

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Крышenea Кирилла Леонидовича

«Биохимические механизмы коррекции острого воспаления липидами печени трески», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 03.01.04 – биохимия.

Процесс острого воспалительного процесса является начальной реакцией организма на воздействие патогенных агентов или повреждения тканей и кратковременным процессом, так как продолжительное хроническое воспаление приводит к тяжелому местному и системному повреждению и возникновению широкого спектра заболеваний. Основные факторы, участвующие в развитии острого воспаления, были выяснены еще в 1927 году Томасом Льюисом и к настоящему времени они достаточно хорошо изучены и освещены в литературе. Не смотря на это вопросы, связанные с процессом разрешения острого воспаления исследованы в меньшей степени и требуют дальнейшего изучения. Поэтому и на протяжении последних десятилетий пристальный интерес специалистов медико-биологического профиля к процессам развития и разрешения острого воспаления не ослабевает.

В настоящее время в арсенале медицины имеется большое количество противовоспалительных лекарственных средств, которые, к сожалению, из-за широкого спектра побочных эффектов, отрицательно влияют на реализацию физиологических процессов в организме. В частности, нестероидные противовоспалительные препараты вызывают побочные осложнения со стороны слизистой желудка, вызывают язвенные поражения, инфаркт миокарда, ухудшение ранозаживления и др. В связи с актуальной проблемой поиска новых эффективных противовоспалительных средств, в последние годы особое внимание исследователей уделяется новому классу липидных медиаторов - метаболитам ω -3 полиненасыщенных высших жирных кислот,

которые являются эндогенными медиаторами, участвующими в завершении воспалительного процесса.

Все выше сказанное указывает на актуальность и своевременность темы диссертационной работы Крышень К.Л., выполненной в ГБОУ ВПО «Северо-Западном государственном медицинском университете им. И.И. Мечникова» МЗ РФ, поскольку данное исследование посвящено изучению конкретной и практически важной проблеме для современной биохимии и медицины – биохимическим механизмам действия и роли липидов в разрешении воспалительного процесса.

Диссертационная работа Крышень К.Л. выполнена в традиционном стиле и представляет собой рукопись объемом 139 страниц машинописного текста. Она состоит из введения, где освещены вопросы обоснования проблемы и задачи исследования; 4-х глав: обзора литературы, посвященному биохимическим механизмам инициации и разрешения острого воспаления, в нем подробно освещены современные данные о новых липидных медиаторах и роли ω -3 полиненасыщенных высших жирных кислот в разрешении воспаления, а также механизму их противовоспалительного действия на экспериментальных моделях; во второй главе освещены вопросы организации и методов исследования; в третьей - экспериментального обоснования биохимических механизмов коррекции острого воспаления липидным комплексом, выделенном из печени трески; и четвертая глава посвящена обсуждению результатов; выводов, заключения и приложения. Результаты исследования суммированы и обобщены в 16 таблицах и проиллюстрированы 45 рисунками. Список цитируемой литературы содержит 210 наименований.

Введение отражает актуальность работы, в нем обосновывается выбор направления данного исследования. Автором четко сформулирована цель работы – установление механизма действия липидов печени трески при остром воспалении в экспериментах *in vivo*, *in vitro* и на изолированных тканях и клеточных линиях. В соответствии с этим Крышень К.Л.

сформулировал ряд конкретных задач, являющихся этапами выполнения последовательного плана экспериментального исследования. В данном разделе диссертации четко изложены научная новизна, теоретическое и практическое значение рецензируемой работы.

В обзоре литературы диссертации дан подробный анализ современного состояния изучаемой проблемы. Глава обзора литературы, включает в себя сведения о современных представлениях биохимических механизмов острого воспаления, основных молекулярных мишенях для продуктов деградации микроорганизмов. Во второй части литературного обзора достаточно широко освещен новый класс липидных медиаторов и их роли в биохимических механизмах разрешения воспаления. Третья часть обзора посвящена анализу экспериментальных моделей для оценки инициации разрешения воспаления, что позволило Крышню К.Л. выбрать оптимальные экспериментальные модели для решения цели диссертации и выполнения поставленных в ней задач. В четвертой части рассматриваются возможности использования морских организмов в качестве источников низко- и высокомолекулярных соединений и автор делает вывод о перспективности данного сырья для получения потенциальных лекарственных препаратов. Необходимо отметить, что при написании данной главы, автор нашел нужное соотношение между частями обзора литературы, посвященным существенно различным проблемам.

В целом обзор литературы свидетельствует о широкой эрудиции диссертанта, его способности к обобщению и систематизации данных других авторов и вполне вводит читателя в круг исследуемых проблем.

По данному разделу работы хотелось бы услышать мнение автора по вопросу: имеются ли к настоящему времени данные о не только противовоспалительном действии биологически активных веществ липидной природы, выделяемых из гидробионтов, но и возможности их применения в медицинской практике.

Собственные оригинальные исследования изложены в трех главах, составляющих основу диссертационной работы. Раздел «Материалы и методы исследования» содержит подробное описание всего арсенала использованных автором в своей работе методик. В целом подбор методов свидетельствует о грамотном и тщательном подходе к экспериментальному исследованию. Характеризуя этот раздел работы, следует подчеркнуть, что методы, избранные и использованные диссертантом, адекватны поставленным целям и задачам исследования, а их высокая специфичность и разрешающая способность обеспечивают получение однозначных, убедительных результатов.

В следующих двух главах представлены оригинальные результаты, полученные автором, совокупность которых дала автору возможность решить поставленные перед ним задачи и сформулировать соответствующие заключения и выводы. Остановившись на оценке биохимической составляющей диссертации нужно отметить: экспериментальная часть выполнена с грамотным применением высокотехнологичных методов исследования и подходов к анализу полученных результатов.

Несомненным достоинством данной работы является проведенный автором всесторонний анализ влияния липидов печени трески на различные молекулярные мишени, задействованные при развитии и завершении воспаления. Автором убедительно показано, что липидный комплекс *in vitro* ингибирует циклооксигеназу-2 (до 69%) и 5-липооксигеназу (до 71%) - ключевые ферменты, непосредственно участвующие в синтезе эндогенных медиаторов (простагландинов и лейкотриенов), задействованных при воспалении. Необходимо отметить, изучаемый липидный комплекс не вызывал полного ингибирования исследуемых ферментов, что, по-видимому, является одним из положительных аргументов для дальнейшего и всестороннего изучения данного препарата в качестве противовоспалительного средства. В частности известно, что полное ингибирование циклооксигеназ нестероидными противовоспалительными

лекарственными средствами приводит к подавлению нормальной физиологической функции простагландинов и развитию побочных эффектов.

На модели культуры базофилов крысы линии RBL-1 было продемонстрировано действие липидного комплекса из печени трески на дегрануляцию тучных клеток и более чем двукратное достоверное подавление индуцированного выброса гистамина из базофилов. Полученные в работе результаты на модели гистамин-индуцированного сокращения поперечно-полосатой кишки морской свинки позволили автору сделать вывод о способности исследуемого препарата связываться с H₁-гистаминовыми рецепторами.

В рецензируемой работе также представлены материалы по изучению влияния липидного комплекса на Toll-подобные рецепторы антиген-презентирующих клеток, а также передачу противовоспалительного сигнала через MAP-киназный каскад.

В разделе «Обсуждение результатов» автор провел обобщение и критический анализ полученного в ходе проведенного исследования материала.

Научная новизна диссертационной работы в первую очередь определяется тем, что автором были впервые всесторонне изучены биохимические механизмы влияния липидного комплекса, выделенного из печени трески на различные молекулярные мишени воспалительного процесса в условиях *in vitro*, *in vivo* и на изолированных тканях и клеточных линиях.

Учитывая выше изложенное, необходимо отметить принципиально новые данные, полученные в диссертационной работе:

- впервые было показано, что *in vitro* в присутствии липидного комплекса идет подавление активности циклооксигеназы-2 и 5-липооксигеназы и снижается образование продуктов реакции метаболизма арахидоновой и линолевой кислот

- на клеточной линии моноцитов человека U937 проведена оценка возможного влияния липидного комплекса на индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2

- экспериментами на клеточных линиях HEK-Blue-hTLR2, HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 установлено, что липидный комплекс не взаимодействует с рецепторами TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6, TLR4 и TLR5

- впервые было оценено влияние липидного комплекса на работу H1-гистаминовых рецепторов на модели гистамин-индуцированного сокращения поперечно-полосатой кишки морской свинки

- на модели культуры базофилов крысы линии RBL-1 оценено взаимодействие изучаемого липидного комплекса с H1-гистаминовыми рецепторами и установлено двукратное снижение выброса гистамина из базофилов

- установлено выраженное снижение инфильтрации лейкоцитов и уровня простагландина $F_{2\alpha}$ в присутствии изучаемого липидного комплекса на модели острого воспаления «каррагениновый воздушный мешочек»

- на модели контактного дерматита у мышей была подтверждена противовоспалительная активность липидного комплекса на стадии экссудативной фазы воспалительной реакции

Диссертационная работа имеет также и научно-практическую значимость для медицинской практики, так как помимо разработки теоретических проблем носит и прикладной характер. А именно, полученные автором данные позволили автору сформулировать практические рекомендации использования липидного комплекса, выделенного из печени трески, в качестве перспективной платформы при создании новых противовоспалительных лекарственных средств для лечения воспалительных процессов и травм различной этиологии. Кроме того, изучаемый липидный комплекс вошел в состав двух лекарственных форм (1% раствора для инъекций и 0,02% геля) ветеринарного противовоспалительного препарата

«Афлогилекс». Полученные автором результаты могут быть использованы и для образовательных целей.

Совокупность представленных экспериментальных данных дала возможность автору решить поставленные перед ним задачи, а также сделать соответствующие заключения и выводы.

Представленные в диссертации материалы не только подтверждают достоверность проведенных исследований, но и служат научным обоснованием всех положений, выдвинутых автором на защиту.

Диссертационная работа написана хорошим языком, текст работы хорошо выверен и практически не содержит опечаток.

Автореферат составлен в соответствии с существующими требованиями и полностью соответствует сведениям, изложенным в диссертационной работе.

По материалам диссертации автором опубликовано 13 работ, 3 из которых опубликовано в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты диссертационной работы прошли апробацию на авторитетных Всероссийских и Международных конференциях.

Биохимические исследования, представленные в работе Крышень Кирилла Леонидовича, выполнены хорошо и принципиальных замечаний к работе нет.

Хотелось бы услышать мнение диссертанта по следующим вопросам:

1. В настоящее время в медицине применяют большое количество противовоспалительных препаратов, которые, по механизму действия, являются необратимыми или конкурентными ингибиторами циклооксигеназы и липооксигеназы, обратимыми ингибиторами рецепторов лейкотриенов и т.п. По-вашему мнению, каков механизм воздействия изучаемого Вами липидного комплекса на активность циклооксигеназы-2 и 5-липооксигеназы? Могут ли компоненты предлагаемого липидного комплекса оказывать прямое воздействие на фермент или их действие на циклооксигеназу и липооксигеназу является опосредованным?

2. При проведении оценки воздействия липидного комплекса на внутриклеточные MAP-киназы Вы использовали максимально возможную концентрацию липидного комплекса (50 мкг/мл). Вы не допускаете такой возможности, что при использовании более широкого диапазона концентраций препарата можно было бы получить более значимые результаты, в отличие от полученной Вами тенденции к индуцированию фосфорилирования MAP-киназ p38 и ERK1/2?

Высказанные вопросы и замечания не умаляют достоинств работы, носят сугубо частный и скорее дискуссионный характер.

Заключение

Диссертационная работа Кирилла Леонидовича Крышеня на тему «Биохимические механизмы коррекции острого воспаления липидами печени трески» является законченной научно-квалификационной работой, содержит решение актуальной задачи фармакологии и биохимии, связанной с разработкой и научным обоснованием использования новой лекарственной субстанции природного происхождения для создания эффективных и безопасных противовоспалительных лекарственных средств.

Принимая во внимание актуальность выполненной работы, обоснованность и новизну научных положений, научно-практическую значимость полученных результатов и высокий методический уровень исследований, можно заключить, что диссертационная работа Крышеня Кирилла Леонидовича полностью соответствует критериям п. 9, утвержденных постановлением «о порядке присуждения ученых степеней» правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 03.01.04 – биохимия.

Доктор биологических наук,
заведующая кафедрой биохимии СПХФА,
профессор



[Handwritten signature]
Н.В.Кириллова

Подпись руки *[Handwritten signature]*
удостоверяю 11.03.2014
Начальник ОД *[Handwritten signature]*