РАЗДЕЛ IX. БИОТЕХНОЛОГИИ

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

Коагуляционный потенциал лиофилизированной плазмы инаktivированной методом рибофлавина+ ультрафиолетовое облучение спектра В.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Россия, Москва)

doi: 10.18411/sr-10-02-2020-12

idsp: sciencerussia-10-02-2020-12

Аннотация

Переливание плазмы крови является одним из основных методов лечения тяжелых коагулопатий, при массивной кровопотере. Для полноценного снабжения клиник плазмой необходимо материально-техническое обеспечение гарантирующий поддержание условий холодовой цепи. Это условие полностью исключает возможность применения плазмы в полевых условиях и в труднодоступной местности. Лيوфилизация плазмы значительно упрощает решение этой задачи. Наше исследование показывает изменение коагуляционного потенциала после лиофилизации плазмы крови вирусиноактивированной рибофлавином + ультрафиолетовое облучение спектра В, и карантинизированной свежзамороженной плазмы.

Ключевые слова: свежзамороженная плазма; лиофилизированная плазма; факторы свертывания крови; коагулопатия; гемостаз.

Материалы и методы

Влияние лиофилизации вирусиноактивированной плазмы, а также лио-филизация карантинизированной свежзамороженной плазмы на ее коагуля-ционную способность была исследована методом лабораторного анализа концентрации факторов свертывания и показателей свертывающей системы (ПВ и АЧТВ).

Вируинактивация донорской плазмы перед лиофилизацией проводилась методом «Мирасол» с использованием рибофлавина + ультрафиолетовое облучение спектра В.

Результаты

Леофилизация карантинизированной свежзамороженной плазмы не привела к существенного снижения концентрации факторов свёртывания и показателей свертывающей системы ниже физиологически допустимой нормы. Также наблюдалось некоторое увеличение показателей свёртывания (ПВ, АЧТВ) после лиофилизации, в то время как лиофилизация инаktivированной плазмы приводит к снижению ниже физиологической нормы фибриногена и VIII факторов свертывания, остальные факторы и показатели оставались в пределах физиологической нормы.

Заключение

Леофилизация плазмы крови человека существенно не изменяет ее бел-ковый состав и не снижает ее коагуляционный потенциал. Леофилизированная плазма не требует поддержание холодовой цепи упрощающую логистику для хранения, и имеет ряд преимуществ перед свежзамороженной плазмой в скорости ее приготовления перед применением в клинической практике.

Таким образом, лиофилизированная патогениноактивированная плазма является привлекательным вариантом для базового лечение тяжелых коагу-лопатий при массивной кровопотери в условиях чрезвычайных ситуациях и в отделениях скорой

помощи, и может существенно повысить качество оказания медицинской помощи пациентам.

Переливание плазмы крови является одним из основных методов лечения тяжелых коагулопатий, при массивной кровопотере. [1-4]. Свежезамороженная плазма (СЗП) или вирусиактивированная плазма сегодня широко применяется в клинической практике. С целью сохранить активность факторов свертывания, плазма должна быть заморожена после сдачи крови и хранится при температуре -30°C вплоть до переливания. Перед трансфузией свежезамороженная плазма должна быть обязательно разморожена и согрета, что требует временных затрат и оборудования. Этот факт полностью исключает возможность применения свежезамороженной плазмы в полевых условиях и при оказании первой медицинской помощи в условиях чрезвычайных ситуаций.

В отличие от свежезамороженной замороженной плазмы, сублимированная (лиофилизированная) плазма может храниться при комнатной температуре и восстановление перед переливанием обычно требует меньших временных затрат. Однако, из-за отсутствия производства лиофилизированной плазмы в России, она не доступна для клинической практики.

Несмотря на то, что лиофилизированная плазма была разработана и с успехом применялась еще во время Второй мировой войны [5], производство лиофилизированной плазмы позже было остановлено из-за высокого риска передачи патогенов гемотрансмиссивных инфекций [6].

Внедрение различных стандартизированных методов снижения патогенности, таких как скрининг доноров на наличие патогенов перед кроводачей, карантинизация и процедуры вирусиактивации, привело к значительному снижению риска инфицирования в отношении широкого спектра бактерий, вирусов и паразитов. [7,8]

Таким образом, совмещение вирусиактивации методом «Мирасол» и лиофилизации может быть перспективным подходом для одновременного решения двух основных задач - безопасность продукции и хранение при комнатной температуре. Это значительно удешевляет и упрощает логистику препарата и расширяет возможность его применения уже на этапе оказания первой медицинской помощи.

В исследовании, мы изучили влияние лиофилизации на уровень факторов свертывания и показателей свертываемости в карантинизированной и в вирусиактивированной плазме.

Исследование подтверждает тот факт, что вирусиактивированная лиофилизированная плазма может служить полноценной альтернативой свежезамороженной плазме.

Материалы и методы

Лфофилизированную плазму получали из СЗП крови человека, характеризующейся биологической (гемостатической) полноценностью и заготовленной согласно существующим в настоящее время требованиям [9-12].

Метод инактивации – вирусиактивация проводилась с использованием системы «Мирасол» с использованием рибофлавина + ультрафиолетовое облучение спектра В.

Способ лиофилизации

Донорская и вирусиактивированная плазма переносилась в стерильные флаконы по 10 мл и замораживалась до -30 градусов. Лфофилизацию проводили в сублимационной установке ТГ-50 (Германия), контролируя давление и температуру, с целью получения лиофилизата с содержанием воды менее 1%.

Флаконы закрывали под умеренным вакуумом и хранили при комнатной температуре $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и 60 ± 5 % влажности. Для восстановления лиофилизаты были сольюбилизованы водой для инъекций в соотношении 1:1 при комнатной температуре.

Анализы свертываемости плазмы

После восстановления образцов лиофилизированной плазмы были проведены следующие исследования:

- Концентрация факторов свертывания крови (измеряли в восстановленной лиофилизированной плазме с помощью коагулометров STA Compact (Франция), и Sysmex 2000i (Япония), (Таблица 1).
- Фибриноген (количественно определялся с помощью метода Клауса)

Результаты приведены в виде средних значений стандартных отклонение. Статистическую оценку полученных результатов проводили с использованием дескриптивных статистик при уровне значимости $p < 0.05$.

Таблица 1

Показатели коагуляционного потенциала плазмы.

образец	Ед.из мер	Физиолог норма	СЗП	Леоф плазма карантинизи рованная	Леоф плаз инактивированн ая «Мирасол»
Фибриноген	г/л	1,8-3,5	$1,9 \pm 0,48$	$2,2 \pm 0,12$	$1,8 \pm 2$
Фактор II	%	70-120	93 ± 8	88 ± 3	83 ± 4
Фактор V	%	70-120	85 ± 12	72 ± 6	70 ± 3
Фактор VII	%	70-120	95 ± 8	90 ± 5	92 ± 3
Фактор VIII	%	70-120	74 ± 7	66 ± 9	62 ± 7
Фактор IX	%	70-120	78 ± 8	74 ± 4	74 ± 4
Фактор X	%	70-120	98 ± 4	93 ± 8	91 ± 2
Антитромбин III	%	75-125	103 ± 4	82 ± 5	86 ± 4
$\alpha 2$ антитромбин	%	75-125	92 ± 3	93 ± 3	86 ± 8
Protein C	%	70-150	100 ± 2	99 ± 4	92 ± 4
ПВ	сек	13-18	13 ± 2	15 ± 2	14 ± 3
АЧТВ	сек	26-37	35 ± 1	38 ± 2	36 ± 3

Результаты

Стандартные тесты на свертываемость крови.

По результатам наших исследований отмечалось снижение концентрации фибриногена в лиофилизированной вирусинактивированной плазме. Так же снижается концентрация фактора VIII - его снижение в карантинизированной лиофилизированной плазме составляет 8%, а в лиофилизированной вирусинактивированной плазме 12% по сравнению с СЗП. Остальные показатели менялись не столь существенно. Так, в карантинизированной лиофилизированной плазме снижение по сравнению с СЗП фактора II составило 5 %, фактора VII - 2 %, фактора IX- 0 %, фактора X- 2 %, Антитромбина III - 18 %, $\alpha 2$ -антитромбина - 6 %, Protein C- 8 %, ПВ - 1 сек, АЧТВ - 3 сек. (Таблица 1), В лиофилизированной вирусинактивированной плазме по сравнению с СЗП снижение было следующим: фактор II снизился на 11 %, фактор VII на 1 %, фактор IX на 6 %, Фактор X на 8 %, Антитромбин III на 15 %, $\alpha 2$ антитромбин на 5 %, Protein C на 5 %, АЧТВ на 3 сек. (Таблица 1).

Леофилизация карантинизированной свежесмороженной плазмы не привела к снижению концентрации факторов свёртывания ниже физиологически допустимой нормы. Также, наблюдалось некоторое увеличение показателей свёртывания крови (ПВ, АЧТВ) после леофилизации карантинизированной плазме, в вирусинактивированной лиофилизированной плазме уровень ПВ и фактора IX оставался на уровне показателей в размороженной СЗП. В то время как леофилизация инактивированной плазмы приводит к снижению ниже физиологической нормы концентрации фибриногена и фактора VIII. Остальные факторы и показатели оставались в пределах физиологической нормы.

Обсуждение

Исследования показали, что после лиофилизации в плазме крови наблюдаются более длительные ПВ и АЧТВ. Отмечается значительное снижение фибриногена и Фактора VIII, по сравнению с СЗП. Остальные факторы и показатели оставались в пределах референтных значений.

Эти данные согласуются с данными, полученными в других исследованиях, а также с более поздними клиническими данными [14]. Лيوфилизированная плазма применялась для управления эпизодами кровотечения у пациентов с гемофилией. [14,15] В исследованиях на животных лечение с помощью лиофилизированной плазмы привело к увеличению ранней выживаемости [16].

Также, было доказано, что множественные травмы и геморрагический шок вызывают увеличение ПВ до 70%, а использование лиофилизированной плазмы и СЗП одинаково эффективны в коррекции коагулопатии у данных пациентов [13].

В исследовании анализ концентрации факторов свертывания крови, влияющих на внешний, внутренний и общий пути свертывания, выявил лишь их незначительное снижение в исследуемых образцах лиофилизированной плазмы.

Также, в этих образцах мы обнаружили увеличение ПВ и АЧТВ, что коррелирует с данными других исследований [17]. Одной из причин, возможно является снижение активности факторов VIII и V. Необходимо отметить, что Фактор VIII является весьма лабильным маркером свертываемости и используется при контроле качества плазмы в Европе и России [18,19].

Леофилизированная плазма не требует дорогостоящей логистики для хранения и транспортировки, а восстановление требует меньше времени, чем оттаивание свежемороженой плазмы, вирусинактивированная леофилизированная плазма является привлекательным вариантом для обеспечения наиболее важного базового лечения тяжелых коагулопатий в чрезвычайных ситуациях или в районах с невозможностью поддержания холодовой цепи. Действительно, ранняя коррекция коагулопатии является ведущей причиной выживаемости пациентов [20].

Плазма является методом выбора для предотвращения и снижения смертности у пациентов с коагулопатией при политравме [21]. Наличие лиофилизированной плазмы в укладках для оказания помощи при чрезвычайных ситуациях и в отделениях скорой помощи, может существенно повысить качество оказания помощи пациентам с тяжелой травмой.

1. Gonzalez EA, Moore FA, Holcomb JB, Miller CC, Kozar RA, Todd SR, Cocanour CS, Balldin BC, McKinley BA. Freshfrozen plasma should be given earlier to patients requiring massive transfusion. J Trauma 2007;62:112-9.
2. Hellstern P, Haubelt H. Indications for plasma in massive transfusion. Thromb Res 2002;107 Suppl 1:S19-22
3. American Association of Blood Banks, American Red Cross, America's Blood Centers, and Armed Services Blood Program. Circular of information for the use of human blood and blood components. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 2009.
4. Bundesärztekammer (BÄK). BÄK: cross-sectional guidelines for therapy with blood components and plasma derivatives. Transfus Med Hemother 2009;36:345-492 and 2011;38:71
5. Bakaltcheva I, O'Sullivan A M, Hmel P, Ogbu H. Freezedried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. Thromb Res 2006.
6. Statement on normal (whole, pooled) human plasma prepared by Committee on Plasma and Plasma Substitutes of the Division of Medical Sciences, National Research Council. Transfusion 1968;8:57-9.
7. Vanlandingham D, KeilSh, McElroy K, Pyles R, Goodrich R, Higgs S. Photo-chemical inactivation of chikungunya virus in plasma and platelets using the Mirasol pathogen reduction technology system. Transfusion 2013; 53:284-290.
8. Antic A, Stanojkovic Z, Macukanovic-Golubovic L, Jelic M. Evaluation of coagulation factors in fresh frozen plasma treated with riboflavin and ultra violet light. Vojnosanit Pregl 2012; 69: 22-26.
9. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, bloodsubstitut-ing solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree №29 of 26 Jan 2010. (in Russian). Available at: <http://base.garant.ru/12172686/> (Accessed 09.10.16).

10. Ragimov A.A., Shcherbakova G.N. Guide infusion-transfusion therapy. Moscow: Medical Information Agency; 2003. (in Russian)
11. Sword-Nilsson A.M., Persson P.O., Johnson U., Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang.* 2006; 90(1): 33–9.
12. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2015.
13. Shuja F, Shults C, Duggan M, Tabbara M, Butt MU, Fischer TH, Schreiber MA, Tieu B, Holcomb JB, Sondeen JL: Development and testing of freeze-dried plasma for the treatment of trauma-associated coagulopathy. *J Trauma* 2008; 65:975–95
14. Maurin O, Martinaud C, Boulesteix G, Eve O, Bertani A, Goudard Y, Kaiser E: Management of bleeding in a child with haemophilia in Africa with freeze-dried plasma. *Haemophilia* 2012; 18:e38–9
15. Krutvacho T, Chuansumrit A, Isarangkura P, Pintadit P, Hathirat P, Chiewsilp P: Response of hemophilia A with bleeding to fresh dry plasma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993; 24 Suppl 1:169–73
16. Shuja F, Finkelstein RA, Fukudome E, Duggan M, Kheirbek T, Hamwi K, Fischer TH, Fikry K, deMoya M, Velmahos GC, Alam HB: Development and testing of low-volume hyperoncotic, hyperosmotic spray-dried plasma for the treatment of trauma-associated coagulopathy. *J Trauma* 2011; 70:664–71
17. Bakaltcheva I, O'Sullivan AM, Hmel P, Ogbu H: Freeze-dried whole plasma: Evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thromb Res* 2007; 120:105–16
18. Europe Committee on Blood Transfusion: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components: Recommendation No. R(95). 16th edition. Strasbourg, Council of Europe Publishing, 2010, pp 311–29
19. Постановление Правительства РФ от 22.06.2019 N 797 "Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации".
20. Bickell WH, Wall MJ Jr, Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, Mattox KL: Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med* 1994; 331:1105–9
21. Alam HB, Bice LM, Butt MU, Cho SD, Dubick MA, Duggan M, Englehart MS, Holcomb JB, Morris MS, Prince MD, Schreiber MA, Shults C, Sondeen JL, Tabbara M, Tieu BH, Underwood SA, Hemostatic Resuscitation Research Group: Testing of blood products in a polytrauma model: Results of a multi-institutional randomized preclinical trial. *J Trauma* 2009; 67:856–64