



А.Н. Афанасьева 
В.Б. Сапарова 
И.Е. Макаренко 
Р.В. Драй 
Т.А. Сельменских 

Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг»,
ул. Связи, д. 34а, Санкт-Петербург, пос. Стрельна, 198515,
Российская Федерация

✉ Афанасьева Алина Николаевна; Alina.Afanaseva@geropharm.com

РЕЗЮМЕ

Согласно требованиям нормативных документов, как российских, так и международных, методики, применяющиеся при исследовании биоэквивалентности, сопоставимости показателей качества биотехнологических (биологических) препаратов, выпускающем контроле качества лекарственных препаратов и прочих не менее важных *in vitro* исследованиях, должны быть валидированы. Для этих исследований *in vitro* используют тесты на связывание молекулы с рецептором и на биологическую активность препаратов. Однако в настоящее время не существует единого подхода к валидации биоаналитических методик *in vitro*, не связанных с определением концентрации действующего вещества в биологических жидкостях. **Цель работы:** валидировать методику оценки инсулинозависимого захвата глюкозы и доказать пригодность набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения глюкозы в культуральной среде. **Материалы и методы:** в исследовании использовали препараты производства ОАО «ГЕРОФАРМ» РинФаст® и плацебо к инсулину аспарт, клеточную линию миобластов крысы L6J1, набор ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения концентрации глюкозы. Исследование проводили на дифференцированных клетках, которые культивировали в течение 7 сут. Для дифференцировки L6J1 использовали питательную среду DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л и 2% сыворотки лошадиной. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9. **Результаты:** продемонстрированы показатели специфичности методики; в максимальной концентрации препарат отличается от плацебо в 4 раза по остаточному уровню глюкозы в культуральной среде. Определена прецизионность методики: сходимость составила 4–9%, внутрилабораторная прецизионность 11–16%. Коэффициент вариации устойчивости методики составил 14% в 4 независимых экспериментах в 9 аналитических сериях. Проведено сравнение инсулиновых продуктов (инсулин аспарт и генно-инженерный инсулин человека), для которых показатели концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) различались в 1,5 раза. Для набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP коэффициент детерминации линейной регрессии составил 0,9983; чувствительность – 1 ммоль/л, диапазон правильности – 95–107%. **Выводы:** можно утверждать, что методика является специфичной, высокопрецизионной и устойчивой для проведения оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии миобластов крысы L6J1 в качестве тест-системы и является пригодной для детектирования биологической активности препаратов инсулина в *in vitro* исследованиях.

Ключевые слова: валидация биоаналитических методик *in vitro*; клеточная линия миобластов крысы L6J1; метаболическая активность; биологическая активность; инсулин; определение глюкозы в клеточной культуральной среде; инсулинозависимый захват глюкозы

Для цитирования: Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Макаренко И.Е., Драй Р.В., Сельменских Т.А. Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):77–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-398>

A.N. Afanasyeva ✉ 
V.B. Saparova 
I.E. Makarenko 
R.V. Draï 
T.A. Selmenskikh 

Experimental Validation of an *In Vitro* Method for Assessing Insulin-Dependent Glucose Uptake

Pharm-Holding, CJSC
34-A Svyazi St., St. Petersburg, Strelina 198515, Russian Federation

✉ Alina N. Afanasyeva; Alina.Afanaseva@geropharm.com

ABSTRACT

Russian and international regulatory documents require that analytical procedures for establishing bioequivalence and comparability of quality attributes of biotechnological (biological) products, carrying out batch release of medicinal products, and conducting other equally important *in vitro* studies must be validated. These *in vitro* studies include molecule–receptor binding and product bioactivity assays. However, at present, there is no single approach to validation of *in vitro* bioanalytical methods not involving the determination of active ingredient concentrations in biological fluids. **The aim of the work** was to validate a procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake and demonstrate the suitability of GOD-PAP GLUCOSE kits for glucose determination in culture media. **Materials and methods:** The study used RinFast® insulin aspart by Geropharm, Russia; a placebo for insulin aspart; the L6J1 rat myogenic cell line; and a GOD-PAP GLUCOSE kit for quantitative determination of glucose. The study was carried out on differentiated cells cultured for 7 days. To encourage L6J1 differentiation, the authors used DMEM with 4.5 g/L glucose and 2% horse serum. The statistical analysis of results was performed using Prism 9. **Results:** The study demonstrated the analytical procedure's specificity, as the concentration of residual glucose in the culture medium observed with the placebo was 4 times higher than that with the maximum concentration of the medicinal product. The determination of precision showed the repeatability of 4–9% and the intralaboratory precision of 11–16%. The coefficient of variation for robustness amounted to 14% in 4 independent experiments comprising a total of 9 analytical runs. The authors compared insulin products (the insulin aspart and a genetically engineered human insulin), and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values differed by 1.5 times. For the GOD-PAP GLUCOSE kit, the linear regression coefficient of determination was 0.9983, the sensitivity amounted to 1 mmol/L, and the accuracy ranged between 95% and 107%. **Conclusions:** the procedure using L6J1 rat myoblasts as a test system may be considered specific, highly precise, and robust in assessing insulin-dependent glucose uptake and suitable for detecting biological activity of insulin preparations *in vitro*.

Key words: validation of *in vitro* bioanalytical methods; L6J1 rat myogenic cell line; metabolic activity; biological activity; insulin; determination of glucose in cell culture media; insulin-dependent glucose uptake

For citation: Afanasyeva A.N., Saparova V.B., Makarenko I.E., Draï R.V., Selmenskikh T.A. Experimental validation of an *in vitro* method for assessing insulin-dependent glucose uptake. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):77–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-398>

Введение

Валидация биоаналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. Соблюдение принципов валидации обеспечивает надежность данных, получаемых в процессе разработки и экспертизы

качества лекарственных препаратов на рынке как химических, так и биологических препаратов¹. Подходы к валидации биоаналитических и химических методик различаются. В руководствах Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по валидации биоаналитических

¹ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. EMA; 2006. Приложение № 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85.

методик² описаны пути разработки и валидации методик количественного определения действующего вещества в биологической жидкости (матрице) (например, методик иммуноферментного анализа), однако отсутствуют прямые указания на возможность трансфера этого метода для валидации методик определения биологической/метаболической/митогенной активности препарата *in vitro*.

В методике оценки инсулинозависимого захвата глюкозы используется миогенная линия клеток L6J1 – субклон материнской линии L6, которую выделил Д. Яффе из первичных культур мышц бедра крысы [1]. При смене богатой сывороткой среды на бедную миобласты L6J1 дифференцируются – клетки сливаются с образованием многоядерных миотубул, представляющих собой *in vitro* модель поперечнополосатой мускулатуры. Дифференцировка определяется по изменению морфологии клеток: появляются видимые мышечные волокна, мультиядерные клетки, при этом возникает способность экспрессировать переносчик глюкозы GLUT4 [2–4]. В обычных условиях при низкой концентрации инсулина большинство молекул GLUT4 отделены от цитоплазматической мембраны в виде внутриклеточных везикул, но посредством внутриклеточной каскадной реакции инсулин стимулирует транслокацию (перемещение) белков – переносчиков глюкозы к цитоплазматической мембране, где они закрепляются, образуя комплексы [5–8]. Наиболее важным среди механизмов влияния инсулина на метаболизм глюкозы является регуляция активности транспортера GLUT4 и, следовательно, поглощения глюкозы [9]. Перечисленные эффекты позволяют использовать дифференцированные клетки линии L6J1 в качестве тест-системы для оценки активности инсулиновых продуктов.

Точное определение концентрации глюкозы на клеточном уровне затруднительно по причине экономической неэффективности методов (в том числе сложностей манипуляций с клеточной линией, необходимости оснащения дорогостоящим оборудованием и пр.). В настоящем исследовании рассматривается способ определения аналита глюкозооксидазным (GOx) методом. Метод основан на окислении глюкозы в присутствии глюкозооксидазы с образованием эквивалентного количества пероксида водорода, которая, в свою очередь, в присутствии пероксидазы окисляет детектируемое вещество (хромоген) [10, 11].

Цель работы – валидация методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы на дифференцированных миоцитах крысы линии L6J1 в качестве тест-системы и оценка пригодности набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения глюкозы в культуральной среде.

Материалы и методы

Исследуемая методика оценки инсулинозависимого захвата глюкозы состоит из двух этапов: *in vitro* стимуляция инсулинозависимой клеточной культуры и определение концентрации глюкозы в культуральной жидкости с помощью коммерческого набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP (НПФ «Абрис+»). Выбор набора реагентов для определения концентрации глюкозы в культуральной среде обусловлен оптимальным соотношением цена/качество, доступностью для приобретения на территории России, а также достаточной стабильностью реагентов, входящих в его состав.

Культура клеток. В исследовании использовали клеточную линию скелетной мышцы крысы сублинии L6J1 (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН. Коллекция культур клеток позвоночных). Для рутинного культивирования использовали полную питательную среду DMEM с феноловым красным и содержанием глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) (ООО «БиолоТ», арт. 1.3.5) в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки, далее FBS (Capricorn Scientific, арт. FBS-11A). В эксперименте использовали клетки до 20 пассажа с подтвержденным отсутствием микоплазмы.

Дифференцировка клеточной линии. Для дифференцировки культуру L6J1 рассевали в стерильные 96-луночные планшеты в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) с добавлением 2% лошадиной сыворотки (ООО «БиолоТ», арт. 1.1.5.2) и смеси антибиотиков пенициллин G – 50000 ед./фл., стрептомицин – 50 мкг/фл. (ООО «БиолоТ», арт. 1.3.18). Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 сут. Изменения морфологии клеток линии L6J1 в процессе дифференцировки фиксировали с помощью флуоресцентного микроскопа Evos® FL (Life Technologies) (рис. 1).

Стимуляция препаратами. В исследовании были протестированы препараты производства ОАО «ГЕРОФАРМ» РинФаст®, плацебо к инсулину аспарт (данный препарат не содержал действующего вещества (инсулин аспарт), состав вспомогательных веществ был аналогичен

² Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. EMA; 2011.
ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation. EMA; 2019.

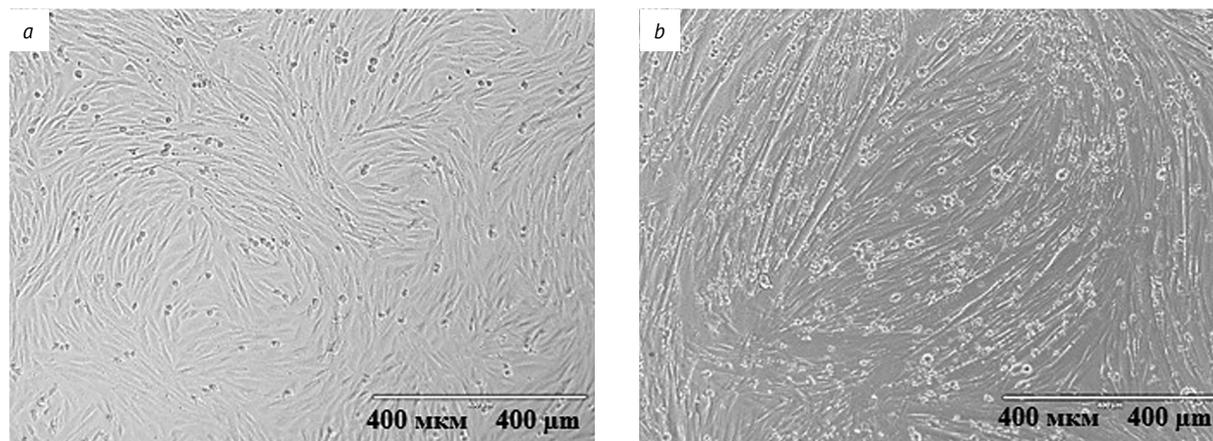


Рис. 1. Морфология клеток линии L6J1. *a* – миобласты скелетной мускулатуры крысы, недифференцированное состояние; *b* – миоциты, дифференцированная культура, наблюдаются миотубулы, *in vitro* модель поперечнополосатой мускулатуры

Fig. 1. L6J1 cell morphology: undifferentiated rat skeletal myoblasts (*a*) and a differentiated myocyte culture with visible myotubes, an *in vitro* model of striated muscles (*b*)

лекарственному препарату) и раствор инсулина человека для культур клеток (Sigma-Aldrich, кат. № I9278), который представляет собой генно-инженерный инсулин человека. Образцы тестировали в 8 концентрационных точках: 1; 10; 50; 100; 250; 400; 800; 1600; 2500 нМ, тест на специфичность методики выполняли с использованием растворов с концентрациями 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 250; 500; 2000; 5000 нМ, что не противоречит критериям оценки, так как проводили сравнение внутри одной аналитической серии двух разных препаратов. При проведении экспериментов с плацебо использовали растворы с разведениями, соответствующими аналогичным разведениям готовой лекарственной формы.

Внесение объектов испытания в среду с содержанием глюкозы 25 ммоль/л проводили на 7 сут с момента начала эксперимента в дифференцированные клетки. После чего клетки инкубировали с исследуемыми объектами в течение 3 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Определение уровня глюкозы проводили на 10 сут с момента начала эксперимента.

Определение концентрации глюкозы проводили в клеточной культуральной среде после инкубации с препаратом при помощи коммерчески доступного набора реагентов ГЛЮКОЗА GOD-PAP (НПФ «Абрис+», кат. № 304.3.250) путем определения оптической плотности (ОП) на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech) при длине волны 504 нм.

Во все лунки полистиролового 96-луночного планшета вносили по 250 мкл ферментативного

буферного раствора, содержащего 15000 МЕ/л глюкозооксидазы и 1000 МЕ/л пероксидазы, а также по 2,5 мкл образцов, калибровочных проб и нулевой пробы. Инкубировали 15 мин при 37 °С при 250 об./мин на планшетном шейкере ELMI Skyline ST-3L (ELMI Ltd.).

Для оценки линейности и чувствительности определения глюкозы в качестве образца глюкозы использовали калибраторы, приготовленные из реагента «глюкоза безводная» (не менее 99,5%, АО «ЛенРеактив», кат. № 040668) с концентрацией 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25 и 30 ммоль/л. В качестве образцов контроля качества использовали калибратор набора, содержание глюкозы 5,5 ммоль/л.

Валидационные параметры. Критерии валидации были подобраны согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) и ЕМА. Процедура валидации включала оценку специфичности методики, устойчивости и прецизионности, в качестве дополнительной характеристики был проведен тест на различение инсулиновых продуктов. Проведена оценка линейности, чувствительности, правильности и прецизионности при использовании набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP.

Для оценки специфичности рассмотрен ответ дифференцированных клеток линии L6J1 на стимуляцию растворами РинФаст® и плацебо препарата РинФаст® в соответствующих

концентрациях. Критерием приемлемости методики было установлено отличие не менее чем в 2 раза по остаточному уровню глюкозы в культуральной среде в максимальной концентрации препарата.

Прецизионность оценивали по показателям сходимости и внутрилабораторной прецизионности. Для определения сходимости проанализированы результаты, полученные при одних и тех же условиях, в течение короткого промежутка времени: анализ проводил один исполнитель, используя одни и те же реактивы и оборудование, в один день в нескольких повторностях. В качестве критерия приемлемости был принят коэффициент вариации (CV) $\leq 20\%$. Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам, полученным при проведении теста разными исполнителями либо одним исполнителем в разные дни. Описанный подход позволил оценить как общую внутрилабораторную прецизионность методики, так и междневную прецизионность и прецизионность при смене исполнителя, а также степень влияния каждого из двух факторов. Критерием приемлемости для параметра внутрилабораторной прецизионности был принят CV $\leq 20\%$.

Оценку устойчивости ответа тест-системы проводили по совокупности результатов, полученных при изменении условий проведения эксперимента. Характеристикой близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в установленных, но не идентичных условиях, являлся критерий CV $\leq 25\%$.

Линейность и чувствительность определения глюкозы в клеточной культуральной среде оценивали для диапазона концентраций 1,0–30,0 ммоль/л, данный диапазон был указан как линейный в инструкции к набору. Линейность сохраняется для не менее четырех ненулевых калибровочных точек в диапазоне концентраций (1,0–30,0) $\pm 15\%$ ммоль/л, для верхнего и нижнего предела количественного определения (ВПКО и НПКО) $\pm 20\%$. Критерием приемлемости для параметра чувствительности является CV $\leq 20\%$ для точек с минимальной концентрацией. Критерий приемлемости для параметра правильности: полученное значение должно составлять 85–115% (80–120% для НПКО) от номинальной концентрации.

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводили, используя программное обеспечение MARS Data Analysis Software 3.01 R2 для мультимодального микропланшетного ридера CLARIOstar®. Концентрацию

раствора глюкозы определяли по калибровочному графику зависимости ОП от концентрации раствора глюкозы в диапазоне концентраций, соответствующем критериям линейности и чувствительности методики. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9 (GraphPad Software). Данные нормировали, за 100% принимали уровень глюкозы в клеточной культуральной среде без внесения исследуемых препаратов, за 0% – уровень глюкозы в клеточной культуральной среде с максимальной концентрацией инсулина. Концентрация глюкозы в культуральной среде соответствовала линейному диапазону методики 1–25 ммоль/л. По полученным данным строили пятипараметрическую кривую зависимости концентрации глюкозы (X) в среде от концентрации препарата для подсчета величины полумаксимального ингибирования IC₅₀ (концентрация инсулина, при которой достигается 50% снижения концентрации глюкозы в среде). Для полученных данных рассчитаны средние арифметические значения и соответствующие стандартные отклонения (SD).

Результаты и обсуждение

Специфичность тест-системы, используемой в биоаналитической методике, определяется возможностью с ее помощью достоверно отличать действующее вещество от примесных соединений, продуктов его деградации и вспомогательных веществ.

В рамках проведенной валидации проанализировали ответ клеточной линии L6J1 на стимуляцию растворами РинФаст® и плацебо препарата РинФаст® (рис. 2, табл. 1). При внесении в среду препарата РинФаст® уровень глюкозы снижается до 22,2–24,1% от исходного уровня, что свидетельствует о стимуляции захвата глюкозы клетками. Содержание глюкозы в образце при внесении плацебо РинФаст® в максимальной концентрации не изменилось, что свидетельствует о сохранении глюкозы в среде в неизменном виде, а следовательно, об отсутствии захвата глюкозы клеткой. Незначительное снижение количества глюкозы (до 82,6% от начального) в образцах, содержащих раствор плацебо РинФаст® в низких концентрациях, может быть связано с вариабельностью методики или, возможно, с действием входящих в состав плацебо вспомогательных веществ.

Различия между максимальным и минимальным показателем содержания глюкозы в растворах, содержащих плацебо РинФаст®, составили

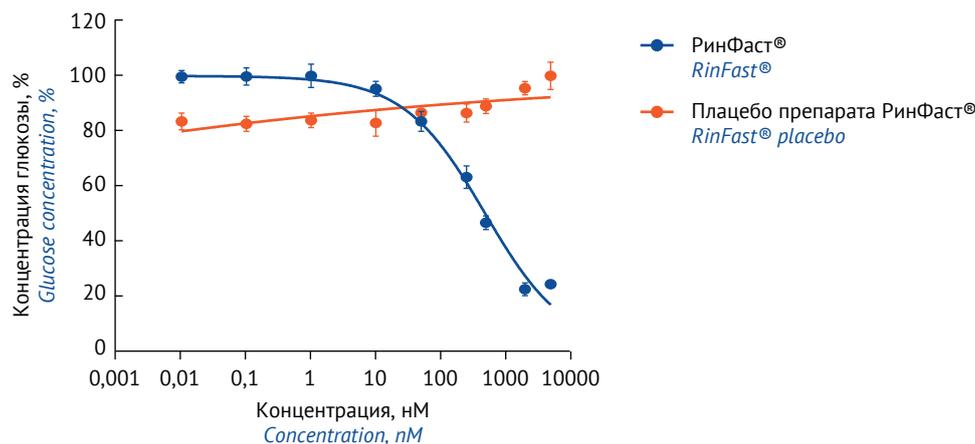


Рис. 2. Специфичность ответа клеточной линии L6J1. Зависимость концентрации глюкозы в среде от концентрации исследуемых препаратов, нормированные данные представлены в виде $\bar{X} \pm SD$

Fig. 2. Specificity of the L6J1 cell line response. Glucose concentrations in the medium are plotted as a function of test product and placebo concentrations; normalised data are presented as $\bar{X} \pm SD$

17,4%, в то время как в растворах РинФаст® – 77,8%. Таким образом, методику можно считать специфичной по критерию приемлемости: концентрация глюкозы в образцах, содержащих препарат РинФаст® и плацебо РинФаст® в концентрации 5 мкМ, отличается более чем в 4 раза.

Прецизионность характеризует степень близости результатов индивидуальных независимых испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит от случайных факторов и выражается величиной стандартного отклонения – коэффициентом

вариации. Экстремальные показатели прецизионности – сходимость и воспроизводимость. Во всех экспериментах для стимуляции захвата глюкозы использовали РинФаст® в диапазоне концентраций 0–2500 нМ. Оценку прецизионности методики проводили по значению IC_{50} .

Сходимость (повторяемость, межпланшетная вариабельность) характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем, с использованием

Таблица 1. Оценка специфичности ответа клеточной линии L6J1 на введение РинФаст® и плацебо РинФаст®

Table 1. Evaluation of the specificity of L6J1 cell line responses to RinFast® and its placebo

Концентрация препаратов, нМ Product concentration, nM	РинФаст® RinFast®		Плацебо РинФаст® RinFast® placebo	
	Остаток глюкозы в среде Residual glucose in the medium			
	$(\bar{X} \pm SD)$, ммоль/л $(\bar{X} \pm SD)$, mmol/L	Нормированные данные, % Normalised data, %	$(\bar{X} \pm SD)$, ммоль/л $(\bar{X} \pm SD)$, mmol/L	Нормированные данные, % Normalised data, %
0	16,2 ± 0,7	100	16,6 ± 1	100
0,01	16,5 ± 0,4	99,7	17 ± 0,6	83,4
0,1	16,5 ± 0,5	99,8	16,9 ± 0,6	82,6
1	16,5 ± 0,7	100	17,1 ± 0,5	83,8
10	15,8 ± 0,4	95,3	16,9 ± 1	82,9
50	13,8 ± 0,6	83,4	17,7 ± 0,4	86,7
250	10,4 ± 0,7	63,1	17,7 ± 0,7	86,5
500	7,7 ± 0,4	46,5	18,2 ± 0,6	89,0
2 000	3,7 ± 0,4	22,2	19,5 ± 0,5	95,5
5 000	4,0 ± 0,3	24,1	20,4 ± 1	100

Примечание. Концентрация глюкозы представлена в виде средних значений (\bar{X}) в 8 повторностях.
Note. Glucose concentrations are presented as mean values (\bar{X}) for 8 replicates.

одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

В рамках проведенной валидации была оценена межпланшетная сходимости по результатам 5 независимых тестов (табл. 2). Сходимость методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками линии L6J1 по результатам независимых испытаний составила от 4 до 9%, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Внутрилабораторная прецизионность оценивается в условиях работы одной лаборатории с изменением условий проведения эксперимента. В рамках валидации проанализировали внутрилабораторную прецизионность методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками линии L6J1 с изменением двух ключевых условий проведения анализа: день постановки эксперимента и исполнитель (табл. 3, 4). Внутрилабораторная прецизионность составляет 11–16%, большой вклад в разброс данных вносит смена исполнителя.

Устойчивость (робастность) валидируемой методики – способность сохранять установленные в оптимальных (номинальных) условиях характеристики при вероятных небольших изменениях условий проведения анализа. Устойчивость методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы на тест-системе дифференцированных миоцитов линии клеток крысы L6J1 оценивали в 4 независимых экспериментах, проводившихся в 2 различных временных периодах с участием 3 исполнителей (9 полных аналитических серий). В каждом тесте меняли номер пассажа, степень конfluence-ности клеток линии L6J1 и конfluence-ность клеток перед рассевом: использованы пассажи от 1 до 15 с конfluence-ностью клеток 80–100%. Во всех экспериментах для стимуляции захвата глюкозы использовали РинФаст® в диапазоне концентраций 0–2500 нМ. Оценку устойчивости проводили по значению IC_{50} (рис. 3, табл. 5).

По результатам четырех независимых экспериментов коэффициент вариации для методики

Таблица 2. Оценка сходимости методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 2. Evaluation of the repeatability of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Исполнитель <i>Analyst</i>	<i>n</i>	IC_{50} , нМ <i>IC₅₀, nM</i>	Среднее IC_{50} , нМ <i>Mean IC₅₀, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
1	3	246,3	255,7	4
		266,5		
		254,3		
1	2	331,5	311,3	9
		291,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (количество проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC_{50} рассчитывалось по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC_{50} value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

Таблица 3. Оценка внутрилабораторной прецизионности (разные дни) методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 3. Evaluation of the intralaboratory precision (different days) of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Дата проведенного исследования <i>Testing date</i>	<i>n</i>	IC_{50} , нМ <i>IC₅₀, nM</i>	Среднее IC_{50} , нМ <i>Mean IC₅₀, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
25.02.2020–06.03.2020	1	265,7	275,9	11
		246,3		
10.03.2020–20.03.2020	3	266,5		
		254,3		
17.03.2020–27.03.2020	2	331,5		
		291,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC_{50} рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC_{50} value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

Таблица 4. Оценка внутрिलाбораторной прецизионности (разные исполнители) методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 4. Evaluation of the intralaboratory precision (different analysts) of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Исполнитель <i>Analyst</i>	<i>n</i>	IC ₅₀ , нМ <i>IC₅₀, nM</i>	Среднее IC ₅₀ , нМ <i>Mean IC₅₀, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
1	2	331,5	279,2	16
		291,1		
2	2	306,3		
		281,3		
3	2	267,8		
		197,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.
Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC₅₀ value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы составляет 14%, что отвечает критериям устойчивости методики.

Различение инсулиновых продуктов. Проведен эксперимент, подтверждающий возможность различать инсулиновые продукты, отличающиеся модификацией молекулы, с помощью валидируемой методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. Стимуляцию проводили растворами РинФаст® и препарата генно-инженерного инсулина человека для культур клеток в диапазоне концентраций 0–2500 нМ в трех аналитических сериях. Результаты оценивали по значению IC₅₀ (рис. 4, табл. 6).

Ответ тест-системы дифференцированных миоцитов линии L6J1 позволяет специфично

различать инсулиновые продукты, что делает методику применимой для оценки биологической активности препаратов инсулина.

При проведении валидации методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы была доказана специфичность, прецизионность и устойчивость клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы, методика является пригодной для детектирования биологической активности препаратов инсулина в исследованиях *in vitro*.

Линейность методики была оценена во всем исследуемом диапазоне концентраций (рис. 5, табл. 7). Коэффициент детерминации для полученной зависимости ОП от концентрации глюкозы составил 0,9983. Калибровочную кривую можно считать линейной в диапазоне концентраций 1–30 ммоль/л.

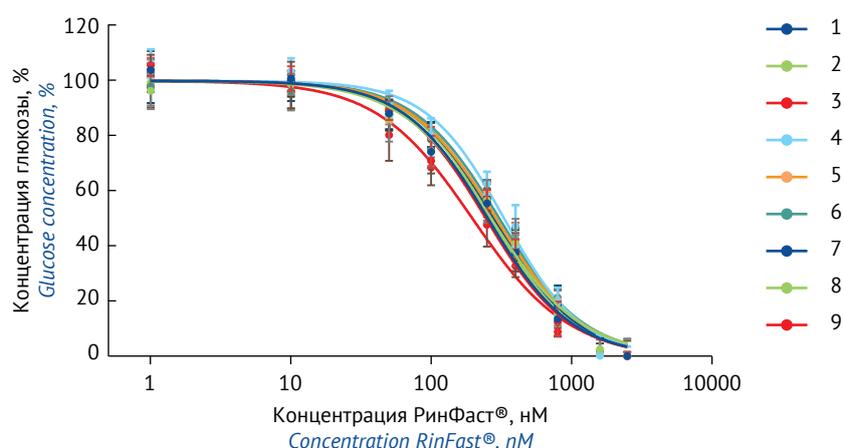


Рис. 3. Устойчивость метода оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками L6J1. Зависимость концентрации глюкозы в среде от концентрации РинФаст®, нормированные данные представлены в виде $\bar{X} \pm SD$. Условные обозначения в легенде соответствуют порядковому номеру эксперимента в таблице 5

Fig. 3. Robustness of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake by L6J1 cells. Glucose concentrations in the medium are plotted as a function of RinFast® concentrations; normalised data are presented as $\bar{X} \pm SD$. The legend shows numbers of the experiments described in Table 5

Таблица 5. Оценка устойчивости методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 5. Evaluation of the robustness of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

№	Дата проведения эксперимента Testing date	Исполнитель Analyst	n	IC ₅₀ , нМ IC ₅₀ , nM	Пассаж Passage	Конфлюэнт-ность, % Confluence, %	Среднее IC ₅₀ , нМ Mean IC ₅₀ , nM	Коэффициент вариации, CV, % Coefficient of variation, CV, %
1	10.03.2020– 20.03.2020	1	3	246,3	15	100	271,4	14
2				266,5				
3				254,3				
4	17.03.2020– 27.03.2020	1	2	331,5	3	80		
5				291,1				
6	17.03.2020– 27.03.2020	2	2	306,3	1	95		
7				281,3				
8	17.03.2020– 27.03.2020	3	2	267,8	1	95		
9				197,1				

Примечание. n – количество проведенных тестов (количество проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. n – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC₅₀ value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

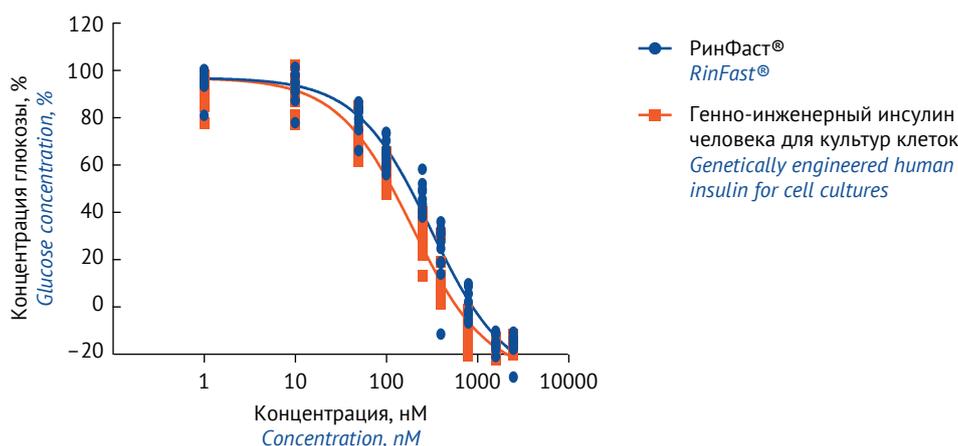


Рис. 4. Зависимость концентрации глюкозы в среде с клетками L6J1 от концентрации вносимого препарата. Данные представлены в виде индивидуальных точек для каждого повтора, всего по 8 повторов для каждой концентрации препарата

Fig. 4. Glucose concentrations in the medium as a function of RinFast® concentrations. Data are presented as individual points for each replicate, with a total of 8 replicates for each product concentration

Таблица 6. Результаты расчета концентрации инсулинового препарата, при которой достигается 50% снижения концентрации глюкозы в среде (IC₅₀)

Table 6. Results of calculating the Insulin product concentration causing a 50% decrease in the concentration of glucose in the medium (IC₅₀)

Инсулиновый препарат Insulin product	IC ₅₀ , нМ IC ₅₀ , nM	Среднее IC ₅₀ , нМ Mean IC ₅₀ , nM	Коэффициент вариации, CV, % Coefficient of variation, CV, %
РинФаст® RinFast®	217,9	249,9	13
	282,0		
	249,8		
Генно-инженерный инсулин человека Genetically engineered human insulin	183,1	176,0	4
	173,0		
	171,8		

Примечание. Значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. The IC₅₀ value was calculated from 8 replicates for each concentration point.

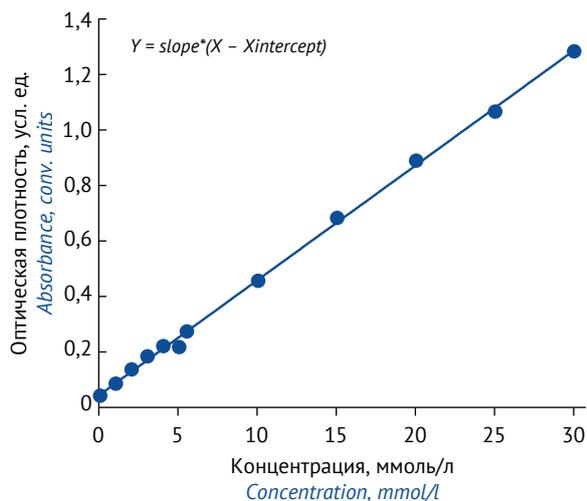


Рис. 5. Зависимость оптической плотности при 504 нм от концентрации глюкозы в среде. Значения оптической плотности представлены в виде $\bar{X} \pm SD$

Fig. 5. The absorbance at 504 nm as a function of glucose concentrations in the medium. Absorbance values are presented as $\bar{X} \pm SD$

Результаты измерений удовлетворяли критериям приемлемости в линейном диапазоне 1,0–30,0 ммоль/л. НПКО методики составляет 1 ммоль/л, чувствительность установлена на уровне НПКО (1 ммоль/л).

Для оценки правильности измерений с помощью набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP были проанализированы независимые образцы контроля качества на трех уровнях концентраций

глюкозы, соответствующих низкому – 1 мМ, среднему – 10 мМ и высокому уровню – 25 мМ (табл. 8).

Значения концентрации глюкозы в культуральной среде составили 95–107% от номинального значения, что соответствует критериям приемлемости.

Заключение

Методика оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы валидирована и может применяться для определения метаболической активности инсулинов в исследованиях разработки препаратов, биоэквивалентности, сопоставимости и выпускающем контроле качества лекарственных препаратов. Набор ГЛЮКОЗА GOD-PAP является пригодным для определения концентрации глюкозы в культуральной среде и может быть использован для оценки инсулинозависимого захвата глюкозы.

Предложенный методологический подход к валидации биоаналитических методик на примере оценки методики по определению инсулинозависимого захвата глюкозы в дальнейшем может быть использован при разработке методических рекомендаций по валидации биологических методик определения метаболической активности препаратов или для внесения соответствующих разделов в нормативные документы.

Таблица 7. Результаты обратного расчета калибровочных образцов для оценки линейности методики

Table 7. Results of back-calculation of calibration samples to evaluate the procedure's linearity

Номинальная концентрация глюкозы, мМ <i>Nominal glucose concentration, mM</i>	Концентрация глюкозы, рассчитанная по калибровочному уравнению, мМ <i>Glucose concentration calculated from the calibration equation, mM</i>			Среднее значение концентрации глюкозы, мМ <i>Mean glucose concentration, mM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation, CV, %</i>
0,0	–	–	–	–	–
1,0	0,95	1,02	0,95	0,97	4
2,0	2,59	2,03	2,02	2,21	15
3,0	3,15	3,21	3,72	3,36	9
4,0	4,31	3,70	4,46	4,16	10
5,0	4,31	3,70	4,46	4,16	10
10,0	9,84	9,97	10,11	9,97	1
15,0	15,34	15,48	15,63	15,48	1
20,0	20,32	20,68	20,39	20,46	1
25,0	24,57	24,82	24,86	24,75	1
30,0	29,73	29,74	30,56	30,01	2

Примечание. «–» – значения не рассчитаны из-за чувствительности методики.

Note. – these values were not calculated because of the procedure's sensitivity.

Таблица 8. Результаты по оценке правильности методики определения концентрации глюкозы в культуральной среде

Table 8. Results of evaluating the accuracy of the procedure for determining the concentration of glucose in the culture medium

Уровень концентрации глюкозы <i>Glucose concentration level</i>	Номинальная концентрация, мМ <i>Nominal concentration, mM</i>	Найдено \bar{X} , мМ <i>Determined \bar{X}, mM</i>	Открываемость, % <i>Recovery, %</i>
Низкий <i>Low</i>	1	0,95	95
		1,02	102
		0,95	95
Средний <i>Medium</i>	10	9,97	100
		9,88	99
		10,11	101
Высокий <i>High</i>	25	26,71	107
		26,51	106
		24,86	99

Примечание. Среднее значение рассчитывали из трех измерений для каждой концентрации.

Note. Mean values were calculated from three measurements for each concentration.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968;61(2):477–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.477>
2. Mandel JL, Pearson ML. Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. *Nature*. 1974;251(5476):618–20. <https://doi.org/10.1038/251618a0>
3. Jacobs FA, Bird RC, Sells BH. Differentiation of rat myoblasts. Regulation of turnover of ribosomal proteins and their mRNAs. *Eur J Biochem*. 1985;150(2):255–63. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09015.x>
4. Portiér GL, Benders AG, Oosterhof A, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Differentiation markers of mouse C2C12 and rat L6 myogenic cell lines and the effect of the differentiation medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999;35(4):219–27. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0030-8>
5. Alvim RO, Cheuhen MR, Machado SR, Sousa AGP, Santos PCJL. General aspects of muscle glucose uptake. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87(1):351–68. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140225>
6. Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED, Horton ES. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):E667–72. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.258.4.E667>
7. Lee AD, Hansen PA, Holloszy JO. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1995;361(1):51–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00147-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00147-2)
8. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(13):5817–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5817>
9. Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(4):983–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.983>
10. Jiang S, Zhang Y, Yang Y, Huang Y, Ma G, Luo Y, et al. Glucose oxidase-instructed fluorescence amplification strategy for intracellular glucose detection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(11):10554–8. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00010>
11. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*. 1969;22(2):158–61. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>

Вклад авторов. А.Н. Афанасьева – написание текста, анализ и интерпретация результатов исследований, участие в выполнении экспериментов; В.Б. Сапарова – существенный вклад в концепцию работы, анализ и интерпретация результатов исследований, редактирование текста; И.Е. Макаренко – критический пересмотр содержания статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Р.В. Драй – руководство исследованием, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Т.А. Сельменских – участие в выполнении экспериментов.

Authors' contributions. Alina N. Afanasyeva—writing of the text, analysis and interpretation of the study results, participation in the experimental work; Valeria B. Saparova—a significant contribution to the study concept, analysis and interpretation of the study results, editing of the text; Igor E. Makarenko—critical revision of the text, approval of the final version of the paper for publication; Roman V. Drai—research management, approval of the final version of the paper for publication; Tatyana A. Selmenskikh—participation in the experimental work.

Благодарности. В проведении исследования и подготовке статьи оказывали помощь коллеги из службы обеспечения качества ЗАО «Фарм Холдинг» И.С. Гиба и А.А. Батуева. Спонсорская поддержка ОАО «ГЕРОФАРМ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Acknowledgements. I.S. Giba and A.A. Batueva, the authors' colleagues from the quality assurance service of Pharm-Holding, CJSC, assisted in the research and preparation of the paper. GEROPHARM, OJSC provided funding for the research.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Афанасьева Алина Николаевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>

Alina.Afanaseva@geropharm.com

Сапарова Валерия Бяшимовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>

Valeriya.Saparova@geropharm.com

Макаренко Игорь Евгеньевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Igor.Makarenko@geropharm.com

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Roman.Drai@geropharm.com

Сельменских Татьяна Алексеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>

Tatyana.Selmenskikh@geropharm.com

Alina N. Afanasyeva.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>

Alina.Afanaseva@geropharm.com

Valeria B. Saparova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>

Valeriya.Saparova@geropharm.com

Igor E. Makarenko, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Igor.Makarenko@geropharm.com

Roman V. Drai, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Roman.Drai@geropharm.com

Tatyana A. Selmenskikh.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>

Tatyana.Selmenskikh@geropharm.com

Статья поступила 21.10.2021

После доработки 24.03.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 20.07.2022

Article was received 21 October 2021

Revised 24 March 2022

Accepted for publication 7 June 2022

Online first 20 July 2022