

КОНТРОЛЬ ПРЕПАРАТОВ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА НА СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

А.Л. Бузюк, магистрант, В.Н. Лихтар, 5 курс
Научный руководитель – А.В. Шашко, к.с.-х.н., доцент
Полесский государственный университет

Актуальность. Проблема инфекционной безопасности компонентов крови является одной из приоритетных в Республике Беларусь. Главная и первостепенная задача производителей препаратов альбумина человека состоит в том, чтобы обеспечить максимальное отсутствие побочных реакций, среди которых пирогенные занимают лидирующее место по частоте и тяжести [1].

Альбумин может связываться с эндотоксинами, делая их при этом недоступными для определения с помощью ЛАЛ-теста. В связи с тем, что данное связывание носит обратимый характер, содержание бактериальных эндотоксинов в препаратах альбумина человека при хранении может повышаться, что несёт очевидную угрозу здоровью и жизни пациентов. В связи с этим препараты альбумина человека при выпуске необходимо подвергать двойному контролю на содержание бактериальных эндотоксинов и пирогенов. Это позволит снизить риск повышения бактериальных эндотоксинов во время хранения [2,3].

Таким образом, целью работы являлась оценка контроля качества лекарственных средств на пирогенность и содержание бактериальных эндотоксинов раствора для инфузий «Альбумин» различными методами.

Материалы и методы. Промежуточная и готовая продукция раствора альбумина человека испытывалась на пирогенность согласно методу Государственной фармакопеи РБ с использованием кроликов как тест-систем. Количество кроликов для каждой серии – 3 особи, при повторном испытании – 5 особей. Тест - доза – 3,0 мл на 1 кг массы кролика. Срок наблюдения – 3 часа, при повторном испытании – 5 часов (замер t каждые 60 мин). Помимо этого, проводились испытания тех же серий альбумина на аномальную токсичность. Серии, не прошедшие испытание на пироген, проверяли на количественное содержание эндотоксинов/пирогенов с помощью ЛАЛ-теста геллотромб методом. Для испытаний были отобраны 8 серий раствора альбумина человека.

Результаты и их обсуждение. Раствор лекарственного средства считается непирогенным, если сумма повышений температуры у трёх кроликов меньше или равна $1,4\text{ }^{\circ}\text{C}$; если эта сумма превышает $2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, то раствор считают пирогенным. В случаях, когда сумма повышений температуры находится в пределах от $1,5$ до $2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, испытание проводят дополнительно на пяти кроликах. Если сумма повышения температуры у восьми кроликов не превышает $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствор считают непирогенным, если же сумма равна или больше $3,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствор лекарственного средства считают пирогенным [4]. Результаты контроля готовой продукции раствора альбумина человека с разной концентрацией на пирогенность представлены в таблице 1.

Исходя из полученных данных контроль на пирогенность прошли 6 из 8 серий. Максимальное суммарное повышение температуры у трех кроликов составило $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (серия № 531119), при среднем значении $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Также у образца №3 (серия № 520822) было отмечено понижение температуры кроликов на $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Это указывает на то, что 6 серий раствора лекарственного средства «Альбумин» являются непирогенными.

Однако, у двух серий (№ 671022 и 681122) были отмечены суммы повышений температуры $1,5$ и $1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно (таблица 2).

В данном случае было проведено повторное испытание на пяти кроликах. При повторном испытании суммарное повышение температуры составило $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (серия № 671022) и $2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (серия № 681122). Так как сумма повышения температуры у восьми кроликов превысила $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($4,0$ и $4,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно), раствор альбумина данных серий следует считать пирогенным.

Таблица 1. – Контроль на пирогенность готового раствора альбумина

№ п/п	Наименование образца	Отклонение температур	ΣΔ, °С
1	Альбумин, раствор для инфузий 200 мг/мл (№ 520822)	У образца №3 наблюдается понижение t на 0,1 °С	0 0 -0,1 (0)
2	Альбумин, раствор для инфузий 100 мг/мл (№ 540822)	Суммарное повышение t составляет 0,3 °С	+0,1 +0,1 +0,1
3	Альбумин, раствор для инфузий 200 мг/мл (№ 550922)	Суммарное повышение t составляет 0,3 °С	+0,1 +0,1 +0,1
4	Альбумин, раствор для инфузий 200 мг/мл (№ 531119)	Суммарное повышение t составляет 0,5 °С	+0,2 +0,1 +0,2
5	Альбумин, раствор для инфузий 200 мг/мл (№ 630921)	Суммарное повышение t составляет 0,4 °С	+0,2 +0,1 +0,1
6	Альбумин, раствор для инфузий 200 мг/мл (№ 630921)	Суммарное повышение t составляет 0,3 °С	+0,2 0 +0,1

Таблица 2. – Повторный контроль на пирогенность готового раствора альбумина

№ п/п	Наименование образца	Отклонение температур	ΣΔ, °С
1	Серия №671022	Суммарное повышение t составляет 1,5 °С	+0,4 / +0,5 / +0,6
2	Повторное испытание серии №671022	Суммарное повышение t составляет 2,5 °С	+0,4 / +0,4 / +0,6 / +0,6 / +0,5
3	Серия №681122	Суммарное повышение t составляет 1,8 °С	+0,4 / +0,7 / +0,7
4	Повторное испытание серии №681122	Суммарное повышение t составляет 2,4 °С	+0,5 / +0,4 / +0,4 / +0,6 / +0,5

Также все серии прошли контроль на аномальную токсичность с использованием белых мышей. Образцы из серий № 671022 и № 681122 проверяли на эндотоксины гелем-тромб-тестом, в котором результаты оцениваются визуально по образованию устойчивого геля. Для его проведения смешивают равные количества ЛАЛ-реактива 0,03 ЕЭ/мл и испытуемого препарата, затем реакционные смеси инкубируют 60 мин при температуре 37 °С. Если в результате реакции получается твёрдый гель, то результат называется положительным и означает, что концентрация эндотоксина равна или более чувствительности ЛАЛ-реактива [4]. Для определения концентрации эндотоксина препарат последовательно разводят водой (таблица 3).

Таблица 3. – Результаты количественного определения эндотоксинов

Разведения испытуемого препарата	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Серия 671022	+	+	+	+	-	-	-
Серия 681122	+	+	+	+	-	-	-

Результаты показывают, что в исходном растворе концентрация эндотоксина была больше чувствительности ЛАЛ-реактива, а в разведении 1/8 она стала равна чувствительности ЛАЛ-реактива. Следовательно, в исходном растворе концентрация эндотоксина в 8 раз больше чувствительности ЛАЛ-реактива.

Таким образом, для повышения безопасности и конкурентоспособности отечественных препаратов альбумина человека производителям и контролирующим органам необходимо проводить двойной контроль препаратов на пирогены/эндотоксины, а именно осуществлять параллельный контроль пирогенности (*in vivo*) биологическим тестом на кроликах и контроль на бактериальные эндотоксины (*in vitro*) количественным ЛАЛ-тестом, с использованием специальной пробоподготовки, способствующей переводу связанной формы эндотоксинов в свободную.

Список использованных источников

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs // Biological Products and Medical Devices. U.S. FDA. December 1987/June 2011. (Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation / Ed. By K.L. Williams. – Boca Raton: CRC Press, 2007. 440 p.
2. M.E. Dawson. Interference with the LAL test and how to address it. Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole Massachusetts // LAL Update. 2005 V. 22(3). P. 1–6.
3. Improved endotoxin detection in protein/peptide and antibody samples using EndoPrep™. EndoPrep™ Application notes – Rev 1 09-11-08 // BioDtech. 2008. P. 1-10.
4. А.Г. Ситников, Л.А. Травина, В.А. Багирова. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. – М. 1997. 96 с.