

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВЕЩЕСТВ И МАТЕРИАЛОВ

MODERN METHODS OF ANALYSIS OF SUBSTANCES AND MATERIAL

Статья поступила в редакцию 14.07.2016

УДК 54.06

DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-3-4-11

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ГАРМОНИЗАЦИИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОВ С ТРЕБОВАНИЯМИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕИ

Яковлев А.К., Гайдерова Л.А., Подкуйко В.Н., Волкова Р.А., Алпатова Н.А., Олефир Ю.В.

**Актуальность исследования.** Задача импортозамещения в здравоохранении, разработка нормативно-правовых актов в рамках ЕВРАЗЭС ставит вопросы гармонизации отечественных требований с международными, в том числе при стандартизации лекарственных средств. В связи с этим актуальна оценка качества отечественных рекомбинантных человеческих эритропоэтинов (рчЭПО) в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи. Основным показателем качества препаратов рчЭПО – специфическую активность – в РФ определяют по влиянию препарата на стимуляцию эритропоэза, подсчитывая количество ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии или световой микроскопии, последний способ подсчета не включен в Европейскую фармакопею. Адекватная оценка указанного показателя необходима при разработке национальных требований к контролю качества препаратов рчЭПО, гармонизированных с Европейской фармакопеей.

**Цель работы:** сравнительная оценка точности метода определения специфической активности эритропоэтина при учете результатов с помощью проточной цитометрии и световой микроскопии для гармонизации проекта общей фармакопейной статьи с Европейской фармакопеей.

**Методы исследования.** Специфическую активность эритропоэтина определяли *in vivo* на нормоцитемических мышцах при учете результатов с помощью проточной цитометрии в соответствии с Европейской фармакопеей и световой микроскопии. Сравнивали два независимых ряда разведений стандартного образца эритропоэтина Европейской фармакопеи.

**Результаты.** Результаты определения специфической активности эритропоэтинов с использованием двух способов подсчета различаются по смещению относительно опорного значения (аттестованного значения): при проточной цитометрии наблюдается смещение в пределах 1–8 %, при световой микроскопии – 4–31 %. При оценке промежуточной прецизионности установлено, что дисперсия результатов определения специфической активности эритропоэтинов, полученных при учете проточной цитометрией, в 2 раза меньше, чем при использовании световой иммерсионной микроскопии.

**Вывод.** Определение специфической активности препаратов эритропоэтинов с использованием проточной цитометрии характеризуется высокой точностью и соответствует требованиям Европейской фармакопеи. Рассмотрена возможность использования световой микроскопии для учета результатов при отсутствии проточного цитометра, использование световой микроскопии требует повышения точности в целях гармонизации методики с требованиями Европейской фармакопеи.

**Ключевые слова:** эритропоэтин рекомбинантный человеческий, метод определения специфической активности, сравнительный анализ, валидация, точность, правильность, прецизионность.

✓ **Ссылка при цитировании:** Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями европейской фармакопеи / А.К. Яковлев [и др.] // Стандартные образцы. 2016. № 3. С. 4–11. DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-3-4-11.

#### Авторы:

##### ЯКОВЛЕВ А.К.

Ведущий микробиолог лаборатории иммунологии  
Испытательного центра экспертизы качества МИБП  
Российская Федерация, 127051, Москва,  
Петровский бул., 8  
Тел.: 8 (985) 994-09-63  
E-mail: YAK.Aleksey@gmail.com

##### ГАЙДЕРОВА Л.А.

Начальник лаборатории иммунологии  
Испытательного центра экспертизы качества МИБП,  
канд. мед. наук.

##### ПОДКУЙКО В.Н.

Старший научный сотрудник, эксперт 1-й категории  
Управления экспертизы противовирусных МИБП  
Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук

##### ВОЛКОВА Р.А.

Начальник лаборатории молекулярно-биологических  
и генетических методов испытаний Испытательного  
центра экспертизы качества медицинских  
иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный  
центр экспертизы средств медицинского  
применения» Минздрава России, д-р биол. наук

##### АЛПАТОВА Н.А.

Главный эксперт лаборатории иммунологии  
Испытательного центра экспертизы качества МИБП,  
канд. биол. наук

##### ОЛЕФИР Ю.В.

Генеральный директор ФГБУ «Научного центра  
экспертизы средств медицинского применения»  
Минздрава России, д-р мед. наук

#### Используемые сокращения

рчЭПО – Рекомбинантный человеческий эритропоэтин  
ЕФ – Европейская фармакопея  
ОФС – Общая фармакопейная статья

#### Введение

Эритропоэтин – это цитокин, который регулирует эритропоэз, стимулируя созревание эритроцитов. Лекарственные препараты на основе рчЭПО применяют для профилактики и лечения анемий различного генеза, в том числе при хронической почечной недостаточности, при онкологических заболеваниях после химиотерапии препаратами, угнетающими эритропоэз, а также для увеличения объема донорской крови для последующей аутоотрансфузии [1–3].

Одним из основных показателей качества препаратов рчЭПО является специфическая активность [4]. Адекватная оценка этого показателя необходима для обеспечения практического здравоохранения стандартными лекарственными средствами на основе рчЭПО. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (ЕФ) специфическую активность определяют биологическим методом по уровню стимуляции эритропоэза у полицитемических и нормоцитемических мышей, при этом оценивают не только значение активности, но и доверительный интервал результатов определения (табл. 1). При проведении

Таблица 1

Требования Европейской фармакопеи к показателю «Специфическая активность» для эритропоэтинов

Метод	Способ учета	Диапазон рассчитанной активности, %	Доверительный интервал рассчитанной активности, ( $P = 0,95$ ), %
На полицитемических мышах	Гамма-счетчик	80–125	64–156
На нормоцитемических мышах	Проточная цитометрия		

испытания на полицитемических мышах активность препарата оценивают по степени включения изотопа железа в циркулирующие эритроциты. Однако выполнение этого метода связано с использованием радиоактивной метки, что ограничивает его применение. При использовании в испытании нормоцитемических мышей стимуляцию эритропоэза учитывают, определяя в крови животных количество ретикулоцитов, окрашенных флуоресцентным красителем, с помощью проточного цитометра.

Анализ требований нормативной документации на препараты рчЭПО, зарегистрированные в РФ, показал, что большинство производителей специфическую активность определяют с использованием нормоцитемических мышей, при этом почти в половине случаев подсчет ретикулоцитов проводится световой иммерсионной микроскопией, а другая половина – проточной цитометрией. Световая иммерсионная микроскопия – это субъективный метод, точность результатов которого зависит от человеческого фактора и количества анализируемых клеток. Проточная цитометрия – это инструментальный метод, позволяющий получать достаточно объективные и точные результаты. Отсутствие в настоящее время в РФ общей фармакопейной статьи (ОФС) на эритропоэтин и недостаточное оснащение лабораторий проточными цитофлуориметрами обусловили использование двух способов подсчета ретикулоцитов – с помощью световой микроскопии и проточной цитометрии. Для гармонизации проекта ОФС с ЕФ необходимо определить точность метода определения специфической активности при использовании различных способов учета результатов. В связи с этим целью исследования является сравнительная оценка точности метода определения специфической активности эритропоэтина при учете результатов с помощью указанных выше способов подсчета.

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725–1–2002 для оценки точности результатов измерений используют две характеристики: правильность и прецизионность.

Правильность – степень близости среднего значения, полученного на основании серии измерений, к принятому опорному.

Прецизионность характеризует степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях. Этот показатель характеризует влияние случайных факторов [5].

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) оценить правильность метода определения специфической активности препаратов рчЭПО при подсчете ретикулоцитов проточной цитометрией и световой микроскопией;

2) исследовать промежуточную прецизионность определения специфической активности препаратов рчЭПО при подсчете ретикулоцитов проточной цитометрией и микроскопией;

3) оценить соответствие точности определения специфической активности препаратов рчЭПО требованиям Европейской фармакопеи.

## Материалы и методы исследования

Оценку точности результатов метода определения специфической активности рчЭПО проводили *in vivo* на нормоцитемических мышах (мыши линии *B6D2F1* в возрасте 8 недель). Испытания выполнены в соответствии с ЕФ. Для оценки точности результатов испытания сравнивали два независимых разведения стандартного образца эритропоэтина Европейской фармакопеи – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3. Каждое независимое разведение разводили до концентрации 80, 40 и 20 МЕ/мл 0,1 % альбуминовым фосфатно-буферным раствором pH 7,2. Один ряд разведений использовали для построения калибровочного графика, другой ряд – как исследуемый образец.

Мышей предварительно взвешивали; если разница в весе была  $\pm 1$  г, животных случайным образом распределяли в 6 клеток, по 8 особей в каждую. Если разница в весе была более чем  $\pm 1$  г, но не более чем  $\pm 3$  г, то животных вначале распределяли на весовые группы, контролируя колебания массы тела в пределах  $\pm 0,5$  г, помещая каждую группу в отдельную клетку соответственно их весовой категории, затем из каждой весовой группы по одному животному равномерно помещали в одну из 6 клеток (по количеству растворов), пока в клетке не будет 8 особей. Каждой группе мышей наносили определенную метку. Растворы рчЭПО вводили мышам подкожно по 0,5 мл и помещали их в новые клетки таким образом, чтобы в каждой клетке оказались мыши, получившие один из шести растворов, в конечном счете получилось 8 клеток по 6 особей в каждой.

Через 4 дня у животных отбирали образцы крови. С целью сравнительной оценки результатов испытания количество ретикулоцитов в каждом образце крови определяли двумя способами: проточной цитометрией с использованием проточного цитофлуориметра (Navios, Beckman Coulter) и световой микроскопией с помощью микроскопа (Axio Scope A1, Carl Zeiss).

Для проточной цитометрии использовали флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый (Sigma-Aldrich), а для световой иммерсионной микроскопии образцы крови окрашивали набором реагентов «Раствор

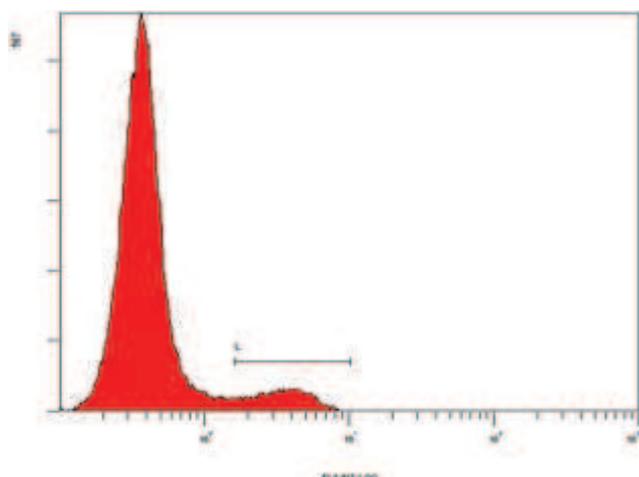


Рис. 1. Типичная гистограмма определения количества ретикулоцитов в образце крови мыши при учете проточным цитофлуориметром (маленький пик, выделенный сверху планкой – ретикулоциты, окрашенные флуоресцентным красителем, большой пик – эритроциты). Всего проанализировано 50 120 клеток, из них 4231 клетка – ретикулоциты, что составляет 8,44 %

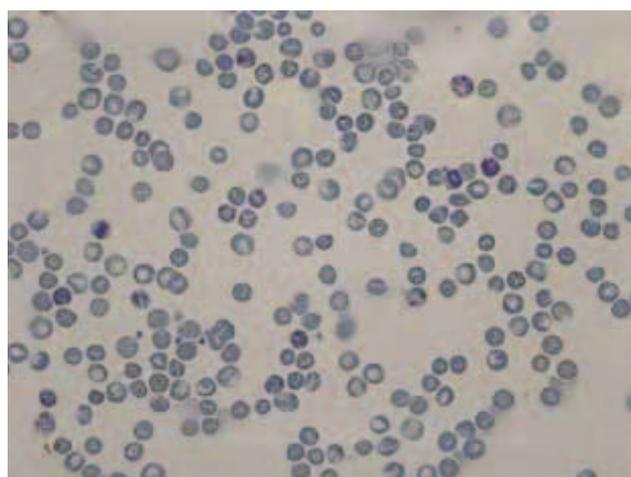


Рис. 2. Одно из полей зрения микроскопа, увеличение  $\times 1000$  (клетки, окрашенные фиолетовым цветом, – ретикулоциты, серым – эритроциты). В данном поле зрения 200 клеток, 15 из них ретикулоциты, что составляет 7,5 % от общего количества клеток. Подсчитывают столько «полей зрения» под микроскопом, чтобы общая сумма клеток была равна 1000

бриллиантового крезилового синего для окраски ретикулоцитов в крови» (ЗАО «Эколаб»).

Полученные первичные данные статистически обработали с помощью метода параллельных линий [6], затем провели оценку правильности и прецизионности [7].

### Результаты и их обсуждение

Исследование точности метода определения специфической активности рЧЭПО при использовании световой микроскопии и проточной цитометрии провели в 6 испытаниях. Функция красителя в обоих способах подсчета – идентификация ретикулоцитов среди эритроцитов (рис. 1 и 2).

По результатам проведенных исследований получены средние геометрические значения ( $n = 48$ ) рассчитанной активности и их доверительные интервалы (табл. 2 и 3).

Как видно из табл. 2, при учете с помощью световой иммерсионной микроскопии активность эритропоэтина на 3–26 % ниже по сравнению с учетом проточной цитометрией, при этом в одном из 6 испытаний основной показатель качества препарата не соответствует требованиям ЕФ.

Доверительный интервал ( $P = 0,95$ ) рассчитанной активности при учете результатов определения специфической активности с помощью световой микроскопии имел более широкие границы в сравнении с результатами,

Таблица 2

Рассчитанные значения показателя «Специфическая активность» при использовании двух способов учета результатов ( $P = 0,95$ )

Номер испытания	Специфическая активность, %		
	Проточная цитометрия	Световая микроскопия	Требования ЕФ
1	94,3	85,5	80–125
2	98,8	94,4	
3	91,8	84,7	
4	95,3	69,1	
5	106,5	103,5	
6	104,7	87,3	

Таблица 3  
Доверительный интервал рассчитанной активности ( $P = 0,95$ )

Номер испытания	Проточная цитометрия		Световая иммерсионная микроскопия		Требования ЕФ, %
	%	$\Delta AntiLn$	%	$\Delta AntiLn$	
1	70–126	1,34	31–235	2,75	64–156
2	81–121	1,22	58–153	1,62	
3	67–127	1,38	49–146	1,72	
4	75–120	1,26	32–148	2,15	
5	80–142	1,33	63–170	1,64	
6	74–148	1,41	51–149	1,70	

полученными с помощью проточной цитометрии, и ни в одном из испытаний не соответствовал требованиям ЕФ (табл. 3). Доверительный интервал рассчитывали с помощью формулы:

$$I_{95} = A \cdot (\times /) \Delta AntiLn \quad [6],$$

где  $I_{95}$  – доверительный интервал,

$A$  – активность,

$AntiLn$  – граница доверительного интервала.

Оценку правильности и прецизионности результатов, полученных с использованием проточной цитофлуориметрии и световой иммерсионной микроскопии, при определении специфической активности рчЭПО проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725–2002 и XI Государственной фармакопеей СССР.

Показателем правильности результатов измерений является смещение. Расчеты показали, что результаты, полученные с помощью двух способов учета, имеют некоторое смещение относительно опорного значения – аттестованного значения специфической активности BRP. Величина смещения при использовании проточной цитометрии составляет 1–8 % и световой микроскопии – 4–31 % (табл. 4).

Таблица 4  
Величина смещения относительно значения принятого в качестве опорного

Номер испытания	Проточная цитометрия, %	Световая иммерсионная микроскопия, %
1	6	15
2	1	6
3	8	15
4	5	31
5	7	4
6	5	13

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о наличии смещения при обоих способах учета, которое при использовании микроскопии выше в среднем в 3,3 раза.

Для сравнения прецизионности двух способов учета результатов вычисляли критерий Фишера  $F$ :

$$F = S_1^2 / S_2^2, \text{ при условии, что } S_1^2 > S_2^2, \quad [7]$$

где  $S_1^2$  и  $S_2^2$  – оценки дисперсии результатов двух способов учета.

Оценки дисперсий представлены в табл. 5.

Вычисленное значение  $F$  сравнивали с табличным значением при  $P = 99\%$ . Поскольку  $F_{\text{экср.}} > F_{\text{табл.}}(P, f_1, f_2)$ , различия дисперсий признавали статистически значимыми с вероятностью 99 %, что позволило сделать заключение о лучшей воспроизводимости метода проточной цитометрии, поскольку последний характеризовался меньшей (не менее чем в два раза) дисперсией.

Более высокое значение дисперсии результатов при использовании световой иммерсионной микроскопии связано, возможно, с недостаточным количеством клеток, подлежащих подсчету из-за трудоемкости метода. Данное предположение было сделано по результатам исследования зависимости стандартного отклонения от количества подсчитанных клеток при использовании проточного цитометра в нашем исследовании. Для этого рассчитали величину дисперсии при различном количестве подсчитанных клеток (рис. 3).

Наличие обратной зависимости величины дисперсии от количества подсчитанных клеток на проточном цитометре (коэффициент корреляции 0,89) свидетельствует о возможности повышения прецизионности учета результатов световой иммерсионной микроскопией при определении специфической активности эритропоэтинов путем увеличения числа считааемых эритроцитов.

В результате проведенных исследований оценены характеристики точности метода определения специ-

Таблица 5

Оценка прецизионности результатов при определении специфической активности эритропоэтинов с использованием двух способов учета результатов

Номер испытания	Дисперсия, процент		$F_{\text{эсп.}}$	$F_{\text{табл.}} (P = 99 \%, f_1 = 47, f_2 = 47)$
	Проточная цитометрия	Световая иммерсионная микроскопия		
1	71	375	5,25	2,01
2	35	150	4,29	
3	60	122	2,03	
4	28	150	5,44	
5	47	238	5,08	
6	43	222	5,14	

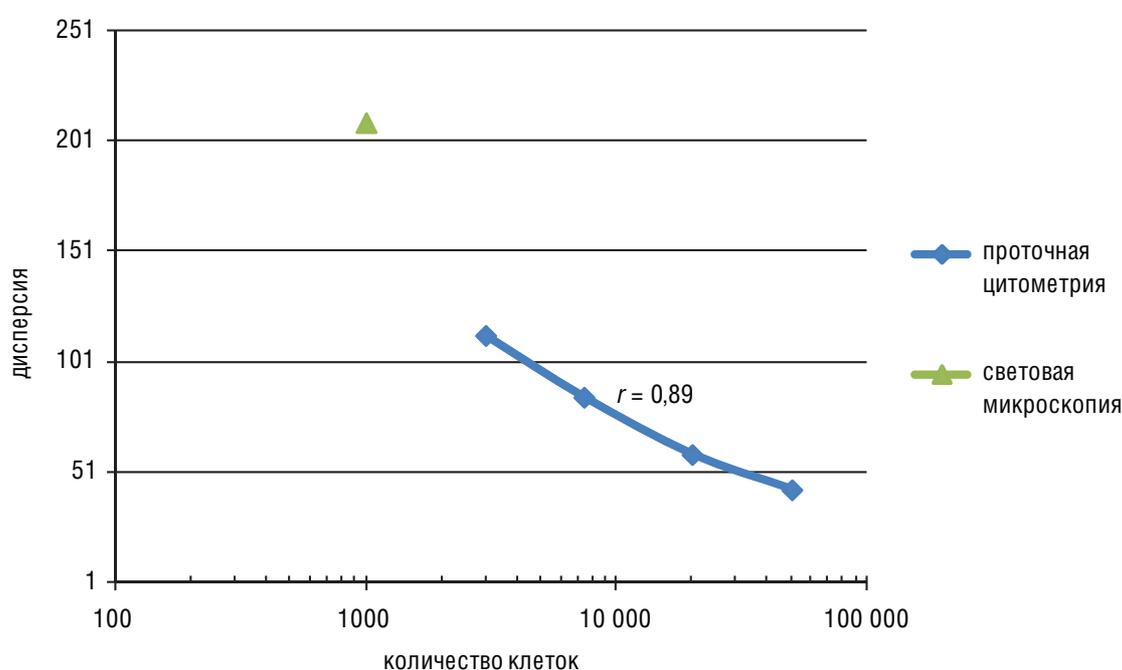


Рис. 3. Влияние количества подсчитанных клеток на величину дисперсии при использовании проточного цитометра. Зеленым треугольником отмечена средняя величина дисперсии при использовании световой микроскопии

фической активности эритропоэтинов биологическим методом по их влиянию на стимуляцию эритропоэза у нормоцитемических мышей. Стимуляцию регистрировали путем подсчета количества ретикулоцитов двумя способами: с помощью проточного цитометра и с использованием светового микроскопа. Установлено, что результаты обоих способов учета имеют смещение относительно опорного значения. Результаты, полученные проточной цитометрией, обладают большей точностью по сравнению с результатами, полученными световой иммерсионной микроскопией. Метод определения специфической активности препаратов эри-

тропоэтинов с использованием проточной цитометрии соответствует требованиям Европейской фармакопеи по характеристикам точности. Результаты световой иммерсионной микроскопии обладают меньшей точностью, не соответствуя требованиям Европейской фармакопеи по доверительному интервалу для результатов. При отсутствии проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии требует отработки оптимальных условий (количество подсчитываемых клеток), что позволит соответствовать требованиям ЕФ как по величине рассчитанной активности, так и по доверительному интервалу полученных результатов.

## Выводы

1. Оценка точности метода определения специфической активности препаратов эритропоэтинов с использованием двух способов учета результатов показала:

– смещение относительно опорного значения при использовании проточной цитометрии не превышает 8 %, при использовании световой микроскопии оно больше и может достигать 31 %;

– дисперсия при оценке промежуточной прецизионности результатов, полученных с помощью проточной цитометрии, статистически значимо меньше (не менее чем в 2 раза) с вероятностью  $P = 0,99$  в сравнении с аналогичным показателем для световой микроскопии.

2. Метод определения специфической активности препаратов эритропоэтинов с использованием проточной цитометрии характеризуется большей точностью по

сравнению со световой микроскопией и соответствует требованиям Европейской фармакопеи.

3. При отсутствии проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии может потребовать отработки оптимальных условий испытаний, например увеличения количества подсчитываемых клеток, что позволит получать результаты, соответствующие требованиям ЕФ не только по величине показателя специфической активности, но и по допустимому доверительному интервалу для значения этого показателя, являющемуся критерием приемлемости результатов испытаний при определении специфической активности препарата.

4. Оценку доверительного интервала в качестве критерия приемлемости полученных результатов испытаний при определении специфической активности препарата необходимо включить в методику определения специфической активности отечественных эритропоэтинов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичева Л.Г., Поддубная И.В. Лечение анемии в онкологии: роль нового стимулятора эритропоеза Аранесп (дарбэпоэтин альфа) // Современная онкология. 2007. № 9(3). С. 69–74.
2. Анемия у больных с хронической почечной недостаточностью: принципы терапии / Ю.С. Милованов [и др.] // Лечащий врач. 2005. № 10. С. 18–24.
3. Macdougall I.C. Novel Erythropoiesis – Stimulating Agents: A New Era in Anemia Management // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2008. № 3. Pp. 200–207. DOI: 10.2215/CJN.03840907.
4. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика / В.А. Меркулов [и др.] // Биопрепараты. 2013. № 3. С. 4–11.
5. ГОСТ Р ИСО 5725–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1: Основные положения и определения. Принят и введен в действие Постановлением Госстандарта РФ от 23.04.2002 № 161-ст.
6. Европейская фармакопея: в 2 т. 7-е изд. М.: Ремедиум, 2011. 4500 с.
7. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1987. 336 с., ил.

The article is received 14.07.2016

УДК 54.06

DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-3-4-11

# THE POSSIBILITY OF HARMONIZING THE RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN SPECIFIC ACTIVITY DETERMINATION METHOD WITH EUROPEAN PHARMACOPOEIA

A.K. Yakovlev, L.A. Gayderova, V.N. Podkuiko, R.A. Volkova, N.A. Alpatova, Yu.V. Olefir

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation  
Russian Federation, 127051, Moscow, 8 Petrovsky boulevard  
E-mail: YAK.Aleksey@gmail.com

**Rationale.** *The task of import substitution in health care and the development of normative legal acts in the framework of the Eurasian Economic Community raises the questions of harmonization of national requirements with international ones, including the standardization of drugs. Thereby, the assessment of the quality of domestic recombinant human erythropoietin in accordance with European Pharmacopoeia requirements is very actual. The main indicator of drug quality is specific activity of drug (rhepo). In Russian Federation it is determined by the influence of the drug on erythropoiesis stimulation. This effect of erythropoietin is measured by counting the number of reticulocytes using the flow cytometry and light microscopy. The latter method of calculation is not included in European Pharmacopoeia. Adequate assessment of this indicator is required for the development of national requirements for quality control of drugs rhepo harmonized with European Pharmacopoeia.*

**Purpose of the work.** *The study aimed the comparative evaluation of the accuracy of the specific erythropoietin activity determination method using the flow cytometry and light microscopy data to provide the harmonization of the draft General monograph with European Pharmacopoeia.*

**Research methods.** *The erythropoietin specific activity was determined in vivo in normocythaemic mice using the flow cytometry in accordance with the European Pharmacopoeia and light microscopy. We have compared the effects of two independent dilution series of erythropoietin European Pharmacopoeia standard sample.*

**Results.** *The results of specific erythropoietin activity determination obtained by two different methods of measurement differed in the offset from the reference value (certified value). In flow cytometry data, the offset varied between 1–8%, the results of light microscopy showed higher variability ranging from 4 to 31%. The estimation of intermediate precision showed twice lower dispersion of specific erythropoietin activity measurements obtained by flow cytometry in comparison with light immersion microscopy data.*

**Conclusion.** *Specific erythropoietin drug activity determination with flow cytometry is characterized by high accuracy and meets the European Pharmacopoeia requirements. We have considered the possibility of light microscopy usage for the same task in the absence of a flow cytometer. The usage of light microscopy requires increasing its accuracy in order to harmonize the method with European Pharmacopoeia requirements.*

**Key words:** recombinant human erythropoietin, the method of determining the specific activity, comparative analysis, validation, accuracy, trueness, precision.

- ✓ **When quoting reference:** Yakovlev A.K., Gayderova L.A., Podkuiko V.N., Volkova R.A., Alpatova N.A., Olefir Yu.V. *Izuchenie vozmozhnosti garmonizatsii metoda opredeleniia spetsificheskoy aktivnosti rekombinantnykh èritropoètinov s trebovaniiami Evropejskoj farmakopei [The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European pharmacopoeia]. Standartnye obrazcy – Reference materials, 2016, No. 3, pp. 4–11. (In Russian). DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-3-4-11.*

## REFERENCES

- Babicheva L.G., Poddubnaja I.V. Lechenie anemii v onkologii: rol' novogo stimulatora èritropoèza Aranesp (darbepoètin al'fa) [Treatment of anemia in Oncology: the role of the new erythropoiesis stimulants Aranesp (darbepoetin Alfa)]. *Sovremennaja onkologija – Modern Oncology*, 2007, No. 9(3), pp. 69–74. (In Russian).
- Milovanov Ju.S., Kozlovskaja L.V., Nikolaev A.Ju., Fomin V.V., Milovanova L.Ju. Anemiia u bol'nykh s khronicheskoy pochechnoj nedostatochnost'iu: printsipy terapii [Anemia in patients with chronic renal failure: principles of treatment]. *Lechashchij vrach – Attending medical doctor*, 2005, No. 10, pp. 18–24. (In Russian).
- Macdougall I.C. Novel Erythropoiesis – Stimulating Agents: A New Era in Anemia Management. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, No. 3, pp. 200–207. DOI:10.2215/CJN.03840907.
- Merkulov V.A. [et al.]. Preparaty rekombinantnykh èritropoètinov i ikh kharakteristika [Preparations of recombinant erythropoietins and their characteristics]. *Biopreparaty – Biologics*, 2013, No. 3, pp. 4–11 (In Russian).
- GOST R ISO 5725–2002. Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezultatov izmerenij. Chast' 1: Osnovnye polozheniia i opredeleniia [Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions]. Moscow, Standartinform Publ., 2009, 32 p. (In Russian).
- Evropejskaia farmakopeia: v 2 tomakh. 7-e izd. [European Pharmacopoeia in two volumes. 7th edition]. Moscow, Remedium Publ., 2011, 4500 p. (In Russian).
- Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. Vypusk 1: Obshchie metody analiza / MZ SSSR. 11-e izd. [USSR State Pharmacopoeia: Issue 1. General methods of analysis 11th edition]. Moscow, Medicina Publ., 1987, 336 p. (In Russian).