

РАЗВИТИЕ ПРАВИЛ GMP

Докт. техн. наук А.Е.Федотов

Ассоциация инженеров по контролю микрозагрязнений, г. Москва

Наверное, редкое явление вызывает такой интерес, столько споров и недоразумений как правила GMP. Еще недавно слово «валидация» представлялось туманным и загадочным, а чистые помещения казались чем-то трудно достижимым и не очень понятным. Попытаемся разобраться, в чем же дело.

Что такое GMP?

Первые правила GMP появились примерно 40 лет назад в США и Европе. GMP - Good Manufacturing Practice, переводятся как «Правила надлежащего производства». С тех пор в странах запада любое предприятие, чтобы получить лицензию на выпуск лекарственных средств, должно соответствовать правилам GMP.

В основе правил GMP лежит следующая фундаментальная идея. Лекарственные средства – это особый вид продукции. Они не могут быть проверены неразрушающими методами контроля, т. е. каждую единицу продукции в отдельности проверить нельзя. Можно проверить только какую-то выборку из серии продукции и по этой выборке судить о всей серии. Поскольку лекарственные средства – высокоответственная продукция, то это суждение должно быть достоверным на 100%. Можно ли это достичь? Да, можно. Если обеспечить 100%-повторяемость, стандартность процесса производства.

Согласно идеологии GMP хорошо **контроль качества продукции не является гарантией качества**. Качество продукции обеспечивается организацией и технологией производства, так, чтобы **любой образец из серии продукции на 100% повторял свойства всей серии**. В этом и состоит основная цель GMP: **продукт должен всегда производиться одинаково и одинаковыми свойствами**.

Необходимость в правилах GMP видна на примере производства стерильных препаратов. Известно, что уровень стерильности препаратов, подлежащих стерилизации в окончательной первичной упаковке, должен быть не менее 10^{-6} . Это означает, что в миллионе ампул должно быть менее одной нестерильной ампулы. Возникают два вопроса:

- Как проверить такой уровень стерильности?
- Как обеспечить его в серийном производстве?

Для того, чтобы сделать статистически достоверное заключение об отсутствии контаминированной ампулы с уровнем стерильности 10^{-6} , нужно проверить на стерильность миллионы ампул, т. е. на производстве все серии целиком должны расходоваться на проверку стерильности! Этого сделать невозможно. Такие масштабные эксперименты проводят только крупнейшие компании только при отработке новых технологий. Например, в начале 80-х годов ведущими американскими компаниями проводился

эксперимент по доказательству эффективности изолирующей технологии, при котором израсходованы были миллионы единиц продукции. В серийном производстве такая постановка вопроса нереальна, при ней теряется сам смысл производства. Выполняемый заводскими лабораториями контроль стерильности позволяет выявить грубый брак, но никак не может доказать соответствие уровня заданному значению.

Выход из положения состоит в **организации производства** по GMP и **валидации** критических процессов и оборудования, при которой доказываются, что данная единица или процесс работают именно так, как положено.

Это означает, что продукт должен гарантированно соответствовать своей формуле, не содержать посторонних включений, иметь правильную этикетку и не терять своих свойств при транспортировании и хранении. Чтобы это достичь, на предприятии должна быть создана система управления качеством, внедрено сплошное документирование так, чтобы любое действие выполнялось только в соответствии с письменной инструкцией, персонал, оборудование, помещения и технологический процесс должны соответствовать определенным нормам и т. д.

Если говорить коротко, то правила GMP направлены на то, чтобы лекарство гарантированно соответствовало своему назначению, было правильно упаковано и этикетировано и не утратило своих свойств на пути к потребителю.

За прошедшие 40 лет правила GMP хорошо отработаны на практике во многих странах. Они постоянно развиваются и охватывают широкий спектр продукции медицинской промышленности.

Являются ли правила GMP чем-то новым для нас?

Можно с уверенностью сказать, что нет. То, что лежит в их основе – сплошное документирование, обеспечение качества за счет четкой организации и технологии производства, а не контроля готовой продукции, поиска и устранения «узких» мест, все это было хорошо отработано в передовых отраслях отечественной промышленности еще 30-40 лет назад. Взять хотя бы комплексную систему управления качеством продукции и единую систему конструкторской документации, основы которых были заложены у нас и нашли применение во всем мире, труды проф. Бердичевского по надежности технических систем и пр. Разница в том, что за рубежом достижения передовых отраслей в этой области практически сразу были восприняты медицинской промышленностью, а у нас развитие производство шло по остаточному принципу.

Можно ли прожить без правил GMP?

Да, можно, но не долго. Давно известно, что если предприятие не развивается, не ставит перед собой задачу освоения новых рынков, в том числе зарубежных, а также обновления номенклатуры продукции, – оно безнадежно, обречено на застой и потерю занимаемых позиций. Поэтому освоение правил GMP – это веление времени, объективная необходимость, диктуемая логикой развития производства.

В чем трудности внедрения GMP?

Как правило, основным препятствием считают необходимость крупных вложений средств. Это справедливо, но лишь отчасти и не всегда. Серьезных капитальных затрат требует технологическое оборудование, а для стерильного производства – и чистые помещения (см. таблицу).

Составляющие GMP	Материальные затраты	Значение
1. Организация производства: - документирование - система управления качеством - подготовка персонала	Незначительны	Составляют суть GMP и дают эффект уже до технического перевооружения производства.
2. Технологическое оборудование, в т. ч подготовка воды. Валидация	Составляют основной удельный вес в реконструкции производства	Позволяют вывести производство на уровень требований GMP
3. Чистые помещения	После технологического оборудования занимают второе место по затратам	Обязательны для стерильного производства. Для нестерильного производства целесообразна соблюдение требований к чистоте, без обязательной классификации чистых помещений. Распространена практика неоправданных затрат на чистые помещения и низкий уровень их исполнения

Между тем, основа GMP – система управления качеством, комплекс организационных мероприятий, включая создание системы организационной документации, включая сплошное документирование, воспитание персонала работать и вести себя только так, как записано в инструкции, не требует материальных средств. Особую трудность представляет собой персонал. В июне 2002 г. на семинаре в Госстандарте России выступал один из руководящих работников FDA США Патрик Вильсон. По его мнению весь смысл документирования по GMP сводится к двум простым задачам:

- все, что делается, нужно оформлять документально,
- делать нужно только так, как записано в документе.

Это – предельно простые правила. Но их реализация порой наталкивается на непреодолимые препятствия. Точнее говоря – **непреодолимые для данного контингента и данной системы контроля.** Нужно отчетливо понимать, что это – реальная трудность. Люди, привыкшие в повседневной жизни ходить на красный сигнал светофора, т. е. постоянно нарушать правила, склонны переносить этот стиль поведения и на производство. Но этот стиль нужно ломать. Нужно вводить адекватную систему контроля и стимулирования, при которой персонал утратил бы желание нарушать правила. Не сделав этого, расходо-

вать деньги на технологию и чистые помещения – пустая затея.

Проблема персонала трудна не только у нас. На одной из крупных международных конференций известный специалист д-р Клеменс прямо заявил, что приучить персонал мыть руки после туалета, не вытирать пальцами нос и не курить в непопозволенных местах – половина дела. Общеизвестны проблемы с гигиеной персонала и применением косметики, причем не только в фармацевтическом производстве, но и везде, где есть чистые технологии, в том числе и в микроэлектронике. Все эти проблемы должны быть решены на предприятии в начальный период внедрения GMP и проходить красной нитью в производственной жизни. Это - первая и основная трудность.

Вторая трудность заключается не в отсутствии денег, а в том, что они расходуются нерационально. Это вызвано низким качеством и ненужным усложнением проектов, устаревшими нормами и правилами, искусственными усложнениями в ОСТа 510-42-98 и пр. Большие средства, порой искусственно завышенные, идут порой на валидацию.

На практике данные о расходовании средств на GMP часто включают затраты, не имеющие отношения к GMP. Это, например,:

- благоустройство территории,
- оборудование проходной с шлагбаумом,

- - оборудование подстанции и теплопункта,
- - прокладку и переустройство коммуникаций,
- - ремонт зданий, разного рода общестроительные работы, включая отделку фасадов,
- - введение элементарной культуры производства,
- - выполнение строительных и санитарных норм и правил, которые существовали десятилетиями до появления GMP.

Отдельно остановимся на последнем пункте таблицы. Чистые помещения невысоких классов (зоны С и D по GMP или классы 7 ИСО и 8 ИСО) не требуют больших затрат на обеспечение чистоты. Более того, для обеспечения чистоты в них вполне достаточно кратностей воздухообмена, определяемых по санитарным нормам, условию удаления вредных веществ и пр. Но поскольку эти требования далеко не всегда выполнялись, их приходится планировать при внедрении GMP.

Что делать?

В первую очередь нужно знать, куда и как идти. А путеводителем являются стандарты и правила, т.е. нормативные документы. С библейских времен известно: «если слепой поведет слепого, то оба упа-

дут в яму». В нашем случае – это пустые затраты, дезориентация производства, перспектива множественных переделок, выпуск неконкурентоспособной продукции. Актуальность **правильных норм**, их приоритетный характер являются азбучной истиной.

Единственный реальный путь для нас – это прямое введение в России международных стандартов и правил, в частности, **Правил производства лекарственных средств и активных фармацевтических субстанций Европейского Союза – GMP ЕС**. Их принятие будет означать старт масштабной практической работы по введению в России всего комплекса сопутствующий документов.

Еще в 1997 году нами был выполнен перевод на русский язык полного текста Правил GMP ЕС, включая 14 приложений, который был издан отдельной книгой. Суммарный тираж издания составил 1500 экз., что говорит о высокой заинтересованности промышленности в этом документе.

В настоящее время подготовлен перевод издания GMP ЕС 2002 года, в который дополнительно вошли еще четыре приложения. Начата работа по подготовке технического регламента России, являющегося идентичным переводом текста GMP ЕС.

Мы приглашаем всех специалистов к обсуждению этого документа.

ПРОФИЛАКТИКА ДЕФИЦИТА ЖЕЛЕЗА У ДОНОРОВ КРОВИ – ВАЖНАЯ СОЦИАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА

проф. Ю.С. Суханов, А.П. Бродская, С.Л. Люблинский
Региональный фонд «Служба крови - людям»,
Станция переливания крови Департамента здравоохранения города Москвы,
НПФ «Мобитек», г. Москва

В ежегодном отчете ВОЗ (1998 г.) указывается, что около 3,6 млрд. человек на земле имеют дефицит железа (ДЖ).

Распространенность латентного (скрытого) дефицита железа (ЛДЖ) отмечается среди женского и мужского населения.

Начиная с 14 лет, особенно в период детородного возраста, ЛДЖ значительно выражен. В частности, частота ЛДЖ у женщин в возрасте 20-50 лет имеет место у 11 %.

У мужчин с 20 до 60 лет ЛДЖ обнаруживается у 1-2 %.

Кадровые доноры имеют высокую частоту ЛДЖ как у женщин, так и у мужчин. Дефицит выявляется у более чем 50 % кадровых доноров.

Определенные виды донорства, например, процедура двойного эритроцитозфереза, особенно заметно сказывается на депо железа в организме доноров. Восстановление исходного уровня железа сыворотки крови, ферритина занимает период до 6 и более месяцев.

У взрослых, особенно женщин, ЛДЖ способен вызвать снижение уровня гемоглобина. Другие расстройства связаны с дефектами металлоферментов, содержащих железо, которых насчитывается до 40 (например, миелопероксидаза, глутатионредуктаза и др.).

Клинически дефицит железа приводит к нарушению функции желудочно-кишечного тракта, кожи, мышц, паренхиматозных органов, работы сердечно-сосудистой системы. Повышенная утомляемость, снижение работоспособности, подверженность к простудным заболеваниям, плохой аппетит - наиболее частые проявления ЛДЖ.

Нарушается функция клеток крови, сокращается период их функционирования, устойчивость к различного рода химическому и физическому воздействию. Например, при замораживании эритроцитов от доноров с ЛДЖ при ультранизких температурах клетки подвергаются повышенному гемолизу, превышающему 30 % при норме не более 2-5 %. Почти в 2 раза снижается кислотная резистентность эритроцитов (при использовании кислотных эритрограмм

основная масса эритроцитов разрушается в первые 8 мин. вместо 15-16 мин.).

Полупериод функционирования эритроцитов в организме людей с дефицитом железа сокращается со 120 до 56 дней. Напряженность эритропоэза не сопровождается усилением продукции эритроцитов.

Последний факт имеет особое значение для доноров крови. Не случайно, что в среднем более 5 % доноров отводятся именно из-за ухудшения показателей красной крови. Анализ причин отводов на СПК КЗ г. Москвы за 1996-98 гг. обнаруживает очевидный рост этого показателя (табл. 1).

Таблица № 1

Динамика отводов доноров по причине низкого гемоглобина и патологии желудочно-кишечного тракта

Годы	Показатель	Количество отводов (%) по причине:	
		Нв<116г/л	Патология желудочно-кишечного тракта
1996		3,5	13,1
1997		5,7	13,7
1998		6,1	13,6

Более 13% доноров (самая распространенная причина) отводятся из-за патологии желудочно-кишечного тракта, имеющей устойчивый характер.

Задача учреждений Службы крови провести своевременные и адекватные реабилитационные мероприятия - сохранить способность доноров осуществлять благородную функцию.

Для профилактики дефицита железа у доноров на западе применяют различные протоколы коррекции обмена железа.

Препарат вводят однократно внутримышечно в дозе до 100 мг элементарного железа, сразу после кроводачи. Парентеральный путь гарантирует попадание железа в организм, исключает возможность игнорирования донором процедуры коррекции обмена железа. Последнее возможно при пероральном приеме препаратов железа, когда донор, вопреки рекомендациям врачей, не принимает медикаменты. Чаще всего используются неорганические соли железа в виде сульфата железа от 1-ой до 3-х таблеток (100 мг железа) в день после кроводачи.

Применение неорганических солей железа не лучший способ профилактики ДЖ. Высок процент побочных реакций (изжога, рвота и т.п.), низкая усвояемость железа на уровне слизистой желудочно-кишечного тракта.

В этом отношении предпочтение следует отдать геминному железу и препаратам на его основе. Высокая, 80 %, усвояемость, хорошая переносимость обес-

печивают их функциональную стабильность и эффективность, несмотря на невысокое содержание железа.

Отечественной промышленностью освоено производство таблетированной формы препарата «Гемобин».

Это принципиально новый противоанемический препарат. Одна таблетка содержит 150 мг очищенного лиофилизированного гемоглобина крови крупного рогатого скота, незаменимые аминокислоты, среди которых до 8 % составляет гистидин, способствующий усвоению железа из пищи (так называемый кооперативный эффект). Этому также способствуют содержащиеся в препарате витамины: 1 мг аскорбиновой и 1 мг лимонной кислоты.

Препарат зарегистрирован как биологически активная добавка, регистрационное удостоверение № 03104 P.643.07.2001. Производитель НПФ «Мобитек». Пищевая добавка «Гемобин» рекомендована для использования в учреждениях здравоохранения на основании письма Минздрава России от 30.06.97 г. № 13-03/10-175.

При содействии Фонда «Служба крови - людям» препарат широко апробирован. По результатам комплексных испытаний Минздрав России рекомендовал применять «Гемобин» для профилактики железодефицитной анемии, особенно у беременных и кормящих женщин и детей.

Результаты оценки динамики обмена железа у доноров крови свидетельствуют о положительном профилактическом действии (табл. 2).

Таблица № 2

Динамика показателей периферической крови первичных доноров на фоне приема «Гемобина» (n=25)

Периоды	Концентрация гемоглобина, г/л	Количество эритроцитов, млн/мм ³	Железо сыворотки крови мкмоль/л	Ферритин, нг/мг
Исходный	135,8±0,9	4,4±0,8	19,6±0,7	80,3±2,9
Через 2 недели	130,4±0,8	4,2±0,3	20,4±0,8	81,3±3,1
Через 1 месяц	138,6±0,9	4,3±0,3	20,6±0,7	88,6±2,7

Принципиально важно отметить восстановление в ранние сроки (10-12 дней) после кроводачи тканевых запасов железа, что является основой для последующего гарантированного восстановления уровня гемоглобина крови доноров.

В таблице 3 представлена сравнительная характеристика традиционных железосодержащих препаратов и БАД к пище «Гемобин».

Сравнительная характеристика традиционных железосодержащих препаратов и БАД к пище «Гемобин»

№	Название препарата	Страна изготовления	Состав	Кол-во Fe ² в 1-ой таблетке	Суточная доза Fe ² , мг	Побочные действия	Противопоказания
1	Гемофер пролонгатум (драже № 30)	Польша	Сульфат железа	105мг	105-210	Диарея (у детей); потемнение зубной эмали	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия
2	Ферро-градумент (табл. № 30)	Югославия	Сульфат железа	105мг	210	Иногда: боли в животе, диарея, тошнота	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия
3	Ферроплекс (табл. № 100)	Венгрия	Сульфат железа	10мг	30-60	Иногда: боли в животе, диарея, тошнота	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия
4	Тардиферон (драже № 30)	Венгрия, Швейцария	Сульфат железа, мукопротеза	50мг	100	Иногда: боли в животе, диарея, тошнота	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия, апластическая анемия, повышенная чувствительность к компонентам препарата
5	Гино-тардиоферон (табл. № 30)	Венгрия	Сульфат железа	80мг	80-160	Тошнота, боли в эпигастрии, диарея, иногда – запор	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия, апластическая анемия, мегалобластная анемия. Препарат не назначают детям
6	Сорбифер дурулес (табл. №30)	Венгрия	Сульфат железа	100мг	100-200	Тошнота, боли в эпигастрии, диарея, или запор	Заболевания ЖКТ, повышенная чувствительность к препарату. Препарат не назначают детям до 12 лет.
7	Фенюльс (капе. № 10)	Индия	Сульфат железа	45'мг	90-180	Иногда: диспепсия, головокружение, аллергические реакции	Гемосидероз; гемохроматоз, повышенная чувствительность к компонентам препарата
8	Активферрин (табл. №50)	Австрия	Сульфат железа	35 мг	70-105	Боли в эпигастриальной области, метеоризм, запоры или диарея.	Гемосидероз; гемохроматоз, гемолитическая анемия, другие виды анемий, не обусловленные дефицитом железа в организме
9	Феррум-лек (в/м № 50)	Словения	Сульфат железа, мальтоза	50 мг/мл	100	Тошнота, диарея	Гемохроматоз, заболевания печени, гипертония
10	Гемобин (табл. № 60)	Россия	Гемоглобин крови с/х животных	0,3-0,5 мг	1-6	Не выявлены	Отсутствуют

Из таблицы видно, что уникальность препарата «Гемобин» заключается в том, что он не обладает побочным действием и не имеет противопоказаний. Последнее обстоятельство особенно ценно, поскольку речь идет о проведении среди доноров крови массовых профилактических мероприятий по предупреждению железодефицитных состояний.

Фонд «Служба крови - людям» в порядке благотворительной помощи предполагает приступить к

реализации программы по профилактике железодефицитных состояний у доноров крови на основе обеспечения учреждений Службы крови препаратом «Гемобин». На начальном этапе эта работа будет проводиться на административных территориях, в которых риск развития железодефицитных состояний среди доноров крови наиболее высок.

ПОЧЕМУ США ХОТЯТ ВЕРНУТЬСЯ К ПЛАТНЫМ ДОНОРАМ?

И.К. Никитин, Т.В. Голосова

Гематологический научный центр РАМН, г. Москва

До 1970 г. в США функционировала смешанная система донорства крови - безвозмездная и платная. После отказа от платных доноров крови и перехода к безвозмездному донорству полностью потребности США в крови и ее компонентах не удовлетворялись и с 1975 г. Нью-Йоркский банк крови начал импорт крови из Европы, который продолжается до настоящего времени. Начало эпидемии ВИЧ-инфекции повело к сокращению числа доноров аллогенной крови, значительному увеличению прямых донаций и заготовки аутокрови. В 1992 г. предоперационная заготовка аутологичной крови достигла пика и составила 8.5% от всей заготовленной крови и 5% от всех перелитых компонентов крови. (Menitove LV et al, 2002). В последующие годы заготовка аутоккомпонентов крови снизилась.

В период 1983-1992 гг. большое количество лиц, желающих сдать кровь, было отстранено от донорства в связи с пересмотром противопоказаний, введением новых обязательных методов тестирования доноров и из-за качества тест-систем. Ситуация стабилизировалась только к середине 90-х годов. За 1997-2001 гг. объем заготовленной крови и ее компонентов вырос на 17%. Вместе с тем в последние годы остаются проблемы в обеспечении потребностей в эритроцитарной массе, связанные с групповой принадлежностью компонентов и сезонностью. Остается неудовлетворенной потребность в эритроцитах 0(1) группы, так как в соответствии с принятой в США доктриной при невозможности переливания одногруппных эритроцитов переливаются эритроциты первой группы. Как правило, даже в больших банках крови, не говоря о лечебных учреждениях в сельской местности, потребность в АВ(0) совместимых эритроцитах полностью не удовлетворяется. Генетические особенности групповой принадлежности населения таковы, что среди населения США выходцев из Азии, Африки, коренного населения Америки, американцев испанского происхождения преобладают лица с 0(1) группой крови, которые неравномерно расселены по территории США. Недостаток эритроцитов с 0(1) группы приходится компенсировать перекрестными поставками эритроцитов недостающих групп, но чаще всего 0(1) группы.

Сезонность оказывает большое влияние на удовлетворение потребности в компонентах крови. В период Рождественских праздников и Нового года многие организации и особенно учебные учреждения закрыты, такая же ситуация складывается во время летних отпусков. Эта ситуация повторяется из года в год и никто не знает выхода из нее.

Остаются проблемы обеспечения компонентами крови, связанные с региональными особенностями. В США население маленьких городов и сельской местности является более активной частью донорско-

го безвозмездного движения, чем население крупных городов. Однако в ряде регионов сельское население довольно бедное, и они не являются активными участниками программы безвозмездного донорства. Не последнее значение оказывает демографическая ситуация и этнические особенности в различных регионах.

В настоящее время на обеспечение потребности и число безвозмездных доноров оказывают влияние следующие факторы: растущие требования к обеспечению безопасности, увеличивающиеся количество новых тестов и тест-систем, растущее влияние рыночных механизмов.

Начиная с конца 1980-х годов Департамент контроля качества лекарств и продуктов (FDA) ведут активное давление на Конгресс США с целью принятия программ, направленных на обеспечения безопасности крови, в первую очередь качества тестирования на ВИЧ и гепатит С. Однако, по мнению Simon TL (2003) многочисленные программы, разрабатываемые под эгидой FDA, оказывают гораздо меньшее влияние на безопасность крови, чем об этом пишут разработчики. Вместе с тем их разработка отвлекает персонал от основной их задачи по обеспечению безопасности- скрининга доноров. При этом на их разработку и апробацию тратятся значительные средства. В результате активной деятельности FDA возрастают требования к заполнению все большего и большего количества документации и появляется все большая законодательная ответственности банков за трансфузии компонентов крови, ведущие к возникновению гемотрансмиссивных инфекций, что в свою очередь увеличивает в бюджете банков крови страховых расходов.

Первый тест для скрининга крови доноров на сифилис был введен в США в качестве обязательного в 1947, в 1971 г. к ним добавился тест, но поверхностный антиген гепатита В (HBsAg). Начиная с мая 1985 г. было добавлено 6 новых тестов: ВИЧ/1 (март 1985г), АЛТ (июнь 1986 г), анти-НВс (октябрь 1986 г.), анти-НТЛV\1 (декабрь 1988 г), анти-ВГС (апрель 1990 г.), ВИЧ р24-антиген (1995-1996 гг.). По данным Американского общества Красного Креста за первые 5 лет десятилетнего периода введения новых тестов было проведено приблизительно 200 млн. дополнительных исследований. При этом к 1990 г. 3% доноров крови были позитивны по одному из тестов. Большинство из положительных тестов относилось к ложно-положительным или давали позитивные результаты на суррогатные тесты, однако доноры были отстранены от повторных донаций, но при этом трансмиссивный агент не был идентифицирован. Только сердцевинный антиген гепатита В (НВс) выявлялся у 2% доноров (McCullough 1993, Simon TL, 1996). Busch MP (1997) оценивал, что только 5% до-

норов с позитивными результатами тестирования вероятно инфицированы. Даже если быть более консервативным и допустить, что из 3% доноров с позитивными тестами 1/3 действительно позитивны, то 2/3 являются безопасными донорами. Расчеты показывают, что за эти 5 лет более 1 млн. доноров абсолютно безопасных были отстранены временно или постоянно от донорства и этим был нанесен значительный моральный ущерб как отведенным от донорства лицам, так и программе безвозмездного донорства. Это происходило как раз в тот период, когда потребность в эритроцитах не удовлетворялась полностью, и начались закупки компонентов крови за рубежом.

С конца 1990 г рыночные механизмы стали оказывать значительное влияние на функционирование банков крови. Введение все новых и новых тестов и тест-систем для скрининга крови повышало стоимость компонентов и препаратов крови. Это повело к тому, что целый ряд госпиталей исключил или резко ограничил использование компонентов крови, а ряд банков крови, чтобы выжить, начал резко снижать цены. В результате в центре внимания банков крови оставались проблемы маркетинга, а не проблемы безопасности и постоянной работы по пропаганде донорства. Многие банки вынуждены были периодически прекращать свою работу и, естественно, при этом нарушалась отлаженная система работы с донорами и пропаганда донорства.

Учитывая все перечисленные выше проблемы обеспечения потребности в крови и ее компонентах за счет безвозмездного донорства, Simon TL (2003) предлагает в качестве эксперимента ввести платных доноров крови и тромбоцитов. При этом он не без оснований считает, что более высокие уровни положительных маркеров гемотрансмиссивных инфекций, выявляемые у платных доноров по сравнению с безвозмездными, отмечались много лет назад, а в настоящее время эти различия не существенны или они даже ниже, чем у безвозмездных доноров. Уровень образования, социально-экономические факторы, методы заготовки крови или ее компонентов и многие другие факторы повышают или наоборот резко снижают риск использования крови и ее компонентов от платных доноров. Одним из важнейших факторов, является организация работы с донорами, что наглядно демонстрирует организация работы с платными донорами плазмы. Оценка уровня риска в зоне с благополучной эпидемической ситуацией среди доноров с высоким образовательным цензом, первичных платных доноров плазмафереза и первичных безвозмездных доноров крови с более низким уровнем образования показала в два раза более частые серопозитивные показатели трансмиссивных заболеваний среди первичных безвозмездных доноров крови (Straus RG et al, 1994).

Сегодня в мире 26 фирм в 16 странах готовят препараты свертывания крови. Они перерабатывают около 14 млн. т СЗП, при этом большинство фирм кроме плазмы, заготовленной в разных странах, ис-

пользуют плазму, импортируемую из США, 80% которой заготовлено от платных доноров. Опыт США показывает, что за последнее десятилетие платные доноры плазмы при надлежащей организации перестают относиться к группе повышенного риска. Это достигнуто благодаря национальной программе Американской Ассоциации Ресурсов крови, направленной на обеспечение мер по снижению, как циркулирующих существующих возбудителей, так и теоретически возможных возбудителей вирусных заболеваний у доноров.

Программа предусматривает:

- стандартизацию центров заготовки плазмы, в первую очередь, внедрение самых современных методов диагностики гепатитов и ВИЧ (тип I и II);

- идентификацию всех серопозитивных доноров (картотека с адресами);

- проверку на лекарственную зависимость всех первичных доноров, в последующем проведение ежегодного контроля;

- создание национального отсроченного регистра серопозитивных доноров (Eastlund T, 1998).

Последнее предложение является крайне актуальным и для России. По нашему мнению создание такого Национального регистра серопозитивных доноров вполне реальная задача. Одним из основных мероприятий программы по снижению риска трансмиссивных заболеваний является организация работы с первичными донорами. Для переработки следует использовать плазму только контрактных квалифицированных доноров. Следовало внедрить и положение, принятое в США для доноров плазмы: донор, не сдававший плазму в течение 6 месяцев, проходит все исследования как первичный.

Программа платных доноров имеет, по мнению Simon TL, ряд преимуществ. Во-первых, она позволит решить проблему доноров 0(1) группы и, во-вторых, удовлетворить потребность в компонентах крови в критические сезонные периоды, такие как Рождество, Новый год, летние каникулы. При этом автор предлагает ввести различные ставки вознаграждения: более высокие для доноров 0(1) группы, доноров, сдающих одновременно плазму и тромбоциты, естественно, для доноров сдающих одновременно две дозы эритроцитов. Говоря об источниках покрытия расходов, автор считает целесообразным привлечь, в том числе и многочисленные фонды Участников и Ветеранов Войны, работающие для благополучия наиболее частых потребителей компонентов крови – пожилых граждан.

Таким образом, в кругах американских трансфузиологов начинает активно обсуждаться вопрос о введении платных доноров крови и ее компонентов. При этом они считают, что нужно и далее поддерживать альтруистическую мотивацию безвозмездных доноров как основу Национальной системы обеспечения кровью и ее компонентами. Однако специалисты считают, что, без привлечения платных доноров, обеспечение потребностей пациентов США в компонентах крови не возможно.

Информационное письмо

НЕОБЯЗАТЕЛЬНЫЕ И ОБЯЗАТЕЛЬНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ к генамплификационному (NAT) тестированию крови и других клинических материалов на вирусные и бактериальные патогены

Генамплификационные (NAT) методы диагностики совместимы с любыми другими диагностическими исследованиями, например, ИФА, биохимическими, цитологическими, бактериологическими и другими, если используется тот же самый материал. Более того, NAT-исследование начинается с жесткой обработки материала, полностью инактивирующей возможные вирусные и бактериальные патогены. Тем не менее в России обязательным условием для генодиагностики является наличие отдельного помещения и создание генодиагностической лаборатории как новой структурной единицы любого медицинского учреждения: СПК, ЦСЭН, Центра СПИД, клиники, НИИ и др. [1]. Надуманность такого требования вполне очевидна. Его обязательное выполнение ведет к существенным неоправданным затратам и замедлению внедрения NAT-диагностики в службу крови и медицину России. Например, в крупных странах Западной Европы, США, Канаде, Японии, Австралии уже несколько лет NAT-тестирование подвергается донорская кровь и ее компоненты в масштабе всей страны, а Россия скована запретами и выдуманной опасениями. Предоставление и оборудование специального помещения в соответствии с давно устаревшими рекомендациями 1995 года [1] по стоимости многократно превосходит комплект даже самого современного генодиагностического оборудования.

В настоящее время широкое распространение получила ИФА-диагностика, в том числе и в службе крови. ИФА-лаборатория без особых усилий может разместить комплект небольших NAT-диагностических приборов. С появлением ПЦР в реальном времени весь процесс NAT-диагностики может быть размещен на одном столе без риска получения ложно-положительных результатов. ИФА и NAT – два метода, взаимно дополняющих друг друга. Есть стадии инфекции и состояния организма, при которых патогены не выявляются методами ИФА, и, напротив, наличие специфических антител не сопровождается прямым обнаружением самих патогенов.

Давно пришло время сказать, что ПЦР – это один из методов лабораторной молекулярной диагностики, и он может и должен быть представлен в любой большой клинико-диагностической лаборатории

наряду с ИФА, биохимическими, цитологическими, культуральными и различными физико-химическими методами. Точно также давно следует сказать, что никакие лицензии, никакие регистрации NAT-тест-систем не могут гарантировать достоверной диагностики без использования NAT-стандартов ВОЗ или национальных стандартов, прокалиброванных по международным, в данный момент, в данной лаборатории и данными сотрудниками. Международный NAT-стандарт – это натуральный материал, например, криоплазма, с точно известной стабильной концентрацией вируса или бактериальной ДНК, эквивалентной определенному количеству бактерий. С началом производства таких международных NAT-стандартов во всем мире снята зависимость NAT-диагностики от дорогих коммерческих тест-систем, так как можно объективно гарантировать чувствительность обнаружения любого патогена в данной лаборатории в данное время при использовании любых приборов и тест-систем, произведенных in-house. Без создания доступных всем национальных NAT-стандартов есть и будет много сомнительных и недостоверных результатов NAT-тестирования. Вот поэтому Центр крови Минздрава России считает эту проблему приоритетной.

Адресатами данного письма, по нашему мнению, прежде всего должны быть лицензионная комиссия Минздрава РФ, Федеральный центр санэпиднадзора, департамент СПИД и главный лаборант Минздрава РФ.

1. Покровский В.В., Федоров Н.А., Шипулин Г.А., Безруков В.М. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения. – Утверждены Государственным комитетом санэпиднадзора Российской Федерации 22 июня 1995 г. Текст в Интернете: www.medigen.ru/9.1.8.php.

Проф. Н.А. Федоров
Центр крови Минздрава России

THE RISE AND POLL OF PREOPERATIVE AUTOLOGOUS BLOOD DONATION

ПОДЪЕМ И ПАДЕНИЕ ЧИСЛА ПРЕОПЕРАЦИОННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ КРОВОДАЧ

M.E. Brecher, L.T. Goodnough
Transfusion 2002;42:12:1618-1622

Внимание к аутокроводачам было подогремо опасностью возникновения ВИЧ-инфекции, которая

передается через кровь. Интерес взлетел в 1980-х и начале 1990-х гг. В 1987 г. при проведении нацио-

нального мультицентрового исследования было показано, что до 10% всех трансфузий эритроцитов могут быть проведены при помощи аутокрови, в частности при плановых операциях. Исследование 1995 г. популяции округа Олмстед в Америке позволило заключить, что возможный вклад предоперационных аутокроводач (ПОАК) в обеспечение донорской кровью может достичь 9,7% от всех перелитых эритроцитов. Несмотря на эти прогнозы, процент ПОАК в национальном масштабе никогда не достигал 10%, ни по сбору, ни по трансфузиям. Пик интереса к ПОАК пришелся на 1992 г. (8,5% собранных, 5% перелитых эритроцитов). В последние годы интерес снизился (4,7% полученных, 3,0% перелитых в 1999 г.). Интересно, что академический интерес точно так же нарастал и падал, судя по числу публикаций.

Почему интерес к аутокроводачам снизился? Значит ли это, что мы потерпели неудачу и должны насторожиться? Или этот метод лечения просто отслужил свое? Чтобы ответить на эти вопросы, нужно кратко вспомнить, что мы узнали за последние годы, и как изменения в трансфузионной медицине повлияли на использование аутокрови.

Риск и его восприятие

Движущей силой внимания к ПОАК в 1980-х гг. был страх трансмиссии вирусов при трансфузии (особенно ВИЧ). В начале 1980-х гг. в некоторых районах США до 1% доз были заражены ВИЧ. В тот же период 0,5% доз были заражены вирусом гепатита С (ВГС). Развитие и улучшение скрининга вирусов и жесткие критерии отбора доноров привели к значительному снижению риска заражения через компоненты крови в течение последних двух десятилетий. Сейчас, в эру пост-ТНК, риск составляет 1 на 1 900 000 доз для ВИЧ и 1 на 1 600 000 для ВГС.

Несмотря на эти впечатляющие цифры, значительная часть публики продолжает относиться с недоверием к безопасности продуктов из крови. В 1997 и 1998 гг. национальное обследование 1204 человек в США выявило, что только 36,2% населения считает продукты из крови в США безопасными, и только 33,3% ответили, что они согласятся при госпитализации, чтобы им перелили компоненты крови. Другое исследование, проведенное в мае 2000 г. на 501 респонденте из 48 прилегающих штатов, показало, что при выборе компонентов крови для плановой операции 53% предпочли бы аутокровь. 33% предпочли бы кровь местных доноров. И только 8% предпочли бы кровь местного донора. Оценки риска трансфузионного заражения ВИЧ или гепатитом равномерно распределены от 1 до 100 в 100 000. Эти исследования показали, что в обществе остается большое недоверие и озабоченность по поводу безопасности донорской крови, но мало известно о современном уровне риска передачи гепатита или ВИЧ.

Показано, что чернокожие, испанцы, женщины, пациенты программы Медикейд получают меньше аутокрови, чем остальное население. Парадоксально, но в исследовании общественного мнения были те же группы - женщины, небелые, менее обра-

зованные люди - которые ощущали более высокий личный и общественный риск кроводач. Здесь существует странная несогласованность, потому что те, кто больше всего боялся донорской крови, участвовали по крайней мере в ПОАК.

ПОАК - это хроническая гемодилюция

Первое предположение по поводу применения ПОАК заключалось в том, что надо определить, какой объем эритроцитов можно удалить перед операцией и сколько времени нужно костному мозгу пациента для восстановления значительной части удаленного объема, в то же время обеспечив достаточный объем эритроцитов для операции. В США ПОАК обычно собирают за несколько недель до операции. Как правило, этого времени недостаточно для полного восстановления эритроцитов путем эритропоэза. Например, при обследовании 372 аутодоноров, сдавших по две дозы, в Университете штата Калифорнии (США, Сан-Франциско), число дней от первой кроводачи до дня операции коррелировало со средним числом полученных доз эритроцитов. Интервалы в 6-13, 14, 20, 21, 27, 28-34 дня и 41 день позволяли регенерировать 0,52, 0,54, 0,75, 1,16 и 1,93 дозы эритроцитов, соответственно. То есть, если кроводачи происходят за 2-3 недели до операции, регенерируется только фракция эритроцитов, которая была в кроводаче. Для многих пациентов сдать аутокровь за несколько недель перед операцией - значит только подвергнуться хронической гемодилюции. Преимущества тогда сравнимы с пользой от острой нормоволемической гемодилюции.

Моделирование

Математическое и компьютерное моделирование сдачи аутокрови и ее трансфузии мало что дало. Модели показали нам, что острая или хроническая гемодилюция приводит к относительно небольшим преимуществам, обычно эквивалентным вливанию 1 дозы эритроцитов. В одной модели подчеркнута необходимость учитывать индивидуальные особенности пациентов и влияние кроводачи на гематокрит отдельных пациентов. Для пациентов с ПОАК показано, что при нормальном исходном гематокрите (>40%) большие кровопотери (>2 л) могут иметь место до того, как достигнут минимальный уровень гематокрита для трансфузии (<28%). Если дозы ПОАК не перелиты, то ПОАК может привести к снижению послеоперационного гематокрита, что повышает риск ишемии. Модель предсказывает, что пациенты после ПОАК более вероятно получают трансфузии раньше и чаще, чем те, кто не были аутодонорами. Истинность таких предсказаний подтверждается многими клиническими наблюдениями. Поскольку оценочные риски смерти по причине гемолиза из-за несовместимости по АВО при трансфузии (ошибка персонала) значительно

превосходят риск заражения вирусом, можно заметить, что сейчас ПОАК скорее повышает, чем снижает риск смерти при трансфузии.

Потери

Исторически сложилось, что примерно половина всех ПОАК, полученных в США, никогда не были перелиты, и были отклонены от трансфузии. Такие большие потери неизбежны, так как дозы ПОАК бывают получены в соответствии с расписанием потребности крови для операций. Эти расписания составляются на основе накопительного процента потребности в крови при данной хирургической процедуре. Как правило, количество доз выбирают как потребность в 90% случаев. Однако при ПОАК средний пациент (50% пациентов) сдает при операции больше крови, чем нужно, на основании указанного выше расписания. В Англии аутокроводачи рекомендуются только если вероятность трансфузии превышает 50%. Расходы на медицину растут, поэтому стало все труднее оправдать постоянные потери этой донорской крови.

Экономическая эффективность

Исследования экономической эффективности аутокроводачи выполнены для разных хирургических процедур. Данные выражены в стоимости года жизни с гарантированными хорошими результатами (ГЖГХР), где ГЖГХР - дополнительные годы жизни человека при хорошем качестве жизни (по шкале от 0 до 1). Стоимость на ГЖГХР - общий критерий для сравнения всех вмешательств, включая широко распространенные, такие как аорто-коронарное шунтирование, аутокроводача и диализ. Медицинское вмешательство считается эффективным при ГЖГХР 50 000 долларов и меньше. Оценки стоимости ГЖГХР на дозу ПОАК для артропластики бедра составили 235 000 – 740 000 долларов, полной артропластики коленного сустава – 1 146 000 – 1 147 000 долларов, артерио-коронарного шунтирования 494 000 – 508 300 долларов, трансуретральной резекции простаты 1 358 000 долларов, простатэктомии 531 000 долларов, и гистерэктомии 23 643 000 долларов. Высокая стоимость одного ГЖГХР на дозу ПОАК зависит от низкой вероятности трансфузии вируса и низкой потребностью в трансфузии при некоторых операциях (что ведет к отклонению этих доз от трансфузии). Принимая во внимание уменьшающийся риск заражения вирусами (особенно после внедрения ТНК), ожидается, что стоимость одного ГЖГХР будет еще выше.

Риск при кроводаче

Сообщалось, что 1 на 16783 аутокроводач приводит к тяжелым последствиям (госпитализации). Этот уровень в 11,8 раза выше, чем риск при переливании крови здоровых добровольных доноров. Даже

небольшое увеличение заболеваемости и смертности, связанной с ПОАК, может свести на нет все преимущества аутокроводачи.

Аутокровь как стандарт медицинской помощи

Учитывая все изложенные выше ограничения ПОАК, не удивительно, что медико-юридические инстанции при все возрастающей роли информированного согласия участвуют в этой стратегической программе крови и донорства. ПОАК - возможность, которую нужно обсуждать с любым пациентом как часть информированного согласия при плановых операциях, при которых может понадобиться трансфузия. В некоторых штатах (например, в Калифорнии) обсуждение возможности ПОАК обязательно. Наблюдение за 1000 больницами в 1997 г. показало, что ПОАК была оценена 83% респондентов как самый распространенный метод консервирования крови. Лучшее всего это иллюстрируют данные о пациентах после операции полной замены суставов: проверка 1996-97 гг. показала, что пропорция пациентов, прошедших ПОАК, составила от 47 до 70 (двусторонняя замена колена) от всех пациентов. Тот же процент наблюдался при первичной замене бедра и ревизии. ПОАК в этих ситуациях уменьшает примерно на две трети вероятность аллогенной трансфузии у пациентов, не страдающих анемией в момент первой кроводачи.

По мере накопления знаний о ПОАК, как мы должны теперь относиться к ее развитию? Нужно найти возможность идентифицировать и лечить пациентов с анемией (гематокрит меньше 39%) в момент, на который назначена их операция. Обнаружено, что 35% пациентов с ПОАК по поводу полной замены суставов страдали анемией в момент первой кроводачи. Для этих пациентов аллогенные трансфузии составили от 11 (односторонняя замена коленного сустава) до 33% (ревизия тазобедренного сустава) несмотря на ПОАК [35]. Этим пациентам явно необходимы клинические испытания ПОАК в сочетании с лечением эритропоэтином и/или другими, возможно, новыми и более безопасными препаратами железа IV.

Еще одна причина поддержать применение ПОАК - потребность в крови. Возрастающая потребность в донорской крови иногда превосходит рост в получении крови, поэтому плановые операции иногда приходится даже откладывать. Если строгие критерии отбора доноров (т.е. путешествие в Европу) станут реальностью, потеря доноров может сделать желательным применение ПОАК при плановых операциях, а может быть, и необходимым.

Заключение

За последние 20 лет мы приобрели опыт и тщательно проанализировали многие разновидности ПОАК. Теперь мы признаем, что во многих случаях ПОАК является просто гемодилуцией, и может при-

вести наших пациентов к более высокому риску покинуть госпиталь с более низким гематокритом, чем без ПОАК. Мы признаем, что, вообще, применение только одной ПОАК обеспечивает только относительно небольшое преимущество и экономически невыгодно. Чтобы максимально увеличить пользу от ПОАК, нужно вызвать эритропоэз, и может потребоваться более длительный промежуток между кроводачей и операцией или применением эритропоэтина. Разумное применение ПОАК совместно с другими сохраняющими кровь методами в отдельных случаях остается оправданным. Однако автоматическое предложение всем пациентам ПОАК - слишком упрощенный подход, его не следует рекомендовать. Тот факт, что мы никогда не достигли 10% получения доз ПОАК или трансфузии аутокрови, отражает изменившуюся ситуацию в наше время.

Десять или 15 лет назад самым убедительным аргументом в пользу ПОАК было уменьшение передачи вирусов. Сегодня этот аргумент менее весом: маятник качнулся в другую сторону. Когда кровь была менее безопасной, медицинская общественность банков крови в значительной степени поддерживала интерес к ПОАК. Теперь, когда кровь для трансфузий почти свободна от ВИЧ и гепатита, нужно ожидать, что интерес к ПОАК будет снижаться. Если появится новый риск трансфузионно-трансмиссионных инфекций (БКЯ или его новый вариант, ассоциированный с бычьей губчатой энцефалопатией), или если количество кроводач не будет соответствовать потребностям, маятник может качнуться обратно, и мы увидим оживление интереса к аутокроводачам.

СРАВНЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО И НЕГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (Г-КСФ) - РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО РАНДОМИЗИРОВАННОГО МОНОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

H. Bonig, S. Silbermann, S. Weller, R. Kirschke, D. Körholz, G. Janssen, U. Göbel, W. Nürnberger Bone Marrow Transplantation 2001; 28: 259-264

Резюме

Открытие гемопоэтического ростового фактора - гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) снизило инфекционную заболеваемость у онкологических больных благодаря уменьшению выраженности нейтропении после химиотерапии. Существуют два типа препаратов рекомбинантного человеческого (рч) Г-КСФ - гликозилированный и негликозилированный. Активность гликозилированного препарата - ленограстима - *in vitro* не менее, чем на 25% выше. Наличие этого преимущества позволяют предполагать и некоторые исследования, в которых сравнивали активность препаратов в плане мобилизации гемопоэтических стволовых клеток. С учетом большой клинической значимости Г-КСФ, мы провели первое проспективное, рандомизированное, перекрестное исследование у детей с нейтропенией, обусловленной проведением химиотерапии. Применение Г-КСФ (250 мкг/м²) начинали в первый день после химиотерапевтической блокады, продолжая его до тех пор, пока в течение 3 дней подряд число лейкоцитов не превышало 1500 в 1 мкл. Анализу подвергли 33 цикла лечения Г-КСФ, проведенные у 11 пациентов (16 циклов - ленограстим, 17 - филграстим). Продолжительность очень тяжелой лейкопении (число лейкоцитов менее 500 в 1 мкл) составила 9 дней [медиана] при использовании ленограстима и 9.5 дней при использовании филграстима, тяжелой лейкопении (число лейкоцитов менее 1000 в 1 мкл) - 11 и 11 дней, соответственно. Длительность инфек-

ций (С-реактивный белок > 5 мг/дл) равнялась 5 и 5.5 дням, соответственно. Продолжительность пребывания в стационаре, обусловленного инфекционными осложнениями, составила 11 и 9 дней, соответственно, а длительность антибиотикотерапии - 9 и 9 дней. Статистическая оценка методом парного анализа не выявила каких-либо различий между терапевтическими группами; медиана разницы для всех параметров эффективности равнялась нулю. Заключение: клиническая эффективность двух типов Г-КСФ в отношении нейтропении, по-видимому, одинакова, по крайней мере, если они используются в дозе 250 мкг/м².

Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) - природный ростовой фактор, который специфически действует на частично детерминированные гемопоэтические клетки-предшественники нейтрофильного ростка (КОЕ-Г)^{1,2}. Он также регулирует некоторые функции зрелых нейтрофилов, включая хемотаксис, миграцию и образование супероксида³. Эти эффекты лежат в основе многократно показанной способности экзогенного Г-КСФ уменьшать продолжительность и тяжести постхимиотерапевтической нейтропении. Оказывая такой эффект, он может достоверно уменьшить частоту и тяжесть нейтропенических инфекций, тем самым снижая заболеваемость и затраты для системы здравоохранения⁴⁻⁶. Кроме того, Г-КСФ используют для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь как у здоровых добровольцев, так и у больных, получивших химиотерапию^{9,10}.

Очистка и молекулярное клонирование Г-КСФ были выполнены в середине 1980-х гг., а первый рекомбинантный человеческий (рч)Г-КСФ - филграстим - был разрешен в США в 1991 г. для клинического применения у онкологических больных, получивших химиотерапию¹¹. Филграстим вырабатывается *E.coli*. В отличие от природной молекулы Г-КСФ, которая подвергается О-гликозилированию в положении Тр-133¹², он не содержит углеводного остатка, но в остальных отношениях - по аминокислотной последовательности и конформационной структуре - практически идентичен природному. Известно, что активность филграстима абсолютно такая же, как природного Г-КСФ". Большинство клинических данных по Г-КСФ были получены именно с применением филграстима. Ленограстим был зарегистрирован в Европе и Японии в 1993 г.¹¹. Он продуцируется клетками яичника китайского хомячка, что позволило внедрить в структуру молекулы углеводные цепи, идентичные таковым у молекулы природного Г-КСФ. Вот почему ленограстим в большей степени идентичен природному Г-КСФ, однако клиническое значение этой модификации еще не установлено. Хотя было убедительно показано, что гликозилирование не существенно для биологической активности рчГ-КСФ¹⁴, углеводный остаток действительно придает молекуле Г-КСФ большую стабильность¹⁵⁻¹⁷, защищая цистеин-17-сульфгидрильную группу¹⁸. С другой стороны, клиренс молекулы гликированного Г-КСФ при длительном применении, по-видимому, увеличивается¹⁹. Влияние гликозилирования молекулы Г-КСФ на его активность *in vivo*, таким образом, предсказать нельзя. Безопасность и эффективность обоих препаратов была продемонстрирована в разных исследованиях^{4-6,20,21}, однако сравнительных данных крайне мало.

Исследования *in vitro* позволили предположить, что активность ленограстима более, чем на 25% выше, чем у филграстима^{14,22-24}. Считалось, что это является результатом более низкой химической стабильности филграстима, которая приводила к снижению периода его полужизни в культуральной среде^{14-16,22}. Такой вывод подкреплялся экспериментами Querol et al.²⁴, которые продемонстрировали, что ежедневное восстановление уровня Г-КСФ в среде устранило эту разницу в активности.

Некоторые группы исследователей предположили, что ленограстим может обладать более высокой мощностью *in vivo*. Как следствие, были проведены два исследования на животных. В одном из них, выполненном Nohynek et al.²⁵ в лабораториях компании "Рон-Пуленк-Рорер", изучалось влияние двух препаратов Г-КСФ на восстановление лейкоцитов у мышей, получавших циклофосфамид. Как в группе ленограстима, так и в группе филграстима минимальное число лейкоцитов отмечалось на 4-й день, что на 1 день отличалось от показателя в контрольной группе животных. На 12-й день в обеих группах число лейкоцитов восстанавливалось до исходного. В другом исследовании изучали фармакокинетику и мак-

симальное число лейкоцитов у обезьян, получавших Г-КСФ²⁶. После подкожного введения биодоступность, плазменные концентрации и максимальное число лейкоцитов были идентичными. Эти данные не только не подтвердили предположение о более высокой активности ленограстима по сравнению с филграстимом, но и позволили считать, что снижение активности филграстима *in vitro* может не иметь места *in vivo*.

Все сравнительные исследования, проведенные у человека, были посвящены мобилизации стволовых клеток, однако их результаты не позволяли прийти к единому заключению. Hoglund et al.²⁷ установили, что в группе здоровых добровольцев ленограстим на 25% превосходил филграстим относительно числа CD34+ клеток и мобилизации КОЕ-ГМ. Тот же дизайн исследования использовали Watts et al.²⁸. Однако, в их исследовании разницы в мобилизации CD34+ клеток не было, а число ГМ-КФК было выше у лиц, получавших ленограстим. Watts et al.²⁸ сравнили также плазменные концентрации Г-КСФ в 1-й день терапии и обнаружили, что уровни филграстима были достоверно выше, чем ленограстима. Эти данные опять указывают на то, что снижение стабильности, которое сопровождается уменьшением эффекта филграстима *in vitro*, не отмечается *in vivo*. Однако сопоставление плазменных концентраций не всегда является хорошим показателем эффекта, поскольку концентрации препарата в плазме могут недостаточно коррелировать с его связыванием с рецепторами. Вот почему авторы исследования предполагают, что более высокая активность Г-КСФ может достигаться другими механизмами, включающими лиганд-рецепторное взаимодействие. В ряде исследований изучали мобилизацию стволовых клеток у больных, получавших химиотерапию, однако найти разницу между двумя препаратами не удавалось²⁹⁻³⁰. Таким образом, хотя ситуация *in vitro* вполне ясна, есть основания сомневаться в существовании разницы в активности ленограстима и филграстима *in vivo*.

Сравнительных данных по потенциалу двух препаратов относительно уменьшения выраженности нейтропении, развития нейтропенических инфекций, продолжительности госпитализации и антибиотикотерапии, также нет. Вот почему в проспективном, рандомизированном перекрестном исследовании мы сравнили число форменных элементов крови, показатели С-реактивного белка и клинических эпизодов инфекций у больных, получающих поддерживающую терапию ростовыми факторами - ленограстимом или филграстимом - после цитотоксической химиотерапии.

Материалы и методы

Больные

С августа 1997 г. по август 1999 г. в исследование были включены 11 больных (3 женского и 8 мужского пола), в возрасте от 3 до 29 лет (медиана - 14 лет). Исследование проводили в одном центре - в

отделении детской гематологии и онкологии Центра детского здоровья университета им. Генриха Гейне. В это проспективное исследование могли быть включены все пациенты, у которых риск тяжелой нейтропении, в соответствии с клиническим суждением, был равен или превышал 50%, или которые должны были получать Г-КСФ как часть рутинной схемы химиотерапии. Характеристики пациентов приводятся в таб-

лице 1. Все пациенты или лица, представляющие их интересы, давали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось в соответствии с текущей версией Хельсинской Декларации, при условии отсутствия необходимости дополнительных заборов крови или амбулаторных посещений клиники. Проанализированы 33 цикла лечения рГГ-КСФ.

Таблица 1

Возраст, пол, диагноз и схемы химиотерапии 11 пациентов, включенных в исследование

№	Возраст (лет) пол	Диагнозы	Схема циклов химиотерапии	Циклы /пары
1	28, м	СЮ	Этопозид 1 x 2000, мелфалан 4 x 38	2/1
2	29, м	АРМС	Ифосфамид 3 x 2000, этопозид 4 x 150, винкристин 1.2 ± актомицин D 3 x 0.5	3/2
3	20, м	ОС	Карбоплатин 4 x 150, этопозид 4 x 150	3/2
4	7, м	рЭРМС	Цисплатин 2 x 40, ифосфамид 4 x 1500, этопозид 4 x 100, глубокая регионарная гипертермия	2/1
5	14, ж	ОС	Карбоплатин 4 x 150, этопозид 4 x 150	2/1
6	12, ж	СЮ	Ифосфамид 3 x 2000, этопозид 3 x 150, VCR 1.2 ± (актомицин D 3 x 0.5 или адриамицин 3 x 20)	5/4
7	3, м	ЭРМС	Циклофосфамид 5 x 250, топотекан 5 x 0.75	3/2
8	22, м	СЮ	Циклофосфамид 3 x 2000, этопозид 4 x 55, бустинг опухоли	3/2
9	18, ж	СЮ	Циклофосфамид 3 x 1800, этопозид 4 x 100 ± бустинг опухоли	4/3
10	8, м	НБЛ	DTIC 5 x 200, винкристин 2 x 1.5, ифосфамид 5 x 1500, адриамицин 2 x 30	2/1
11	10, м	ПНЭО	Карбоплатин 4 x 150, этопозид 4 x 100 (этопозид 5 x 0.2 мг + АраС 1 x 30 мг интратекально)	4/3

Проанализированы 33 цикла (22 перекрестных пары) лечения рГГ-КСФ. Все дозы выражены в мг/м², если не указано иначе. Диагнозы: СЮ - саркома Юинга, АРМС - альвеолярная рабдомиосаркома, ОС - остеосаркома, (р)ЭРМС - (рецидивирующая) эмбриональная рабдомиосаркома, НБЛ - нейробластома, ПНЭО - примитивная нейроэктодермальная опухоль.

Лечение

Введение рГГ-КСФ начинали в 1-й день после окончания блока химиотерапии. Его вводили 1 раз в сутки подкожно в стандартной педиатрической дозе 250 мкг/м² + 5%. Связь между укорочением периода нейтропении после химиотерапии, с дозой Г-КСФ установлена для диапазона доз от 0.5 до 60 мкг/кг^{31,32}, поэтому доза 250 мкг/м² (или 6 мкг/кг) представляет собой среднюю дозу. Лечение рГГ-КСФ продолжали до тех пор, пока число лейкоцитов, пройдя ожидаемый минимум, в течение 3 дней подряд не превышало 1500 в 1 мкл.

Исследование было запланировано как проспективное, рандомизированное, открытое, перекрестное моноцентровое исследование III фазы. Больных попеременно лечили ленограстимом (Граноцит, "Авентис") и фил-грастимом (Нейпоген, "Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд"). Рандомизацию больных относительно того, какой препарат они будут получать во время первого цикла, проводилась методом жребьевки. Для выявления различий методом парно-

го анализа необходимо было сравнить два последовательных цикла с одинаковыми или очень сходными схемами химиотерапии, но с применением различных препаратов ростовых факторов.

При каждом амбулаторном посещении клиники больным проводили полное физикальное обследование и брали анализ крови. Были определены следующие параметры эффективности: лейкопения (число лейкоцитов ≤ 1000 в 1 мкл), тяжелая лейкопения (число лейкоцитов ≤ 500 в 1 мкл, нейтропения (абсолютное число нейтрофилов [АЧН] ≤ 1000 в 1 мкл), тяжелая нейтропения (АЧН ≤ 500 в 1 мкл), предполагаемая инфекция (С-реактивный белок > 5 мг/дл), связанная с инфекцией госпитализация (пребывание в стационаре с проведением антибиотикотерапии; госпитализации по другим причинам не учитывали), антибиотикотерапия (лечение антибиотиками, за исключением профилактики пневмоцистной пневмонии котримоксазолом). В качестве диагностического критерия инфекции использовался С-реактивный белок, а не лихорадка, поскольку на температуру тела может повлиять ряд факторов, например, температура окружающей среды и пирогенные (амфотерицин В) или жаропонижающие (метамизол, ацетаминофен) эффекты некоторых лекарственных средств. Регистрировали также продолжительность применения рГГ-КСФ. Если в некоторые дни определение развернутой формулы крови не проводилось, а число лейкоцитов было < 500 в 1 мкл или < 1000 в 1 мкл, то АЧН брали

равным < 500 в 1 мкл или < 1000 в 1 мкл, соответственно. Для оценки числа лейкоцитов (АЧН) в одной из критических точек (500 или 1000 клеток в 1 мкл) между двумя определениями лейкоцитарной формулы допускался разрыв не более 2 дней (3 дней), в противном случае данный цикл исключали из оценки динамики числа лейкоцитов (АЧН).

Методы

Лейкоцитарную формулу определяли в обычной лаборатории с помощью аутоанализатора. С-реактивный белок определяли методом стандартной лазерной нефелометрии. При числе лейкоцитов > 500 в 1 мкл лейкоцитарную формулу подсчитывали вручную, методом световой микроскопии мазков крови, окрашенных по Паппенгейму.

Статистический анализ

Перекрестный анализ мог выполняться в том случае, если в двух последовательных циклах применялись одинаковые или очень сходные химиотерапевтические препараты, но разные ростовые факторы. Два последовательных цикла (следующих немедленно друг за другом) сравнивали попарно с помощью рангового теста Вилкоксона (парный анализ). Разницу рассчитывали в виде "время (дни) лечения ленограстимом - время (дни) лечения филграстимом", причем отрицательная "разница" означает превосходство ленограстима, а положительная - превосходство филграстима. Чтобы выявить возможный эффект переноса, проводили сравнение групп, которые получали первым, соответственно, ленограстим или филграстим, используя U-тест Манна-Уитни (непарный анализ). Если у какого-либо больного была возможность анализа более, чем двух циклов, они считались независимыми "событиями". Так, если больной в цикле 1 получал препарат А, в цикле 2 - препарат В, в цикле 3 - препарат А, то сравнивали следующие независимые пары: цикл 1 с циклом 2 и цикл 2 с циклом 3. За уровень достоверности брали $p < 0.05$, не внося поправки на множественное тестирование. Доверительные интервалы и анализ мощности проводили по программе nQuery. Было установлено, что исследование имело достаточную статистическую мощность для выявления как "статистически значимой" разницы свыше 2 дней для продолжительности поддержания числа лейкоцитов на уровне < 1000 в 1 мкл и на уровне < 500 в 1 мкл, АЧН - на уровне < 1000 в 1 мкл, а также для продолжительности лечения (> 3 дней для АЧН < 500 в 1 мкл) при уровне достоверности $\alpha = 0.05$ и мощности, равной 80%.

Результаты

Характеристики больных

Одиннадцать пациентов получили, в общей сложности, 33 цикла лечения Г-КСФ (от 2 до 5 циклов, медиана - 3 цикла на больного), из них 16 - ленограстимом, 17 - филграстимом. Это составило 22 перекрестных пары, 12 из которых первым получали

ленограстим (а в последующем цикле - филграстим), а 10 первым получали филграстим, а затем ленограстим. Чтобы выявить возможный эффект переноса, группы "первым ленограстим" и "первым филграстим" сравнили между собой с помощью U-теста Манна-Уитни (непарный анализ). Ни по одному из критериев эффективности разницы найдено не было. Таким образом, никаких эффектов переноса, по видимому, не было, поэтому в последующем анализе не надо было учитывать, какой из ростовых факторов применялся первым, а какой вторым. Г-КСФ переносился хорошо; не было зафиксировано никаких значимых нежелательных явлений, которые можно было бы отнести на счет терапии Г-КСФ. При проведении парного анализа пришлось согласиться с существованием небольших различий в схемах химиотерапии у трех пациентов. Так, у одного пациента первый из трех циклов терапии ифосфамидом, этопозидом и винкристином включал также и актиномицин D, у другого больного, помимо ифосфамида, этопозидом и винкристином, чередовали терапию актиномицином D и адриамицином, а у третьего пациента в ходе 3 и 4 циклов высокодозной терапии цик-лофосфамидом и этопозидом проводилось и облучение ложа опухоли (таблица 1).

Продолжительность лейкопении и нейтропении

Число лейкоцитов упало до уровня менее 1000 в 1 мкл у 69% (11/16) больных, получавших ленограстим, и у 76% (13/17) пациентов, получавших филграстим. В обеих группах на 9 день лечения ростовым фактором число лейкоцитов равнялось или превышало 1000 в 1 мкл у $\geq 50\%$ больных (10/16 и 10/17). Минимальный уровень лейкоцитов < 500 в 1 мкл отмечался только у 42% и 41% (7/16 и 7/17) больных из каждой терапевтической группы. У всех больных АЧН снизилось до < 1000 в 1 мкл ($n = 30$ циклов); в обеих группах у $\geq 50\%$ пациентов (7/13 и 10/17) АЧН впервые сравнялось или превысило 1000 в 1 мкл на 11 день. Очень тяжелая нейтропения (АЧН < 500 в 1 мкл, $p=29$) отмечалась у 77% (10/13) и 69% (11/16) больных двух терапевтических групп. 50% и более пациентов в обеих группах (7/13 и 8/16) восстановили АЧН до уровня ≥ 500 в 1 мкл на 9 день (рисунок 1). По результатам анализа статистической мощности, можно было бы выявить разницу между ленограстимом и филграстимом относительно числа лейкоцитов < 1000 в 1 мкл и АЧН < 1000 в 1 мкл на протяжении более 2 дней, равную > 28% и 18%, соответственно. Сравнение парных разниц дало 0 (-2.3-1.3) дней (медиана и 95% доверительные интервалы средних) для такого параметра, как число лейкоцитов > 500 в 1 мкл, 0 (-3.3-0.9) дней для числа лейкоцитов > 1000 в 1 мкл, 0 (-2.0-4.5) дней для АЧН > 500 в 1 мкл и 0 (-0.9-2.7) дней для АЧН > 1000 в 1 мкл. Графически это отображено на рисунке 2. Таким образом, частота, тяжести и продолжительность лейко- и нейтропении у больных, получавших ленограстим и филграстим, были однотипными.

Продолжительность терапии рЧГ-КСФ

Продолжительность применения ростовых факторов в обеих группах была одинаковой. Ленограстим вводили в течение 12.5 (7 - 18) дней (медиана и диапазон), а филграстим - в течение 12 (3 - 17) дней. Анализ статистической мощности позволил устано-

вить, что можно было бы выявить разницу в продолжительности терапии, превышающую 2 дня. Это было бы эквивалентно разнице $> 16\%$ (уровень достоверности $\alpha = 0.05$, статистическая мощность 80%). Разница между парами равнялась 0 (-4-7) дням (рисунок 2). Между пациентами, получавшими ленограстим и филграстим, никаких различий обнаружено не было.

Рисунок 1. Динамика числа лейкоцитов и АЧН у больных, получавших химиотерапию и рЧГ-КСФ. Одиннадцать пациентов получали 33 профилактических цикла рЧГ-КСФ после проведения химиотерапии (ленограстим - черные ромбики, филграстим - белые треугольники) до поддержания числа лейкоцитов на уровне более 1500 в 1 мкл в течение 3 дней подряд. По оси x отложено время, по оси y - процент больных с числом лейкоцитов < 1000 в 1 мкл (а), числом лейкоцитов < 500 в 1 мкл (b), АЧН < 1000 в 1 мкл (c) и АЧН < 500 в 1 мкл (d). Минимальное число лейкоцитов менее 500 в 1 мкл отмечалось у 44% больных при лечении ленограстимом и у 41% больных при лечении филграстимом, минимальное число лейкоцитов менее 1000 в 1 мкл - у 67% и 76% больных, а минимальное АЧН менее 500 в 1 мкл - у 77% и 69%, соответственно. АЧН менее 1000 в 1 мкл отмечалось у всех пациентов. В обеих группах у 50% больных число лейкоцитов было ≥ 1000 в 1 мкл, АЧН > 1000 в 1 мкл или АЧН > 500 в 1 мкл на 9, 9 и 11 день, соответственно.

Инфекция

Клинические события, расцененные как связанные с инфекцией, отмечались у небольшого числа больных, но с одинаковой частотой в обеих терапевтических группах. Так, в группах ленограстима и филграстима инфекции (С-реактивный белок > 5 мг/дл) развились у 33% (5/15) и 35% (6/17) больных, продолжались в течение 5 дней (4-9) (медиана и диапазон) и 5.5 дней (3-12), соответственно. Медиана разницы в продолжительности инфекционных эпизодов равнялась 0 дней (диапазон -8-7 дней). 95% доверительные интервалы средних составили -1.8-0.9. 58% (7/12) и 60% (9/15) пациентов двух групп полу-

чали антибиотикотерапию в течение, в среднем, 9 (1-12) и 9 (2-17) дней (медианы и диапазоны). Медиана разницы равнялась 0 дней (диапазон -2-6 дней). 25% (3/12) и 50% (7/14) больных были повторно госпитализированы или задержались в стационаре из-за инфекций; средняя продолжительность пребывания в стационаре по поводу инфекции составила 11 (6-12) и 9 (3-14) дней (рисунок 2). Медиана (диапазон) парных разниц в продолжительности связанной с инфекцией госпитализации составила 0 дней (-5-6 дней), доверительные интервалы средних равнялись -2.1-1.2. Ни одна из этих разниц не была статистически достоверной.

Обсуждение

In vitro многократно была продемонстрирована более высокая активность ленограстима^{14,17,22,24}. Ее объясняли, по крайней мере, частично, более высокой рН устойчивостью гликозилированной молекулы, поскольку восстановление концентрации Г-КСФ устранило эту разницу^{17,24}.

Активность двух препаратов относительно мобилизации стволовых клеток сравнивали в ряде исследований, давших противоречивые результаты. Так, у получивших химиотерапию пациентов с нейтропенией Schiodt et al.²⁹ и Saccardi et al.³⁰ не обнаружили различий в активности двух этих препаратов. Однако, это были нерандомизированные исследования, анализ статистической мощности в них не проводился, поэтому осталось неясным, насколько большой должна была быть разница, чтобы ее удалось выявить. В рандомизированных перекрестных исследованиях у здоровых добровольцев ленограстим проявлял более высокую активность относительно мобилизации CD34+ клеток²⁰ и/или ГМ-КОЕ^{27,28}.

Рисунок 2. Анализ парных разниц: в качестве пары для анализа брали последовательные циклы химиотерапии с применением различных Г-КСФ (n=22). Разницу рассчитывали как Δ (дни) = продолжительность применения ленограстима (дни) - продолжительность применения филграстима (дни). Тем самым положительная Δ указывает на преимущество филграстима, и наоборот. На рисунке 2 приведены коробчатые графики распределения Δ . Разница отложена по оси у, а сами параметры оценки - по оси x (1 - число лейкоцитов < 1000 в 1 мкл; 2 - число лейкоцитов < 500 в 1 мкл; 3 - АЧН < 1000 в 1 мкл; 4 - АЧН < 500 в 1 мкл; 5 - продолжительность терапии Г-КСФ; 6 - длительность поддержания концентрации С-реактивного белка на уровне более 5 мг/дл; 7 - продолжительность антибиотикотерапии; 8 - продолжительность госпитализации, связанной с инфекцией). Медиана разницы между пациентами, получавшими ленограстим и филграстим, равнялась 0 дней для всех параметров эффективности. Пациенты, получавшие ленограстим, не отличались от пациентов, получавших филграстим, ни по одному из изученных параметров.

Однако по всем четырем исследованиям следует отметить, что определение числа CD34+ клеток или культуры клеток-предшественников один раз в сутки может неадекватно отражать очень незначительную динамику мобилизации стволовых клеток

под влиянием Г-КСФ. Имеющихся на сегодня данных недостаточно для обоснования какого-либо заключения о разной активности двух препаратов Г-КСФ.

Важным фактором, регулирующим уровень Г-КСФ по механизму обратной связи, является его нейтрализация зрелыми нейтрофилами³⁴. Это означает, что фармакокинетика рчГ-КСФ у лиц с нейтропенией и без нес будет весьма различной. Однако, в то время как эффект присутствия нейтрофилов нарастает с каждым днем, фармакокинетические исследования проводились только в первый день применения Г-КСФ²⁸.

Если гликозилированный рчГ-КСФ менее эффективно нейтрализуется нейтрофилами, это могло бы объяснить тот факт, почему при его использовании отмечается более высокое число CD34+ или ГМ-КОЕ и более высокий максимум числа лейкоцитов^{25,27,28}. Во время нейтропении эта разница не играла бы роли, что и могло бы объяснить, почему при нейтропении различий в эффективности гликозилированного и негликозилированного Г-КСФ ни разу не обнаруживалось^{29,30}, хотя два эти препарата Г-КСФ обладают разным связыванием с рецепторами.

Как уже упоминалось, более высокая физическая стабильность гликозилированной молекулы, по видимому, дает ленограстиму преимущества в экспериментах in vitro. Однако in vivo этого не происходит. Биодоступность и плазменные концентрации препаратов после подкожного введения были одинаковыми у человека²⁸ и обезьян²⁶. Здесь может играть роль ряд факторов. Стабильность окружающей среды и непрерывное высвобождение из подкожного депо может уменьшить значение меньшей физико-химической стабильности филграстима. In vivo клиренс препарата в гораздо большей степени является результатом протеолиза и нейтрализации, обусловленных связыванием с рецепторами и интеграции. Проведенные исследования позволяют предполагать, что эти механизмы клиренса одинаково влияют на оба препарата. Нужно учитывать и почечный клиренс Г-КСФ, поскольку у некоторых онкологических больных может иметь место стойкое поражение почек, обусловленное заболеванием, приводящее к повышению плазменных концентраций препарат³⁶. Можно думать о различных эффектах нарушения функции почек на гликозилированный и негликозилированный Г-КСФ, хотя они никогда не изучались.

Это первое исследование, в котором изучали разные эффекты двух препаратов на динамику нейтропении у человека, обусловленной проведением химиотерапии. Нам удалось продемонстрировать, что при введении в стандартной для педиатрической практики дозе (250 мкг/м²) ленограстим и филграстим не отличались друг от друга по влиянию на длительность и тяжесть нейтропении и на частоту и клиническое течение инфекций. Статистическая мощность исследования была достаточной для обнаружения разницы в диапазоне, постулированном Hognlund et al.²⁷, т.е. 25%-ного преимущества ленограстима.

Полученные нами данные позволяют предполагать, что результаты изучения эквивалентности доз разных препаратов Г-КСФ *in vitro* нельзя переносить на условия *in vivo*, по крайней мере, на больных с нейтропенией. Скорее, ленограстим и филграстим, при назначении их детям в дозе 250 мкг/м², следует считать идентичными по влиянию на приживание нейтрофилов и развитие инфекционных осложнений.

Нельзя исключить существование различий в биологических эффектах других доз. У детей и подростков эти два препарата (в дозе 250 мкг/м²) взаимозаменяемы. Это позволяет выбирать препарат рГ-КСФ с учетом соотношения дозы во флаконе и площади поверхности тела пациента, стоимости и индивидуальной переносимости.

HOW I TREAT PATIENTS WITH VON WILLEBRAND DISEASE

КАК Я ЛЕЧУ БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА

P.M. Mannucci
Blood 1997;7:1915-1919

Болезнь Виллебранда (БВ) - часто встречающееся наследственное заболевание - нарушение системы свертывания, из-за дефицита или дисфункции фактора Виллебранда (фВ) в результате мутации гена, кодирующего мультимерный гликопротеин. Недавно опубликован обширный обзор относительно БВ и фВ. фВ выполняет две основные функции в первичном гемостазе и внутреннем пути свертывания - он опосредует адгезию тромбоцитов к местам повреждения сосудов, и стабилизирует фактор VIII (фVIII) свертывания крови в плазме. При БВ нарушение этих функций фенотипически выражается в низком уровне свертывающей активности фVIII в плазме (фVIII:C) и удлинненном времени кровотечения, по крайней мере при тяжелых случаях. Симптомы кровотечения обычно умеренны и характеризуются продолжительной кровоточивостью после мелких и крупных хирургических операций и геморрагиями на слизистых, а также эпистаксисом и меноррагией. Только у пациентов с тяжелой формой наблюдаются кровоизлияния в мягкие ткани, например, в мышцы, и в суставы. Роды часто осложнены, особенно опасен послеродовой период.

БВ фенотипически гетерогенна и классифицируется в виде трех различных типов. Тип 1 относится к частичному, количественному дефициту фВ, более тяжелый тип 3 - полный дефицит фВ. Тип 2 означает качественные нарушения фВ, обычно измеряемого в нормальных количествах в плазме, и также подразделяется на 4 подтипа - 2A, 2B, 2M и 2N - на основе более тонких различий фенотипа. Некоторые тесты на фВ применяются для диагностики БВ и ее подтипов, например, измерение в плазме количества антигена фВ (фVIII:АГ), для диагностики БВ и ее подтипов, связывание фВ с коллагеном типа I и III (коллагенсвязывающая активность, фVIII:СВА), и взаимодействие фВ с антибиотиком ристоцетином и гликопротеином 1b тромбоцитов (активность фВ - кофактора ристоцетина, фVIII:RcoF). Это большое количество измерений отражает тот факт, что ни одно из

них недостаточно чувствительно для постановки диагноза.

Хотя лечение больных с гемофилией А и В облегчается тесным взаимодействием между содержанием фVIII и фIX, в заместительных препаратах, уровнем в плазме после инфузии и клинической эффективностью, эту модель нельзя просто так перенести на оценку препаратов для лечения БВ, потому что все еще неясно, измерение фVIII или фВ в лечебных препаратах или у больного лучше коррелирует с тяжестью клинических проявлений кровоточивости и с эффективностью лечения. Ситуация еще больше осложняется тем, что подтипы БВ по-разному отвечают на лечение. Два основных лечебных препарата используются для остановки спонтанного кровотечения и предупреждения кровотечения во время хирургических процедур - нетрансфузионный препарат десмопрессин и продукты из крови, содержащие фVIII и фВ, сконцентрированные из плазмы. Дополнительная форма лечения - концентрат тромбоцитов, синтетические ингибиторы фибринолиза, оральные эстроген-прогестероновые препараты, которые в некоторых клинических ситуациях дополняют или заменяют два основных метода лечения.

Десмопрессин (1-деамино-8-D-аргинин-вазопрессин) - синтетический аналог антидиуретического гормона вазопрессина, обычно применяемого для лечения *diabetes insipidus*. При введении здоровым добровольцам и больным с умеренной гемофилией или БВ десмопрессин временно повышает уровень фУН! и фВ путем высвобождения половинок молекул из мест хранения в плазме. Механизм действия препарата понятен лишь частично. Тельца Вейбель-Паллада из эндотелиальных клеток, возможно, являются источником фВ, фVIII определен не был. Десмопрессин вызывает высвобождение фВ в плазму, связываясь с рецептором вазопрессина V2 и тем самым активируя опосредованный циклической аденозин-монофосфатазой сигнал в клетках сосудистого эндотелия.

Первые клинические испытания десмопрессина успешно прошли в 1977 г., их целью было избежать использования продуктов из крови у пациентов с умеренно выраженной гемофилией и БВ, которые нуждаются в удалении зубов или в других хирургических процедурах. Очевидное преимущество этого средства - его относительная дешевизна и отсутствие риска передачи инфекций из донорской крови. При внутривенной инфузии в течение 30 мин. в дозе 0,3 мкг/кг в 50 или 100 мл физиологического раствора десмопрессин должен увеличивать в течение 30 мин. уровень фВ и фVIII в плазме в пять раз. В среднем высокие концентрации фВ и фVIII сохраняются в плазме в течение не менее 8-10 час. Ответ каждого больного индивидуален, поэтому тестовая доза десмопрессина в момент постановки диагноза помогает установить индивидуальные параметры ответа. Пациенты с исходным уровнем фVIII - фВ в плазме от 10 до 20 МЕ/дл (МЕ -международные единицы) или больше, скорее всего, достигнут после введения десмопрессина уровня, достаточного, чтобы поддержать гемостаз, принимая, конечно, во внимание такие переменные величины, как тип и тяжесть эпизодов кровотечений и активности фВ - фVIII, необходимых для поддержания гемостаза на безопасном уровне. Инфузии можно повторять при необходимости каждые 12 или 24 час. Несмотря на то что большинство пациентов с легкой формой гемофилии А после повторного лечения десмопрессин начинают хуже отвечать на лечение, эта проблема реже встречается и менее выражена у пациентов с БВ типа 1. Препарат выпускается также в концентрированной форме для подкожного и интраназального введения (в дозах соответственно 0,3 мкг/кг и 300 мкг), что позволяет проводить лечение дома у больного.

Побочные действия десмопрессина чаще всего - умеренная тахикардия, головная боль и гиперемия лица, благодаря его сосудорасширяющему действию, их часто можно снять путем замедления инфузии. Гипонатриемия и перегрузка жидкостью встречаются редко, если ее не влили слишком много во время лечения. Описано несколько случаев, в частности, у маленьких детей, получивших несколько инфузий подряд. Не было описано случаев тромбоза у пациентов с БВ после лечения десмопрессин, тем не менее его нужно применять с осторожностью у лиц старшего возраста с сердечно-сосудистыми болезнями, так как у нескольких больных гемофилией А и уремией после лечения произошел инфаркт. Эти тромботические эпизоды, вероятно, связаны с транзиторным появлением в плазме сверхкрупных мультимеров фВ из эндотелиальных клеток и агрегацией тромбоцитов в условиях прямого стресса, как это бывает в стенозированных артериях. Десмопрессин обладал небольшой оксидо-циновой активностью или не обладал ею в моей практике в раннем периоде беременности у 31 женщины (включая носительниц гемофилии А и больных БВ) и с низким уровнем фVIII при использовании для предупреждения крово-

течения при инвазивных диагностических процедурах, таких, как амниоцентез (неопубл. данные).

Десмопрессин эффективнее всего у больных с БВ типа 1, в частности у тех, у кого имеется резерв фВ в местах хранения, что обычно видно по нормальному уровню фВ в тромбоцитах. У таких пациентов фVIII, фВ и время кровотечения обычно корректируются десмопрессин до нормальных значений. В случае двух других подтипов ответ может быть различным. Слабый и кратковременный ответ наблюдался у больных БВ типа 1, который характеризуется низким уровнем фВ тромбоцитов (потому что низкий уровень в тромбоцитах параллелен низкому уровню высвобождаемого из мест хранения фВ). При БВ типа 2А уровень фVIII:с обычно повышается в ответ на десмопрессин, но время кровотечения укоротилось только у некоторых больных. Десмопрессин противопоказан при БВ типа 2В из-за транзиторно появляющейся тромбоцитопении. Пока еще мало опыта с БВ типа 2М, но предсказывают слабый ответ, потому что фВ дисфункционален при этом подтипе. При типе БВ 2N уровень фVIII:с повышается после введения десмопрессина, но высвобожденный фVIII :с циркулирует в плазме пациента в течение относительно короткого времени, потому что стабилизирующее действие фФВ на фVIII:с нарушено в результате генной мутации, затрагивающей участок связывания фVIII:с у фВ. Поэтому концентраты плазмы, содержащие формы фВ и фVIII:с, предпочтительнее. Пациенты с БВ типа 3 обычно не отвечают на десмопрессин, потому что у них нет запасов, из которых может высвободиться фВ.

Другие нетрансфузионные методы лечения БВ

Два других вида нетрансфузионного лечения применяются иногда при БВ - синтетические антифибринолитические аминокислоты и эстроген-прогестерон-содержащие препараты. Антифибринолитические аминокислоты взаимодействуют с процессом лизиса вновь сформированных сгустков, насыщая места связывания на плазминогене, тем самым предупреждая его связывание с фибрином и препятствуя взаимодействию плазминогена с образующимся сгустком. Эпсилон-аминокапроновую кислоту (50-56 мг/кг каждые 4-6 час.) и транексаминую кислоту (20-25 мг/кг каждые 8-12 час.) можно принимать орально, вводить внутривенно, или применять местно. При лечении менее тяжелых форм эстрогены, синтетические и натуральные, повышают уровень фВ в плазме, но ответ настолько переменчивый и непредсказуемый, что эти средства нельзя широко использовать для лечебных целей. В клинике часто можно наблюдать, что продолжительное применение оральных контрацептивов, содержащих синтетические эстрогены или прогестероны, оказывалось полезным для уменьшения меноррагии у женщин с БВ, даже при тяжелом типе 3. Уровни фVIII:с и фВ при таком лечении не изменялись сильно, возможно, эффективность лечения объясняется опосредованными изме-

нениями в эндометрии матки, в котором снижается тенденция к кровоточивости во время менструации.

Траксфузионная терапия продуктами плазмы, содержащими как фVIII:с, так и фВ, является наилучшим методом при наличии кровотечения или для его предупреждения, и предполагаемый ответ на десмопрессин считается субоптимальным для гемостаза. фVIII:с и фВ могут быть введены в виде свежезамороженной плазмы, но требуемые большие объемы ограничивают возможности ее применения. Криопреципитат содержит в 5-10 раз больше фVIII:с и фВ (каждый контейнер содержит примерно 80-100 МЕ). Ранние исследования показывают, что криопреципитат, вводимый каждые 12-24 часа, нормализует уровень фVIII:с в плазме и останавливает или предупреждает кровотечение при БВ. На основании этих наблюдений криопреципитат стал основой лечения на многие годы. Однако методы уничтожения вирусов не могут быть применены для криопреципитата в массовом порядке в банках крови, и этот продукт несет в себе небольшой, но реальный риск передачи инфекционных агентов. Поэтому концентраты фVIII:с и фВ с инактивированными вирусами вначале разработанные для лечения гемофилии А, считаются более безопасными и предпочтительными для лечения больных БВ, не отвечающих на десмопрессин.

Два коммерчески доступных концентрата оценивались более широко, чем остальные, и клинические испытания показали их эффективность для предупреждения и остановки кровотечения.

Один, лицензированный в США и некоторых европейских странах для лечения БВ, содержит довольно высокие концентрации фVIII:с, большие, чем концентрации фВ, по результатам измерений фВ:RCoF (примерно в 203 раза больше в МЕ). Вирусы убивают при помощи пастеризации. Другой концентрат, пока что лицензированный только в Европе, отличается тем, что содержит примерно равные количества фVIII:с и фВ:RHCof. Два метода обезвреживания вирусов - растворитель-детергент и нагревание до высокой температуры - включены в процесс производства, чтобы инактивировать вирусы как имеющие оболочку, так и без оболочки. Другие концентраты фVIII:с-фВ с инактивацией вирусов успешно применялись у больных БВ, но клинический опыт их применения более ограничен. Высокоочищенные концентраты, полученные методом иммуноаффинной хроматографии на моноклональных антителах, содержат очень небольшие количества фВ, а имеющиеся в продаже рекомбинантные препараты фVIII не содержат его совсем. Они непригодны для лечения БВ, потому что время полужизни в плазме инфузированного фVIII:с очень коротко: 1 час или менее благодаря отсутствию его носителя фВ и в концентрате, и у больного БВ. Недавно был исследован концентрат, очищенный хроматографическим методом, сильно обогащенный фВ, но с низким содержанием фVIII. Концентрат был клинически эффективен при тестировании у небольшого числа больных с БВ типа 3. Сейчас его эффективность и безопасность исследу-

ются с участием большого числа пациентов в странах Европы.

Большая часть концентратов, изготовленных для лечения больных гемофилией А, содержат информацию на этикетке только относительно содержания фVIII:с. Поскольку фVIII:с у больных с БВ имеет более длительное время полужизни, чем при гемофилии А, 24-26 час. против 12-14 час., то инфузия одной дневной дозы достаточна для достижения и поддержания адекватного уровня в плазме для лечения спонтанных эпизодов кровотечений и предупреждения новых кровотечений, вплоть до полного излечения, в зависимости от локализации и характера операции. Поскольку в США FDA (Управление по контролю медицинских и пищевых продуктов) требует, чтобы продукты из плазмы, предназначенные и лицензированные для лечения больных БВ, имели на этикетке указание на то, какой дефектный белок препарат может заместить, концентрат, обработанный растворителем-детергентом и нагреванием, должен содержать на этикетке указание на содержание фВ:RCoF. Дозы этого концентрата, которые я рекомендую, показали свою эффективность в обширном, проспективном клиническом исследовании - 40-60 МЕ/кг (50-70 МЕ/кг у детей, потому что у них меньше остающееся содержание *in vivo*). Что обычно позволяет получать уровень фВ:RCoF в плазме 80-120 Е/дл и выше. Даже если время полужизни в плазме фВ:RCoF значительно короче, чем у фVIII:с (6-8 против 24-26 час.), обычно такие дозы не приходится повторять чаще, чем каждые 24 часа, но иногда интервалы между вливаниями приходится согласовывать с клинической ситуацией.

Обычно нет необходимости делать лабораторные исследования, чтобы следить за заместительной терапией у больных со спонтанными эпизодами кровотечений. Для хирургических процедур я рекомендую определять фVIII:с каждые 12 час. в день операции, затем каждые 24 часа. Результат определения фVIII:с можно предсказать по фармакокинетическим данным, указывающим, что 1 МЕ/кг повышает уровень фVIII:с в плазме примерно на 2 Е/дл (1,5 Е/дл у детей). Те, кто применяет концентраты, помеченные по содержанию фВ:RCoF, могут выбрать метод определения этой половины, хотя ее сложнее измерить в клинических условиях, и этот тест менее стандартен, чем определение фVIII:с. Нужны дополнительные исследования, чтобы выяснить, станут ли новейшие лабораторные методы, такие, как определение связывания с коллагеном, проще и лучше предсказывать исход.

Определять время кожного кровотечения обычно нет необходимости. Удлиненное время кровотечения часто не нормализуется или даже укорачивается у больных после лечения концентратами фVIII-фВ. Существуют неизвестные причины для неадекватного влияния продуктов плазмы на ВК. Сегодня ни один концентрат не содержит полностью функционального фВ, по данным оценки *in vitro* мультимерной модели и по данным функциональных проб,

потому что сильный протеолиз фВ имеет место при очистке в результате действия протеиназ тромбоцитов и лейкоцитов, загрязняющих плазму, подвергнутой фракционированию. Несмотря на отсутствие коррекции ВК или частичную коррекцию, крупные хирургические операции успешно проводятся, а спонтанные кровотечения купируются после применения концентратов фVIII:с-фВ. В тех относительно редких случаях, когда ВК остается удлиненным и кровотечение остановить не удается, концентраты тромбоцитов (введенные немедленно после препаратов фVIII:с-фВ, в дозе $4-5 \times 10^{11}$ тромбоцитов), оказываются эффективны, в частности, у пациентов с БВ типа 3, при этом корректируется ВК и прекращается кровотечение. Тромбоциты пациентов с БВ типа 3 полностью лишены фВ, и после инфузии концентратов не происходит захвата белка из плазмы. Гемостатическая эффективность трансфузии нормальных тромбоцитов должна быть повышена, потому что эти клетки транспортируют и локализуют фВ в участках повреждения сосудов. С практической точки зрения, нужно подчеркнуть, что в более обширном проспективном исследовании, проведенном с участием больных БВ, концентраты тромбоцитов были необходимы для предупреждения или остановки кровотечения только у одного больного.

Лечение при беременности и родах

Нет никаких данных о том, что БВ, даже наиболее тяжелого типа 3, ухудшает способность женщин к зачатию и деторождению, или что случаи невынашивания плода более часты у этих больных по сравнению со здоровыми женщинами. Во время нормальной беременности фВ и фVIII:с имеют тенденцию спонтанно повышаться у женщин с БВ типов 1 и 2, но этот подъем начинается не раньше 10-11 недели беременности. Степень увеличения во время беременности сильно варьирует, поэтому пациентки с БВ типа 1 должны быть проверены на фVIII:с в дни перед родами и через 1-2 недели после них - в это время уровень фVIII:с в плазме резко падает, и может произойти позднее кровотечение. У этих больных уровень фVIII:с - лучший предсказатель риска кровотечения при родах и в послеродовой период. Риск кровотечения минимален, когда уровень фVIII:с выше 40 Е/дл, и этот риск весьма высок при уровне меньше 20 Е/дл. При этом, возможно, необходимо принимать десмопрессин во время родов, особенно при кесаревом сечении, и еще в течение 2-3 дней. Аккуратная остановка кровотечения хирургическим путем и эффективные сокращения матки обычно компенсируют продолжительное ВК. У больных с БВ типа 3 из-за того, что уровни фVIII:с очень низки и почти неизмеримы в течение всей беременности, следить за ними во время беременности малоэффективно и бесполез-

но, но заместительная терапия концентратами плазмы и наблюдение за уровнем фVIII:с необходимы во время родов и после них. По моему опыту, 3-4 дневных дозы концентратов фVIII:с-фВ (40-60 фVIII с или фВ-RCoF МЕ/кг) необходимы, чтобы избежать послеродового кровотечения, которое часто имеет место, если женщины с БВ типа 3 совсем не получают лечения или получают его в течение короткого периода. Во время беременности может развиваться или осложниться тромбоцитопения у больных с БВ типа 2В, но неясно, как она связана с кровотечением.

Лечение пациентов с аллоантителами к фВ

Аллоантитела к фВ развиваются после многочисленных трансфузий в 10-15% случаев у больных с БВ типа 3. Частота встречаемости и особенности этого осложнения очень похожи на то, что происходит с пациентами с гемофилией А, у которых инфузия концентратов фВ не только неэффективна, но может вызвать постинфузионную анафилактическую реакцию, по причине образования иммунных комплексов, активирующих систему комплемента. Эти реакции могут быть опасны для жизни. Пока накоплено мало опыта лечения этих пациентов иными препаратами, чем концентраты фVIII:с-фВ. Мне удалось успешно лечить пациента, у которого до этого были угрожавшие жизни анафилактические реакции, и которому пришлось срочно делать операцию на брюшной полости с применением рекомбинантного фVIII:с, потому что этот продукт полностью лишен фВ, он был единственным, который не вызывал образования иммунных комплексов и не вызывал анафилактических реакций. Из-за очень короткого периода полужизни фVIII, лишённого носителя - фВ, рекомбинантный фVIII:с нужно вводить путем непрерывной в/в инфузии, в больших дозах, достаточных для поддержания у больного уровня фУ111:с выше 50 Е/дл в течение 10 дней после операции.

Заключение

Лечение эпизодов спонтанного кровотечения и их предупреждение при инвазивных процедурах относительно просто и может быть выполнено клиническим гематологом при минимальном количестве лабораторных тестов (определение фVIII:с). Однако пациенты должны быть подробно охарактеризованы фенотипически, потому что выбор лечения должен зависеть от различных типов и подтипов болезни. Сделать такую характеристику непросто. В большинстве клинических центров трудно наладить выполнение большого количества сложных тестов, таких, как мультимерный анализ, и определение фВ:RCoF Образцы могут быть отправлены в клинику, где есть опытные специалисты по данному вопросу

***DONOR POOL SIZE AND THE RISK OF BLOOD-BORNE
CREUTZFELDT-JACOB DISEASE******РАЗМЕРЫ ПУЛОВ ДОНОРСКОЙ ПЛАЗМЫ И РИСК
ЗАРАЖЕНИЯ БОЛЕЗНЬЮ КРЕЙЦФЕЛЬДА-ЯКОБА ЧЕРЕЗ ДОНОРСКУЮ КРОВЬ******P. Brown******Transfusion 1998;38:3:312-315***

Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) - фатальное заболевание мозга, приводящее к его дегенерации, в основном поражающее больных в возрасте от 50 до 75 лет. Болезнь обычно начинается с потери памяти, прогрессивно приводящей к деменции, и сопровождается расстройством координации движений, затруднением речи, судорогами мышц, ригидностью, слабостью, мутизмом и комой. Процесс не отличается от поздних стадий болезни Альцгеймера и неизбежно приводит к смерти в течение года после проявления первых симптомов.

БКЯ поражает 1 из миллиона человек, что составляет в США примерно 250 случаев в год. Эта цифра превосходит известные на сегодняшний день данные относительно полиомиелита или бешенства, но уступает случаям СПИДа, вирусных гепатитов, герпетических инфекций и даже кори. Это редкое заболевание привлекло внимание, так как имеет много общего с гораздо более распространенной болезнью Альцгеймера, но значительно опаснее, а также из-за возможности передачи от человека к человеку при нарушениях лечебных мероприятий.

Недавний пример БКЯ, вызванной медицинскими мерами - вспышка заболевания у больных с гипопитуитаризмом, получавших гормон роста, который до 1985 г. выделяли из трупных гипофизов. Некоторые люди, из трупов которых был получен гормон, умерли от нераспознанной БКЯ, и их гипофизы попали в пул, из которого было получено лекарство, использованное для лечения более 7000 больных в США. На сегодня это стало причиной 21 смерти. Такой же путь заражения привел во Франции и Англии примерно к 100 смертным случаям после лечения взрослых людей. Начиная с 1970-х годов продолжают появляться новые случаи после все более длительных инкубационных периодов.

Трагедия, связанная с применением гормона роста, и даже в большей степени более поздняя вспышка БКЯ у больных после нейрохирургических операций, которым была сделана пересадка зараженной трупной твердой мозговой оболочки, также взятой от людей, умерших от БКЯ, заставили нас обратить особое внимание на все медицинские процедуры, связанные с пересадкой тканей - твердых и жид-

ких - от человека к человеку, и постараться предвидеть и предупредить опасность.

Возникает вопрос, каков риск передачи БКЯ с плазмой крови? Ответ зависит от трех расчетов: 1) вероятности того, что пул плазмы будет содержать материал по меньшей мере от одного донора, зараженного БКЯ; 2) вероятность того, что лицо, получившее продукт, сделанный из такого пула, получит с ним инфекционный агент; 3) вероятность того, что такой больной будет заражен и заболеет БКЯ.

Из всех этих факторов реально можно проконтролировать только число доноров пула плазмы; все другие факторы биологически переменны, включая число доз продукта, изготовленных из пула плазмы, а также доз, данных реципиентам, что зависит от индивидуальных особенностей лечения. В настоящей работе анализируются размеры пулов плазмы в контексте указанных выше биологических аспектов.

Риск заражения БКЯ на разных этапах***Риск на 1 этапе***

Вероятность того, что пул плазмы будет содержать плазму больного донора, была недавно проанализирована в общих чертах, для ряда уровней частоты заражения и размеров пулов. Применяя эти статистические принципы к БКЯ, мы начинаем с числа заболеваний во всей популяции и числа случаев на миллион жителей. При помощи простой арифметики определяем частоту БКЯ во всей популяции - 1 случай на 1700000 жителей (см. приложение 1). Затем мы можем определить частоту заболеваний в возрастной группе основных доноров (от 20 до 75 лет) - 1 случай на 1.27 млн. жителей (см. приложение 2). Иначе говоря, из 1.27 млн. доноров у одного обнаружат БКЯ. В США это составляет около 130 больных на различных стадиях заболевания в любой день года.

В зависимости от того, получена ли плазма методом плазмафереза или от отдельных кроводач, типичная партия продукции объемом 3200 л плазмы требует участия от 7000 до 15000 доноров. При производстве многих концентратов белков из плазмы партии продукции объединяют перед обработкой, что повышает количество доноров до 50000, и еще больше, если альбумин используют для стабилизации прокоагулянтных препаратов. В этих случаях верх-

ним пределом может стать 100000 доноров и больше. В соответствии с частотой больных БКЯ в популяции доноров - 1/1.27 млн. человек, вероятность того, что плазма донора, больного БКЯ, попадет в пул от 10000 доноров, составляет 0.8%. Если пул увеличивается до 100000, вероятность возрастает до 7.6% (см. приложение 3).

Однако человек с симптомами БКЯ обычно не является донором, и мы должны беспокоиться о периоде до появления симптомов. Здесь - полная неопределенность, так как мы не знаем, как долго инфекция находится в крови до появления симптомов, и у нас нет серологических маркеров заболевания в доклинической стадии. Однако у нас все же есть немного информации. В некоторых опытах с экспериментально зараженными грызунами инфекционность была обнаружена в крови (обычно в лейкоцитомасле) по крайней мере в середине инкубационного периода, и выявлялась до самой гибели животного. Мы также знаем, что у людей, получивших зараженный гормон роста, инкубационный период составил от 5 до 30 лет, в среднем около 20 лет (также Preece M., письменное сообщение, январь 1998 г., и Dormont D., письменное сообщение, январь 1998 г.).

Предположив, что эти данные, полученные на моделях грызунов, а также при ятрогенном заболевании человека, можно приложить к спорадическим случаям БКЯ у человека, мы можем постулировать, что инфекционность может присутствовать в крови за 10 лет до начала болезни. Частота инфекционности во время инкубационного периода БКЯ, таким образом, будет в 10 раз больше годовой частоты БКЯ, и вероятность того, что зараженный донор будет участвовать в пуле, становится равной 13% для пула из 10000 доноров, и 75% для пула из 100 доноров (см. приложение 4).

Риск на 2 этапе

Следующая стадия риска - вероятность того, что реципиент плазмы или продуктов из ее пула, в котором оказалась плазма больного БКЯ, получит инфекционный агент, - может быть примерно вычислена при учете следующих трех факторов: число инфекционных частиц в пуле плазмы, число вирусов БКЯ, необходимых для формирования инфицирующей единицы БКЯ, и число реципиентов. Последнее определяется размерами пула плазмы, количеством плазмы, необходимым для получения лечебной дозы, и числом введенных доз. На практике для одной лечебной дозы нужна плазма от одного до пяти доноров, но для упрощения расчетов мы будем считать число доноров в пуле плазмы и число реципиентов взаимозаменяемыми величинами.

Первая ситуация: донорский пул содержит много инфекционных частиц. Например, если пул

содержит 10000 инфекционных частиц, он более или менее «насыщен»: если весь продукт, полученный из пула, будет перелит одному реципиенту, он будет заражен. Если пул будет перелит 100 реципиентам, то весьма вероятно, что все 100 будет заражены, и так далее до тех пор, пока число реципиентов не достигнет нескольких тысяч. На этом этапе разведение и случайное распределение вирусов приведут к заражению некоторых реципиентов. Такова ситуация с ВИЧ и вирусом гепатита С - одна кроводача может содержать до 100000 инфекционных частиц вирусов.

Вторая ситуация: донорский пул содержит небольшое число инфекционных частиц. Например, если донорский пул содержит пять инфекционных частиц, и весь продукт получен одним реципиентом, то заразится только один реципиент. Если пул попадет 10 реципиентам, то заразится 1-5 человек. Если пул разделен между 100, 1000, 10000 больными, все равно заразится 5 реципиентов, так как весьма вероятно, что каждая инфекционная единица попадет одному реципиенту. Эта концепция полностью распределенного, очень низкого уровня инфекционности важна для понимания влияния размеров пула на риск для реципиента. Неважно, распределились ли несколько вирусных частиц в 10 пулах от 10000 или одном от 100000 - заразится одно и то же число реципиентов. Это - наиболее вероятная ситуация для БКЯ, по данным экспериментов с заражением животных, а также по результатам, полученным у людей, хотя точный уровень инфекционности в крови людей до сих пор не был определен (также: Brown P., Rohwer G., неопубликованные данные, январь, 1998 г.).

Третья ситуация: одна инфекционная единица БКЯ состоит из двух или более частиц, которые являются независимо распределенными физическими единицами. Мы не знаем, сколько частиц образуют инфекционную единицу БКЯ, поэтому должны считать, что две или больше вирусных частицы образуют инфекционную единицу. В этой ситуации пул, содержащий 100 частиц (50 инфекционных единиц БКЯ), разделенный между 10 реципиентами, видимо, несет всем им риск заражения. Если пул разделен между 100, 1000, 10000 реципиентами, случайное распределение частиц приведет ко все меньшему количеству людей, получающих требующиеся 2 частицы, и будет наблюдаться прогрессивное снижение случаев заражения с приближением к нулю.

Этот результат противоположен таковым в первых двух ситуациях, в которых инфекционной считалась одна вирусная частица. Он отличается от результата в ситуации высокой инфекционности тем, что снижение числа заражений начнет наблюдаться значительно раньше при разведении серий, чем если бы каждая частица была инфекционной. Он также

отличается от результатов в ситуации с низкой инфекционностью тем, что число инфицированных реципиентов прогрессивно приближается к нулю, вместо того, чтобы выходить на плато минимума, эквивалентного числу независимых инфекционных частиц в исходном препарате. Во всех трех ситуациях риск для отдельного реципиента возрастает с ростом числа полученных доз (в то время как риск, связанный с пулом плазмы, остается неизменным).

Важно также отметить, что в исследованиях по определению безопасности продукта из крови эти различия можно было наблюдать только при использовании прогрессивно увеличивавшегося числа животных для изучения прогрессивно увеличивавшихся разведений. Если группа идентичных образцов использовалась для параллельных разведений суспензий (1:10, 1:100, 1:1000...), и весь объем каждого разведения вводился все более многочисленным группам животных, то, в зависимости от того, содержалась ли там одна или более чем одна инфекционная единица БКЯ, мы наблюдали снижение числа заражений, которое достигало минимального плато или продолжало снижаться до нуля. Если же мы вводили постоянный объем каждого разведения одному и тому же небольшому числу животных (метод стандартных конечных разведений), мы также увидим снижение числа заражений с увеличением объема препарата, независимо от числа вирусов, составляющих инфекционную единицу БКЯ, так как не вводятся более значительные объемы препарата. Эту зависимость иногда не замечают при работе с очень низкими уровнями инфекционности, с целью доказать, что препарат действительно не заразен, в то время как у него может просто быть не выявлена инфекционность.

Риск на 3 этапе

Финальный этап риска - вероятность того, что реципиент, вступивший в контакт с инфекционным агентом БКЯ, заразится - зависит от легкости передачи агента внутривенным или внутримышечным путем. Мы не знаем ответа на этот вопрос у людей, но у животных эти пути заражения могут потребовать концентраций в 10-10000 раз больше, чем интрацеребральное введение. Наконец, влияние генетических факторов или чувствительности к инфекции было показано для ятрогенной БКЯ после подкожного введения зараженного гормона роста человека, и, возможно, так же обстоит дело и с зараженными продуктами из крови.

Заключение

Хотя математическое моделирование может дать нам весьма точное представление о влиянии размеров пула на риск заражения, оценки риска для

пациента заразиться БКЯ при помощи зараженного продукта из крови неполны из-за нашего недостаточного знания о большинстве биологических факторов, влияющих на эту оценку. Относительно величины входящих переменных (редкие случаи заболеваемости БКЯ в общей популяции, низкая или отсутствующая инфекционность в крови больных БКЯ, и низкая эффективность передачи болезни при внутривенном или внутримышечном введении), шанс заразиться БКЯ посредством пула продукта из крови, в который попала кровь больного БКЯ, должен быть очень невелик, независимо от объема пула. Тот факт, что эпидемиологические исследования до сих пор не выявили ни одного случая БКЯ в результате применения донорской крови и продуктов из нее, даже в таких популяциях с высоким риском, как больные гемофилией, поддерживает это предположение (также: Schonberger L.V., неопубликованные данные, январь, 1998 г.).

Приложение

1. Частота заболеваемости - число новых случаев в данной популяции, появившихся в течение определенного времени (обычно 1 год), связана с частотой встречаемости - с числом случаев, которое существует в данной популяции в любой данный момент: частота встречаемости = длительность болезни (годы) x число заболеваний (в год). Для БКЯ один новый случай возникает на миллион человек в год, средняя длительность болезни 7 мес., частота встречаемости $7/12 \times 1 = 0.58$ случаев на миллион человек (1 случай на 1.7 млн. чел.)

2. Из количества населения США и распределения БКЯ по возрастным группам видно, что 89% всех случаев БКЯ наблюдается у 65% населения в возрасте от 20 до 75 лет. Таким образом, частота заболеваемости БКЯ в этой возрастной группе 0.89 случаев на 650000 человек = 1.37 случая на 1 млн. чел. Возрастная встречаемость составляет $7/12 \times 1.37 = 0.79$ случаев на 1 млн. чел. (1 случай на 1.27 млн. чел.).

3. Вероятность того, что донорский пул будет содержать хотя бы одну кроводачу от донора, имеющего заболевание с известной частотой встречаемости, рассчитывается по формуле: вероятность = $1 - (1 - \text{частота встречаемости})^{\text{размер пула}}$.

4. Используя годовую частоту одного случая БКЯ на млн. чел., получаем частоту встречаемости 10 инкубационных случаев с потенциально заразной кровью на миллион населения, или, при уточнении возраста донора, 13.6 случаев на 1 млн. доноров (1 случай/73500). Вероятность попадания инфицированной крови в донорские пулы разных размеров рассчитывается по формуле из Приложения 3.

CURRENT STATUS OF SOLVENT/DETERGENT-TREATED FROZEN PLASMA

СЕГОДНЯШНИЙ СТАТУС ЗАМОРОЖЕННОЙ ПЛАЗМЫ, ОБРАБОТАННОЙ РАСТВОРИТЕЛЕМ-ДЕТЕРГЕНТОМ

(сокращенный перевод)

H.G. Klein, R.Y. Dodd, W.H. Dzik, et al.

Transfusion 1998;38;1:102-107

Комитет по продуктам из крови Управления по контролю пищевых и лекарственных продуктов (FDA) недавно рекомендовал разрешить к применению обработку свежемороженой плазмы (СЗП) растворителем и детергентом (РД). Ожидается, что FDA скоро выдаст лицензию V.I. Technologies, Inc. (VITEX, New York, NY) на производство РД-плазмы. Ввиду того, что в США в год перерабатывают примерно 2 миллиона доз плазмы, возможность получения альтернативного компонента крови должно дать клинической практике значительные дополнительные возможности применения СЗП, что может расширить границы ее использования и спрос. В данном обзоре сообщается о различных аспектах развития метода получения РД-плазмы и инактивации вирусов, современные клинические данные применения РД-плазмы, а также ответы на обычно возникающие вопросы. Данная работа не ставит целью установить стандарты и требования для применения СЗП или РД-плазмы, но дать основную информацию для врачей, рассматривающих различные варианты трансфузий. Разработка руководств и стандартов для добровольного участия потребует дополнительных клинических данных.

В настоящее время большую часть СЗП получают в центрах переливания крови в качестве побочного продукта переработки цельной крови, хотя СЗП можно получать и путем плазмафереза. СЗП достаточно безопасна биологически. Риск при ее применении оценивается как 7.5 случаев побочных действий на 10000 перелитых доз, и 3.7 случая побочных действий на 1000 больных, получивших трансфузии. Усилия по улучшению скрининга и тестирования, а также по уменьшению неоправданного использования компонентов крови привели к снижению риска передачи вирусной инфекции. Однако СЗП до сих пор несет в себе примерно такой же риск, как и другие компоненты крови, полученные от одного донора. Ввиду того, что этот компонент практически не содержит клеток, СЗП не переносит тех инфекций, которые связаны исключительно с лейкоцитами, таких, как цитомегаловирус или Т-лимфотропный вирус типа I и/или II. Так же, как другие широко используемые компоненты - эритроциты и тромбоконцентраты, СЗП не обрабатывали никакими реагентами, инактивирующими вирусы.

До появления инактивации вирусов и рекомбинантных методов риск передачи вирусной инфекции через концентраты факторов свертывания, приго-

товленные из больших пулов плазмы, значительно превосходил риск инфицирования через компоненты от одного донора - СЗП или криопреципитат. С развитием эффективных методов инактивации вирусных концентратов антигемофильного фактора (АГФ) и другие инактивированные продукты теперь стали менее опасны, чем индивидуальные дозы цельной крови, из которых они были получены.

Метод инактивации вируса при помощи растворителя-детергента (SD или РД) был лицензирован FDA в 1985 г. для производства концентрата АГФ и применен для обработки СЗП. Плазма РД была лицензирована в Германии в 1991 г. и применяется там рутинно, как и во Франции, Австрии и Нидерландах. Плазма РД полностью заменила СЗП в Норвегии и Бельгии. Более 2 млн. доз РД-плазмы и более 11 млн. доз обработанных РД продуктов из крови было перелито во всем мире без единого выявленного случая передачи вирусов (Grossberg, письменное сообщение, июнь 1997 г.).

Обработка плазмы РД для инактивации вирусов

Применение РД-метода для уменьшения вирусной инфекционности фракционированных белковых продуктов из крови берет начало в использовании растворителя этилового эфира и детергента Гвин-80, для разделения вирусов, покрытых липидной оболочкой, от вирусов, покрытых белковой оболочкой. Исследования показали, что различные составы РД, введенные в плазму и ее фракции, инактивируют различные вирусы в липидной оболочке, в то же время сохраняя состав и биологические функции отдельных белков плазмы. Используемый метод сочетает органический растворитель три(н-бутил)фосфат (ТНБФ) с неионным детергентом, Тритоном X-100, позволяя достичь высокого уровня уничтожения вирусов при приемлемой совместимости с белками.

Убедившись в том, что обработка РД повышает безопасность концентратов факторов свертывания, таких, как АГФ, начали исследовать возможность обработки плазмы РД. Ряд исследований по инактивации в АГФ вирусов, попавших туда естественным или искусственным путем, показали инактивацию вируса везикулярного стоматита, вирусов Синдбис, Сендай, вирусов гепатита С (ВГС) и гепатита В (ВГВ) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Вирус энцефаломиокардита, не имеющий оболочки, исполь-

зованный в качестве контроля, не был инактивирован. Выход свертывающей активности фактора VIII (фVIII) составил 80%. Реагенты легко удалялись гелефильтрацией, формирования новых иммуногенов не наблюдалось. Nogowitz et al. обсуждали опубликованные и неопубликованные данные, показывающие, что сохранение в кровотоке, время полужизни АГФ и концентрация других белков, связанных и не связанных со свертыванием крови, были в норме.

Безопасность концентратов факторов свертывания, обработанных РД

В 1985 г. FDA лицензировало АГФ, обработанный РД, для нью-йоркского центра переливания крови. Метод был разработан в первую очередь, чтобы уменьшить риск передачи гепатита, но его применение совпало со всеобщим беспокойством по поводу передачи ВИЧ через концентраты факторов свертывания. К счастью, РД инактивирует ВИЧ. Примерно 6 млн. доз перелитого АГФ, представляющих более 75000 пациентов/лет лечения (считая в среднем 80000 Международных Единиц (МЕ) /пациент-год были введены после 1985 г. (Grossberg, письменное сообщение, июль 1997 г.). Примерно 2/3 количества АГФ, перелитого в Северной Америке, Западной Европе и Японии, обработано РД. Обработка РД была признана как средство инактивации вирусов с липидной капсулой после многочисленных исследований *in vivo* на животных, а также клинических исследований, включая: 1) семь исследований по инактивации вируса гепатита на шимпанзе; 2) 11 независимых клинических исследований, в которых участвовали 427 больных гемофилией, которые считались инфицированными вирусом гепатита; 3) 455 больных гемофилией, которые считались ВИЧ-инфицированными. В этих исследованиях не сообщалось ни об одном случае передачи ВГВ, ВГС или ВИЧ. Наоборот, до 1985г. исследования на шимпанзе и клинические исследования первых нагретых и высушенных концентратов АГФ в США показали, что передача ВИЧ и ВГВ происходила часто, и практически каждая доза концентрата АГФ содержала ВГС. По оценкам нью-йоркского центра переливания крови, одна доза современного концентрата фактора свертывания, обработанная методом РД, имеет менее 1 шанса из 10^{16} , 10^{13} и 10^6 содержать ВИЧ, ВГВ и ВГС, соответственно. Дополнительные процессы могут еще повысить безопасность, но было бы разумно обеспечить тот же уровень безопасности для плазмы, обработанной РД.

Остается также беспокойство по поводу вирусов, не содержащих оболочку, таких, как вирус гепатита А (ВГА) и парвовирус В19. Кроме того, существующий метод не инактивирует агенты, связанные с болезнью Крейцфельд-Якоба, и другими спонгиформами. Риск их передачи невелик, но его также необходимо исключить.

Благодаря короткой фазе виремии ВГА редко передается через компоненты, полученные от одного донора. Тем не менее его передача была зарегистрирована у реципиентов концентратов АГФ в нескольких странах Европы. Эти результаты противоречат данным эпидемиологических исследований в США, Франции, Бразилии и Норвегии. Исследования факторов свертывания на наличие генов ВГА дали противоречивые результаты. Факты говорят о том, что ВГА был передан через некоторые концентраты факторов, обработанные РД, хотя это явление не имеет широкого распространения. Причины передачи неясны, но они могут заключаться в высокой концентрации ВГА в пуле, преобладающем удалении нейтрализующих анти-ВГА, загрязнении воды или других причинах. Недавно был сделан обзор данных о путях передачи ВГА.

Весьма частая встречаемость парвовируса В19 у больных гемофилией и 5 этапов сероконверсии свидетельствуют, что этот вирус может быть передан через очищенные продукты из крови. В общем случае заражение В19 приводит к нетяжелому заболеванию с симптомами лихорадки, которое проходит само (*erythema infectiosum*), но у некоторых групп пациентов могут возникнуть серьезные осложнения. У беременных женщин, особенно в течение первых 20 недель, инфекция вызывает 10% риск спонтанного аборта и 1.5% риск *hydrops fetalis*. У пациентов с хронической гемолитической анемией могут возникнуть транзиторные апластические кризы, а при хроническом иммунодефиците может развиваться чистая красноклеточная аплазия. В недавно опубликованном обзоре документирована сероконверсия В19 у семи из девяти лиц, получивших концентрат фактора свертывания, обработанный РД. Частота встречаемости этого вируса меняется в зависимости от сезона и группы населения, к которой принадлежат доноры плазмы. По данным одного исследования, частота встречаемости геномных последовательностей В19 в донорской крови составляет 1 на 3300, а во время эпидемии - 1 на 167 - по данным только гнездовой полимеразной цепной реакции (отчет конференции «Шестой семинар по парвовирусам», Монпелье, Франция, 1995 г.).

Факт передачи с концентратами факторов ВГА и В19 должен насторожить клиницистов в отношении опасности инфекции в объединенных компонентах крови, пулах РД-плазмы, в отличие от концентратов факторов и СЗП, обычно содержащих достаточное количество нейтрализующих антител как к ВГА, так и к В19. Реципиенты, получающие 10-15 мл РД-плазмы на кг веса тела должны получить 100-150 мг IgG на кг, или 480-1800 МЕ анти-ВГА. Эта доза во много раз больше обычно вводимой для профилактики ВГА. 54 приготовленные ранее дозы РД-плазмы содержали в среднем 132 Е/мл (43-491) анти-В19. Защитная доза для этого агента не была установлена. Относительный риск получить вирус без оболочки при трансфузии пула по сравнению с индивидуаль-

ным продуктом не был определен. Однако антитела отсутствуют в концентратах факторов и присутствуют в компонентах РД-плазмы.

РД-плазма: получение, безопасность и эффективность

РД-плазму можно получать почти так же, как и очищенные белковые препараты - альбумин и гаммаглобулин. Метод, предложенный в США для обработки РД, включает в себя инкубацию плазмы, подобранной по группам АВО, из пулов по 2500 добровольных доноров (10-20% применяется для приготовления пулов, идущих на коммерческое фракционирование плазмы) с 1% ТНБФ и 1% Тритон X-100 в течение 4 часов при 30°C. Реагенты удаляют экстракцией растительным маслом и последующей хроматографией в обращенной фазе на смоле С18. Стерильную после фильтрации плазму снова замораживают в стандартных контейнерах объемом 200 мл. Процесс изготовления предусматривает получение компонента плазмы, стандартизированного по объему и уровню факторов свертывания. Соответствие было показано в более чем 2000 партиях, произведенных в Европе этим методом после его введения в 1991 г. РД-плазма содержит минимум 0.7 Е/мл каждого из факторов: V, VII, VIII, IX, X, XI и XIII, и минимум 1.8 мг/мл фибриногена (FDA. SD-Plasma Product monograph, February 1997; Appendix II:1). Маркеры активации свертывания, уровень основных белков плазмы, стабильность при хранении находятся на ответственности изготовителя.

Инактивация вирусов широко документирована. При существующем методе обработки РД уровень инактивации модельных вирусов в СЗП превосходит таковой в концентратах АГФ. Полная инактивация введенных вирусов обычно достигается в первые 15 минут 4-часовой процедуры. Была показана инактивация вирусов больше или равная 10^6 средних инфекционных доз ВГВ для шимпанзе, $>10^5$ таких доз ВГС и $>10^{7.2}$ средних инфекционных доз для культуры ткани ВИЧ. Содержание белков плазмы в РД-плазме находится в пределах нормы. ТНБФ и Тритон X-100 удаляются эффективно, остаток в конечном продукте составляет <3 мкг/мл. При этом уровне человек, весящий 70 кг, получающий 2 л РД-плазмы, может получить 0.086 мг инактивирующих химикатов на 1 кг веса тела. Этот уровень на 2 порядка ниже самой низкой дозы этих веществ, вызывающих побочные действия у мышей.

8 исследований РД-плазмы, используемой для СЗП, были проведены в США после 1991 г. У больных с наследственным дефицитом факторов, требующих профилактических инфузий плазмы при хирургических операциях, гемостатический уровень дефицитного фактора был достигнут в 30 из 32 случаев лечения. В оставшихся двух случаях у одного больного появился ингибитор, а другой получил

только 4 мг плазмы на 1 кг веса тела, что ниже эффективной дозы. Клинический эффект достигался после 40-46 инфузий, и был достигнут во всех случаях. Все 4 пациента с дефицитом фактора XIII оставались бессимптомными в течение 42 мес. профилактики. У пациентов с кровоточивостью при дефиците факторов свертывания значительное снижение протромбинового времени или активированного частичного тромбопластинового времени было достигнуто в 19 из 20 случаев, кровотечение прекратилось в 49 из 51 случая. Клинический эффект был достигнут у всех девяти пациентов, требующих лечения варфарином или другими средствами.

У всех 6 пациентов, леченых по поводу хронической рецидивирующей тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), значительно увеличилось число тромбоцитов. Такой же клинический ответ наблюдался при введении СЗП, а именно отсутствие прогрессирования болезни. У 16 больных ТТП, леченных РД-плазмой, выживаемость, уровень ремиссии и уровень рецидивирования были такими же, как при лечении СЗП (FDA. SD-Plasma Product monograph, February 1997:4-5). Эти результаты вдохновляют, но больных, прошедших курс лечения мало. ТТП - не изолированная болезнь, а синдром со многими клиническими проявлениями. Только дополнительные клинические наблюдения докажут эффективность РД-плазмы при каждом из этих обстоятельств. При использовании РД-плазмы отмечены некоторые побочные действия у 66 больных, получивших более 800 доз РД-плазмы, жизненно важных изменений не наблюдалось. Общий уровень реакции на дозу перелитой РД составил 0.66% (FDA. SD-Plasma Product monograph, February 1997:4-5). Побочные действия были минимальны и включали озноб, боль в животе; у одного пациента с астмой в анамнезе наблюдалось укорочение дыхания. Примерно 12% из 396 случаев лечения были связаны с побочными действиями, половина - аллергические реакции. В исследованиях с применением СЗП по указаниям FDA, РД-плазма вызывала несколько меньшее, но сравнимое возникновение аллергических реакций. Шести больным, ранее не получавшим трансфузий, было перелито 52 дозы РД-плазмы из шести различных партий. ВИЧ, ВГВ и ВГС через 6 мес. после трансфузий не выявлено.

Показания к применению РД-плазмы почти, но не совсем такие же, как для СЗП. Клинические исследования выявили эффективность только в двух случаях: 1) замещение дефицитных факторов свертывания, для которых нет специальных препаратов; и 2) лечение ТТП. При лечении побочных действий варфарина инфузии РД-плазмы значительно уменьшали протромбиновое время во всех шести исследованных случаях. По данным, представленным изготовителем в FDA, РД-плазма вызвала желаемое лечебное действие во всех девяти случаях. Как и СЗП, РД-плазма не должна использоваться для восполнения объема плазмы или как источник восполнения белков. Она не

обладает свойством придавать обратимый характер действию гепарина и не показана больным с минимальным удлинением протромбинового времени или активированного частичного тромбопластинового времени, или в качестве профилактического средства, когда предполагается массивная трансфузия. РД-плазма не содержит самых крупных мультимеров фактора Виллебранда. Зарегистрировано умеренное снижение протеина S и антиплазмина (FDA. SD-Plasma Product monograph, February 1997; Appendix II:1).

Сведений о применении РД-плазмы у новорожденных, детей и беременных женщин мало. При клинических испытаниях в США РД-плазму переливали двум новорожденным и 18 детям в возрасте 1.5-17 лет (Grossberg, письменное сообщение, июль 1997 г.). Один норвежский терапевт сообщил о переливании 75 доз РД-плазмы детям и новорожденным. Два ребенка в отделении интенсивной терапии получили большие объемы РД-плазмы при одновременной экстракорпоральной мембранной оксигенации. В ходе этих исследований не было обнаружено каких-либо неожиданных побочных действий РД-плазмы по сравнению с СЗП. В Европе не существует ограничений для ее применения у каких-либо групп пациентов. Изготовители в США не планируют дополнительных клинических исследований, но постлицензионный мониторинг, видимо, будет продолжаться.

Роль РД-плазмы в практике банков крови и трансфузий

Клиническая безопасность РД-плазмы представляется обнадеживающей, но пока недостаточно данных о ее применении у новорожденных, детей, беременных женщин; у больных с диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (ДВС), для которых фактор Виллебранда может быть необходим, или при лечении тяжелых печеночных коагулопатий, при которых нужны протеин S и антиплазмин. Криопреципитат из РД-плазмы должен содержать ожидаемые концентрации фибриногена и фактора VIII, но не крупные мультимеры фактора Виллебранда. Эффективность подобного компонента при лечении кровотечений при уремии, болезнях печени, болезни Виллебранда и ДВС не установлена. Изготовитель не сообщал о приготовлении криопреципитата из РД-плазмы и не подавал просьбы о лицензии на этот компонент.

Обработка плазмы РД эффективно инактивирует вирусы с липидной капсулой. В эту категорию попадает большинство клинически значимых вирусов, передающихся при трансфузии, поэтому безопасность компонента значительно повышается. С другой стороны, РД-плазму готовят из пулов. Теоретически это повышает вероятность передачи безоболочечных вирусов - таких, как ВГА и В19, но в настоящее время сообщения о таких случаях отсутст-

вуют. Присутствие в плазме нейтрализующих антител к этим вирусам может понижать способность к передаче инфекции, и делать ее меньше, чем у очищенных концентратов белков. Тем не менее, если считать, что в пулах обычно содержится много вирусов, защитная роль этих антител остается неясной. Может быть, следует учитывать этот небольшой, но теоретически возможный риск у таких чувствительных групп, как беременные женщины, больные хронической гемолитической анемией и тяжелыми хроническими иммунодефицитами.

Другие виды риска - загрязнение в процессе обработки и присутствие в донорском пуле плазмы неизвестного патогенного агента, не инактивированного при обработке. Любой из вариантов делает пул плазмы источником гораздо большей опасности, чем плазма от одного донора. Ирония ситуации очевидна. Если появится новый агент, нечувствительный к обработке РД, РД-плазма станет средством его распространения. Следует учитывать сравнительно низкий уровень риска сегодня при использовании плазмы от одного донора, а также возможный риск продукта, полученного из пула, обработанного для ликвидации вирусов в липидной оболочке.

Показания для применения РД-плазмы и СЭП практически одинаковы. Содержание белка в РД-плазме более унифицировано, чем в СЗП, из-за влияния эффекта пула. Белки стабильны при хранении в течение 2 лет при -30°C и при -18°C еще в течение 6 мес. Срок хранения такой же, как для СЗП: 12 мес. при -18°C . После оттаивания с ней надо обращаться так же, как с СЗП. Центры переливания крови могут выбрать для хранения в замороженном виде РД-плазму или СЗП. В Европе для лечения применяют 5 видов плазмы: СЗП, РД-плазму, долго хранившуюся плазму, плазму, обработанную теплом, и плазму, обработанную метиленовым синим.

Стоимость РД-плазмы пока неизвестна, но ожидается, что она будет на 50-100% больше, чем стоит сегодня доза СЗП (50 долларов). VITEX устанавливает предварительную цену, но окончательную назначают в каждом центре переливания крови. Оправдают ли преимущества дополнительные затраты? Исследование эффективности затрат показало, что относительно высокие затраты и небольшие преимущества (невысокая эффективность затрат в 239.300 долларов на 1 жизнь, спасенную за год) не оправдывает широкого распространения РД-плазмы. Однако законодатели, контролирующие органы и широкая публика не всегда принимают прозаические соображения эффективности затрат для помощи больным, когда речь идет о безопасности трансфузий. **Доказательство:** VITEX недавно назначил Американский Красный Крест единственным агентом по маркетингу и продажам РД-плазмы в США. Продукт должен быть доступен любой больнице, центру переливания крови или любому заказчику на коммерческой основе.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Проф. Л.С. Шарыгин

Кировский НИИ гематологии и переливания крови, г. Киров

Значение иммунных препаратов крови в терапии гнойносептических, вирусных заболеваний, различных осложнений инфекционного происхождения особенно возросло в последние годы в связи с повышением устойчивости патогенной микрофлоры к большинству применяемых антибиотиков. Ряд авторов считает, что причина роста гнойносептических заболеваний кроется не только в появлении большого числа антибиотиков, устойчивых форм микробов, но и в изменении иммунного статуса населения. Перспективным направлением повышения заместительной иммунотерапии является разработка и изготовление препаратов с высокой специфической активностью, пригодных для внутривенного введения.

В отечественной медицине с целью заместительной иммунотерапии в настоящее время используется главным образом гипериммунная плазма и иммуноглобулины различной направленности для внутримышечного введения.

Несмотря на высокую терапевтическую эффективность указанных лечебных средств, они обладают рядом существенных недостатков. Так, гипериммунная плазма имеет сравнительно низкое содержание специфических антител, требуется введение больному в сжатые сроки больших ее объемов, что может привести к перегрузке системы кровообращения, возможна сенсibilизация организма больного различными антигенами, имеется опасность возникновения посттрансфузионных осложнений, связанная с возможной вирусной контаминацией плазмы. Недостатком является также непродолжительный срок хранения нативной и замороженной плазмы.

Иммуноглобулины для внутримышечного введения имеют низкую терапевтическую эффективность при тяжелом течении заболеваний, связанную с возможностью введения только ограниченного объема препарата, с медленной резорбцией антител из мышечной ткани (уровень антител в крови больной достигает максимума только на 7-й день), а также в связи со значительным местным протеолизом, достигающим 30%.

Перспективным направлением повышения эффективности заместительной иммунотерапии является разработка и изготовление препаратов с высокой специфической активностью, пригодных для внутривенного введения. Этот путь применения препарата

позволяет вводить иммуноглобулин в больших, необходимых для лечения дозах, и быстро увеличивать уровень специфических антител в крови реципиента. Высокая терапевтическая эффективность иммуноглобулинов для внутривенного введения подтверждена многими исследователями в зарубежных странах.

Первые иммуноглобулиновые препараты, пригодные для внутривенного введения, появились в начале шестидесятых годов. Они были приготовлены путем протеолитического расщепления пепсином или плазмином как полимеров, так и значительной части мономеров IgG.

В настоящее время и в разных странах для получения иммуноглобулинов для внутривенного введения предложено несколько методов, но основным принципом изготовления является снижение антикомплемментарной активности (АКА) при сохранении активности антител.

В нашей стране пока существует единственный производственный метод получения иммуноглобулина для внутривенного введения, разработанный сотрудниками Нижегородского НИИЭМ И.А. Киселевой и В.В. Анастасиевым. Данный метод вписывается в технологию фракционирования плазмы по методу Кона и является доступным во всем учреждениям службы крови, занятым производством препаратов.

В настоящее время по разработанной технологии препарат "Внутривенный иммуноглобулин человека нормальный" выпускается на предприятиях Нижнего Новгорода, Кирова, Хабаровска, Омска.

Однако отечественных иммуноглобулинов направленного действия для внутривенного введения до настоящего времени нет.

В связи с этим в рамках Федеральной программы развития донорства и службы крови Российской Федерации поставлена задача разработки комплекса специфических иммуноглобулинов для внутривенного введения по технологии, доступной службе крови страны.

Общие требования к качеству специфических иммуноглобулинов одинаковы с требованиями к нормальному иммуноглобулину. Дополнительно предъявляются требования по специфической активности. Все иммуноглобулины направленного действия должны содержать не менее чем в 6 раз больше

антител по сравнению с содержанием их в иммуноглобулине человека нормальном.

В Кировском НИИ гематологии и переливания крови осуществляется программа создания ряда гипериммунных препаратов для внутривенного введения. Проблема разработки и получения этих препаратов включает в себя несколько аспектов. Это – организация иммунного донорства, заготовка иммунного сырья и определение требований к нему, разработка технологии получения препаратов, а также клиническое изучение их терапевтической эффективности.

Изучение вопросов иммунного донорства проводится в двух направлениях. Первое – это социологическое исследование среди иммунных доноров по специально разработанной анкете, где наряду с социальным и материальным положением доноров определяется их мотивация к донорству, уровень знаний по вопросам иммунного донорства и другое. Второе направление – это изучение частоты и характера иммунных нарушений у доноров в динамике за последние 5 лет. Как свидетельствуют полученные результаты, изменение социально-экономических условий, неблагоприятная экологическая обстановка способствуют распространению различных, нарушений со стороны иммунной системы у населения. Это убеждает в необходимости включения тестов иммунологического мониторинга в схему комплексного освидетельствования доноров.

Один из разделов комплексной программы разработки и получения специфических иммуноглобулинов для внутривенного введения включает и себя поиск источников иммунного сырья для их производства.

Научные исследования Российского НИИ гематологии и трансфузиологии показывают, что приоритетным в этом направлении следует считать серологический скрининг донорской крови и плазмы по выявлению "естественных" сывороточных антибактериальных антител с целью последующего получения иммунного сырья.

Разработанный в Кировском НИИ гематологии и переливания крови способ прогнозирования иммунного ответа на активную иммунизацию доноров позволяет увеличить число иммуноактивных лиц при иммунизации стафилококковым анатоксином до 85%, столбнячным анатоксином до 80%. Отстранение от иммунизации индивидов, ареактивных к указанным антигенам, предотвращает неоправданную антигенную нагрузку, сокращает нецелесообразные материальные затраты.

Одним из важных этапов разработки специфических иммуноглобулинов для внутривенного введения

является технология их получения. В Кировском НИИ гематологии и переливания крови иммуноглобулины направленного действия для внутривенного введения получали методом кислотно-ферментативного гидролиза, который основан на снижении антикомплементарной активности иммуноглобулинов посредством гидролиза в слабокислой среде в присутствии минимального (25 мг/100 г белка) количества пепсина с последующим удалением фермента гидроокисью алюминия.

В результате проведенных исследований разработана технологическая схема изготовления специфических иммуноглобулинов для внутривенного введения, включающая ультрафильтрацию вместо дорогостоящей и энергоемкой лиофилизации, что позволило на три стадии сократить продолжительность цикла и получить препараты высокого качества.

В настоящее время успешно прошел Государственные клинические испытания "Имуноглобулин человека антистафилококковый для внутривенного введения". Одна доза иммуноглобулина содержит 500 и более международных единиц анти-альфа-стафилолизина. Препарат зарекомендовал себя как высокоэффективное средство при тяжелых формах генерализованной и местных проявлениях стафилококковой инфекции.

На стадии утверждения нормативно-технической документации находится противостолбнячный иммуноглобулин. Он выпускается в лиофилизированной форме, имеет трехлетний срок хранения. Выпуск такого препарата позволит создать "аварийный запас" на случай стихийных бедствий и катастроф, а также для лечения sporadических случаев столбняка.

Совместно со Свердловской ОСПК (г. Первоуральск) и Хабаровским НИИЭМ ведется работа по созданию иммуноглобулина против клещевого энцефалита для внутривенного введения. Препарат проходит Государственные клинические испытания. Есть первые положительные результаты его применения для лечения тяжелых менингеальных и очаговых форм клещевого энцефалита.

Проводятся исследования по созданию иммунных препаратов против грамотрицательной флоры, в частности, против синегнойной инфекции. Планируются работы по определению эффективной лечебной дозы.

Реализация намеченной программы иммуноглобулинов направленного действия для внутривенного введения позволит обеспечить отечественное здравоохранение высокоэффективными лечебными препаратами.

