

Особенности испытаний лекарственных средств на наличие бактериальных ЭНДОТОКСИНОВ

Доцент Байдуйсенова А.У.

Основным показателем качества воды, применяемой для приготовления инъекционных/инфузионных растворов является **апирогенность**.

Термин «пироген» происходит от греческого “pyreto” - лихорадка. Пирогенами называют вещества, способные вызывать повышение температуры тела при попадании в кровь. К ним относят: грамотрицательные бактерии и их токсины, вирусы и продукты их жизнедеятельности, погибшие микробные клетки и пр. По химическому составу пирогенные вещества представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий, так называемые - **бактериальные эндотоксины**.



(продолжение)

Пирогенные вещества - это высокомолекулярные соединения, они нелетучи и не перегоняются с водяным паром. Загрязнение дистиллированной воды пирогенными веществами происходит чаще всего в результате переброса капельной фазы, содержащей пирогенные вещества, из испарителя в конденсатор и сборник аквадистиллятора.

Поэтому главной задачей при получении воды для инъекций является отделение капелек воды от паровой фазы, уменьшение толщины кипящего слоя, обеспечение равномерного кипения и оптимальной скорости парообразования.



Пирогены - термостабильные вещества, они разрушаются только при нагревании в суховоздушных стерилизаторах при температуре **250 °С в течение 30 минут**. При воздействии пара под давлением (t 120 °С автоклавированием) в растворах пирогены разрушаются только через 5 часов. Следовательно, освободиться от пирогенных веществ в воде и инъекционных растворах при помощи термической стерилизации практически невозможно.

Таким образом, каждый инъекционный раствор после его правильной стерилизации стерилен, но не каждый стерильный раствор -

апирогенен.

Стерильность и ***апирогенность*** - разные понятия и подменять одно другим - нельзя.

Отсюда ясна важность строжайшего соблюдения аптечными учреждениями асептических условий изготовления инъекционных растворов на всех этапах, независимо от последующей стерилизации.

В связи с опасностью пирогенного эффекта проверке на «**Пирогенность**» должны подвергаться растворы, вводимые внутривенно в объемах 10 мл и более (ГФ XI).

По фармакопейной методике (ГФ XI) пирогенность определяется с помощью биологического метода, основанного на изменении температуры тела кролика после введения испытуемых препаратов. Для этого исследуемый раствор препарата или 0,9% изотонический раствор натрия хлорида, приготовленный на испытуемой воде, вводят трем кроликам, в ушную вену из расчета 10 мл на 1 кг веса кролика.

Раствор лекарственного вещества или воду считают апирогенными, если в каждом из трех измерений температура тела кролика не должна повышаться более, чем на $0,6^{\circ}\text{C}$, а в сумме не должна превышать $1,4^{\circ}\text{C}$.

Относительная чувствительность в данном случае составляет 1-10 нм/мл

Недостатки биологического метода: зависимость результатов от индивидуальной чувствительности животного, большее восприятие пирогенной реакции человеком по сравнению с кроликом и высокие затраты на содержание и уход за животными (метод экономически дорог).

Фармакопея США XX (1980г) включила наряду с испытаниями на кроликах определение пирогенных веществ с помощи реакции гелирования лизата амебоцитов крови (гемолимфы) мечехвоста вида *Limulus polyphemus*.

В 1964 года в США было доказано, что клетки крови мечехвоста вида *Limulus polyphemus* способны специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (пирогенами). В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина в испытуемом растворе.

Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амебоцитов *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*), сокращенно ЛАЛ-реактив, и, соответственно, ЛАЛ-тест.

ЛАЛ-реактив представляет собой лиофильно высушенный препарат. Это водный экстракт (лизат) амебоцитов, содержащий все компоненты, необходимые для реакции с эндотоксином.

Для проведения анализа методом гель-тромб тест предназначены ЛАЛ-реактивы Endosafe и Endosafe КТА.

Фармакопея Японии, Европейская Фармакопея, а также Фармакопея Казахстана также включили наряду с биологическим методом определение пирогенных веществ с помощи реакции гелирования лизата амебоцитов крови мечехвоста.

На основе вышеуказанной реакции гелирования разработан активно развивающийся способ контроля качества лекарственных средств, определяющий наличие бактериальных эндотоксинов *in vitro* - ЛАЛ-тест.

И сегодня **ЛАЛ-тест** считается наиболее надежным и перспективным способом проверки потенциальной пирогенности лекарственных средств.

Преимущества **ЛАЛ-теста** - высокая чувствительность, простота выполнения, надежность, хорошая воспроизводимость, возможность анализировать в короткий срок большое число образцов.

При массовом использовании этот метод, безусловно, дешевле теста на кроликах.

LAL-тест

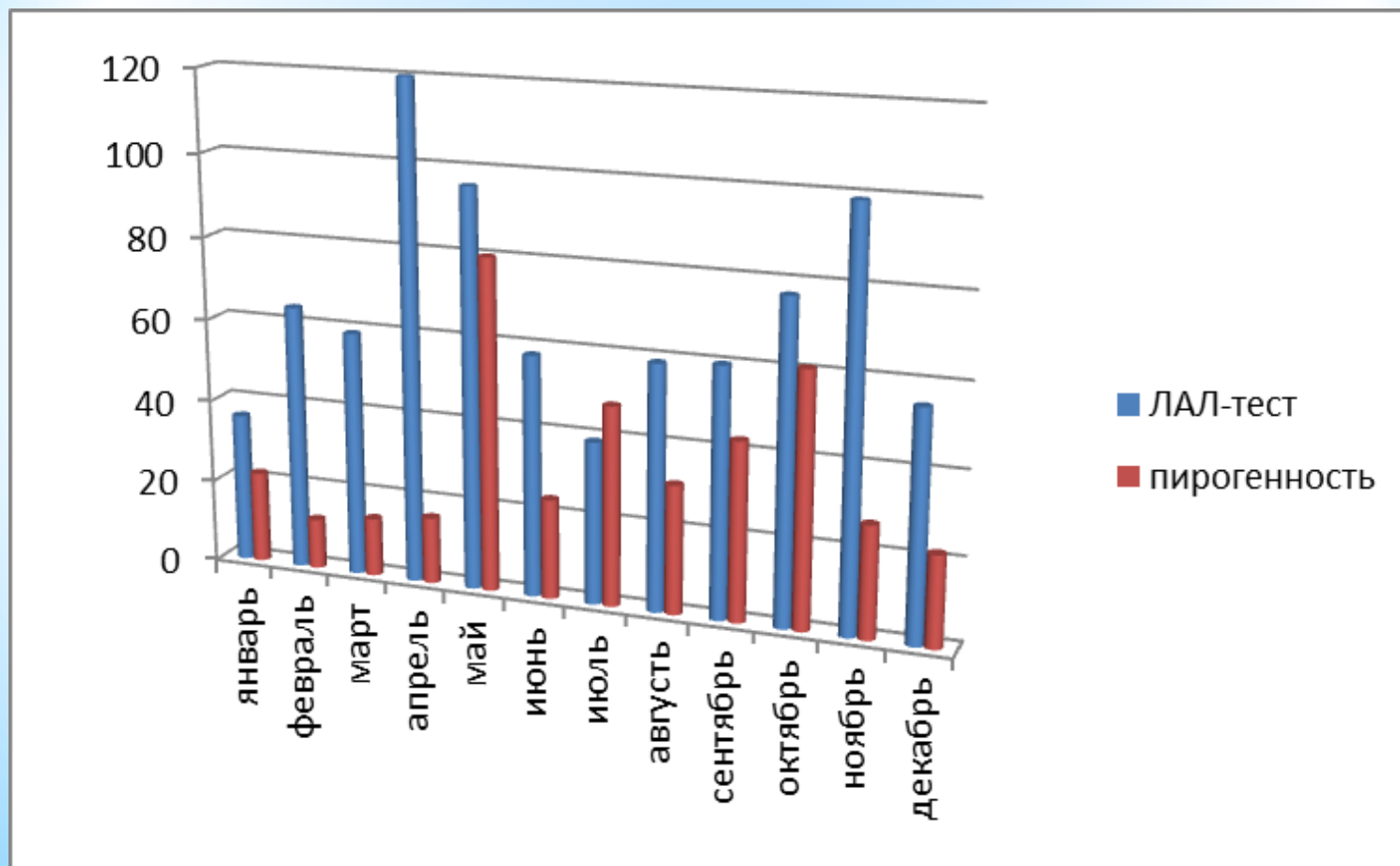
Существуют три основных методологических подхода для проведения данного испытания:

- **гель-тромб метод**, основанный на образовании геля;
- **турбидиметрический метод**, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в ЛАЛ-реактиве;
- **хромогенный метод**, основанный на появлении окрашивания после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса.



Раствор	Исходный раствор	Конечная концентрация эндотоксина (КСЭ) в испытуемом растворе	Количество повторностей
A	Испытуемое лекарственное средство	—	2
B	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	2λ	2
C	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией 2λ	2λ	2
D	Вода для ЛАЛ-теста	—	2

Количество испытаний лекарственных средств на наличие бактериальных эндотоксинов



Основные лекарственные средства, поступающие на испытания «бактериальные эндотоксины»

