https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165 УДК 54.062 + 615.074 + 615.033

### Оригинальная статья/Research article



# Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (Strongylocentrotus droebahiensis) как возможный биомаркер фармакокинетики

### В. М. Косман<sup>1</sup>\*, Н. М. Фаустова<sup>1</sup>, И. Н. Уракова<sup>1</sup>, М. Н. Карлина<sup>1</sup>, В. Г. Макаров<sup>1</sup>

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, к. 245

ORCID: В. М. Косман – https://orcid.org/0000-0001-9690-1935; Н. М. Фаустова – https://orcid.org/0000-0002-6866-5741; И. Н. Уракова – https://orcid.org/0000-0003-0833-3371; М. Н. Карлина – https://orcid.org/0000-0002-6292-8934; В. Г. Макаров – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888.

Статья поступила: 17.04.2020. Статья принята в печать: 19.06.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Оценка фармакокинетического профиля действующих веществ является необходимым этапом разработки лекарственного препарата. Исследованный в работе экстракт представляет собой комплекс биологически активных соединений, выделенных из гонад морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* Баренцева моря, содержащий в своем составе пептидные соединения, жирные кислоты, каротиноиды и токоферолы. Выявлена ингибирующая активность экстракта гонад морских ежей в отношении фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). Традиционные подходы к изучению фармакокинетики, основанные на применении хроматографических методов, зачастую не являются эффективными для таких комплексных объектов; альтернативой могут служить методы иммуноферментного анализа.

**Цель.** Цель исследования – поиск подходов к изучению фармакокинетики экстракта гонад морских ежей на кроликах после его перорального введения в трех дозах.

**Материалы и методы.** Для характеристики химического состава образцов экстракта гонад морских ежей и определения содержания возможных целевых аналитов в биопробах использованы спектрофотометрические и хроматографические (ВЭЖХ и ТСХ) методы. Изучение фармакокинетики проводили на самцах кроликов после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей. Была установлена корреляция между его концентрацией в плазме крови и биологической активностью, в качестве маркера которой использована активность фермента ДПП-4. Активность фермента определяли хромогенным оптическим методом.

Результаты и обсуждение. Охарактеризованы основные группы биологически активных веществ в составе экстракта гонад морских ежей. Содержание пептидов составило 15–22 %, содержание α-токоферола – 0,05–0,15 %, суммарное содержание токоферолов – 0,23–0,38 %, содержание каротиноидов – 0,005–0,07 %, содержание суммы жирных кислот в пересчете на линоленовую кислоту – 11,03–12,74 %. В связи с низким содержанием биологически активных веществ различных классов и отсутствием доминирующих компонентов оптимальным для изучения фармакокинетики признан подход, базирующийся на корреляции между активностью специфического маркера (активность фермента ДПП-4) и концентрацией экстракта в плазме крови. Разработана методика количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по активности фермента ДПП-4. Методика валидирована по параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, диапазон линейности, точность, прецизионность. Изучена фармакокинетика экстракта гонад морских ежей в плазме крови после перорального введения кроликам в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Средняя максимальная концентрация ( $C_{max}$ ) в зависимости от дозы была 37–115 мкг/мл, площадь под фармакокинетической кривой (АUС<sub>0-24</sub>) – 193–594 ч · мкг/мл, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) составило 3–3,5 ч, период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) – 7,9–9,9 ч, среднее время удержания (MRT) – 11–14 ч.

**Заключение.** С помощью нетрадиционного подхода, основанного на корреляции активности специфического маркера (ДПП-4) и концентрации препарата, охарактеризована фармакокинетика экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам. Схожие подходы могут быть эффективны для многокомпонентных природных смесей, которые затруднительно или невозможно анализировать на основе традиционных хроматографических (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.) методов.

**Ключевые слова:** активность дипептидилпептидазы-4, Strongylocentrotus droebachiensis, экстракт гонад, фармакокинетика, кролики, плазма, линейность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** В. М. Косман планировала исследование, выполняла экспериментальные работы методом ВЭЖХ-УФ, сбор и обработка результатов, подготовка и финализация рукописи. Н. М.Фаустова выполняла экспериментальные работы по определению активности ДПП-4, участвовала в обсуждении результатов. И. Н. Уракова выполняла экспериментальные работы методом ТСХ, участвовала в обсуждении результатов. М. Н. Карлина участвовала в обсуждении результатов и доработке текста. В. Г. Макаров критический пересмотр текста публикации.

**Для цитирования:** Косман В. М., Фаустова Н. М., Уракова И. Н., Карлина М. Н., Макаров В. Г. Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebahiensis*) как возможный биомаркер фармакокинетики. *Paзработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):158–165. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165

# Dypeptydylpeptidase IV Activity Ingibition after Oral Administration to Rabbits of *Strongylocentrotus Droebahiensis* Gonads Extract as Possible Biomarker of Pharmakokinetics

Vera M. Kosman<sup>1</sup>\*, Natal'ya M. Faustova<sup>1</sup>, Irina N. Urakova<sup>1</sup>, Marina N. Karlina<sup>1</sup>, Valerij G. Makarov<sup>1</sup>

1 – Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

\*Corresponding author: Vera M. Kosman. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

- © Косман В. М., Фаустова Н. М., Уракова И. Н., Карлина М. Н., Макаров В. Г., 2020
- © Kosman V. M., Faustova N. M., Urakova I. N., Karlina M. N., Makarov V. G., 2020

<sup>\*</sup>Контактное лицо: Косман Вера Михайловна. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

ORCID: Vera M. Kosman – https://orcid.org/0000-0001-9690-1935; Natal'ya M. Faustova – https://orcid.org/0000-0002-6866-5741; Irina N. Urakova – https://orcid.org/0000-0003-0833-3371; Marina N. Karlina – https://orcid.org/0000-0002-6292-8934; Valerij G. Makarov – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888.

Received: 17.04.2020. Revised: 19.06.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** The pharmacokinetic profiling of active compounds is necessary for drug development and application. Comlex extract of biologically active compounds was isolated from gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. It contains fatty acids, carotenoids and tocopherols and have inhibition activity to ensyme dypeptydylpeptidase IV (DPP-4). Traditional approaches to pharmacokinetic study based on chromatographic methods are not effective for such complex mixtures because they had not enough selectivity and sensitivity. Methods of immunoassay for special enzyme, bioassay, etc. may be used as an alternative way.

Aim. The aim: to find approach to pharmacokinetic study of sea urchin gonads extract in rabbits after a three doses oral administration.

**Materials and methods.** Various spectroscopic and chromatographic (HPLC and TLC) methods were used for chemical characteristic of sea urchin gonads extract ant different target analytes quantification in biosamples. The pharmacokinetic of sea urchin gonads extract was studied after single dose oral administration to male rabbits. The correlation between concentration of sea urchin gonads extract in the blood plasma and its biological activity marked by DPP-4 activity was established. The activity of DPP-4 was determined by the chromogenic optical method.

Results and discussion. Main groups of sea urchin gonads extract chemical compounds were characterized. Total peptides content was 15–22 %;  $\alpha$ -tocopherol content – 0.05–0.15 %, total tocopherols content – 0.23–0.38 %; total carotenoid content – 0.005–0.07 %; total fatty acids content calculated to linolenic acid – 11,03 to 12,74 %. After sea urchin gonads extract chemical composition results it was established that concentrations of identified individual biologically active compound are low, there is no dominant compound or group of compounds responsible for pharmacological activity of sea urchin gonads extract which may be unambiguously chosen as target analyte for its pharmacokinetic study. Approach based on correlation of special marker activity (DPP-4) and extract concentration appears to be the best for pharmacokinetic study of complex extract from green sea urchin gonads. The method for the quantitative determination of sea urchin gonads extract in the blood plasma of rabbits by its effect on DPP-4 activity was developed. The method was validated by parameters: selectivity, lower limit of quantification, linearity range, accuracy, and precision. The pharmacokinetics was linear in the dose range of 5–25 mg/kg after oral administration. The mean maximal concentration in plasma ( $C_{max}$ ) was dose dependent and it was 37.12–114.71 µg/mL for various doses, area under the curve (AUC<sub>0-24</sub>) was 192.92–597.14 h · µg/mL, mean time to reach maximum plasma concentration ( $T_{max}$ ) was 3–3.5 h, half-life ( $T_{1/2}$ ) was 7.88–9.89 h, and the mean retention time (MRT) was 1.73–14.31.

**Conclusion.** After nontraditional approach based on correlation of special marker activity (DPP-4) and active substance concentration the plasma pharmacokinetics of sea urchin gonads extract after oral administration to the rabbits in three doses was characterized. Similar approaches may be effective for compounds and complex mixtures when it is difficult or impossible to analyze them traditionally by chromatographic (HPLC-UV/FL/MS, GC-MS, etc.) methods.

Keywords: dipeptidyl peptidase IV activity, Strongylocentrotus droebachiensis, gonads extract, pharmacokinetic, rabbits, plasma, linearity.

Conflict of interest: no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Vera M. Kosman investigation planning, experiments evaluation by HPLC-UV method, results proceeding and systematization, text preparing and finishing. Natal'ya M. Faustova experiments evaluation of DPP-4 activity, results interpretation. Irina N. Urakova experiments evaluation by TLC method, results interpretation. Marina V. Karlina results interpretation, text finishing. Valerij G. Makarov critical revision of publication text.

**For citation:** Kosman V. M., Faustova N. M., Urakova I. N., Karlina M. N., Makarov V. G. Dypeptydylpeptidase IV activity ingibition after oral administration to rabbits of *Strongylocentrotus droebahiensis* gonads extract as possible biomarker of pharmakokinetics. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2020;9(3):158–165. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165

### **ВВЕДЕНИЕ**

Комплекс биологически активных соединений, выделенных из гонад морских ежей Strongylocentrotus droebachiensis Баренцева моря, содержит в своем составе пептидные соединения, жирные кислоты, каротиноиды и токоферолы [1]. Для экстракта гонад морских ежей установлена ингибирующая активность в отношении фермента дипептидилпептидазы 4 типа (ДПП-4). Фермент ДПП-4 отвечает за быструю инактивацию инкретиновых гормонов глюкагоноподобного пептида-1 и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида [2].

Экстракт гонад морских ежей содержит компоненты, являющиеся эндогенными (токоферолы, каротиноиды) или быстро метаболизирующиеся в живых организмах (пептиды). Традиционные подходы к изучению фармакокинетики, основанные на применении хроматографических методов (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.), не являются эффективными для таких комплексных объектов из-за недостаточной селективности и

чувствительности. Альтернативой могут служить методы иммуноферментного анализа (ИФА) для оценки активности специфических ферментов, биохимические методы и методы, основанные на оценке специфической биологической активности. Подобные подходы были предложены, например, для качественной оценки экстракта лососевых рыб [3], количественного определения эритропоэтинов в плазме крови [4], оценки иммуногенности интерферонов [5]. Кроме того, для изучения фармакокинетики и распределения в тканях полисахарида фукоидана, являющегося неиндивидуальным, гетерогенным соединением природного происхождения, был предложен метод, основанный на корреляции концентрации фукоидана и его анти-Ха активности [6]. Также корреляция между концентрацией биологически активного гликопептида, комплексного, неиндивидуального состава, выделенного из внутренних органов морских ежей S. droebachiensis, и одним из биохимических параметров - активностью лактатдегидрогеназы использована для фармакокинетических исследований [7].

Таким образом, фармакокинетика комплексных лекарственных средств природного происхождения может быть основана на применении биологических маркеров (биомаркеров, суррогатных маркеров концентрации препарата) согласно рекомендациям [8–10].

**Цель данной работы** – поиск подходов к изучению фармакокинетики экстракта гонад морских ежей.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования стал экстракт гонад морских ежей, полученный из икры зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* по запатентованной технологии [11].

При характеристике химического состава экстракта гонад морских ежей пептиды анализировали методом Варбурга – Кристиана с использованием прямой спектрофотомерии [12], измерения были выполнены на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония). Токоферолы анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием [13, 1] с использованием жидкостного хроматографа высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) в режиме изократического элюирования метанолом, детектирование при длине волны 284 нм. Анализ каротиноидов выполнен также методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием [1] с незначительными вариациями - изократическое элюирование ацетонитрилом, детектирование при 450 нм. Программное обеспечение LabSolutions LCSolution Version 1.25 (Shimadzu, Япония) использовано для регистрации и обработки хроматограмм.

Анализ липидных соединений выполнен методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silica gel 60  $F_{254}$ . В системе растворителей петролейный эфир/диэтиловый эфир/уксусная кислота (8/2/0,1 об/об/об) для оценки состава нейтральных липидов [14]. Нанесение образцов на пластины осуществляли с помощью аппликатора для нанесения проб Linomat V (Camag, Швейцария). Соединения липидной природы визуализировали путем дериватизации пластины 2% раствором фосфорно-молибденовой кислоты в метаноле и последующим ее нагреванием в течение 5 минут при температуре 100 °C на термостатирующей панели TLC Plate Heater 3 (Camag, Швейцария). Денситометрический анализ соединений осуществляли с помощью сканнера TLC Scanner 3 (Camag, Швейцария) при длине волны 700 нм.

Исследование фармакокинетики (эксперименты *in vivo*) проводили на самцах кроликов, полученных от КФХ «Нера» (Санкт-Петербург, Россия). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам [15, 16] и нормативным документам [правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014); Директиве 2010/63/ЕU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и др.], регулирующих проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобрены на заседании биоэтической комиссии (№ 1.73/17 и 1.26/18).

Для оценки фармакокинетики экстракт гонад морских ежей вводили в виде суспензии в инертном носителе (1 % растворе крахмала) однократно перорально в дозах 5, 15 и 25 мг/кг. Распределение животных по экспериментальным группам выполнено методом модифицированной блочной рандомизации [17]. Образцы крови кроликов отбирали через 0, 30 мин; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после введения, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при –20 °С. Перед началом количественного определения образцы размораживали.

Активность фермента ДПП-4 в плазме крови определяли с помощью хромогенного субстрата глицил-L-пролин-п-нитроанилида и спектрофотометрического детектирования продукта реакции – п-нитро-анилина (рисунок 1) [18, 19].

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 и позволяющая рассчитывать содержание экстракта в пробах плазмы крови на основании изменения активности фермента ДПП-4.

К реакционной смеси, содержащей 20 мкл тестируемой пробы (калибровочного раствора, модельной смеси или образа плазмы крови, полученного от экспериментальных животных) и 40 мкл 0,1 М ТРИС-НСІ буферного раствора (рН 8,0), прибавляли 40 мкл 1 ммоль/л раствора субстрата для запуска реакции. Пробы инкубировали при 37 °С 20–25 мин. Оптическую плотность (О.D.) свободного п-нитроанилина измеряли при длине волны 405 нм каждые 5 мин в течение инкубации с использованием микроплан-

Рисунок 1. Схема ферментативной реакции

Figure 1. Cheme of enzyme reaction

шетного спектрофотометра (X-Mark; Bio-Rad, Hercules, CA, США). На основании полученных данных рассчитывали скорость реакции (О.D./мин) для каждой пробы, затем определяли значение ингибирующего действия (ИД) по отношению к модельной смеси с концентрацией экстракта гонад морских ежей 0 мкг/мл или пробе плазмы крови, взятой на нулевой точке (0 мин), далее определяли концентрацию экстракта гонад морских ежей (мкг/мл) в анализируемой пробе.

Параметры фармакокинетики рассчитаны внемодельным методом статистических моментов [20] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel; рассчитаны средние арифметические значения  $(\bar{X})$ , соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения  $(S\bar{x})$ . Для статистической оценки различий между фармакокинетическими параметрами был применен двухвыборочный t-тест для средних (оценку проводили при уровне достоверности 95 %).

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [1] показано, что экстракт гонад морских ежей содержит около 384 мг/г общих липидов, богатых миристиновой и пальмитиновой кислотами (соединения группы насыщенных жирных кислот) и эйкозапентаеновой кислотой, относящейся к ненасыщенным жирным кислотам; около 0,0026 % β-каротина; 0,063 % эхиненона; 0,06 % токоферола; 0,031 % фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина).

По результатам дополнительных исследований содержание пептидов составило 15–22 %. Методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в образцах экстракта гонад морских ежей идентифицировано доминирующее соединение группы токоферолов –  $\alpha$ -токоферол, а также сумма  $\beta$  +  $\gamma$ -токоферолов (соединения не делятся при хроматографировании в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ [21]), следы токотриенолов. Содержание  $\alpha$ -токоферола в различных образцах экстракта гонад морских ежей составило 0,05–0,15 %, суммарное содержание токоферолов – 0,23–0,38 %.

Каротиноиды также были обнаружены в образцах экстракта гонад морских ежей. Методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в образцах экстракта гонад морских ежей доминирующее соединение этой группы, предположительно идентифицированное как эхиненон [1]. Это соединение согласно литературным данным является основным каротиноидом морских ежей [22]. Поскольку стандартный образец эхиненона коммерчески недоступен, количественные оценки выполнены в пересчете на родственное соединение группы каротиноидов – лютеин. Содержание каротиноидов в различных образцах экстракта гонад морских ежей составило 0,005–0,07 %.

В образцах экстракта гонад морских ежей методом ТСХ по совпадению значений  $R_{\rm f}$  с таковым для линоленовой кислоты ( $R_{\rm f}=0,28$ ) идентифицированы жирные кислоты. Содержание суммы жирных кислот в пересчете на линоленовую кислоту в различных образцах составило 11,03–12,74 %.

На примере проб, полученных от животных после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей в дозе 5 мг/кг, были протестированы несколько аналитических подходов к оценке его фармакокинетики: определение концентрации экстракта гонад морских ежей по активности фермента ДПП-4 энзиматическим методом; оценка содержания токоферолов и каротиноидов методом ВЭЖХ-УФ; оценка содержания суммы жирных кислот методом ТСХ с денситометрическим детектированием; оценка уровней триглицеридов и холестерина с использованием автоматического биохимического анализатора [23]. Предварительные данные по оценке фармакокинетических параметров экстракта гонад морских ежей были получены на основании анализа по активности фермента ДПП-4, а также по результатам анализа биопроб на содержание токоферолов и жирных кислот. Однако значимый отклик измеряемого аналитического параметра во времени после введения препарата наблюдали только для данных, основанных на активности фермента ДПП-4. Изменения содержания токоферолов и жирных кислот в пробах не превышали 10-15 % от исходного базового уровня и были трудно отличимы от колебаний эндогенного уровня этих аналитов. Каротиноиды не были обнаружены в биопробах после введения экстракта гонад морских ежей; значимых изменений в уровне триглицеридов и холестерина не было выявлено.

Таким образом, показано, что концентрации индивидуальных биологически активных соединений в экстракте гонад морских ежей сравнительно низкие; не выявлено доминирующего соединения или группы веществ, с которой можно было бы однозначно связать его фармакологическую активность, и которая могла бы быть использована в качестве целевого аналита для оценки фармакокинетики экстракта. Поскольку ингибирующее действие в отношении фермента ДПП-4 может быть обусловлено несколькими группами действующих веществ, входящих в состав экстракта, наиболее корректной является оценка его фармакокинетики по суммарному отклику.

По результатам данного этапа исследования, подход, базирующийся на корреляции специфического маркера (активности фермента ДПП-4) и концентрации экстракта, был признан наиболее подходящим для изучения фармакокинетики экстракта гонад морских ежей.

Валидация методики количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по активности фермента ДПП-4 выполнена согласно рекомендациям [24–27] по параметрам селективность, нижний предел количественного определения, диапазон линейности, точность, прецизионность.

Для проверки селективности были проанализированы бланк-пробы и модельные смеси с экстрактом гонад морских ежей. Для модельных смесей экстракта гонад морских ежей с плазмой крови характер-

но дозозависимое снижение активности фермента ДПП-4, тогда как при добавлении бланка (1 % раствора полисорбата-80 в 0,1 М Трис рабочем буферном растворе с pH = 8,0) такого изменения не происходило, что подтверждало селективность методики.

Согласно рекомендациям [24, 27], концентрации экстракта гонад морских ежей, соответствующая наименьшей точке в калибровочной зависимости, была принята в качестве нижнего предела количественного определения (НПКО), который составил 1,9 мкг/мл.

Для определения содержания экстракта гонад морских ежей и построения калибровочной кривой готовили модельные смеси с использованием плазмы крови кроликов. После инкубации биоматериала с различными концентрациями экстракта гонад морских ежей была определена активность ДПП-4. Дозозависимое изменение активности ДПП-4 в плазме крови было получено для достаточно широкого диапазона концентраций: 1,9–2200 мкг/мл (рисунок 2А). Для линеаризации полученной зависимости использовали логарифмическое преобразование logit-log (рисунок 2В). На основании полученных данных, представленных на рисунке 2В, линейность методики определения концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов характерна для диапазона концентраций 1,9-710 мкг/мл.

На основании полученных данных методом наименьших квадратов выполнен расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей. Полученное уравнение регрессии (таблица 1, рисунок 2В) использовано для дальнейших расчетов.

Оценка точности и прецизионности выполнена по результатам анализа модельных проб плазмы на четырех уровнях концентраций в необходимом количестве повторностей.

Валидационные параметры методики определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови представлены в таблице 1.

90,0 Ингибирующее действие, 80.0 70,0 Inhibitory effect, 60.0 30,0 20,0 10,0 500 1000 1500 2000 2500 С, мкг/мл C, µg/ml A

Таблица 1. Валидационные параметры методики определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов

Table 1. Validation parameters of method for sea urchin gonads extract quantification on rabbit plasma

Параметр Parameter	Значения валидационных параметров Validation Values		
Калибровочный диапазон Calibration range	<b>1,9–710 мкг/мл</b> 1.9–710 µg/ml		
Уравнение регрессии* Regression Equation*	$y = 0.7113 \cdot x - 2.6593$		
HNKO LLOQ	<b>1,9 мкг/мл</b> 1.9 µg/ml		
Коэффициент корреляции r Correlation coefficient r	0,9998		
<b>Точность,</b> % Accuracy, % 710 мкг/мл			
710 µg/ml <b>248 мкг/мл</b>	6,8		
248 μg/ml 5,53 мкг/мл	8,5		
5.53 µg/ml 1,9 мкг/мл	6,6		
1.9 µg/ml Внутридневная//междневная прецизионность, % Intraday//interday precision, % 710 мкг/мл	3,6		
710 µg/ml 248 мкг/мл	3,5//8,6		
248 μg/ml 5,53 мкг/мл	13,1//10,8		
5.53 µg/ml 1,9 мкг/мл	4,6//8,1		
1.9 μg/ml	4,3//8,5		

**Примечание:** \*Для плазмы крови y – параметр logit (ИД); x – логарифм концентрации экстракта гонад морских ежей (lg C), мкг/мл.

**Note:** \*For blood plasma y – parameter logit (ID); x – is the logarithm of the concentration of gonad extract of sea urchins (log C), mca/ml

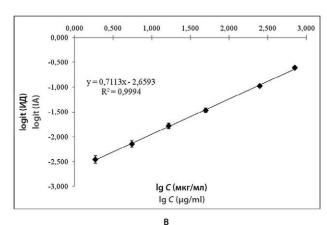


Рисунок 2. Зависимость ингибирующего действия (ИД) экстракта гонад морских ежей на энзиматическую активность ДПП-4 от концентрации экстракта гонад морских ежей (С, мкг/мл) в плазме крови кроликов в разных координатах: С = f(ИД) (А) и logit (ИД) = f(lg C) (B)

Figure 2. Correlation between ingibition activity (IA) of sea urchin gonads extract to ensimatic activity of DPP-4 and sea urchin gonads extract concentration (C,  $\mu$ g/ml) in rabbit plasma in different coordinats: C = f(IF) (A) and logit (IA) = f(IgC) (B)

Таким образом, по всем критериям получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности предлагаемой методики.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа биопроб, полученных после перорального введения экстракта гонад морских ежей в трех дозах (рисунок 3).

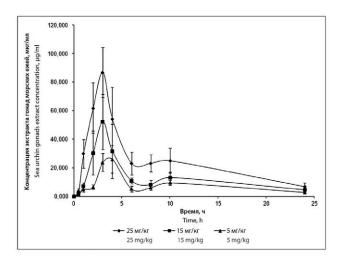


Рисунок 3. Кривая «концентрация-время» экстракта гонад морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей в дозах 5 мг/кг, 15 мг/кг и 25 мг/кг  $(n=4, \bar{X}\pm S\bar{x})$ 

Figure 3. «Time-concentration» curve of sea urchin gonads extract in plasma after single oral application of sea urchin gonads extract substance in doses 5 mg/kg; 15 mg/kg and 25 mg/kg ( $n = 4, \bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Кинетика экстракта гонад морских ежей в плазме крови после введения исследуемого экстракта в дозах 5 мг/кг, 15 мг/кг и 25 мг/кг имела схожую форму кривой. В течение первых 2-3 часов после введения экстракта в исследованных дозах наблюдали сравнительно интенсивное увеличение концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови. Максимальную концентрацию экстракта в плазме крови наблюдали через 2-4 часа после введения, далее к 6-8 часу наблюдали достаточно резкое снижение концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови с последующим незначительным подъемом к 8–10 часу эксперимента. К 24 часу эксперимента после введения экстракта в плазме крови было обнаружено около 8–11 % от максимальной концентрации экстракта гонад морских ежей.

Фармакокинетические параметры экстракта гонад морских ежей для трех исследованных доз представлены в таблице 2.

Анализ основных фармакокинетических данных экстракта гонад морских ежей показал, что значения максимальной концентрации ( $C_{\max}$ ) в плазме крови и значения основного параметра, характеризующего степень биологической доступности,  $AUC_{0-24}$ , с увеличением дозы также увеличивались; различия статистически значимы (p < 0.05). На основании данных

регрессионного анализа корреляции между введенной дозой и величиной  $AUC_{0-t}$  показана линейность фармакокинетики экстракта гонад морских ежей в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) для кроликов составило 3,0–3,5 ч; период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) – 7,9–9,9 ч; значения среднего времени удержания (MRT) – 11–14 ч, значения не имели статистически значимых различий (p > 0,05).

Таблица 2. Фармакокинетические параметры экстракта гонад морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения в трех различных дозах

Table 2. Pharmacokinetic parameters of sea urchin gonads extract after single oral administration in three different doses

Доза,	Параметр ( $\overline{X} \pm S\overline{x}$ , $n = 4$ ) Parameter ( $\overline{X} \pm S\overline{x}$ , $n = 4$ )				
мг/кг Dose, mg/kg	C <sub>max</sub> , мкг/мл C <sub>max</sub> , µg/ml	Т <sub>тах</sub> , ч Т <sub>тах</sub> , h	AUC <sub>0-24</sub> ′ ч·мкг/мл AUC <sub>0-24</sub> ′ h·µg/ml	MRT, 4 MRT, h	Т <sub>1/2</sub> , ч Т <sub>1/2</sub> , h
5	37,1 ± 5,7	$3,50 \pm 0,3$	192,3 ± 12,3	14,3 ± 2,6	9,9 ± 1,6
15	107,3 ± 12,0	$3,00 \pm 0,4$	312,7 ± 52,1	12,7 ± 3,2	8,8 ± 2,2
25	114,7 ± 7,1	$3,00 \pm 0,4$	594,2 ± 85,2	10,7 ± 2,3	7,9 ± 1,6

Таким образом, с помощью предложенного подхода получены приведенные выше результаты (рисунок 3, таблица 2), позволившие охарактеризовать фармакокинетику нового препарата природного происхождения и показать её линейность в изученном диапазоне доз.

В настоящее время не установлено какая группа веществ экстракта гонад морских обуславливает его энзиматическую активность в отношении ДПП-4. Доминирующими компонентами в составе экстракта являются жирные кислоты. В литературе имеются некоторые сведения о фармакокинетике жирных кислот. В большинстве случае такие данные были получены после применения комплексных продуктов - растительных экстрактов, растительных или рыбьих масел (жиров) или различных пищевых добавок на их основе. Только параметр  $T_{\rm max}$  может быть сопоставлен с полученными нами результатами, поскольку значения остальных фармакокинетических параметров ( $C_{max'}$ AUC<sub>0.+</sub>) зависят от концентраций (уровней) индивидуальных (целевых) аналитов. Авторы работы [28] изучали фармакокинетику и тканевое распределение олеиновой и линолевой кислот после перорального и ректального введения масла Brucea javanica крысам. Они использовали метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) для количественного анализа индивидуальных жирных кислот и сообщали, что значение  $T_{\rm max}$  после введения эмульсии на основе масла растения Brucea javanica составило около 4 ч для обеих проанализированных кислот. В работе [29] представлен обзор данных по фармакокинетике и безопасности  $\omega$ -3 ПНЖК. Согласно представленным данным  $T_{\max}$ в ряде исследований у человека варьировал в диапазоне 4,6–11,8 ч, но необходимо подчеркнуть, что были изучены различные аналиты и тестируемые продукты. В работе [30] представлены данные по фармако-кинетике эйкозапентаеновой кислоты после много-кратного перорального введения высокоочищенной эйкозапентаеновой кислоты;  $T_{\rm max}$  общей и неэтерифицированной эйкозапентаеновой кислоты в плазме крови составило около 3–5 ч. В недавней работе по изучению фармакокинетики эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот после применения содержащих их пищевых добавок [31] также были получены значения  $T_{\rm max}$  5,3–6,6 ч. Полученные нами значения времени достижения максимальной концентрации экстракта гонад морских ежей сопоставимы с аналогичными данными для жирных кислот.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Охарактеризованы основные группы действующих веществ, входящих в состав экстракта, выделенного из гонад морских ежей Баренцева моря. Экстракт содержит пептиды, токоферолы, каротиноиды, жирные кислоты. Однако концентрации индивидуальных биологически активных соединений в экстракте гонад морских ежей сравнительно низкие; не выявлено доминирующего соединения или группы веществ, с которой можно было бы однозначно связать его фармакологическую активность, и которая могла бы быть использована в качестве целевого аналита для оценки фармакокинетики экстракта гонад морских ежей.

Разработана методика количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по его влиянию на активность фермента ДПП-4 хромогенным оптическим методом. Методика валидирована в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по параметрам специфичность, линейность (в диапазоне концентрации аделандака 1,9–710 мкг/мл), точность и прецизионность. Разработанная методика применена к анализу биопроб, полученных при изучении фармакокинетики экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам.

Установлено, что фармакокинетика экстракта гонад морских ежей линейна в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Определены значения основных фармакокинетических параметров: максимальной концентрации ( $C_{\rm max}$ ); площади под фармакокинетической кривой (AUC); времени достижения максимальной концентрации ( $T_{\rm max}$ ); периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ); среднего времени удержания (MRT).

С помощью нетрадиционного подхода, основанного на корреляции активности специфического маркера (ДПП-4) и концентрации экстракта, охарактеризована фармакокинетика экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам. Схожие подходы могут быть эффективны для многокомпонентных природных смесей, которые затруднительно или невозможно анализировать на основе традиционных хроматографических (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.) методов.

### **ЛИТЕРАТУРА**

- Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Laakso I., Sappanen-Laakso T., Makarenko I. E., Faustova N. M., Makarova M. N., Makarov V. G. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin Strongylocentrotus droebahensis from Barents Sea. J. of funct. Foods. 2015;17: 227–234.
- 2. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9–24.
- 3. Косман В. М., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Макаров В. Г. Разработка, валидация и применение методики иммуноферментного анализа для стандартизации биопрепарата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;2(11):176–182.
- Карлина М. В., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Косман В. М., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Определение дарбэпоэтина альфа в плазме крови кроликов методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;4(17):204–210.
- 5. Митюшова Е. В., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Макаров В. Г., Шиков А. Н. Разработка и валидация методики определения иммуногенности препарата интерферона альфа-2а. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;1:194–200.
- Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Faustova N. M., Obluchinskaya E. D., Kosman V. M., Vuorela H., Makarov V. G. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. *Marine Drugs*. 2018;16(4):132–142.
- Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Faustova N. M., Kosman V. M., Razzazi-Fazeli E., Novak J. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from Strongylocentrotus droebachiensis after Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach. *Marine Drugs*. 2019:17:577–590.
- 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-weightheparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017. 8 p.
- Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016. 716 с.
- Пожарицкая О. Н., Уракова И. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Способ комплексной переработки морских ежей. Патент RU 2 432 956 С1, приоритет от 08.07.2010, опубликовано 10.11.2011. Бюл. № 31.
- Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.Y., Jones R.M. Data for biochemical research. (third edition). Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986. 580 p.
- Косман В. М., Фаустова Н. М., Зенкевич И. Г., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Сравнительная характеристика состава образцов масла зародышей пшеницы различного происхождения. Масложировая промышленность. 2007;6:32–34.
- Sherma J., Fried B. Thin Layer Chromatographic Analysis of biological Samples. A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005;28:2297–2314.
- 15. Миронов А. Н. и др., ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том І. М.: *Гриф и К*, 2013. С. 6–44.
- Миронова А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 845–855.
- Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3<sup>rd</sup> edition). Oxford Medical Publications, 2000. 422 p.
- 18. Dipeptidyl peptidase IV. Enzymatic assay. Available at: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/dipeptidyl-peptidase-iv.html (accessed 02.04.2020).
- Lin Lu. I., Tsai K.-C., Chiang Y.-K. et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. 2008;43(8):1603–1611.
- Пиотровский В. К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. Фармакология и токсикология. 1986;49(5):118–127.
- Ruperez F. J., Martin D., Herera E., Barbas C. Chromatographic analysis
  of tocopherol and related compounds in various matrices. *J. of Chromatogr.* 2001; 935(1-2):45–69.

- 22. Agatsuma Y., Sato M., Taniguchi K. Factor Causing Brown-Colored Gonads of The Sea Urchine, *Strongylocentrotus nudus*, in Northern Honshu, Japan. *Aquaculture*. 2005;249:449–458.
- Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N. Various approaches to pharmacokinetic study of Adelandak Strongylocentrotus droebachiensis gonads extract. *Abstracts book of 22-d Int. Congress «Phytopharm 2018»*, Horgen, Switzerland, 2018. P. 59–60.
- Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/ EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
- ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994. P. 1–5.
- ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996. P. 1–8.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
- Su H., Zhang Y., Huang W., Wen L., Zhuang Z., Chen G. Pharmacokinetic and tissue distribution of oleic and linoleic acids following oral and rectal administration of *Brucea javanica* oil in rats. *Int. j. of Pharmacology*. 2016;12(5):461–482.
- Tamaro J., Tamaro M. Pharmacokinetics and safety profile of omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: Omega-3 Fatty Acids. Switzerland, Springer Publisher, 2016. P. 541–584.
- Braeckman R. A., Stirtan W. G., Soni P. N. Pharmacokinetics of eicosapentaenoic acid in plasma and red blood cells after multiple oral dosing with Icosapent Ethyl in healthy subjects. Clinical Pharmacology in Drug Development. 2013;3(2):101–108
- Petyaev I. M., Chalyk N. E., Klochkov V. A., Pristensky D. V., Chernyshova M. P., Kyle N. H., Bashmakov Y. K. Pharmacokinetics and oxidation parameters in volunteers supplemented with microencapsulated docosahexaenoic acid. *Int. j. of Applied Basic Medical research*. 2018;8(3):148–154.

### **REFERENCES**

- Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Laakso I., Sappanen-Laakso T., Makarenko I. E., Faustova N. M., Makarova M. N., Makarov V. G. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin Strongylocentrotus droebahensis from Barents Sea. *J. of funct. Foods*. 2015;17: 227–234.
- 2. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9–24.
- Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharickaya O. N., Makarov V. G. Development, validation and application of immunoenzyme assay for the standardization of biopreparation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2015;2(11):176–182. (In Russ.).
- 4. Karlina M. V., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Kosman V. M., Shikov A. N., Makarov V. G. Determination of darbepoetin alfa in rabbit plasma by elisa. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016; 4(17): 204–210. (In Russ.).
- Mityushova E. V., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Makarov V. G., Shikov A. N. Development and validation of immunoassay for immunogenicity of interferon-alpha 2a drugs. *Razrabotka i* registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration. 2017;1:194–200. (In Russ.).
- Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Faustova N. M., Obluchinskaya E. D., Kosman V. M., Vuorela H., Makarov V. G. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. *Marine Drugs*. 2018;16(4):132–142.
- Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Faustova N. M., Kosman V. M., Razzazi-Fazeli E., Novak J. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from Strongylocentrotus droebachiensis after Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach. *Marine Drugs*. 2019;17:577–590.
- 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-weightheparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017. 8 p.
- 10. Rules for conducting research on biological drugs of the Eurasian Economic Union. 2016. 716 p. (In Russ.).
- Pozharickaya O. N., Urakova I. N., Shikov A. N., Makarov V. G. Method for complex processing of sea urchins. Patent RU 2 432 956 C1, priority dated July 8, 2010, published November 10, 2011. Buliten No. 31. (In Russ.).
- Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. Y., Jones R. M. Data for biochemical research. (third edition). Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986. 580 p.
- Kosman V. M., Faustova N. M., Zenkevich I.G., Pozharickaya O. N., SHikov A. N., Makarov V. G. Comparative characterization of wheat germs oil samples. *Maslozhirovaya promyshlennost'*. 2007;6:32–34. (In Russ.).
- Sherma J., Fried B. Thin Layer Chromatographic Analysis of biological Samples. A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005;28:2297–2314.
- Mironov A.N. et al., editors. Guidelines for the examination of medicines. Volume I. Moscow, Grif and K, 2013. P. 6–44. (In Russ.).
- Mironova A. N., editor. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Moscow. Grif and K. 2012. P. 845–855. (In Russ.).
- Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3<sup>rd</sup> edition). Oxford Medical Publications, 2000. 422 p.
- Dipeptidyl peptidase IV. Enzymatic assay. Available at: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/dipeptidyl-peptidase-iv.html (accessed 02.04.2020).
- Lin Lu. I., Tsai K.-C., Chiang Y.-K. et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. 2008;43(8):1603–1611.
- Piotrovskij V.K. Method of statistical moments and integral modelindependent parameters of pharmacokinetics. Farmakologiya i toksikologiya. 1986;49(5):118–127. (In Russ.).
- Ruperez F. J., Martin D., Herera E., Barbas C. Chromatographic analysis
  of tocopherol and related compounds in various matrices. *J. of Chromatogr.* 2001; 935(1-2):45–69.
- 22. Agatsuma Y., Sato M., Taniguchi K. Factor Causing Brown-Colored Gonads of The Sea Urchine, *Strongylocentrotus nudus*, in Northern Honshu, Japan. *Aquaculture*. 2005;249:449–458.
- Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N. Various approaches to pharmacokinetic study of Adelandak Strongylocentrotus droebachiensis gonads extract. *Abstracts book of 22-d Int. Congress «Phytopharm 2018», Horgen, Switzerland*, 2018. P. 59–60.
- Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/ EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
- ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994. P. 1–5.
- ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva. March 1996. P. 1–8.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
- Su H., Zhang Y., Huang W., Wen L., Zhuang Z., Chen G. Pharmacokinetic and tissue distribution of oleic and linoleic acids following oral and rectal administration of *Brucea javanica* oil in rats. *Int. j. of Pharmacology*. 2016;12(5):461–482.
- Tamaro J., Tamaro M. Pharmacokinetics and safety profile of omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: Omega-3 Fatty Acids. Switzerland, Springer Publisher, 2016. P. 541–584.
- 30. Braeckman R. A., Stirtan W. G., Soni P. N. Pharmacokinetics of eicosapentaenoic acid in plasma and red blood cells after multiple oral dosing with Icosapent Ethyl in healthy subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2013;3(2):101–108
- 31. Petyaev I. M., Chalyk N. E., Klochkov V. A., Pristensky D. V., Chernyshova M. P., Kyle N. H., Bashmakov Y. K. Pharmacokinetics and oxidation parameters in volunteers supplemented with microencapsulated docosahexaenoic acid. *Int. j. of Applied Basic Medical research*. 2018;8(3):148–154.