

2.1.11.36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭПОЭТИНОВ

В общей фармакопейной статье приведена методика определения активности эпоэтинов (группы эритропоэтинов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК) биологическим методом *in vivo* по стимуляции созревания ретикулоцитов у нормоцитемических мышей.

Активность эпоэтинов определяют, сравнивая активность испытуемого образца с аналогичной активностью стандартного образца эритропоэтина, калиброванного в международных единицах. За международную единицу принимают активность определённого количества международного стандартного образца эритропоэтина, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат эритропоэтина, полученного по технологии рекомбинантной ДНК.

В качестве стандартного образца при определении активности эпоэтинов может быть использован *СО ФЕАЭС эритропоэтина*, калиброванный в международных единицах.

МЕТОДИКА

Концентрации испытуемых растворов и растворов сравнения могут быть изменены в зависимости от диапазона чувствительности используемых животных.

Испытуемый раствор (а). Испытуемый образец разводят *фосфатно-альбуминовым забуференным солевым раствором с рН 7,2 Р1* до получения концентрации 80 МЕ/мл.

Испытуемый раствор (б). Смешивают равные объёмы испытуемого раствора (а) и *фосфатно-альбуминового забуференного солевого раствора рН с 7,2 Р1* до получения концентрации 40 МЕ/мл.

Испытуемый раствор (в). Смешивают равные объёмы испытуемого раствора (б) и *фосфатно-альбуминового забуференного солевого раствора с рН 7,2 Р1* до получения концентрации 20 МЕ/мл.

Раствор сравнения (а). Разводят *СО ФЕАЭС эритропоэтина* в *фосфатно-альбуминовом забуференном солевом растворе с рН 7,2 Р1* до получения концентрации 80 МЕ/мл.

Раствор сравнения (б). Смешивают равные объёмы раствора сравнения (а) и *фосфатно-альбуминового забуференного солевого раствора с рН 7,2 Р1* до получения концентрации 40 МЕ/мл.

Раствор сравнения (в). Смешивают равные объёмы раствора сравнения (б) и *фосфатно-альбуминового забуференного солевого раствора с рН 7,2 Р1* до получения концентрации 20 МЕ/мл.

ВЫБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

В испытании используют мышей подходящего возраста и линий, например, линии B6D2F1, F1(CBA*C57BL) или линии Balb/c в возрасте восьми недель с весом 18–24 г. Животных случайным образом распределяют в шесть клеток не менее чем по восемь особей в каждую.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ

Каждому животному вводят подкожно по 0,5 мл одного из испытуемых растворов или растворов сравнения (всем животным одной клетки вводят одинаковый раствор) и помещают животное в новую клетку. Животных распределяют таким образом, чтобы в каждой клетке содержались мыши, получившие различные дозы испытуемого образца и стандартного образца (испытуемый раствор (а), испытуемый раствор (б), испытуемый

раствор (в), раствор сравнения (а), раствор сравнения (б), раствор сравнения (в)), по шесть особей в клетке.

Через 96 ч после введения растворов забирают образцы крови у животных и определяют количество ретикулоцитов с помощью подходящего метода.

Определение может быть проведено методом проточной цитофлуориметрии (2.1.6.16). Окрашивание ретикулоцитов проводят подходящим красителем, например, тиазоловым оранжевым или акридиновым оранжевым.

Для получения максимальной и стабильной флуоресценции может потребоваться изменение процедуры разведения образцов, объема крови и флуоресцентного красителя.

Может быть использован один из представленных ниже методов окрашивания.

Окрашивание ретикулоцитов тиазоловым оранжевым

Раствор тиазолового оранжевого. Готовят раствор *тиазолового оранжевого Р* в концентрации, в два раза превышающей необходимую для испытания.

Образцы крови разводят в 500 раз буферным раствором, применяемым для приготовления раствора тиазолового оранжевого. Полученный раствор смешивают с раствором тиазолового оранжевого в соотношении 1:1 и выдерживают в течение от 3 мин до 10 мин для окрашивания. После окрашивания определяют количество ретикулоцитов микрофлуориметрическим методом и вычисляют их содержание в процентах с помощью двухпараметрической гистограммы «количество клеток – красная флуоресценция» (620 нм).

Окрашивание ретикулоцитов акридиновым оранжевым

Раствор акридинового оранжевого. Растворяют 3,7 мг *акридинового оранжевого с цинка хлоридом Р* в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10,0 мл. Непосредственно перед использованием 0,5 мл полученного раствора доводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* до объема 100,0 мл.

Образцы крови смешивают с раствором акридинового оранжевого в соотношении 1:500. После окрашивания определяют количество ретикулоцитов микрофлуориметрическим методом и вычисляют их содержание в процентах с помощью двухпараметрической гистограммы «количество клеток – зеленая флуоресценция» (530 нм).

Учет результатов

Рассчитывают активность испытуемого образца общепринятыми статистическими методами параллельных прямых (например, 2.3.12.0).

Рассчитанная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % от заявленной активности, доверительный интервал ($P=0,95$) рассчитанной активности должен быть не менее 64 % и не более 156 % от заявленной активности.