

А. А. Чапленко^{1,2}, Е. В. Мельникова¹, О. В. Меркулова¹, Ю. В. Олефир¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Поступила в редакцию 19.12.2017. Принята к печати 07.01.2019.

К числу объектов, в которых необходимо контролировать наличие пирогенов, относятся биомедицинские клеточные продукты (БМКП). Требования к предельному содержанию бактериальных эндотоксинов (БЭ) как основного источника пирогенных примесей в 5 ЕЭ/кг массы пациента/ч при пути введения, отличном от интратекального, установленные ГФ XIII для лекарственных препаратов, распространены авторами для БМКП. По результатам теста «Мешающие факторы» кратность рабочего разведения для супернатанта клеточных культур составила 1:20. Это разведение использовали при анализе образцов БМКП как методом гель-тромб теста, так и с помощью автоматизированной системы PTS хромогенным кинетическим методом. Установлено, что содержание БЭ в представленных образцах клеточных культур составляет менее 0,6 ЕЭ/мл, что соответствует требованиям ГФ XIV. Результаты анализа клеточных культур, полученные с использованием автоматизированной системы PTS, согласуются с результатами гель-тромб теста. Использование автоматизированной системы анализа содержания БЭ позволяет сократить время анализа и минимизировать влияние человеческого фактора без потери точности измерения.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты, бактериальные эндотоксины, пирогенность, кинетический хромогенный тест.

Пирогены — вещества, которые способны вызывать повышение температуры тела при парентеральном введении. К пирогенам относятся грамотрицательные бактерии и их токсины, вирусы и продукты их жизнедеятельности, лизированные микробные клетки. По химическому составу пирогены представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий [1].

Основная группа веществ, обладающих пирогенной активностью, — бактериальные эндотоксины (БЭ) — высокомолекулярные и термостабильные вещества, они разрушаются только при нагревании в суховоздушном стерилизаторе при 250 °С в течение 30 мин. При воздействии пара под давлением (автоклавирование при 120 °С) в растворах БЭ разрушаются только через 5 ч. Следовательно, устранить пироген-

ные вещества в лекарственных средствах парентерального применения при помощи термической стерилизации практически невозможно. Таким образом, стерильные лекарственные препараты не всегда могут быть апиrogenными, т.е. не содержать БЭ [2].

Наряду с пирогенной активностью БЭ также повышают проницаемость клеточной мембраны и при парентеральном введении могут помимо повышения температуры тела вызывать следующие токсические эффекты — диарею, септический шок, активацию системы комплемента, некроз [3]. Таким образом, испытание на содержание пирогенных примесей для средств медицинского парентерального применения является важным тестом, который должен быть обязательно включен в нормативную документацию. Пороговой пирогенной дозой считается доза БЭ, равная 5 ЕЭ/кг массы человека/ч [4, 5].

В ГФ XIV, как и в ведущих мировых фармакопеях, предусмотрены два метода определения пирогенных примесей: биологический — определение пирогенности на кроликах, ЛАЛ-тест — определение БЭ *in vitro*. Рекоменду-

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051 Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

² Chaplenko@expmed.ru

мый ГФ XIV биологический метод отличается специфичностью, но не дает количественной оценки содержания пирогенных веществ. К его существенным недостаткам следует отнести трудоемкость и продолжительность испытаний, необходимость содержания животных, ухода за ними, сложность подготовки к проведению испытаний, зависимость результатов от индивидуальных особенностей каждого животного и т. д., поэтому наиболее востребованным в настоящее время является второй метод определения пирогенов, основанный на специфической реакции ЛАЛ-реактива (лизат амебоцитов мекхехоста *Limulus*) с БЭ [6].

ЛАЛ-тест выполняют с помощью гель-тромб теста и инструментальных методов анализа (турбидиметрического и хромогенного), отличающихся от первого метода большими чувствительностью и воспроизводимостью [6].

К числу объектов, где необходимо контролировать наличие пирогенных примесей, относятся биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — комплексы, состоящие из клеточной линии (клеточных линий) человека и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами и/или медицинскими изделиями.

Основными источниками пирогенных примесей в БМКП могут являться: биоматериал донора, реактивы и материалы, используемые при выделении и культивировании клеток (среды, сыворотки, культуральные чашки и др.), бактериальная контаминация культуры [7].

Требования к предельному содержанию БЭ в 5 ЕЭ/кг массы пациента/ч при пути введения, отличном от интратекального, установленные ГФ XIV для лекарственных препаратов, актуально распространить и для БМКП. Однако содержание БЭ в БМКП в ЕЭ/мл точно установить довольно сложно, поскольку на данный момент в РФ отсутствуют зарегистрированные продукты с конкретной дозировкой и схемой введения.

В связи с ограниченным сроком годности БМКП (минимальный может составлять порядка нескольких часов) особенно важным является время проведения анализа качества БМКП и его надежность [7]. Нарушение методики проведения, а также повтор испытания могут задержать выпуск и введение БМКП пациенту. Проведение анализа методом гель-тромб теста занимает не менее 2 – 3 ч, поэтому для клеточных продуктов актуально использование подобных современных, более экспрессных и чувствительных методов [8].

За последние несколько лет хорошо себя зарекомендовали разработки, значительно сокращающие время проведения теста на содержание БЭ. В ряду инноваций особое место занимает тест-система Endosafe PTS (Charles River, США). Основной целью разработчиков была максимальная автоматизация и стандартизация процедуры анализа. В результате кардинальным образом изменена приборная составляющая и предельно упрощена процедура проведения опыта. Время проведения анализа пробы составляет около 15 мин, а точность и воспроизводимость для лекарственных средств удовлетворяет фармакопейным требованиям. Испытание с помощью прибора Endosafe PTS предусматривает использование кинетического хромогенного метода, который одобрен регуляторными органами США и Европы.

Таким образом, весьма актуальной задачей является апробирование автоматизированных систем проведения ЛАЛ-теста для оценки содержания БЭ в БМКП, что позволит ускорить процедуру анализа и повысить чувствительность определения БЭ.

Цель работы — оценить пригодность методов определения содержания БЭ в образцах БМКП с помощью автоматизированной системы Endosafe PTS и гель-тромб теста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами анализа служили образцы клеточных культур человека: фибробласты — 5 клеточных культур; мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ) — 5 клеточных культур; МСК эндометрия — 5 клеточных культур; питательные среды, в которых происходило культивирование клеток.

Образцы биоматериала от 18 доноров без хронических заболеваний в возрасте от 20 до 65 лет предоставлены лабораторией клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова.

Выделяли и культивировали клетки согласно общепринятым требованиям, указанным в работах [9 – 11].

Предоставленные для анализа клеточные культуры могут выступать модельным объектом БМКП, так как широко применяются для клеточной терапии за рубежом [12].

Норму предельного содержания рассчитывали согласно международным требованиям (5 ЕЭ/кг массы пациента/ч) и приблизительной оценки объема введения БМКП (5 мл/кг/ч). Норма предельного содержания БЭ в БМКП составила не более 1 ЕЭ/мл.

В связи с тем, что БЭ свойственна внеклеточная локализация, для анализа клеточных культур использовали супернатант клеточной культуры, для отделения которого использовали центрифугу Eppendorf 5804R (Eppendorf, Германия), параметры — 1000g, 10 мин.

В работе использовали: набор реактивов для гель-тромб теста — контрольный стандарт эндотоксина КСЭ, ЛАЛ-реактивы различной чувствительности от 0,015 до 0,125 ЕЭ/мл (Charles-River, США); воду для ЛАЛ-теста («ЛАЛ-центр», Россия); портативную систему анализа БЭ Endosafe PTS (Charles-River, США) с оригинальными картриджами для анализа чувствительностью 1 – 0,01 ЕЭ/мл; сушевоздушный нагревательный прибор для инкубации при 37 °С; автоматические дозаторы с переменным объёмом 20 – 200 мкл и 100 – 1000 мкл; вихревую мешалку; депирогенизированные стеклянные пробирки с диаметром 13 и 10 мм («ЛАЛ-центр», Россия); наконечники для автоматических дозаторов.

Анализировали супернатант клеточной среды с помощью автоматизированной системы Endosafe PTS (Charles-River, США) согласно инструкции производителя и параллельно выполняли гель-тромб тест.

Полученные результаты оценивали в соответствии с критериями приемлемости, предусмотренными программным обеспечением системы Endosafe PTS. Если результат анализа по-

ложительного контроля («spike recovery») составлял от 50 до 200 %, а коэффициент вариации не превышал 25 % (согласно инструкции производителя), то результаты анализа признавались корректными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав супернатанта сред клеточных культур стволовых и прогениторных клеток включает в себя значительное число ростовых факторов и ферментов белковой природы, которые в совокупности могут как усиливать, так и ингибировать реакцию взаимодействия эндотоксинов с ЛАЛ-реактивом, поэтому для оценки содержания БЭ в образцах необходимо предварительное проведение теста «Мешающие факторы» с целью определения оптимального разведения образцов. Для этого использовали один из супернатантов культуральных сред МСК ЖТ.

Значение максимально допустимого разведения (МДР) супернатанта сред клеточных культур стволовых и прогениторных клеток, рассчитанное с учётом нормы предельного содержания БЭ (1 ЕЭ/мл) и максимальной чувствительности используемого ЛАЛ-реактива ($\lambda = 0,015$ ЕЭ/мл), составило 1:66.

Образцы супернатанта оценивали в разведениях 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 (1/3 МДР). Результаты теста «Мешающие факторы» представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты теста «Мешающие факторы» для образцов клеточных культур, проведенного методом гель-тромб теста

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация БЭ в испытуемом растворе, ЕЭ/мл	Результат ($n = 4$, $\lambda = 0,015$ ЕЭ/мл, совпадал для всех повторностей)
A	Супернатант клеточной культуры	–	–	–	–
B ₁	КСЭ в супернатанте клеточной культуры	Супернатант клеточной культуры	1	0,03	–
B ₂	КСЭ в супернатанте клеточной культуры (1:2)	Супернатант клеточной культуры (1:2)	1	0,03	–
B ₃	КСЭ в супернатанте клеточной культуры (1:4)	Супернатант клеточной культуры (1:4)	1	0,03	–
B ₄	КСЭ в супернатанте клеточной культуры (1:10)	Супернатант клеточной культуры (1:10)	1 2	0,03 0,015	+ –
B ₅	КСЭ в супернатанте клеточной культуры (1:20)	Супернатант клеточной культуры (1:20)	1 2 4 8	0,03 0,015 0,0075 0,0033	+ + + –
C	КСЭ в воде для ЛАЛ-теста	Вода для ЛАЛ-теста	1 2 4	0,03 0,015 0,0075	+ + –
D	Вода для ЛАЛ-теста	–	–	–	–

Таблица 2. Сравнительный анализ результатов испытаний образцов клеточных культур на содержание эндотоксинов с помощью системы Endosafe PTS и гель-тромб теста

№ образца	Описание образца (супернатант, разведение 1:20)	Концентрация БЭ, ЕЭ/мл		Совпадение результатов
		PTS (n = 8, среднее значение)	гель-тромб тест (n = 3, представлен интервал полученных результатов)	
1	МСК ЖТ	0,019	0,015 – 0,03	+
2	МСК ЖТ	0,011	<0,015	+
3	МСК ЖТ	0,020	0,015 – 0,03	+
4	МСК ЖТ	0,024	0,015 – 0,03	+
5	МСК ЖТ	0,015	0,015 – 0,03	+
6	МСК ЖТ	0,019	0,015 – 0,03	+
7	МСК ЖТ	0,015	<0,015	±
8	МСК ЖТ	<0,01	<0,015	+
9	МСК эндометрия	<0,01	0,015 – 0,03	±
10	МСК эндометрия	<0,01	<0,015	+
11	МСК эндометрия	0,023	0,015 – 0,03	+
12	МСК эндометрия	<0,01	<0,015	+
13	МСК эндометрия	0,033	0,015 – 0,03	+
14	Фибробласты	0,012	<0,015	+
15	Фибробласты	<0,01	<0,015	+
16	Фибробласты	0,018	<0,015	±
17	Фибробласты	0,026	0,015 – 0,03	+
18	Фибробласты	0,015	0,015 – 0,03	+

По результатам теста «Мешающие факторы» [5] рабочее разведение для супернатанта клеточных культур составило 1:20, именно его и использовали при анализе образцов БМКП как методом гель-тромб теста, так и с помощью автоматизированной системы.

Таким образом, в 8 образцах (с учетом разведения 1:20) содержание БЭ было ниже предела обнаружения методом гель-тромб теста, в 5 из них — ниже предела обнаружения PTS (табл. 2). Максимальное содержание БЭ выявлено в исходном образце № 13 (без 20-кратного разведения) — по данным PTS оно составило $0,033 \cdot 20 = 0,66$ ЕЭ/мл, по данным гель-тромб теста — 0,3 – 0,6 ЕЭ/мл. Во всех образцах результаты теста PTS и классического теста согласуются между собой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что содержание БЭ в предоставленных образцах клеточных культур составляет менее 0,6 ЕЭ/мл, что соответствует требованиям ГФ XIV [5]. Результаты анализа клеточ-

ных культур, полученные с использованием автоматизированной системы PTS, сопоставимы с результатами традиционного метода — гель-тромб теста.

Использование автоматизированной системы анализа содержания БЭ позволяет сократить время анализа и минимизировать влияние человеческого фактора без потери точности измерения. Особенно важным срок проведения анализа является для БМКП, поэтому использование PTS может быть рекомендовано для контроля качества клеточных продуктов.

СПИСОК ССЫЛОК

1. *Chen L., Mozier N.* / J. Pharm. Biomed. Analys. 2013. V. 80. P. 180 – 185.
2. *Stoppelkamp S., Würschum N., Stang K., Löder J., Avci-Adali M., Toliashvili L., Fennrich S.* / Drug Test. Analys. 2017. V. 9. № 2. P. 260 – 273.
3. *Русанова Е. В., Нуязматов А. Г., Протас И. М.* / Альм. клин. мед. 2013. № 29. С. 70 – 73.
4. USP 38 <85> Bacterial endotoxin test.
5. ГФ XIV. ОФС. 1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины.

6. Bolden J. S., Warburton R. E., Phelan R., Murphy M., Smith K. R., De Felippis M. R., Chen D. / *Biologicals*. 2016. V. 44. № 5. P. 434 – 440.
7. Мельникова Е. В., Меркулова О. В., Чапленко А. А., Меркулов В. А. / *Биопреп. профилактик., диагност., леч.* 2017. Т. 17. № 3. С. 133 – 144.
8. Шаповалова О. В., Неугодова Н. П., Рябцева М. С., Агаширинова А. А., Гунар О. В. / *Фармация*. 2017. Т. 66. № 2. С. 7 – 10.
9. Сагарадзе Г. Д., Григорьева О. А., Ефименко А. Ю. / *Биомед. химия*. 2015. Т. 61. № 6. С. 750 – 759.
10. Gargett C. E., Chan R. W. S., Schwab K. E. *Endometrial stem cells* / *Cur. Opin. Obstet. Gynecol.* 2007. V. 19. № 4. P. 377 – 383.
11. Парфенова Е. В., Ткачук В. А., Рубина К. А., Калинина Н. И., Сысоева В. Ю. Способ выделения и культивирования аутологичных дермальных фибробластов для стимуляции регенеративных процессов и заместительной терапии. Патент РФ #2382077. 2010.
12. Matthay M. A., Pati S., Lee J. W. / *Stem Cells*. 2017. V. 35. № 2. P. 316 – 324.

USING OF THE AUTOMATED SYSTEM FOR DETERMINATION OF BACTERIAL ENDOTOXINS IN QUALITY CONTROL OF BIOMEDICAL CELL PRODUCTS

A. A. Chaplenko^{1,2}, E. V. Melnikova¹, O. V. Merkulova¹, Y. V. Olefir¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky Boulevard 8, Bld. 2, Moscow, 127051, Russian Federation

² Chaplenko@expmed.ru

Biomedical cellular products — complexes consisting of human cell lines in combination with medicines and/or medical devices. The main sources of pyrogenic impurities cell products are donor biological materials, reagents and materials used for the isolation and cultivation of cells (medium, serum, culture cups, etc.), bacterial contamination of culture. The limit of the concentration of bacterial endotoxins is 5 EU/kg of patient weight/hour. According to the test results of the «Interfering factors» working dilution for supernatant of cell lines was 1:20; namely this dilution was used in the analysis of samples by the gel-clot test method and using the automated system. The content of bacterial endotoxins in the submitted samples of cell cultures is not more than 0.6 EU/ml, which corresponds to the requirements of State Pharmacopeia XIV. The results of the analysis of samples obtained using the automated system are in good agreement with the results of the traditional gel clot test. Using the automated system of the analysis of the cell products allows to reduce time of analysis and to minimize the influence of «human factor» without a loss of measurement accuracy.

Keywords: biomedical cellular products, bacterial endotoxins, pyrogenicity, kinetic chromogenic test.