

На правах рукописи

Крышень Кирилл Леонидович

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ОСТРОГО
ВОСПАЛЕНИЯ ЛИПИДАМИ ПЕЧЕНИ ТРЕСКИ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2014

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Макарова Марина Николаевна

Доктор химических наук, профессор

Дадали Владимир Абдулович

Официальные оппоненты:

Лесиовская Елена Евгеньевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», ведущий научный сотрудник.

Кириллова Надежда Васильевна, доктор биологических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биохимии.

Ведущая организация: Федеральное государственное казённое военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

Доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Долгое время считалось, что воспаление вызывает и усугубляет наиболее распространенные заболевания, включая сердечно-сосудистые, астму, воспалительные заболевания кишечника, нейродегенеративные патологии, ревматоидный артрит, болезни легких, пародонтит, диабет и рак. Тем не менее острое воспаление является физиологически необходимым для защиты хозяина от микробной инфекции и повреждения тканей. Оно характеризуется активацией иммунных клеток, изменением в сосудистой проницаемости и синтезе провоспалительных медиаторов, в том числе цитокинов, хемокинов, липидных посредников, стероидов и факторов роста (Kulinsky, V.I., *Biochemical Aspects of Inflammation* / Kulinsky, V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. - 2007. - Vol.72(6). - P.595-607).

Несмотря на свою важную функцию в защите организма острое воспаление не должно быть продлено, чтобы избежать хронического и системного, которое вовлечено в патогенезе широкого спектра заболеваний.

Успешное завершение воспалительного ответа на ранней стадии сопровождается возвращением к нормальному состоянию, и процесс известен как разрешение (резолуция) воспаления.

Клеточные и молекулярные механизмы развития острого воспаления достаточно хорошо изучены. Гораздо меньше известно о механизмах, лежащих в основе разрешения. Накопленные данные свидетельствуют о том, что разрешение острого воспаления является крайне скоординированным процессом, который жестко регулируется несколькими эндогенными противовоспалительными посредниками, включая липидные медиаторы. Так, в последние годы огромное внимание уделяется новому классу липидных медиаторов, участвующих в завершении воспалительного процесса. К ним относятся липоксины, резолвины и протектины, которые являются продуктом метаболизма ω -3 полиненасыщенных жирных кислот (Serhan, C. *Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways* / Serhan, C. // *Annu. Rev. Immunol.* - 2007. - Vol.25. - P.101-137).

Таким образом, понимание роли липидов в завершении воспалительной реакции требует глубокого рассмотрения биохимических механизмов воспаления и предоставляет перспективные терапевтические стратегии для профилактики и лечения воспалительных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Полная элиминация острого воспалительного процесса является идеальным результатом для сохранения ткани от чрезмерного повреждения и развития хронического воспаления. Переход от инициации воспаления к его разрешению происходит как на клеточном (например, инфильтрация нейтрофилов, их апоптоз и последующее уничтожение макрофагами), так и на молекулярном уровнях (переключение синтеза провоспалительных медиаторов на противовоспалительные) (Serhan, C. *Resolution of inflammation: the beginning programs the end* / Serhan, C., Savill, J. // *Nat. Immunol.* - 2005. - Vol.6. - P.1191-1197).

Начало воспаления определяется в основном липидными медиаторами, получаемых из ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) ферментами циклооксигеназой-2 (ЦОГ-2) и 5-липооксигеназой (5-ЛОГ). Разрешение же воспалительного процесса преимущественно регулируется липидными медиаторами, получаемых из ω -3 ПНЖК (Schmitz, G. *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids* / Schmitz, G., Ecker, J. // *Prog.*

Lipid. Res. - 2008. - Vol.47. - P.147-155). Известно, что при низких наномолярных концентрациях резолвин E1 подавляет воспаление, блокируя трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов, провоспалительные сигнальные каскады (например, NF-κB активацию) и высвобождение провоспалительных цитокинов, включая TNFα, IL-1 и IL-6 (Martin, S. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis / Martin, S., Esser, P. Weber, F., Jakob, T., Freudenberg, M., Schmidt, M., Goebeler, M. // Allergy. - 2011. - P.1-12).

Провоспалительные медиаторы образуются в течение нескольких секунд и минут начала процесса острого воспаления, в то время как в более позднее время (от часов до дней) постепенно растет количество противовоспалительных посредников и медиаторов процесса разрешения. Тонкое изменение липидных посредников из провоспалительных эйкозаноидов в противовоспалительные медиаторы имеет решающее значение для завершения воспалительного процесса (Holgate, S. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling / Holgate, S., Peters-Golden, M., Panettieri, R., Henderson, W. // J. Allergy Clin. Immunol. - 2003. - Vol.111(1). - P.18-34). Таким образом, важнейшим механизмом завершения острого воспаления является коррекция синтеза медиаторов каскада арахидоновой кислоты.

На модели адьювантного артрита у крыс были обнаружены противовоспалительные эффекты липидного комплекса, выделенного по оригинальной технологии из печени трески (Рыбакова, А.В. Изучение противовоспалительной активности нового ветеринарного препарата афлогилекс на модели экспериментального адьювантного артрита / Рыбакова, А.В., Крышень, К.Л., Соколов, В.Д. // Международный вестник ветеринарии. 2012. №1. С. 39-43). Липидный комплекс представляет собой уникальную композицию липофильных соединений (Шиков, А.Н. Новые технологии переработки гидробионтов / Шиков, А.Н., Пожарицкая, О.Н., Уракова, И.Н., Рыбакова, А.В., Крышень, К.Л. Макаров, В.Г. // Фармацевтические и медицинские биотехнологии. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва, Россия. 2012. С. 385). В липидном комплексе (ЛК) обнаружено высокое содержание остатков ω-3 ПНЖК, в том числе эйкозопентаеновой кислоты в составе фосфолипидов.

Наличие эйкозопентаеновой кислоты дает основание предположить конкурентное субстратное взаимодействие с ферментами ЦОГ-2 и 5-ЛОГ и, таким образом, снижение синтеза простагландинов и лейкотриенов и активацию синтеза противовоспалительных медиаторов.

В основе противовоспалительного эффекта ЛК могут лежать и другие молекулярные механизмы, в том числе активация Toll-подобных рецепторов, ингибирование фосфорилирования внутриклеточных сигнальных белков MAPK p38, ERK1/2, выброс гистамина тучными клетками.

Цель исследования

Целью настоящего исследования было установление механизма действия липидов печени трески при остром воспалении в экспериментах *in vivo*, *in vitro* и на изолированных тканях и клеточных линиях.

Задачи исследования

1. Установить влияние липидов печени трески на активность 5-липооксигеназы и циклооксигеназы-2;

2. Установить влияние липидов печени трески на высвобождение гистамина базофилами крысы линии RBL-I;
3. Выявить взаимодействие липидного комплекса с H1-гистаминовыми рецепторами на модели изолированной подвздошной кишки морской свинки;
4. Изучить действие липидного комплекса на модели острого воспаления “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс;
5. Исследовать действие липидного комплекса на модели контактного дерматита у мышей;
6. Определить влияние липидного комплекса на индуцированное фосфорилирование митоген-активированных протеинкиназ p38 и ERK1/2 на клеточной линии моноцитов человека U937;
7. Выявить взаимодействие липидного комплекса с Toll-подобными рецепторами.

Научная новизна исследования

Впервые рассмотрены биохимические механизмы процесса разрешения острого воспаления в условиях поступления в организм липидов, выделенных из печени тресковых. Оценено взаимодействие липидного комплекса с ферментами циклооксигеназой-2 и 5-липооксигеназой в условиях *in vitro*, с H1-гистаминовыми рецепторами на изолированной подвздошной кишке морской свинки. Кроме того на клеточной линии RBL-I установлено мембрано-стабилизирующее действие, препятствующее выбросу гистамина. Изучено взаимодействие с Toll-подобными рецепторами и влияние на индуцированное фосфорилирование внутриклеточных MAP-киназ p38 и ERK1/2. На моделях “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс и контактом дерматите у мышей подтверждено участие липидных компонентов тресковых в процессе разрешения воспалительного процесса.

Научно-практическая значимость

Результаты исследований были включены в регистрационное досье ветеринарных препаратов Афлогилекс-раствор для инъекций 0,1% Рег.№ПВР-3-3.0/02688 от 30.01.2012 и Афлогилекс-гель 0,02% Рег.№ПВР-3-3.0/02688 от 30.01.2012. Материалы диссертационного исследования были внедрены в учебный процесс кафедры биологической и общей химии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку биохимических механизмов коррекции острого воспаления липидами печени трески «*in vivo*», «*in vitro*» и на изолированных тканях и клеточных линиях.

Эксперименты «*in vivo*» включали исследования противовоспалительного действия ЛК на моделях “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс и контактный дерматит у мышей.

Молекулярные механизмы действия ЛК изучали в условиях *in vitro* с использованием тест-систем для оценки взаимодействия с ЦОГ-2 и 5-ЛОГ. Для анализа влияния ЛК на липополисахарид-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ использовали клеточную линию моноцитов человека U937 с последующим разделением белков клеточного лизата методом гель-электрофореза и определения фосфорилированных

форм белков p38 и ERK1/2 методом Вестерн-блот. Для оценки влияния ЛК на дегрануляцию тучных клеток использовали клетки базофилов крысы линии RBL-I с последующим анализом индуцированного выброса гистамина методом иммуноферментного анализа. Для регистрации взаимодействия с H1-гистаминовыми рецепторами использовали модель индуцированного гистамином сокращения подвздошной кишки морской свинки.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что липидный комплекс снижает образование продуктов превращения арахидоновой и линолевой кислот под действием ЦОГ-2 и 5-ЛОГ соответственно;
2. Выявлено, что липиды печени трески ингибируют дегрануляцию тучных клеток, снижая выброс гистамина;
3. На изолированной подвздошной кишке морской свинки установлено, что липидный комплекс снижает гистамин-индуцированное сокращение подвздошной кишки морской свинки посредством блокады H1-гистаминовых рецепторов;
4. На моделях воспаления “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс и контактном дерматите у мышей показано, что липидный комплекс приводит к снижению воспалительного процесса в тканях, инфильтрации лейкоцитов и снижению синтеза простагландина F_{2α}.

Степень достоверности и апробация материалов исследования

Степень достоверности определяется достаточным для статистической обработки данных количеством экспериментальных животных 112 крыс и 70 мышей в экспериментах *in vivo*, постановкой нескольких параллелей в экспериментах на изолированных тканях, клеточных линиях и *in vitro*.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на II всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», IV съезде фармакологов России, XVI международном съезде «Phytopharm 2012», во II Всероссийской конференции с международным участием «Профилактическая медицина 2012», 61-ом международном конгрессе «Society for Medicinal Plant and Natural Product Research 2013».

Апробация диссертации прошла на заседании проблемной комиссии №5 от 19 сентября 2013 года государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личное участие автора в выполнении исследования

Исследования были выполнены на базе кафедры биологической и общей химии СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Автор лично осуществлял планирование экспериментов и их непосредственное выполнение, статистическую обработку полученных результатов, обсуждение, написание статей, тезисов и докладов, диссертации и автореферата.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов и выводов, заключения и практических рекомендаций, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрирована 46 рисунками и 16

таблицами. Библиографический указатель содержит 210 наименований, из них 8 на русском языке и 203 - на иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 представляет собой обзор литературы, посвященный молекулярным механизмам инициации, развития и разрешения острого воспалительного процесса. Особое внимание уделено современным аспектам участия липидных медиаторов в разрешении воспаления.

В **Главе 2** отражены основные методы и экспериментальные модели исследования, которые были использованы при выполнении диссертационной работы.

Глава 3 объединяет результаты собственных исследований.

В **Главе 4** представлено обсуждение полученных результатов и выводы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали липидный комплекс, полученный из печени трески по оригинальной технологии в соответствии с патентом РФ 2420213 [приоритет от 16.11.2009]. В качестве объекта переработки использовали свежемороженную печень трески (*Gadus morrhua L.*).

Методом ВЭЖХ-ELSD установлено, что исследуемая субстанция содержит фосфолипиды, эфиры холестерина, холестерин, моноглицериды и другие вещества, при этом основным фосфолипидом является фосфатидилхолин, содержание которого составляет не менее 40 мг/г. Жирнокислотный состав представлен миристиновой, пальмитолеиновой, пальмитиновой, стеариновой, гондоиновой (11-эйкозеновой), линолевой кислотами, олеиновой и 11-цис/транс-октадекановой (цис/транс-вакценовой) кислотами. Сделано заключение, что фосфатидилхолин содержит остатки пальмитиновой (23,0%), эйкозапентаеновой (14,5%) и олеиновой кислоты (11,9%); в фосфатидилэтанолаmine основными кислотами являются эйкозапентаеновая (14,0%), олеиновая (12,8%) и пальмитиновая (10,2%) кислоты, в фосфатидилинозитоле – стеариновая (17,8%), олеиновая (15,7%), эйкозапентаеновая (10,9%) и пальмитиновая кислоты (10,8%).

Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую активность 5-липооксигеназы

Исследование влияния ЛК на энзиматическую активность 5-ЛОГ проводили в конечных концентрациях 50; 25; 12,5; 6,75; 3,375 и 1,69 мкг/мл с использованием набора Lipoxugenase Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, США), включающим очищенный фермент 5-ЛОГ и субстрат линолевою кислоту. В качестве позитивного контроля использовали неселективный ингибитор 5-ЛОГ – NDGA (Nordihydroguaiaretic acid, Cayman Chemicals, США) в конечной концентрации 15 мкМ. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель 5% диметилсульфоксид (ДМСО).

С помощью тест-системы оценивали количество гидропероксидов, продуцируемых в реакции липоксигенации. Образцы исследовали в четырех повторностях. Реакцию проводили при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Время инкубации неселективного ингибитора NDGA/ЛК с 5-ЛОГ и линолевою кислотой составляло 10 минут. Энзиматический катализ останавливали внесением хромогена. Через 5 минут инкубации проводили измерение оптической плотности при длине волны 490 нм на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США). После регистрации оптической плотности вычисляли % снижения продукта энзиматической реакции от контроля.

Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую активность циклооксигеназы-2

Исследование влияния ЛК на энзиматическую активность ЦОГ-2 проводили с использованием набора COX inhibitor screening assay kit (Cayman Chemicals, США) в соответствии с инструкцией производителя. Тест-система включает очищенный фермент ЦОГ-2 и арахидоновую кислоту в качестве субстрата. ЛК изучали в концентрациях 25, 20, 15, 10 и 1 мкг/мл. В качестве позитивного контроля использовали селективный ингибитор ЦОГ-2 нифлумовую кислоту (Cayman Chemicals, США) в концентрации 0,1 мкМ. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель 5% ДМСО.

В ходе энзиматической реакции ЦОГ-2 и арахидоновой кислоты формируется нестабильный продукт PGH_2 , который подвергали редукции хлоридом олова ($SnCl_2$) для образования стабильного простагландина $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) определяли количество $PGF_{2\alpha}$ (Cayman Chemicals, США). После проведения цветной ферментативной реакции измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США). После снятия оптической плотности вычисляли % снижения продукта энзиматической реакции от контроля.

Определение влияния липидного комплекса на индуцированную продукцию гистамина

Определение влияния ЛК на индуцированную продукцию гистамина проводили с использованием культуры клеток RBL-1 базофильной лейкемии крысы. ЛК изучали в концентрациях 1, 2, 4, 16 мкг/мл. В качестве позитивного контроля использовали субстанцию кетотифена в конечной концентрации 16 мкг/мл. Экспозиция клеток с субстанциями длилась 15 минут при 37°C и 5%CO₂. Далее в культуру вносили индуктор дегрануляции Compound 48/80 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл и выдерживали в тех же условиях в течение 60 минут. После инкубации 50 мкл культуральной среды переносили в стерильные пробирки и проводили ацилирование образцов. В ацилированных образцах определяли концентрацию гистамина методом ИФА. Ацилирование и ИФА осуществляли с использованием реагентов в составе набора Histamine ELISA kit (IBL International, Германия).

Анализ влияния липидного комплекса на индуцированное фосфорилирование митоген-активированных протеинкиназ (MAP-киназ)

Для изучения ЛПС-индуцированного фосфорилирования MAP-киназ p38 и ERK1/2 использовали суспензионную клеточную линию моноцитов человека U937.

Фосфорилирование MAP-киназ оценивали методом иммуноблоттинга по количеству фосфорилированных форм белков после инкубации клеток с ЛК в концентрации 10 мкг/мл в течение 16 часов и обработкой липополисахаридом (ЛПС *Escherichia coli* серотипа 0111:B4, Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1 мкг/мл в течение 60 минут.

Для специфического выявления белков на иммуноблоте использовали поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированных по триптофану и тирозину (Thr202/Tyr204) ERK1/2 и (Thr180/Tyr182) p38 (Cell Signaling Technology, США). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика и конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP, Cell Signaling Technology, США). Электрофоретическое разделение белков проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии лаурилсульфат натрия

(SDS). Разделённые в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) в камере для "мокрого" переноса (BioRad, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Изучение взаимодействия липидного комплекса с Toll-подобными рецепторами

В качестве тест-системы для оценки взаимодействия с парами рецепторов TLR1/2, 2/2, 2/6 были выбраны адгезионные клеточные линии HEK-Blue-hTLR2 (InvivoGen, США), полученные производителем трансфекцией плазмиды, кодирующей рецептор hTLR2. В качестве тест-системы для оценки взаимодействия с hTLR4 и hTLR5 были выбраны адгезионные клеточные линии HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 (InvivoGen, США).

Липидный комплекс тестировали в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл. В качестве растворителя использовали 5% ДМСО.

Стимуляцию рецепторов проводили специфическими агонистами TLR1/2 – Pam3CSK 1 нг/мл, TLR2/2 – HKLM 10^8 клеток/мл, TLR2/6 – FSL1 1 нг/мл, TLR5 – Flagellin 1 нг/мл, TLR4 – ЛПС 10 нг/мл. Для нейтрализации рецепторов и определения специфичности стимуляции использовали соответствующие поликлональные антитела (Ab) Anti-hTLR-Ab (InvivoGen, США). Стимуляция рецептора агонистом приводит к активации транскрипционных факторов NF-κB и AP1 и последующей выработке фермента щелочной фосфатазы. Уровень стимуляции рецепторов детектировали по ферментативной цветной реакции после добавления субстрата. Измеряли оптическую плотность на длине волны 630 нм с помощью планшетного спектрофотометра xMark (BioRad, США).

Определение взаимодействия липидного комплекса с H1-гистаминовыми рецепторами

Оценку взаимодействия ЛК с H1-гистаминовыми рецепторами проводили на выделенных фрагментах подвздошной кишки морской свинки. У морских свинок извлекали подвздошную кишку и помещали в емкость с раствором Кребса-Хенселейта. Фрагменты кишки длиной около 1 см закрепляли металлическими крючками в проточных камерах установки для изолированных тканей (ООО «Кардиопротект», Россия). За 100% сокращения принимали сокращение, индуцированное 80 мМ раствором KCl. Проточные камеры заполняли водным раствором гистамина (10^{-6} М). В течение 10 минут осуществляли регистрацию силы сокращения. Далее добавляли ЛК в концентрациях 10, 20, 100 и 1000 мкг/мл. В качестве позитивного контроля использовали блокатор H1-гистаминовых рецепторов кетотифен в концентрации 5 нг/мл. Во время всего опыта регистрировали кривую изометрической силы сокращения, учитывали амплитуду сокращения и время наступления максимального сокращения, используя программное обеспечение «PhysExp» (ООО «Кардиопротект», Россия).

Оценка противовоспалительного действия липидного комплекса на модели острого воспаления «каррагениновый воздушный мешочек у крыс»

Крысы-самцы породы Wistar были получены из питомника лабораторных животных "Рапполово". Масса животных к началу исследования составляла 220-250г. За шесть дней до начала введения тестируемых объектов крыс помещали в CO₂ камеру до достижения анестезии на 30 секунд. Стерильным шприцом вводили 20 мл воздуха подкожно во внутрикапсульную область спины крысы. На 6 день под CO₂ анестезией вызывали воспаление, вводя 5 мл 0,5% раствора λ-каррагенина (λ-Carrageenan, Sigma-Aldrich, США) непосредственно в мешочек.

ЛК тестировали в трех различных дозах 4 мг/кг, 0,4 мг/мл и 0,04 мг/кг. Растворителем служил 5% ДМСО. ЛК в каждой дозе вводили внутрь мешочка. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак (раствор для инъекций 25 мг/мл, Неморфам, Сербия) и вводили внутрь мешочка сразу после инъекции раствора каррагинина в дозе 2 мг/кг.

Спустя 6 часов после инъекции животное подвергали эвтаназии ингаляцией CO₂. Экссудат забирали через 6 часов после индукции воспаления. Анализировали клеточный состав экссудата при помощи ветеринарного гематологического анализатора Abacus Unior Vet (Diatron, Австрия). Анализ PGF_{2α} проводился с помощью набора для количественного определения простагландина F_{2α} методом ИФА Prostaglandin F_{2α} EIA kit (Cayman Chemicals, США).

Оценка противовоспалительного действия липидного комплекса на модели контактного дерматита у мышей

Беспородные мыши-самцы были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово». Всего в эксперименте было сформировано 7 групп по 10 животных в каждой. В качестве индуктора контактного дерматита использовали 1-хлор-2,4-динитробензол (ДНХБ, Sigma-Aldrich, США) в виде 2% раствора в 95% этаноле. На 1, 8 и 14 день эксперимента животным на предварительно выбритые участки спины наносили 100 мкл 2% раствора ДНХБ с целью сенсibilизации организма. На 18 день на правое «опытное» ухо животным наносили 20 мкл 2% спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 час.

ЛК вводили внутримышечно в дозах 2, 4 и 8 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали Супрастин (20 мг/мл хлоропирамина гидрохлорид, Egis Pharmaceuticals, Венгрия). Супрастин вводили внутримышечно в дозе 22 мг/кг, эквивалентной терапевтической дозе для человека. В качестве плацебо вводили 5% ДМСО. Тестируемые объекты вводили по лечебной схеме, начиная с 8 по 20 день эксперимента внутримышечно один раз в сутки.

На 21 сутки эксперимента животных эвтаназировали в CO₂ – камере. «Опытное» и «контрольное» ухо забирали для гистологической оценки поражения и степени отека.

Для оценки степени отека после эвтаназии определяли массу «опытного» и «контрольного» уха. Вычисляли индекс реакции (ИР), выраженный в процентах разницы в массах «опытного» и «контрольного» уха. Оценку концентрации IgE в сыворотке крови мышей проводили с использованием ИФА тест-системы (Kamiya Biomedical Company, США). Гистологическая оценка включала в себя анализ степени воспалительных изменений в коже уха по 5 признакам: лейкоцитарно-плазмоцитарная реакция; степень выраженности воспалительных изменений на разных уровнях слоев кожи; глубина поражения; фиброз и склероз.

Статистическая обработка результатов

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах. В случаях ненормального распределения была рассчитана медиана и квартильный размах. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия был использован критерий Стьюдента для независимых переменных. В качестве непараметрического критерия использовали U критерий Манна-

Уитни. Различия были определены при 0.05 уровне значимости. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ **Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую** **активность 5-липооксигеназы**

Одним из возможных механизмов перехода к завершению воспаления может быть снижение синтеза простагландинов и лейкотриенов.

Липооксигеназная система относится к растворимым цитозольным ферментам, она обнаружена в цитоплазме альвеолярных макрофагов, тромбоцитах, тучных клетках и лейкоцитах. Наиболее важным среди ферментов этой системы является 5-ЛОГ. 5-ЛОГ является индуцибельным ферментом, экспрессирующимся в результате воздействия на клетки различных стимулов (провоспалительные цитокины и антигены).

Проведенное исследование показало, что ЛК снижал образование продукта реакции 5-ЛОГ с линолевой кислотой дозозависимо (рисунок 1).

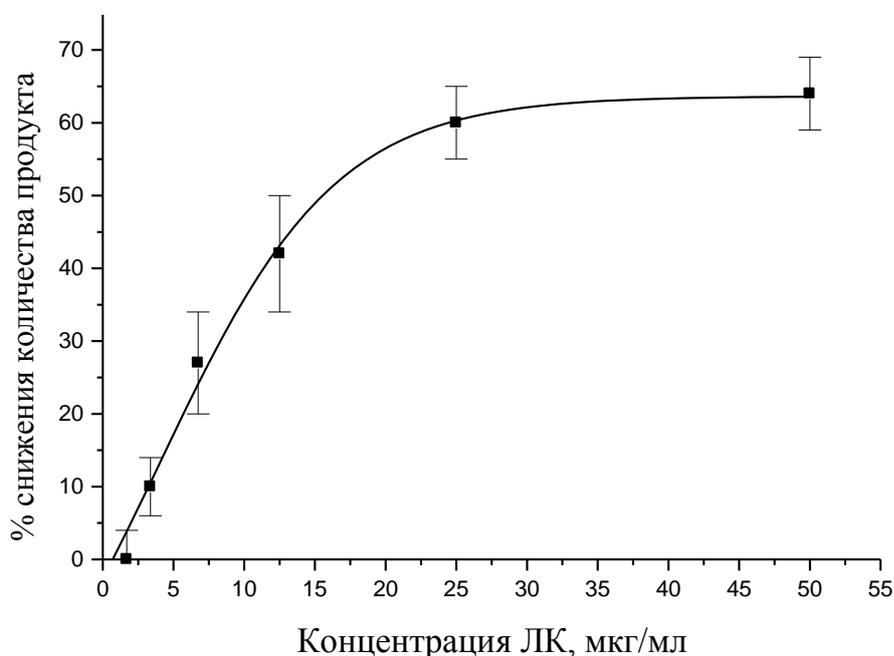


Рисунок 1 – Влияние ЛК на энзиматическую активность 5-ЛОГ

По уравнению аппроксимирующей кривой вычисляли EC50 (эффективную концентрацию на уровне 50% активности), равную 16,2 мкг/мл. Ингибитор NDGA в концентрации 15 мкМ снижал количество продукта реакции на 71%.

Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую активность **циклооксигеназы-2**

Простагландины, образующиеся под действием ЦОГ-2 из арахидоновой кислоты, обладают широким биологическим действием, участвуют в нормальном гомеостазе, являются ключевыми медиаторами в развитии острого воспалительного процесса.

Проведенный анализ показал, что ЛК снижал образование продукта реакции ЦОГ-2 с арахидоновой кислотой дозозависимо. Кривая снижения концентрации продукта

реакции имела сигмоидную форму с выходом на плато на уровне 60% при концентрациях >15 мкг/мл (рисунок 2).

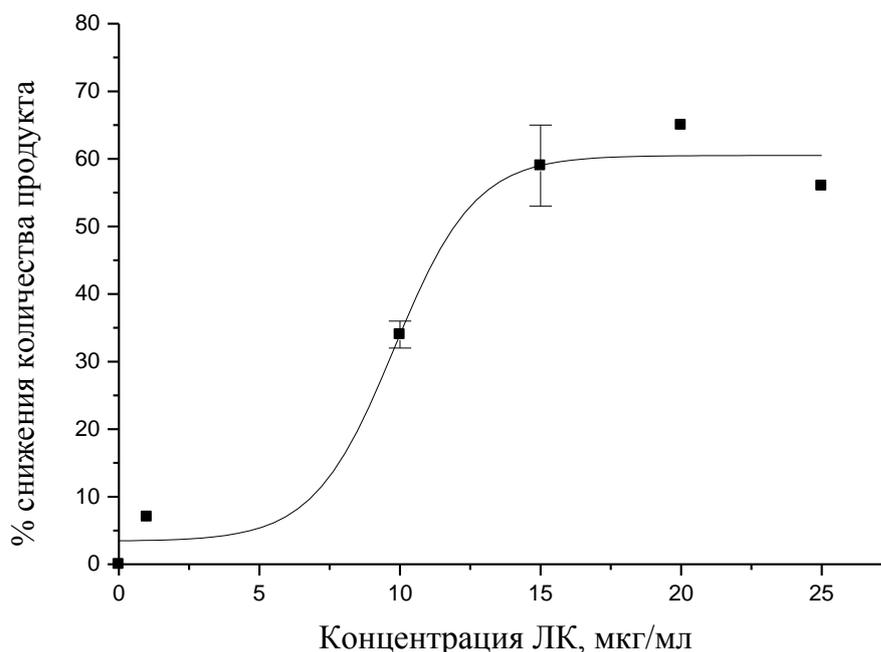


Рисунок 2 - Влияние ЛК на enzymатическую активность ЦОГ-2

По уравнению аппроксимирующей кривой вычисляли EC50, равную 9,8 мкг/мл. Нифлумовая кислота в концентрации 0,1 мкМ снижала количество продукта реакции на 21%.

Определение влияния липидного комплекса на индуцированную продукцию гистамина

Гистамин является важным химическим медиатором аллергических реакций и воспаления. Он синтезируется и хранится во вторичных гранулах тучных клеток различных тканей и циркулирующих в крови базофилах. В начале воспалительного процесса гистамин высвобождается из клеток и взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами. Через H1-гистаминовые рецепторы гистамин вызывает спазм гладкой мускулатуры бронхов и кишечника, активирует антиген-презентирующие клетки, стимулирует экспрессию молекул клеточной адгезии, индуцирует привлечение эозинофилов и нейтрофилов в очаг воспаления, повышает проницаемость капилляров, за счет чего инициирует развитие отека тканей.

Проведенное исследование выявило, что ЛК подавляет индуцированный выброс гистамина клетками RBL-I. Инкубация клеток с ЛК в течение 75 минут (15 мин до внесения в культуру клеток индуктора дегрануляции и 60 минут после) снижала выброс гистамина более чем в 2 раза в сравнении с контролем во всех тестируемых концентрациях 1, 2, 4 и 16 мкг/мл. Инкубация клеток с кетотифеном (16 мкг/мл), выбранным в качестве вещества сравнения, привела к полному подавлению высвобождения гистамина (рисунок 3).

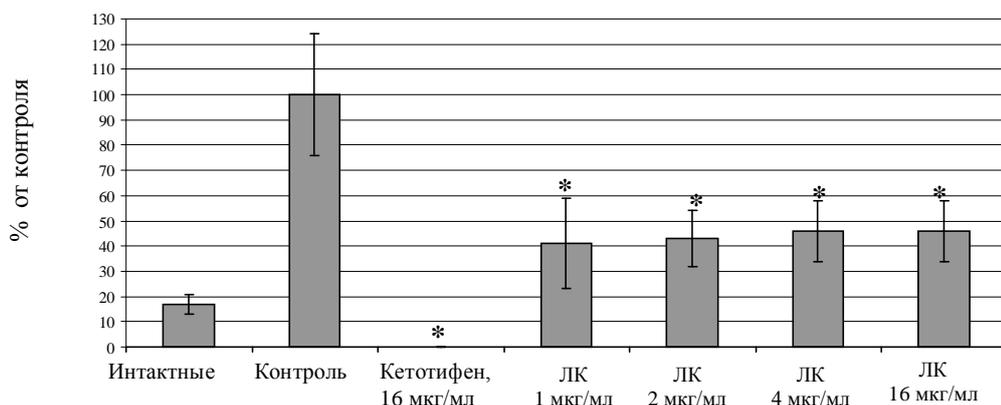


Рисунок 3 - Влияние ЛК на индуцированное высвобождение гистамина в культуре базофилов крысы линии RBL-I

Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с контролем по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таким образом, в присутствии ЛК в концентрациях 1, 2, 4 и 16 мкг/мл обнаружено снижение дегрануляции гистамина в 2 раза клетками базофилов крысы линии RBL-I.

Анализ влияния липидного комплекса на индуцированное фосфорилирование митоген-активированных протеинкиназ (МАР-киназ) *in vitro*

Продукция провоспалительных медиаторов в самом начале воспалительного процесса находится под контролем внутриклеточных сигнальных белков МАР-киназ p38, ERK1/2, ядерных транскрипционных факторов NF-κB и AP-1.

Проведенное исследование было направлено на оценку влияния ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование МАР-киназ p38 и ERK1/2. ЛК тестировали в одной концентрации 50 мкг/мл. В качестве препарата сравнения использовали ловастатин в концентрации 4 мкг/мл. Внесение в культуру ловастатина статистически значимо снижало количество фосфо-p38. Оценка действия ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование МАР-киназ p38 и ERK1/2 показала отсутствие эффекта (таблица 1).

Таблица 1

Влияние ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование МАР-киназ p38 и ERK1/2 в культуре моноцитов человека линии U937 ($n=3$, $Me \pm Q_2$)

Пробы	Количество фосфо-МАРК (усл. ед.)	
	p38	ERK1/2
Интактные	1786±2178	3476±221
Контроль	7161±6264*	6596±1149*
Ловастатин, 4 мкг/мл	2830±660 [#]	1722±1444
ЛК, 50 мкг/мл	4710±1319	6003±3437

Примечание –

* - отличия статистически значимы в сравнении с интактными клетками по U критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$;

[#] - отличия статистически значимы в сравнении с контролем по U критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Таким образом, на клеточной линии моноцитов человека U937 показано отсутствие влияния ЛК в концентрации 50 мкг/мл на ЛПС-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2;

Изучение взаимодействия липидного комплекса с Toll-подобными рецепторами на примере TLR4

Стимуляция клеточной линии ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл привела к NF-κB-зависимой выработке щелочной фосфатазы, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции, интенсивность которой составила $0,63 \pm 0,01$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм. Нейтрализация антителами привела к полному блокированию экспрессии щелочной фосфатазы (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно. Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций (рисунок 4).

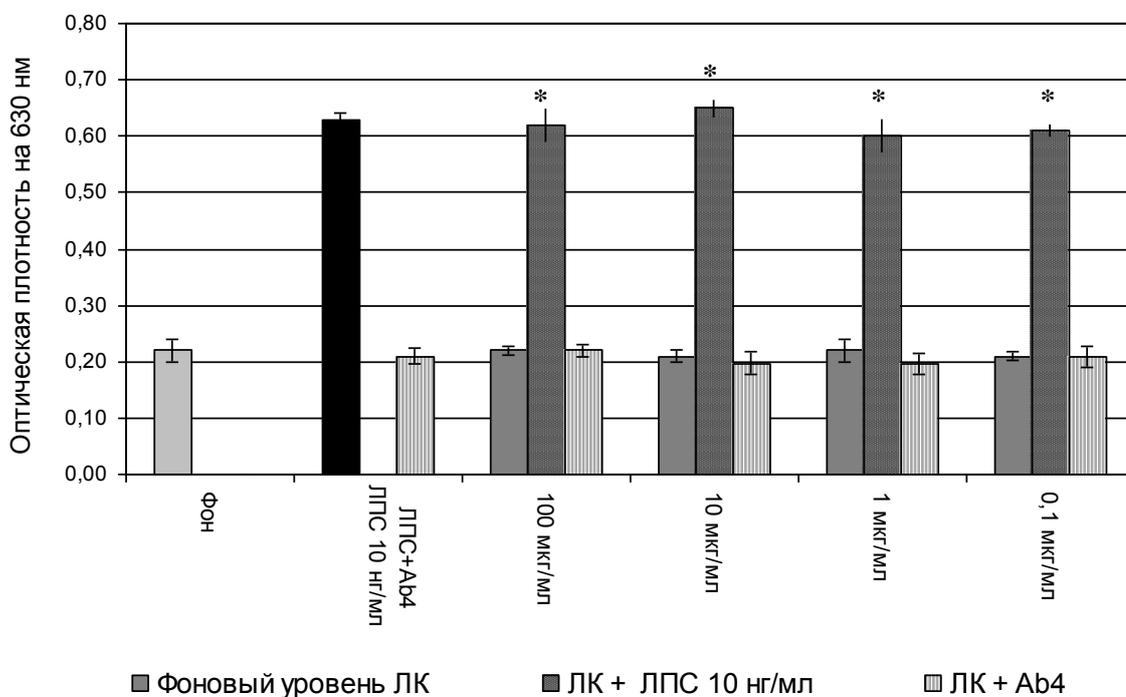


Рисунок 4 - Результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR4

Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с фоновым уровнем активации по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Во всех используемых концентрациях ЛК не повлиял на взаимодействие ЛПС с рецептором hTLR4.

Аналогичные результаты были получены для всех изученных рецепторов TLR1/2, TLR2/6, TLR2/2 и TLR5.

Таким образом, результаты экспериментов на клеточных линиях HEK-Blue-hTLR2, HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 демонстрируют отсутствие агонистического и антагонистического действия липидного комплекса по отношению к рецепторам TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6, TLR4 и TLR5 в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл.

Определение взаимодействия липидного комплекса с H₁-гистаминовыми рецепторами

Используя гистамин-индуцированное сокращение подвздошной кишки морской свинки, выявлено, что ЛК подавляет реакцию гладкой мускулатуры на гистамин, отразившееся в дозозависимом снижении амплитуды гистамин-индуцированного сокращения кишки и увеличении времени наступления максимального ответа (таблица 2).

Таблица 2

Амплитуда гистамин-индуцированного сокращения и время наступления
максимального ответа (Me±Q)

Группа	Амплитуда (% от 80мМ КСI)	Время (единицы от 80мМ КСI)
Контроль	98±33**	5±1**
Кетотифен 5 нг/мл	2±2*	45±16*
ЛК 10 мкг/мл	59±8**	18±3**
ЛК 20 мкг/мл	46±14**	25±9*
ЛК 100 мкг/мл	14±5**	32±12*
ЛК 1000 мкг/мл	5±2*	45±12*

Примечание –

* - отличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой, при $p < 0,05$;

** - отличия статистически значимы в сравнении с группой кетотифена, при $p < 0,05$.

ЛК проявил дозозависимый эффект, наиболее выраженный в концентрации 1000 мкг/мл. По выраженности выявленный эффект соответствовал эффекту субстанции кетотифена в концентрации 5 нг/мл. Вычисленное среднее значение EC₅₀ по отношению к амплитуде сокращения и времени наступления максимального ответа составило 18,1 мкг/мл.

Таким образом, обнаружено взаимодействие липидного комплекса с H₁-гистаминовыми рецепторами с EC₅₀, равной 18,1 мкг/мл, отразившееся в дозозависимом снижении амплитуды гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки морской свинки и увеличении времени наступления максимального ответа.

Оценка противовоспалительного действия липидного комплекса на модели острого воспаления «каррагениновый воздушный мешочек у крыс»

ЛК тестировали в трех дозах 4 мг/кг, 0,4 мг/кг и 0,04 мг/кг при введении внутрь каррагенинового мешочка сразу после введения 0,5% раствора λ-каррагенина. В качестве показателей противовоспалительной активности служил клеточный состав забираемого экссудата, а также продукция простагландина PGF_{2α}.

Интактная группа характеризовалась низкими значениями общего количества лейкоцитов $1,2 \times 10^6$ кл/мл. Введение внутрь воздушного мешочка 0,5% раствора λ-каррагенина привело к развитию острой воспалительной реакции с инфильтрацией лейкоцитов в зону воспаления через 6 часов до $9,2 \times 10^6$ кл/мл, из которых 82% составляли нейтрофилы (Таблица 3).

Таблица 3

Клеточный состав экссудата через 6 часов после индукции воспаления, $M \pm m$, $n=7$

Группа №	Описание групп	Общее количество лейкоцитов, $\times 10^6$ кл/мл	Лимфоциты, $\times 10^6$ кл/мл	Моноциты, $\times 10^6$ кл/мл	Нейтрофилы, $\times 10^6$ кл/мл
1	Интактная	$1,2 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,6$	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$
2	Контрольная	$9,2 \pm 2,3^*$	$1,4 \pm 0,7$	$0,58 \pm 0,32^{*\#}$	$8,8 \pm 2,3^*$
3	Диклофенак, 2 мг/кг	$3,7 \pm 0,8^{*\#}$	$0,5 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,11^{*\#}$	$2,8 \pm 0,3^{*\#}$
4	ЛК, 0,04 мг/кг	$7,9 \pm 2,3^*$	$1,2 \pm 0,5$	$0,13 \pm 0,08^*$	$6,6 \pm 0,9^*$
5	ЛК, 0,4 мг/кг	$6,8 \pm 2,2^*$	$0,9 \pm 0,4$	$0,08 \pm 0,03^*$	$5,8 \pm 1,1^*$
6	ЛК, 4 мг/кг	$5,3 \pm 1,2^{*\#}$	$0,6 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,08^{*\#}$	$4,6 \pm 0,5^{*\#}$

Примечание –

* - отличия статистически значимы в сравнении с интактной группой по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$;# - отличия статистически значимы в сравнении с группой контроля по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Препарат сравнения диклофенак в дозе 2 мг/кг статистически значимо снижал количество лейкоцитов в экссудате на 60% до $3,7 \times 10^6$ кл/мл. ЛК был наиболее эффективен в дозе 4 мг/кг, снижая общее количество лейкоцитов на 42%, в дозах 0,4 и 0,04 мг/кг на 26% и 14% соответственно (таблица 3).

Острое воспаление характеризовалось продукцией провоспалительных медиаторов. Так, оценка содержания $PGF_{2\alpha}$ в экссудате в контрольной группе составила 2756 пг/мл. Препарат сравнения диклофенак, неселективный ингибитор циклооксигеназы, ингибировал выброс $PGF_{2\alpha}$ практически до 0, что полностью согласуется с его механизмом действия (рисунок 5).

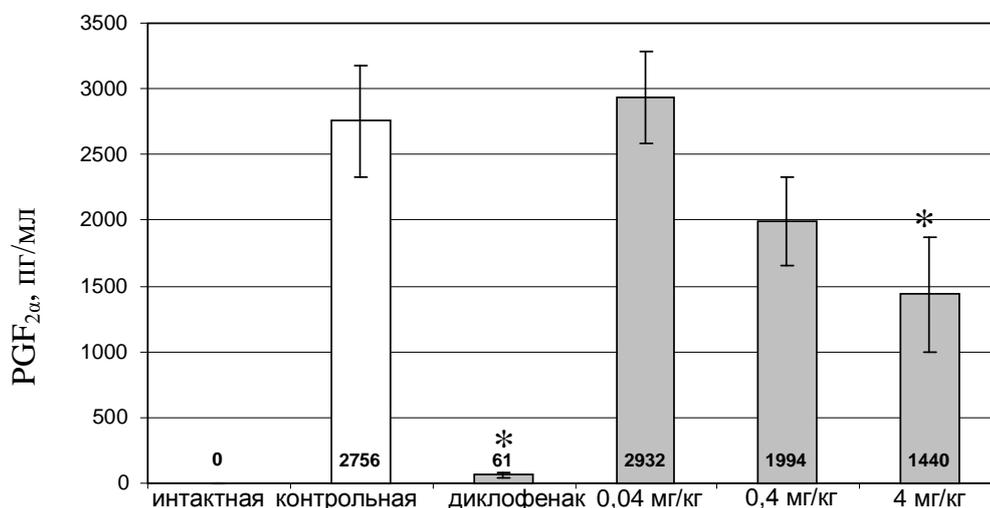


Рисунок 5 - Концентрация простагландина $F_{2\alpha}$ через 6 часов после индукции воспаления

Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

В дозе 4 мг/кг было обнаружено снижение количества $PGF_{2\alpha}$ в пробах в 2,2 раза по отношению к контролю, что подтверждает установленный механизм действия, связанный с ингибированием ЦОГ-2.

Таким образом, на модели острого воспаления “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс при введении липидного комплекса в дозах 0,04, 0,4 и 4 мг/кг установлено значимое снижение инфильтрации лейкоцитов и уровня простагландина $F_{2\alpha}$ в зоне воспаления.

Оценка противовоспалительного действия липидного комплекса на модели контактного дерматита у мышей

Индекс реакции в контрольной группе животных через трое суток после нанесения разрешающей дозы химического аллергена ДНХБ составил 52% (рисунок 6). У животных, получавших растворитель 5% ДМСО, ИР не отличался от контроля. Препарат сравнения супрастин снижал степень отека пораженного уха на 78%. ЛК снижал ИР дозозависимо. В дозе 2 мг/кг степень отека была ниже плацебо на 41%, в дозе 4 мг/кг на 66%, в дозе 8 мг/кг на 68%.

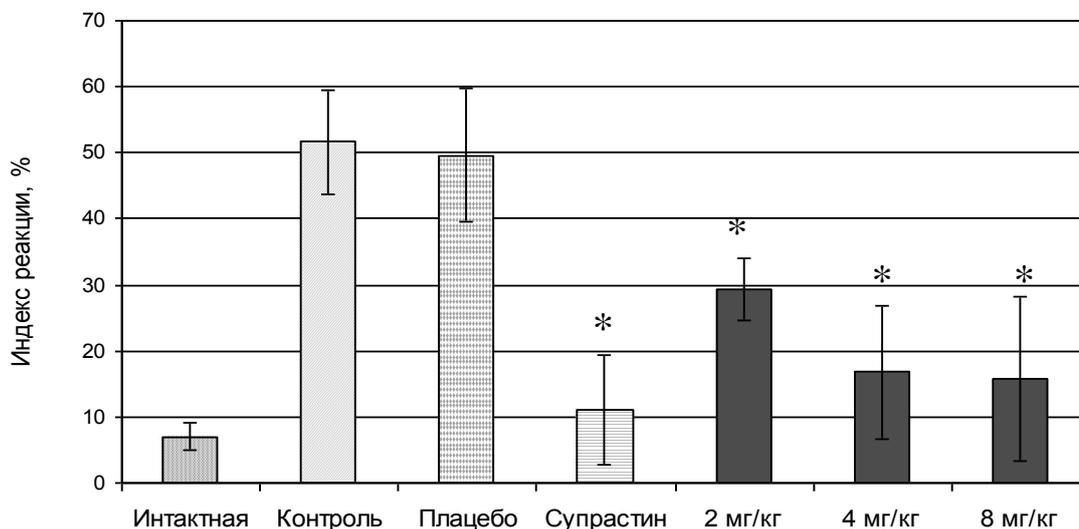


Рисунок 6 - Степень отека пораженного уха

Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с группой плацебо по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Морфологическая оценка показала, что “Опытное” ухо контрольных животных характеризовалось хроническим продуктивным воспалением с резко выраженной лейкоцитарно-плазмоцитарной инфильтрацией с вовлечением в воспалительный процесс нижних слоев дермы и поражением хрящевой ткани. Группа плацебо по выраженности изменений не отличалась от контроля. В группе животных, получавших препарат Супрастин, наблюдали умеренно выраженное воспаление, не затрагивающее нижние слои дермы, которое в соответствии с бальной системой было снижено на 54%, что согласуется с данными полученными при оценке отека (ИР) (рисунок 6).

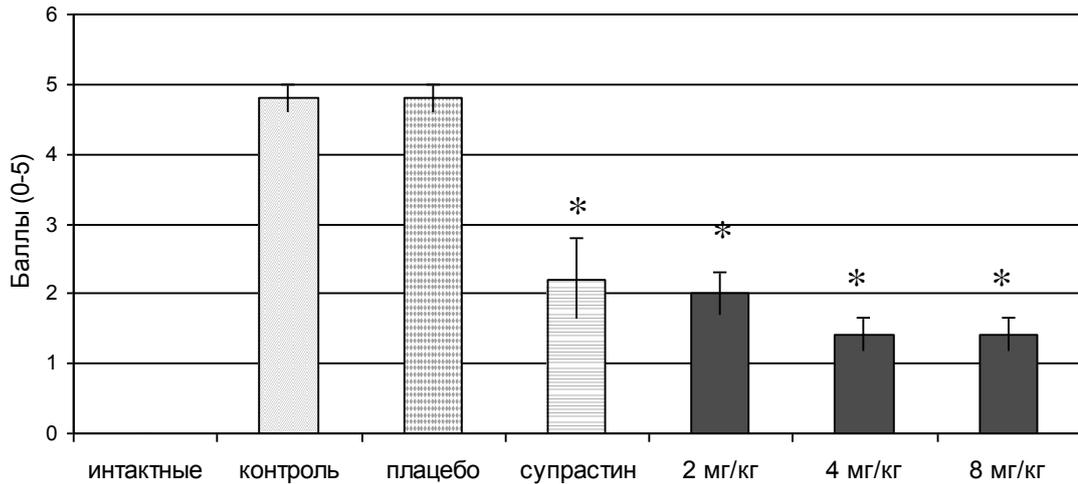


Рисунок 6 - Результаты гистологического исследования “опытного” уха в баллах
Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с группой плацебо по U критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

ЛК был эффективен во всех трех дозах. Изменения имели дозозависимый характер и характеризовались плазмоцитарно-лейкоцитарной инфильтрацией с вовлечением только верхних слоев дермы. Интенсивность воспалительного процесса, определенная по балльной системе, в дозах 4 и 8 мг/кг была снижена на 71% в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, на модели контактного дерматита у мышей подтверждено противовоспалительное действие липидного комплекса при внутримышечном введении в дозах 2, 4 и 8 мг/кг, выраженное в снижении отека ткани и гистологических признаков воспалительного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ЛК снижает образование провоспалительных продуктов преобразования арахидоновой и линолевой кислот под действием ЦОГ-2 и 5-ЛОГ в присутствии липидного комплекса с ЕС50, равными 9,8 и 16,2 мкг/мл соответственно;
2. В присутствии ЛК в концентрациях 1, 2, 4 и 16 мкг/мл обнаружено снижение высвобождения гистамина в 2 раза базофилами крысы линии RBL-1;
3. Выявлено взаимодействие ЛК комплекса с H1-гистаминовыми рецепторами с ЕС50, равной 18,1 мкг/мл, отразившееся в дозозависимом снижении амплитуды гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки морской свинки и увеличении времени наступления максимального ответа;
4. На модели острого воспаления “каррагениновый воздушный мешочек” у крыс при введении липидного комплекса в дозах 0,04, 0,4 и 4 мг/кг установлено значимое снижение инфильтрации лейкоцитов и уровня простагландина $F_{2\alpha}$ в зоне воспаления;
5. На модели контактного дерматита у мышей подтверждено противовоспалительное действие ЛК при внутримышечном введении в дозах 2, 4 и 8 мг/кг, выраженное в снижении отека ткани и гистологических признаков воспалительного процесса;
6. На клеточной линии моноцитов человека U937 показано отсутствие влияния ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2;
7. Результаты экспериментов на клеточных линиях HEK-Blue-hTLR2, HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 демонстрируют, что ЛК в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл не

проявляет агонистического и антагонистического действия по отношению к рецепторам TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6, TLR4 и TLR5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены биохимические механизмы коррекции острого воспаления липидами печени трески. Поскольку развитие острого воспаления является сложным процессом, в котором задействованы как клеточные, так и молекулярные механизмы, действие липидного комплекса изучали на процесс воспаления комплексно в условиях *in vivo*, *in vitro* и на изолированных тканях и клеточных линиях.

Рассматривая механизмы инициации острого воспалительного процесса, возможный агонизм и антагонизм ЛК изучали по отношению к Toll-подобным рецепторам, которые запускают каскад внутриклеточных биохимических процессов, активацию ядерных факторов и экспрессию сотен провоспалительных генов. На клеточных линиях, экспрессирующих отдельные TLR, было показано отсутствие взаимодействия ЛК с рецепторами TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6, TLR4 и TLR5. На клеточной линии моноцитов человека U937 было продемонстрировано отсутствие влияния на индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2, играющих ведущую роль в проведении провоспалительного сигнала.

Изучая действие комплекса липидов на каскад арахидоновой кислоты, было установлено снижение образования продуктов реакций преобразования арахидоновой и линолевой кислот ферментами ЦОГ-2 и 5-ЛОГ соответственно. Последние достижения липидомики позволяют сделать вывод, что ЛК приводит к торможению синтеза простагландинов и лейкотриенов из арахидоновой кислоты, и инициирует образование нового класса противовоспалительных липидных медиаторов из ω -3 полиненасыщенных жирных кислот, таких как резолвины, протектины и марезины. Эти медиаторы обладают исключительной ролью в переходе острого воспаления в стадию разрешения. На модели каррагенинового воздушного мешочка было доказано, что ЛК снижает инфильтрацию лейкоцитов и простагландина F2 α .

Поскольку при таких заболеваниях как артрит и атопический дерматит важную роль в развитии воспаления играет гистамин изучали возможность влияния ЛК на процесс высвобождения гистамина и работу H1-гистаминовых рецепторов. Впервые на клеточной линии базофилов крысы RBL-I было установлено, что комплекс липидов проявляет мембрано-стабилизирующие свойства, снижая выброс гистамина. На модели гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки морской свинки было обнаружено ингибирующее действие по отношению к H1-гистаминовым рецепторам. Применение липидного комплекса на модели контактного дерматита у мышей подтвердило его противовоспалительные эффекты.

Подводя итог накопленным данным можно заключить, что липиды играют важнейшую роль в инициации и разрешении острого воспалительного процесса. Благодаря комплексному составу ЛК действует сразу на несколько молекулярных мишеней, включая ЦОГ-2, 5-ЛОГ, H1-гистаминовые рецепторы и проявляет мембрано-стабилизирующие свойства, ингибируя выброс гистамина тучными клетками.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Установленные механизмы противовоспалительного действия ЛК, выделенного из печени трески, позволяют рекомендовать его использование в качестве перспективной платформы при создании новых противовоспалительных лекарственных средств для

лечения таких заболеваний, как ревматоидный артрит, псориаз, контактный дерматит, а также других воспалительных процессов и травм.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Рыбакова, А.В. Изучение противовоспалительной активности нового ветеринарного препарата афлогилекс на модели экспериментального адьювантного артрита / Рыбакова, А.В., **Крышень, К.Л.**, Соколов, В.Д. // Международный вестник ветеринарии. - 2012. - №1. - С. 39-43.
2. **Крышень, К.Л.** Оценка противоаллергенных свойств нового полипептидного препарата из печени тресковых / Крышень, К.Л. Демченко, Д.В, Рыбакова, А.В., Дадали, В.А., Рылдловская, А.В., Пожарицкая, О.Н., Макарова, М.Н., Шиков, А.Н., Макаров, В.Г. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. - 2012. - №2. - С.38-42.
3. **Крышень, К.Л.** К механизму противовоспалительного действия комплекса, выделенного из печени трески. Антиэкссудативное действие. (сообщение №1) / Крышень, К.Л. Демченко, Д.В, Шиков А.Н., Пожарицкая, О.Н., Макарова М.Н., Макаров В.Г. // Международный вестник ветеринарии.- 2013. - №4. - С.100-106.

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Крышень, К.Л.** Противоаллергенные свойства и молекулярные механизмы действия пептидно-фосфолипидного комплекса, полученного из печени трески / Крышень К.Л. // Материалы конференции Профилактическая медицина. - 2011. - С.1724.
2. Рыбакова, А.В. Сравнительная оценка эффективности полипептидного препарата при эндометритах коров / **Крышень, К.Л.** Макарова, М.Н., Соколов, В.Д. // Международный вестник ветеринарии. - 2012. - №4. - С.38-41.
3. Шиков, А.Н. Новые технологии переработки гидробионтов / Шиков, А.Н., Пожарицкая, О.Н., Уракова, И.Н., Рыбакова, А.В., **Крышень, К.Л.** Макаров, В.Г. // Фармацевтические и медицинские биотехнологии. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва, Россия. - 2012. - С. 385.
4. **Крышень, К.Л.** Двойной селективный ингибитор циклооксигеназы-2 и 5-липоксигеназы природного происхождения / Крышень, К.Л. Ацапкина, А.А, Рыбакова, А.В., Демченко, Д.В., Рылдловская, А.В., Пожарицкая, О.Н., Макарова, М.Н., Макаров, В.Г. // Материалы IV съезда фармакологов России. Казань, Россия. - 2012. - С.105.
5. **Крышень, К.Л.** Биохимические основы противовоспалительного действия нового полипептидного комплекса, полученного из печени трески / Крышень, К.Л. Рыбакова, А.В., Рылдловская, А.В., Макарова, М.Н., Дадали, В.А., Макаров, В.Г. // Материалы всероссийской молодежной конференции «Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов». Уфа. Россия. - 2012. - С. 92-94.
6. **Крышень, К.Л.** Оценка механизмов противовоспалительного действия препарата Афлогилекс, полученного из печени трески / Крышень, К.Л., Рылдловская, А.В., Гушин, Я.А., Рыбакова, А.В., Дадали, В.А., Макаров, В.Г. // Медицинский академический журнал. - 2012. - №4. - С.88-89.
7. **Крышень, К.Л.** Противовоспалительное действие липидов, выделенных из печени тресковых / Крышень, К.Л. Дадали, В.А. // Материалы конференции Профилактическая медицина - 2012. – С.86
8. Rybakova, A.V. Anti-inflammatory properties of peptide complex obtained from the cod liver (gadidae) on the model of adjuvant arthritis in the rat / Rybakova, A.V., **Kryshen, K.L.**,

Kovaleva, M.A., Avdeeva, O.I., Makarenko, I.E., Makarova, M.N., Makarov, V.G. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Материалы XVI международного конгресса Фитофарм. - 2012. - С. 93.

9. **Kryshen, K.L.** Biochemical basis of anti-inflammatory properties of peptide complex obtained from the cod liver (gadidae) / Kryshen, K.L., Demchenko, D.V., Rybakova, A.V., Rydlovskaya, A.V., Atsapkina, A.A., Makarova, M.N., Makarov, V.G. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Материалы XVI международного конгресса. - 2012. - С. 73.

10. **Kryshen, K.L.** Anti-inflammatory effects of lipids extract from the cod liver / Kryshen, K.L., Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Laakso, I., Hiltunen, R. // *Planta Med.* - 2013. - Vol.79. - P.1247.