

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Испытание на гистамин

ОФС.1.2.4.0007.15

Взамен ГФ XII, ч.1,

ОФС 42-0063-07

Настоящая статья распространяется на определение содержания гистамина *in vitro* в лекарственных средствах для парентерального применения.

Подготовка изолированного органа

В опыт берут морскую свинку-самца массой тела 200 – 350 г. За 24 ч до эксперимента животное лишают пищи, но оставляют свободный доступ к воде. После эвтаназии у свинки вскрывают брюшную полость от лонного сочленения до грудины и находят слепую кишку. Место её перехода в ободочную кишку является ориентиром при поиске подвздошной кишки, которая отходит от слепой за 1 – 2 см до этого участка.

Для того чтобы извлечь подвздошную кишку, тупым зажимом или пинцетом плотно захватывают её основание и отрезают ножницами. Отсечённый конец кишки слегка приподнимают, а затем без натяжения и, не перехватывая её, отсекают ткань брыжейки маленькими разрезами при помощи тупоконечных ножниц. Остатки брыжейки удалять не следует. Все манипуляции с подвздошной кишкой следует проводить осторожно, не растягивая её. Для эксперимента пригоден дистальный участок подвздошной кишки, исключая 10 – 15 см, ближайшие к слепой кишке.

Подвздошную кишку нарезают на равные части (около 6 см каждая) и помещают в чашку Петри с гипокальциевым раствором Тироде (примечание

1). Этим раствором осторожно промывают полученные отрезки с помощью шприца или резиновой груши с пастеровской пипеткой с затуплённым концом до полного удаления содержимого кишечника. Промытые отрезки подвздошной кишки помещают в чистый гипокальциевый раствор Тироде. Они могут быть использованы сразу или храниться в течение 24 ч при температуре от 2 до 4°C (примечание 2).

Непосредственно перед экспериментом промытый отрезок кишки разрезают до длины, требуемой условиями эксперимента (10 мм при использовании электронного датчика или 20 мм при использовании механического рычага и кимографа).

Приготовление разведений стандартного и испытуемого образца

1. Разведение стандартного образца (СО)

В качестве СО используют гистамина дигидрохлорид в 3 разведениях: разведение 1 ($1,25 \cdot 10^{-6}$ г/мл); разведение 2 ($2,50 \cdot 10^{-6}$ г/мл) и разведение 3 ($5,00 \cdot 10^{-6}$ г/мл), вызывающие 50,75 и 100 % сокращение кишки соответственно. В качестве растворителя используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

2. Разведение испытуемого образца (ИО)

Испытанию подвергают неразведённый ИО, когда максимально допустимая нормативной документацией концентрация гистамина в неразведённом препарате находится в диапазоне от $1,25 \cdot 10^{-6}$ г/мл до $2,50 \cdot 10^{-6}$ г/мл. При необходимости ИО разводят 0,9 % раствором натрия хлорида таким образом, чтобы предполагаемая концентрация гистамина дигидрохлорида в разведении ИО составляла $2,50 \cdot 10^{-6}$ г/мл.

Регистрирующая система

Для регистрации сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение СО и ИО используют регистрирующую систему, состоящую из термостатируемой ванночки с гипокальциевым раствором Тироде при температуре 35 °С, а

также электронного датчика с самописцем или механического рычага с кимографом. Ванночку аэрируют карбогеном (95 % O₂ и 5 % CO₂) или воздухом. Нагрузка обычно составляет 500–800 мг. В случае использования механического рычага для вычисления нагрузки следует применять правило равновесия:

$$\text{Сила} \cdot \text{Плечо силы} = \text{Нагрузка} \cdot \text{Плечо нагрузки.}$$

Проведение опыта

Изолированный отрезок подвздошной кишки помещают в ванночку и прикрепляют к регистрирующей системе с помощью лигатуры по диагонали за противоположные концы: один – к крючку на дне ванночки, а другой – к датчику или рычагу. Прикладывают к отрезку нагрузку и оставляют его в покое на 30 мин. За это время необходимо не менее 3 раз сменить в ванночке раствор Тироде.

1. Адаптация изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки к субмаксимальной дозе гистамина

В термостатируемую ванночку вводят СО в разведении 3 в объеме, равном 1/100 от её ёмкости. Через 30 с (время экспозиции) ванночку промывают тройным объемом раствора Тироде. После первого отмывания проводят второе таким же объемом раствора. Не менее чем через 4 мин после первого введения снова повторяют цикл «введение–экспозиция–два отмывания». Эти циклы повторяют до тех пор, пока не получат не менее 2 одинаковых пиков. Их высоту принимают за 100 % (примечание 3). Временные интервалы между введениями испытуемого вещества и между двумя отмываниями должны быть постоянными.

2. Испытание ИО на гистамин

2.0. Предварительное испытание

После достижения постоянной величины ответа отрезка кишки на введение СО в разведении 3 проводят испытание ИО на гистамин. Для этого с интервалом не менее 4 мин однократно в случайном порядке вводят СО в

разведениях 1 и 3 и неразведенный ИО. Циклы «введение–экспозиция–два отмывания» такие же, как и при проведении адаптации органа к субмаксимальной дозе.

В случае, если пик, полученный в ответ на введение ИО, по высоте не меньше, чем пик СО в разведении 1, проводят количественное определение содержания гистамина в ИО (см. п. 2.1). Если пик, полученный в ответ на введение ИО, меньше пика СО в разведении 1 или вообще отсутствует, проводят контрольное испытание (см. п. 2.2).

2.1. Количественное испытание ИО на гистамин

В случайном порядке поочерёдно вводят СО в разведениях 1 и 3 и ИО до получения не менее 4 пиков в ответ на введение каждого раствора. Находят среднее значение ответа отрезка кишки на каждый раствор. С помощью регрессионного анализа вычисляют параметры линейной зависимости среднего ответа кишки на введение СО от логарифма его концентрации. Затем, подставляя полученные значения этих параметров в уравнение регрессии, вычисляют концентрацию гистамина в том разведении ИО, которому соответствует средняя высота его пика, и, исходя из этого, рассчитывают содержание гистамина в неразведённом ИО.

ИО считают прошедшим испытание, если найденное содержание гистамина не превышает максимально допустимое, указанное в нормативной документации (коэффициент пересчёта гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038).

2.2. Контрольное испытание

Схема проведения контрольного испытания такая же, как и при количественном определении содержания гистамина в ИО, только вместо ИО используют СО в разведении 2. Если средняя высота его пика соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном разведении ($2,50 \cdot 10^{-6}$ г/мл), то результаты опыта следует признать достоверными.

Результаты опыта следует признать недостоверными в каждом из следующих случаев:

1. Если средняя высота пика СО в разведении 2 не соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном разведении ($2,50 \cdot 10^{-6}$ г/мл).

2. Если при количественном определении содержания гистамина в ИО отсутствует воспроизводимость ответов отрезка кишки на введение ИО.

3. Если в процессе эксперимента наблюдается статистически значимое снижение высоты пиков в ответ на серию введений одного и того же раствора (примечание 4).

В каждом из этих 3 случаев следует провести испытание ИО на вещества депрессорного действия в соответствии с ОФС «Испытание на депрессорные вещества».

Примечания

1. Гипокальциевый раствор Тироде.

Состав:

- NaCl 80,00 г;
- NaHCO₃ 10,00 г;
- D-глюкоза 11,00 г;
- KCl 2,00 г;
- CaCl₂·2H₂O 1,30 г;
- MgCl₂·6H₂O 2,10 г;
- NaH₂PO₄·H₂O 0,58 г;
- Вода очищенная до 10 л.

Приготовление

В мерном цилиндре вместимостью 1 л растворяют в воде очищенной навески NaCl, NaHCO₃ и D-глюкозы в любом порядке. Доводят объём раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и переливают содержимое цилиндра в 10-литровую стеклянную емкость с притёртой пробкой или полиэтиленовый сосуд того же объёма с завинчивающейся крышкой.

Таким же образом, но по отдельности, каждую из оставшихся навесок растворяют в 1 л воды очищенной и по очереди переносят в тот же 10-литровый сосуд, строго придерживаясь следующего порядка:

- 1) KCl,
- 2) CaCl₂·2H₂O,
- 3) MgCl₂·6H₂O,
- 4) NaH₂PO₄·H₂O.

Затем доливают воду очищенную до отметки 10 л и вновь тщательно перемешивают.

Полученный раствор может храниться при температуре от 3 до 5 °С не более 24 ч. Помутнение недопустимо.

Помутневший раствор следует вылить, тщательно промыть сосуд в проточной воде и прополоскать водой очищенной. Поверхностно активные моющие средства применять нельзя.

2. Сосуд, в котором находятся отрезки подвздошной кишки при хранении, плотно не закрывают, а затягивают двойным слоем марли, чтобы обеспечить доступ воздуха. Перед использованием в опыте отрезки следует подготовить. Для этого сосуд в течение 10 мин держат при комнатной температуре, а затем в течение 20 мин при температуре 35 °С в термостате. После нагревания из отрезка следует удалить слизь. Это достигается лёгкими поглаживающими движениями в продольном направлении.

3. Струя вводимого раствора должна быть направлена не прямо на изолированный отрезок кишки, а в сторону стенки ванночки, причём направление струи не должно меняться. Скорость введения должна быть максимально высокой и постоянной.

Регистрацию сокращений проводят непрерывно (скорость ленты 2 мм/мин.). В случае использования механического рычага и кимографа писчик во время отмыывания можно отводить и прекращать запись.

4. Каждую серию, состоящую не менее чем из 4 пиков, полученных в результате введения одного и того же раствора, следует проверять с помощью теста Нойманна на дрейф:

$$D = \frac{n \sum_{i=1}^{n-1} (x_i - x_{i+1})^2}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2},$$

где:

x – высота пика на введение одного и того же раствора;

n – число пиков, полученных в результате введения одного и того же раствора.

Значение D при $P = 95\%$ должно быть:

при $n = 4$ – меньше 0,78;

при $n = 5$ – меньше 0,82;

при $n = 6$ – меньше 0,89.