

Опыт применения препарата 5 % иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения И.Г. Вена в терапии иммунной тромбоцитопенической пурпуры у детей

В.Ю. Петров, Э.В. Агеенкова, Е.А. Яценко, И.Н. Лаврентьева,
А.А. Казанкова, Л.Е. Ларина, К.Л. Кондратчик, И.Е. Колтунов

ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 119049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9

Контактные данные: Виктор Юрьевич Петров petrovhemcentr@yandex.ru

Внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ) являются препаратами первой линии терапии иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП) у детей. Однако, как показывает практика, препараты ВВИГ не являются абсолютно аналогичными друг другу, поэтому при их выборе нужно руководствоваться клиническими наблюдениями и исследованиями. При применении ВВИГ необходимо учитывать не только их эффективность, но и переносимость. Мы исследовали эффективность и безопасность препарата И.Г. Вена (Кедрион С.п.А., Италия) при лечении 62 пациентов в возрасте от 6 месяцев до 15 лет с впервые выявленной ИТП. Положительный эффект от применения препарата отмечен у 85,5 % детей с данной патологией. За время исследования не было отмечено серьезных нежелательных реакций ни у одного пациента. Кратковременные побочные эффекты (повышение температуры тела, тошнота, головная боль) наблюдались лишь у 16,1 % больных и не требовали прекращения терапии препаратом И.Г. Вена. Таким образом, в исследовании были продемонстрированы высокая эффективность и безопасность препарата И.Г. Вена при терапии детей с ИТП.

Ключевые слова: дети, иммунная тромбоцитопеническая пурпура, внутривенный иммуноглобулин, И.Г. Вена, эффективность, безопасность

DOI: 10.21682/2311-1267-2016-3-3-52-58

Experience with the drug 5 % human normal immunoglobulin for intravenous administration of Ig Vena N.I.V. in the treatment of immune thrombocytopenic purpura in children

V.Yu. Petrov, E.V. Ageenkova, E.A. Yatsenko, I.N. Lavrentieva, A.A. Kazankova, L.E. Larina, K.L. Kondratchik, I.E. Koltunov
Morozov Children's Hospital; 1/9 4th Dobryninskiy Per., Moscow, 119049, Russia

Intravenous immunoglobulin (IVIg) is the first-line therapy for immune thrombocytopenia (ITP) at children. However, IVIGs are not absolutely comparable, as routine practice shows, so the choice of IVIG requires analysis of specific clinical cases and studies. IVIGs application requires to take into account not only effectiveness, but also tolerability. We investigated effectiveness and safety of Ig VENA (Kedrion S.p.A., Italy) administration for treatment of 62 patients with initially diagnosed ITP at the age of 6 months to 15 years. Positive effect of application of the medication reached at 85.5 % of children with this disease. None of the patients experienced serious adverse events during the study period. Short-term adverse events (fever, nausea, headache) were registered at 16.1 % of patients and did not require discontinuation of Ig VENA therapy. Thus, our study demonstrated the high effectiveness and safety of Ig VENA therapy for children with ITP.

Key words: children, immune thrombocytopenic purpura, intravenous immunoglobulin, Ig Vena N.I.V., efficacy, safety

Актуальность

Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) является приобретенным аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется изолированной тромбоцитопенией.

У детей ИТП, как правило, проявляется остро с выраженной клинической картиной (кожные геморрагии, кровотечения) на фоне значительной тромбоцитопении (уровень тромбоцитов менее $30 \times 10^9/\text{л}$) [1].

Проведенные впервые в 1951 г. W.J. Harrington et al. исследования показали, что разрушение тромбоцитов при ИТП вызвано антитромбоцитарными антителами [2–4]. Обычно у большинства пациентов идентифицируются антитромбоцитарные антитела, направленные к гликопротеидам классов IIb/IIIa и Ib/IX [5, 6].

Появление аутоантител к тромбоцитам и их фагоцитоз считаются основной причиной их разрушения при ИТП [7].

Исходя из известных на сегодняшний день механизмов возникновения ИТП, становится понятным и подход к лечению данного заболевания. Стандартными препаратами первой линии терапии для пациентов с ИТП являются внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ) и глюкокортикоиды.

Важное преимущество ВВИГ в сравнении с глюкокортикоидами заключается в их быстром гемостатическом эффекте при использовании в ургентных ситуациях, развивающихся при ИТП.

ВВИГ – препараты нормального полиспецифического иммуноглобулина класса G (IgG), полученного из пула сывороток нескольких тысяч доноров с таким же распределением по субклассам, как и в нормальной сыворотке, и периодом полувыведения около 3 нед. Механизм действия ВВИГ основан на подавлении активности антитромбоцитарных антител. Положительный эффект иммуноглобулинов обусловлен блокадой Fc-рецепторов макрофагов, что уменьшает опсонизацию тромбоцитов и предотвращает их разрушение в кровеносном русле. ВВИГ также модулируют иммунный ответ путем усиления функции Т-клеток-супрессоров [1, 8, 9].

Современные препараты ВВИГ должны соответствовать требованиям Всемирной организации здравоохранения, определенным в 1982 г.:

- 1) минимум 1000 порций крови;
- 2) минимум 90 % IgG;
- 3) нативный IgG (высокая активность Fc-фрагмента);
- 4) нормальное деление IgG на субклассы;
- 5) физиологичный период полураспада.

Кроме того, ВВИГ должны иметь низкую антикомплементарную активность и двойную вирус-инактивацию (чистый IgG).

Состав препарата ВВИГ может влиять на его переносимость, а также частоту и тяжесть нежелательных явлений. Известно, что различные препараты ВВИГ не полностью идентичны по своему составу. Важно обращать внимание на их вспомогательные вещества: так, например, наличие в нем в качестве стабилизатора мальтозы может привести к возникновению аллергических или анафилактикоидных реакций. В целом же препараты ВВИГ должны отвечать следующим критериям:

- 1) обеспечение высокого уровня вирусной безопасности;
- 2) максимальное сохранение природной нативной структуры иммуноглобулинов;
- 3) минимальное содержание полимеров, агрегированных частиц и активаторов прекаликрина.

В настоящее время на российском рынке существует большое разнообразие препаратов ВВИГ как отечественного, так и импортного производства, которые широко применяются в терапии аутоиммунных заболеваний, в том числе и ИТП у детей.

Применение ВВИГ позволяет быстро повысить уровень тромбоцитов в крови и тем самым снять угрозу такого опасного осложнения, как внутримозговое кровоизлияние. При применении ВВИГ эффект достигается значительно быстрее (через 24–48 ч), чем при использовании глюкокортикоидов. Большие дозы ВВИГ успешно применяются в процессе подготовки пациентов с ИТП к различным плановым операциям, в частности к спленэктомии.

Существует несколько схем терапии с помощью ВВИГ. В обычной практике стандартная доза составляет 1–2 г/кг на курс 2–5 дней. По данным литературы, примерно у 80 % пациентов при терапии ВВИГ достигается повышение уровня тромбоцитов до более $50 \times 10^9/\text{л}$, у большинства из них наступает полная ремиссия. Количество тромбоцитов повышается после первого дня терапии и, как правило, достигает максимального значения в течение первой недели после лечения. Однако такой эффект носит временный характер и сохраняется в течение не более 3–4 нед, после чего количество тромбоцитов может снизиться до первоначального уровня [1, 8].

За период с 2005 по 2015 г. нами наблюдались 2683 пациента с ИТП, в терапии которых применялись как глюкокортикоиды, так и ВВИГ. Необходимо отметить, что в последние 5 лет в нашей практике препаратами выбора в первой линии терапии у детей с впервые выявленной ИТП являются ВВИГ. Так, ежегодно, начиная с 2010 г., для лечения ИТП нами используется до 60 л (3000 г) препаратов ВВИГ.

По результатам наших наблюдений, эффективность терапии ВВИГ у детей с ИТП составляет 68 %. При этом клинико-лабораторный ответ на лечение не зависит от дозы препарата (1–2 г/кг на курс) и является индивидуальным для каждого пациента. Наши результаты совпадают с данными других авторов. Нами доказано отсутствие связи рецидива ИТП с полом, возрастом и исходным уровнем тромбоцитов.

Согласно результатам нашего исследования, максимальный рост количества тромбоцитов отмечается на 2–3-й день от момента введения ВВИГ, что соответствует данным других авторов. Быстрый гемостатический эффект и повышение количества тромбоцитов на фоне введения ВВИГ указывают на необходимость их применения в терапии первой линии, особенно у пациентов с угрожающими жизни кровотечениями.

Используя в своей практике различные ВВИГ, мы обратили внимание на разную частоту нежелательных лекарственных реакций в зависимости от конкретного препарата, применяемого в лечении ИТП у детей. Нежелательные лекарственные реакции при применении ВВИГ, проявляющиеся в виде лихорадки, тошноты, рвоты, были отмечены в 23–42 % случаев (в зависимости от применяемого препарата). Эти данные совпадают с результатами других авторов, указывающих на

частоту развития побочных эффектов на фоне лечения ВВИГ [10]. По нашим наблюдениям, при применении ВВИГ отсутствовали серьезные осложнения, требующие отмены препарата [8]. Однако наличие даже незначительных побочных реакций может ухудшать самочувствие пациента и вызывать обеспокоенность его родителей, а иногда и требовать сопроводительной терапии (антипиретики, анальгетики и т. д.).

В связи с вышеизложенным мы решили сравнить переносимость и эффективность относительно нового на российском рынке препарата И.Г. Вена (Кедрион С.п.А, Италия) с ранее широко используемыми другими ВВИГ.

И.Г. Вена изготовлен из пулированной плазмы доноров с помощью фракционирования холодным этанолом и с инактивацией вирусов методом сольвент-детергентной обработки и инкубацией при низком значении рН. По своему составу препарат И.Г. Вена соответствует всем требованиям Европейской фармакопеи [11].

Материалы и методы

Препарат И.Г. Вена представляет собой раствор для инфузий 5 % IgG человека нормального (табл. 1).

В ходе исследования нами были проанализированы безопасность и эффективность препарата И.Г. Вена при лечении детей с впервые выявленной ИТП.

В исследование были включены больные с подтвержденным диагнозом ИТП, которые наблюдались в отделении гематологии ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ».

В исследовании принимали участие 62 пациента (37 мальчиков и 25 девочек) в возрасте от 1 месяца до

15 лет (медиана — 5,2 года). Диагноз ИТП был поставлен на основании клинической картины и проведенных лабораторных тестов.

Исследование носило открытый нерандомизированный проспективный характер. Препарат И.Г. Вена вводили в дозе 0,8–2 г/кг на курс с максимально разрешенной скоростью 1,9 мл/кг/ч. При оценке эффективности учитывали регресс клинической картины и уровень тромбоцитов в анализе крови, при оценке безопасности — реакции и осложнения при использовании препарата. Исследование закончили все пациенты.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel, для определения уровня значимости различий (*p*) использовали *t*-критерий Стьюдента для парных значений. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Согласно протоколу в исследование были включены только пациенты с впервые возникшей ИТП, выраженной клинической картиной и уровнем тромбоцитов $30 \times 10^9/\text{л}$ и менее. Средний уровень тромбоцитов до начала терапии препаратом И.Г. Вена составил $16,5 \pm 5,7 \times 10^9/\text{л}$ (табл. 2).

Известно, что нежелательные лекарственные реакции при терапии ВВИГ варьируют от нетяжелых кратковременных состояний (головные боли, тошнота, рвота, лихорадка) до тяжелых, таких как острый гемолиз, тромботические осложнения и т. д.

В ходе исследования в общей сложности 62 пациентам с ИТП было выполнено 286 введений препарата И.Г. Вена. Средняя доза составила 1,53 г/кг на курс.

За время наблюдения не было зарегистрировано ни одного тяжелого нежелательного явления, связанного с введением препарата И.Г. Вена. Кроме того, при катamnестическом наблюдении за пациентами в течение 1 мес и более не выявлено отсроченных реакций на терапию данным препаратом. Нетяжелые кратковременные реакции, такие как рвота, головная боль, лихорадка, не требующие отмены препарата И.Г. Вена, были отмечены только у 10 (16,1 %) пациентов в отличие от других ВВИГ, при которых указанные нежелательные явления наблюдались в 42 % случаев. Тяжелых реакций на введение препарата И.Г. Вена не было отмечено ни у одного из наших больных.

Первичная эффективность препарата И.Г. Вена (достижение полного гематологического ответа) зафиксирована у 53 (85,5 %) пациентов. Из них в дальнейшем (спустя 3 нед от проведения курса ВВИГ) у 41 (66,1 %) больного отмечена полная клинико-лабораторная ремиссия (уровень тромбоцитов более $140 \times 10^9/\text{л}$), у 7 (11,3 %) — неполная клинико-лабораторная ремиссия (уровень тромбоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$, отсутствие геморрагического синдрома), у 4 (6,5 %) — клиническая

Таблица 1. Основные характеристики препарата И.Г. Вена

Характеристика	И.Г. Вена	Требование Европейской фармакопеи
Содержание мономеров/димеров IgG, %	Более 95	Не менее 95
Функциональная активность Fc-фрагмента IgG, %	95,8	Более 60
Содержание IgA, мг/мл	Менее 0,05	Менее 0,1
рН	4,6	4–5,5
Осмолярность, мосмоль/кг	Более 240	336
Титр изогемагглютининов	Менее 1/64	1/4–1/8
Стабилизатор	Мальтоза	В соответствии со спецификацией производителя
Скрининг на вирус В19	Серологические методы/ПЦР	Рекомендован

Примечание. ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Таблица 2. Демографические характеристики, дозы ВВИГ, клинические и лабораторные данные у пациентов с ИТП, участвовавших в исследовании

№ п/п	Возраст	Пол	Доза ВВИГ, г/кг	Уровень тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		Нежелательные явления	Эффект терапии	Повторный криз
				до лечения	после лечения			
1	8 лет	Мужской	1	30	216	Рвота однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
2	8 лет	Мужской	1	11	310	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
3	1 год 8 месяцев	Мужской	1	27	213	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
4	5 месяцев	Мужской	2	10	273	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 3 нед
5	7 месяцев	Мужской	1,5	30	333	Рвота однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
6	4 года	Мужской	2	23	483	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
7	1 год 8 месяцев	Мужской	1	5	227	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
8	1 год	Мужской	2	10	276	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
9	2 год	Женский	1	20	528	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
10	8 лет	Мужской	1	0	199	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 2 нед
11	1 год 1 месяц	Мужской	2	5	341	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
12	6 лет	Женский	1	5	5	—	Без эффекта	Назначены глюкокортикоиды
13	6 лет	Женский	1,2	25	329	Головная боль	Клинико-гематологическая ремиссия	—
14	10 месяцев	Женский	0,8	30	280	Рвота однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
15	13 лет	Мужской	0,8	30	160	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
16	2 года	Мужской	1	0	368	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
17	8 месяцев	Мужской	2	30	489	Рвота, лихорадка однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
18	13 лет	Женский	1	30	229	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
19	1 год 8 месяцев	Мужской	2	26	300	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 1 нед
20	1 год 8 месяцев	Мужской	1	9	125	—	Неполная ремиссия	Через 2 нед
21	4 месяца	Мужской	3	9	205	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
22	6 месяцев	Мужской	2	30	408	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—

Демографические характеристики, дозы ВВИГ, клинические и лабораторные данные у пациентов с ИТП, участвовавших в исследовании (продолжение)

№ п/п	Возраст	Пол	Доза ВВИГ, г/кг	Уровень тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		Нежелательные явления	Эффект терапии	Повторный криз
				до лечения	после лечения			
23	6 лет	Женский	2	4	195	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 1 нед, назначены глюкокортикоиды
24	6 лет	Женский	1	5	200	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
25	2 года	Мужской	1,4	7	227	Рвота однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 2 нед
26	2 года	Мужской	1	22	231	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 2 нед
27	2 года	Мужской	2	4	299	—	Неполная ремиссия	—
28	3 месяца	Женский	2	30	191	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
29	3 года	Женский	2	14	125	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
30	3 года	Женский	0,7	27	267	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
31	1 месяц	Женский	2	28	542	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
32	4 года	Мужской	2	4	122	—	Неполная ремиссия	Через 2 нед
33	15 лет	Мужской	1,8	13	133	—	Неполная ремиссия	—
34	1 год 2 месяца	Женский	1,5	30	329	Лихорадка, рвота	Клинико-гематологическая ремиссия	—
35	10 месяцев	Мужской	2	9	185	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
36	7 лет	Женский	1,7	24	236	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
37	1 год 2 месяца	Женский	1	4	205	Лихорадка однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
38	7 месяцев	Мужской	2	7	402	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
39	10 месяцев	Мужской	2	14	734	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
40	1 год 3 месяца	Мужской	1	12	293	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
41	1 год	Женский	1	29	228	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
42	6 лет	Мужской	1	30	335	—	Клинико-гематологическая ремиссия	Через 2 нед
43	6 лет	Мужской	1,5	30	430	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
44	4 года	Женский	1	5	156	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—

Демографические характеристики, дозы ВВИГ, клинические и лабораторные данные у пациентов с ИТП, участвовавших в исследовании (окончание)

№ п/п	Возраст	Пол	Доза ВВИГ, г/кг	Уровень тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		Нежелательные явления	Эффект терапии	Повторный криз
				до лечения	после лечения			
45	2 года	Женский	1	27	314	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
46	3 года	Женский	2	3	381	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
47	1 год 1 месяц	Мужской	2	0	281	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
48	8 лет	Женский	2	5	58	—	Неполная ремиссия	Назначены глюкокортикоиды
49	5 лет	Мужской	1,8	9	178	—	Неполная ремиссия	—
50	8 лет	Женский	1,6	0	18	—	Без эффекта	Назначены глюкокортикоиды
51	15 лет	Мужской	2	17	208	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
52	3 года	Женский	1,1	30	285	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
53	3 года	Мужской	2	30	191	Лихорадка однократно	Клинико-гематологическая ремиссия	—
54	15 лет	Мужской	1	30	151	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
55	6 месяцев	Мужской	1,25	30	249	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
56	3 месяца	Женский	2	18	248	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
57	8 лет	Женский	1	25	194	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
58	7 лет	Женский	1,8	11	335	Лихорадка однократно, рвота	Клинико-гематологическая ремиссия	—
59	11 лет	Мужской	2	4	158	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
60	9 лет	Мужской	1,7	25	385	—	Неполная ремиссия	—
61	6 лет	Мужской	2	15	274	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—
62	7 лет	Женский	2	0	164	—	Клинико-гематологическая ремиссия	—

ремиссия (отсутствие геморрагического синдрома при сохранении уровня тромбоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$). И только у 10 (16,1 %) пациентов сохранялись клинические проявления заболевания и выраженная тромбоцитопения (уровень тромбоцитов ниже $30 \times 10^9/\text{л}$), потребовавшие в дальнейшем назначения глюкокортикоидов.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что препарат И.Г. Вена является высокоэффективным и наиболее безопасным в терапии ИТП у детей и может быть рекомендован к применению у пациентов раннего возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В.Ю., Сосков Г.И., Плахута Т.Г., Агеенкова Э.В. Современные представления о патофизиологии и терапии идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Педиатрия 2009;88(4):125–34. [Petrov V.Yu., Soskov G.I., Plakhuta T.G., Ageenkova E.V. Modern understanding of the pathophysiology and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatriya = Pediatrics* 2009;88(4):125–34. (In Russ.)].
2. Harrington W.J., Minnich V., Hollingsworth J.W., Moore C.V. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38(1):1–10.
3. Shulman N.R., Marder V.J., Weinrach R.S. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. *Physiologic, serologic and isotopic studies. Ann N Y Acad Sci* 1965;124(2):499–542.
4. van Leeuwen E.F., van der Ven J.T., Engelfriet C.P., von dem Borne A.E. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1982;59(1):23–6.
5. McMillan R., Wang L., Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* 2003;1(3):485–91.
6. Brighton T.A., Evans S., Castaldi P.A. et al. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigenspecific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 1996;88(1):194–201.
7. Cines D.B., Blanchette V.S. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002;346(13):995–1008.
8. Петров В.Ю. Современные аспекты этиопатогенеза, клинического течения и терапии острой тромбоцитопенической пурпуры у детей. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2005. 43 с. [Petrov V.Yu. Modern aspects of etiology and pathogenesis, clinical course and treatment of acute thrombocytopenic purpura in children. Thesis abstract of ... Ph. D. Med. Moscow, 2005. 43 p. (In Russ.)].
9. Lazarus A.H., Crow A.R. Mechanism of action of IVIG and anti-D in ITP. *Transfus Apher Sci* 2003;28(3):249–55.
10. Kattamis A.C., Shankar S., Cohen A.R. Neurologic complications of treatment of childhood acute immune thrombocytopenic purpura with intravenously administered immunoglobulin G. *J Pediatr* 1997;130(2):281–3.
11. Summary of product characteristics. Available at: http://www.biogenetech.co.th/wpcontent/uploads/2011/10/IgVena_PI0605_E1002_rev.01.pdf.