







УДК 606:615.076

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

Оригинальная статья | Original article



Оценка активности филграстима биологическим методом *in vitro*: валидация методики

Л.А. Гайдерова , М.Л. Байкова , О.В. Головинская , С.Л. Лыскова ,
В.В. Фоменко , Н.А. Алпатова ✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Филграстим представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, изготовленный по технологии рекомбинантных ДНК. Поскольку при производственном контроле качества филграстима должна применяться валидированная методика, первостепенное значение имеет установление ее валидационных характеристик методики в полном объеме, а при замене критичных реагентов/материалов/параметров – подтверждение ранее установленных.

ЦЕЛЬ. Выбор параметров и подтверждение ряда валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Специфическую активность филграстима оценивали по интенсивности флуоресценции красителя alamarBlue™ при длинах волн возбуждения (530 нм) и эмиссии (620 нм), прямо пропорциональной уровню пролиферации клеток линии NFS-60 под действием филграстима в дозах от 0,1 до 208 МЕ/мл. Полученные данные анализировали в программе PLA 2.0.0 методом параллельных линий с использованием 4-параметрической логистической функции 4PL.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Методика охарактеризована как прецизионная: значение коэффициента вариации (CV) при изучении повторяемости и внутрилабораторной прецизионности составляет 6,20 и 1,19% соответственно (критерий приемлемости $CV \leq 25\%$). Методика линейна – коэффициент детерминации (R^2) линейной функции составляет 0,99 при значении критерия приемлемости $R^2 \geq 0,95$. Значение степени извлечения составляет 101,6% и не превышает отклонения $\pm 10\%$ от ожидаемого значения. Методика устойчива к увеличению плотности клеточной суспензии с $1,5 \times 10^5$ до $3,0 \times 10^5$ клеток/мл ($CV=0,07\%$) и увеличению продолжительности инкубации образцов филграстима с клеточной суспензией с 48 до 72 ч ($CV=4,2\%$) или с флуоресцентным красителем с 4 до 6 ч ($CV=2,05\%$).

ВЫВОДЫ. Методика оценки специфической активности препаратов на основе филграстима в условиях *in vitro* при использовании клеток линии NFS-60 характеризуется линейностью, прецизионностью и правильностью; показана устойчивость методики при контролируемом изменении ряда параметров. Исследование подтверждает пригодность использования клеток линии NFS-60 при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима. Это имеет важное значение для производителей с точки зрения расширения спектра клеточных линий, применяемых при оценке качества препаратов.

Ключевые слова: специфическая активность; биологический метод; валидационные характеристики; правильность; линейность; робастность; прецизионность; линия клеток NFS-60; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

© Л.А. Гайдерова, М.Л. Байкова, О.В. Головинская, С.Л. Лыскова, В.В. Фоменко, Н.А. Алпатова, 2026
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Байкова М.Л., Головинская О.В., Лысикова С.Л., Фоменко В.В., Алпатова Н.А. Оценка активности филграстима биологическим методом *in vitro*: валидация методики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):85–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Validation of an *in vitro* biological method for filgrastim potency assessment

Lidia A. Gaiderova , Marina L. Baykova , Olga V. Golovinskaya ,
Svetlana L. Lysikova , Viktoriia V. Fomenko , Natalia A. Alpatova  

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Filgrastim is a human granulocyte colony-stimulating factor produced using recombinant DNA technology. Since filgrastim quality control necessitates a validated method, establishing the entire method validation parameters is of high priority; confirming the previously established parameters gains primary importance when substituting critical reagents/materials/parameters.

AIM. This study aimed to select and confirm a number of validation parameters for *in vitro* biological method that would assess filgrastim potency using NFS-60 cell line.

MATERIALS AND METHODS. Filgrastim potency was assessed by fluorescence intensity of alamarBlue™ reagent at excitation wavelengths of 530 nm and emission of 620 nm directly proportional to proliferation level of NFS-60 cells exposed to filgrastim 0.1 to 208 IU/mL. Statistical analysis of the results was performed using the 4-parameter logistic function 4PL and the parallel line analysis in PLA 2.0.0 software.

RESULTS. The method was deemed precise: the coefficient of variation (CV) in the repeatability study was 6.20%, and the intermediate precision study showed CV 1.19% (acceptance criterion $CV \leq 25\%$). The method was linear; the coefficient of determination for the linear function was $R^2 = 0.99$ (acceptance criterion $R^2 \geq 0.95$). The degree of recovery was 101.6% and did not exceed $\pm 10\%$ of the expected value. The method was robust to an increased density of the cell suspension from 1.5×10^5 to 3.0×10^5 cells/mL ($CV = 0.07\%$) and to prolonged incubation of filgrastim samples with the cell suspension (from 48 to 72 h, $CV = 4.2\%$) or with fluorescent dye (from 4 to 6 h, $CV = 2.05\%$).

CONCLUSIONS. The *in vitro* method assessing specific potency of filgrastim-based preparations using NFS-60 cell line is linear, precise, and accurate, and has proven to be stable under controlled changes of certain parameters. Confirmed applicability of NFS-60 cell line for assessing the potency of filgrastim-based preparations is essential for manufacturers, since it expands the range of cell cultures used for quality assessment of preparations.

Keywords: specific activity; biological method; validation parameters; correctness; linearity; robustness; precision; NFS-60 cell line; granulocyte colony-stimulating factor

For citation: Gaiderova L.A., Baykova M.L., Golovinskaya O.V., Lysikova S.L., Fomenko V.V., Alpatova N.A. Validation of an *in vitro* biological method for filgrastim potency assessment. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):85–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

Funding. The study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00061-26-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мировой фармацевтической практике сохраняется интерес к производству биотехнологических лекарственных препаратов (ЛП) на основе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) – биоаналогичных (биоподобных) филграстимов и препаратов, которые благодаря измененной структуре молекулы обладают увеличенным периодом полувыведения, сниженной частотой нежелательных и побочных эффектов. Филграстим, рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (рчГ-КСФ), представляет собой негликозилированный белок, полученный с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Продуцентами рчГ-КСФ являются штаммы *Escherichia coli*, в геном которых введен ген человеческого Г-КСФ [1]. Филграстим проявляет биологическую активность при взаимодействии с рецепторами к Г-КСФ, которые экспрессированы на поверхности клеток миелоидного ряда. Принцип действия Г-КСФ заключается в стимуляции пролиферации клеток-предшественников и дифференцировки их в зрелые нейтрофилы, что широко используется при лечении нейтропении, вызванной химиотерапией, у пациентов с онкологическими заболеваниями [2, 3].

Специфическая активность – критичный показатель качества биотехнологических ЛП, который должен объективно и надежно оцениваться на всех этапах жизненного цикла ЛП [4]. Целесообразно оценивать относительную специфическую активность (RP), сравнивая эффект ЛП с эффектом соответствующего стандартного образца¹. Активность ЛП, действующим веществом которых является филграстим, оценивают биологическим методом *in vitro* по уровню пролиферации клеточных линий, чувствительных к действию филграстима.

Биологические тест-системы (БТС) играют важную роль в современных биомедицинских исследованиях и разработках биологических ЛП и позволяют изучать процессы, определяющие патогенез заболевания. БТС позволяют воспроизводить механизм действия ЛП на молекулярном уровне и выбирать пригодные методики оценки специфической биологической активности ЛП для подтверждения стабильности и постоянства качества ЛП по данному показателю на протяжении всего жизненного цикла ЛП. Кроме того, БТС необходимы при доказательстве биоподобия биоаналогичного ЛП референтному

препарату [5–7]. Известно, что результаты, полученные с использованием БТС, характеризуются высокой вариабельностью, достигающей 50%. Есть несколько причин вариабельности результатов испытаний на клеточных линиях: разная чувствительность клеток; уровень жизнеспособности и концентрации клеток; количество пассажей; периодичность и условия пересевов при рутинном культивировании; продолжительность культивирования до момента использования в испытании; состав питательной среды; время инкубации клеток с препаратом; параметры инкубирования и др. [8–10]. Таким образом, стандартизации биологических методик, применяемых при оценке специфической активности ЛП, следует уделять особое внимание.

Учитывая значимое влияние перечисленных выше факторов на надежность и релевантность результатов, получаемых при постановке биологической методики *in vitro*, такие факторы должны быть изучены при валидации методики в процессе ее разработки. Подтверждение правильности и прецизионности методики способствует получению валидных результатов². В течение жизненного цикла ЛП возможно внесение изменений, в том числе критичных, в методику оценки специфической активности, что предусматривает проведение исследований по подтверждению валидационных характеристик.

При контроле качества ЛП на основе филграстима специфическая активность оценивается по стимулирующему действию на пролиферацию чувствительных к Г-КСФ клеток, уровень которой определяется с помощью различных красителей и реагентов [10–14]. В монографии Европейской фармакопеи The Filgrastim concentrated solution предложено применение клеточной линии M-NFS-60 (ATCC, No. CRL-1839)³ для оценки специфической активности филграстима. Однако активность ряда ЛП на основе филграстима оценивается с применением клеточной линии NFS-60. Обе клеточные линии получены от мышей с миелоидным лейкозом и являются чувствительными к Г-КСФ. При этом M-NFS-60 представляет собой клеточную сублинию, полученную из NFS-60 при культивировании в присутствии макрофагального КСФ [15]. Кроме того, клеточную линию M-NFS-60 использовали в международных исследованиях по разработке 2-го Международного стандартного образца Г-КСФ [16]. Учитывая, что при оценке качества филграстима производители применяют клеточные линии M-NFS-60

¹ 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

² ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

ICH Q14 Analytical procedure development. EMA; 2023.

³ 2206 Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

и NFS-60, одна из которых предусмотрена монографией Европейской фармакопеи, целесообразно подтвердить валидационные характеристики методики с использованием NFS-60 с целью включения соответствующей общей фармакопейной статьи в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Цель работы – выбор параметров и подтверждение ряда валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: подобрать оптимальные условия для проведения испытания и уточнить ряд параметров методики (дозы филграстима, концентрация клеток в лунке, время инкубации с красителем); изучить валидационные характеристики методики, такие как правильность, линейность, прецизионность и устойчивость (робастность).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали следующие материалы и реагенты: клеточная линия NFS-60 (CLS, Германия, кат. № 400301) – цитокинзависимые мышинные миелобласты, полученные после заражения взрослых мышей вирусом Cas-Bv-MuLV; 2-й Международный стандартный образец (МСО) рГ-КСФ (2nd International standard for granulocyte colony stimulating factor, human rDNA-derived, NIBSC, code 09/136, 95000 МЕ/ампула, 100 МЕ \approx 1 нг белка); питательная среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия, кат. № с330п); фетальная бычья сыворотка, термически инактивированная (HyClone, США, кат. № SH30070.03); 50 мг/мл гентамицин («ПанЭко», Россия, кат. № A011); 200 мМ GlutaMAX (Gibco, США, кат. № 35050061); 1 М HEPES (Gibco, США, кат. № 15630-080); ростовой фактор интерлейкин-3 (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № 14144); флуоресцентный краситель alamarBlue™ (Invitrogen, США, кат. № DAL1100); 0,4% трипановый синий (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № T8154); фосфатно-солевой буфер Дульбекко (Gibco, США, кат. № 141190-144). В работе также использовали 96-луночные полистироловые планшеты (Corning, США, кат. № 3599).

Методы

Культивирование клеток линии NFS-60 осуществляли в стандартных условиях при 37°C, 5 \pm 2% CO₂ и увлажненной атмосфере в CO₂-инкубаторе Binder C-150 (BINDER, Германия) в среде

RPMI-1640, обогащенной интерлейкином-3 (2 нг/мл), 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ GlutaMAX, 25 мМ HEPES и содержащей 50 мкг/мл гентамицина для предотвращения бактериальной контаминации. Клеточную суспензию пассировали каждые 48–72 ч; плотность при переосеве составила от 2,5 \times 10⁴ до 5 \times 10⁴ клеток/мл.

Перед началом испытания клетки трижды отмывали от интерлейкина-3 путем центрифугирования при 250 g в фосфатно-солевом буфере Дульбекко. После третьего цикла центрифугирования осадок ресуспендировали в среде для анализа (идентична по составу среде для культивирования, но не содержит интерлейкин-3), затем отбирали аликвоту суспензии, окрашивали 0,4% раствором трипанового синего и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. В испытании использовали культуру клеток с жизнеспособностью не менее 90% и плотностью 1,5 \times 10⁵ клеток/мл; при изучении устойчивости методики – 3,0 \times 10⁵ клеток/мл. Непосредственно перед началом испытания к клеточной суспензии добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 0,1 мМ.

Изучение валидационных характеристик методики. В качестве стандартного образца (СО) и испытуемого образца (ИО) использовали независимые разведения одной и той же серии МСО рГ-КСФ. Для одного независимого определения готовили две независимые серии разведений МСО от 208 МЕ/мл (\approx 2 нг/мл) до 0,1 МЕ/мл (\approx 0,001 нг/мл). Каждую серию разведений вносили в лунки культурального планшета в трех повторностях (100 мкл/лунка) и добавляли равный объем ранее подготовленной клеточной суспензии. Значения активности образцов в лунках после внесения суспензии составили 104, 52, 26, 13, 6,5, 3,25, 1,63, 0,81, 0,41, 0,20, 0,10 и 0,05 МЕ/мл, а концентрация клеток – 0,75 \times 10⁵ клеток/мл; при изучении устойчивости методики использовали 1,5 \times 10⁵ клеток/мл.

Планшеты, содержащие реакционную смесь, инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч (при изучении устойчивости методики – в течение 72 ч) при 37°C и 5 \pm 2% CO₂ и увлажненной атмосфере. Далее в лунки с СО и ИО добавляли по 20 мкл alamarBlue™ и инкубировали в течение 4 ч (при изучении устойчивости методики – в течение 6 ч) в тех же условиях. По окончании инкубации регистрировали сигналы флуоресценции при длинах волн 530 и 620 нм возбуждения и эмиссии соответственно.

При изучении **линейности** методики готовили модельные растворы МСО с ожидаемой активностью 80, 90, 100, 110 и 120% относительно МСО, выбранного в качестве СО с активностью

100%. Остальная процедура испытания оставалась без изменений.

Оценка *пригодности* системы и ИО является неотъемлемой частью аналитических методик и основана на концепции, что оборудование, реагенты, процедуры и ИО составляют целостную систему⁴. Для обеспечения надежности анализа и достоверности результатов устанавливают требования к критериям пригодности системы (для СО), тогда как для ИО также оценивают степень его подобия СО в качестве критериев приемлемости результатов испытания⁵ [4].

Статистический анализ данных. Полученные в испытаниях данные анализировали в программе PLA 2.0.0 (Stegmann Systems, Германия) методом параллельных линий с использованием 4-параметрической логистической функции 4PL. Проводили аппроксимацию зависимости значений сигналов флуоресценции от десятичного логарифма концентрации филграстима. Значения средних величин, стандартных отклонений и коэффициентов вариации (CV) рассчитывали в программе Microsoft Excel. Значения коэффициентов детерминации (R^2) кривых зависимости «доза–эффект» для СО и ИО рассчитывали автоматически для определения степени зависимости между регрессионной моделью и исходными данными. Средние значения указанных параметров рассчитывали для всех независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий.

Критерии пригодности и приемлемости. Полученные результаты оценивали на соответствие критериям пригодности системы и приемлемости результатов, чтобы подтвердить надежность данных⁶ [17]. Использовали следующие критерии: $R^2 \geq 0,95$; динамический диапазон анализа, для оценки которого определяли отношение максимального значения сигнала к минимальному значению (соотношение асимптот ≥ 3); наличие линейного участка на дозозависимой кривой, содержащего не менее 3 точек; CV для 3 повторностей каждого разведения образцов⁷.

При оценке критериев пригодности системы использовали следующие параметры⁸: кривая

зависимости интенсивности сигнала от концентрации СО включает не менее 3 точек в линейном диапазоне; значение R^2 кривой зависимости ответа от дозы СО должно быть $\geq 0,95$; значения CV единиц флуоресценции для повторностей каждого разведения СО должны быть $\leq 25\%$.

Были установлены следующие критерии приемлемости результатов испытания для ИО (разведения МСО, взятого в качестве ИО)⁹: статистический анализ данных подтверждает отсутствие отклонений от линейности и параллельности кривой зависимости ответа от дозы ИО по сравнению с СО ($P=0,95$); значение R^2 кривой зависимости ответа от дозы ИО должно быть $\geq 0,95$; значения CV единиц флуоресценции для повторностей каждого разведения ИО должны быть $\leq 25\%$.

При соблюдении критериев пригодности системы и приемлемости результатов рассчитывали значения относительной специфической активности (RP) по формуле (1).

$$RP = \frac{EC_{50} \text{ MCO_CO}}{EC_{50} \text{ MCO_ИО}} \times 100\%, \quad (1)$$

где $EC_{50} \text{ MCO_CO}$ – полумаксимальная эффективная концентрация международного стандартного образца, взятого в качестве стандартного образца, нг/мл; $EC_{50} \text{ MCO_ИО}$ – полумаксимальная эффективная концентрация международного стандартного образца, взятого в качестве испытуемого образца, нг/мл.

Валидационные испытания. В соответствии с ОФС.1.1.0012 и Решением Коллегии ЕЭК № 113 методики оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов относятся к количественным и для обеспечения достоверности результатов испытания должны обладать правильностью, линейностью, воспроизводимостью, прецизионностью, специфичностью и устойчивостью¹⁰.

Прецизионность методики для оценки изменчивости повторяющихся измерений изучали на двух уровнях: повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Испытания по оценке прецизионности проводили в разные дни с участием одного или двух аналитиков.

⁴ 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

⁵ 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

⁶ 1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

⁷ <https://www.pharmtech.com/view/establishing-systems-suitability-and-validity-criteria-for-analytical-methods-and-bioassays>

⁸ 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

⁹ 1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

¹⁰ ICH Q14 Analytical procedure development. EMA; 2023.

⁹ Там же.

¹⁰ ОФС.1.1.0012. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023. Решение Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

Для подтверждения повторяемости одним аналитиком выполнено 9 независимых определений. Повторяемость оценивали по величине CV значений RP, полученных в независимых определениях. Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам, полученным двумя аналитиками в 6 независимых определениях в разные дни. Рассчитывали величину CV средних значений RP, полученных разными аналитиками¹¹.

Правильность методики подтверждали путем выполнения 9 независимых определений. Для каждого независимого определения методом параллельных линий рассчитывали RP. Степень извлечения (%) рассчитывали по формуле (2).

$$\text{Степень извлечения} = \frac{\text{RP (получено)}}{\text{RP (ожидаемо)}} \times 100\%, \quad (2)$$

где RP (получено) – значение относительной специфической активности, полученное в испытании; RP (ожидаемо) – значение относительной специфической активности, рассчитанное при приготовлении модельных образцов.

В качестве критерия приемлемости результатов использовали критерий степень извлечения $\pm 25\%$ от ожидаемого значения¹².

Линейность разведения образцов, то есть наличие линейной зависимости между значениями ожидаемой и полученной RP, изучали на модельных образцах с ожидаемой активностью 80, 90, 100, 110 и 120% в пределах аналитической области методики (80–125%). Проводили 3 независимых испытания по определению RP для каждого модельного образца. Если значение R^2 из графика зависимости между ожидаемыми и полученными значениями активности в соответствии с установленными критериями составляло $\geq 0,95$, методику признавали линейной в заданном диапазоне¹³.

При изучении **робастности** методики оценивали влияние на RP контролируемых изменений параметров при проведении испытаний: плотность клеточной суспензии – $1,5 \times 10^5$ и $3,0 \times 10^5$ клеток/мл; продолжительность инкубации клеток с образцами – 48 или 72 ч; продолжительность инкубации после внесения

красителя alamarBlue™ – 4 или 6 ч. Отдельное испытание каждого из исследуемых параметров включало ≥ 6 независимых определений. В качестве критерия приемлемости использовали $CV \leq 25\%$ значений RP, полученных в независимых определениях¹⁴.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Любое изменение, вносимое в валидированную методику анализа биологической активности, должно оцениваться с точки зрения его влияния на валидационные характеристики и соответствие методики заявленному назначению. Изменения можно считать незначительными, если не затрагивается биологическая основа анализа. В таком случае допустимо проведение верификационных исследований для подтверждения отсутствия негативного влияния изменений на валидность методики [18]. Внесение значимых изменений требует проведения валидации методики в полном объеме. Поскольку клеточные линии M-NFS-60 и NFS-60 имеют общее происхождение, аналогичные характеристики и чувствительны к Г-КСФ, в данном исследовании только часть валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима изучали на клеточной линии NFS-60.

На предварительном этапе были подобраны оптимальные условия проведения испытаний, такие как концентрации образцов филграстима и диапазон их разведений, количество клеток на лунку, время инкубации и краситель для идентификации пролиферирующих клеток. Оптимальные условия воспроизведения методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеток линии NFS-60 [14] приведены в *таблице 1*.

Зависимость пролиферации клеток линии NFS-60 от дозы филграстима. Наличие прямой зависимости уровня пролиферации клеток линии NFS-60 от используемых доз филграстима подтверждено экспериментально. На *рисунке S1* (опубликован на сайте журнала¹⁵) показано, что кривая зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма доз филграстима (кривая зависимости «доза–эффект») при использовании клеточной линии NFS-60 характеризуется

¹¹ ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

¹² 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

¹³ 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

¹⁴ 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

¹⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>

Таблица 1. Оптимальные условия воспроизведения методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеточной линии NFS-60

Table 1. The optimal conditions for repeating assessment method of filgrastim potency using NFS-60 cell line

Параметры / <i>Parameters</i>	Значения параметров / <i>Values</i>
Активность образца в первой лунке, МЕ/мл <i>Sample potency in the first well, IU/mL</i>	208
Концентрация образца в первой лунке, нг/мл <i>Sample concentration in the first well, ng/mL</i>	2
Кратность разведений / <i>Dilution factor</i>	1:1
Вносимый объем образцов и суспензии клеток, мкл <i>Volume of samples and cell suspension introduced, μL</i>	100
Время инкубации, ч / <i>Incubation time, h</i>	48
Краситель / <i>Dye</i>	AlamarBlue™
Метод детектирования / <i>Detection method</i> Длины волн, нм / <i>Wavelengths, nm</i>	Флуориметрия / <i>Fluorimetry</i> 530 и 620 / <i>530 and 620</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

приемлемыми результатами в диапазоне концентраций от 0,0005 до 0,52 нг/мл или активностей от 0,05 до 52 МЕ/мл.

На графике кривой зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма доз образца филграстима определен линейный участок, соответствующий условию $R^2 \geq 0,95$ (табл. S1, опубликована на сайте журнала¹⁶). Пример линейного участка кривой зависимости «доза–эффект» представлен на рисунке S2 (опубликован на сайте журнала¹⁷). Кривая имеет выраженное верхнее и нижнее плато – 52 и 0,05 МЕ/мл соответственно, линейный участок в диапазоне концентраций от 0,008 до 0,0325 нг/мл или активностей от 0,8–3,25 МЕ/мл и $R^2=0,99$ (рис. S1 и S2, опубликованы на сайте журнала). Поскольку кривая имеет верхнее и нижнее плато с отношением асимптот >4 , не менее 3 точек на линейном участке кривой и $R^2=0,99$, то критерии приемлемости были соблюдены.

Повторяемость методики оценивали по близости результатов, полученных в независимых определениях, проводимых одним аналитиком в одинаковых условиях на одном оборудовании в пределах короткого промежутка времени. Методику считали соответствующей данной характеристике, если значение CV между значениями RP составляло $\leq 25\%$ (табл. 2). CV значений RP между независимыми определениями не превышал 9,2%, а между испытаниями составил 6,2%.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам, полученным разными аналитиками на разном оборудовании в разные дни.

В качестве критерия приемлемости использовали $CV \leq 25\%$. Средние значения RP и CV представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 демонстрируют воспроизводимость результатов биологической методики, полученных двумя аналитиками. Значения $RP \pm$ стандартное отклонение составили $101,6 \pm 0,97$ и $99,9 \pm 0,98\%$ для аналитика № 1 и 2 соответственно, а значение $CV=1,19\%$. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной прецизионности методики.

Правильность методики изучали по критерию «Степень извлечения». Для каждого независимого определения рассчитывали значения RP. В качестве критерия приемлемости результатов рассматривали степень извлечения $\pm 25\%$ от ожидаемого значения. Значение степени извлечения для образца (табл. 4) составило 101,6% и не превышало отклонения $\pm 10\%$ от ожидаемого значения. Таким образом, полученные данные позволили сделать вывод, что правильность методики подтверждена.

Для подтверждения **линейности** методики в пределах аналитического диапазона строили графики линейной регрессии, аппроксимируя значения полученной активности от ожидаемой, при использовании испытуемого образца с симулированной активностью от 80% до 120%. В качестве критерия приемлемости линейности методики рассматривали значение $R^2 \geq 0,95$ между измеренными и ожидаемыми значениями RP. Средние значения полученных RP для каждого из 3 определений представлены в таблице 5. На рисунке S3 (опубликован на сайте журнала¹⁸)

¹⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>

¹⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>

¹⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

Таблица 2. Результаты испытаний валидационной характеристики «Повторяемость» методики оценки специфической активности филграстима

Table 2. Repeatability of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

Независимое определение <i>Independent determination</i>	Относительная специфическая активность, % <i>Relative potency, %</i>	Среднее значение <i>Mean value</i>	CV, %	95% ДИ <i>95% CI</i>
1	99,3	101,6	6,2	96,77–106,39
2	100,7			
3	101,1			
1	106,8			
2	91,7			
3	109,0			
1	92,8			
2	107,8			
3	105,0			

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

Таблица 3. Результаты испытаний валидационной характеристики «Внутрилабораторная прецизионность» методики оценки специфической активности филграстима

Table 3. Intermediate precision of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	Значения RP (%), полученные разными аналитиками в разные дни <i>RP values (%) obtained by different analysts on different days</i>	
	Аналитик № 1 / <i>Analyst No. 1</i>	Аналитик № 2 / <i>Analyst No. 2</i>
1	101,5	99,9
2	101,7	98,9
3	101,2	98,9
4	101,7	100,4
5	103,2	99,7
6	100,2	101,5
Среднее значение RP, % <i>Mean value of RP, %</i>	101,6	99,9
95% ДИ / <i>95% CI</i>	99,66–103,54	97,93–101,87
CV, %	1,19	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. RP – относительная специфическая активность; ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. RP, relative potency; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

приведен график зависимости полученных значений RP от соответствующих значений ожидаемой активности (теоретические значения RP).

Продемонстрирована линейная зависимость между полученными и ожидаемыми значениями RP. Показано, что теоретические значения RP (80, 90, 100, 110 и 120%) прямо пропорциональны экспериментально установленным значениям RP. Значение $R^2=0,99$ соответствует критерию приемлемости $R^2 \geq 0,95$. Таким образом, методика может дифференцировать уровни

относительной специфической активности ИО от 80 до 120% относительно СО (табл. 5).

Значение оценки **устойчивости** (робастности) методики заключается в установлении параметров пригодности системы для поддержания ее валидности. Отдельное испытание для каждого из исследуемых параметров методики оценки RP филграстима (плотность клеточной суспензии, продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией и с красителем) включало минимум 6 независимых определений.

На первом этапе оценивали, насколько методика устойчива к изменению плотности клеточной суспензии. В испытаниях использовали клеточные суспензии, содержащие $1,5 \times 10^5$ или $3,0 \times 10^5$ клеток/мл. Полученные результаты приведены в *таблице 6*, из которой следует, что увеличение плотности клеточной суспензии с $1,5 \times 10^5$ до $3,0 \times 10^5$ клеток/мл не оказывало влияния на результат определения RP.

На втором этапе определяли чувствительность методики к увеличению продолжительности инкубации образцов филграстима с клеточной суспензией с 48 до 72 ч. Полученные значения RP, представленные в *таблице 6*, указывают на отсутствие зависимости значений активности образцов от увеличения времени инкубации с клеточной суспензией.

На третьем этапе оценивали, насколько методика устойчива к изменению продолжительности инкубации с красителем. После добавления в анализируемые лунки красителя alamarBlue™ планшеты оставляли в CO₂-инкубаторе в течение 4 или 6 ч. Из *таблицы 6* видно, что активность образцов не зависит от увеличения продолжительности инкубации с красителем.

Таким образом, испытуемая методика устойчива к незначительным контролируемым изменениям, а именно увеличению плотности клеточной суспензии и продолжительности инкубации образцов с клеточной суспензией или красителем alamarBlue™.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что все проведенные испытания с использованием в качестве СО и ИО независимых разведений 2-го МСО Г-КСФ и клеточной линии NFS-60 соответствуют критериям пригодности системы, критериям приемлемости образца и являются

Таблица 4. Результаты испытаний валидационной характеристики «Правильность» методики оценки специфической активности филграстима

Table 4. Accuracy of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	RP, %
1	99,3
2	100,7
3	101,1
4	106,8
5	91,7
6	109,0
7	92,8
8	107,8
9	105,0
Среднее значение RP, % <i>Mean RP, %</i>	101,6
Ожидаемое значение RP, % <i>Expected RP, %</i>	100,0
Степень извлечения, % <i>Degree of recovery, %</i>	101,6

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. RP – относительная специфическая активность.

Note. RP, relative potency.

валидными. Подтверждена пригодность системы. В качестве критериев рассматривали наличие линейности ответа при $R^2 \geq 0,95$, не менее 3 точек на линейном участке кривой, отношение асимптот ≥ 3 (отношение максимального значения сигнала к минимальному), $CV \leq 25\%$ между повторностями каждого разведения. Подтверждено отсутствие отклонений

Таблица 5. Результаты испытаний валидационной характеристики «Линейность» методики оценки специфической активности филграстима

Table 5. Linearity of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

Ожидаемое значение RP, % <i>Expected RP, %</i>	Количество испытаний <i>Number of tests</i>	Среднее значение RP (полученное), % <i>Mean RP (obtained), %</i>	Степень извлечения, % <i>Degree of recovery, %</i>	Степень извлечения, 95% ДИ <i>Degree of recovery, 95% CI</i>	CV, %
80	3	79,59	99,49	97,77–101,21	3,8
90	3	90,61	100,68	98,80–102,56	3,8
100	3	101,04	101,04	99,54–102,54	2,7
110	3	110,08	100,07	98,24–101,90	3,0
120	3	119,76	99,80	97,64–101,96	3,2

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. RP – относительная специфическая активность; ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. RP, relative potency; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

Таблица 6. Результаты испытаний для валидационной характеристики «Робастность» методики оценки специфической активности филграстима

Table 6. Robustness of assessment method for filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	Значения относительной специфической активности, % / <i>Relative potency, %</i>					
	Плотность клеточной суспензии, клеток/мл <i>Cell suspension density, cells/mL</i>		Продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией, ч <i>Incubation time of samples with cell suspension, h</i>		Продолжительность инкубации с alamarBlue™, ч <i>Incubation time with alamarBlue™, h</i>	
	1,5×10 ⁵	3,0×10 ⁵	48	72	4	6
1	101,5	102,1	101,5	95,5	101,5	98,6
2	101,7	101,0	101,7	97,5	101,7	98,3
3	101,2	103,0	101,2	94,1	101,2	97,2
4	101,7	101,9	101,7	94,7	101,7	99,1
5	103,2	101,3	103,2	95,8	103,2	98,3
6	100,2	99,8	100,2	97,2	100,2	100,8
Среднее значение RP, % <i>Mean value of RP, %</i>	101,6	101,5	101,6	95,8	101,6	98,7
CV, %	0,07		4,20		2,05	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. RP – относительная специфическая активность; CV – коэффициент вариации.

Note. RP, relative potency; CV, coefficient of variation.

Таблица 7. Валидационные характеристики методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеточной линии NFS-60

Table 7. Validation parameters of the method for assessing filgrastim potency using NFS-60 cell line

Характеристика <i>Parameter</i>	Критерий <i>Criterion</i>	Результат <i>Result</i>	Заключение <i>Conclusion</i>
Правильность / <i>Accuracy</i>	Степень извлечения ±25% <i>Degree of recovery ±25%</i>	+1,6%	Методика охарактеризована как правильная / <i>The method is characterized as accurate</i>
Линейность / <i>Linearity</i>	R ² ≥0,95	R ² =0,99	Методика охарактеризована как линейная <i>The method is characterized as linear</i>
Робастность / <i>Robustness</i>			
Плотность клеточной суспензии <i>Density of cell suspension</i>	CV≤25%	0,07%	Методика устойчива к увеличению плотности клеточной суспензии / <i>The method is robust to increasing cell suspension density</i>
Продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией <i>Incubation time of samples with cell suspension</i>	CV≤25%	4,2%	Методика устойчива к увеличению продолжительности инкубации образцов с клеточной суспензией / <i>The method is robust to increasing incubation time of samples with cell suspension</i>
Продолжительность инкубации с красителем <i>Incubation time of samples with a dye</i>	CV≤25%	2,05%	Методика устойчива к увеличению продолжительности инкубации с красителем <i>The method is robust to increasing incubation time after the addition of a dye</i>
Прецизионность / <i>Precision</i>			
Повторяемость / <i>Repeatability</i>	CV≤25%	6,20%	Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность методики подтверждены <i>Repeatability and intermediate precision of the method are confirmed</i>
Внутрилабораторная прецизионность <i>Intermediate precision</i>	CV≤25%	1,19%	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. RP – относительная специфическая активность; CV – коэффициент вариации; R² – коэффициент детерминации.

Note. RP, relative potency; CV, coefficient of variation; R², coefficient of determination.

от линейности и параллельности кривой зависимости специфической активности от дозы филграстима для ИО по сравнению с СО.

Валидационные характеристики методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом на клеточной линии NFS-60 представлены в *таблице 7*. Сопоставление полученных данных позволяет сделать вывод, что валидационные характеристики методики правильность, линейность, прецизионность и устойчивость (робастность) соответствуют установленным критериям.

Оценка специфической активности – одного из критичных показателей качества ЛП с применением валидированной методики – является ключевым аспектом обеспечения безопасности и эффективности ЛП. Стабильная воспроизводимость методики позволяет минимизировать необходимость в повторных испытаниях, что способствует сокращению сроков проведения экспертизы качества лекарственных средств и повышению экономической эффективности исследовательских процессов. Приведенная в статье методика оценки активности МСО рГ-КСФ может применяться

как для рутинного контроля специфической активности ЛП, так и для подтверждения биоподобия новых разрабатываемых препаратов на основе филграстима.

ВЫВОДЫ

1. Методика оценки специфической биологической активности препаратов на основе филграстима является валидной при использовании клеточной линии NFS-60 в воспроизведенных условиях.
2. Подобраны оптимальные условия и параметры (дозы филграстима, концентрация клеток, время инкубации с красителем) методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.
3. Подтверждены валидационные характеристики методики, такие как правильность, линейность, прецизионность и робастность.
4. Данные, полученные при подтверждении валидационных характеристик методики, соответствуют критериям пригодности системы и приемлемости результатов испытаний.

Литература/References

1. Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. Production of recombinant human G-CSF from non-classical inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 2021;52(2):541–6. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00413-y>
2. Bond TC, Szabo E, Gabriel S, et al. Meta-analysis and indirect treatment comparison of lipegfilgrastim with pegfilgrastim and filgrastim for the reduction of chemotherapy-induced neutropenia-related events. *J Oncol Pharm Pract*. 2018;24(6):412–23. <https://doi.org/10.1177/1078155217714859>
3. Cornes P, Gascon P, Chan St, et al. Systematic review and meta-analysis of short-versus long-acting granulocyte colony-stimulating factors for reduction of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Adv Ther*. 2018;35(11):1816–29. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0798-6>
4. Levy MJ, Gucinski AC, Sommers CD, et al. Analytical techniques and bioactivity assays to compare the structure and function of filgrastim (granulocyte-colony stimulating factor) therapeutics from different manufacturers. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(26):6559–67. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7469-x>
5. Magalhaes V, Mantovani M, Caruso C, et al. Physicochemical and biological comparison of the first Brazilian biosimilar filgrastim with its reference product. *Biosimilars*. 2016;6:45–60. <https://doi.org/10.2147/BS.S107898>
6. Caselli D, Cesaro S, Aricò M. Biosimilars in the management of neutropenia: Focus on filgrastim. *Biologics*. 2016;10:17–22. <https://doi.org/10.2147/BTT.S73580>
7. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):4–14. Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):4–14 (In Russ.). EDN: [UBEKFJ](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00413-y)
8. White JR, Abodeely M, Ahmed S, et al. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *Biotechniques*. 2019;67(3):126–37. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>
9. Li H, Witkos TM, Umlauf S, Thompson C. Potency assay variability estimation in practice. *Pharm Stat*. 2025;24(1):e2408. <https://doi.org/10.1002/pst.2408>
10. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
11. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):10. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
12. Tiwari K, Wavdhane M, Haque S, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol*. 2015;53(6):849–54. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.943248>
13. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):10. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489>
14. Головинская ОВ, Байкова МЛ, Алпатова НА и др. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):193–201. Golovinskaya OV, Baykova ML, Alpatova NA, et al. Comparative analysis of dyes used in the assessment of filgrastim products specific activity by biological *in vitro* methods. *BIOpreparations. Prevention,*

- Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):193–201 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>
15. Nakoinz I, Lee MT, Weaver JF, Ralph P. Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 1990;145(3):860–4. PMID: [2142710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2142710/)
 16. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, et al. The 2nd International Standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods*. 2011;367(1–2):63–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.005>
 17. Никонова ЮА, Аббасова СГ, Каргополова ПЕ и др. Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):317–29. Nikonova YuA, Abbasova SG, Kargopolova PE, et al. Validation of an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on tocilizumab and determination of acceptance criteria for test results. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):317–29 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>
 18. Kirkland PD, Newberry KM. Your assay has changed – is it still “fit for purpose”? What evaluation is required. *Rev Sci Tech*. 2021;40(1):205–15. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3218>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблица S1* и *рисунки S1–S3*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** – утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **М.Л. Байкова** – проведение испытаний, сбор и систематизация данных; **О.В. Головинская** – анализ и интерпретация результатов, редактирование текста рукописи; **С.Л. Лысикова** – систематизация литературных данных; **В.В. Фоменко** – проведение испытаний, написание текста рукописи; **Н.А. Алпатова** – дизайн исследования, систематизация литературных данных, формулировка выводов.

Additional information. *Table S1* and *Figures S1–S3* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** approved the final version of the manuscript. **M.L. Baykova** conducted the study, collected and systematized the data. **O.V. Golovinskaya** analyzed and interpreted the results, and revised the manuscript. **S.L. Lysikova** systematized literature data. **V.V. Fomenko** conducted the study and drafted the manuscript. **N.A. Alpatova** designed the study, systematized literature data, and formulated the conclusions.

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / Lidia A. Gaiderova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Байкова Марина Леонидовна / Marina L. Baykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / Olga V. Golovinskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / Svetlana L. Lysikova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Фоменко Виктория Валерьевна / Viktoriia V. Fomenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8677-0927>

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / Natalia A. Alpatova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Поступила 03.10.2025

После доработки 22.12.2025

Принята к публикации 13.03.2026

Received October 3, 2025

Revised December 22, 2025

Accepted March 13, 2026