

- in a population at high risk for breast cancer. *BBA Clinical*. 2015; 3:189–95.
16. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., Guerra E.N.S. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: a review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 110: 62–73.
17. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y., Wang X. Untargeted saliva metabolomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*. 2016; 158: 351–60.
18. Takayama T., Tsutsui H., Shimizu I., Toyama T., Yoshimoto N., Endo Y., Inoue K., Todoroki K., Min J.Z., Mizuno H., Toyooka T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 452: 18–26.
19. Cheng F., Wang Z., Huang Y., Duan Y., Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 447: 23–31.
20. Jinno H., Murata T., Sunamura M., Sugimoto M., Kitagawa Y. Breast cancer-specific signatures in saliva metabolites for early diagnosis. *The Breast*. 2015; 24S1: S26–S86.
21. Schapher M., Wendler O., Gröschl M. Salivary cytokines in cell proliferation and cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412: 1740–8.
22. Lubes G., Goodarzi M. GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 147: 312–22.
23. Park Y-D., Jang J-H., Oh Y-J., Kwon H-J. Analyses of organic acids, inorganic anions, and their relationship in human saliva before and after glucose intake. *Archives of oral biology*. 2014; 59: 1–11.
24. Chen Z., Feng S., Pow E.H.N., Lam O.L.T., Mai S., Wang H. Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 438: 231–5.
25. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems “Kapel” [Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza “Kapel”]. St.Peterburg: OOO «Veda»; 2006. (in Russian)
26. Bel'skaya L.V. The use of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Byulleten' nauki i praktiki. Elektronnyi zhurnal*. 2017; 2(15): 132–40. (in Russian)
27. Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., McKnight S.L., Tu B.P. Acetate Dependence of Tumors. *Cell*. 2014; 159: 1591–602.
28. Tekade R.K., Sun X. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discovery Today*. 2017; 22(11): 1637–53.
29. Zhang Y., Song L., Liu N., He C., Li Z. Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2014; 437: 31–7.
30. Klupczynska A., Plewa S., Dyszkiewicz W., Kasprzyk M., Sytek N., Kokot Z.J. Determination of low-molecular-weight organic acids in non-small cell lung cancer with a new liquid chromatography–tandem mass-spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; 129: 299–309.

Поступила 09.01.18

Принята к печати 14.03.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.276.2/4.015.4

Яковлев А.К.¹, Алешкин А.В.², Меркулов В.А.¹, Бондарев В.П.¹

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА

¹ФГБУ НЦЭСМП «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, 127051, Москва, Россия;

²ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и необходимость гармонизации отечественных требований с международными обуславливает актуальность стандартизации методики определения специфической активности. Исследования прецизионности проводили в шести экспериментах на мышах линии Balb/c. В ходе экспериментов варьировали факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал три уровня: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по восемь повторов стандартного и испытуемого образца. Правильность оценивали по смещению относительно опорного значения на пяти уровнях: 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом – по четыре повтора стандартного и испытуемого образца. Испытуемые образцы получали путём серии независимых разведений стандартного образца. Подсчёт ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре. В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого. На основании экспериментального исследования точности и оптимизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены две её валидационные характеристики (правильность и прецизионность). Доказана обоснованность использования логарифмов зарегистрированных величин эритропоэза при статистических расчётах специфической активности эритропоэтина и исследовании валидационных параметров методики. Теоретически и экспериментально обоснованная схема методики включает три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл по 8 животных на каждом и соответствует международным требованиям точности. По результатам экспериментальных исследований правильность характеризуется смещением не более 9% и не превышает диапазон рассчитанной активности (80–125%). Статистическая обработка результатов испытания методом параллельных линий, позволяет про- верить предположение об эквивалентности испытуемого образца стандартному препарату и рассчитать его активность. Доверительный интервал рассчитанной активности при величине внутрилабораторной прецизионности 5,6% составляет от 76 до 131%, что соответствует предложенному диапазону (64–156%, при P = 0,95).

Для корреспонденции: Яковлев Алексей Константинович, вед. микробиолог лаб. иммунологии ; e-mail: yak.Aleksey@gmail.com

Ключевые слова: эритропоэтин; методика определения специфической активности; прецизионность; правильность; доверительный интервал рассчитанной активности.

Для цитирования: Яковлев А.К., Алешкин А.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (7): 422-428. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-422-428>

Yakovlev A.K.¹, Aleshkin A.V.², Merkulov V.A.¹, Bondarev V.P.¹

IMPROVEMENT OF ERYTHROPOIETIN BIOASSAY

¹Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, 125212, Moscow, Russia

The relevance of bioassay standardization results from the lack of consistent national regulatory requirements for evaluation of recombinant human erythropoietin quality and the need to harmonize these requirements with international ones. Precision studies were carried out in 6 experiments on Balb/C mice. The factors that can influence the accuracy of the method were altered during the experiments. Each experiment included three levels: 20, 40 and 80 IU/ml, and 8 replicates for the reference and test samples. The trueness was estimated by bias relative to the reference value at 5 levels: 10, 20, 40, 80 and 160 IU/ml, and 4 replicates for the reference and test samples at each level. The test samples were prepared by a series of independent dilutions of the reference standard. Reticulocyte count was performed using a flow cytometer. 5 µmol acridine orange solution was used as a dye. Experimental study of accuracy and optimization of erythropoietin bioassay procedure helped to obtain two validation characteristics (trueness and precision). It was shown that logarithms of erythropoiesis registered values could reasonably be used in statistical calculations of erythropoietin specific activity and evaluation of the method's validation parameters. The theoretically and experimentally justified test procedure includes three levels of doses: 20, 40 and 80 IU/ml, and 8 animals for each level, which is consistent with the international requirements for accuracy. According to the results of experimental studies, the trueness is characterized by a bias of no more than 9 % and does not exceed the range of the calculated activity (80-125 %). Statistical processing of the test results by the parallel-line method makes it possible to check the assumption of equivalence of the test and reference samples and to calculate the test sample activity. The confidence limit of the calculated activity for intra-laboratory precision of 5.6 % is equal to 76-131 % which complies with the proposed range (64-156 %, P=0.95).

Key words: erythropoietin, bioassay, precision, trueness, confidence limit of the calculated activity.

For citation: Yakovlev A.K., Aleshkin A.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Improvement of erythropoietin bioassay. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*, 2018; 63 (7): 422-428. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-422-428>

For correspondence: Yakovlev A. K., Leading microbiologist of the Laboratory of Immunology of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: yak.aleksey@gmail.com

Information about author:

Yakovlev A.K., <http://orcid.org/0000-0002-2809-1819>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.03.2018
Accepted 13.04.2018

Введение. Методика определения специфической активности (СА) эритропоэтина служит неотъемлемой частью оценки качества при производстве и реализации лекарственных препаратов эритропоэтина. Наличие в препаратах эритропоэтина нескольких изоформ [1] с разной активностью обуславливает их дозирование не по количеству вещества, а по активности, которая проявляется ответной реакцией организма на количество введённого препарата в виде стимуляции эритропоэза, в результате получают безразмерный показатель. В связи с этим ВОЗ рекомендует определять активность эритропоэтина в относительных – международных единицах (МЕ) [2], отражающих биологическую активность. Комитет биологической стандартизации разработал эталон МЕ эритропоэтина – международный стандартный образец [3, 4] и установил процедуру определения специфической активности.

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований (ОФС) к оценке качества препаратов эритропоэтина привело к различиям в методике и точности определения их СА (табл. 1). В соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 для оценки точности результатов измерений используют две характеристики: правильность и прецизионность.

Согласно данным, представленным в табл. 1, различия в требованиях к параметрам проведения методики и расчёту результата у разных отечественных производителей лекарственных препаратов эритропоэтина заключаются в использовании мышей разных линий, количестве животных в группе, вводимых дозах, способе подсчёта ретикулоцитов, выборе статистического метода обработки и диапазоне рассчитанной активности.

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и необходимость гармонизации отечественных требований с международными обуславливают актуальность стандартизации методики определения специфической активности. Введение в Государственную фармакопею РФ ОФС на упомянутую методику регламентирует контроль основного качества данных препаратов в соответствии с международными требованиями, что обеспечит их эффективность и повысит безопасность клинического применения.

Способ подсчёта ретикулоцитов – один из значимых факторов, определяющих вариабельность результатов. Исследование точности способов подсчёта ретикулоцитов, проведённое ранее [5], показало, что результаты

Схема методики определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина отечественных производителей

Параметр	Требования					
	Нормативной документации отечественных производителей					Европейской фармакопеи
	1	2	3	4	5	
Линия мышей	Беспородные	F1(CBA*С57BL) Balb/c	Balb/c	F1(CBA*С57BL)	B6D2F1	
Количество	Не менее 7	5	8	6	Не менее 8	
Дозы, МЕ/мл	10,20,40,80	0, 10, 20, 40, 80	0, 20, 40, 80	20, 40, 80	20, 40, 80	
Способ подсчёта ретикулоцитов	Визуальный		Визуальный/ геманализатор	Микрофлуориметрический	Микрофлуориметрический	
Статистический метод	Регрессионный	Параллельных линий		Регрессионный	Параллельных линий	
Критерий приемлемости испытания	–	Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)		–	Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)	
Диапазон рассчитанной активности, %	80–120		80–125	80–120	80–125	
Доверительный интервал рассчитанной активности, (P=0,95), %	–		–	–	64–156	

Примечание. Данный параметр не используют в схеме методики.

проточной цитометрии по прецизионности в 2 раза выше визуального способа, что указывает на возможность введения дополнительного, установленного ведущими фармакопеями, критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности.

Цель данной работы – исследование точности и совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина.

Задачи исследования. 1. Оценка типа распределения регистрируемых показателей эритропоэза. 2. Обоснование оптимальной схемы методики. 3. Исследование прецизионности и правильности методики.

Материал и методы. Исследование прецизионности методики определения специфической активности эритропоэтина проводили на нормоцитемических мышцах линии *Balb/C* ($n = 288$), которая была выбрана по результатам предварительно проведённого нами изучения условий стандартизации методики [6]. Животных получали из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, содержание и уход осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 и Европейской конвенцией [7]. Исследование проводили в шести экспериментах по схеме, изменяющей факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал 3 уровня: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по 8 повторов стандартного образца эритропоэтина Европейской Фармакопеи (European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3) и испытуемого образца (испытываемые образцы получены путём серии разведений стан-

дартного образца), что составило набор для проведения серии параллельных испытаний. Правильность оценивали на пяти уровнях: 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом по 4 повтора стандартного и испытуемого образца (мышь линии *Balb/C*, $n = 40$).

Обязательным условием проведения всех испытаний была рандомизация животных по массе тела, назначение которой заключалось в том, чтобы, распределённые объекты в подгруппах не оказались более однородными, чем вся совокупность в целом, что позволило исключить дополнительные источники вариации. Каждому животному подкожно вводили по 0,5 мл одной дозы, затем помещали в новую клетку. Распределение по клеткам было выполнено таким образом, чтобы в каждой содержались мыши, получившие одну из доз.

Схема исследования прецизионности включала в себя определение влияния факторов в рамках одного уровня дозы и между уровнями, что позволило получить оценки вариабельности методики, которые использовали для проверки и прогнозирования внутрилабораторной прецизионности. Через 4 сут после введения растворов у животных из ретроорбитального синуса глаза отбирали образцы крови (200–300 мкл) в пробирки с K_2 ЭДТА. Каждому образцу крови присваивали определённый номер, который соответствовал дозе, полученной животным. Подсчёт ретикулоцитов проводили на проточном цитоф-

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа на примере уровня 20 МЕ/мл

Источник изменчивости	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	Оценки компонент дисперсии
Между параллельными испытаниями	7	0,196	0,028	0,0083
Остаточная дисперсия внутри уровня	8	0,091	0,011	0,0114
Сумма	15	0,287	-	-



Рис. 1. Гистограмма распределения количества ретикулоцитов.

Таблица 3

Компоненты дисперсии и общая вариабельность уровней испытаний

Компонента	Уровень, МЕ/мл			Среднее
	20	40	80	
Дисперсия между	0,0083	0,0078	0,0060	0,0074
Дисперсия внутри	0,0114	0,0176	0,0107	0,0132
ПП, %	15,1	17,3	13,8	15,4

Таблица 4

Дисперсия и общая вариабельность испытаний (6 экспериментов)

Компонента	Номер испытания					
	1	2	3	4	5	6
Дисперсия между	0,0024	0,0005	0,0074	0,0001	0,0016	0,0051
Дисперсия ошибки	0,0159	0,0085	0,0132	0,0064	0,0089	0,0062
ПП, %	14,5	9,9	15,4	8,2	10,7	11,2

луориметре (Navios, Beckman Coulter, США). В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого (Sigma-Aldrich, США). Результаты выражали в процентах количества ретикулоцитов на 1000 эритроцитов. Проверку первичных данных на нормальность распределения проводили в соответствии с общепринятой методикой [8]. Анализ компонент дисперсии и исследования по оценке правильности и прецизионности методики проводили в соответствии с Американской фармакопеей, раздел «Валидация биологических методов» [9]. Промежуточную прецизионность (ПП) выражали как процент геометрического коэффициента вариации (%GCV) и определяли по формуле:

$$ПП = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}} + \sigma^2_{\text{внутри}}}} - 1) \% \quad (1)$$

Прогнозируемая вариабельность (ПВ) для независимых уровней (k) с серией разведений (n) испытуемого препарата в рамках одного эксперимента рассчитывали по формуле:

$$ПВ = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}}/k + \sigma^2_{\text{внутри}}/(nk)}} - 1) \% \quad (2)$$

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 правильность – это степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению. Правильность оценивали по смещению и рассчитывали по формуле:

$$\text{Смещение} = 100 \times \left(\frac{\text{измеренная активность}}{\text{опорное значение}} - 1 \right) \% \quad (3)$$

Результаты и обсуждение. Стимуляцию эритропоэза оценивали в процентах ретикулоцитов на 1000 эритроцитов, полученные результаты характеризовались вариабельностью (рис. 1). Величина коэффициента асимметрии ($As = 0,09$) близка к нулю, коэффициент эксцесса (Ex) заметно выражен и равен $-1,03$, что превышает табличное критическое значение $Ex_{\text{крит}} = 0,867$ при уровне значимости $\alpha = 1\%$, поэтому гипотеза о нормальности распределения отвергается. Поскольку статистические методы, используемые в исследовании, требуют, чтобы данные были близки к нормальному распределению, результаты были подвергнуты логарифмическому преобразованию по основанию натурального логарифма (e) (рис. 2). Полученные величины коэффициента асимметрии и эксцесса ниже табличных



Рис. 2. Гистограмма распределения количества ретикулоцитов (Ln).

Примечание. Данные после логарифмического преобразования.

($As_{\text{крит}} = 0,802$; $Ex_{\text{крит}} = 0,867$, при $n = 48$ и уровне значимости $\alpha = 1\%$), что указывает на близость к нормальному распределению [8].

Прецизионность методики исследовали в рамках независимых экспериментов, в ходе проведения её оценки использовали первичные регистрируемые результаты подсчёта ретикулоцитов методом проточной цитометрии после логарифмического преобразования. Стратегия параллельных испытаний на всех уровнях была одинаковой, поэтому компоненты дисперсии определены на основании стандартного однофакторного дисперсионного анализа. Результаты дисперсионного анализа для модели компонент дисперсии приведены в табл. 2.

Оценки компонент дисперсии рассчитали на каждом уровне испытания по прецизионности. ПП выражали как процент геометрического коэффициента вариации (%GCV) и определяли по формуле (1), результаты представлены в табл.3.

Соотношение максимальной и минимальной дисперсий между параллельными испытаниями составляет 1,4, внутри уровня 1,6 предельным значением по схеме исследования является 6. При превышении этой величины за счёт избыточной вариабельности данный уровень следовало бы исключить из дальнейшего анализа и ограничить диапазон применения методики. Валидационные испытания имели сбалансированный дизайн, поэтому дисперсии между уровнями усреднили, геометрический коэффициент прецизионности методики составил 15,4%.

Результаты средних оценок дисперсий и ПП по шести экспериментам представлены в табл. 4.

Таблица 5

Прогнозируемая вариабельность методики (в %) для комбинаций уровней и параллельных испытаний

Количество испытаний (n)	Вариабельность методики для уровней (k)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	15,4	10,7	8,6	7,4	6,6	6,0	5,6	5,2
2	12,6	8,7	7,1	6,1	5,4	4,9	4,6	4,3
3	11,5	8,0	6,5	5,6	5,0	4,5	4,2	3,9
4	10,9	7,6	6,2	5,3	4,7	4,3	4,0	3,7
5	10,5	7,3	6,0	5,1	4,6	4,2	3,9	3,6
6	10,3	7,2	5,8	5,0	4,5	4,1	3,8	3,5
7	10,1	7,0	5,7	4,9	4,4	4,0	3,7	3,5
8	10,0	7,0	5,6	4,9	4,3	4,0	3,7	3,4

Оценки дисперсии использовали для определения схемы методики с желаемым уровнем прецизионности. Ожидаемую вариабельность для независимых уровней (k) с серией разведений (n) испытуемого препарата в рамках эксперимента №3 рассчитывали по формуле (2). В табл. 5 представлен прогноз внутрилабораторной прецизионности при различных комбинациях количества уровней и параллельных испытаний по результатам эксперимента №3, выбранного по максимальной величине среднего геометрического коэффициента вариации по трём уровням.

Расчёт расширили путём включения различных комбинаций уровней и количества параллельных испытаний. Наиболее эффективным способом сокращения вариабельности окончательного значения по результатам, представленным в табл. 5, является увеличение количества независимых уровней.

Следующим этапом было определение правильности и её доверительных интервалов. Исходными данными служила рассчитанная активность единичного измерения. Активность рассчитывали путём сопоставления эффекта стандартного и испытуемого образцов, проявляемого в виде количества ретикулоцитов, и выражали в МЕ. С учётом полученных при исследовании прецизионности результатов для оценки правильности выбрали 5 уровней доз 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом – по 4 повтора стандартного и испытуемого образца (рис. 3).

Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о значительной вариабельности результатов активности внутри уровней 10 и 160 МЕ/мл. Для выбора схемы методики принципиально важным является степень корреляции между эталоном и рассчитанной по нему активности. Этому условию соответствует участок прямой в диапазоне 20–80 МЕ/мл (уравнение регрессии $y = 1,0069x$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,97$). Правильность оценивали по смещению на отдельных уровнях, а также путём отслеживания зависимости на всех уровнях. Смещение на отдельных уровнях рассчитывали по формуле (3).

В табл. 6 приведены среднее значение и 90% доверительный интервал на логарифмической шкале, а также соответствующие активность и смещение.

Изменения величины смещения на разных уровнях и его 90% доверительные интервалы (рис. 4) согласуются с графиком линейной зависимости (см. рис. 3).

Диапазон рассчитанной активности определили от 80 до 125 %, по результатам анализа требований нормативной документации отечественных производителей (у большинства из них его границы от 80 до 120%). Следуя рекомен-

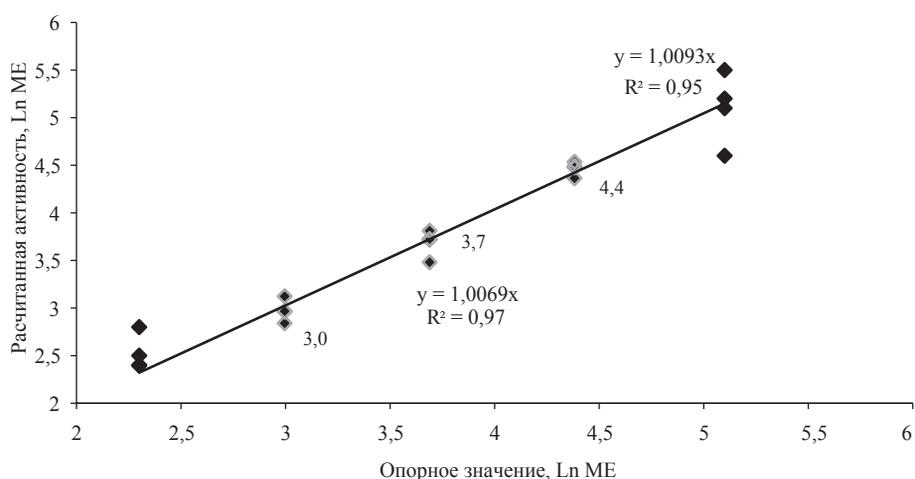


Рис. 3. Результаты исследования правильности по уровням.

Примечание. Крайние уровни 2,3 и 5,1 – это результаты, имеющие значительную вариабельность при визуальной оценке, уровни 3,0, 3,7, 4,4 – участок линейной зависимости (уравнение регрессии $y = 1,0069x$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,97$).

дациям (USP раздел <1033>) верхнюю границу доверительного интервала при логнормальном распределении рассчитывают по формуле $1,00/0,80 * 100\% = 125\%$.

На рис. 4 между уровнями не прослеживается зависимость смещения. Её наличие указывало бы на систематическое отклонение при сравнении образцов с разными показателями относительной активности. После установления отсутствия зависимости смещения между уровнями провели оценку правильности на каждом уровне. В нашем случае 90% доверительные интервалы смещения на уровнях 10 и 160 МЕ/мл выходят за пределы диапазона приемлемости, что, возможно, связано с вариабельностью определения, полученного вследствие небольшой выборки данных.

Исходя из полученных результатов оценки внутрилабораторной прецизионности и правильности, можно сделать заключение о целесообразности схемы методики с тремя уровнями доз – 20, 40 и 80 МЕ/мл. В данном диапазоне применения методики сохраняется удовлетворительная точность (см. рис. 3 и 4).

Прецизионность в целом характеризуется доверительным интервалом, поэтому результат испытания лучше представлять вместе с доверительным интервалом рассчитанной активности. Однако в спецификациях отечественных производителей данный критерий приемлемости результатов отсутствует. В целях гармонизации отечественных требований определения СА эритропоетина с международными целесообразно ввести в ОФС «Определение специфической активности

Таблица 6

Средняя активность и относительные систематические ошибки на разных уровнях

Уровень доз, МЕ/мл	Активность						Стандартное отклонение	GCV,%	Смещение	90 % (ДИ)	
	Среднее геом.	90 % (ДИ)		Среднее Ln	90 % (ДИ)					min	max
		min	max		min	max					
10	12,4	9,9	15,6	2,52	2,29	2,75	0,19	21,4	24	-0,99	56,1
20	19,6	17,1	22,4	2,97	2,84	3,11	0,12	12,3	-2	-14,7	12,0
40	39,8	33,7	47,0	3,68	3,52	3,85	0,14	15,2	-1	-15,8	17,5
80	87,1	80,0	94,9	4,47	4,38	4,55	0,07	7,5	9	-0,04	18,6
160	166	107,7	257	5,11	4,68	5,55	0,37	44,8	4	-32,7	60,7

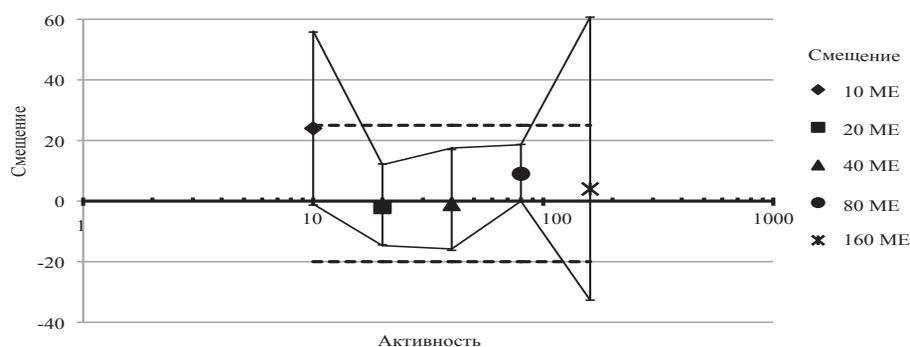


Рис. 4. График 90% доверительных интервалов для смещения.

Примечание. Сплошная горизонтальная линия - целевое значение смещения, пунктирные линии - диапазон рассчитанной активности.

препаратов эритропоэтина» критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности и требования (от 64 до 156%). Границы доверительного интервала рассчитывали исходя из диапазона активности (80–125%) и правильности методики (смещение не более 9%) $80\%/125\%*100\% = 64\%$ – нижний доверительный интервал рассчитанной активности и $125\%/80\%*100\% = 156\%$ – верхний доверительный интервал рассчитанной активности.

Доверительный интервал рассчитанной активности при величине внутрилабораторной прецизионности 5,6% составляет 76 – 131%, рассчитан нами ранее [5] методом параллельных линий и соответствует международным требованиям (64 – 156%, при $P = 0,95$) (см. табл. 1). Согласно общепринятой международной и отечественной практике определение СА препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека проводят относительно стандартного образца, поэтому в методике должен быть реализован подход, основанный на эквивалентности для изучения подобия (критерий параллельности) [10]. Для экспериментально обоснованного формата методики, ограниченного тремя уровнями доз, применима статистическая обработка результатов методом параллельных линий. В основе данного метода лежит дисперсионный анализ, который позволяет достоверно проверить предположение об эквивалентности сравнением двух линий на графике, построенных по средним величинам в серии разведений. Параллельность – фундаментальный принцип сравнения двух биологических препаратов. Наличие параллельности линий означает, что стандартный образец и испытуемый препарат имеют одинаковую природу [11], содержат одно и то же активное начало, но в разном соотношении активного и неактивного компонентов, её отсутствие указывает на несопоставимость препаратов.

Следовательно, теоретически и экспериментально обоснованный формат методики, ограниченный тремя уровнями доз, и статистическая обработка результатов методом параллельных линий в целом обеспечивают корректное определение специфической активности в МЕ и оценку качества лекарственного препарата эритропоэтина.

Заключение. На основании экспериментального исследования точности и оптимизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены две её валидационные характеристики (правильность и прецизионность) и сделаны выводы:

1. Доказана обоснованность использования логариф-

мов зарегистрированных величин эритропоэза при статистических расчётах специфической активности эритропоэтина и исследовании валидационных параметров методики. Статистическая обработка результатов методом параллельных линий обеспечивает проверку фундаментального принципа сравнения двух препаратов – подобие (параллельность).

2. Теоретически и экспериментально обоснованная схема (формат) методики включает три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл по 8 животных на каждом и наиболее пригодна для достижения между-

народных требований точности к методике определения специфической активности эритропоэтина.

3. По результатам исследований правильность характеризуется смещением не более 9% и не превышает диапазон рассчитанной активности от 80 до 125%; геометрический коэффициент внутрилабораторной прецизионности равен 5,6%, что соответствует рекомендованному международными требованиями диапазону (от 64 до 156%, при $P = 0,95$) доверительного интервала рассчитанной активности. Для обоснованной оптимальной схемы методики допустимо использование рекомендованного показателя – доверительного интервала рассчитанной активности с гармонизированным нормативом от 64 до 156%.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 7, 9, 10 см. REFERENCES)

- Яковлев А.К., Гайдерова Л.А., Подкуйко В.Н., Волкова Р.А., Алпатова Н.А., Олефир Ю.В. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи. *Стандартные образцы*. 2016; 3: 4-11.
- Яковлев А.К., Алпатова Н.А., Постнова Е.Л., Симутенко Л.В., Батушвили Т.А. Исследование стандартности методики определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитических мышах. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(S): 77-8.
- Лакин Г.Ф. *Биометрия*. Учебное пособие. 4-е изд. М.: Высшая школа; 1990.
- Петухов В.Г. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других медицинских иммунобиологических препаратов в иммуноферментном анализе. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2004; 13 (1): 19-23.

REFERENCES

- Storing P.L., Tiplady R.J., Gaines Das R.E., Rafferty B., Mistry Y.G. Lectin binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J. Endocrinol.* 1996; 150(3): 401-12.
- Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series, Annex 2. *Expert Committee on biological standardization*. Geneva. 2006; 932: 73-131.
- Cotes P.M., Bangham D.R. The International Reference Preparation

- of Erythropoietin. *Bull. World Health Organ.* 1966; 35(5): 751-60.
4. Burns Chr., Tiplady R., Hockley J. WHO International Collaborative study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay. *Expert Committee on biological standardization.* Geneva. 2012: 1-23.
 5. Yakovlev A.K., Gayderova L.A., Podkuyko V.N., Volkova R.A., Alpatova N.A., Olefir Yu.V. The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European pharmacopeia. *Standartnye obraztsy.* 2016; 3: 4-11. (in Russian)
 6. Yakovlev A.K., Alpatova N.A., Postnova E.L., Simutenko L.V., Batuashvili T.A. Study standard methodology for determining the specific activity of erythropoietin on normocytemic mice. *Meditinskaya immunologiya.* 2017; 19(S): 77-8. (in Russian)
 7. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986.
 8. Lakin G.F. *Biometry [Biometriya. Uchebnoe posobie]*. 4th ed. Moscow : Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)
 9. USP<1033>BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION. Available at: https://dlscrib.com/queue/usp-1033-biological-assay-validation-pdf_58bf8c24e12e899a02add37d_pdf?queue_id=59a52e4ddc0d60f87c568edc[accessed 21.02.2018].
 10. USP<1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS. Available at: https://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1032.pdf[accessed 21.02.2018].
 11. Petukhov V.G. The method of parallel lines for the quantitative evaluation of the quality of standards and other medical immunobiological preparations in the enzyme immunoassay. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2004; 13(1): 19-23. (in Russian)

Поступила 15.03.18

Принята к печати 13.04.18

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.828.6]-092:612/017.1]-078.33

Селимова Л.М.¹, Калнина Л.Б.¹, Серебровская Л.В.², Иванова Л.А.², Носик Д.Н.¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МТ-4 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва;

²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва

В системе in vitro на модели неопластической клеточной линии МТ-4 было изучено влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркеров активации. Проведённые исследования показали изменение экспрессии таких маркеров активации, как CD28⁺, CD38⁺, HLA-DR⁺ и CD69⁺. Динамика этих показателей при использовании плазм пациентов без лечения и пациентов, принимающих антиретровирусную терапию (АРТ), показала, что перечисленные белки могут рассматриваться как маркеры для оценки уровня активации иммунной системы пациентов. Исследования показали снижение активационного потенциала клеток при использовании плазм пациентов с АРТ и повышение без лечения. Изучение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69 при использовании МТ-4 клеток и плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией может иметь прогностическое значение для мониторинга инфекции и эффективности различных терапевтических схем.

Ключевые слова: МТ-4 клетки; фенотипические маркеры CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺, HLA-DR⁺, CD95⁺.

Для цитирования: Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Использование неопластической клеточной линии МТ-4 для изучения иммуномодулирующей активности плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63(7): 428-433. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-428-433>

Selimova L.M.¹, Kalnina L.B.¹, Serebrovskaya L.V.², Ivanova L.A.², Nosik D.N.¹

APPLICATION OF MT-4 NEOPLASMIC CELL LINE FOR THE STUDY IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF PATIENT PLASMA WITH HIV-INFECTION

¹«The D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology» of «N.F. Gamaleya NRCM», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow;

²«Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumer Rights Protection and People's Welfare», 111123, Moscow

It was studied in vitro the immunomodulatory effect of plasma HIV-infected individuals on expression of activation markers when used as a model neoplastic cell line MT-4. Carrying out researches indicated the variation in expression of the activation markers CD28⁺, CD38⁺, HLA-DR⁺ and CD69⁺. Change dynamics of these indices showed that these proteins can to consider as markers for