**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ОФС.0.0.0000 |
| **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНОВ** |

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

Активность эпоэтинов определяют, сравнивая активностьиспытуемого образцас аналогичной активностью фармакопейного 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.

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 забуференнымфизиологическим раствором рН 7,2 (1)* до получения концентрации 80 МЕ/мл.

*Испытуемый раствор (б)*. Смешивают равные объёмы испытуемого раствора (а) и *фосфатно-альбуминового забуференногофизиологического раствора рН 7,2 (1)* до получения концентрации 40 МЕ/мл.

*Испытуемый раствор (в)*. Смешивают равные объёмы испытуемого раствора (б) и *фосфатно-альбуминового забуференногофизиологического раствора рН 7,2 (1)*до получения концентрации 20 МЕ/мл.

*Раствор сравнения (а)*. Разводят фармакопейный стандартный образец *эритропоэтина* в *фосфатно-альбуминовом забуференномфизиологическомрастворе рН 7,2 (1)* до получения концентрации 80 МЕ/мл.

*Раствор сравнения (б)*. Смешивают равные объёмы раствора сравнения (а) и *фосфатно-альбуминового забуференногофизиологического раствора рН 7,2 (1)* до получения концентрации 40 МЕ/мл.

*Раствор сравнения (в)*. Смешивают равные объёмы раствора сравнения (б) и *фосфатно-альбуминового забуференногофизиологического раствора рН 7,2 (1)* 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/св возрасте восьми недельc 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) ипомещаютживотное в новую клетку. Животных распределяют таким образом, чтобы в каждой клеткесодержались мыши, получившие различные дозы испытуемого образца и фармакопейного 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 ретикулоцитовс помощью подходящего метода.

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

Для получения максимальной и стабильной флуоресценцииможет потребоваться изменение процедуры разведения образцов, объёма крови и флуоресцентного красителя.

Может быть использован один из представленных ниже методов окрашивания.

**Окрашиванниеретикулоцитовтиазоловым оранжевым**

*Раствор тиазоловогооранжевого*. Готовят раствор *тиазолового оранжевого* 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 растворомтиазолового оранжевого в соотношении 1:1 и выдерживают в течение от 3 мин до 10 мин для окрашивания. После окрашивания определяют количество ретикулоцитовмикрофлуориметрическим методом и вычисляют их содержание в процентах с помощью двухпараметрической гистограммы «количество клеток – красная флуоресценция» (620 нм).

**Окрашиванниеретикулоцитов акридиновым оранжевым**

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

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

**Учёт результатов**

Рассчитывают активность испытуемого образца общепринятыми статистическими методами параллельных прямых (например, *ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»*).

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.