

Сравнение гемостатического действия препаратов рекомбинантного активированного фактора свертывания крови VII

В.Ю.Зоренко, Г.М.Галстян, Т.Ю.Полянская, М.С.Сампиев,
Т.В.Северова, Н.И.Коняшина, И.В.Грибкова, Е.Б.Орел, Э.Г.Гемдзян

Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

Цель исследования – с помощью лабораторных методов сравнить гемостатическое действие двух препаратов рекомбинантного активированного фактора свертывания крови VII (rFVIIa) – препарата НовоСэвен® («Ново Нордиск», Дания) и его отечественного биоаналога – препарата Коагил-VII (ЗАО «ГЕНЕРИУМ», Россия) – у больных с ингибиторной формой гемофилии А. В проспективное рандомизированное сравнительное перекрестное исследование включены 10 больных с ингибиторной формой гемофилии А. Каждый больной получал однократно один из препаратов rFVIIa (НовоСэвен или Коагил-VII согласно рандомизации). Спустя 3 суток (период «отмывки») каждый больной получал повторно также однократно другой препарат rFVIIa. Оба препарата вводили в дозе 90 мкг/кг внутривенно. У больных до введения препаратов rFVIIa, а затем через 15, 30, 60 мин, 2, 6, 9, 12, 24, 36 и 48 ч после введения определяли активированное частичное тромбoplastинное время (АЧТВ), протромбиновое время, тромбиновое время, концентрацию фибриногена в плазме, активность FVII в плазме, проводили тест генерации тромбина. Тромбоэластографию (ТЭГ) выполняли до введения препаратов rFVIIa, а затем спустя 15, 30, 60 мин, 2, 24 и 48 ч. После введения обоих препаратов rFVIIa не выявлено статистически значимых изменений концентрации фибриногена и тромбинового времени. Максимальное повышение активности FVII зарегистрировано спустя 15 мин после введения препаратов rFVIIa: активность FVII повысилась с $97,0 \pm 19,3$ до $3642,0 \pm 1377,0\%$ после введения препарата Коагил-VII и с $92,9 \pm 22,4$ до $3283,0 \pm 787,1\%$ после введения препарата НовоСэвен, для обоих препаратов различия статистически значимы ($p < 0,05$). Статистически значимое повышение активности FVII в плазме сохранялось в течение 48 ч после введения препарата НовоСэвен и в течение 36 ч после введения препарата Коагил-VII. Введение обоих препаратов rFVIIa приводило к укорочению АЧТВ: с $119,0 \pm 26,0$ до $67,7 \pm 6,9$ с после введения препарата Коагил-VII и с $113,0 \pm 37,0$ до $68,0 \pm 9,5$ с после введения препарата НовоСэвен, для обоих препаратов различия статистически значимы ($p < 0,05$). Введение обоих препаратов rFVIIa также приводило к укорочению протромбинового времени: с $11,4 \pm 0,7$ до $7,3 \pm 0,3$ с после введения препарата Коагил-VII и с $11,0 \pm 0,7$ до $7,4 \pm 0,2$ с после введения препарата НовоСэвен, для обоих препаратов различия статистически значимы ($p < 0,05$). До введения препаратов rFVIIa эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП) был ниже нормы. После введения обоих препаратов rFVIIa ЭТП статистически значимо повышался и достигал нормальных значений. До введения обоих препаратов rFVIIa у 9 больных на протяжении более 1 ч не происходило расхождения ветвей ТЭГ, у 1 больного отмечалась гипокоагуляция. После введения препаратов Коагил-VII и НовоСэвен уже через 15 мин появлялось расхождение кривых ТЭГ, стал образовываться сгусток и параметры ТЭГ приближались к нормальным значениям. Этот эффект сохранялся в течение 2 ч. После введения препаратов Коагил-VII и НовоСэвен в одни и те же временные промежутки значения параметров гемостаза статистически значимо не различались. Таким образом, изменения лабораторных показателей свидетельствуют о том, что гемостатический эффект обоих препаратов rFVIIa (Коагил-VII и НовоСэвен) сопоставим как по выраженности, так и по длительности.

Ключевые слова: гемофилия А, ингибитор, рекомбинантный активированный фактор VII, НовоСэвен®, Коагил-VII, тромбоэластография, тест генерации тромбина

Comparison of the hemostatic effects of recombinant activated factor VII agents

V.Yu.Zorenko, G.M.Galstyan, T.Yu.Polyanskaya, M.S.Sampiev,
T.V.Severova, N.I.Konyashina, I.V.Gribkova, E.B.Orel, E.G.Gemdzhyan

Hematology Research Center, Moscow

The hemostatic effects of two agents of recombinant activated factor VII (rFVIIa) – NovoSeven® («Novo Nordisk», Denmark) and its Russian bioanalogue Coagyl-VII («GENERIUM») – in hemophilia A patients with inhibitors were compared by laboratory methods. The prospective randomized comparative cross study was carried out in 10 hemophilia A patients with inhibitors. Each patient received a single dose of one of rFVIIa agents – NovoSeven or Coagyl-VII according to random selection. After 3 days (the «wash-away» period) each patient received a single dose of the other rFVIIa agent. Both agents were injected in a dose of 90 µg/kg intravenously. Activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time, thrombin time, plasma fibrinogen concentration, plasma FVII activity were evaluated and thrombin generation test was carried out before and 15, 30, 60 minutes, 2, 6, 9, 12, 24, 36, and 48 hours after rFVIIa injection. Thromboelastography (TEG) was carried out before rFVIIa injection and 15, 30, 60 minutes, 2, 24, and 48 hours after it. No appreciable shifts in fibrinogen concentrations and thrombin time were seen after injection of both rFVIIa agents. The maximum increase of plasma FVII activity was registered 15 minutes after injection of rFVIIa agents: the activity of FVII increased from 97.9 ± 19.3 to $3642.0 \pm 1377.0\%$ after injection of Coagyl-VII and from 92.9 ± 22.4 to $3283 \pm 787.1\%$ after injection of NovoSeven, the differences being statistically significant ($p < 0.05$) for both agents. A statistically significant increase of plasma FVII activity persisted during 48 hours after injection of NovoSeven and during 36 hours after injection of Coagyl-VII. Injections of both rFVIIa agents led to APTT shortening from 119.0 ± 26.0 to 67.7 ± 6.9 sec after injection

of Coagyl-VII and from 113 ± 37 to 68 ± 9.5 sec after injection of NovoSeven, the differences being statistically significant ($p < 0.05$) for both agents. Injections of both rFVIIa agents led to shortening of the prothrombin time – from 11.4 ± 0.7 to 7.3 ± 0.3 sec after injection of Coagyl-VII and from 11 ± 0.7 to 7.4 ± 0.2 sec after injection of NovoSeven, the differences being statistically significant ($p < 0.05$) for both agents. The endogenous thrombin potential (ETP) was lower than normally before rFVIIa injection. After injection of both rFVIIa agents the ETP increased significantly, reaching the normal level. Before injections of both rFVIIa agents the TEG curves did not separate during more than 1 hour in 9 patients and 1 patient exhibited hypocoagulation. The TEG curves separated within 15 minutes after injection of Coagyl-VII or NovoSeven, the clot formation started, and TEG parameters were close to the normal values. This effect persisted during 2 hours. The time course of hemostasis parameters was similar after injections of Coagyl-VII and NovoSeven. Hence, changes in the laboratory values demonstrates that the hemostatic effect of both rFVIIa agents (Coagyl-VII and NovoSeven) are similar by intensity and duration.

Key words: hemophilia A, inhibitor, recombinant activated factor VII, NovoSeven®, Coagyl-VII, thromboelastography, thrombin generation test

Наличие ингибиторов к факторам свертывания крови VIII и/или IX (FVIII и/или FIX) осложняет течение заболевания у 3–35% больных гемофилией [1–4].

Появление ингибитора изменяет течение гемофилии и усугубляет ее тяжесть [2, 4]. Происходит это не только вследствие снижения эффективности гемостатической терапии, но и из-за изменения клинических проявлений болезни. На этом этапе заболевания гемартрозы отодвигаются на второй план, а ведущими становятся кровоизлияния в мягкие ткани и мышцы [2]. Например, частота возникновения забрюшинных гематом у больных с ингибиторной формой гемофилии в 14 раз выше, чем у больных гемофилией без ингибитора. Геморрагический синдром нередко приобретает угрожающий жизни характер [2].

Обеспечение гемостаза при ингибиторной форме гемофилии является сложной задачей. Сложность обусловлена как особенностями заместительной терапии этой категории больных, так и трудностью мониторинга эффективности лечения. При ингибиторной форме гемофилии используют препараты, обладающие шунтирующим механизмом действия. К ним можно отнести препарат ФЕЙБА®, представляющий собой концентрат активированных факторов протромбинового комплекса, и эптаког альфа – рекомбинантный активированный FVII (rFVIIa) [5]. Первые попытки получения небольшого количества FVIIa из плазмы крови были предприняты в 1980–1981 гг. в Мальмо (Швеция) [6]. Впервые FVIIa, полученный из плазмы, был введен больному с ингибиторной формой гемофилии 21 апреля 1981 г. Спустя 1 месяц препарат был введен второму больному гемофилией в связи с кровотечением после удаления зуба. В обоих случаях лечение FVIIa было эффективным [6, 7]. Однако уже тогда стало ясно, что FVIIa должен найти более широкое применение у больных гемофилией и получить его в достаточном количестве можно только с помощью рекомбинантных технологий. Эти исследования были начаты в 1985 г. [6]. В клинической практике rFVIIa впервые был применен у больного гемофилией 9 марта 1988 г., а в 1989 г. были про-

ведены первые клинические исследования по применению препарата НовоСэвен® («Ново Нордиск», Дания) [8]. С 1996 г., т.е. с начала пострегистрационного использования, до 2004 г. в мире было применено более чем 710 000 стандартных доз rFVIIa (90 мкг/кг) [9]. Появились сообщения об эффективности rFVIIa при лечении геморрагического синдрома в различных клинических ситуациях у больных без ингибиторов к FVIII и FIX – при тромбоцитопении, маточных кровотечениях, внутримозговых кровоизлияниях, передозировке непрямых антикоагулянтов, активированного протромбина C и т.д. [10, 11].

До недавнего времени в мире единственным rFVIIa, доступным для клинического использования, являлся препарат НовоСэвен. В последние годы в России был разработан биоаналог этого препарата, который получил название Коагил-VII (ЗАО «ГЕНЕРИУМ»). Биологические, физиологические и лекарственные свойства биоаналогов во многом определяются процессами получения рекомбинантного белка, его очисткой и получением лекарственной формы [12]. Различия в препаратах могут быть обусловлены отличиями в оригинальных генно-модифицированных клеточных линиях, продуцирующих биосубстанцию, в процессах ее очистки от примесей и т.д. В итоге полученный препарат может быть похожим на оригинальное вещество, но не эквивалентным ему. Поэтому столь актуальны исследования по сравнению эффективности биоаналога и оригинального препарата [12]. Сравнение эффективности препаратов НовоСэвен и Коагил-VII до настоящего времени не проводилось.

Цель настоящего исследования – с помощью лабораторных методов сравнить гемостатический эффект двух препаратов rFVIIa – НовоСэвен и Коагил-VII – у больных с ингибиторной формой гемофилии А.

Пациенты и методы

Характеристика пациентов. Данное исследование было одобрено Этическим комитетом Гематологического научного центра РАМН (ныне ГНЦ Минздравсоцразвития России). Больных включали в исследование после подписания информированного согласия, составленного в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинской декларации. Всего с декабря 2009 г. по ноябрь 2010 г. в исследование были включены 10 взрослых мужчин с тяжелой формой врожденной гемофилии А, течение которой ослож-

Для корреспонденции:

Галстан Геннадий Мартинович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела анестезиологии и реаниматологии Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А

Телефон: (495) 612-1243

Факс: (495) 656-0658

E-mail: ggalst@rambler.ru

Статья поступила 09.09.2011 г., принята к печати

нилось появлением ингибитора к FVIII в высоком титре (5 Бетезда единиц – БЕ и более). На момент включения в исследование ни у одного из больных не было признаков кровотечения.

Возраст больных составлял от 20 до 54 лет (медиана 34 года). У всех больных активность FVIII в сыворотке крови была менее 1%. Титр ингибитора к FVIII составлял от 5 до 463 БЕ (медиана 14 БЕ). У одного больного одновременно с ингибитором к FVIII выявлялся ингибитор к FIX в титре 1,7 БЕ. В исследование не включали больных с наличием аллергии к препаратам rFVIIa, пациентов, которым в течение последних 48 ч вводили концентрат протромбинового комплекса или препараты rFVIIa, а также больных с количеством тромбоцитов в периферической крови менее $120,0 \times 10^9/\text{л}$. Характеристика больных, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Дизайн исследования. Выполнено проспективное рандомизированное двойное слепое сравнительное перекрестное исследование гемостатического действия препаратов rFVIIa – НовоСэвен и Коагил-VII. Каждый больной, включенный в исследование, получал однократно один из препаратов rFVIIa (НовоСэвен или Коагил-VII согласно рандомизации). Спустя 3 суток (период «отмывки») каждый больной получал повторно также однократно другой препарат rFVIIa. Оба препарата вводили в дозе 90 мкг/кг внутривенно. Одному больному (наблюдение №6) введен только препарат Коагил-VII, так как он досрочно выбыл из исследования по семейным обстоятельствам.

В течение всего периода исследования ни больные, ни медицинский персонал не знали, какой из двух препаратов конкретно получали пациенты.

Лабораторные методы обследования. Пробы крови получали путем пункции периферической вены иглами 21 g и собирали в вакуумные пробирки Vacutainer® (“Becton Dickinson International”, США), содержащие 3,2% цитрат натрия. Пробирки с кровью, предназначенной для тромбоэластографии (ТЭГ), сразу же направляли для выполнения исследования.

У всех больных до введения препаратов rFVIIa, а затем через 15, 30, 60 мин, 2, 6, 9, 12, 24, 36 и 48 ч определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время, концентрацию фибриногена в плазме, активность FVII в плазме, выполняли тест генерации тромбина (ТГТ). ТЭГ выполняли у больных до введения препаратов rFVIIa, а затем спустя 15, 30, 60 мин, 2, 24 и 48 ч.

Для выполнения коагуляционных тестов, измерения активности FVII, выполнения ТГТ требовалась бедная тромбоцитами плазма, которую получали путем центрифугирования цитратной крови с ускорением 2500 g в течение 15 мин при температуре 15–25°C. Полученные образцы плазмы хранили в замороженном состоянии при температуре –70°C до момента выполнения анализа. Образцы плазмы оттаивали при температуре 37°C непосредственно перед началом выполнения анализа.

АЧТВ, ПВ, тромбиновое время, концентрацию фибриногена в плазме крови определяли на автоматическом коагулометре «Systemex CA-1500» (“Systemex Corporation”, Япония) с использованием реагентов производства фирмы “Dade

Behring” (Германия) [13]. Активность FVII в плазме крови исследовали на коагулометре Merlin medical® MC 10 plus (Германия) с использованием реактивов производства фирмы “Siemens Healthcare Diagnostic Inc” (Германия) и выражали в процентах по отношению к нормальной плазме.

С помощью ТГТ измеряют кинетику и количество тромбина, образующегося в плазме крови при стандартной величине активации системы свертывания [11, 14, 15]. Измерение концентрации тромбина осуществляли с помощью специфического «медленного» флюорогенного субстрата Z-Gly-Gly-Arg-AMC, при расщеплении которого тромбином образуется сильно флюоресцирующий продукт. Регистрировали кинетику возникновения и последующего исчезновения тромбина в плазме крови после активации свертывания. Для выполнения теста в ячейки стандартного плоскодонного 96-луночного планшета помещали по 90 мкл образцов бедной тромбоцитами плазмы, к которым добавляли по 10 мкл раствора «медленного» флюорогенного субстрата молярной концентрации 5 ммоль/л. Планшет инкубировали в течение 3–5 мин при температуре 37°C. Затем в ячейки многоканальной пипеткой одновременно вносили по 25 мкл раствора активатора и быстро перемешивали. В качестве активатора использовали раствор тромбoplastина из теста для определения ПВ, разбавленный в 250 раз буфером [20 ммоль HEPES (N-2 гидроксипиперазин-2-этаносульфоновой кислоты), 140 ммоль хлорида натрия, pH 7,5], содержащим дополнительно 100 ммоль хлорида кальция. Момент внесения активатора и перемешивания считали началом отсчета времени реакции. Запись флюоресценции AMC, возникающего при гидролизе субстрата тромбином, образующимся в ходе свертывания, осуществляли при температуре 37°C непрерывно на протяжении 90 мин с помощью флюориметрического ридера Appliskan (“Thermo Fisher SCIENTIFIC”, Финляндия; длина волны возбуждения 355 нм, длина волны испускания 460 нм). Результаты эксперимента представляли собой интенсивность флюоресценции, выражаемую в условных единицах, в зависимости от времени. Чтобы перевести интенсивность флюоресценции, выражаемую в условных единицах, в абсолютные концентрации AMC для каждого опытного образца проводили калибровку сигнала. Площадь под кривой зависимости концентрации тромбина от времени называется эндогенным тромбиновым потенциалом (ЭТП). Этот показа-

Таблица 1. Характеристика больных с ингибиторной гемофилией А, включенных в сравнительное исследование эффективности препаратов rFVIIa

№ наблюдения	Возраст, годы	Масса тела, кг	Титр ингибитора к FVIII	Титр к FIX	Число эпизодов кровотечений в месяц (по данным анамнеза)
1	29	35	23	0	3–4
2	54	74	12	0	1–2
3	30	65	23	0	3–4
4	50	88	5	0	3–4
5	51	65	26	0	3–4
6	38	64	6	0	4–5
7	40	77	15	0	3
8	21	95	10	0	3–4
9	26	75	463	1,7	4–5
10	20	85	10	0	4–5
Медиана	34	74,5	14	1,7	–

тель используют для количественного выражения генерации тромбина [11, 14, 15].

Для выполнения ТЭГ использовали стабилизированную цитратом кровь. Измерение параметров ТЭГ проводили согласно стандартной методике на тромбоэластографе TEG 5000 ("Haemoscope Corporation", США) [16]. Рекальцификацию пробы 340 мкл цитратной крови осуществляли добавлением в ячейку 20 мкл раствора хлорида кальция молярной концентрации 0,2 моль/л. Оценивали следующие параметры: R – время от начала теста до достижения амплитуды сигнала 2 мм, т.е. время от начала измерения до образования первых волокон фибрина; K – время коагуляции, т.е. время, необходимое для увеличения амплитуды сигнала от 2 до 20 мм, характеризующее кинетику свертывания; угол альфа (α) – угол наклона восходящей части ТЭГ, отражающий скорость свертывания; максимальную амплитуду (MA) – параметр, характеризующий конечный этап тромбообразования – полимеризацию фибрина и прочность образовавшегося сгустка [16]. Коагуляционный индекс (CI) – показатель, характеризующий состояние гемостаза в совокупности, рассчитывали по формуле [16]:

$$CI = -0,1227 \times R + 0,0092 \times K + 0,166 \times MA - 0,1241 \times \alpha - 5,0220.$$

Анализ выполняли с помощью программного обеспечения Haemoscope TEG Analytic® Software 4.2.97.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SPSS 10.0.5. Данные представлены в виде: среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD), медиана и разброс (минимальное и максимальное значения). Проверку распределения на нормальность осуществляли с помощью критериев согласия Пирсона (χ^2) и

Колмогорова–Смирнова. Для оценки различий между группами сравнения и в процессе лечения использовали T -критерий Вилкоксона и парный t -критерий Стьюдента. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Лечение обоими препаратами rFVIIa переносилось хорошо, не зарегистрировано ни одного осложнения, связанного с их введением.

До введения препаратов rFVIIa у больных не выявлено статистически значимых различий в величинах АЧТВ, тромбинового времени, ПВ, концентрации фибриногена в плазме, активности FVII в плазме и ЭТП (табл. 2 и 3). АЧТВ было удлинено у всех больных. Тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме были в пределах нормальных значений (см. табл. 2). После введения препаратов rFVIIa не выявлено статистически значимых изменений концентрации фибриногена в плазме и тромбинового времени.

После введения обоих препаратов rFVIIa максимальное повышение активности FVII в плазме зарегистрировано спустя 15 мин: активность FVII повысилась с $97,0 \pm 19,3$ до $3642,0 \pm 1377,0\%$ после введения препарата Коагил-VII и с $92,9 \pm 22,4$ до $3283,0 \pm 787,1\%$ после введения препарата НовоСэвен, различия для обоих препаратов статистически значимы ($p < 0,05$). Статистически значимое повышение активности FVII в плазме сохранялось в течение 48 ч после введения препарата НовоСэвен и в течение 36 ч после введения препарата Коагил-VII. Статистически значимых различий в активности FVII в плазме в одни и те же временные промежутки между больными, получившими разные препараты rFVIIa, не обнаружено (см. табл. 3).

Введение обоих препаратов rFVIIa приводило к укорочению, но не к нормализации АЧТВ. Статистически значимое укорочение АЧТВ наблюдалось в течение 6 ч после введения препарата НовоСэвен и в течение 9 ч после введения

Таблица 2. Тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме у больных до введения препаратов rFVIIa

Препарат	Тромбиновое время, с		Концентрация фибриногена, г/л	
	разброс	$M \pm SD$	разброс	$M \pm SD$
Коагил-VII	17,8–20,4	$18,7 \pm 0,9$	17,6–20,3	$18,8 \pm 1,0$
НовоСэвен	1,8–3,2	$2,4 \pm 0,5$	1,8–3,5	$2,4 \pm 0,5$

Таблица 3. Активность FVII в плазме, АЧТВ, ПВ и ЭТП до и после введения препаратов rFVIIa

Параметр	Активность FVII, % от нормальной плазмы		АЧТВ, с		ПВ, с		ЭТП, нмоль \times 90 мин	
	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен
Значение в норме	80–100		30–35		10–15		700–800	
До введения	$97,0 \pm 19,3$	$92,9 \pm 22,4$	$119,0 \pm 26,0$	$113,0 \pm 37,0$	$11,4 \pm 0,7$	$11,0 \pm 0,7$	$633,8 \pm 153,3$	$676,0 \pm 161,2$
Время после введения препарата:								
15 мин	$3642,0 \pm 1377,0^*$	$3283,0 \pm 787,1^*$	$67,7 \pm 6,9^*$	$68,0 \pm 9,5^*$	$7,3 \pm 0,3^*$	$7,4 \pm 0,2^*$	$752,9 \pm 181,6^*$	$727,4 \pm 161,1^*$
30 мин	$2779,0 \pm 612,5^*$	$2862,0 \pm 925,6^*$	$68,6 \pm 7,8^*$	$73,3 \pm 12,8^*$	$7,4 \pm 0,2^*$	$7,4 \pm 0,4^*$	$760,8 \pm 199,9^*$	$730,9 \pm 144,4^*$
1 ч	$2160,0 \pm 505,0^*$	$1816,0 \pm 836,7^*$	$70,3 \pm 9,0$	$76,9 \pm 14,4$	$7,6 \pm 0,3^*$	$7,5 \pm 0,4^*$	$775,5 \pm 154,5^*$	$773,5 \pm 100,8^*$
2 ч	$1511,0 \pm 515,9^*$	$1170,0 \pm 553,2^*$	$75,4 \pm 9,3^*$	$79,5 \pm 12,5$	$7,8 \pm 0,6^*$	$7,7 \pm 0,5^*$	$756,9 \pm 177,5^*$	$744,4 \pm 140,0^*$
6 ч	$521,9 \pm 163,5^*$	$383,2 \pm 175,4^*$	$89,0 \pm 13,9^*$	$90,5 \pm 20,1^*$	$8,3 \pm 0,6^*$	$8,8 \pm 0,8^*$	$758,5 \pm 153,3^*$	$754,4 \pm 125,4^*$
9 ч	$302,3 \pm 93,9^*$	$288,9 \pm 99,0^*$	$100,9 \pm 20,7^*$	$99,1 \pm 22,4$	$9,0 \pm 0,6^*$	$9,5 \pm 0,6^*$	$745,2 \pm 171,0^*$	$730,3 \pm 151,0^*$
12 ч	$191,0 \pm 79,9^*$	$184,8 \pm 73,9^*$	$107,8 \pm 19,6$	$113,5 \pm 34,0$	$9,6 \pm 0,6^*$	$10,0 \pm 6,5^*$	$727,7 \pm 160,0^*$	$699,2 \pm 161,2$
24 ч	$129,5 \pm 38,5^*$	$119,8 \pm 34,5^*$	$116,6 \pm 21,6$	$118,5 \pm 33,0$	$11,2 \pm 0,7$	$10,0 \pm 0,9$	$691,7 \pm 153,8$	$692,9 \pm 118,7$
36 ч	$107,4 \pm 22,3^*$	$107,4 \pm 29,0^*$	$117,5 \pm 24,8$	$118,7 \pm 30,5$	$11,5 \pm 0,7$	$11,3 \pm 0,7$	$667,9 \pm 143,4$	$663,0 \pm 152,1$
48 ч	$101,9 \pm 24,0$	$100,5 \pm 24,3^*$	$117,6 \pm 25,0$	$117,7 \pm 29,2$	$11,1 \pm 1,3$	$11,4 \pm 0,7$	$676,0 \pm 146,4$	$648,3 \pm 138,3$

*Статистически значимые различия (парный t -критерий Стьюдента; $p < 0,05$) по сравнению со значением параметра до введения препарата.

препарата Коагил-VII. Статистически значимых различий в величине АЧТВ в одни и те же временные промежутки после введения разных препаратов rFVIIa не выявлено (см. табл. 3).

Введение обоих препаратов rFVIIa также сопровождалось статистически значимым укорочением ПВ. Это укорочение сохранялось в течение 12 ч, а затем длительность ПВ вновь возвращалась к исходным значениям. Статистически значимых различий в длительности ПВ в одни и те же временные промежутки после введения разных препаратов rFVIIa не получено (см. табл. 3).

До введения препаратов rFVIIa ЭТП был ниже нормы. Введение обоих препаратов rFVIIa приводило к статистически значимому повышению и нормализации ЭТП уже через 15 мин. Статистически значимое повышение ЭТП сохранялось в течение 12 ч после введения препарата Коагил-VII и в течение 9 ч после введения препарата НовоСэвен. Статистически значимых различий в величине ЭТП в одни и те же временные промежутки после введения разных препаратов rFVIIa не выявлено (см. табл. 3).

До введения препаратов rFVIIa у 9 больных, включенных в исследование, на протяжении более 1 ч не происходило расхождения ветвей ТЭГ и регистрировалась прямая линия, у 1 больного (наблюдение №2) параметры ТЭГ удалось определить перед введением обоих препаратов, но при этом отмечалась гипокоагуляция (табл. 4). После введения препаратов Коагил-VII и НовоСэвен уже через 15 мин появилось расхождение кривых ТЭГ, стал образовываться сгусток и параметры ТЭГ приблизились к нормальным значениям. Подобный эффект сохранялся в течение 2 ч. Спустя 24 ч наблюдался возврат параметров ТЭГ к исходным значениям, отмечавшимся до введения препаратов rFVIIa: у большинства больных вновь регистрировалась прямая линия и не происходило расхождение кривых ТЭГ; лишь у 1 больного (наблюдение №2) наблюдались кривые ТЭГ с признаками гипокоагуляции. После введения препаратов Коагил-VII и НовоСэвен в одни и те же временные промежутки параметры ТЭГ были сопоставимы и статистически значимо не различались, исключая период К на 60-й минуте (см. табл. 4).

Одной из проблем применения препаратов, обладающих шунтирующим механизмом действия, у больных с ингибиторной формой гемофилии является сложность лабораторной оценки эффективности терапии.

В проведенном нами исследовании введение обоих препаратов rFVIIa приводило к статистически значимому укорочению АЧТВ. Однако даже после этого АЧТВ оставалось

больше нормы почти в 2 раза. Подобный эффект rFVIIa отмечали и другие авторы [17–19]. В выполненном нами исследовании изменение лабораторных параметров под действием оригинального препарата и биоаналога было сопоставимо. АЧТВ является индикатором прежде всего внутреннего пути свертывания крови и определяется активацией FX, FV, протромбина, а также кининогена, прекалликреина, FXII, FIX, FVIII [13]. Возможным механизмом укорочения АЧТВ у больных с ингибиторной формой гемофилии может быть прямая активация FX в присутствии высокой концентрации rFVIIa [18, 20].

После введения препаратов rFVIIa происходило укорочение не только АЧТВ, но и ПВ. Это укорочение регистрировалось в течение 12 ч после введения препаратов. ПВ определяется витамин-К-зависимыми факторами свертывания крови (II, VII и X) и витамин-К-независимым FV [21]. Укорочение его свидетельствует об активации внешнего пути свертывания крови.

Одним из ключевых факторов внешнего пути свертывания крови является FVII. Его активность в плазме была максимальной через 15 мин после введения обоих препаратов rFVIIa и значительно, почти в 30 раз, превышала исходное значение. Активность FVII в плазме снизилась до исходного значения лишь через 36 ч после однократной инъекции препаратов rFVIIa. Подобные изменения активности FVII после введения препарата НовоСэвен больным с ингибиторной формой гемофилии отмечали и японские авторы [19]. Столь значительное повышение активности FVII необходимо для достижения шунтирующей активности. У здоровых лиц лишь 1% циркулирующего FVII находится в активированной форме. Количество фактора, необходимого для «шунтирующего действия», значительно больше. У больных с ингибиторной формой гемофилии в отсутствие FVIII и/или FIX фармакологические дозы FVIIa связываются с активированными тромбоцитами и напрямую активируют FX, переводя его в FXa, который в присутствии FV усиливает генерацию тромбина [10, 20].

Следует отметить, что в одни и те же временные точки после введения препаратов НовоСэвен и Коагил-VII значения АЧТВ, ПВ, активности FVII в плазме статистически значимо не различались. В то же время хронометрические тесты и активность отдельных факторов свертывания не коррелируют с клиническим ответом на лечение препаратами rFVIIa [17, 18]. Объективно оценить гемостатическое действие этих препаратов можно только с помощью интегральных тестов, к которым относятся ТЭГ и ТГТ [22].

Таблица 4. Параметры ТЭГ до и после введения препаратов rFVIIa

Параметр	R, мин		K, мин		Угол α, град.		MA, мм		CI	
	9–27		2–9		22–58		44–64		от –3 до 3	
Значение в норме										
Препарат	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен	Коагил-VII	НовоСэвен
До введения	Н.о. (34,0)	Н.о. (26,0)	Н.о. (7,6)	Н.о. (7,2)	Н.о. (26,0)	Н.о. (29,0)	Н.о. (43,0)	Н.о. (43,0)	Н.о. (–5,2)	Н.о. (–4,7)
Время после введения препарата:										
15 мин	28,0 ± 9,4	28,9 ± 22,1	9,2 ± 4,0	8,3 ± 4,8	30,9 ± 14,2	32,9 ± 14,6	46,1 ± 14,7	56,6 ± 13,3	–4,5 ± 3,0	–2,1 ± 1,9
30 мин	22,5 ± 7,2	31,3 ± 21,5	6,1 ± 2,3	10,1 ± 10,5	36,3 ± 12,0	32,0 ± 16,2	54,4 ± 12,6	56,1 ± 15,7	–3,2 ± 1,5	–2,5 ± 1,6
1 ч	20,8 ± 8,3	31,7 ± 7,2	5,8 ± 1,9	10,8 ± 4,5*	40,5 ± 13,8	26,3 ± 10,7	58,3 ± 7,1	52,4 ± 12,3	–2,6 ± 1,3	–3,2 ± 1,7
2 ч	35,1 ± 21,4	36,2 ± 21,1	9,6 ± 10,1	9,4 ± 4,8	35,4 ± 20,1	29,9 ± 14,0	47,1 ± 24,5	51,2 ± 19,0	–3,5 ± 2,5	–2,9 ± 1,9
24 ч	Н.о. (37,0)	Н.о. (61,0)	Н.о. (23,0)	Н.о. (40,0)	Н.о. (9,7)	Н.о. (5,5)	Н.о. (36)	Н.о. (25,0)	Н.о. (–4,6)	Н.о. (–8,6)
48 ч	Н.о. (36,0)	Н.о. (61,4)	Н.о. (22,0)	Н.о. (40,4)	Н.о. (8,3)	Н.о. (5,0)	Н.о. (39)	Н.о. (25,4)	Н.о. (–3,8)	Н.о. (–8,7)

Н.о. – параметр у больных не определяется в связи с гипокоагуляцией, в скобках даны значения параметра у 1 больного (наблюдение №2); * – получены статистически значимые различия (парный t-критерий Стьюдента; $p < 0,05$) между группами пациентов, получивших препарат Коагил-VII и препарат НовоСэвен.

ТЭГ – глобальный тест, позволяющий интегрально оценить весь процесс свертывания, включая инициацию, скорость образования сгустка и прочность сгустка. При ТЭГ *in vivo* создаются условия, напоминающие свертывание в организме. Опубликовано множество работ, свидетельствующих о том, что ТЭГ можно использовать у больных с ингибиторной формой гемофилии для мониторинга гемостатического действия rFVIIa как *ex vivo* [11, 23], так и в клинических условиях при кровотечениях [11, 24–26].

Мы сравнили профили ТЭГ у больных, получивших однократную дозу препаратов Коагил-VII и НовоСэвен. У большинства больных до введения препаратов, по данным ТЭГ, регистрировалась прямая линия и расхождение кривых так и не произошло. Только после инъекции того или иного препарата rFVIIa в дозе 90 мкг/кг параметры ТЭГ нормализовались или стали близки к нормальным значениям. Это означает, что у больных до введения препаратов сгусток не образовывался, он появлялся только после инъекции препаратов rFVIIa, что уже само по себе является значимым. Почти во всех случаях не выявлено статистически значимых различий в параметрах ТЭГ в зависимости от препарата rFVIIa. Суммарно оценить изменения всех параметров ТЭГ можно с помощью *CI*, который также не определялся до введения какого-либо из препаратов rFVIIa и нормализовался после его введения. Даже у больного (наблюдение №2), у которого до введения rFVIIa определялись параметры ТЭГ, *CI* был резко снижен и нормализовался лишь после введения препаратов rFVIIa.

При ТЭГ эффект сохранялся в течение 2 ч, а уже через 24 ч сгусток вновь не образовывался, что соответствует фармакокинетике rFVIIa [1].

Другим тестом, позволяющим на лабораторном уровне оценить действие препаратов с шунтирующим механизмом действия при ингибиторной форме гемофилии, является ТГТ [11, 22, 27]. С помощью него можно измерить концентрацию тромбина в плазме до и после образования сгустка. Данный тест является чувствительным к изменениям факторов свертывания крови [22]. В плазме крови больных гемофилией А в отсутствие FVIII скорость реакций, ведущих к образованию тромбина и последующему формированию сгустка, резко снижена [22, 28, 29]. В 1993 г. Y.Sultan и F.Loyer [30] предложили ТГТ для *in vitro* оценки действия препаратов, обладающих шунтирующим механизмом действия. Позже этот тест был использован и другими авторами [11, 28, 29] для мониторинга дозы препаратов с шунтирующим механизмом действия у больных с ингибиторной формой гемофилии. Отмечена корреляция между клиническим ответом на введение препаратов, обладающих шунтирующим механизмом действия, и величиной ЭТП [28]. В проведенном нами исследовании у больных исходно ЭТП был снижен. После введения обоих препаратов rFVIIa отмечались статистически значимое повышение и нормализация ЭТП. Ранее S.Eichinger и соавт. [29] показали, что после введения rFVIIa генерация тромбина увеличивается в среднем на 20%, причем этот эффект является дозозависимым [28]. В проведенном нами исследовании все больные получили rFVIIa в одной и той же дозе – 90 мкг/кг. В клинической практике такая доза достаточна у большинства больных для достижения гемостатического эф-

фекта [5, 10], хотя иногда могут использоваться и более высокие дозы препарата [29, 31]. Как и при остальных методах исследования, мы не обнаружили статистически значимых различий в величине ЭТП в зависимости от того, какой препарат rFVIIa вводили больному.

Таким образом, проведенное исследование показало, что изменения лабораторных показателей, свидетельствуют о том, что гемостатический эффект обоих препаратов rFVIIa (Коагил-VII и НовоСэвен) сопоставим как по выраженности, так и по длительности. Необходимо проведение дальнейших клинических исследований для сравнения клинической эффективности этих двух препаратов rFVIIa при лечении геморрагического синдрома у больных с ингибиторной формой гемофилии.

Литература

1. Plug I., van der Bom J.G., Peters M., et al. Thirty years of hemophilia treatment in the Netherlands, 1972–2001. *Blood* 2004; 104(12): 3494–500.
2. Андреев Ю.Н. Многоликая гемофилия. М.: Ньюдиамед; 2006.
3. Peerlinck K., Hermans C. Epidemiology of inhibitor formation with recombinant factor VIII replacement therapy. *Haemophilia* 2006; 12(6): 579–90.
4. Баркаган З.С. Наследственные нарушения коагуляционного гемостаза. В кн.: Руководство по гематологии. Воробьев А.И., ред. М.: Ньюдиамед; 2005: Т. 3: 45–72.
5. Hedner U., Lee C. A. First 20 years with recombinant FVIIa (NovoSeven). *Haemophilia* 2011; 17(1): 172–82.
6. Hedner U., Kiesel W. Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *J Clin Invest* 1983; 71(6): 1836–41.
7. Hedner U. History of rFVIIa therapy. *Thromb Res* 2010; 125(Suppl. 1): 4–6.
8. Hedner U., Glazer S., Pingel K., et al. Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe hemophilia A during synovectomy. *Lancet* 1988; 2(8621): 1193.
9. www.novonordisk.ru.
10. Roberts H.R., Monroe D.M., White G.C. The use of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding disorders. *Blood* 2004; 104(13): 3858–64.
11. Синуридзе Е.И., Шулуток Е.М., Щербакова О.В. и др. Методы анализа состояния гемостаза при введении пациентам препарата рекомбинантного фактора VIIa «НовоСэвен». *Новое в трансфузиологии* 2006; 42: 17–34.
12. Белоусов Д.Ю. Биоаналоги – насколько они подобны? *Качественная клиническая практика* 2006; 2: 80–3.
13. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед; 2001.
14. Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32(5–6): 249–53.
15. Ghosh K., Mota L., Shetty S., Kulkarni B. Spectrum of changes in endogenous thrombin potential due to heritable disorders of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19(6): 577–80.
16. Younga G., Ebbesen L.S., Viuff D., et al. Evaluation of thromboelastography for monitoring recombinant activated factor VII *ex vivo* in haemophilia A and B patients with inhibitors: a multicentre trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008, 19(4): 276–82.
17. Keeney M., Allan D.S., Lohmann R.C., Yee I.H. Effect of activated recombinant human factor 7 (Niastase) on laboratory testing of inhibitors of factors VIII and IX. *Lab Hematol* 2005; 11(2): 118–23.
18. Telgt D.S., Macik B.G., McCord D.M., et al. Mechanism by which recombinant factor VIIa shortens the aPTT: activation of factor X in the absence of tissue factor. *Thromb Res* 1989; 56(5): 603–9.

19. Shirahata A., Kamiya T., Takamatsu J., et al. Clinical trial to investigate the pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with hemophilia with inhibitors. *Int J Hematol* 2001; 73(4): 517–25.
20. Butenas S., Brummel K.E., Branda R.F., et al. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002; 99(3): 923–30.
21. Poller L. Prothrombin time. In: *Laboratory techniques in thrombosis – a manual*. Jespersen J., Bertina R.M., Haverkate F., eds. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2000; 45–61.
22. Váradi K., Schwarz H.P., Turecek P.L. Methods for testing pharmacodynamic variables of hemophilia and inhibitor therapy: thrombin generation assay and other tests. In: Scharrer I., Schramm W., eds. 34th Hemophilia symposium. Hamburg 2003. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005; 245–52.
23. Young G., Ebbesen L.S., Viuff D., et al. Evaluation of thromboelastography for monitoring recombinant activated factor VII ex vivo in haemophilia A and B patients with inhibitors: a multicentre trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19(4): 276–82.
24. Young G., Blain R., Nakagawa P., et al. Individualization of bypassing agent treatment for haemophilic patients with inhibitors utilizing thromboelastography. *Haemophilia* 2006; 12(6): 598–604.
25. Sørensen B., Ingerslev J. Thromboelastography and recombinant factor VIIa-hemophilia and beyond. *Semin Hematol* 2004; 41(1, Suppl. 1): 140–4.
26. Viuff D., Andersen S., Sørensen B.B., Lethagen S. Optimizing thromboelastography (TEG) assay conditions to monitor rFVIIa (NovoSeven®) therapy in haemophilia A patients. *Thromb Res* 2010; 126(2): 144–9.
27. Turecek P.L., Váradi K., Keil B., et al. Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(1): 16–22.
28. Dargaud Y., Lienhart A., Negrier C. Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery. *Blood* 2010; 116(25): 5734–7.
29. Eichinger S., Lubczyk B., Kollars M., et al. Thrombin generation in haemophilia A patients with factor VIII inhibitors after infusion of recombinant factor VIIa. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(8): 707–13.
30. Sultan Y., Loyer F. In vitro evaluation of factor VIII-bypassing activity of activated prothrombin complex concentrate, prothrombin complex concentrate, and factor VIIa in the plasma of patients with factor VIII inhibitors: thrombin generation test in the presence of collagen-activated platelets. *J Lab Clin Med* 1993; 121(3): 444–52.
31. Kenet G., Lubetsky A., Luboshitz J., Martinowitz U. A new approach to treatment of bleeding episodes in young hemophilia patients: a single bolus megadose of recombinant activated factor VII (NovoSeven). *J Thromb Haemost* 2003; 1(3): 450–5.

Информация о соавторах:

Зоренко Владимир Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом гемофилии и других коагулопатий Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 613-2469
Факс: (495) 656-0658
E-mail: v.zorenko@mail.ru

Полянская Татьяна Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, травматолог-ортопед отделения реконструктивно-восстановительной ортопедии для больных гемофилией Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 612-4392
Факс: (495) 656-0658
E-mail: polyantat@rambler.ru

Сампиев Магомет Султанович, травматолог-ортопед отделения реконструктивно-восстановительной ортопедии для больных гемофилией Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 612-4392
Факс: (495) 656-0658

Северова Татьяна Викторовна, врач-гематолог стационара дневного пребывания для больных гемофилией Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 612-4960

Коняшина Надежда Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник стационара дневного пребывания для больных гемофилией Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 612-4960

Грибкова Ирина Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 612-3522

Орел Елена Борисовна, заведующая лабораторией клинической коагулологии Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: (495) 613-2681

Гемджян Эдуард Георгиевич, старший научный сотрудник лаборатории биостатистики Гематологического научного центра Минздравсоцразвития России
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4А
Телефон: 8 (915) 277-4014
E-mail: edstat@mail.ru