doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2023.08.04

布舍瑞林注射液过敏性、溶血性及刺激性研究

杨 雪[1],王 建[1*],刘海余[1],薛宝君[1],赵 健[1],崔志刚[1],汤连升[2*]

(1. 天津市中升挑战生物科技有限公司,天津 300380;2. 山东省药学科学院,济南 250101)

[收稿日期] 2023 - 03 - 10　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2023) 08 - 0026 - 09　[中图分类号] S859.7

[摘　要]　本研究旨在通过过敏性、体外溶血性及肌肉刺激性评价布舍瑞林注射液的安全性。过敏性试验和溶血性试验中设立阴性和阳性对照,而刺激性试验中采用自身对照。试验过程中,对照系统均成立。Hartley 豚鼠隔日腹腔连续 3 次注射给予布舍瑞林注射液(2 μg/只),末次致敏后第 14 和 21 天分别静脉注射 2 倍致敏剂量供试品激发进行主动全身过敏试验,结果为阴性;同样的给药剂量,末次致敏后第 10 天,皮内注射给予对应的抗体血清,静脉注射激发后未见蓝斑,豚鼠被动皮肤过敏反应结果为阴性。采用 2% 红细胞悬液进行体外溶血性试验,温育 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h 各观察 1 次,布舍瑞林注射液和阴性对照组所有试管未见溶血,终末未见红细胞凝集,而阳性对照组全部溶血。新西兰兔连续肌肉注射给予布舍瑞林注射液(0.5 mL/只),末次给药 72 h 后,病理组织学检查可见对新西兰兔股四头肌有刺激作用,恢复期结束未见刺激性反应,具有可逆性。研究结果表明,布舍瑞林注射液无过敏性和溶血性,对肌肉有刺激性但停药后可恢复,在应用过程中是安全的。

[关键词]　布舍瑞林;过敏性;体外溶血性;肌肉刺激性

Experimental Study of Buserelin Injection on Sensitization, Hemolysis and Irritation

YANG Xue[1], WANG Jian[1*], LIU Hai - yu[1], XUE Bao - jun[1], ZHAO Jian[1], CUI Zhi - gang[1], TANG Lian - sheng[2*]

(1. *Tianjin Speerise Challenge Biotechnology Co., Ltd., Tianjin* 300380, *China*;
2. *Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan* 250101, *China*)

Corresponding authors: WANG Jian, E - mail: wangjian5555@163.com; TANG Lian - sheng, E - mail: tangliansheng@sdaps.cn

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the safety of buserelin injection by sensitization, *in vitro* hemolysis, and muscle irritation. In the allergy test and hemolysis test, the negative control group, positive control group were set up, while in the irritation test, the self - control method was used. During the test, the control system was established. Hartley guinea pigs were injected with buserelin injection (2 μg/animal) for 3

作者简介: 杨 雪,高级兽医师,硕士,从事化学药品新药开发及药理毒理研究。

通讯作者: 王 建,E - mail:wangjian5555@163.com;汤连升,E - mail:tangliansheng@sdaps.cn

consecutive times every other day in intraperitoneal, and buserelin injection was administered intravenously at twice the sensitizing dose on days 14 and 21 after the last sensitization for excitation. Allergic reaction was negative. On the 10th day after the last sensitization, the corresponding antibody serum was injected intradermally with the same dose. Locus coeruleus was not observed after intravenous injection excitation . The result of passive cutaneous anaphylaxis was negative in guinea pigs. 2% erythrocyte suspension was used for *in vitro* test in the hemolysis test, and observed once at 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h and 3 h respectively. No hemolysis was observed in all test tubes of buserelin injection and negative control, and no erythrocyte aggregation was observed at the end. Hemolysis was observed in the all positive control group. New Zealand rabbits were given buserelin injection (0.5 mL/animal) by continuous intramuscular injection. Histopathological examination showed that buserelin injection had obvious irritation to quadriceps femoris of New Zealand rabbits at 72 h after the last administration. No irritation reaction was observed at the end of the recovery period, which was reversible. The results showed that buserelin injection had no allergy and hemolysis, and had irritation to muscle, but it could be recovered after withdrawal, which indicated that buserelin injection was safe in application process.

Key words: buserelin; sensitization; *in vitro* hemolysis; muscle irritation

布舍瑞林(Buserelin)为白色或类白色粉末,有引湿性,在水中略溶,在 1% 醋酸溶液中略溶。布舍瑞林可促使黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)和性激素的分泌增加,其促进 LH 和 FSH 释放的作用效力分别为天然促性腺激素释放激素的 18 至 322 倍[1]。布舍瑞林通过调节激素的分泌,从而可以诱导动物的同步排卵,既用于治疗卵巢疾病(如卵巢囊肿),又用于提高受孕率。布舍瑞林注射液最先由英特威公司开发,现已在德国、英国、法国、日本、爱尔兰、捷克等国家上市销售。目前已有英特威公司开发的商品名为 Receptal、Porceptal 的注射剂(规格:4 μg/mL),以及商品名为 Busol、Veterelin、Fertigest 的注射剂(规格:4 μg/mL)上市销售[2-3]。

为科学评价布舍瑞林注射液的安全性,参考国家食品药品监督管理局颁布的《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》(2014 年 5 月实施)[4],同时参照《兽药临床前毒理学评价试验指导原则》(2009 年 8 月)相关要求[5],分别进行过敏性试验、溶血性试验、皮肤刺激性试验,为临床用药提供参考。

1　材料与方法

1.1　*药品与试剂*　布舍瑞林注射液,批号:210123,规格:2.5 mL∶10 μg/瓶,含量:100.2%,由天津市中升挑战生物科技有限公司提供。0.9% 氯化钠注射液,批号:2110081324,由辰欣药业股份有限公司提供。牛血清白蛋白,批号:128K055,由北京索莱宝科技有限公司提供。伊文思蓝,批号:20200902,规格:10 g/瓶,由上海蓝季科技发展有限公司提供。灭菌注射用水,批号:210016,规格:5 mL/支,由百正药业股份有限公司提供。盐酸赛拉嗪注射液,批号:20201118,规格:2 mL∶0.1 g,由吉林省华牧动物保健品有限公司提供。舒泰®50,批号:889EA,规格:替来他明 125 mg,唑拉西泮 125 mg,由法国维克有限公司提供。

1.2　*主要仪器*　电子计价秤,梅特勒-托利多常州测量技术有限公司,ACS-JJ-Tiger;超净工作台,苏州苏洁净化设备有限公司,SW-CJ-2FD;电子分析天平,岛津公司,AUW-120D;低速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司,JW-1032;电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司,DHP-9162;染色封片一体机,樱花医疗科技有限公司。

1.3　*实验动物*　Hartley 豚鼠,普通级,5~6 周,雌雄各半,由潍坊圣诺实验动物养殖有限公司提供(生产许可证号:SCXK(鲁)2018 0002)。由山东省药学科学院新药评价中心动物房饲养(实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2018 0031)。新西兰兔,普通级,

3 ~4 月龄,雌雄各半,由青岛康大生物科技有限公司提供(生产许可证号:SCXK(鲁)2021 0003),山东省药学科学院新药评价中心动物房饲养。

1.4　试验方法

1.4.1　豚鼠主动全身过敏试验　Hartley 豚鼠分为 3 组,阴性对照组(0.9% 氯化钠注射液)、供试品组(布舍瑞林注射液 4μg/mL)、阳性对照组(牛血清白蛋白 40 mg/mL),每组 6 只,雌雄各半。致敏给药体积为 0.5 mL/只,激发给药体积为 1 mL/只。致敏途径:采用腹腔注射给药。激发途径:采用静脉注射给药。致敏频率:共 3 次,隔日注射 1 次,给药时间为给药第 1 天、第 3 天和第 5 天。激发频率:各组末次致敏后第 14 天分别取 3 只动物,第 21 天取每组剩余动物进行激发。因激发时兼用雌雄,每组首次激发后如雌/雄剩余 1 只动物,则单笼饲养。本试验设计详见表 1。

当阴性对照组动物未出现过敏反应症状,阳性对照组动物出现过敏反应症状时,试验系统成立。按表 2、表 3 判断过敏反应发生程度,计算过敏反应率(每组发生过敏反应的动物数/该组动物总数),根据过敏反应发生率和发生程度综合评价过敏反应情况。

表 1　豚鼠主动全身过敏试验设计

Tab 1　Experimental design of active systemic anaphylaxis in guinea pigs

组别	实验动物/只		致敏给药			激发给药		
	雌性	雄性	途径	剂量	频次[a]	途径	剂量	频次[b]
阴性对照组(0.9% 氯化钠注射液)	3	3	腹腔注射	0.5mL/只	共 3 次,隔日注射 1 次	静脉注射	1 mL/只	末次致敏后第 14 天和第 21 天
供试品组(布舍瑞林注射液 4μg/mL)	3	3	腹腔注射	0.5mL/只	共 3 次,隔日注射 1 次	静脉注射	1 mL/只	末次致敏后第 14 天和第 21 天
阳性对照组(牛血清白蛋白 40mg/mL)	3	3	腹腔注射	0.5mL/只	共 3 次,隔日注射 1 次	静脉注射	1 mL/只	末次致敏后第 14 天和第 21 天

a:致敏给药时间为给药第 1 天、第 3 天和第 5 天;b:激发给药为末次致敏后第 14 天分别取 3 只动物,第 21 天取每组剩余动物进行激发

表 2　过敏反应症状及对应的数值

Tab 2　Allergic reaction symptoms

症状	数值	症状	数值	症状	数值
正常	0	呼吸急促	7	步态不稳	14
不安宁	1	排尿	8	跳跃	15
竖毛	2	排粪	9	喘息	16
发抖	3	流泪	10	痉挛	17
搔鼻	4	呼吸困难	11	旋转	18
喷嚏	5	哮鸣音	12	潮式呼吸	19
咳嗽	6	紫癜	13	死亡	20

表 3　全身过敏反应评价标准

Tab 3　Evaluation criterion for systemic allergic reaction

症状数值	级别	过敏反应评价
0	-	阴性
1 - 4	+	弱阳性
5 - 10	+ +	阳性
11 - 19	+ + +	强阳性
20	+ + + +	极强阳性

1.4.2　豚鼠被动皮肤过敏试验　试验设置阴性对照组(0.9% 氯化钠注射液)、供试品组(布舍瑞林注射液 4 μg/mL)、阳性对照组(牛血清白蛋白 40 mg/mL)。每组动物 10 只,雌雄各半。致敏及抗血清制备阶段每组 4 只,被动致敏及激发阶段每组共 6 只,均雌雄各半。致敏给药体积为 0.5 mL/只,激发给药体积为 1 mL/只(加等体积 0.5% 伊文思蓝溶液)。本试验设计详见表 4。

各组豚鼠于第 1 天、第 3 天、第 5 天腹腔注射给药致敏 3 次;末次致敏后 10 天,采用 CO_2吸入法麻醉/安乐死,腹主动/静脉采血,不抗凝,血液样本在室温下 2000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20 ℃可保存备用。将各组制备好的抗血清原液用 0.9% 氯化钠注射液稀释,分别为原液(不稀释)、1∶2、1∶4、1∶8。将背部脱毛,脱毛区域约 8 cm×8 cm。在脱毛区域离脊柱旁约 2 cm 的皮内注射各对应组的不同稀释度抗血清 0.1 mL,每侧 2 个点,每点间隔约 4 cm;按照右上、左上、左下、右下浓度依次降低的顺序注射进行被动致敏。被动致敏后 4~5 h,各组足跖静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原,即各组药液加等量 0.5% 伊文思蓝混合后的溶液(参见表 4 试验设计)。激发约 30 min 用 CO_2麻醉处死动物,剪取背部皮肤,采用直接测量法,测量皮肤内侧蓝斑的长径和短径,不规则斑点的直径为长径与短径的平均值,并对蓝斑进行拍照。阳性对照组蓝斑直径在该稀释度下平均直径在 5 mm 以上,同时阴性对照组在该稀释度下无蓝斑,供试品各组在该稀释度下出现蓝斑直径在 5 mm以上者,将该稀释度下的供试品判定为阳性。

表 4　豚鼠被动皮肤过敏试验设计

Tab 4　Experimental design of passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs

组别	致敏及抗血清制备	被动致敏	激发
阴性对照组 (0.9% 氯化钠注射液) 供试品组 (布舍瑞林注射液 4μg/mL) 阳性对照组 (牛血清白蛋白 40mg/mL)	每组雌雄豚鼠各 2 只, 腹腔注射,0.5mL/只, 隔日注射 1 次,共 3 次	每组雌雄豚鼠各 3 只, 皮内注射 1 次,每只 4 个位点, 每个位点注射 0.1mL 不同稀释度的抗血清	每组被动致敏后的豚鼠雌雄各 3 只, 1 次足跖静脉注射各组药液加等体积 0.5% 伊文思蓝混合后的溶液, 1.0mL/只

1.4.3　体外溶血实验　采用供试品(布舍瑞林注射液 4 μg/mL)制剂原液给药,同时设阴性对照(0.9% 氯化钠注射液)及阳性对照(灭菌注射用水)验证试验系统稳定性。取新西兰兔经耳中央动脉采血 10 mL,轻轻搅拌除去纤维蛋白后得 6 mL 脱纤血液,加入 0.9% 氯化钠注射液 60 mL,分装为 6 管,每管约 11 mL,1500 r/min离心 15 min,去除上清液,每管加入 0.9% 氯化钠注射液 10 mL,再按照上述条件离心 1 次,去除上清液后取红细胞 2 mL,加 0.9% 氯化钠注射液 98 mL 稀释成 2% (V/V) 的混悬液,备用。取洁净试管进行编号,1-5 号管为供试品管,6 号管为阴性对照管,7 号管为阳性对照管。按照表 5 加入各种溶液,轻轻摇匀后,立即置 37.0±0.5 ℃的恒温箱中进行温育。从放入恒温培养箱开始(温育前,0 h)每隔15 min观察 1 次,1 h 后每隔 1 h 观察 1 次,共观察3 h,记录每次观察结果。

结果判断标准如下。无溶血:试管中红细胞逐渐下沉,上层液体无色澄明或药物颜色澄明。部分溶血:管底有少量红细胞残留,上层液体澄明红色或棕色。全部溶血:试验管底无细胞残留,溶液呈澄明红色。红细胞真凝聚:试验管溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,振摇试管后絮状沉淀不分散,或用滴管吸取凝聚的絮状物滴在载玻片上,在凝聚物边缘滴加 2 滴氯化钠注射液,置显微镜下观察,凝聚物不被冲散者为真凝聚。红细胞假凝聚:溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,振摇试管后絮状沉淀均匀分散开,或用滴管吸取凝聚的絮状物滴在载玻片上,在凝聚物边缘滴加 2 滴氯化钠注射液,置显微镜下观察,凝聚物能被冲散者为假凝聚。

表 5　溶血试验各管加样量

Tab 5　Sample adding amount of each tube in hemolysis test

溶液	各管加样量/mL						
	1	2	3	4	5	6	7
2% 红细胞混悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
0.9% 氯化钠注射液	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5	—
灭菌注射用水	—	—	—	—	—	—	2.5
4μg/mL 布舍瑞林注射液	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	—	—

1.4.4　兔肌肉刺激性试验　挑选健康动物 5 只，雌雄兼用，自身对照无需分组。依据 Karl - Heinz Diehl 关于动物给药体积的报道以及动物福利等要求，根据实验系统实验兔及临床动物各自种属特点，设计给药体积为 0.5 mL/只，给药 1 次，即给药剂量为 2.0 μg/只。采用同体左右侧自身对照，对照侧给予 0.9% 氯化钠注射液，给药方法与供试品侧相同。肌肉注射，单次给药，0.5 mL/只，股四头肌给药，恢复期：药后 72 h 及恢复 14 d。

给药前和非给药日每日 1 次肉眼观察注射部位的局部刺激反应。末次给药 72 h 后和恢复期结束时，各组分别取 3 只和 2 只动物采用舒泰®50 和盐酸塞拉嗪注射液混前肢肌肉注射麻醉放血实施安乐死后，剪取给药部位组织，进行组织病理学检查。根据表 6 肌肉刺激性反应分级标准计算级数平均值，按表 7 判定刺激等级。

2　结果与分析

2.1　豚鼠主动全身过敏试验　末次致敏给药后第 14 天和第 21 天激发，激发给药后3 h内观察可见阴性对照组、供试品组动物均未见过敏反应症状，全身主动过敏反应评价等级为“ - ”，过敏反应为阴性；阳性对照组动物首、末次激发后所有动物药后 30 min 内和或出现搔鼻、咳嗽、呼吸急促、排尿、呼吸困难、步态不稳、跳跃、痉挛、死亡等过敏症状，所有动物激发后 4 ~ 15 min 内死亡，全身过敏反应发生率为 100%，级别为“ + + + + ”，过敏反应为极强阳性，结果见表 8。

表 6　肌肉刺激反应分级标准

Tab 6　Grading standards for muscle irritation reaction

刺激反应	反应级分值
无明显变化	0
轻度充血，范围在 0.5 × 1.0 cm 以下	1
中度充血，范围在 0.5 × 1.0 cm 以上	2
重度充血，伴有肌肉变性	3
出现坏死，有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

表 7　肌肉刺激反应平均分值和等级

Tab 7　Average score and grade of muscle irritation reaction

平均分值	刺激等级
0.0 ~ 0.4	无
0.5 ~ 1.4	轻微
1.5 ~ 2.4	轻度
2.5 ~ 3.4	中度
3.5 ~ 4.4	重度
4.5 及以上	严重

2.2　豚鼠被动皮肤过敏试验　阴性对照组、供试品组注射部位各稀释度下未出现蓝斑，且激发后动物一般状态良好，无过敏反应。阳性对照组各给药点蓝斑直径 > 5 mm，结果为阳性。动物蓝斑直径体积结果见表 9。

表 8　全身过敏试验观察结果

Tab 8　Observed result for general allergy test

激发时间	组别	动物数/只	不同过敏反应数值对应的动物数/只					过敏反应发生率/%	过敏反应发生程度
			0	1 - 4	5 - 10	11 - 19	20		
末次致敏后第 14 天	阴性对照组	3	3	0	0	0	0	0	阴性
	供试品组	3	3	0	0	0	0	0	阴性
	阳性对照组	3	0	3	3	3	3	100	极强阳性
末次致敏后第 21 天	阴性对照组	3	3	0	0	0	0	0	阴性
	供试品组	3	3	0	0	0	0	0	阴性
	阳性对照组	3	0	3	3	3	3	100	极强阳性

表 9　被动皮肤过敏试验各组蓝斑直径平均值($\bar{x} \pm s$)

Tab 9　Mean diameter of locus coeruleus in each group in passive cutaneous anaphylaxis test　($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	蓝斑直径/mm			
		原液	1∶2	1∶4	1∶8
阴性对照组	6	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
供试品组	6	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
阳性对照组	6	14.3 ±3.3	12.3 ±1.9	10.4 ±1.4	9.2 ±1.2

2.3　体外溶血试验　试验期间,0.9% 氯化钠注射液各试管随 37.0 ℃恒温温育时间的增加,红细胞逐渐下沉,上层液无色澄明,3 h 后适当振摇后下沉的红细胞重新分散,未出现溶血和凝聚现象;灭菌注射用水试管随 37.0 ℃恒温温育时间的增加,悬液逐步呈澄明红色,温浴 3 h 溶液呈澄明红色,试验管底无细胞残留,判定为全部溶血现象。综上所述,本试验体系正常可靠。供试品 1 – 5 号管随 37.0 ℃恒温温育时间的增加,红细胞逐渐下沉,上层液无色澄明,3 h 后适当振摇后下沉的红细胞重新分散,未出现溶血和凝聚现象,与阴性对照组观察结果相同。具体见表 10。

表 10　溶血试验结果

Tab 10　Hemolysis test results

加样溶液	管号	药后不同放置时间的溶血情况					
		15 min	30 min	45 min	1 h	2 h	3 h
供试品	1	A	A	A	A	A	A
	2	A	A	A	A	A	A
	3	A	A	A	A	A	A
	4	A	A	A	A	A	A
	5	A	A	A	A	A	A
阴性对照	6	A	A	A	A	A	A
阳性对照	7	C	C	C	C	C	C

A 无溶血,C 全部溶血;阴性对照为 0.9% 氯化钠注射液;阳性对照为灭菌注射用水

2.4　肌肉刺激试验　肉眼形态学观察结果见表 11。末次给药 72 h 后,所有动物对照侧肌肉无明显变化,反应级平均值为 0;给药侧肌肉 101、103 号动物均表现为出现坏死,有褐色变性;102 号动物表现为中度充血,范围在 0.5 ×1.0 cm 以上,给前侧反应平均值为 2。对照侧和给药侧肌肉刺激程度分别为无刺激性、轻度刺激性。恢复期结束,所有动物对照侧和给药侧肌肉均无明显变化,反应级平均值均为 0;对照侧和给药侧肌肉刺激程度均为无刺激性。

组织病理学检查结果见表 12 及图 1 – 10。末次给药 72 h 后,所有动物对照侧肌肉均未见明显异常;给药侧肌肉 101、103 号动物表现为肌纤维坏死,肌组织间质内炎细胞浸润;102 号动物表现为肌组织内血管充血。恢复期结束,所有动物对照侧和给药侧肌肉均未见明显异常。

表 11　肌肉刺激试验肉眼形态学观察结果(72h)

Tab 11　Macroscopic morphological observations of the muscle irritation test(72h)

动物编号	剖检位置	肉眼形态学观察	反应级分值
101	给药侧	出现坏死,有褐色变性	4
	对照侧	无明显变化	0
102	给药侧	中度充血,范围在 0.5 ×1.0 cm 以上	2
	对照侧	无明显变化	0
103	给药侧	出现坏死,有褐色变性	4
	对照侧	无明显变化	0
104	给药侧	无明显变化	0
	对照侧	无明显变化	0
105	给药侧	无明显变化	0
	对照侧	无明显变化	0

表 12　肌肉刺激试验组织病理学检查结果(72h)

Tab 12　Histopathological examination results of muscle irritation test(72h)

动物编号	剖检位置	组织病理学检查结果
101	给药侧	肌纤维坏死,肌组织间质内炎细胞浸润
	对照侧	未见明显异常
102	给药侧	肌组织内血管充血
	对照侧	未见明显异常
103	给药侧	肌纤维坏死,肌组织间质内炎细胞浸润
	对照侧	未见明显异常
104	给药侧	未见明显异常
	对照侧	未见明显异常
105	给药侧	未见明显异常
	对照侧	未见明显异常

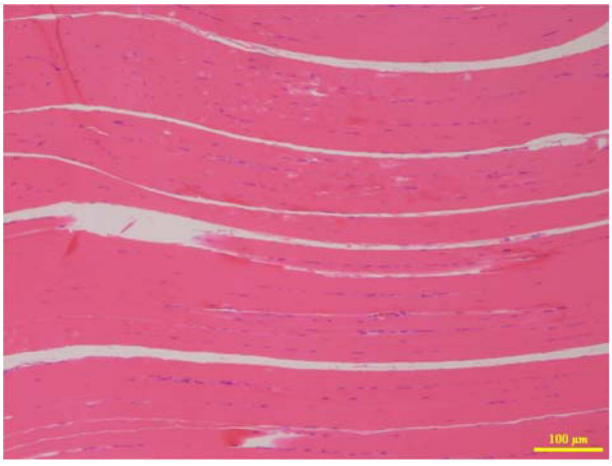

图 1　101 号动物对照侧　HE ×100(72h)

Fig 1　101 control side　HE ×100(72h)

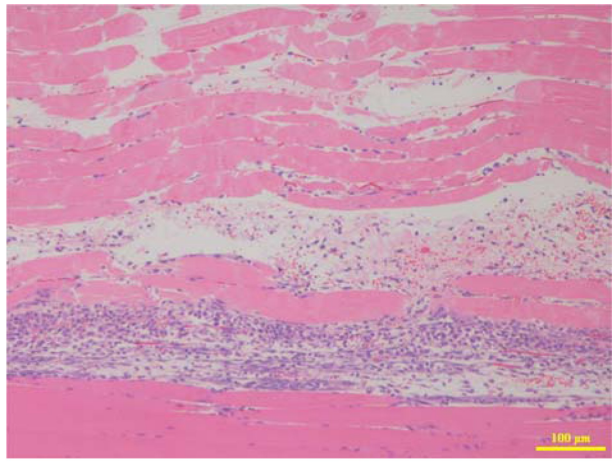

图 2　101 号动物给药侧　HE ×100(72h)

Fig 2　101 treated side　HE ×100(72h)

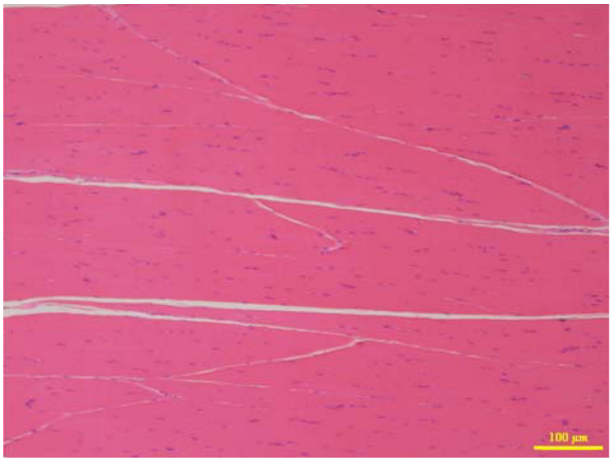

图 3　102 号动物对照侧　HE ×100(72h)

Fig 3　102 control side　HE ×100(72h)

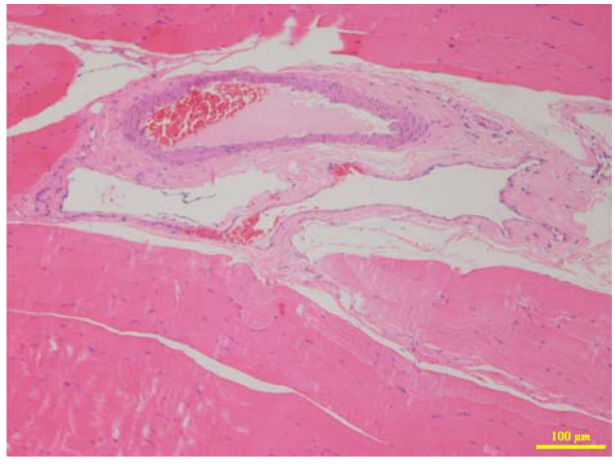

图 4　102 号动物给药侧　HE ×100(72h)

Fig 4　102 treated side　HE ×100(72h)

图 5　103 号动物对照侧　HE ×100(72h)

Fig 5　103 control side　HE ×100(72h)

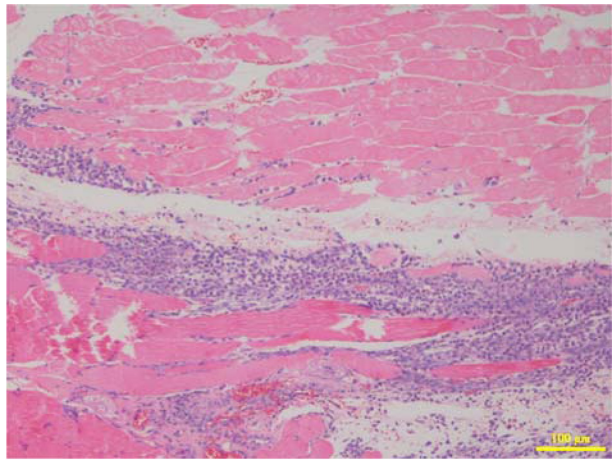

图 6　103 号动物给药侧　HE ×100(72h)

Fig 6　103 treated side　HE ×100(72h)

图 7　104 号动物对照侧　HE × 100(72h)

Fig 7　104 control side　HE × 100(72h)

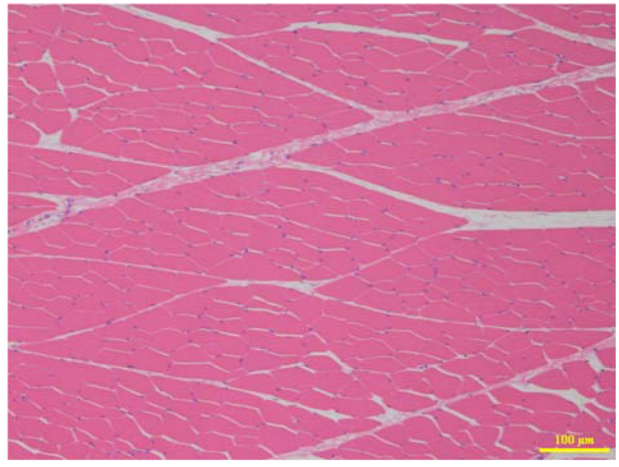

图 8　104 号动物给药侧　HE × 100(72h)

Fig 8　104 treated side　HE × 100(72h)

图 9　105 号动物对照侧　HE × 100(72h)

Fig 9　105 control side　HE × 100(72h)

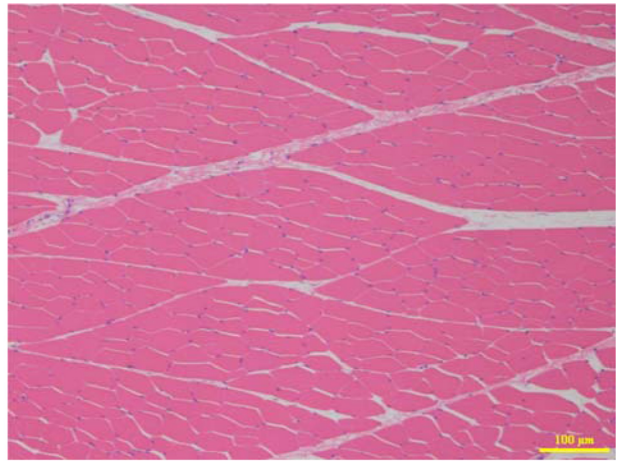

图 10　105 号动物给药侧　HE × 100(72h)

Fig 10　105 treated side　HE × 100(72h)

3　讨　论

药物的活性成分及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质(如 pH 值、渗透压等)均有可能引起刺激性和/或过敏性和/或溶血性的发生,在临床应用前应研究其制剂在给药部位使用后引起的局部和/或全身毒性,以提示临床应用时可能出现的毒性反应、毒性靶器官、安全范围、临床研究监测指标并为临床解毒或解救措施提供参考,保障临床用药的安全、有效。刺激性试验是观察动物的血管、肌肉、皮肤、粘膜等部位接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出、变性或坏死等局部反应;过敏性试验是观察动物接触受试物后是否产生全身或局部过敏反应;溶血性试验是观察受试物是否能够引起溶血和红细胞凝聚等反应[4]。

欧洲药品评价署 EMEA[1] 报道了布舍瑞林在犬和兔子的刺激性研究。结果显示,鼻内、结膜、静脉、肌注、皮下注射给药,均为阴性。

赛诺菲 SUPREFACT(布舍瑞林)产品报告[6]中公布了布舍瑞林的局部耐受性研究。在 2 只兔子中进行布舍瑞林注射液(5 μg/mL)和鼻腔溶液(0.113%,*W/W*)单剂量的局部耐受试验。布舍瑞林在所有给药途径中都能耐受。同时,测定了 SUPREFACT(布舍瑞林)鼻腔溶液(0.1 mL)对兔子的黏膜耐受性。在 6 只动物的左眼结膜囊中各给

药 1 次,右眼作为对照。24 h 后,用生理盐水冲洗。眼角膜、虹膜和眼球都没有发生变化。

布舍瑞林注射液说明书用法用量为:肌内注射;一次量,每头母猪 10 μg 布舍瑞林,即 2.5 mL/头。母猪断奶后 83 ~ 89 h 使用本品 2.5 mL。本品主要诱导机体促进 LH、FSH 的释放,临床为原液制剂给药,故在过敏性研究中,直接采用制剂原液给药,致敏给药体积为 0.5 mL/只,激发给药体积为1 mL/只。肌肉刺激性试验中,依据 Karl - Heinz Diehl 关于动物给药体积的报道以及动物福利等要求,根据实验系统实验兔及临床动物各自种属特点,设计给药体积为 0.5 mL/只,给药 1 次,即给药剂量为 2.0 μg/只。溶血性试验中,采用制剂原液给药。

过敏性研究中,布舍瑞林注射液豚鼠主动全身过敏试验和被动皮肤过敏反应结果均为阴性。刺激性试验中,病理组织学检查可见末次给药 72 h 后,布舍瑞林注射液对新西兰兔股四头肌有明显刺激性;恢复期结束,未见刺激性反应,提示对肌肉刺激性具有可逆性。溶血性试验中,采用 2% 红细胞悬液进行体外试验,布舍瑞林注射液和阴性对照的所有试管在各观察时间点未见溶血,终末未见红细胞凝集,阳性对照组全部溶血。

关于布舍瑞林注射液过敏性、溶血性、刺激性的实验开展的较少。本研究结果有助于提示临床应用时可能出现的不良反应,同时结合药学、药代动力学、药效学、靶动物安全性、毒理研究等共同对临床用药进行指导,以实现安全用药。

参考文献:

[1] EMEA. Buserelin: Summary report[EB/OL]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl - report/buserelin - summary - report - committee - veterinary - medicinal - products_en.pdf.

[2] Veterinary Medicines Directorate. Receptal 0.004 mg/ml Solution for Injection: Scientific discussion[EB/OL]. https://www.vmd.defra.gov.uk/ProductInformationDatabase/files/UKPAR_Documents/UKPAR_330916.PDF.

[3] HPRA. Busol 0.004 mg/ml solution for injection for cattle, horses, rabbits: Publicly Available Assessment Report for a Veterinary Medicinal Product[EB/OL]. https://www.hpra.ie/homepage/veterinary/veterinary - medicines - information/find - a - medicine? query = Buserelin&field = ACTIVESUBSTANCES.

[4] 国家食品药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[EB/OL]. 国家食品药品监督管理总局通告 2014 年第 4 号. 北京: 2014 - 05 - 03.

[5] 农业部. 兽用化学药物安全药理学试验指导原则等[EB/OL]. 中华人民共和国农业部公告第 1247 号. 北京: 农业部, 2009 - 09 - 21.

[6] Sanofi - aventis Canada Inc. PrSUPREFACT®. Buserelin Acetate. Product Monorraph[EB/OL]. http://products.sanofi.ca/en/suprefact.pdf.

(编 辑:李文平)