

Влияние параметра «скорость введения» при выполнении теста «Испытание на токсичность»

Н. П. НЕУГОДОВА¹, Г. В. ДОЛГОВА², Т. Я. ПОМЕРАНЦЕВА²,
М. Н. ХАЙРЕТДИНОВА², Г. А. САПОЖНИКОВА¹

¹ Институт стандартизации и контроля лекарственных средств НЦ ЭСМП, Москва

² Государственный научный центр по антибиотикам, Москва

Impact of Administration Rate Parameter in Toxicity Test

N. P. NEUGODOVA, G. V. DOLGOVA, T. YA. POMERANTSEVA,
M. N. KHAIRETDINOVA, G. A. SAPOZHNIKOVA

Institute of Standardization and Control of Drugs, Scientific Centre for Investigation of Medicinal Products, Moscow
National Research Centre of Antibiotics, Moscow

Показатель «Токсичность» выполняют *in vivo* в экспериментах на белых мышах и используют в рутинном контроле качества серийной продукции препаратов биологического происхождения и, в первую очередь, антибиотиков. Для эффективного контроля качества с помощью данного показателя условия его проведения должны быть жестко стандартизованы, включая массу животных и условия их содержания. Основными же факторами, определяющими выявление аномальной токсичности препаратов, являются величина тест-дозы, вводимой животному, и скорость, с которой осуществляется внутривенное введение. Эти два параметра тесно связаны между собой и имеют обратную зависимость. Правильный выбор тест-дозы и скорости внутривенного введения препарата обеспечивает получение достоверных результатов испытания, которые позволяют оценить безопасность исследуемого препарата.

В Общей фармакопейной статье (ОФС) «Испытание на токсичность» Государственной фармакопеи (ГФ XI) [1] указано, что испытуемые растворы препаратов должны вводиться внутривенно со скоростью 0,1 мл в 1 секунду или весь объем 0,5 мл, как правило, за 5 секунд.

В Европейской Фармакопее [2] в статье «Аномальная токсичность» предлагается более медленное введение препарата в таком же объеме, но в течение 15–30 секунд. Данное указание неконкретно. Препарат, введенный внутривенно в одной и той же дозе, но с различной скоростью — 0,1 мл за 3 сек или за 6 сек, может оказать на организм животного эффекты, отличающиеся по интенсивности и соответственно привести к неоднозначным результатам испытаний.

На протяжении более 50 лет в России испытания антибиотиков на токсичность проводят при введении со скоростью 0,1 мл/сек. Тест-дозы для

большинства антибиотиков подобраны с учетом именно этой величины.

В данной работе на примере образцов антибиотика цефепим, изготовленного двумя производителями, было экспериментально продемонстрирована взаимосвязь величины тест-дозы и скорости введения испытуемых растворов препарата при оценке острой токсичности.

Материал и методы

В сравнительном исследовании изучали острую токсичность антибиотика цефалоспоринового ряда — цефепим на образцах препарата «Максипим» производства «Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.» и дженерика — препарата «Максифеф» производства ООО «АБОЛмед» (Россия). Обе лекарственные формы представляют собой порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения. Кроме активного вещества цефепима в состав препаратов входит вспомогательное вещество L-аргинин, причем доля его составляет 30–40% от общего количества.

Белых мышей получали из ГУ НЦ «Биомедицинские Технологии» РАМН, филиал питомника «Андреевка». Животных содержали в виварии согласно санитарным правилам на стандартном рационе.

Подготовку к опыту белых мышей с массой тела 19–21 г осуществляли в соответствии с указаниями ОФС «Испытание на токсичность» ГФ XI. Перед опытом мышей лишали корма и воды. Через два часа животных взвешивали и рандомизировали по группам.

Непосредственно перед введением исследуемые образцы растворяли. При растворении учитывали увеличение объема исходного раствора за счет насыпного объема препарата во флаконе. Для этого во флакон с 1 г цефепима добавляли 8 мл воды для инъекций. Полученный раствор переносили в мерную колбу или цилиндр и доводили объем раствора до 10 мл, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 100 мг цефепима в 1 мл. Затем готовили рабочий раствор так, чтобы испытуемая доза содержалась в 0,5 мл раствора, который вводили в хвостовую вену животных с различной скоростью — 0,1 мл за 1 сек; 0,1 мл за 6 сек и 0,1 мл за 12 сек. Соответственно время введения составляло 5 сек, 30 сек и 60 сек. Каждое испытание проводили на пяти животных, за состоянием которых наблюдали на протяжении 48 ч.

По результатам экспериментов рассчитывали показатели острой токсичности по методу Беренса-Кербера в модификации Ван дер Вардена: величину средней смертельной дозы ЛД₅₀, а также ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₈₄ с использованием соответствующей компьютерной программы «Dozeff» [3, 4].

© Коллектив авторов, 2008

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а, ГНЦА

Таблица 1. Показатели острой токсичности препарата «Максипим» в зависимости от скорости введения испытуемых растворов

№ опыта	Частота* гибели белых мышей после внутривенного введения препарата в дозах (мг/мышь):								Расчётные показатели (мг/мышь)
	20	25	30	35	40	45	50	55	
Скорость введения испытуемого раствора 0,5 мл/5 сек									
1	0/5	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5	—	—	ЛД ₁₀ =27,5
2	0/5	0/5	1/5	2/5	4/5	5/5	—	—	ЛД ₁₆ =28,9
3	0/5	0/5	1/5	2/5	4/5	5/5	—	—	ЛД ₈₄ =39,3
Итого	0/15	0/15	4/15	8/15	13/15	15/15	—	—	ЛД ₅₀ =34,2 (31,9÷36,4)
Скорость введения испытуемого раствора 0,5 мл/30 сек									
1	—	—	0/5	0/5	2/5	3/5	4/5	5/5	ЛД ₁₀ =36,5
2	—	—	0/5	0/5	2/5	3/5	5/5	5/5	ЛД ₁₆ =37,9
3	—	—	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	5/5	ЛД ₈₄ =47,9
Итого	—	—	0/15	0/15	5/15	10/15	14/15	15/15	ЛД ₅₀ =42,9 (40,3÷45,5)

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — число погибших животных / число мышей, взятых в опыт.

Таблица 2. Результаты испытания острой токсичности препаратов «Максипим» и «Максифеф» в зависимости от скорости введения испытуемого раствора

Препарат	№ опыта	Частота гибели животных* после внутривенного введения препарата в дозе 35 мг в 0,5 мл на мышь в течение:		
		5 секунд	30 секунд	60 секунд
		«Максифеф» ООО «АБОЛмед»	1	4/5
	2	3/5	0/5	0/5
	3	3/5	1/5	0/5
«Максипим» «Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.»	1	4/5	0/5	0/5
	2	2/5	0/5	0/5
	3	2/5	0/5	0/5

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, внутривенное введение препарата «Максипим» в диапазоне доз от 20 до 55 мг/мышь, в зависимости от скорости введения испытуемых растворов, вызывает токсические эффекты разной интенсивности, приводящие к гибели животных. Так, после введения испытуемого раствора препарата в дозе 35 мг в течение 5 секунд погибает 83% животных от общего числа особей, взятых в опыт.

После введения этого же раствора в той же дозе, но в течение 30 секунд, все мыши остаются живы.

Сравнительный статистический анализ показателей острой токсичности препарата «Максипим», рассчитанных по результатам экспериментов, в которых использовали разные скорости введения испытуемых доз, подтвердил достоверность различий при $p < 0,05$ (табл. 1).

Для контроля качества антибиотика цефепим в трёх нормативных документах предлагается использовать тест-дозу 35 мг/мышь при введении в течение 5 секунд в соответствии с требованиями ГФ XI.

Такая норма указана для субстанции «Цефепим стерильный» фирмы «Орхид Кемикалс энд Фармасьютикалс Лтд», Индия (НД 42-13030-04), готовая лекарственная форма «Максипим» фирмы

«Бристоль Майерс Сквибб С.р.Л.», Италия (НД 42-81-64-03) и «Цефепим» ОАО «Биосинтез», Россия (ФСП 42-8028-06). В трёх других документах дано указание о большем времени введения той же тест-дозы — в течение 30 секунд. Это субстанция «Цефепим стерильный» фирмы «Нектар Лайфсайенсиз Лтд.», Индия (НД 42-14831-07) и готовой лекарственной формы «Цефепим-Альпа» фирмы «Купер Фарма», Индия (НД — 42-14584-06), «Максифеф» компании ООО «АБОЛмед» (изменение 1 к ФСП 42-0078501904).

В табл. 2 приведены результаты испытаний двух препаратов «Максифеф» и «Максипим» при внутривенном введении животным их растворов с концентрацией цефепима 70 мг/мл по 0,5 мл/мышь с разной скоростью: в течение 5, 30 и 60 секунд.

Установлено, что результаты, полученные после испытания на токсичность препаратов, с использованием скорости введения 0,1 мл/сек (0,5 мл за 5 сек), дают основание экспериментатору забраковать оба исследованных препарата по показателю «Токсичность».

Проведенное исследование подтвердило, что испытание препаратов цефепима с использованием тест-дозы 35 мг/мышь при скорости 0,1 мл/сек невозможно. Выход из сложившейся ситуации представляется двояким: возможно либо

увеличение продолжительности введения тест-дозы до 30 сек, либо снижение тест-дозы до величины 25 мг/мышь.

Таким образом, в настоящей работе экспериментально показано, что острая токсичность антибиотиков зависит от двух основных параметров — тест-дозы и скорости её внутривенного введения, связанных между собой обратно пропорционально. На конкретном примере продемонстрировано определяющее влияние

скорости введения испытуемых растворов антибиотика цефепима при оценке его острой токсичности и связанный с ней выбор величины тест-дозы для показателя «Токсичность» для включения в нормативную документацию. Для исключения ошибок при выборе тест-дозы необходимо, чтобы скорость её введения составляла 5 секунд (0,1 мл/сек). Эта величина является унифицированной согласно требованиям ОФС ГФ XI (Россия) [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. ОФС «Испытание на токсичность» ГФ XI, 2; 182.
2. European Pharmacopoeia, III ed. 5 ed.
3. *Беленький М. Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига, 1960.
4. *Соловьёв В. Н., Фишман В. М.* Алгоритм расчёта параметров распределения при анализе кривой доза-эффект. Хим фарм журн 1972; 1: 55—60.