

## История развития и современное состояние биологических тестов в России

М. С. Рябцева, Т. А. Батуашвили, Г. А. Сапожникова,  
Н. П. Неугодова, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

*Статья поступила 15.01.2016 г. Принята к печати 09.02.2016 г.*

**Резюме:** Среди общих фармакопейных статей, включенных в действующие издания ведущих фармакопей мира, наиболее проблемными считаются биологические показатели «Пирогенность» и «Аномальная токсичность», целесообразность применения которых очевидна не для всех специалистов. Авторы анализируют причины введения и историю становления биологических методов контроля качества лекарственных средств, а также основные перспективы их дальнейшего развития в Российской Федерации.

**Ключевые слова:** фармакопея; фармакопейная статья; контроль качества лекарственных средств; биологические методы.

**Библиографическое описание:** Рябцева МС, Батуашвили ТА, Сапожникова ГА, Неугодова НП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА. История развития и современное состояние биологических тестов в России. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (1): 11–14.

Для специалистов фармацевтической области очевидно, что важнейшим документом фарминдустрии является национальная фармакопея. Вне зависимости от национальной принадлежности всегда остается неизменной цель этого документа – унификация требований, предъявляемых к качеству лекарственных средств (ЛС). Среди общих фармакопейных статей, включенных в действующие издания ведущих фармакопей мира, наиболее проблемными по праву считаются биологические показатели «Пирогенность» и «Аномальная токсичность», целесообразность применения которых на сегодняшний день очевидна не для всех специалистов. Цель данной статьи – осветить причины введения и историю становления биологических тестов, а также основные перспективы их дальнейшего развития в России.

Впервые в СССР официальные биологические методы контроля качества ЛС введены в Государственную фармакопею (ГФ) СССР IX изд. (1961 г.) [1]. Поскольку первые биологические методы ГФ были разработаны на основе Фармакопеи США (USP) и Международной фармакопеи (МФ), историю развития этих тестов нельзя рассматривать в отрыве от становления данных тестов в США и Европе, где начало XX века характеризовалось активным развитием фармацевтической промышленности. В этот период синтезировалось огромное количество новых фармацевтических субстанций и химических соединений, однако оценка их безопасности не была закреплена законодательно. Это приводило к регулярным отравлениям и возникновению скандалов вокруг подобных инцидентов, самыми значимыми среди которых можно назвать: применение героина как успокоительного средства при кашле (1898–1924 гг.), «сульфаниламидная» трагедия (1937–1938 гг.), применение двуокиси тория, альфа-активного радионуклида, в качестве рентгеноконтрастного вещества (1928–1960 гг.); «талидомидная» катастрофа (1957–1964 гг.). С каждым подобным скандалом со стороны населения росло недоверие к фармацевтиче-

ской промышленности, в результате чего активизировалась разработка подходов к оценке безопасности ЛС, в том числе с использованием лабораторных животных (мыши и крысы).

В этот период методическая и нормативно-правовая база в области фармации формировалась по прецедентному принципу, поэтому именно возникающие побочные эффекты от применения новых классов лекарственных препаратов (ЛП) определяли направление разработки соответствующих биологических методов [2, 3].

С появлением инъекционных ЛП было установлено такое явление как «инъекционный жар» – развитие у пациента лихорадки в ответ на инъекцию лекарства. В 1911 г. W. Wechselman показал, что причина «инъекционного жара» – бактерии, которые находятся в воде, используемой для приготовления инъекционных растворов. В том же году E. S. Hort и W. J. Penfold доказали, что раствор может быть стерильным, но при этом вызывать пирогенную реакцию. Годом позже они же опубликовали результаты исследований «Микроорганизмы и их влияние на возникновение жара», из которых следовало, что подобная реакция ассоциируется с экзогенными пирогенами, образующимися в основном из грамотрицательных бактерий [4].

Первая попытка создать тест, позволяющий выявить наличие в ЛП пирогенных примесей, нашла отражение в Британской фармакопее в 1912 г. Однако исследования эффекта пирогенности на этом не прекратились. К 1923 г. F. V. Seibert выделил пирогенные вещества, установил их термостабильную природу, а также предложил использование кроликов для оценки пирогенной реакции. L. Rademacher подтвердил правильность его выводов и показал, что стерильность не является гарантией апиогенности, доказав необходимость предотвращения бактериального загрязнения на каждом этапе фармацевтического производства [4]. Однако потребовалось еще 20 лет для того, чтобы Национальный институт здоровья США

и 14 фармпроизводителей ввели тестирование пирогенности. В общепринятом виде тест «Пирогенность» появился в USP в 1942 г. [5].

При разработке теста в качестве тест-объектов для испытаний были исследованы многие виды животных. Уровень чувствительности к пирогенам и характер развития пирогенной реакции позволили выбрать два вида: собаки и кролики. Однако из-за порой агрессивного поведения собак предпочтение было отдано кроликам. К 1944 г. *So Tiu* для кролика была определена минимальная пирогенная доза для пирогенов различной природы [4], что позволило подбирать тест-дозы испытуемых ЛП таким образом, чтобы они обеспечивали отсутствие пирогенной реакции у пациентов при клиническом применении. Началась эпоха теста «Пирогенность». Несмотря на это, из-за индивидуальной чувствительности и эмоциональности животных, кролик часто был ненадежен. А в условиях большого производства требовал значительных финансовых, трудовых и временных затрат. Кроме того, многие препараты невозможно было испытывать на животных из-за их фармакологического действия или физико-химических свойств (нерастворимость в водных растворителях, вязкость и т.п.). Поэтому параллельно шел процесс поиска достойной замены теста на животных (*in vivo*).

К 60-м годам XX века было накоплено достаточно информации относительно природы пирогенной реакции. Доказано, что лихорадку способны вызывать экзогенные и эндогенные вещества различного происхождения. Среди них основной вклад в загрязнение ЛП принадлежит грамотрицательным микроорганизмам, а точнее бактериальным эндотоксинам (БЭ), содержащимся в клеточной стенке. Для выявления БЭ был разработан ЛАЛ-тест. Началом разработки ЛАЛ-теста можно считать совместные работы Ф. Б. Банга и Дж. Левина в шестидесятых годах прошлого века, которые установили способность амебоцитов мечехвоста образовывать плотный гелиевый сгусток при взаимодействии с БЭ, что было положено в основу нового теста.

К началу 70-х годов были отработаны методы получения лизата амебоцитов и способы проведения теста для обнаружения БЭ. С конца 70-х годов началось промышленное производство ЛАЛ-реактивов. В 1983 году ЛАЛ-тест введен в USP XX издания как альтернативный тесту «Пирогенность». Дальнейшее развитие ЛАЛ-теста привело к расширению его возможностей и появлению к 1991 г. дополнительных кинетических методов (колориметрического и турбидиметрического) [6]. В России до начала XXI века показатель БЭ присутствовал в основном в НД на зарубежные препараты. Для отечественных производителей проведение анализа с помощью ЛАЛ-теста стало возможным после введения временной фармакопейной статьи «Определение содержания бактериальных эндотоксинов, ЛАЛ-тест» (ВФС 42-2960–97) в 1997 г. В 2000 г. она была заменена общей фармакопейной статьей «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002–00), а с начала 2001 г. началось активное включение ЛАЛ-теста в ФСП отечественными производителями. В 2007 г. тест «Бактериальные эндотоксины» впервые включен в ГФ РФ XII изд., которая имела особое значение в гармонизации отечественных биологических методов с требованиями Европейского Союза.

В то же время стало понятно, что ЛАЛ-тест не может быть альтернативным тесту «Пирогенность»

из-за различной чувствительности и специфичности методов, так как они являются однонаправленными. Дальнейшее изучение механизма пирогенной реакции на фоне становления клеточных методик и иммуноферментного анализа привело к созданию более универсального метода определения пирогенных примесей в ЛС — теста активации моноцитов. В 2010 г. он был включен в текст Европейской фармакопеи как полностью альтернативный тесту «Пирогенность» [7]. На сегодняшний день данный тест является достаточно дорогим и не получил еще широкого распространения для использования в рутинном контроле как за рубежом, так и на территории Российской Федерации.

Параллельно с развитием методов контроля пирогенных загрязняющих веществ шла работа над еще одной проблемой, поставленной фармацевтической промышленностью — оценкой безопасности применения сывороток и вакцин.

Несмотря на положительные результаты применения иммунобиологических препаратов их использование вызывало ряд серьезных негативных последствий. В конце XIX века для получения иммунных сывороток в качестве консерванта использовали фенол или крезол, которые вызывали у пациентов аллергию и серьезные отравления. Кроме того, в результате заражения иммунных сывороток столбнячным токсином неоднократно были зафиксированы случаи заболевания и гибели пациентов от столбняка в Италии (1900 г.) и США (1901 г.). Уже в 1894 году правительство Германии представило конкретные правила для производства дифтерийной сыворотки. Образец сыворотки считался «безопасным», если он был свободен от крупных механических включений, бактериальных примесей, не содержал более 0,5% фенола, и был свободен от токсинов, в частности, столбнячного токсина. Возникла необходимость разработки соответствующих методов контроля [8].

В 1901 г. в Германии, а позже и в других странах, в качестве индикатора токсинов клостридий (в том числе столбнячного) в иммунных сыворотках был введен тест на морских свинках. Для решения проблемы с фенолом потребовалось чуть больше времени. Только в 1910 г. П. Эрлихом для выявления содержания фенола в сыворотке было предложено использовать лабораторных мышей, так как они оказались очень чувствительны к этому консерванту. Было показано, что при подкожном введении 0,5 мл сыворотки, содержащей 0,5% фенола, у мышей развивались тремор и судороги, но они переживали интоксикацию. В случае увеличения содержания фенола животные погибали. В таком виде тест «безопасности» был утвержден для дифтерийной и столбнячной сыворотки, а позже перенесен для первых бактериальных вакцин (против брюшного тифа и холеры), в производстве которых также использовался фенол [8, 9]. Тест на мышах стал стандартом для выявления содержания фенола в Германии и сохранялся без изменений до 1935 г. В 1940 г. в Германии при пересмотре нормативных документов на вакцины в первый раз была создана основная схема теста «Аномальная токсичность» — сочетание двух ранее независимых специфических тестов. В последующие годы тест вошел практически во все регуляторные документы на биологические и иммунобиологические препараты, а также в первое официальное издание МФ в 1951 г.

Открытие А. Флемингом пенициллина в 1928 г. положило начало эры широкого применения антибиотиков в клинической практике. Наряду с высокой эффективностью первых результатов применения антибиотиков в медицине, после создания инъекционных форм, стали появляться сообщения о серьезных токсических эффектах. Появилась необходимость контроля безопасности данного класса ЛС. В 1938 г. в США на законодательном уровне появились требования обязательных токсикологических исследований ЛС на животных, предшествующих клиническому применению [10]. Результаты таких исследований показали, что уровень токсичности мог колебаться для разных партий одного препарата. Стала очевидной необходимость оценки уровня токсичных примесей, для чего разработали «тест безопасности». В основу нового теста был заложен учет выживаемости животных при введении предельно переносимых доз препарата. В России ОФС «Испытание антибиотиков на токсичность» впервые была включена в 1961 г. в Государственную фармакопею СССР IX издания. К этому времени А. Е. Тебякина и Г. Я. Кивман в ряде исследований образцов препарата стрептомицин показали зависимость токсического действия от скорости внутривенного введения препарата (1952 г.). А чуть позже Л. М. Якобсон сформулировала основное требование к выбору тест-дозы — «желательно применение высших переносимых доз препарата», а также условия для снижения межлабораторных расхождений — соблюдение установленных параметров (скорости введения, растворителя, вводимого объема и др.). В дальнейшем показатель «Испытание на токсичность» был включен в ГФ X изд., где применение данного метода было расширено на препараты, получаемые из биологического сырья [11]. В таком виде тест сохранялся практически без изменений следующие 50 лет [4].

В 1985 г. в USP XXI издания, в рамках гармонизации Американской и Европейской фармакопей статья «Аномальная токсичность» объединила основной тест и тест для вакцин и сывороток [12]. В России гармонизация теста с требованиями Европейского Союза осуществлена в ГФ XII изд. ОФС «Аномальная токсичность» впервые включила оба теста [13].

К началу 90-х годов показатель «Аномальная токсичность» был исключен из большинства статей USP [14]. Такая же тенденция отмечена и в Европе. В 1994–1995 гг. при поддержке Министерства образования Германии проведен анализ показательности теста «Аномальная токсичность» на вакцины и сыворотки, для определения возможности изъятия данно-

го теста из регуляторных документов [9]. В России роль контроля качества по показателю «Аномальная токсичность» сохраняется еще на достаточно высоком уровне. Данный показатель включен в ГФ XIII изд. [15]. В то же время не отрицается и общемировая тенденция к индивидуальному подходу оценки безопасности ЛС с использованием альтернативных методов. Однако, в контроле качества ЛС, получаемых из биологического сырья, для которых сложна стандартизация условий производства, создание альтернативного метода затруднено, так как четко не определен источник опасности. Поэтому в стремлении к внедрению новейших результатов научно-технического прогресса важно не отказываться от использования уже зарекомендовавших себя методов обеспечения качества фармацевтических продуктов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 9-е изд. М.: Медгиз; 1961.
2. Schechtman LM. The Safety Assessment Process — Setting the Scene: An FDA Perspective. IJARJ 2002; 43(Suppl 1): S5–S10. Available from: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/>.
3. History of Federal Regulation: 1902–Present. Available from: <http://www.fdareview.org/history.shtml>.
4. Крылов ЮФ, Кивман ГЯ. Биологический контроль безопасности лекарственных средств. М.: Медицина; 1985.
5. U.S.P. 12th edition. 1942.
6. Ситников АГ, Травина ЛА, Багирова ВЛ. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М.; 1997.
7. European Pharmacopoeia. 6th edition. 2010.
8. Cussler K. The Scientific Relevance of the ATT — Today and from a historical Perspective. Available from: <https://circabc.europa.eu/sd/a/713b9d43-9383-4681-a46a-054c6249c40b/ihb%20sept%202015%205%20Case%20study%201 Klaus%20Cussler.pdf>.
9. Гарбе ЙХО, Озборн С, Бергс К, Бопст М, Йос А, Киташова АА. и др. Исключение теста на аномальную токсичность в качестве теста контроля качества: исторический анализ данных и научные знания. Разработка и регистрация лекарственных средств 2015; 2(11): 184–92.
10. FDA [Food and Drug Administration]. 1981b. The Story of The Laws Behind The Labels, Part II: 1938 — The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. FDA Consumer, June, 1981. Available from: <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/historla.html>.
11. Государственная фармакопея СССР. 10-е изд. М.: Медицина; 1968.
12. U.S.P. 21th edition. 1985.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Ч. 1. М.: НЦЭСМП; 2008.
14. U.S.P. 22th edition. 1990.
15. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Ч. 1. М.: НЦЭСМП; 2015.

## ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

*Рябцева Мария Сергеевна.* Эксперт 2-й категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

*Батуашвили Тамара Ариеловна.* Главный эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

*Сапожникова Галина Алексеевна.* Ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

*Неугодова Наталья Петровна.* Начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

*Олефир Юрий Витальевич.* Генеральный директор, д-р мед. наук.

*Меркулов Вадим Анатольевич.* Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, проф.

## АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Рябцева Мария Сергеевна; Ryabtseva@expmед.ru

## HISTORY AND CURRENT STATUS OF BIOLOGICAL TESTS IN RUSSIA

M. S. Ryabtseva, T. A. Batuashvili, G. A. Sapozhnikova, N. P. Neugodova, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov

Federal State Budgetary Institution  
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** «Pyrogenicity» and «Abnormal Toxicity» are considered to be among most problematic pharmacopoeia monographs in the current editions of the leading world pharmacopoeias, the reasonability of which is not obvious to all experts. The authors analyze the reasons for the introduction and history of the elaboration of biological methods for drug quality control, as well as major prospects for their further development in Russia.

**Key words:** pharmacopoeia; pharmacopoeia monograph; drug quality control; biological methods.

**For citation:** Ryabtseva MS, Batuashvili TA, Sapozhnikova GA, Neugodova NP, Olefir YuV, Merkulov VA. History and current status of biological tests in Russia. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2016; (1): 11–14.

### REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the USSR. 9th ed. Moscow: Medgiz; 1961 (in Russian).
2. Schechtman LM. The Safety Assessment Process — Setting the Scene: An FDA Perspective. *ILARJ* 2002; 43(Suppl 1): S5–S10. Available from: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/>.
3. History of Federal Regulation: 1902–Present. Available from: <http://www.fda.gov/oc/ohrt/history.html>.
4. Krylov YuF, Kivman GYa. Biological control of drug safety. Moscow: Meditsina; 1985 (in Russian).
5. U.S.P. 12th edition. 1942.
6. Sitnikov AG, Travina LA, Bagirova VL. LAL test. Modern approaches to the determination of pyrogenicity. Moscow; 1997 (in Russian).
7. European Pharmacopoeia. 6th edition. 2010.
8. Cussler K. The Scientific Relevance of the ATT — Today and from a historical Perspective. Available from: <https://circabc.europa.eu/sd/a/713b9d43-9383-4681-a46a-054c6249c40b/ihb%20sept%202015%20Case%20study%201%20Klaus%20Cussler.pdf>.
9. Garbe IHO, Osborne C, Beggs K, Bopst M, Jos A, Kitashova AA, et al. The exception test for abnormal toxicity as a quality control test: a historical analysis of the data and scientific knowledge. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2015; 2(11): 184–92 (in Russian).
10. FDA [Food and Drug Administration]. 1981b. The Story of The Laws Behind The Labels, Part II: 1938 — The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. FDA Consumer, June, 1981. Available from: <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/historla.html>.
11. The State Pharmacopoeia of the USSR. 10th ed. Moscow: Meditsina; 1968 (in Russian).
12. U.S.P. 21th edition. 1985.
13. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Part 1. Moscow: NCESMP; 2008 (in Russian).
14. U.S.P. 22th edition. 1990.
15. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. Part 1. Moscow: NCESMP; 2015 (in Russian).

### AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard, 8–2, Moscow, 127051, Russian Federation.

*Ryabtseva MS.* 2nd category expert of Laboratory of pharmacology.

*Batuashvili TA.* Chief expert of Laboratory of pharmacology of Test Center of Quality Expertise of medicines. Candidate of Biological Sciences.

*Sapozhnikova GA.* Leading expert of Laboratory of pharmacology of Test Center of Quality Expertise of medicines.

*Neugodova NP.* Head of Laboratory of pharmacology of Test Center of Quality Expertise of medicines. Candidate of Biological Sciences.

*Olefir YuV.* Director General. Doctor of Medical Sciences.

*Merkulov VA.* Deputy Director General for the expertise of drugs. Doctor of Medical Sciences, professor.