

Использование биомаркеров в фармакокинетических исследованиях лекарственных препаратов природного происхождения

В. М. Косман*, Н. М. Фаустова, М. В. Карлина, В. Г. Макаров, М. Н. Макарова

Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,
Заводская ул., 3, к. 245, г.п. Кузьмолловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

Резюме. Лекарственные препараты природного происхождения имеют широкое применение благодаря их фармакологической активности и относительной безопасности. Химический состав таких препаратов, как правило, сложен — они могут являться гетерополимерами или смесями, содержащими пептиды, полисахариды и другие эндогенные компоненты и/или соединения, быстро метаболизируемые в живом организме. Традиционные подходы к изучению таких препаратов, основанные на хроматографических методах, зачастую оказываются неприменимы. Для изучения фармакокинетики препаратов природного происхождения возможно применение методов, основанных на оценке биологического действия и фармакодинамических свойствах таких препаратов, связанных с определением уровней биологических маркеров (биомаркеров). **Цель работы** — обобщение накопленного экспериментального опыта по применению биомаркеров для оценки фармакокинетики на примере нескольких препаратов природного происхождения. **Материалы и методы:** объектами исследования служили фукоидан, выделенный из *Fucus vesiculosus*; комплекс биологически активных веществ и гликозилированный полипептид, выделенные из гонад зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*. Корреляции между концентрациями исследуемых смесей и активностью/концентрацией потенциальных биомаркеров были установлены на базе *in vitro* / *ex vivo* экспериментов. Для установления специфичности, калибровочного (линейного) диапазона отклика биомаркера, его нативного уровня были получены экспериментальные данные по его содержанию в плазме или сыворотке (*in vitro*) и цельной крови (*ex vivo*) до и после внесения добавок известных количеств исследуемых препаратов. Аналитические методики были основаны на применении хромогенного (оптического) метода определения активности анти-Ха фактора, определении активности ферментов дипептидилпептидазы IV типа и лактатдегидрогеназы кинетическим методом со спектрофотометрическим детектированием продуктов ферментативных реакций. **Результаты:** анализ результатов исследований ряда лекарственных препаратов природного происхождения (фукоидана, выделенного из *F. vesiculosus*; гликозилированного полипептида и комплекса биологически активных веществ, выделенных из внутренних органов *S. droebachiensis*) показал, что подход к изучению фармакокинетики подобных препаратов с использованием биомаркеров оправдан. Его применение позволило корректно рассчитать фармакокинетические параметры. **Выводы:** обсуждаемый подход может быть использован в различных биологических моделях и эффективен для исследования соединений, которые трудно или невозможно детектировать методами, традиционно используемыми для анализа биопроб при исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов.

Ключевые слова: фармакокинетика; препараты природного происхождения; биологическая активность; биомаркеры; анти-Ха фактор; дипептидилпептидаза IV типа; лактатдегидрогеназа; энзиматический анализ; кинетические методы; фукоидан; *Fucus vesiculosus*; биологически активные вещества; гликозилированный полипептид; *Strongylocentrotus droebachiensis*

Для цитирования: Косман ВМ, Фаустова НМ, Карлина МВ, Макаров ВГ, Макарова МН. Использование биомаркеров в фармакокинетических исследованиях лекарственных препаратов природного происхождения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(1):24–35. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-24-35>

* **Контактное лицо:** Косман Вера Михайловна; kosman.v.m@doclinika.ru

Use of Biomarkers in Pharmacokinetics Studies of Medicinal Products of Natural Origin

V. M. Kosman*, N. M. Faustova, M. V. Karlina, V. G. Makarov, M. N. Makarova

St.-Petersburg Institute of Pharmacy,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

Abstract. Medicinal products of natural origin are widely used by virtue of their pharmacological efficacy and relative safety. Chemical composition of such medicines is usually complex, they may be represented by heteropolymers or mixtures containing peptides, polysaccharides, and other compounds which are endogenous and/or rapidly metabolised in a living organism. Conventional, chromatography-based approaches to evaluation of such medicines are often not applicable. Pharmacokinetics of medicinal products of natural origin may be studied by methods based on assessment of biological action and pharmacodynamic properties of such medicines, which involves determination of biological marker (biomarker) levels. **The aim** of the study was to summarise the accumulated experimental data on the use of biomarkers in pharmacokinetics studies as illustrated by a few medicinal products of natural origin. **Material and methods.** The authors studied fucoidan from *Fucus vesiculosus*, as well as a complex of bioactive compounds and a glycopeptide—both isolated from gonads of green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *In vitro* / *ex vivo* experiments were used to establish correlation between the concentrations of the test mixtures and the activity/concentration of potential biomarkers. Experiments showing the biomarker concentration in plasma or serum (*in vitro*) and whole blood (*ex vivo*) before and after spiking with the studied products were performed in order to assess specificity, calibration (linear) range of the biomarker response, and its native concentration. The analytical procedures were based on the chromogenic (optical) anti-factor Xa activity (AXA) assay, and determination of dipeptidyl peptidase 4 and lactate dehydrogenase activity by kinetic

analysis with spectrophotometric detection of enzymatic reaction products. **Results.** The analysis of the results of studies of a number of natural products (fucoidan from *Fucus vesiculosus*; a complex of bioactive compounds isolated from gonads of green sea urchins *S. droebachiensis*; a glycopeptide isolated from internal organs of *S. droebachiensis*) demonstrated the feasibility of using biomarkers in pharmacokinetics studies of such products. This approach allowed for accurate calculation of pharmacokinetic parameters. **Conclusion.** The discussed approach may be used for various biological models and is an effective means of studying compounds that are difficult or impossible to detect by conventional bioassays in pharmacokinetics and bioequivalence studies.

Key words: pharmacokinetics; medicinal products of natural origin; biological activity; biomarkers; anti-factor Xa; dipeptidyl peptidase 4; lactate dehydrogenase; enzymatic assay; kinetic methods; fucoidan; *Fucus vesiculosus*; biologically active compounds; glycosylated polypeptide; *Strongylocentrotus droebachiensis*

For citation: Kosman VM, Faustova NM, Karlina MV, Makarov VG, Makarova MN. Use of biomarkers in pharmacokinetics studies of medicinal products of natural origin. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(1):24–35. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-24-35>

*Corresponding author: Vera M. Kosman; kosmanvm@doclinika.ru

Лекарственные препараты природного (животного и растительного) происхождения, а также полученные в ходе биологического синтеза, имеют широкое медицинское применение благодаря фармакологической активности и относительной безопасности. Сложность изучения фармакокинетического профиля препаратов природного происхождения связана с тем, что они часто имеют сложный гетерогенный состав, и точно установить структуру составляющих их соединений не всегда возможно. Концентрации маркерных биологически активных соединений низки, и определение таких соединений может быть затруднительным в связи с тем, что основу такого рода препаратов составляют полисахариды, пептиды, белки и другие вещества, являющиеся эндогенными и/или быстро метаболизирующимися в живом организме. Поэтому традиционные подходы к изучению фармакокинетики, основанные на хроматографических методах (высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым, флуориметрическим, масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС), газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) и др.), оказываются неэффективными для изучения препаратов сложного состава. Альтернативным вариантом является изучение их фармакокинетики, основанное на использовании биологических маркеров (биомаркеров), уровень содержания которых связан с биологической активностью изучаемых препаратов и их фармакодинамическими свойствами.

Подход к оценке фармакокинетики с использованием биомаркеров (в литературе используют также термины «суррогатные маркеры концентрации», «конечные точки фармакокинетики») описан в ряде нормативных документов¹ и монографий (например, [1]). Такой подход наиболее разработан в отношении

низкомолекулярных гепаринов. В документе² в главе 15.6 «Доклинические и клинические исследования биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов на основе гепаринов низкой молекулярной массы» указано: «Гетерогенность низкомолекулярных гепаринов не позволяет проведение обычного исследования фармакокинетических свойств. Поэтому оценка всасывания и элиминации низкомолекулярных гепаринов проводится при изучении фармакодинамических свойств по показателям (включая анти-Ха и анти-Па), которые могут быть использованы в качестве суррогатных маркеров концентрации препарата». Согласно руководству Европейского агентства по лекарственным средствам³ (European Medicines Agency, EMA), оценку фармакокинетики, биоэквивалентности препаратов низкомолекулярных гепаринов следует проводить по их анти-Ха, анти-Па активностям и концентрации ингибитора пути тканевого фактора (TFPI). Этот подход активно использован в ряде работ, посвященных изучению фармакокинетики и/или биоэквивалентности гепаринсодержащих препаратов (на основе эноксапарина, далтепарина и др.) [2–7].

Логическим продолжением использования такого подхода явилось применение биомаркеров для оценки фармакокинетики ряда препаратов природного происхождения, основанное на корреляции между концентрацией исследуемых препаратов и активностью/концентрацией потенциальных биомаркеров [8–11]. В опубликованных недавно работах по изучению фармакокинетики фукоидана, являющегося гетерогенным полисахаридом, экстрагированным из природного сырья, расчет концентрации фукоидана в биопробах выполнен на основании корреляции концентрации фукоидана в биоматериале и противосвертывающей активности, определенной по активности анти-Ха

¹ Guidance for industry. Exposure-response relationships — study design, data analysis, and regulatory. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2003.

Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev. 1. 2017.

Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.

² Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.

³ Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev. 1. 2017.

фактора [8, 9]. Фармакокинетика экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebachiensis*) после однократного перорального введения кроликам охарактеризована методом, основанным на выявленной авторами корреляции концентрации препарата и изменения активности фермента дипептидилпептидазы IV типа (ДПП-4, DPP-4) [10]. Еще одним подобным примером применения биомаркеров может служить оценка фармакокинетики гликозилированного полипептида (ГПП), выделенного из внутренних органов морских ежей *S. droebachiensis*, — расчет концентрации препарата в биопробах выполнен на основании корреляции концентрации препарата и изменения активности фермента лактадегидрогеназы (ЛДГ) [11].

Цель работы — обобщение накопленного экспериментального опыта по применению биомаркеров для оценки фармакокинетики на примере нескольких лекарственных препаратов природного происхождения для дальнейшего расширения применения подобного подхода для изучения фармакокинетики препаратов сложного гетерогенного или неустановленного состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись фукоидан, полученный из слоевищ фукуса пузырчатого *Fucus vesiculosus* по оригинальной технологии [12], и готовые лекарственные формы (фармацевтические композиции) на его основе для перорального [13] и наружного [9] применения; экстракт гонад морских ежей (*S. droebachiensis*), полученный по запатентованной технологии [14]; спрей для интраназального применения, содержащий ГПП, выделенный из внутренних органов *S. droebachiensis* [11, 15].

Количественное содержание фукоидана в биопробах определяли с помощью хромогенного (оптического) метода определения анти-Ха активности, основанного на способности комплекса антитромбина III нейтрализовать активированный фактор Ха, с помощью наборов реагентов «Реахром-гепарин» (НПО «Ренам») [8].

Активность фермента ДПП-4 в биопробах определяли с помощью хромогенного субстрата глицил-L-пролин-п-нитроанилида и спектрофотометрического детектирования продукта реакции (п-нитроанилина) при длине волны 405 нм⁴ [16]. Подробное описание процедуры определения приведено в работе [10].

Количественное содержание ГПП определяли по изменению уровня активности фермента ЛДГ

в крови. Измерения проводили на биохимическом автоматическом анализаторе RandomAccess A-25 (BioSystem S.A.) с использованием набора реагентов для определения концентрации (активности) ЛДГ (Biosystems).

Экспериментальные исследования *in vivo* проводили согласно нормативным документам, регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных (Правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014); Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и др.). Проведение исследований было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии (заключения № 8.12/16, 9.12/16, 1.17/17, 1.73/17 и 1.26/18).

Валидация биоаналитических методик выполнена согласно рекомендациям⁵.

Параметры фармакокинетики рассчитывали внемоделным методом статистических моментов [17, 18] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel; при статистической обработке результатов рассчитывали средние арифметические значения (\bar{X}), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения (Sx). Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных литературы и результатов собственных исследований для изучения фармакокинетики препаратов природного происхождения *in vivo* мы предлагаем использовать корреляцию между биологическим действием препарата и его концентрацией в плазме крови (или ином биоматериале) животных. Для реализации такого подхода важно выбрать специфический маркер (биохимический параметр, активность фермента и т.п.), связанный с механизмом действия изучаемого препарата и коррелирующий с его концентрацией в биоматериале. Аналитические методики в этом случае могут быть основаны на применении методов иммуноферментного анализа (ИФА), ферментативных, биологических методов и др. Необходимыми этапами изучения фармакокинетики с использованием биомаркеров являются *in vitro* / *ex vivo* эксперименты, а также пилотный эксперимент (*in vivo*) с использованием лабораторных животных в качестве биологической модели. Эксперименты с плазмой или сывороткой

⁴ Dipeptidyl peptidase IV. Enzymatic assay. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/dipeptidyl-peptidase-iv.html>

⁵ ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. Geneva; 1994.

ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva; 1996. P. 1–8.

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S.; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London; 2011.

(*in vitro*) и цельной кровью (*ex vivo*) до и после внесения добавок известных количеств исследуемых препаратов необходимы для установления специфичности, линейного диапазона отклика биомаркера, его нативного уровня. Пилотный эксперимент *in vivo* необходим для оценки интенсивности изменения концентрации (отклика) выбранного биомаркера на введение исследуемого препарата, а также согласованности времени проявления отклика и выбранного пути введения. На данных этапах возможно рассмотрение нескольких аналитических подходов к оценке фармакокинетики (в том числе нескольких биомаркеров) для выбора оптимального.

При реализации обсуждаемых подходов важно учесть базовый или нативный уровень измеряемых показателей в биоматериале, не связанный с введением исследуемого препарата⁶. На этапе экспериментов *in vitro* для этого использовали отклик, регистрируемый при анализе интактного биоматериала (как полученного от индивидуальных животных, так и пулированного), а на стадии экспериментов *in vivo* — от животных, которым не вводили исследуемый препарат («нулевая» точка или пробы, отобранные до введения исследуемого препарата). Значения базового (нативного) уровня определяемого параметра, выбранного в качестве биомаркера, вычитали из значений, получаемых для модельных смесей и экспериментальных проб, или находили значение изменения активности фермента по отношению к базовому уровню (в процентах или долях).

Для выбора математической модели обработки данных, необходимой для линеаризации полученных калибровочных зависимостей, использовали общие принципы и рекомендации, аналогичные моделям, применяемым для обработки данных ИФА [19].

Фукоидан из фукуса пузырчатого и оценка его содержания по анти-Ха активности

Фукоиданы — сложные разветвленные гетерополисахариды, присутствующие в составе бурых водорослей и некоторых иглокожих, основным моносахаридом которых является L-фукопираноза [20, 21]. Для определения количества фукоидана в растворах и биологических жидкостях могут быть применены физико-химический метод, основанный на способности сульфатированного полисахарида фукоидана образовывать окрашенное соединение с метиленовым голубым [22], и ИФА-метод, основанный на способности фукоидана взаимодействовать со специально полученными антителами [19, 21]. Физико-химический метод

(спектрофотометрический) не подходит для анализа биоматериала из-за недостаточной селективности используемой цветной реакции и маскирующего влияния на ход реакции других компонентов плазмы крови. Метод ИФА имеет определенные преимущества вследствие высокой чувствительности и использования специфических антител к данному полисахариду, однако готовые наборы или коммерчески доступные антитела к фукоидану отсутствуют.

Наиболее доступными и специфичными методами определения в биоматериале концентрации антикоагулянтов (гепарина и других соединений, обладающих противосвертывающей активностью, к которым относится фукоидан) являются коагулологические методы (основаны на способности антикоагулянта удлинять время свертывания плазмы крови, в частности активированного частичного тромбопластинового времени) и хромогенный метод (основан на измерении остаточной амидолитической активности фактора Ха после катализируемой антикоагулянтом инактивации их антитромбином III, АТ III)⁷ [23]. Хромогенный метод точнее и значительно чувствительнее по сравнению с коагулологическим тестированием. Именно такой аналитический подход применен при изучении фармакокинетики и/или биоэквивалентности гепаринсодержащих препаратов [2–7] согласно рекомендациям⁸ [1].

Хромогенный метод основан на способности комплекса АТ III—антикоагулянт нейтрализовать активированный фактор Ха. Фукоидан, как и гепарин, обладает ингибирующим действием на фактор свертывания Ха, поэтому активность фукоидана в плазме можно определить, добавляя к ней избыток АТ III и фактора Ха. При этом происходит ингибирование фактора Ха комплексом АТ III—фукоидан пропорционально его количеству в плазме. Оставшееся количество фактора Ха катализирует отщепление п-нитроанилина от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного п-нитроанилина, определяемая спектрофотометрическим методом при длине волны 405 нм, обратно пропорциональна анти-Ха активности (и соответственно количеству) фукоидана в испытуемой пробе.

В ходе *in vitro* экспериментов с раствором субстанции фукоидана и модельными смесями интактного биоматериала (плазмы крови крыс) с добавками аналита получены убывающие линейные зависимости оптической плотности растворов от концентрации фукоидана, соответствующие

⁶ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.

⁷ Берковский АЛ, Сергеева ЕВ, Суворов АВ, Мелкумян АЛ, Козлов АА, Нешкова ЕА, Яровая ГА. Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие. М.: РМАПО; 2015.

⁸ Guidance for industry. Exposure-response relationships — study design, data analysis, and regulatory. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2003.

Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev. 1. 2017.

Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.

данным литературы [21], и подобные зависимости, получаемой при анализе плазм-калибраторов с известным содержанием (активностью) гепарина (рис. 1).

Следует отметить, что область линейности зависимости аналитического сигнала от концентрации для фукоидана, как и для гепарина, отличается достаточно узким интервалом, выход за пределы линейности приводит к существенным ошибкам определения количества фукоидана. Таким образом, для каждого анализируемого образца необходимо подбирать разбавление таким образом, чтобы концентрация аналита находилась в пределах линейного диапазона методики, что повышает трудоемкость аналитического этапа анализа биопроб. Отметим также, что согласно инструкции к набору реагентов⁹ рекомендовано использовать один уровень разбавления проб (в 5 раз) при анализе образцов плазмы крови человека, оптимизированный согласно средним определяемым значениям (0,1–0,3 анти-Ха ед./мл при введении гепарина в профилактических целях; 0,3–0,7 анти-Ха ед./мл при введении гепарина в терапевтических целях), который не учитывают при построении калибровочной зависимости. При работе с образцами, полученными от лабораторных животных, потребовались иные уровни разбавления проб (в 2–4 раза), что повлекло необходимость изменения алгоритма построения калибровочных зависимостей. Для исключения применения дробных коэффициентов при построении зависимостей использовали активности/концентрации в реакционных смесях с учетом

разбавления проб. Такого рода экспериментальные особенности необходимо принимать во внимание при применении обсуждаемых подходов.

Важным, с нашей точки зрения, является переход от выражения активности/концентрации препарата в единицах активности (анти-Ха ед./мл, МЕ/мл и т.п.) к массовым концентрациям (мкг/мл и т.п.). Первый вариант (выражение в единицах активности) традиционно применяют при использовании ферментативных реакций в целом и в работах по фармакокинетике гепаринсодержащих препаратов в частности (например, [2–7]). Второй подход (выражение в массовых концентрациях) более привычен для классических работ и руководств по оценке фармакокинетики различных лекарственных препаратов (например,¹⁰). Результаты по оценке активности экспериментальных проб могут быть выражены в массовых концентрациях анализируемого препарата на основании пересчета с использованием соответствующих зависимостей. Для расчетов концентрации фукоидана в анализируемых пробах различного биоматериала была построена зависимость концентрации фукоидана от анти-Ха активности калибровочных растворов (модельных смесей) с плазмой крови и получено соответствующее линейное уравнение (рис. 2). С нашей точки зрения, такой подход более корректен для сложных по составу объектов природного происхождения.

Методики оценки фукоидана в различных видах биоматериала лабораторных животных (крыс) по корреляции концентрации фукоидана в биоматериале и анти-Ха активности были валидированы согласно общепринятым рекомендациям¹¹

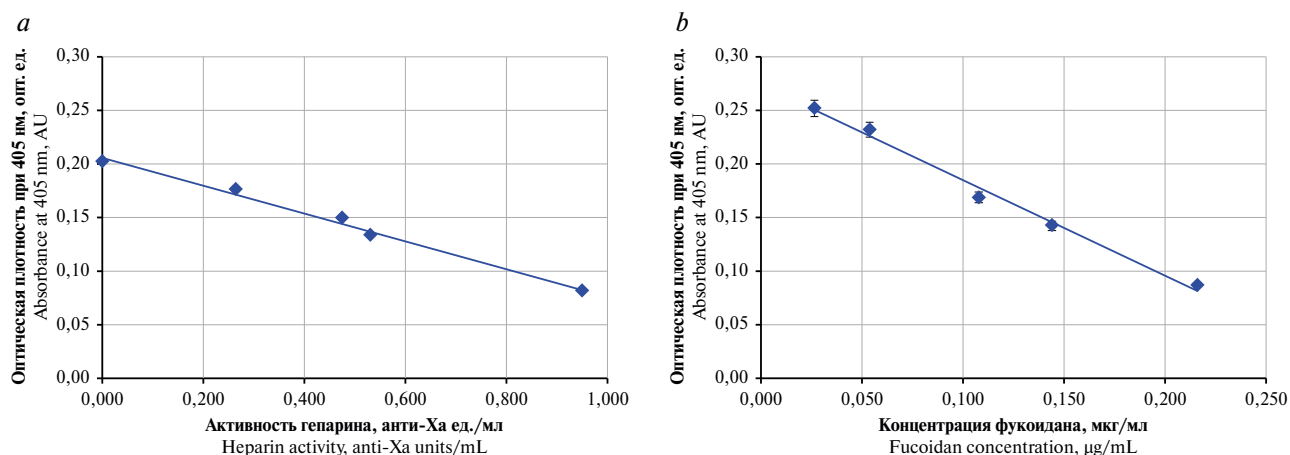


Рис. 1. Примеры зависимости оптической плотности реакционной смеси от: (а) концентрации гепарина в плазмах-калибраторах ($y = -0,1282x + 0,2057$, коэффициент корреляции $r = 0,9957$), (б) концентрации фукоидана в плазме ($y = -0,8932x + 0,2754$, коэффициент корреляции $r = 0,9956$)

Fig. 1. Examples of correlation between absorbance of the reaction mixture and (a) heparin concentration in the plasma control samples ($y = -0.1282x + 0.2057$, correlation coefficient $r = 0.9957$), (b) fucoidan concentration ($y = -0.8932x + 0.2754$, correlation coefficient $r = 0.9956$)

⁹ Инструкция к набору реагентов для определения анти-Ха активности гепарина оптическим методом (Реахром-гепарин) по ТУ 9398-032-05595541-2011. <http://genam.ru/reahrom-geparin>

¹⁰ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

и применены для оценки результатов фармакокинетического эксперимента [8, 9].

Предложенный аналитический подход позволил изучить параметры фармакокинетики фукоидана у крыс при однократном пероральном введении в дозе 100 мг/кг и однократном и многократном нанесении в дозах 50, 100 и 150 мг/кг [8, 9]. Полученные результаты позволили подтвердить системную доступность препарата, определить абсолютную биодоступность (по сравнению с результатами, полученными при внутривенном введении субстанции) и оценить его распределение в органах и тканях [8, 9].

Экстракт гонад морских ежей и оценка его содержания по ингибированию активности специфического фермента

На примере анализа экстракта гонад морских ежей [10] были протестированы несколько аналитических подходов к оценке фармакокинетики: оценка содержания токоферолов и каротиноидов (методом ВЭЖХ-УФ); оценка содержания суммы жирных кислот (методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с денситометрическим детектированием); оценка уровней содержания триглицеридов и холестерина (с использованием автоматического биохимического анализатора), а также определение концентрации экстракта по активности фермента ДПП-4 (методом ИФА).

Выбор фермента ДПП-4 в качестве маркера для оценки фармакокинетики экстракта гонад морских ежей основан на данных о его фармакологическом действии и ингибирующей активности в отношении данного фермента [24, 25]. В ходе экспериментов *in vitro* (с модельными пробами плазмы крови с добавками экстракта гонад морских ежей) выявлена способность экстракта гонад морских ежей ингибировать активность фермента ДПП-4, коррелирующая с его концентрацией в образцах, что позволяет рассчитать содержание экстракта в пробах плазмы крови на основании изменения активности фермента ДПП-4. Дозозависимое изменение активности ДПП-4 в плазме крови наблюдали в широком диапазоне концентраций (1,9–2200 мкг/мл); для линеаризации полученной зависимости использовали логарифмическое преобразование logit-log. Этот вид преобразований позволил линеаризовать зависимость для максимально широкого диапазона концентраций (1,9–710 мкг/мл) [10]; при применении других математических моделей верхний предел количественного определения, входящий в область линейности, оказывался ниже.

Полученные результаты позволили перейти к валидации методики, выполненной согласно

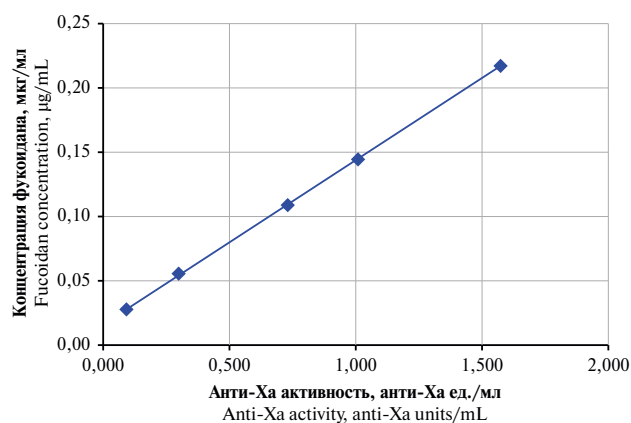


Рис. 2. Зависимость концентрации фукоидана (мкг/мл) от анти-Ха активности калибровочных растворов (модельных смесей) с плазмой крови ($y = 0,1278x + 0,015$, коэффициент корреляции $r = 1$)

Fig. 2. Correlation between fucoidan concentration (µg/mL) and anti-Xa activity of calibration solutions (model mixtures) with blood plasma ($y = 0.1278x + 0.015$, correlation coefficient $r = 1$)

общепринятым рекомендациям¹², и применить ее для оценки результатов фармакокинетического эксперимента [10].

По результатам предварительного эксперимента на кроликах традиционные подходы, основанные на оценке содержания действующих веществ (каротиноидов, токоферолов, жирных кислот, триглицеридов, холестерина), оказались неэффективными. Поскольку в экстракте не выявлено вещество (или группа веществ), преобладающее количественно, вклад каждой группы веществ в биологическую активность экстракта не установлен, а ингибирующее действие в отношении фермента ДПП-4 может быть обусловлено несколькими группами действующих веществ, входящих в состав экстракта, оптимальным для оценки фармакокинетики оказался подход с использованием биомаркера [10].

Гликозилированный полипептид и оценка его содержания по биохимическому параметру

ГПП, выделенный из внутренних органов морских ежей, был охарактеризован методами вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле, высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-, МС- и рефрактометрическим детекторами, рядом интегральных параметров (содержание белков, пептидов) и др. Поскольку точная структура соединения не установлена, применение хроматографических методов для определения концентрации этого аналита в биоматериале затруднительно.

¹¹ PICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. Geneva; 1994.

ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S.; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London; 2011.

¹² Там же.

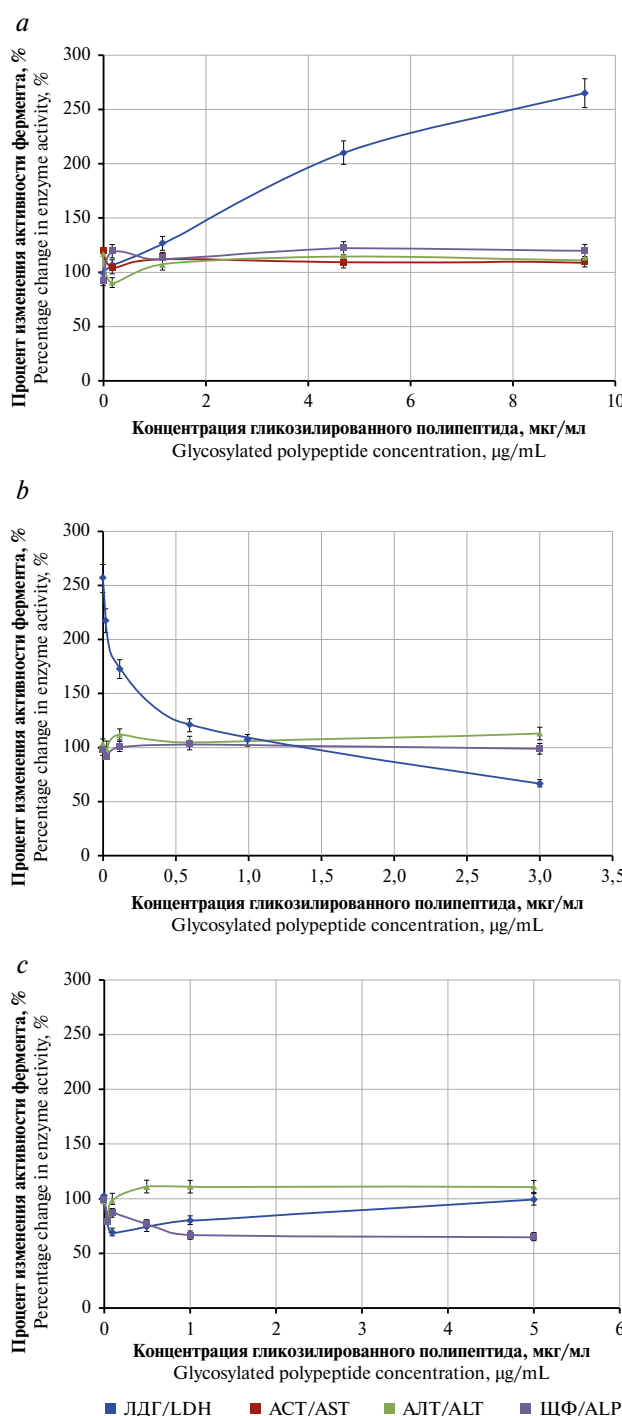


Рис. 3. Корреляция между изменением активности ферментов и концентрацией гликозилированного полипептида в модельных пробах плазмы крови (а), гомогенатов печени (б) и гомогенатов почек (в) (ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АСТ — аспартатаминотрансфераза, АЛТ — аланинаминотрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза)

Fig. 3. Correlation between changes in enzyme activities and glycosylated polypeptide concentrations in (a) model samples of blood plasma, (b) liver homogenates, and (c) kidney homogenates (LDH—lactate dehydrogenase, AST—aspartate aminotransferase, ALT—alanine aminotransferase, ALP—alkaline phosphatase)

Отсутствие готовых наборов или коммерчески доступных антител к выделенному полипептиду делало невозможным применение метода ИФА для целей исследования.

ГПП в экспериментах *in vitro* обладает выраженной антирадикальной активностью в отношении DPPH-радикала, вызывает снижение фосфорилирования митогенактивированной протинкиназы (МАРК) р38 и дозозависимое увеличение фосфорилирования JNK2 концевой киназы, обладает ингибирующей активностью в отношении фермента циклооксигеназы-2, а также противовоспалительным действием, установленным на моделях острого вирусного синусита и экспериментального подострого бронхита [26–29]. Однако такие маркеры невозможно использовать для оценки фармакокинетики ГПП на здоровых животных, так как их активность или концентрация изменяется только при развитии (моделировании) воспаления в организме.

Для определения ГПП в биоматериале апробирован специфический подход, основанный на выявленной корреляции концентрации гликозилированного полипептида с одним из биохимических показателей крови. В ходе экспериментальных исследований *in vitro* с использованием цельной крови и гомогенатов органов (печени, почек и слизистой оболочки носа) были определены с помощью биохимических анализаторов активности ряда ферментов: щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), g-глутаматтрансферазы (ГГТ). Дозозависимое изменение активности было достаточно широко в диапазоне концентраций было получено только для фермента ЛДГ. Изменения активности других ферментов были незначительны (около 20%) и не имели дозозависимости (рис. 3), поэтому был сделан вывод о специфическом воздействии ГПП на активность ЛДГ.

ЛДГ — внутриклеточный гликолитический фермент, который участвует в обратимом превращении лактата в пируват и содержится в большинстве тканей организма. Многие анестетики, нестероидные противовоспалительные средства, рентгеноконтрастные соединения, антибактериальные и противогрибковые препараты вызывают повышение активности ЛДГ, а такие вещества, как амикацин, аскорбиновая кислота, гидроксимочевина, эналаприл, метронидазол, противосудорожные препараты, снижают активность данного фермента¹³.

Молекула ЛДГ представляет собой тетрамер, состоящий из одного или двух типов субъединиц, обозначаемых как М (muscle) и Н (heart). Активный центр содержит несколько аминокислотных остатков, наиболее значимые аргинин-171, аргинин-109 и гистидин-195, а также специальную подвижную петлю 98-111; аргининовые фрагменты протонированы

¹³ Fischbach FT, Dunning MB. A manual of laboratory and diagnostic tests. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

(H⁺) и могут взаимодействовать с COO⁻-группами субстратов [30]. Различия между активными центрами двух субъединиц заключаются в замене аланина (в М-цепи) глутамином (в Н-цепи) [31]. Существует 5 изоформ ЛДГ¹⁴; общая каталитическая активность фермента убывает в ряду: почки, сердце, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, легкие, сыворотка крови. Изоформы ЛДГ-4 и ЛДГ-5 (М-типы ЛДГ) работают эффективно в анаэробных условиях, ЛДГ-1 и ЛДГ-2 (Н-типы) — в аэробных, когда пируват быстро окисляется до CO₂ и H₂O, а не восстанавливается до молочной кислоты [31].

В клинической практике уровень ЛДГ может являться важным и специфическим маркером тканевой деструкции. При заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей и разрушением клеток, активность ЛДГ в крови повышается¹⁵. Однако умеренное увеличение уровня ЛДГ в крови (в 2–2,5 раза) может происходить при увеличении проницаемости клеточных мембран без их разрушения. В модельных пробах крови и гомогенатов печени и почек мы не наблюдали гемолиза и повышения активности ферментов АСТ и АЛТ (т.е. не происходило деструкции тканей).

ЛДГ может регулироваться аллостерически. Этот тип регуляции является одним из основных для ферментов, имеющих доменную структуру; изменение конформации может являться обратимой; в некоторых бактериях (*E. coli*, *Bifidobacterium longum* и др.) данный тип регуляции фермента может быть активирован фруктозо-1,6-дифосфатом [32, 33]. Изоформа ЛДГ-5, выделенная из мышц кролика, является аллостерическим ферментом, в то время как ЛДГ-1 из того же источника — нет [34].

ГПП может быть положительным аллостерическим активатором ЛДГ и может активировать изменение конформаций различных субъединиц и/или изоформ фермента. Преобладание тех или иных изоформ в разных органах и тканях определило разнонаправленность изменений активности ЛДГ под влиянием ГПП (рис. 3) и необходимость выполнения экспериментов *in vitro* с модельными пробами с добавками ГПП с различными видами биоматериала, отбор и анализ которых планировался при изучении фармакокинетики ГПП.

На основании данных, полученных в экспериментах с модельными пробами плазмы крови с добавками ГПП в широком диапазоне концентраций, выявлена линейность зависимости аналитического сигнала от концентрации ГПП в более узком диапазоне концентраций 0,01–7,05 мкг/мл (рис. 4).

Полученные результаты позволили валидировать методику анализа ГПП в плазме лабораторных животных согласно рекомендациям¹⁶, адаптировать и ревалидировать ее для анализа органов и тканей и применить для определения концентрации целевого аналита в биопробах, полученных при выполнении фармакокинетического эксперимента [11].

Отметим, что при планировании и выполнении экспериментальной работы (*in vivo*) в эксперимент сначала были включены две группы животных (одна группа крыс и одна группа кроликов), которым препарат был введен в максимальной из планируемых к изучению доз (200 мкг/кг). По результатам этой работы была установлена системная доступность препарата, далее в эксперимент были включены остальные группы животных. Такая последовательность позволила минимизировать количество задействованных в эксперименте животных, соблюсти принципы гуманности и биоэтики — принцип «трех R». Предложенный аналитический подход позволил выполнить весь объем исследований, необходимый для оригинального препарата¹⁷ [35]: определить параметры фармакокинетики ГПП при однократном интраназальном введении крысам в трех дозах, установить линейность фармакокинетики в исследованном диапазоне доз, оценить абсолютную биодоступность (на основании сопоставления данных с результатами после внутривенного введения), распределение по органам и тканям, наличие некоторой кумуляции при многократном

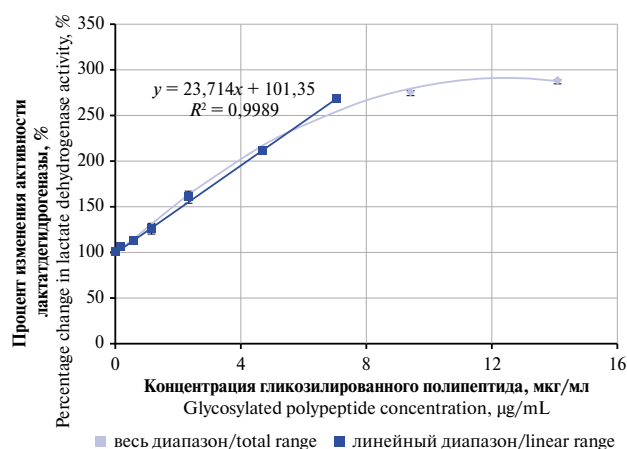


Рис. 4. Зависимость изменения активности лактатдегидрогеназы от концентрации гликозилированного полипептида в плазме крови крыс

Fig. 4. Correlation between changes in lactate dehydrogenase activity and glycosylated polypeptide concentration in rat plasma

¹⁴ Северин ЕС, ред. Биохимия: Учебник для вузов. М.: ГЭОТАР-Медицина; 2003.

¹⁵ Fischbach FT, Dunning MB. A manual of laboratory and diagnostic tests. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

¹⁶ ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. Geneva; 1994.

ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S.; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London; 2011.

¹⁷ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

введении, а также выведение с двумя видами экскретов, линейность и абсолютную биодоступность при введении кроликам (рис. 5, табл. 1).

Фармакокинетические кривые и значения фармакокинетических параметров, полученные на основании подхода с применением биомаркера, вполне соответствовали общим закономерностям, характерным для выбранных путей введения. Так, при внутривенном введении максимальную концентрацию действующего вещества наблюдали на первой временной точке, далее фиксировали достаточно интенсивное снижение плазменной концентрации аналита [11]. При интраназальном

введении и крысам, и кроликам наблюдали дозозависимый подъем фармакокинетической кривой, отражающий всасывание и поступление препарата в кровь, максимум (около 0,7–1 ч) и постепенное снижение концентрации в плазме крови, отражающее выведение действующего вещества из системного кровотока (рис. 5). В то же время в органы и ткани препарат поступал не одновременно, а по мере распределения по организму — наименьшее время достижения максимальной концентрации (около 0,9 ч) получено для слизистой носа, являющейся в данном случае местом введения, а наибольшее (около 3,6 ч) — для печени,

Таблица 1. Фармакокинетические параметры гликозилированного полипептида после введения крысам (по данным [11]) и кроликам

Table 1. Pharmacokinetic parameters of glycosylated polypeptide after administration to rats (according to [11]) and rabbits

Биоматериал Biosample	Путь введения Route of administration	Доза, мкг/кг Dose, µg/kg	Параметр (среднее ± стандартная ошибка, число животных $n = 5$ для крыс (на временную точку), $n = 6$ для кроликов) Parameter (mean ± standard error, number of animals: $n = 5$ for rats (per time point), $n = 6$ for rabbits)				
			C_{max} , мкг/мл (µg/mL)	T_{max} , ч (h)	AUC_{0-24} , ч×мкг/мл (h × µg/mL)	MRT, ч (h)	$T_{1/2}$, ч (h)
Крысы (Rats)							
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	50	2,90 ± 0,35	0,67 ± 0,08	3,93 ± 0,73	1,54 ± 0,14	0,77 ± 0,14
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	100	4,15 ± 0,66	0,75 ± 0,00	7,14 ± 2,25	5,58 ± 2,04	3,53 ± 1,34
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	200	6,22 ± 0,62	0,70 ± 0,04	12,64 ± 2,44	4,62 ± 1,88	4,03 ± 1,59
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	100*	6,99 ± 1,32	1,00 ± 0,50	22,98 ± 12,68	60,04 ± 21,9	3,70 ± 1,63
Плазма крови Blood plasma	в/в (IV)	100	—	—	8,87 ± 1,59	1,11 ± 0,26	0,80 ± 0,17
Слизистая носа Nasal mucosa	и/н (IN)	100	53,66 ± 8,01	0,85 ± 0,14	248,75 ± 24,45	8,00 ± 4,53	4,46 ± 3,03
Печень Liver			0,73 ± 0,20	1,60 ± 0,55	2,40 ± 0,71	7,40 ± 7,46	4,48 ± 5,26
Почки Kidney			0,98 ± 0,37	3,60 ± 0,89	3,50 ± 1,85	8,07 ± 3,36	6,42 ± 2,91
Селезенка Spleen			2,53 ± 0,70	2,40 ± 0,89	28,90 ± 7,24	10,20 ± 2,28	6,48 ± 2,09
Мышцы Muscle			1,74 ± 1,28	1,85 ± 2,33	12,98 ± 9,05	8,18 ± 5,42	4,98 ± 3,38
Надпочечники Adrenal glands			2,67 ± 1,17	2,40 ± 0,89	27,06 ± 6,73	21,42 ± 8,30	14,69 ± 5,89
Кролики (Rabbits)							
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	50	3,44 ± 0,57	1,00 ± 0,00	7,65 ± 0,48	4,63 ± 1,39	4,63 ± 1,39
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	100	3,89 ± 0,44	1,04 ± 0,20	14,89 ± 1,60	7,04 ± 1,35	7,04 ± 1,35
Плазма крови Blood plasma	и/н (IN)	200	4,31 ± 0,44	1,13 ± 0,18	19,70 ± 2,37	9,53 ± 1,26	4,63 ± 1,39
Плазма крови Blood plasma	в/в (IV)	100	—	—	16,42 ± 1,83	2,92 ± 0,23	2,17 ± 0,23

Примечание. C_{\max} — максимальная концентрация, для органов, — мг/г; T_{\max} — время достижения максимальной концентрации, AUC_{0-24} — площадь под кривой «концентрация—время», для органов — ч×мкг/г; MRT — среднее время удержания, $T_{1/2}$ — период полувыведения, и/н — интраназально, в/в — внутривенно; «—» — не определяют для внутривенного введения.

Note. C_{\max} — maximum concentration (in mg/g for organs), T_{\max} — time to maximum concentration, AUC_{0-24} — area under the concentration-time curve (h×µg/g for organs), MRT — mean residence time, $T_{1/2}$ — half-life, IN — intranasal administration, IV — intravenous administration; — not determined for intravenous administration.

* Многократное введение 3 раза в день в дозе 100 мкг/кг в течение 7 дней.

* Repeated administration 3 times a day at a dose of 100 µg/kg for 7 days.

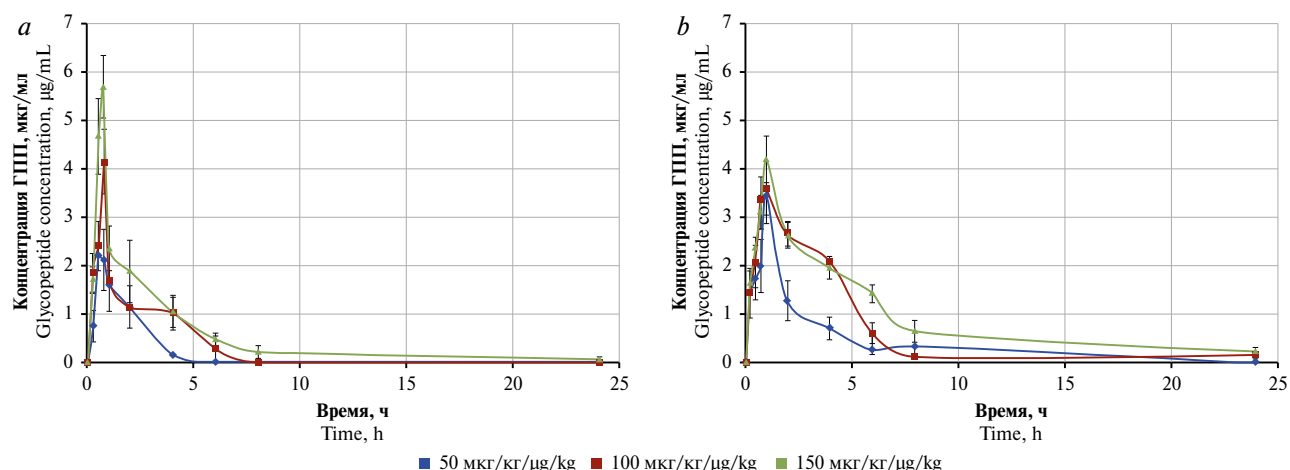


Рис. 5. Кривая «концентрация—время» гликозилированного полипептида после однократного интраназального введения в трех различных дозах крысам (а) (число животных на временную точку $n = 5$) и кроликам (б) (число животных $n = 6$), среднее \pm стандартная ошибка

Fig. 5. Concentration-time curve of glycosylated polypeptide following single intranasal administration in three different doses to (a) rats (number of animals per time point, $n = 5$), and (b) rabbits (number of animals, $n = 6$), mean \pm standard error

отвечающей за метаболизм лекарственных веществ (табл. 1). Такого рода закономерности подтверждали корректность выбора биомаркера для оценки фармакокинетики ГПП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение биомаркеров и расчет концентраций препарата на основании соответствующих корреляций целесообразны для изучения фармакокинетики лекарственных препаратов природного происхождения сложного гетерогенного или неуставленного состава, в том числе кинетики их всасывания, распределения и элиминации.

Предложенный подход (применение биомаркеров для оценки фармакокинетических параметров) является одним из способов решения проблемы оценки фармакокинетики уже зарегистрированных и успешно применяемых препаратов сложного гетерогенного или неуставленного состава. Применение данного подхода позволяет оценить все основные фармакокинетические параметры — максимальную концентрацию (C_{max}), площадь под фармакокинетической кривой (AUC), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), период полувыведения ($T_{1/2}$), среднее время удержания (MRT); охарактеризовать фармакокинетику препарата; показать ее линейность в изученном диапазоне доз; оценить распределение в ткани и органы, и др. Таким образом, с помощью обсуждаемого

подхода возможно решить основные задачи фармакокинетических исследований.

Вклад авторов. В. М. Косман — идея исследования, обработка и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; Н. М. Фаустова — экспериментальная аналитическая работа по выбору биомаркеров, разработке и валидации методик и анализу биопроб; М. В. Карлина — обсуждение и интерпретация результатов, доработка текста; В. Г. Макаров — концепция исследования; М. Н. Макарова — критический пересмотр текста публикации и иллюстративного материала.

Authors' contributions. Vera M. Kosman—elaboration of the study idea, processing and systematisation of experimental data, drafting and editing of the paper; Natalia M. Faustova—experimental analytical selection of biomarkers, development and validation of test procedures, analysis of biosamples; Marina V. Karlina—discussion and interpretation of the results, revision of the paper; Valery G. Makarov—elaboration of the study concept; Marina N. Makarova—revision of the text and illustrative material.

Благодарности. Работа выполнена как инициативное исследование без финансовой поддержки.

Acknowledgements. The study was performed as unsolicited independent research without financial support.

Конфликт интересов. М. Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of “The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products”, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Evens R., ed. *Drug and biological development: From molecule to product and beyond*. New York: Springer; 2007.
2. Hoffmann U, Harenberg J, Bauer K, Huhle G, Tolle AR, Feuring M, Christ M. Bioequivalence of subcutaneous and intravenous body-weight-independent high-dose low-molecular-weight heparin Certoparin on anti-Xa, Heptest, and tissue factor pathway inhibitor activity in volunteer. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(4):289–96. <https://doi.org/10.1097/00001721-200206000-00003>
3. Feng L, Shen-Tu J, Liu J, Chen J, Wu L, Huang M. Bioequivalence of generic and branded subcutaneous enoxaparin: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy Chinese male subjects. *Clin Ther*. 2009;31(7):1559–67. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.07.017>

4. Gadiko C, Thota S, Tippabotla SK. Pharmacokinetic parameters to be evaluated for selected low molecular weight heparins in bioequivalence studies. *Int J Pharm Sci Res.* 2012;3(11):4065–72. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(11\).4065-72](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4065-72)
5. Gadiko C, Tippabotla SK, Thota S, Cheerla R, Betha MR, Vobalaboina V. Bioequivalence study of two subcutaneous formulations of dalteparin: randomized, single-dose, two-sequence, two-period, cross-over study in healthy volunteers. *J Drug Assess.* 2013;2(1):21–9. <https://doi.org/10.3109/21556660.2013.781504>
6. Boubaker H, Grissa MH, Sassi M, Chakroun T, Beltaief K, Hassine M, et al. Generic and branded enoxaparin bioequivalence: A clinical and experimental study. *J Bioequiv Availab.* 2015;7(5):225–8. <https://doi.org/10.4172/jbb.1000244>
7. Martinez González J, Monreal M, Ayani Almagia IA, Llaudo Garín J, Ochoa Diaz de Monasterioguren L, Gutierrez Adúriz I. Bioequivalence of a biosimilar enoxaparin sodium to Clexane® after single 100 mg subcutaneous dose: results of a randomized, double-blind, crossover study in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:575–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S162817>
8. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Faustova NM, Obluchinskaya ED, Kosman VM, Vuorela H, Makarov VG. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. *Mar Drugs.* 2018;16(4):132–42. <https://doi.org/10.3390/md16040132>
9. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Obluchinskaya ED, Vuorela H. The pharmacokinetics of fucoidan after topical application to rats. *Mar Drugs.* 2019;17(12):687–96. <https://doi.org/10.3390/md17120687>
10. Косман ВМ, Фаустова НМ, Уракова ИН, Карлина МН, Макаров ВГ. Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebachiensis*) как возможный биомаркер фармакокинетики. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):158–65. [Kosman VM, Faustova NM, Urakova IN, Karlina MN, Makarov VG. Dipeptidylpeptidase IV activity inhibition after oral administration to rabbits of *Strongylocentrotus droebachiensis* gonads extract as possible biomarker of pharmacokinetics. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration.* 2020;9(3):158–65 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165>
11. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Faustova NM, Kosman VM, Razzazi-Fazeli E, Novak J. Pharmacokinetic study of bioactive glycopeptide from *Strongylocentrotus droebachiensis* after intranasal administration to rats using biomarker approach. *Mar Drugs.* 2019;17:577–90. <https://doi.org/10.3390/md17100577>
12. Облущинская ЕД. Сухой экстракт фукуса, способ его получения и антикоагулянтная мазь на его основе. Патент Российской Федерации № 2506089; 2014. [Obluchinskaya ED. Dry fucus extract, method for preparing it, and base anticoagulant ointment. Patent of the Russian Federation No. 2506089; 2014 (In Russ.)]
13. Облущинская ЕД, Карлина МВ, Пожарицкая ОН, Демченко ДВ, Шиков АН, Макарова МН, Макаров ВГ, Фомичев ЮС. Фармацевтическая композиция на основе фукоидана для перорального применения и способ ее получения. Патент Российской Федерации № 2657615 C1; 2018. [Obluchinskaya ED, Karlina MV, Pozharitskaya ON, Demchenko DV, Shikov AN, Makarova MN, Makarov VG, Fomichev YuS. Pharmaceutical composition on the basis of fucoidan for oral use and method of its production. Patent of the Russian Federation No. 2657615 C1; 2018 (In Russ.)]
14. Пожарицкая ОН, Уракова ИН, Шиков АН, Макаров ВГ. Способ комплексной переработки морских ежей. Патент Российской Федерации № 2432956 C1; 2011. [Pozharitskaya ON, Urakova IN, Shikov AN, Makarov VG. Method of complex processing of echinus. Patent of the Russian Federation No. 2432956 C1 (In Russ.)]
15. Пожарицкая ОН, Демченко ДВ, Макаров ВГ, Макарова МН, Шиков АН, Кательникова АЕ. Средство с гликозилированным полипептидом и способ его получения. Патент Российской Федерации № 2712235 C1; 2020. [Pozharitskaya ON, Demchenko DV, Makarov VG, Makarova MN, Shikov AN, Katelnikova AE. Agent with a glycosylated polypeptide and a method for production thereof. Patent of the Russian Federation No. 2712235 C1; 2020 (In Russ.)]
16. Lin Lu I, Tsai K-C, Chiang Y-K, Jiaang W-T, Wu S-H, Mahindroo N, et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2008;43(8):1603–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.11.014>
17. Пиотровский ВК. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. *Фармакология и токсикология.* 1986;49(5):118–27. [Piotrovsky VK. The method of statistical moments and integral model-independent parameters of pharmacokinetics. *Farmakologiya i toksikologiya = Pharmacology and Toxicology.* 1986;49(5):118–27 (In Russ.)]
18. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010; 99(3):306–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
19. Свежова НВ, Шаркова ВЕ, Громов ДБ, Головаченко ВА, Полинцев ДГ. Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. 1. Теоретические основы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008;(1):3–9. [Svezhova NV, Sharikova VE, Gromov DB, Golovachenko VA, Polyntsev DG. Methods for mathematical data processing in enzyme immunoassay. I. Theoretical basis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics.* 2008;(1):3–9 (In Russ.)]
20. Mizuno M, Nishitani Y, Tanoue T, Matoba Y, Ojima T, Hashimoto T, Kanazawa K. Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(2):335–8. <https://doi.org/10.1271/bbb.80542>
21. Ушакова НА, Морозевич ГЕ, Устюжанина НЕ, Билан МИ, Усов АИ, Нифантьев НЗ, Преображенская МЕ. Антикоагулянтная активность фукоиданов из бурых водорослей. *Биомедицинская химия.* 2008;54(5):597–606. [Ushakova NA, Morozovich GE, Ustyuzhanina NE, Bilan MI, Usov AI, Nifantiev NE, Preobrazhenskaya ME. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. *Biochem (Mosc.) Suppl Ser B Biomed chem.* 2009;(3):77–83]. <https://doi.org/10.1134/S1990750809010119>
22. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM, Kongtawelert P. A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2005;27(10):705–10. <https://doi.org/10.1358/mf.2005.27.10.948919>
23. Селемев ВФ, Хохлова ОН, Хохлов ВЮ, Щербинин РЛ. Определение гепарина спектрофотометрическим и фотоколориметрическим методами. *Химико-фармацевтический журнал.* 1999;(8):47–8. [Selemenev VF, Khokhlova ON, Khokhlov VYu, Scherbinin RL. Heparin determination by spectrophotometric and photocolormetric methods. *Pharm Chem J.* 1999;33(8),450–1]. <https://doi.org/10.1007/BF02510101>
24. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Laakso I, Sappanen-Laakso T, Makarenko IE, Faustova NM, Makarova MN, Makarov VG. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. *J Funct Foods.* 2015;17:227–34. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.030>
25. Kashkin V, Selezneva AI, Makarova MN, Makarov VG. Therapeutic activity of new drug from hydrobionts in the model of metabolic syndrome in rats. *17th International Congress "Phytopharm", Vienna, Austria, 8–10 July 2013. Abstract Book.*
26. Кательникова АЕ, Крышень КЛ, Макарова МН, Макаров ВГ, Воробьева ВВ, Шиков АН. Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенных из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis* на модели острого бронхита у крыс. *Биомедицина.* 2018;(2):85–94. [Katelnikova AE, Kryshen KL, Makarova MN, Makarov VG, Vorobieva VV, Shikov AN. Specific pharmacological activity study of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in the model of acute bronchitis in rats. *Biomeditsina = Biomedicine.* 2018;(2):85–94 (In Russ.)]
27. Кательникова АЕ, Крышень КЛ, Макарова МН, Макаров ВГ, Шиков АН. Механизмы противовоспалительного действия комплекса полипептидов выделенного из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Российский иммунологический журнал.* 2018;21(1):73–9. [Katelnikova AE, Kryshen KL, Makarova MN, Makarov VG, Shikov AN. Mechanisms of anti-inflammatory effect of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology.* 2018;21(1):73–9 (In Russ.)]

28. Кательникова АЕ, Воробьева ВВ, Крышень КЛ, Макаров ВГ, Шиков АН. Противовоспалительная и антиоксидантная активность комплекса гликозилированных полипептидов, выделенных из морских ежей. *Медицинский академический журнал*. 2016;16(4):183–4. [Katelnikova AE, Vorobieva VV, Kryshen KL, Makarov VG, Shikov AN. Antiinflammatory and antioxidative activity of complex of glycosylated polypeptides isolated from sea urchin. *Meditinskij akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*. 2016;16(4):183–4 (In Russ.)]
29. Кательникова АЕ, Крышень КЛ, Макарова МН, Макаров ВГ, Воробьева ВВ, Пожарицкая ОН, Шиков АН. Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов выделенного из морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* на модели острого бронхита индуцированного формалином у крыс. *Биофармацевтический журнал*. 2016;8(6):50–7. [Katelnikova AE, Kryshen KL, Makarova MN, Makarov VG, Vorobieva VV, Pozharitskaya ON, Shikov AN. Specific pharmacological activity study of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in the model of acute bronchitis induced by formalin in rats. *Biofarmatsevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2016;8(6):50–7 (In Russ.)]
30. Кольман Я, Рем К-Г. *Наглядная биохимия*. М.: Мир; 2004. [Kohlmann J, Rem K-G. *Visual biochemistry*. Moscow: Mir; 2004 (In Russ.)]
31. Eventoff W, Rossmann MG, Taylor SS, Torff HJ, Meyer H, Keil W, Kiltz HH. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(7):2677–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2677>
32. Fushinobu S, Kamata K, Iwata S, Sakai H, Ohta T, Matsuzawa H. Allosteric activation of L-lactate dehydrogenase analyzed by hybrid enzymes with effector-sensitive and -insensitive subunits. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25611–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25611>
33. Cameron AD, Roper DI, Moreton KK, Kathleen M, Muirhead H, Holbrook JJ, Wigley DB. Allosteric activation in *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase investigated by an X-ray crystallographic analysis of a mutant designed to prevent tetramerization of the enzyme. *J Mol. Biol.* 1994;238(4):615–25. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1318>
34. Fritz PJ. Rabbit muscle lactate dehydrogenase 5; a regulatory enzyme. *Science*. 1965;150(3694):364–6. <https://doi.org/10.1126/science.150.3694.364>
35. Карлина МВ, Пожарицкая ОН, Шиков АН. Экспериментальная фармакокинетика, современные требования, исследования *in vitro*. *Международный вестник ветеринарии*. 2015;(3):98–102. [Karlina MV, Pozharitskaya ON, Shikov AN. Experimental pharmacokinetics, modern requirements, *in vitro* studies. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2015;(3):98–102 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук. *Vera M. Kosman*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук. *Natalia M. Faustova*, Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук. *Marina V. Karlina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
Макаров Валерий Геннадиевич, д-р мед. наук. *Valery G. Makarov*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук. *Marina N. Makarova*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Статья поступила 11.11.2020
После доработки 23.12.2020
Принята к печати 20.02.2021

Article was received 11 November 2020
Revised 23 December 2020
Accepted for publication 20 February 2021