**Тимуса экстракт, ФС**

**субстанция Взамен ФС 42-3457-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию тимуса экстракта, представляющую собой комплекс пептидов.

Субстанция предназначена для производства готовых лекарственных средств.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию выделяют из ткани железы тимуса крупного рогатого скота, полученого из хозяйств, в которых не зарегистрированы вирусные, бактериальные, прионовые и другие патогены опасные для человека.

Качество сырья (микробиологические показатели, содержание токсичных элементов, антибиотиков и др.) не должно превышать показателей, установленных нормативной документацией, действующей на территории Российской Федерации.

Производство субстанции должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики и в соответствии с требованиями ОФС «Фармацевтическая субстанция животного происхождения».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Лиофилизированный порошок белого цвета.

**Растворимость.** Растворим в воде, практически не растворим в спирте 96 %.

**Подлинность.** Определение активного компонента проводят тремя подходящими валидированными методами.

*1. Качественная реакция с биуретовым реактивом*. Раствор окрашивается в слабо-фиолетовый цвет.

*2. Спектрофотометрический.* Ультрафиолетовый спектр испытуемого раствора в области длин волн от 200 до 300 нм должен иметь два максимума при 205 нм и 269-281 нм.

*3. Биологический* по разделу «Биологическая активность».

**Белок.** Раствор должен оставаться прозрачным, определяют с помощью качественной реакции с трихлоруксусной кислотой. К 1 мл 0,01 % раствора субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида прибавляют 1 мл 10 % раствора кислоты трихлоруксусной.

**Прозрачность.** 0,01 % раствор субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Окраска 0,01 % раствора субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 5,0 до 7,0 (0,01 % раствор субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 1166,7 ЕЭ/мл. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Пирогенность.** Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС **«Пирогенность».**

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Микробиологическая чистота.** Должен соответствовать категории 1. 2. Б.(табл.1). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Биологическая активность.** Восстановление чувствительности должно быть не менее 50 % (количество розеткообразующих клеток не более 50 %). Определение проводят биологическим методом восстановления чувствительности лимфоцитов селезенки тимэктомированных линейных мышей (С57В1/6) к ингибирующему действию азатиоприна.

Приготовление растворов

*Приготовление раствора азатиоприна.* 0,0050 г азатиоприна растворяют в 5 мл 0,2 М натрий-карбонатного буфера (pH 9,8) при температуре (60±2) °С, 10-15 мин тщательно перемешивая.

Срок хранения раствора при температуре (8±2) °С не более 6 сут.

Перед постановкой опыта в пробирку отбирают 0,1 мл приготовленного раствора азатиоприна, прибавляют 4,9 мл среды 199 перемешивают.

Полученный раствор сразу используют в опыт.

*Приготовление 1 % суспензии эритроцитов барана.* Эритроциты барана получают путём взятия крови из ярёмной вены барана. Кровь берут в стерильную банку со стеклянными бусами. Непрерывным сильным встряхиванием кровь дефибринируют в течение 15-20 мин. Эритроциты отмывают 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида до появления бесцветной надосадочной жидкости. Осадок эритроцитов получают центрифугированием при 3000 об/мин. в течение 10 мин. Для приготовления суспензии эритроцитов к 0,1 мл осадка эритроцитов барана прибавляют 9,9 мл среды 199, взвесь суспендируют путем барбатирования автоматической пипеткой. Полученную суспензию используют сразу после приготовления.

*Приготовление 0,2 % раствора гексенала.* 0,0100 г гексенала растворяют в 5 мл 0,9%изотонического раствора натрия хлорида для инъекций, тщательно перемешивают и сразу используют для введения мышам в качестве наркоза.

1. Подготовка к контролю - тимэктомия.

В опыт берут 5 мышей линии С57В1/6, самцов массы 14-16 г и возрастом 8-12 недель. Каждому внутрибрюшинно вводят 0,5 мл 0,2 % раствора гексенала. Через 10-15 мин у животных проводят верхнегрудинный разрез и удаляют железу тимуса аспирацией через пастеровскую пипетку. На операционную рану накладывают 1 шов. Для проведения контроля в опыт берут мышей не ранее, чем через 10-14 суток после тимэктомии.

2. Проведение контроля.

Через 10-14 дней тимэктомированных мышей забивают. Проводят верхнебрюшинный разрез и выделяют селезенку. Затем отбирают 1-2 селезенки по признаку отсутствия очагов некроза или других патологических изменений. Материал помещают в охлажденную микробиологическую среду 199, объемом 3-4 мл. Ткань селезенки гомогенизируют в гомогенизаторе со слабо притертым пестиком и клетки осаждают центрифугированием при 1700 об/мин в течение 5 мин. Затем надосадочную жидкость удаляют к осадку клеток прибавляют 20-30 мл среды 199 и взвесь клеток тщательно суспендируют. Клетки повторно осаждают центрифугированием и надосадочную жидкость удаляют. Данную процедуру повторяют дважды. Затем осадок клеток суспендируют в 2 мл среды 199. В лейкоцитарный меланжер отбирают 0,1 мл суспензии клеток, а затем добавляют 5 % раствор уксусной кислоты до метки. Подсчет клеток осуществляют в камере Горяева. Доводят объем клеточной суспензии средой 199 до концентраций 30 млн. клеток в 1 мл.

Отбирают по 0,1 мл суспензии клеток в 5 пластиковых круглодонных пробирок и нумеруют. В пробирки № 2, 3 и 4 вносят по 0,05 мл свежеприготовленного раствора азатиоприна в среде 199. В пробирку № 3 вносят 5 мкг тимуса экстракта в 0,05 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 %, а в пробирки № 4 и 5 по 10 мкг тимуса экстракта, растворенного в 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида изотонического.

В каждую пробирку вносят среду 199 до объема 0,4 мл. Пробирки закрывают пробками и выдерживают при (35±2) °С в течение 90 мин. Затем в каждую пробирку вносят по 0,1 мл 0,1 % взвеси эритроцитов барана. Пробирки центрифугируют при 2000 об/мин 5 мин и затем инкубируют при (4±2) °С не менее 60 мин. Осадок суспендируют и суспензию из каждой пробирки помещают в камеру Горяева. Подсчет розеткообразующих клеток под микроскопом 25х для объектива 10х для окуляра. За розеткообразующую клетку принимают лимфоцит, присоединивший не менее 3 эритроцитов. Одновременно в камере Горяева подсчитывают количество ядросодержащих элементов.

Количество розеткообразующих клеток на 10 клеток подсчитывают по формуле

Х= $\frac{А ∙10}{В}$, где

X - количество розеткообразующих клеток на 10 ядросодержащих элементов,

А - количество розеткообразующих клеток при подсчете в камере Горяева,

В - количество ядросодержащих элементов при подсчете в камере Г оряева.

Контрольными пробами являются 1, 2 и 5 пробирки. Среднее арифметическое из количества розеткообразующих клеток в контрольных образцах принимают за 100 %.

Количество розеткообразующих клеток в пробирках 3 и 4 должно быть не более 50 % по отношению к значениям контроля.

**Количественное определение.** Фракции свыше 25000 дальтон должна составлять не более 8 % от суммы I, II, III фракций. Фракция от 6000 до 1350 должна составлять не менее 55 % от суммы III и II фракций. Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография»**.**

**Хранение.** При температуре от 2 до 10°С в защищенном от света месте. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств»