

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.В. Шаповалова*, **Н.П. Неугодова**, кандидат биологических наук,
М.С. Рябцева, кандидат биологических наук, **А.А. Агаширинова**,
О.В. Гунар, доктор фармацевтических наук

Испытательный центр экспертизы качества лекарственных средств

Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ;
Российская Федерация, 119002, Москва, Сивцев Вражек пер., д. 41

Появилось много инновационных разработок, которые способны сократить число экспериментов на животных путем внедрения методов альтернативных биологическим. Под выражением «альтернативные» подразумевается, что исследование на животных заменяется в каждом случае подходящим для данного эксперимента специфичным методом *ex vivo*. Предложенные тесты «Пирогенность» и «ЛАЛ-тест» являются однонаправленными, так как определяют пирогенные примеси, но ввиду различий в чувствительности и специфичности они не могут быть признаны альтернативными. В Государственной фармакопее РФ XIII издания (ГФ XIII) наряду с гель-тромб-тестом введены инструментальные методы. Предусмотрено 6 модификаций метода определения бактериальных эндотоксинов с включением фотометрических методов – турбидиметрических и хромогенных. В последние годы для оценки наличия пирогенности разработан тест активации моноцитов (МАТ), который сочетает в себе достоинства обеих «традиционных» тест-систем и даже превосходит их по некоторым позициям. Но он тоже имеет ряд методических ограничений. Увеличение числа доступных методов расширяет не только спектр лекарственных средств, которые могут быть протестированы, но и спектр пирогенов, которые могут быть детектированы.

Ключевые слова: альтернативные методы, гистамин, пирогенность, ЛАЛ-тест, моноциты.

E-mail: shapovalova@expmed.ru

Испытания с участием животных, возможно, – один из самых спорных вопросов современной науки. Сторонники исследований на животных указывают на огромный прогресс в медицине, который стал возможен благодаря подобным экспериментам, а противники считают их жестокими и бессмысленными, поскольку результаты испытаний далеко не всегда применимы к человеку. Вместе с тем появилось много инновационных разработок, которые способны сократить число экспериментов на животных путем внедрения методов альтернативных биологическим [1].

Альтернативные биологические тесты – это методы, которые позволяют избежать или сократить использование живых организмов (экспериментальных животных). Основоположниками альтернативного моделирования считают Уильяма Расселла и Рекса Берча, выступающих за более гуманный подход к использованию животных в научных исследованиях. В 1959 г. они разработали правило «Трех R», включающее следующие постулаты: 1) refinement – ограничить использование животных; 2) reduction – оптимизировать эксперименты с целью минимизировать страдания животных; 3) replacement – отказать от тех испытаний, которые можно заменить

альтернативными методиками [2]. А чуть позже была сформулирована основная концепция альтернативного моделирования: альтернативный метод частично исключает эксперимент на животных и/или требует дополнительной альтернативной методики без животных; существует серия методов, выполненных в одно и то же время или в тесной связи друг с другом, для получения информации в рамках дополнительного многофакторного эксперимента; выбор каждого теста определяется достоверными результатами предыдущего уровня исследований, но построение осуществляется в виде последовательного процесса, состоящего из серии тестов [3].

На сегодняшний день «альтернативным» методом считается такая ситуация, когда исследование на животных заменяется в каждом случае подходящим для данного эксперимента специфичным методом *ex vivo*. В то же время в научных кругах идея «альтернативности» часто употребляется применительно к методам, которые не заменяют опыты на животных, а лишь сокращают их количество или усовершенствуют сам эксперимент [4].

В рамках фармакопейных методик 1-й опыт замены животных, обитающих в природной среде, на лабораторных был предпринят в конце 70-х годов XX века [5]. Тогда в качестве 1-го этапа при определении гистаминоподобных примесей в препаратах живот-

ного или микробиологического происхождения вместо экспериментов на кошке было предложено использовать изолированный орган – подвздошную кишку морской свинки. Испытание основывалось на измерении величины сокращения кишки после воздействия испытуемого препарата по сравнению с реакцией на стандарт гистамина. В случае превышения установленного уровня содержания гистамина эксперимент выполняли на кошке. В России данный метод был впервые введен, согласно требованиям ГФ XII издания [6].

2-м примером, подтверждающим приемлемость концепции «3R» для контроля качества лекарственных средств (ЛС), является успех, достигнутый при разработке альтернативных методов определения примесей, оказывающих пирогенное действие. Для исключения риска возникновения лихорадочного состояния у пациентов после парентерального введения ЛС, начиная с 1942 г. и по настоящее время, наличие пирогенных примесей определяют в испытаниях на кроликах [7]. Несмотря на неоспоримые достоинства метода *in vivo*, он имеет также недостатки: следует учитывать индивидуальную чувствительность и эмоциональность лабораторного животного, биоэтические и финансовые проблемы, существенные различия в реакции человека и кролика на пирогены [8–10]. Кроме того, многие препараты (средства для наркоза, седативные препараты, миорелаксанты, радиоактивные препараты, препараты, маскирующие пирогенный эффект или напротив вызывающие его, и т.п.) невозможно испытывать на животных из-за их фармакологического действия. Значительную группу фармакологических средств невозможно вводить животным внутривенно из-за их физико-химических свойств (нерастворимость в воде, вязкость, масляные растворы и т. п.), что также затрудняет контроль ЛС в испытании «Пирогенность».

В настоящее время накоплен достаточный объем информации о природе пирогенной реакции, вследствие чего удалось установить, что основной вклад в загрязнение ЛС вносят бактериальные эндотоксины, содержащиеся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий. В 1956 г. американские ученые Ф.Б. Банг и Дж. Левин положили начало ЛАЛ-тесту, с помощью которого выявили внутрисосудистое свертывание крови мечехвостов под воздействием не только живых, но и мертвых микроорганизмов [11]. Длительное изучение данного феномена позволило в конце 70-х годов XX века постепенно заменять испытания на животных тестом *in vitro*. Данный метод как альтернатива испытанию пирогенности на кроликах впервые введен в 1980 г. в Фармакопею США, XX издания («Bacterial Endotoxins Test») [12].

В России определение бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста сначала считали альтернативным определению на кроликах. В 1997 г. была

введена ВФС 42-2960-97 «Определение содержания бактериальных эндотоксинов», а в 1999 г. – ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины». В статье описан только метод «гель-тромб-тест» с использованием реактива лизата амебоцитов крови мечехвоста *Limulus polyphemus* [13, 14]. Результат реакции бактериальных эндотоксинов с ЛАЛ-реактивом оценивается визуально по образованию плотного геля, который остается на дне пробирки после ее переворачивания на 180°. Минимальная концентрация эндотоксина, определяемая в тесте, зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива. Предел обнаружения обычно составляет около 0,03 ЕЭ/мл (единиц эндотоксина в 1 мл) для гель-тромб теста, а наиболее чувствительные инструментальные модификации теста позволяют обнаруживать до 0,005 ЕЭ/мл.

В ГФ РФ XIII наряду с гель-тромб тестом введены инструментальные методы. Предусмотрено 6 модификаций метода определения бактериальных эндотоксинов с включением фотометрических методов – турбидиметрических и хромогенных [15]. Турбидиметрический тест основан на помутнении реакционной смеси после перехода коагулогена, содержащегося в ЛАЛ-реактиве, в коагулин-гель; хромогенный – на появлении окрашивания – после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса, где коагулоген заменен на искусственный хромогенный субстрат. Хромогенный субстрат представляет собой простой полипептид с хромофором на конце [16].

Анализ на ЛАЛ-тест может быть выполнен только в водных растворах, которые составляют подавляющее большинство ЛС. С помощью данного метода не могут быть протестированы препараты, влияющие на систему свертывания крови, вызывающие ингибирование реакции ЛАЛ-реактива, из-за связывания двухвалентных катионов (этилендиаминтетрауксусная кислота, цитрат, ингибиторы протеаз) или потенцирования из-за высокого содержания белка или протеазы [17]. Проблемы возникают при работе с диализными жидкостями, липосомами, наночастицами и препаратами клеточной терапии. Кроме того, для испытания твердых материалов (например, медицинских приборов), имеются значительные трудности, так как могут быть проверены только смывы или промывочные растворы. Также в испытаниях с помощью ЛАЛ-теста иммуностимулирующих компонентов из грамположительных бактерий, липопротеинов, пептидогликанов и липотейхоевых кислот могут быть получены ложноотрицательные результаты, которые могут привести к серьезным клиническим последствиям для человека [17].

Преимуществами ЛАЛ-теста по сравнению с определением пирогенности *in vivo* являются: возможность полуколичественной или количественной оценки содержания бактериальных эндотоксинов в ЛС, отсутствие необходимости использования подо-

пытных животных, надежность и быстрота исполнения, а также его высокая чувствительность и экономическая выгода.

Таким образом, тесты «Пирогенность» и «ЛАЛ-тест» являются однонаправленными, так как определяют пирогенные примеси, но ввиду различий в чувствительности и специфичности они не могут быть признаны альтернативными.

В последние годы разработан еще один метод, позволяющий оценить наличие пирогенности – тест активации моноцитов (МАТ), который сочетает в себе достоинства обеих «традиционных» тест-систем и даже превосходит их по некоторым позициям (см. таблицу). Анализ используется для обнаружения или количественного определения веществ, активирующих человеческие моноциты с выделением эндогенных медиаторов – провоспалительных цитокинов, например фактора некроза опухолей α (TNF α), интерлейкина-1 β (IL-1 β) и интерлейкина-6 (IL-6), вызывающих лихорадочное состояние [10]. Выделенные цитокины обнаруживают иммунологическими методами (EIA, ELISA) [18]. Метод включен в Европейскую фармакопею [19, 20], а также нашел признание в Японии, Бразилии и на Кубе.

В испытании на модели моноцитов человека из разных источников (цельной крови человека, мононуклеарных клеток периферической крови человека, моноцитарных клеточных линий человеческого происхождения) *in vitro* имитируется реакция человеческого организма при взаимодействии с пирогеном [18]. Для стандартизации моноцитарных клеток из разных источников их калибруют по стандарту эндотоксина (грамотрицательные микроорганизмы) и стандарту липотейхоевой кислоты (грамположительные микроорганизмы) путем построения кривых «доза–отклик» при различных разбавлениях стандартов. Обладая преимуществами ЛАЛ-теста, МАТ дополнительно оценивает эффективность различных видов эндотоксинов и отражает воспалительную активность образца для организма человека. Преимущество этого метода перед другими – возможность

анализировать такие ЛС, как препараты крови, вакцины, липидные парентеральные препараты [17]. В настоящее время МАТ может считаться методом, альтернативным испытанию на «Пирогенность».

Однако, несмотря на определенные преимущества МАТ, его также нельзя назвать универсальным, поскольку и он имеет ряд методических ограничений: испытание выполняется на клетках, поэтому для получения надежного результата необходимо выполнение нескольких повторностей и контролей; чувствительность (0,04 ЕЭ/мл) ниже, чем в ЛАЛ-тесте; работа с цельной кровью человека (потенциальный источник ВИЧ, гепатитов) подразумевает наличие доноров крови. Учитывая даже значительный аналитический потенциал МАТ по сравнению с имеющимися методами контроля качества, все же потребуются время, чтобы ввести данный тест в существующую систему испытаний пирогенных загрязнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с внедрением принципов «3R» в фармакопейные методы, введение «Теста активации моноцитов» в отечественную фармакопею не только позволит сократить число лабораторных животных, но также увеличит потенциал и обеспечит надежность методической базы Фармакопеи. Как показали испытания на пирогенные примеси, из 3 вышеописанных тестов наиболее доступным и распространенным в России и мире в настоящее время оказался ЛАЛ-тест, определяющий бактериальные эндотоксины. Увеличение количества доступных методов расширяет не только спектр ЛС, которые могут быть протестированы, но и спектр пирогенов, которые могут быть детектированы, что обеспечит безопасность инъекционных ЛС практически со 100% вероятностью.

Внедрение прогрессивных альтернативных методов позволит значительно повысить надежность контроля качества ЛС, так как указанные методы имеют преимущества в точности, воспроизводимости и возможности количественной оценки по сравнению с экспериментами на животных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРОГЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ

| Характеристика | Пирогенность <i>in vivo</i> | ЛАЛ-тест <i>in vitro</i> | МАТ <i>in vitro</i> |
|--------------------|---|--|---|
| Система испытания | Кролики | Лизат амебоцита (реактив из крови мечехвоста) | Человеческая кровь или линии клеток (моноциты) |
| Тип испытания | Качественное определение | Качественное определение, количественное определение | Качественное определение, количественное определение |
| Специфичность | Определяет все виды пирогенных примесей | Определяет эндотоксины | Определяет все виды пирогенных примесей |
| Предел обнаружения | 5 ЕЭ/кг | 0,005 ЕЭ/мл | 0,04 ЕЭ/мл |
| Применение | Фармацевтические продукты, биологические продукты, медицинское оборудование (смывы) | Фармацевтические продукты, биологические продукты (ограниченное количество наименований), медицинское оборудование (смывы) | Фармацевтические продукты, биологические продукты, медицинское оборудование (поверхность/смывы) |

ЛИТЕРАТУРА

1. Кацнельсон А. Можно ли обойтись без опытов на животных? BBC Future (Электронный ресурс). Режим доступа: http://www.bbc.com/russian/science/2015/03/150317_vert_fut_will_we_ever_end_animal_testing.
2. Russell W.M.S., Burch R.L. (1959). The principles of humane experimental technique. London: Methuen, reprinted 1992; 238.
3. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010; 241.
4. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии. М: Биомедицина, 2006; 1 (4): 5–23.
5. European pharmacopoeia 2, 1980.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд., OFS 42-0063-07.
7. United States Pharmacopoeia, 12-th., 1942.
8. Рябцева М.С., Батуашвили Т.А., Сапожникова Г.А., Неугодова Н.П., Олефир Ю.В., Меркулов В.А. История развития и современное состояние биологических тестов в России. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2016; 1: 11–4.
9. Крылов Ю.Ф., Кивман Г.Я. Биологический контроль безопасности лекарственных средств. М.: Медицина; 1985.
10. Багирова В.Л., Митькин О.Д., Митькина Л.И. Тест на активацию моноцитов как альтернатива тесту «Пирогенность» на кроликах. Фармация, 2010; 7: 40–2.
11. Levin J., Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp., 1964; 115: 265–74.
12. United States Pharmacopoeia, 20-th; 1980.
13. OFS 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины».
14. Государственная фармакопея РФ XII изд., 2008. OFS 42-0062-07.
15. Государственная фармакопея РФ XIII изд., 2016. OFS 1.2.4.0006.15.
16. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М.:1997; 19–26.
17. Hasiwa N., Daneshian M., Bruegger P., Fennrich S. et al. Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. ALTEX 30: 2013; 2: 169–208.
18. Apparao Potu, Shashidher Burra, Ajay Kumar Patil. Monocyte activation test: a new pharmacoepial quality control test for pyrogens. Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences, 2011;1 (1): 123–31.
19. European pharmacopoeia 8, 2014.
20. European pharmacopoeia 9, 2016.

Поступила 12 октября 2016 г.

ALTERNATIVE BIOLOGICAL METHODS FOR ASSESSING THE QUALITY OF MEDICINES

O.V. Shapovalova; N.P. Neugodova, PhD; M.S. Ryabtseva, PhD; A.A. Agashirinova; O.V. Gunar, PhD

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 41, Sivtsev Vrazhek Lane, Moscow 119002, Russian Federation

SUMMARY

There are many innovations that are able to reduce the number of animal experiments through the introduction of methods alternative to biological ones. The term «alternative ones» implies that the animal study is replaced in each case suitable for this experiment by a specific ex vivo test. The proposed tests (pyrogenicity test and LAL test) are unidirectional, for they identify pyrogenic impurities, but because of differences in sensitivity and specificity, they cannot be recognized as alternatives. Along with the gel-clot test, instrumental methods are introduced into the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition. Six modifications of the method for identifying bacterial endotoxins were provided, by including turbidimetric and chromogenic photometric techniques. A monocyte activation test that combines the advantages of both traditional test systems and even outperforms them in some positions has been recently devised to assess pyrogenicity. But it also has a number of methodological limitations. The increase in the number of available methods not only expands the range of drugs that can be tested, but also the range of pyrogens that can be detected.

Key words: alternative methods, histamine, pyrogenicity, LAL test, monocytes.

REFERENCES

1. Katznelson A.. Can we do without animal experiments? BBC Future (electronic resource) - Access mode: http://www.bbc.com/russian/science/2015/03/150317_vert_fut_will_we_ever_end_animal_testing.
2. Russell W.M.S., Burch R.L. (1959). The principles of humane experimental technique. London: Methuen, reprinted 1992; 238.
3. Karkischenko N.N., Gracheva S.V. Manual for laboratory animals and alternative models in biomedical research. Moscow: Profile-2C, 2010; 241 (in Russian)
4. Karkischenko N.N. Classical and alternative models of drug toxicology. Moscow: Biomedicine, 2006; 1 (4): 5–23 (in Russian).
5. European pharmacopoeia 2, 1980.
6. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XII-ed., OFS 42-0063-07 (in Russian).
7. United States Pharmacopoeia, 12-th, 1942.
8. Ryabtseva M.S., Batuvashvili T.A., Sapozhnikova G.A., Neugodova N.P., Olefir J.V., Merkulov V.A. History of development and current state of biological tests in Russia. Vedomosti Nauchnogo Centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2016; 1: 11–4 (in Russian).
9. Krylov Y.F., Kivman G.Y. Biological control of drug safety. Moscow: Medicine, 1985 (in Russian).
10. Bagirova V.L., Mitkin O.D., Mitkina L.I. Test activation of monocytes as an alternative to the test «Pyrogenicity» on rabbits. Farmatsiya, 2010; 7: 40–2 (in Russian).
11. Levin J., Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp., 1964; 115: 265–74.
12. United States Pharmacopoeia, 20-th, 1980.
13. OFS 42-0002-00 «Bacterial endotoxins» (in Russian).
14. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XII-ed., 2008. OFS 42-0062-07 (in Russian).
15. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII-ed., 2016. OFS 1.2.4.0006.15 (in Russian).
16. Sitynikov A.G., Travina L.A., Bagirova V.L. LAL test. Modern approaches to the determination of pyrogenicity. Moscow: 1997; 19–26 (in Russian).
17. Hasiwa N., Daneshian M., Bruegger P., Fennrich S. et al. Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. ALTEX 30: 2013; 2: 169–208.
18. Apparao Potu, Shashidher Burra, Ajay Kumar Patil. Monocyte activation test: a new pharmacoepial quality control test for pyrogens. Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences, 2011;1 (1): 123–31.
19. European pharmacopoeia 8, 2014.
20. European pharmacopoeia 9, 2016.