофилизации	92	113	79	103	108	104	2,4	2,6	14,2	13,3	35	32,2	96	95
Через 7 сут хранения при 37 °C	65	109	52	91	85	95	2,2	2,7	14,9	14	39	33,1	92	95

Таблица 3

Изменения коагулологических показателей при хранении лиофилизированной плазмы с рН до сушки $7,3 \pm 0,05$ (контроль) и $7,0 \pm 0,05$ (опыт) в растворенном состоянии при комнатной температуре

Время хранения при температуре 24°C	Коагулологические показатели													
	FV, %		FVIII, %		FIX, %		фибриноген, г/л		ПВ, с		АЧТВ, с		АТIII, %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
После регидратации:	92	113	79	103	108	104	2,4	2,6	14,2	13,3	35	32,2	96	95
2 ч	89	110	74	98	99	98	-	-	14,2	13,2	35,7	31,9	-	-
4 ч	85	110	70	96	97	95	-	-	14,2	13,3	36	31,4	95	94,6
24 ч	80*	107	62*	93	91	93	2,35	2,6	14,7	14,5	36	31,7	94	93,4

Примечание. * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению со значением после регидратации.

Мы также изучили стабильность показателей в тех же контрольных и опытных образцах плазмы после лиофилизации/регидратации, находящихся в разведенном состоянии при комнатной температуре в течение 1 сут. Полученные данные представлены в табл. 3. Хранение лиофилизированных образцов плазмы после регидратации при комнатной температуре в течение 24 ч вызывало снижение активности FV, FVIII и FIX как в контрольных, так и в опытных образцах плазмы. Статистически значимые различия с таковыми сразу после регидратации отмечены для FV и FVIII только в контроле. Содержание фибриногена, АТIII и значения ПВ и АЧТВ при хранении лиофилизированных образцов плазмы после их регидратации в течение 1 сут при 24 °C практически не изменялось как в контроле, так и в опыте.

Обсуждение

Плазменные факторы свертывания крови являются относительно нестабильными и поэтому требуется добавление к плазме до лиофилизации соединений, способных сохранять их функциональную активность при сублимационной сушке и последующем хранении. В настоящее время разработаны методы повышения стабильности факторов системы гемостаза за счет добавления к плазме агентов, относящихся к «полиолам», таких как сахара (сахароза, тригалаза, маннитол), глутамин-дипептиды, глутамин и глицин [1, 8, 12]. В ряде работ [1, 7, 11, 12, 18] показано, что наиболее эффективным стабилизатором гемостатических факторов в процессе лиофилизации и хранения плазмы является глицин. Глицин предотвращал снижение коагулологической активности наиболее лабильных FV и FVIII после лиофилизации и хранения на 21 и 17% соответственно и был самым эффективным из изученных «полиолов» протектором для других плазменных клоттинговых факторов. После сублимационной сушки происходит повышение рН плазмы от физиологических до щелочных [6, 11] значений, что обусловлено практически полной потерей плазмой CO_2 в процессе лиофилизации [1]. Эти изменения крайне нежелательны как при лечении больных с помощью лиофилизированной плазмы крови человека, так и при производстве лиофилизированных гемостазиологических референсных материалов с диагностической целью в связи со снижением стабильности показателей гемостаза в такой плазме. Результаты проведенных исследований [1, 11] предполагают, что для предотвращения снижения активности показателей гемостаза в лиофилизированных референсных материалах при сушке и хранении необходимо стабилизировать белки плазмы и подавлять защелачивание плазмы при лиофилизации. Задачей нашей работы являлось обеспечение сохранности активности показателей гемостаза в лиофилизированных препаратах плазмы с помощью одного активного в этом отношении соединения, а именно концентрированного буферного раствора HEPES.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что подкисление СЗП этим буфером до лиофилизации обеспечивало сохранение активности факторов свертывания в плазмах после сублимационной сушки. Проведенное исследование показало, что повышение буферной емкости плазмы при лиофилизации с помощью буферного раствора HEPES, обеспечивающие физиологические значения рН плазмы после сублимационной сушки, позволило снизить степень изменений коагулологических показателей, вызываемых лиофилизацией. Сохранение физиологических значений рН плазмы после лиофилизации согласно

полученным в работе данным обеспечивало стабильность параметров системы гемостаза в условиях ускоренного хранения. По нашему мнению, стабилизирующая белки плазмы способность буфера HEPES и подкисление с его помощью плазмы до лиофилизации обуславливали и сохранение активности факторов свертывания в течение 24 ч после регидратации лиофилизированной плазмы.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность сохранения активности коагулологических показателей при лиофилизации пулированной донорской СЗП и ее дальнейшем хранении. Повышенная стабильность системы гемостаза в лиофилизированной плазме достигалась подкислением СЗП до сублимационной сушки концентрированным буферным раствором HEPES, что сохраняло физиологические значения рН плазмы в процессе лиофилизации и хранения. Предлагаемый метод позволяет проводить сублимационную сушку СЗП без значительной потери активности факторов свертывания крови в условиях физиологического рН и длительно хранить такую лиофилизированную плазму без статистически значимых изменений величин ПВ, АЧТВ и активности коагулологических факторов. Данный подход может обеспечить получение стабильных при хранении лиофилизированных форм диагностических реагентов и контрольных материалов. После вирусной инактивации такие лиофилизированные плазмы позволяют также увеличить эффективность их клинического применения, в частности, в военно-полевых условиях.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Савиных Е.Ю. Получение лиофилизированных субстратов для исследования активности плазменных прокоагулянтов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; 1999.
- Савиных Е.Ю., Тарасова В.Н., Платонова Г.К. Субстратные плазмы в методах исследования коагуляционного гемостаза. В сборнике материалов науч.-практ. конф. «Препараты крови и кровезаменители, производство, контроль, применение», 1995, Киров; 1995: 41–3.
- Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Утв. Постановлением №29 Правительства РФ от 26.01.2010, <http://base.garant.ru/12172686/> (дата обращения 09.10.2016).
- Рагимов А.А., Щербакова Г.Н. Руководство по инфузионно-трансфузионной терапии. М.: Медицинское Информационное Агентство; 2003.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Bakaltcheva I., O'Sullivan A.M., Hmel P., Ogbu H. Freeze-dried whole plasma: Evaluation sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thromb. Res.* 2007; 120(1): 105–15.
- Krutvachio T., Chuansumrit A., Isarangkura P., Pintadit P., Hathirat P., Chiewsilp P. Response of hemophilia with bleeding to fresh dry plasma. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1993; 24 (Suppl. 1): 169–73.
- Chuansumrit A., Krasaesub S., Angchaisuksiri P., Hathirat P., Isarangkura P. Survival analysis of patients with haemophilia at the International Haemophilia Training Centre, Bangkok, Thailand. *Haemophilia.* 2004; 10(5): 542–9.
- Sailliol A. *Blood plasma lyophilization process.* Patent US 0143198 A1; 2013.
- Hellstern P., Sachse H., Schwinn H., Oberfrank K. Manufacture and in vitro characterization of a solvent/detergent-treated human plasma. *Vox Sang.* 1992; 63(3): 178–85.

6. Trobisch H. Results of a quality-control study of lyophilized pooled plasmas which have been virally inactivated using a solvent detergent method (modified Horowitz procedure). *Beitr. Infusionsther.* 1991; 28: 92–109.
7. Bakaltcheva I. *Freeze-dried plasma format for the trauma care field*. Patent US 0233671 A1; 2010.
8. Matejtschuk P., Stanley M., Jefferson P. Freeze-drying of biological standards. In: Rey L., May J.C., eds. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York, London: Informa Healthcare; 2010: 317–53.
9. Savinykh E.Yu. Preparation of lyophilized substrates for the study of plasma procoagulant activity. Dis. St.Peterburg; 1999. (in Russian)
10. Savinykh E.Yu., Tarasova V.N., Platonova G.K. Substrate plasma in the research methods of coagulation. In: Blood products and blood substitutes, production, control and application: Proceeding of the Science Practice Conference. Kirov; 1995: 41–3. (in Russian)
11. Hugler P., Trobisch H., Neuman H., Moller A., Sirtl C., Derdak M., et al. Quality control of three different conventional fresh-frozen plasma preparations and one new virus-inactivated lyophilized pooled plasma preparation. *Klin. Wochenschr.* 1991; 69(3): 157–61.
12. Bakaltcheva I., Ketchum L. Method of producing glycine-stabilized lyophilized plasma. Patent US 7,931,319; 2011.
13. Heimbürger N., Sieber A., Schwinn H. Stable plasma, process for preparing it and its use as comparative plasma in coagulation tests. Patent US4,056,484; 1977.
14. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, blood-substituting solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree №29 of 26 Jan 2010. (in Russian). Available at: <http://base.garant.ru/12172686/> (Accessed 09.10.16).
15. Ragimov A.A., Shcherbakova G.N. *Guide infusion-transfusion therapy*. Moscow: Medical Information Agency; 2003. (in Russian)
16. Sword-Nilsson A.M., Persson P.O., Johnson U., Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang.* 2006; 90(1): 33–9.
17. 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.
18. Wilder D., Reid N., Bakaltcheva I. Hypertonic resuscitation and blood coagulation. In vitro comparison of several hypertonic solutions for their action on platelet and plasma coagulation. *Thrombos. Res.* 2002; 107(5): 255–61.

Поступила 26.09.16
Принята к печати 22.11.16

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.273.5.03:616.151.514.012

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И МОДИФИКАЦИИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,
127051, Москва, Россия

Основным методом лечения гемофилии А и В является заместительная терапия с использованием препаратов, получаемых из плазмы доноров или посредством технологии рекомбинантных ДНК. Среди основных недостатков немодифицированных препаратов факторов VIII и IX (FVIII и FIX) следует выделить низкий период циркуляции препарата в организме больного и выработку антител (ингибиторов) к белку препарата, что существенно снижает их эффективность. Повышение эффективности и безопасности рекомбинантных препаратов достигается за счет удаления В-домена в молекуле FVIII, пегилирования или разработки препаратов на основе слитных белков (fusion proteins – слияние молекулы препарата с альбумином или Fc-фрагментом IgG). Данные модификации в первую очередь способствуют повышению стабильности молекулы действующего вещества, увеличению периода полувыведения и снижению иммуногенности рекомбинантных препаратов. Заместительная терапия традиционными препаратами больных гемофилией, у которых определяются антитела (ингибиторы) к препарату, не эффективна. Учитывая это, в последние годы были разработаны новые препараты для альтернативных подходов методов лечения гемофилии. Разработан препарат на основе биспецифичных моноклональных антител, имитирующий функцию FVIII; моноклональные антитела и аптамер, блокирующие активность ингибитора пути тканевого фактора, и препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида, блокирующий мРНК, ответственную за синтез антифактора III. Основным преимуществом новых препаратов является то, что они не вызывают выработку антител к факторам свертывания и могут быть использованы для лечения больных с наличием в плазме крови ингибиторов.

Ключевые слова: гемофилия; рекомбинантный фактор VIII; рекомбинантный фактор IX; пегилированные белки; препараты моноклональных антител; препараты на основе слитных белков/fusion proteins; аптамер; антисмысловые олигонуклеотиды.

Для цитирования: Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 208–215. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-208-215>

Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir Yu.V., Bondarev V.P.

MAIN DIRECTIONS FOR THE DEVELOPMENT AND MODIFICATION OF PREPARATIONS FOR THE TREATMENT OF HEMOPHILIA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The basic method of the treatment of haemophilia A and B is the replacement therapy by preparations obtained from plasma of donors, or by recombinant DNA technology. Among the major shortcomings of unmodified drugs VIII and IX factors should be allocated between the low time circulation of the drug in the body of the patient and the delivery of antibodies (inhibitors) to a protein preparation that significantly reduces their effectiveness. The improvement of the efficiency and safety of recombinant preparations is achieved by removing B-domain of factor VIII molecule, pegylation or development of preparations of fusion proteins (fusion molecules of the preparation to the albumin or Fc-fragment of IgG). These modifications,