

СЕВЕРО-ЗАПАДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. И.И.МЕЧНИКОВА

На правах рукописи

Крышень Кирилл Леонидович

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ
ЛИПИДАМИ ПЕЧЕНИ ТРЕСКИ

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология
03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Доктор медицинских наук, Макарова М.Н.
Доктор химических наук, профессор Дадали В.А.

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ И РАЗРЕШЕНИЯ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ. ОСНОВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ	11
1.1.1 Врожденный иммунитет и роль Toll-подобных рецепторов в инициации воспаления.....	11
1.1.2 Роль внутриклеточных MAP-киназ в развитии воспаления	17
1.1.3 Роль тучных клеток, гистамина и гистаминовых рецепторов в инициации и развитии воспаления.....	20
1.1.4 Роль эйкозаноидов в инициации и развитии воспаления.	23
1.2 НОВЫЙ КЛАСС ЛИПИДНЫХ МЕДИАТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗРЕШЕНИИ ВОСПАЛЕНИЯ. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗРЕШЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ С ИХ УЧАСТИЕМ	29
1.2.1 Общие аспекты разрешения воспаления	29
1.2.2 Роль макрофагов разрешения воспаления.....	31
1.2.3 Липидные медиаторы, участвующие в разрешении воспаления.....	32
1.3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНИЦИАЦИИ И РАЗРЕШЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ	39
1.3.1 Модель каррагенинового воздушного мешочка у крыс.....	39
1.3.2 Модель контактного дерматита у мышей.....	42
1.4 ГИДРОБИОНТЫ КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ КАНДИДАТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1.1 Способ получения	52
2.1.2 Химический анализ субстанции.....	52
2.2 ЖИВОТНЫЕ	53

2.3 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 5-ЛОГ И ЦОГ-2 В УСЛОВИЯХ IN VITRO	56
2.3.1 Изучение влияния липидного комплекса на энзиматическую активность 5-ЛОГ	56
2.3.2 Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую активность ЦОГ-2	56
2.4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ПРОДУКЦИЮ ГИСТАМИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO	57
2.5 АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ MAP-КИНАЗ В УСЛОВИЯХ IN VITRO	58
2.6 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С TOLL-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO	61
2.7 МЕТОД ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С H1-ГИСТАМИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ	63
2.8 ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ	64
2.9 МЕТОД АНАЛИЗА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ “КАРРАГЕНИНОВЫЙ ВОЗДУШНЫЙ МЕШОЧЕК” У КРЫС	67
2.10 МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ СТАТИСТИКИ	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
3.1 ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 5-ЛОГ	70
3.2 ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ 2	74
3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ГИСТАМИНА	77

3.4 РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ MAP-КИНАЗЫ	78
3.5 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С TOLL-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ	79
3.6 РЕЗУЛЬТАТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С H1-ГИСТАМИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ	88
3.7 ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ	95
3.8 ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ "КАРРАГЕНИНОВЫЙ ВОЗДУШНЫЙ МЕШОЧЕК" У КРЫС..	99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

ВВЕДЕНИЕ

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., 2007).

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. 2007).

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. 2005).

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., Ecker, J. 2008). Известно, что при низких наномолярных концентрациях резолвин E1 подавляет воспаление, блокируя трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов, провоспалительные сигнальные каскады (например, NF- κ B активацию) и высвобождение провоспалительных цитокинов, включая TNF α , IL-1 и IL-6 (Martin S. et al. 2011).

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. et al. 2003). 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. и др. 2012). Липидный комплекс представляет собой уникальную композицию липофильных соединений (Шиков А.Н. и др. 2012). В липидном комплексе (ЛК) обнаружено высокое содержание остатков ω -3 ПНЖК, в том числе эйкозапентаеновой кислоты в составе фосфолипидов.

Наличие эйкозапентаеновой 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 контактном 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-1 с последующим анализом индуцированного выброса гистамина методом иммуно-ферментного 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 $F_{2\alpha}$.

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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ И РАЗРЕШЕНИЯ
ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ. ОСНОВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ*1.1.1 Врожденный иммунитет и роль Toll-подобных рецепторов в инициации воспаления*

Инфекционное воспаление индуцируется продуктами деградации бактерий (липопептиды, липополисахариды, пептидогликаны, формилметионил пептиды, флагеллин, ДНК), грибов (зимозаны), вирусов (двуспиральная и односпиральная РНК) и др. Продукты деградации микроорганизмов (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, ПАМП) узнаются семейством рецепторов TLR (Toll-подобные рецепторы) (Кетлинский С., Симбирцев А., 2008).

У человека TLR представляют собой семейство молекул, состоящее на сегодняшний день из 10 индивидуальных рецепторов, обозначаемых TLR1, TLR2 и т.д. (Zarembek K., Godovsky P., 2002).

TLR в состоянии распознать практически все основные типы патогенов, включая различные типы бактерий, вирусов, грибов, простейших и паразитов. Все известные TLR представляют собой одноцепочечные трансмембранные полипептиды со сходным строением, формирующие биологически активные димерные рецепторы, в том числе гетеродимерные рецепторы, состоящие из двух разных Toll-молекул (Кетлинский С., Симбирцев А., 2008).

Внеклеточная N-концевая область аминокислотной последовательности имеет от 19 до 25 тандемных повторяющихся участков с повышенным содержанием лейцина, различающихся по длине у разных TLR и ответственных за связывание ПАМП. Внутриклеточная часть представлена TIR-доменом (Toll/IL-1 гомологичным доменом), названным так вследствие одинакового строения этих цитоплазматических доменов у TLR и у рецепторов цитокинов семейства IL-1 (Medzhitov R., Janeway C., 1997).

TLR конститутивно экспрессируются главным образом на клетках миеломоноцитарного ряда и различных популяциях лимфоцитов, имея свои особенности экспрессии на различных типах клеток (Таблица 1) (Hornung V. et al., 2002).

Таблица 1.

Экспрессия Toll-подобных рецепторов на различных
иммунокомпетентных клетках

	TLR1/2	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR2/6	TLR7	TLR8	TLR9
В-лимфоциты	+	+	-	-	-	+	+	-	+
CD4+ Т-лимфоциты	+	-	-	-	+	-	+	+	-
CD8+ Т-лимфоциты	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Моноциты	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Натуральные киллеры	-	-	+	-	-	-	+	-	+

Каждый TLR кодируется своим собственным геном. В целом уровень экспрессии TLR на лейкоцитах достаточно низок – от сотен до нескольких тысяч рецепторов на клетку. Все TLR по-разному локализованы в клеточных компартментах (Kiyoshi T., Akira S., 2005). Функционально активные TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6, распознающие ПАМП бактерий и других клеточных патогенов, экспрессированы на поверхности клеток, а после фагоцитоза патогена некоторые из них продолжают экспрессироваться на мембранах эндосом, где получают дополнительную возможность взаимодействовать с ПАМП после разрушения патогена. Напротив, TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, распознающие различные варианты нуклеиновых кислот, слабо экспрессируются на внешней мембране клеток, а появляются в эндосомах. TLR9 конститутивно экспрессируются в эндоплазматическом ретикулуме и появляется в эндосомах после активации клеток CpG DNA (рисунок 1) (Latz E. et al., 2004; Matsumoto M. et al., 2003).

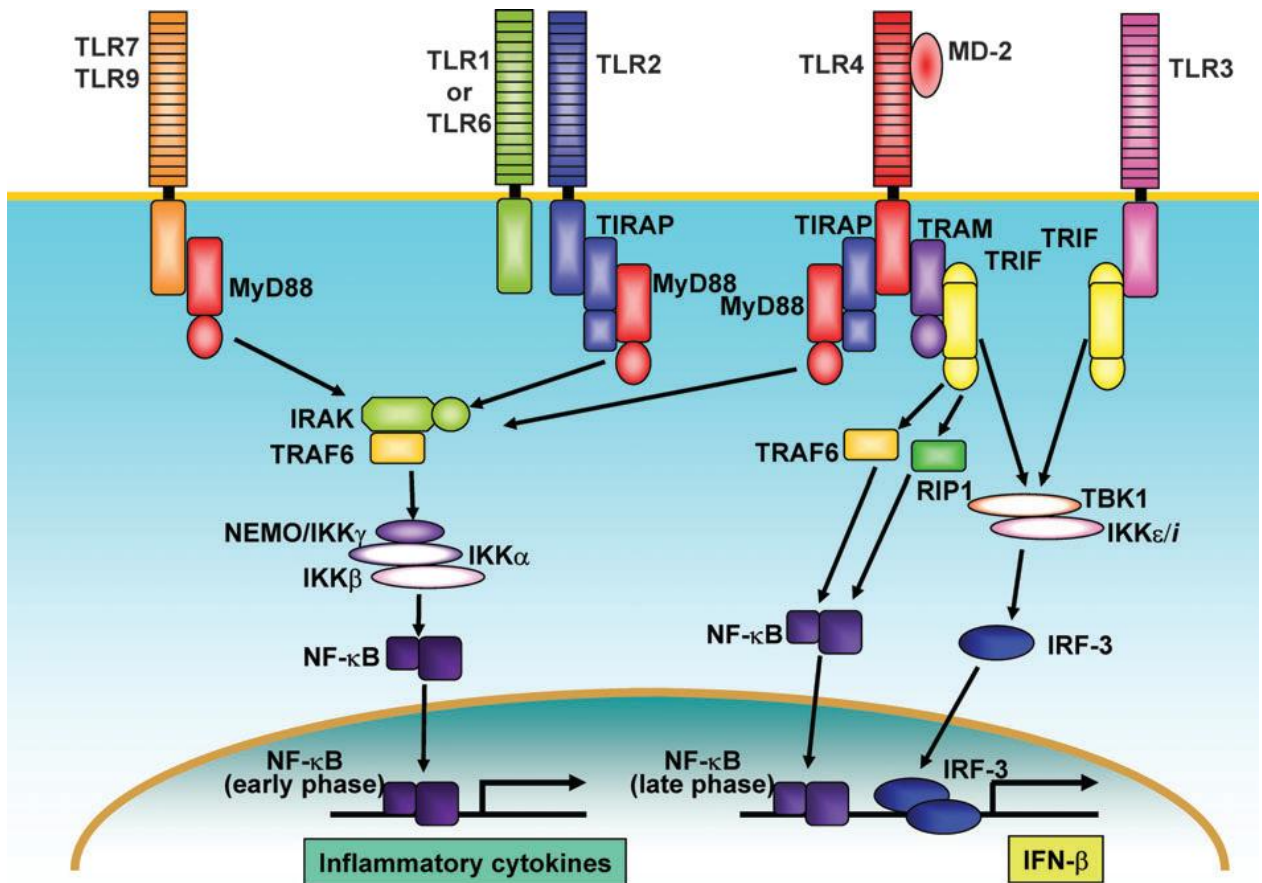


Рисунок 1 - Проведение внутриклеточного сигнала через TLR. Представлен MyD88-зависимый и MyD88 независимый сигнальные пути

Природным лигандом к TLR1/2 рецептору являются триациллилопептиды, к TLR2/6 - диациллилопептиды, к TLR4 – ЛПС, TLR5 – флагеллин, TLR3 – dsRNA, TLR7/8 – ssRNA, TLR9 – CpG DNA (Kiyoshi T., Akira S., 2005). Общим свойством всех TLR является взаимодействие с ПАМП и проведение активационного сигнала, указывающего на присутствие патогена и ведущего к активации защитных реакций. После связывания соответствующих лигандов все TLR димеризуются и претерпевают конформационные изменения, нужные для освобождения сайтов взаимодействия с клеточными адаптерными молекулами в TIR-домене для запуска каскада передачи сигнала. TIR-домен непосредственно взаимодействует с адаптерной молекулой MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), нужной для привлечения киназ семейства IRAK (IL-1 receptor associated kinase), состоящих из четырех ферментов, обозначаемых цифрами 1-4, и

IRAK-M (рисунок 1). Первой активируется киназа IRAK4, а затем IRAK1, которая, в свою очередь, взаимодействует с внутриклеточным фактором TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), впервые открытым при изучении рецептора TNF и активирующим ферменты семейства MAP-киназ (mitogen-activated protein kinase) TAK1, затем JNK (c-jun N-terminal kinase) и др. Далее происходит активация киназ IKK- α и IKK- β , приводящая к фосфорилированию и деградации ингибиторного белка I κ B с освобождением димера NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и его транслокацией в ядро (Akira S., Takeda K., 2004).

NF- κ B прямо связывается с промоторными участками целого ряда генов молекул, активирующих и регулирующих развитие воспалительной реакции, включая гены цитокинов. На определенных этапах описанного каскада происходит активация и других транскрипционных факторов, в частности AP-1, также участвующих в инициации экспрессии генов молекул воспаления. Важно, что данный внутриклеточный сигнальный механизм функционирует при активации соответствующими ПАМП всех известных TLR, за исключением TLR3. Это означает, что разные патогены после взаимодействия своих ПАМП со специфическими TLR могут вызывать развитие одинакового универсального пути активации воспалительного ответа по рассмотренному механизму. Это полностью согласуется с данными о различиях во внеклеточных доменах TLR, обеспечивающих специфичность распознавания ПАМП, и напротив, очень большом сходстве строения внутриклеточных участков, нужных для проведения активационного сигнала (Vogel S. et al., 2003).

Однако активация клеток с участием различных TLR может проходить и с использованием иных механизмов передачи сигнала. Помимо описанного сигналинга с участием адаптерного белка MyD88 существует и другой, MyD88-независимый сигнальный путь, но не для всех TLR. Главной отличительной чертой данного пути активации оказалась индукция экспрессии целого ряда так называемых генов, индуцируемых интерфероном (interferon-inducible), обычно экспрессирующихся при развитии противовирусного ответа. Этот путь также

принципиально важен для дифференцировки дендритных клеток, экспрессии ими костимуляторных молекул (CD40, CD80 и CD86) и последующей индукции пролиферации Т-лимфоцитов (рис.1) (Kiyoshi T., Akira S., 2005). Важность данного пути активации определяется тем, что IFN I типа считаются важнейшими молекулами для дифференцировки Т-лимфоцитов. Они нужны для индукции экспрессии костимуляторных молекул на дендритных клетках, необходимых для их оптимального взаимодействия с CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами (Le Bon A., Tough D., 2002).

Расшифровка данного сигнального пути позволила сделать вывод, что он принципиально отличается от MyD88-зависимой активации клеток, начиная со стадии адаптерных молекул для TLR. TIR-домен TLR в этом варианте взаимодействуют с адаптерной молекулой TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) после чего происходит активация внутриклеточного фактора TBK1 (TRAF-family binding kinase 1), а затем IRF3 (interferon responsive factor 3), приводящая к последовательной индукции экспрессии генов – сначала IFN- β , а потом IFN- α , необходимых для развития противовирусного ответа. Кроме того, идентифицированы и другие адаптерные молекулы, абсолютно необходимые для проведения сигнала от определенных TLR (Le Bon A., Tough D., 2002).

Таким образом, активация различных сигнальных путей после взаимодействия ПАМП с TLR приводит к индукции экспрессии различных сочетаний генов и, соответственно, различиям в развитии защитных реакций. Во всяком случае в настоящее время описано два принципиально различающихся сигнальных пути: 1) активация раннего провоспалительного ответа с участием TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 и внутриклеточных молекул MyD88, IRAK, TRAF6, NF- κ B; 2) активация противовирусного ответа и позднего провоспалительного ответа с участием TLR3, TLR4 и внутриклеточных молекул TRAM, TRIF, TBK1, IRF3, а также RIP1 (receptor interaction protein). Для TLR3 логично развитие именно этого пути активации, так как данный рецептор взаимодействует с вирусной двухспиральной RNA. В то же время TLR4 является уникальным рецептором,

одинаково эффективно участвующим в реализации обоих путей клеточной активации, что объясняет, почему именно LPS (специфический лиганд к TLR4) является таким мощным провоспалительным медиатором, вызывающим чаще других ПАМП развитие системной воспалительной реакции и септического шока

Проведение активационного сигнала от разных TLR, так же, как и связывание ПАМП, может быть специфическим или, во всяком случае, имеет свои особенности приводящие к развитию разных вариантов защитных реакций. Следовательно распознавание ПАМП любых разновидностей патогенов приводит, по крайней мере, к двум принципиально важным типам реакций врожденного иммунитета: антибактериальной защите с развитием воспалительной реакции в тканях и к противовирусному ответу, где воспаление дополняется синтезом IFN I типа – основного противовирусного медиатора врожденного иммунитета (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

Развитие воспаления обеспечивается синтезом комплекса провоспалительных и других цитокинов, стимулирующих большинство дальнейших событий в развитии воспалительной реакции и активации различных типов клеток, участвующих в поддержании и регуляции воспаления, включая все типы лейкоцитов, дендритные клетки, Т- и В- лимфоциты, НК-клетки, эндотелиальные и эпителиальные клетки, фибробласты и др. Главные защитные механизмы, развивающиеся в результате клеточной активации через TLR, представлены в таблице 2 (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

Функции клеток, активируемые в результате взаимодействия ПАМП с TLR

Функции клеток	Роль в защитных реакциях
Индукция синтеза провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-18 и TNF	Активация местного воспаления и системного острофазового ответа
Индукция синтеза интерферонов 1-ого типа	Противовирусная защита
Индукция синтеза и экспрессии рецепторов IL-8 и других хемокинов	Привлечение различных типов клеток в очаг воспаления и миграция в лимфоидные органы
Активация NO-синтазы	Уничтожение патогенов
Синтез свободных форм кислорода	Уничтожение патогенов
Активация циклооксигеназы и липооксигеназы	Синтез низкомолекулярных медиаторов воспаления (простагландинов и лейкотриенов)
Индукция синтеза цитокинов семейства IL-12	Дифференцировка Т-лимфоцитов
Индукция дифференцировки дендритных клеток	Усиление представления антигенов и индукция дифференцировки Т-лимфоцитов
Индукция экспрессии антигенов гистосовместимости и костимуляторных молекул CD-40, CD-80/CD-86	Усиление представления антигенов и индукция дифференцировки Т-лимфоцитов

Таким образом, Toll-подобные рецепторы отвечают за распознавание антигена, активацию антиген-презентирующих клеток, синтез медиаторов воспаления и в развитие иммунологического ответа. В настоящее время активно ведется разработка лекарственных средств и субстанций, являющихся агонистами и антагонистами различных рецепторов TLR, для лечения воспаления с вирусной, бактериальной, аллергической этиологией, таких как грипп, вирусный гепатит, сепсис, артрит, аллергический ринит, астма и другие (Connolly D., O'Neill L., 2012).

1.1.2 Роль внутриклеточных MAP-киназ в развитии воспаления

Синтез провоспалительных цитокинов инициируется внутриклеточным сигналингом, одним из звеньев которого являются MAP-киназы p38 и ERK1/2. MAP-киназы (МАРК) являются серин/треониновыми киназами, чья функция и регуляция сохранилась в процессе эволюции от одноклеточных организмов, таких как пивные дрожжи до высшего существа - человека. МАРК – регуляторные белки, они находятся в цепи передачи активационного сигнала, вызванного разнообразными внеклеточными стимулами (ростовыми факторами, медиаторами

воспаления, бактериальными агентами, УФ и другими стрессами окружающей среды).

Каждая молекула активируется по определенному пути и передает сигналы независимо или координировано. По данным многочисленных исследований MAP-киназы p38 и ERK1/2 играют одну из ключевых ролей в развитии воспаления (Рисунок 2) (Huang G. et al., 2009). Во-первых, они фосфорилируют и, таким образом, активируют многие факторы транскрипции, в числе которых ядерный фактор kB (Kyriakis J., Avruch J., 2001; Saklatvala J., 2004), во-вторых, p38 и ERK1/2 обеспечивают посттранскрипционную регуляцию синтеза некоторых белков воспаления: повышают стабильность мРНК (IL-3, IL-6, IL-8, TNF α , циклоксигеназы-2 и c-fos) и регулируют ее транспорт из ядра в цитоплазму (TNF α) (Dumitru C., 2000; Caput D. et al., 1986; Ming X. et al., 1998; Winzen et al., 1999).

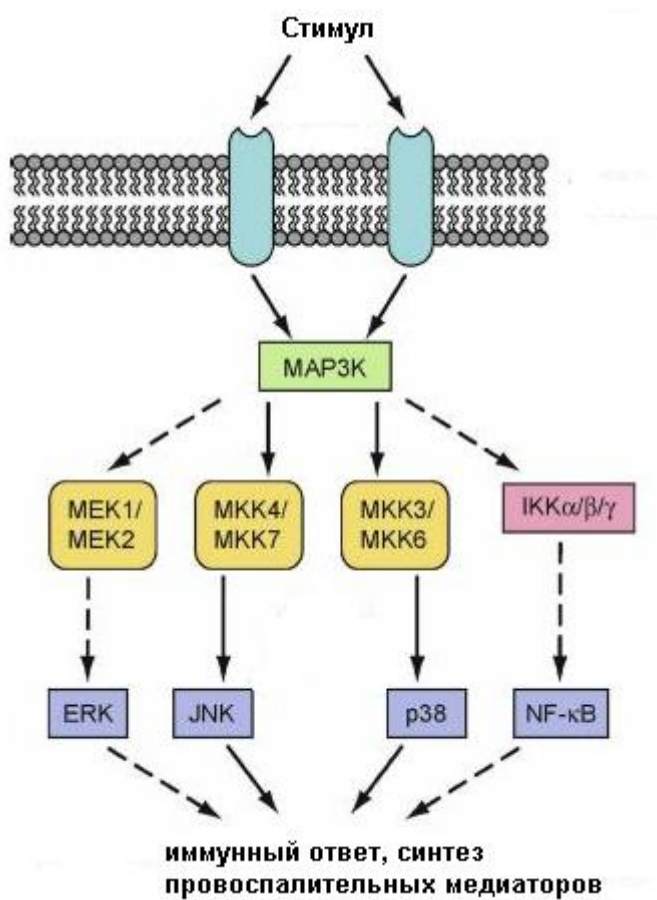


Рисунок 2 – Организация MAP-киназного каскада при иммунологическом ответе

Передача сигнала через MAP-киназный каскад происходит через различные рецепторы, участвующие в инициации и развитии воспаления, в том числе TLR, рецептор фактора некроза опухоли α (TNFR), рецептор IL-1, Т-клеточный рецептор (TCR) и др. (рисунок 3) (Huang G. et al., 2009).

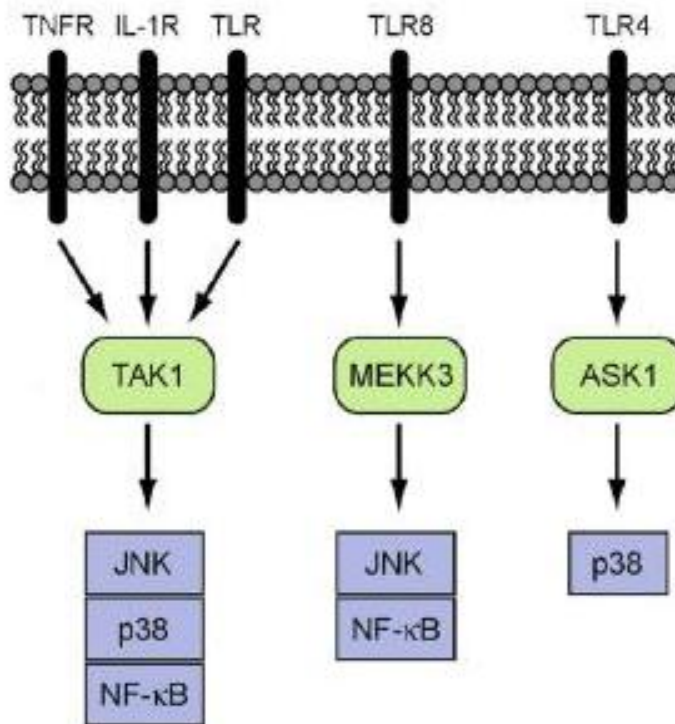


Рисунок 3 – Роль различных рецепторов при передаче внутриклеточного сигнала через MAP-киназный каскад

Специфические ингибиторы p38 и ERK1/2 показали выраженное терапевтическое действие на различных моделях воспаления у животных. SB203580, SB 220025, R-130823 и FR167653 эффективно предотвращали развитие коллаген-индуцированного артрита у мышей (Gum R., 1998; Jackson J., 1998; Wada Y., 2005; Nishikawa M., 2003). SB242235 подавлял развитие адьювант-индуцированного артрита у крыс (Badger A. et al., 2000). Помимо этого использование ингибиторов MAP-киназы p38 (в частности, SB 203580) блокировало ЛПС-индуцированную продукцию TNF α у мышей и крыс и снижало ЛПС-индуцированную смертность у мышей (Badger A. et al., 1996).

На модели экспериментально-индуцированного колита у мышей Hollenbach et al показали, что SB203580 улучшает клинические симптомы, ингибирует

патологические изменения тканей и снижает в них уровень мРНК провоспалительных цитокинов (Hollenbach E. et al., 2004). Ингибитор p38/JNK CNI-1493 вызвал улучшение клинической картины и оказал терапевтическое действие на слизистую оболочку пациентов, страдающих болезнью Крона (Hommes D. et al., 2002).

Таким образом, MAP-киназы непосредственно участвуют в процессах воспаления и представляют собой привлекательные мишени для поиска кандидатов в лекарственные средства.

1.1.3 Роль тучных клеток, гистамина и гистаминовых рецепторов в инициации и развитии воспаления

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что тучные клетки играют важнейшую роль при воспалительных заболеваниях (Theoharides T., 2004), таких как артрит (Woolley D., 2003), атопический дерматит и псориаз (Harvima I. et al., 1993; Ozdamar S. et al., 1996), рассеянный склероз (Theoharides T. 1990) и др. На рисунке 4 схематично продемонстрирована степень вовлеченности тучных клеток при различных заболеваниях (Theoharides T., 2012).



Рисунок 4 – Вовлеченность тучных клеток в развитии различных заболеваний

В отличие от аллергических реакций, тучные клетки слабо дегранулируют во время воспалительного процесса. Вовлечение тучных клеток при воспалительных заболеваниях возможно только в случае их активации и селективной секреции медиаторов (Theoharides T. et al., 2007).

При активации тучные клетки секретируют множество вазоактивных и провоспалительных медиаторов (Dvorak A., 1997; Serafin W., Austen K., 1987, Schwartz L. 1987, Holgate S., 2000), которые включают в себя гистамин, серотонин, кинины и протеазы, находящихся в секреторных гранулах. При активации фосфолипазы A2 происходит синтез из арахидоновой кислоты и секреция простагландинов. В течение нескольких часов после стимуляции синтезируются цитокины (IL-1, 2, 5, 6, 8, 9, 13, and TNF α) и эндотелиальный ростовой фактор VEGF (Grutzkau A. et al., 1998).

Активаторами дегрануляции тучных клеток являются IgE и антиген, анафилотоксины, гормоны и нейропептиды (субстанция P, нейротензин, хемокинин), патоген-ассоциированные молекулярные паттерны микроорганизмов, включая ЛПС бактерий и вирусные компоненты, а также некоторые цитокины, включая IL-1, IL-9 и др. (Theoharides T., 2012).

Среди важнейших и наиболее изученных медиаторов является гистамин. Гистамин был впервые идентифицирован в качестве биологически активного вещества еще в начале 1900-х годов. Гистамин оказывает спектр биологического воздействия на многие физиологические и патологические процессы, в том числе с воспалительной этиологией (Thurmond R., 2008).

Гистамин (2-[имидазолил]этиламин) принадлежит к группе биогенных аминов и синтезируется из аминокислоты гистидина под действием L-гистидиндекарбоксилазы в присутствии пиридоксальфосфата. Он образуется в тучных клетках, базофилах, тромбоцитах, гистаминергических нейронах и энтерохромаффинных клетках, в которых содержится в гранулах и высвобождается при разрушении или стимуляции клетки (Белан Э., Гутов М., 2010).

Биологическое действие гистамина реализуется через 4 типа рецепторов – H1, H2, H3 и H4. Рецепторы гистамина принадлежат к группе рецепторов, 7 раз пересекающих клеточную мембрану и связывающих G-белок. В качестве вторичного посредника H1-гистаминовых рецепторов служат ионы Ca^{2+} (рисунок 5), H2-рецепторов cAMP. Недавно открытые H3 и H4-гистаминовые рецепторы проводят сигнал как через освобождение Ca^{2+} из депо, так и через синтез cAMP (MacGlashan D., 2003).

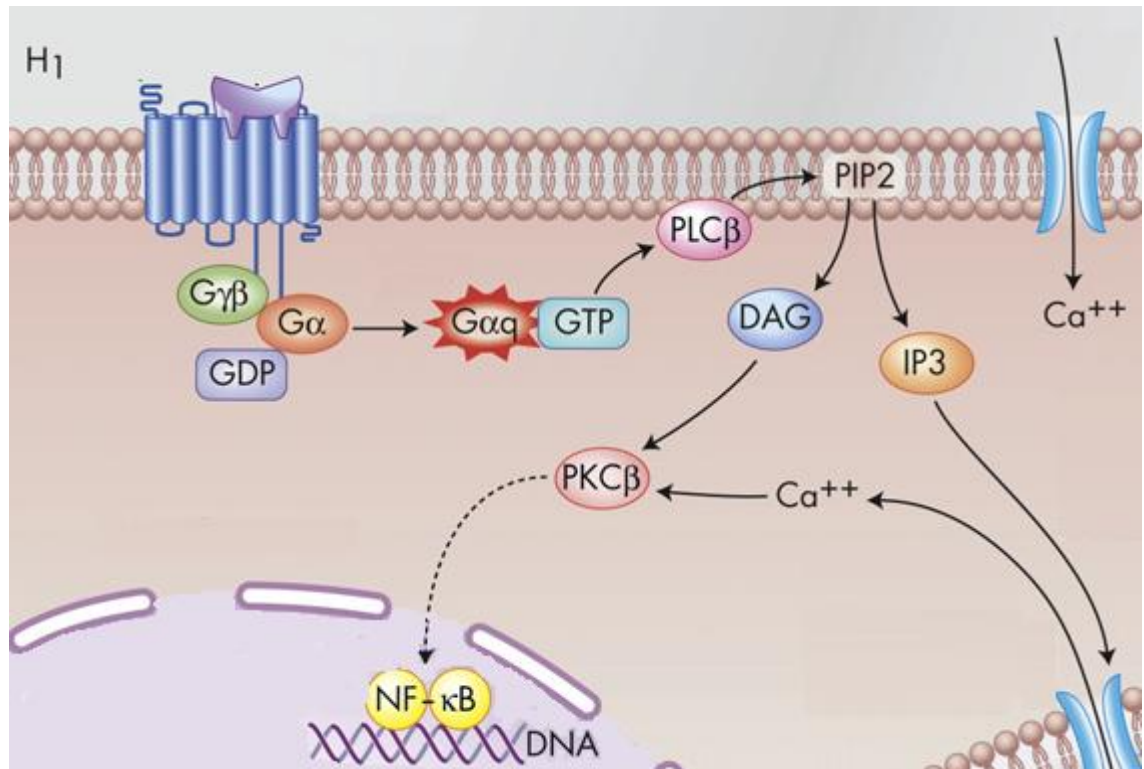


Рисунок 5 – проведение активационного сигнала через H1-гистаминовые рецепторы

Экспрессия гистаминовых рецепторов обнаруживается практически во всех иммунокомпетентных клетках, включая моноциты и макрофаги, лимфоциты, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки, эндотелиальные и эпителиальные клетки (Thurmond R., 2008).

В частности, 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 (Nijmeijer S. et al., 2010).

Имеющиеся к настоящему времени данные о роли гистамина в генезе различных заболеваний позволили успешно внедрить в клиническую практику целый ряд препаратов, влияющих на его синтез, высвобождение из тучных клеток, метаболизм и реализацию биологического эффекта (Белан Э., Гутов М., 2010). При этом существует две стратегии для завершения воспаления: ингибирование выброса гистамина из тучных клеток и блокада H1-гистаминовых рецепторов. При этом сочетание возможности обеих стратегий в одном препарате повышает его эффективность (Simons F., Simons K., 2011).

1.1.4 Роль эйкозаноидов в инициации и развитии воспаления.

Эйкозаноиды представляют собой целый класс липидных медиаторов, образующихся в процессе метаболизма арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота находится в составе фосфолипидов клеточной мембраны и отщепляется фосфолипазами (преимущественно фосфолипаза A2) в результате действия различных стимулов, включая формил пептид fMLP, IL-8, фактор активации тромбоцитов PAF, микроорганизмы, провоспалительные цитокины, неспецифические раздражители, такие как повреждение, травма и другие (Piper P., Vane J., 1971).

В цитозоле клетки арахидоновая кислота может метаболизироваться тремя основными путями до оксигенированных продуктов, в совокупности называемых эйкозаноиды, которые высвобождаются из клетки в наномолярных концентрациях и действуют по аутокринному/паракринному механизму на клетки-мишени. Это большое семейство включает в себя простагландины (PG) и тромбоксан (общее название простаноиды), образующиеся в результате действия циклооксигеназы (ЦОГ), лейкотриены и липоксины, образующиеся в результате действия липооксигеназы (ЛОГ) (Samuelsson B. et al., 1987; Serhan C. et al., 1984) и эпоксиэйкозатриеновые кислоты, образующиеся в результате действия ферментов цитохром P450 (Cardevila J. et al., 1990).

Циклооксигеназа является бифункциональным ферментом, который осуществляет комплекс свободнорадикальных реакций, действуя последовательно, как бисоксигеназа и пероксидаза. Первым этапом фермент катализирует реакции бисоксигенации и циклизации, преобразуя арахидоновую кислоту в первый метаболит PGG₂ (Pagels W. et al., 1983). После чего пероксидазный элемент фермента преобразует гидропероксид углерода в 15 положении и приводит к образованию промежуточной биологически неактивной формы PGH₂ (Stables M., Gilroy D., 2011; Hamberg M, Samuelsson B., 1973; Nugteren D., Hazelhof E., 1973) (Рисунок 6). Существуют две основные изоформы циклооксигеназы, участвующие в преобразовании арахидоновой кислоты – ЦОГ-1 и ЦОГ-2. ЦОГ-1 конститутивно экспрессируется в большинстве клеток и тканей, ЦОГ-2 индуцируется в ответ на воспалительные стимулы (Dubois R., 1998). Как известно, ЦОГ-1 – контролирует выработку ПГ, регулирующих целостность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, функцию тромбоцитов и почечный кровоток, а ЦОГ-2 – участвует в синтезе ПГ, задействованных при воспалении (Stables M., Gilroy D., 2011).

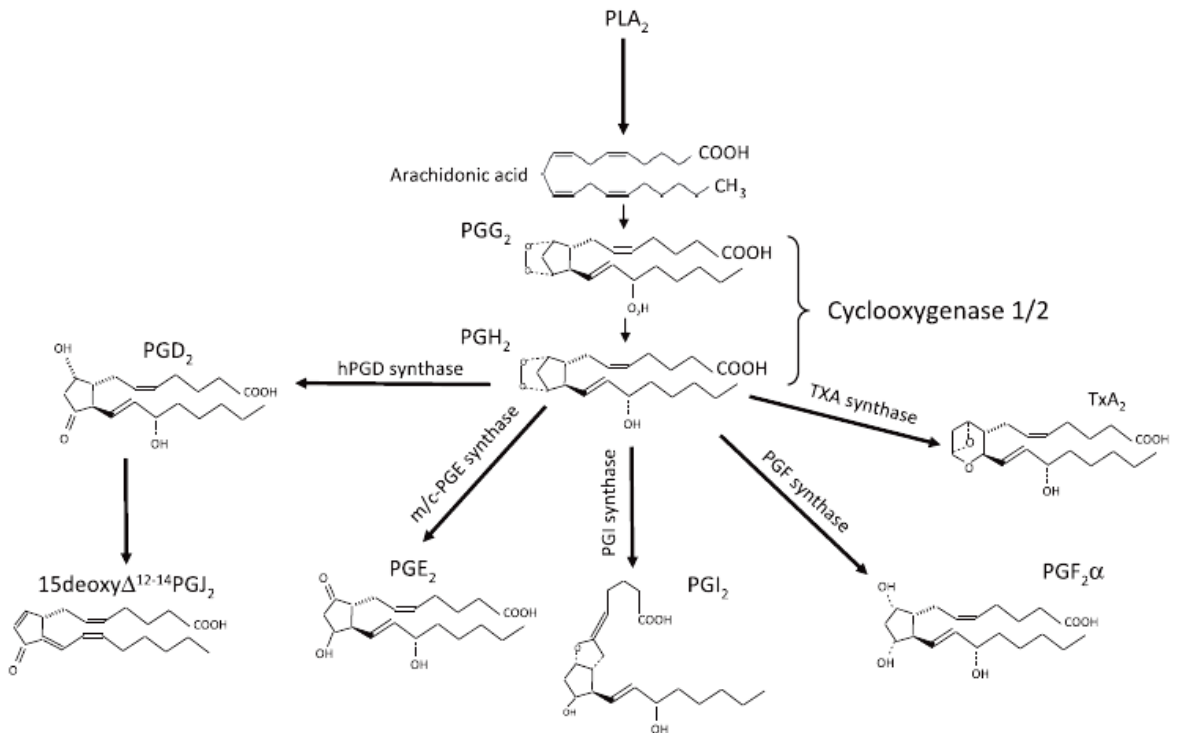


Рисунок 6 – Биосинтез простаноидов из арахидоновой кислоты

Дальнейшее формирование биологически активных простагландинов из PGH₂ происходит за счет действия синтаз. Эти синтазы включают в себя простагландин D-синтазу (PGD) (Shimizu T. et al., 1982), простагландин E-синтазу (PGE) (Tanaka Y., 1987), простагландин F синтазу (PGF) (Hayashi H. et al., 1989), простагландин I синтазу (PGI) (DeWitt D., Smith W., 1983) и тромбоксан A синтазу (TXA) (Ullrich V, Haurand M., 1983). Эти синтазы катализируют биосинтез PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂ (рисунок 6).

Различный уровень экспрессии этих синтаз в клетке определяет и синтетический профиль и функцию. Так, например, тучные клетки главным образом продуцируют PGD₂, в то время как макрофаги во время активации продуцируют PGE₂ (Bezugla Y. et al., 2006). Простаноиды оказывают свое биологическое действие путем связывания со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. На сегодняшний день известно не менее 9 различных рецепторов простаноидов – рецепторы простагландина D₂ DP1 и PD2, рецепторы простагландина E₂ EP1, EP2, EP3 и EP4; FP рецептор простагландина PGF_{2α} и TP рецептор для TXA₂. Все перечисленные рецепторы принадлежат к суперсемейству G-белок связанных рецепторов (GPCR). Рецепторы IP, DP1, EP2 и EP4 проводят сигнал через G_s субъединицу, что приводит к увеличению внутриклеточного cAMP, рецепторы EP3 проводят сигнал через G_i субъединицу, что приводит к уменьшению внутриклеточной cAMP. Рецепторы EP1, FP и TP взаимодействуют с G_q субъединицей и индуцируют мобилизацию кальция (Hirai H. et al., 2003; Monneret G. et al., 2001, Xue L. et al., 2005).

Простаноиды были впервые идентифицированы в середине 1930 годов как биологически активные молекулы в семенной жидкости человека (Euler U., 1936). На сегодняшний день ясно, что простаноиды синтезируются во многих тканях и клеточных типах, модулируют такие биологические процессы как сокращение гладкой мускулатуры (Eckenfels A., Vane J., 1972), проницаемость сосудов (Williams T., Jose P., 1979), гиперальгезию (Ferreira S. et al., 1978), боль (Feldberg W., 1971), а также агрегацию тромбоцитов (Moncada S., 1976).

Простагландины PGE_2 и PGI_2 преимущественно являются провоспалительными. Оба вызывают вазодилатацию сосудов (Moncada S., 1976), развитие отека за счет увеличения проницаемости сосудов вместе с гистамином и брадикином (Hata A., Breyer R., 2004). PGE_2 также известен как пиретический агент, найденный в спинномозговой жидкости у пациентов с вирусной и бактериальной инфекцией (Saxena P. et al., 1979).

Простаноиды также играют важную роль в поддержании сердечно-сосудистого гомеостаза, в защите от окислительного повреждения кардиомиоцитов (Smyth E. et al., 2009). Нормальный гомеостаз поддерживается прежде всего ЦОГ-1, при этом классические нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) ингибируют эту изоформу, в связи с чем терапия классическими НПВС увеличивает риск развитию сердечно-сосудистых заболеваний, включая инфаркт миокарда, тромбозы, инсульт, системную гипертензию и другие (Garcia Rodriguez L., 2008). Ниже в таблице 3 показаны основные физиологические эффекты простаноидов.

Физиологические эффекты простаноидов

Биологическое действие	Медиатор
Расслабление гладкой мускулатуры сосудов	PGE ₂ , PGF _{2α} , PGI ₂
Стимуляция агрегация тромбоцитов	TXA ₂
Ингибирование агрегации тромбоцитов	PGI ₂
Расслабление гладкой мускулатуры бронхов	PGE ₂ , PGI ₂
Констрикция гладкой мускулатуры бронхов	PGF _{2α}
Усиление тока крови почечной ткани	PGE ₂ , PGI ₂
Защита слизистой желудка	PGE ₂

Однако подавление нормальной физиологической функции простаноидов приводит к развитию побочных эффектов. Часто побочные эффекты классических нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) развиваются со стороны желудочно-кишечного тракта - гастропатии и желудочно-кишечные расстройства. Это связано с тормозящим действием НПВС на ЦОГ-1 в слизистой оболочке и снижением синтеза гастропротективных простагландинов (в частности PGE₂), что приводит к уменьшению секреции слизи, повышению кислотности желудочного содержимого и увеличению проницаемости клеточных мембран (Bertolini A. et al., 2001; Kumar K. et al., 2011). Ингибирование ЦОГ классическими НПВС сдвигает баланс в сторону биосинтеза лейкотриенов, что может приводить к сокращению гладкой мускулатуры и бронхоспазму (Charlier C., Michaux C., 2003; Gilroy D., 1998).

Арахидоновая кислота также метаболизируется тремя изформами ферментов липооксигеназ 5, 12 или 15-ЛОГ лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток, соответственно. Лейкоцитарная 5-ЛОГ отвечает за синтез медленно реагирующих медиаторов анафилаксии лейкотриенов LTC₄, LTD₄ и LTE₄ (Lewis R. et al., 1980) и LTB₄, мощного хемоаттрактанта полиморфоядерных лейкоцитов (рисунок 7) (Borgeat P., 1979; Smith M., 1979).

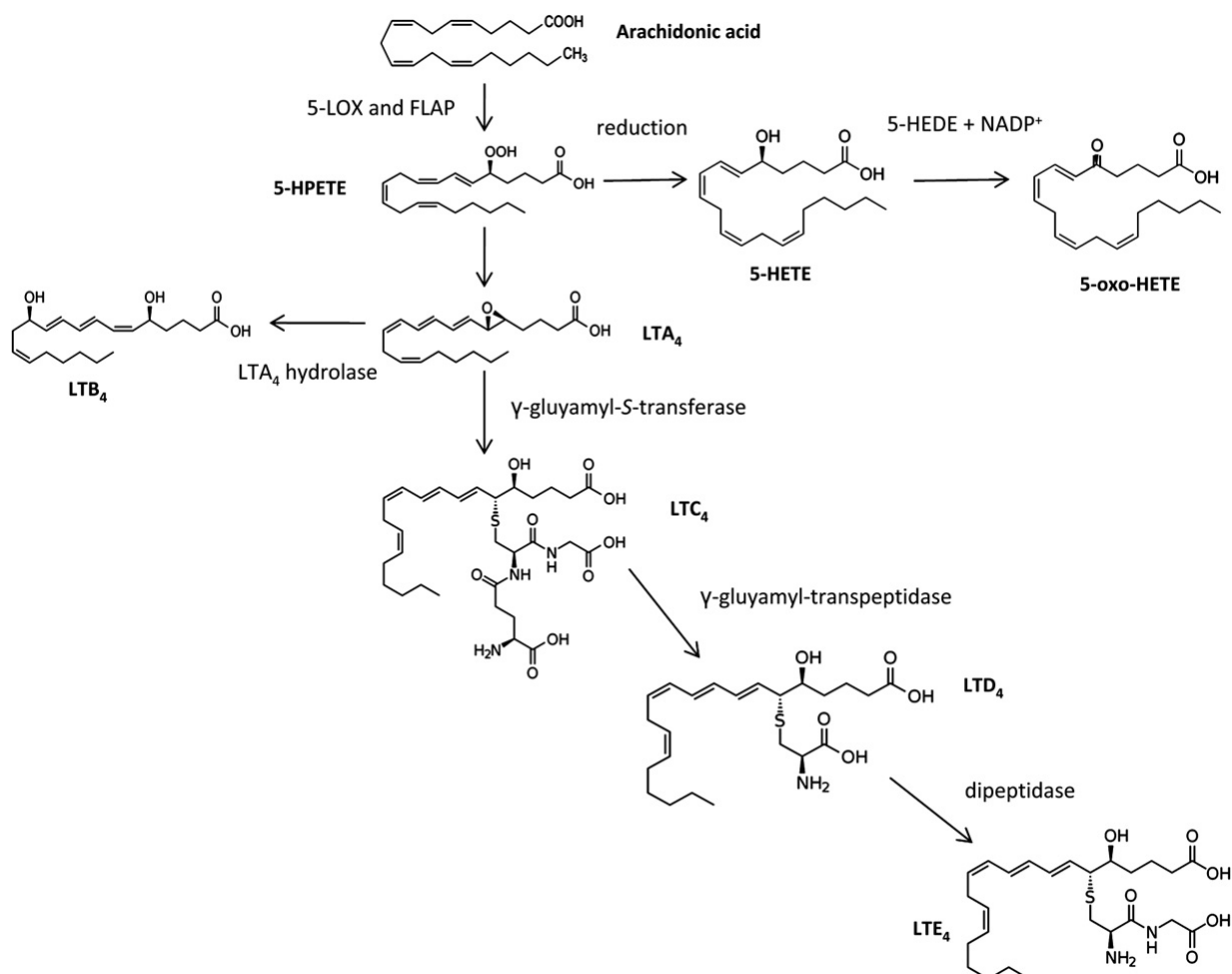


Рисунок 7 – Биосинтез лейкотриенов из арахидоновой кислоты

5-ЛОГ с помощью белка FLAP преобразует арахидоновую кислоту в гидропероксид путем присоединения молекулярного кислорода в пятом положении (Рисунок 7). Образовавшийся 5-гидропероксиэйкозатетраеновая кислота (5-HPETE) быстро редуцируется до 5-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (5-НЕТЕ). 5-HPETE переходит в нестабильный лейкотриен LTA₄. Под действием гидролазы LTA₄ переходит в LTB₄ (Funk С., 2001; Minami M. et al., 1987). С участием ферментов γ-глутамил-S-трансферазы и γ-глутамилтранспептидазы образуется так называемые цистиинил лейкотриены LTC₄, LTD₄ и LTE₄ (Lam V. et al., 1990; Leier I. et al., 1994).

Лейкотриены также как и простаноиды осуществляют свою биологическую роль путем взаимодействия со специфическими рецепторами, которых на данный момент описано четыре – рецепторы лейкотриена В4 изоформы 1 и 2 (BLT1 и BLT2), рецепторы к цистеинил лейкотриенам 1 и 2 (cysLT1 и cysLT2) (Kanaoka Y. Boyce J., 2004; Tager A. et al., 2003). Рецептор cysLT1 отвечает за развитие

бронхоспазма, секрецию слизи, аккумуляции жидкости в дыхательные пути во время анафилактической реакции (Lynch K. et al., 1999), рецептор cysLT2 отвечает за проницаемость сосудов, фиброз ткани в дыхательных путях легких (Beller T., 2004, Hui Y., 2004). При воспалении основная роль отдается рецептору BLT1, который с высокой афинностью способен связывать лейкотриен LTB₄ и отвечает прежде всего за хемотаксис лейкоцитов в зону воспаления.

В процессе острого воспаления лейкотриены играют центральную роль и синтезируются полиморфоядерными нейтрофилами, макрофагами и тучными клетками. В частности, лейкотриен B₄ привлекает и активирует нейтрофилы, моноциты и лимфоциты, а лейкотриен D₄ является главным хемоаттрактантом для эозинофилов. Цистеинил лейкотриены LTC₄, LTD₄ и LTE₄ прежде всего направлены на увеличение проницаемости сосудов и, как следствие, способствуют развитию отека ткани. Лейкотриены обязательно задействованы в развитии таких патологий как ревматоидный артрит, псориаз, аллергический ринит, бронхиальная астма, атеросклероз, остеоартрит и другие (Stables M., Gilroy D., 2011).

Учитывая важнейшую роль эйкозаноидов при воспалении одним из возможных молекулярных механизмов противовоспалительного действия может быть ингибирование ферментов ЦОГ и ЛОГ и снижение синтеза простагландинов и лейкотриенов, получаемых из арахидоновой кислоты (Holgate S. et al., 2003).

1.2 НОВЫЙ КЛАСС ЛИПИДНЫХ МЕДИАТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗРЕШЕНИИ ВОСПАЛЕНИЯ. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗРЕШЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ С ИХ УЧАСТИЕМ

1.2.1 Общие аспекты разрешения воспаления

Полная элиминация острого воспалительного процесса является идеальным результатом для сохранения ткани от чрезмерного повреждения и предотвращения развития хронического воспаления. Переход от инициации воспаления к его разрешению происходит, как на клеточном (например, инфильтрация нейтрофилов, апоптоз и последующее уничтожение макрофагами),

так и на молекулярном (от провоспалительных медиаторов к противовоспалительным) уровнях (Serhan C., Savill J., 2005).

Разрешение воспаления состоит из трех основных этапов: подавление провоспалительной сигнализации, апоптоз нейтрофилов и осуществление макрофагами фагоцитоза апоптотических нейтрофилов (эффероцитоз) с последующей миграцией через лимфатические узлы.

Начальный этап разрешения воспаления включает в себя подавление провоспалительных сигнальных каскадов и высвобождение эндогенных противовоспалительных медиаторов, включая интерлейкин IL-10, трансформирующий фактор роста- β (TGF β), протеолитических ферментов и липидных медиаторов. “Противовоспалительный состав” окружающей среды способствует апоптозу нейтрофилов, которые затем удаляются макрофагами. После фагоцитоза макрофаги начинают активно продуцировать высокие уровни противовоспалительных липидных медиаторов, после чего покидают сайт воспаления через ближайшие лимфатические узлы (Savill J., Fadok V., 2000; Van Nove C. et al., 2008; Vandivier R. et al., 2006). Накопленные данные свидетельствуют о том, что разрешение острого воспаления является скоординированным процессом, который жестко регулируется несколькими эндогенными противовоспалительными посредниками, включая липидные медиаторы липоксины и резолвины (Serhan C., 2007). Эти медиаторы блокируют дальнейший приток нейтрофилов, привлекают моноциты, нормализуют проницаемость сосудов, вызывают апоптоз остатков нейтрофилов и содействуют их дальнейшему фагоцитозу, контролируют отток макрофагов через лимфатические сосуды и облегчают удаление экссудата и фибрина из воспаленной ткани, что способствует нормальному гомеостазу (Serhan C., Chiang N., 2008).

Принято разделять противовоспалительные свойства медиаторов и их свойства к разрешению воспаления (в дальнейшем разрешающие свойства). В то время как сокращение притока нейтрофилов в сайт воспаления отражает противовоспалительное действие, увеличение притока моноцитов и макрофагов

связано с проявлением разрешающих свойств. Парадоксально, но усиление противовоспалительного действия может только продлить время к элиминации воспалительного процесса. Например, ингибиторы циклооксигеназ и липооксигеназ ингибируют выработку провоспалительных эйкозаноидов, в частности, классических простагландинов и лейкотриенов, но при этом они могут нарушать биосинтез медиаторов резолуции, включая резолвины и липоксины (Simopoulos A., 1999; Serhan C. et al., 2008).

1.2.2 Роль макрофагов в разрешении воспаления

Полиморфоядерные нейтрофилы являются основными эффекторными клетками острых воспалительных реакций, поэтому их удаление из сайта воспаления является необходимым условием для эффективного разрешения воспаления. На поздней фазе воспаления полиморфоядерные нейтрофилы спонтанно подвергаются апоптозу, что делает их “узнаваемыми” для макрофагов. Макрофаги являются ключевыми игроками в разрешении острого воспаления. Кроме фагоцитирования мертвых клеток и поглощения выделяемых ими продуктов, макрофаги также способствуют инициации апоптоза соседних нейтрофилов, выбрасывая в зону поражения “цитокины смерти”, например Fas лиганд. Фагоцитоз макрофагами апоптотических нейтрофилов имеет специальное определение - эффероцитоз. Эффероцитоз стимулирует макрофаги к продукции противовоспалительных медиаторов, таких как TGF- β 1, которые блокируют TLR-индуцированную провоспалительную сигнализацию. TGF- β 1 играет две существенные роли в разрешении воспаления - подавление воспаления, а другая - стимулирование восстановления тканей, секреция фактора роста эндотелия сосудов и коллагена (Voll R. et al., 1997; Golpon H. et al., 2004).

После эффероцитоза макрофаги начинают процесс ухода из воспаленных тканей до ближайших лимфатических сосудов и ткань возвращается в нормальное состояние. Если макрофаги не в состоянии мигрировать через лимфатические узлы, то они будут постоянно накапливаться в ткани, что является отличительной чертой хронического воспаления (Bellingan G. et al., 1996).

Таким образом, макрофаги играют ключевую роль как в инициации воспаления, так и в способствованию разрешения воспаления, заживлению ран и восстановлению поврежденных тканей. В соответствии с этим, существует концепция альтернативной активации макрофагов (Stein M. et al., 1992). В соответствии с ней макрофаги были разделены на два основных типа: классически активированные макрофаги (тип M1), которые способствуют воспалению и альтернативно активированные макрофаги (тип M2) с противовоспалительными и разрашающими свойствами. Макрофаги, которые присутствуют при резолуции острого воспаления, в основном поляризованные типа M2, экспрессируют скавенджер-рецепторы, маннозные и галактозные рецепторы, аргиназу-1 и др. (Martinez F. et al., 2009). Макрофаги типа M2 принимают участие в ключевых процессах резолуции воспаления, в его подавлении, в удалении “мусора” и апоптозных клеток, а также в стимуляции ангиогенеза (Lopez-Castejon G. et al., 2011).

“Переключатель” поляризации макрофагов в тип M2 находится под контролем секретируемых лимфоцитами Тхелпер-2 биологически активных веществ, таких как IL-4 и IL-13, IL-10, глюкокортикоидные гормоны, биологически активные липиды или фактор транскрипции PPAR γ . Функциональная поляризация макрофагов в M2 может быть одной из терапевтических стратегий для лечения воспалительных заболеваний (Tabas I., 2010; Odegaard J. et al., 2007).

1.3.3 Липидные медиаторы, участвующие в разрешении воспаления

Начало воспаления определяется в основном липидными медиаторами, получаемых из ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), особенно арахидоновой кислоты (АА), но разрешение воспаления преимущественно регулируется липидными медиаторами, полученных из ω -3 ПНЖК.

Важно отметить, что ω -6 и ω -3 ПНЖК являются конкурирующими субстратами для циклооксигеназы (ЦОГ) и липооксигеназы (ЛОГ). Так, для биосинтеза эйкозаноидов преимущественно используется арахидоновая кислота (ω -6), поскольку клеточные мембраны содержат в основном именно

арахидоновую кислоту (Schmitz G., Ecker J., 2008).

Простагландины и лейкотриены, образующиеся в самом начале воспалительного процесса, под действием ферментов ЦОГ и ЛОГ, опосредуют воспалительную реакцию, стимулируя расширение кровеносных сосудов и хемотаксис нейтрофилов в зону воспаления. Интересно, что эйкозаноиды могут одновременно выступать и в качестве противовоспалительных агентов. Так PGE₂, один из представителей провоспалительных простагландинов, модулирует начальную фазу воспаления, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов. С другой стороны, PGE₂ может также способствовать уменьшению продукции провоспалительных лейкотриенов 4-й серии через ингибирование 5-ЛОГ. При этом, происходит субстратная нагрузка другой изоформы фермента 15-ЛОГ, что способствует синтезу липидных медиаторов, участвующих в разрешении воспаления. Таким образом, сигнальные пути, ведущие к синтезу PGE₂, в свою очередь, способны модулировать работу фермента 15-ЛОГ, необходимого для генерации другого класса эйкозаноидов (липоксины), а также нового семейства липидных медиаторов (резолвинов), образующихся из ω -3 ПНЖК (Bagga D. et al., 2003, Levy B. et al., 2001).

Провоспалительные медиаторы образуются в течение нескольких секунд и минут от начала процесса острого воспаления, в то время как в более поздние сроки (от часов до дней), постепенно растет количество противовоспалительных посредников и медиаторов процесса разрешения. Это реципрокное изменение липидных посредников из провоспалительных эйкозаноидов в резолвины и липоксины, обладающих противовоспалительными свойствами, имеет решающее значение для завершения воспалительного процесса (Serhan C. et al., 2008).

В разрешении воспаления, различные серии противовоспалительных и липидных медиаторов синтезируются в зависимости от субстрата. Новые биоактивные липидные медиаторы, называемые резолвины, были найдены в воспалительном экссудате (Arita M. et al., 2005). Резолвины являются эндогенными липидными медиаторами, которые образуются из ω -3 ПНЖК, главным образом из эйкозапентаеновой кислоты (EPA) и докозапентаеновой

кислоты (DHA) (Lee H., Surh Y., 2012).

Они включают в себя резолвины E серии (RvE), полученные из EPA, и резолвины D-серии (RvD), нейропротектины/протектины, марезины и эпимеры, получаемые в результате ацетилирующего действия аспирина на ЦОГ-2. Дополнительная серия резолвинов D образуется только в присутствии аспирина - 17R-Резолвин D серии (Рисунок 8) (Lee H., Surh Y., 2012).

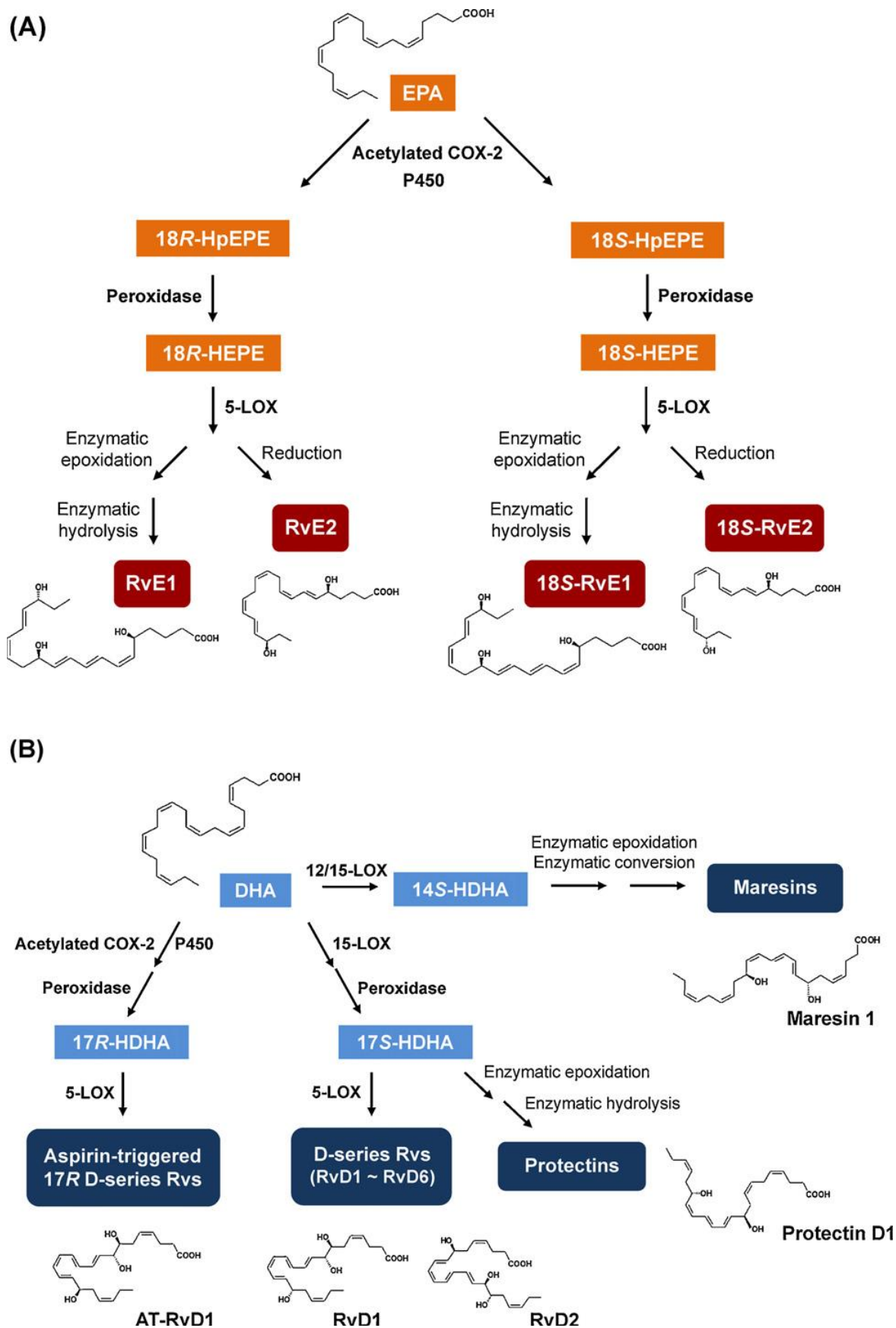


Рисунок 8 - Биосинтез липидных медиаторов, участвующих в разрешении воспаления (цит. по Lee H., Surh Y., 2012)

Резолвины E-серии подразделяют на две группы: 18R и 18S резолвины серии E. Оба синтезируются из EPA во время воспаления, когда эндотелиальные клетки взаимодействуют с лейкоцитами. В присутствии аспирина EPA может быть преобразована ферментативно в 18R и 18S гидроксизэйкозапентаеновые кислоты (или 18R-18S-HEPEs) ацетилированной ЦОГ-2 в эндотелиальных клетках. 18R и 18S-HEPEs высвобождаются лейкоцитами для последующего преобразования 5-ЛОГ в RvE1 и 18S-RvE1, соответственно (Arita M. et al., 2005; Oh S. et al., 2011). RvE2/18S-RvE2 структурно отличаются от RvE1/18S-RvE1 и идентифицированы как 5S,18(R/S)-дигидрокси-EPA (Tjonahen E. et al., 2006).

DHA является предшественником двух групп резолвинов, которые называются как 17S D-резолвины и 17R D-аспирин-опосредованные (AT-RVS). DHA могут быть преобразованы ЛОГ в 17S-гидрокси резолвины, известные как RvD1 в RvD6 (Рисунок 8). RvD1 биосинтез включает в себя последовательное оксигенирование 15-ЛОГ и 5-ЛОГ. В присутствии аспирина, DHA преобразуется в 17R-гидрокси-DHA (17R-HDHA) аспирин-ацетилированной ЦОГ-2, а затем 5-ЛОГ, в результате чего образуется AT-RvD1 (Sun Y. et al., 2007; Chiang N. et al., 2012; Hong S. et al., 2003).

В дополнение к резолвинам D-серии, DHA может быть преобразована в протектины путем ферментативного гидролиза и эпоксидирования. Представитель члена протектинов - протектин D1, известный как нейропротектин D1, генерируются в нервных тканях, отличается наличием сопряженной триен-содержащей структуры. Биосинтез протектинов происходит под действием 15-ЛОГ (Sun Y. et al., 2007; Hong S. et al., 2003).

Недавно было открыто новое семейство производных жирных кислот DHA, называемых марезинами (медиаторы макрофагов, участвующих в регуляции воспаления). Эти новые молекулы продуцируются макрофагами и действуют непосредственно на фагоциты (Serhan C. et al., 2009).

Накопленные данные демонстрируют, что резолвины и протектины обладают противовоспалительным действием и разрешающими свойствами. Среди резолвинов E-серии, биологические функции RvE1 освещены в литературе

наиболее подробно. При низких наномолярных концентрациях, RvE1 подавляет воспаление, блокируя трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов, провоспалительных сигнальных (например, NF- κ B активацию) и высвобождение провоспалительных цитокинов, включая TNF α , IL-1 и IL-6 (Gronert K. et al., 2004; Arita M. et al., 2007). Он также известен как мощный контррегулятор накопления супероксиданион радикала, тем самым предотвращая разрушение ткани в результате свободно-радикального окисления (Hasturk H. et al., 2006). В дополнение к этому противовоспалительному действию, RvE1 привлекает неактивированные моноциты и макрофаги, а также способствует фагоцитозу нейтрофилов макрофагами (Schwab J. et al., 2007). Кроме того, было обнаружено, что RvE1 способствует удалению хемокинов. RvE1 регулирует экспрессию рецептора хемокинов типа 5 (CCR5) во время апоптоза PMNs, увеличивает связывание этого рецептора с CCR5 хемокинами CCL3 и CCL5, участвующих в воспалении и аутоиммунных заболеваниях. Макрофаги, поглощают PMNs, на поверхности которых находятся хемокины (Ariel A. et al., 2006).

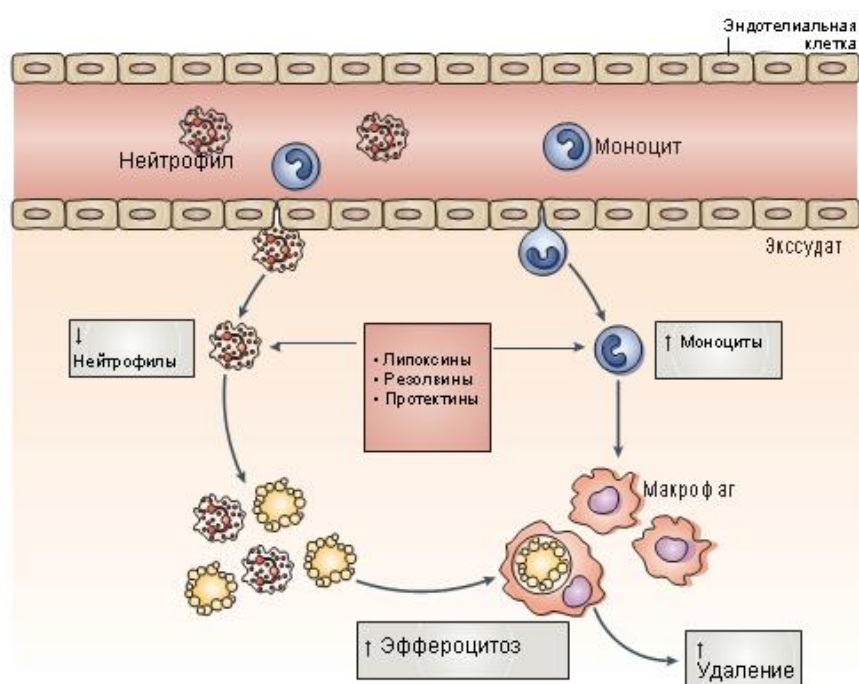


Рисунок 9 - Двойное действие липидных медиаторов в резолуции воспалительного процесса

Резолвины E серии, D серии и протектины также терминируют инфильтрацию нейтрофилов, ингибируют секрецию провоспалительных цитокинов и

провоцируют инфильтрацию моноцитов и фагоцитоз (рисунок 9). Это стереоселективное действие резолвинов изучалось в отношении многих экспериментальных моделей воспалительных заболеваний, включая перитонит, пародонтит, бронхиальную астму, колит, аллергические воспаления дыхательных путей, артриты, сухость глаз, воспалительные боли (таблица 4).

Таблица 4

Действие резолвинов, протектинов и марезинов при
различных моделях заболеваний

Медиаторы	Заболевание	Доказанные эффекты	Литературный источник
RvE1	Перитонит	Ограничение инфильтрации нейтрофилов	(Krishnamurthy V. et al., 2011)
		Снижение синтеза провоспалительных цитокинов	
		Усиление эффероцитоза	(Schif-Zuck S. et al., 2011)
		Стимуляция миграции макрофагов в лимфатические узлы	
	Периодонтит	Усиление фагоцитарной активности макрофагов	(Fredman G. et al., 2011)
		Ингибирование дифференцировки остеокластов	(Vassiliou E. et al., 2008)
		Уменьшение маркеров воспаления С-реактивного белка и IL-1 β	(Hasturk H. et al., 2007)
	Аллергическое воспаление дыхательных путей	Активация натуральных киллеров	(Haworth O. et al., 2011)
		Ингибирование развития аллергического воспаления	(Ishizuka T. et al., 2008)
	Глазная инфекция	Уменьшение ангиогенеза	(Rajasagi N. et al., 2011)
		Ингибирование синтеза провоспалительных цитокинов	
		Ингибирование хемотаксиса эозинофилов и лимфоцитов	(Aoki H. et al., 2010)
	Колит	Уменьшение синтеза провоспалительных цитокинов	(Campbell E. et al., 2010)
Пневмония	Уменьшение инфильтрации нейтрофилов	(Seki H. et al., 2010)	
RvE2	Перитонит	Ограничение полиморфоядерной инфильтрации	(Oh S. et al., 2012)
		Ослабление фагоцитарной активности макрофагов	
		Стимуляция продукции противовоспалительных цитокинов	
		Ингибирование продукции провоспалительных цитокинов	
RvE3	Перитонит	Ограничение инфильтрации нейтрофилов	(Isobe Y. et al., 2012)
RvD1	Перитонит	Ограничение инфильтрации нейтрофилов	(Norling L. et al., 2011)
RvD2	Сепсис	Усиление фагоцитарной активности макрофагов	(Spite M. et al., 2009)
		Ограничение инфильтрации нейтрофилов	
Протектин D1	Перитонит	Стимуляция миграции макрофагов через лимфатические узлы	(Ariel A., Serhan C., 2007)
		Ограничение инфильтрации нейтрофилов	
Марезин 1	Перитонит	Ограничение инфильтрации нейтрофилов	(Serhan C. et al., 2012)

Таким образом, воспаление может быть пролонгировано во времени из-за

недостаточного синтеза противовоспалительных медиаторов и медиаторов разрешения, постоянной стимуляции провоспалительных сигналов, отсутствия изменения фенотипа макрофагов и Т-клеточных популяций в сайте воспаления, а также при неконтролируемом проникновении миелоидных клеток-супрессоров (Nathan C., Ding A., 2010).

1.3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНИЦИАЦИИ И РАЗРЕШЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ

1.3.1 Модель каррагенинового воздушного мешочка у крыс

Модель формирования воздушного мешочка под кожей крысы *in vivo* широко используется для изучения острого воспаления. Воздушный мешочек формируется подкожной инъекцией воздуха во внутрикапсульную область спины крысы. Подкожная инъекция воздуха в область спины, за несколько дней приводит к морфологическим изменениям в клеточной выстилке мешочка. Мешочек состоит главным образом из макрофагов и фибробластов, хорошо васкуляризован, и имеет сходство с синовиальной сумкой (Taylor G., 2003).

Каррагенин представляет собой группу неразветвленных сульфатированных полисахаридов, молекулы которых построены из остатков производных D-галактопиранозы со строгим чередованием α -1,3- и β -1,4 связей между ними. Каррагенин получают из красных морских водорослей. Различия между отдельными представителями каррагенинов обусловлены тем, что в качестве 4-О-замещенного моносахаридного остатка может выступать не только D-галактоза, но и 3,6-ангидро-D-галактоза, при этом гидроксильные группы могут быть сульфатированы, изредка метилированы, а в качестве 3-О-замещенного остатка в молекуле иногда содержится 4,6-О-(1'-карбоксии) этилиденное производное D-галактозы (Tsuji R. et al., 2003).

Каррагенин взаимодействует с рецепторами TLR4 на поверхности макрофагов, выстилающих внутрикапсульную область мешочка, что вызывает их активацию и последующий синтез провоспалительных медиаторов (IL-1; IL-6; TNF α , IL-8, простагландинов и лейкотриенов, NO, активных форм кислорода) (Tsuji R. et al.,

2003).

Простагландины PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$ напрямую вызывают вазодилатацию сосудов. Вазодилатация способствует инфильтрации клеток и медиаторов воспаления и опосредуется в ответ на действие NO и некоторых простагландинов. NO образуется из L-аргинина вследствие активации NO-синтазы (NOS) (Рисунок 10) (Sherwood E., Toliver-Kinsky T., 2004).

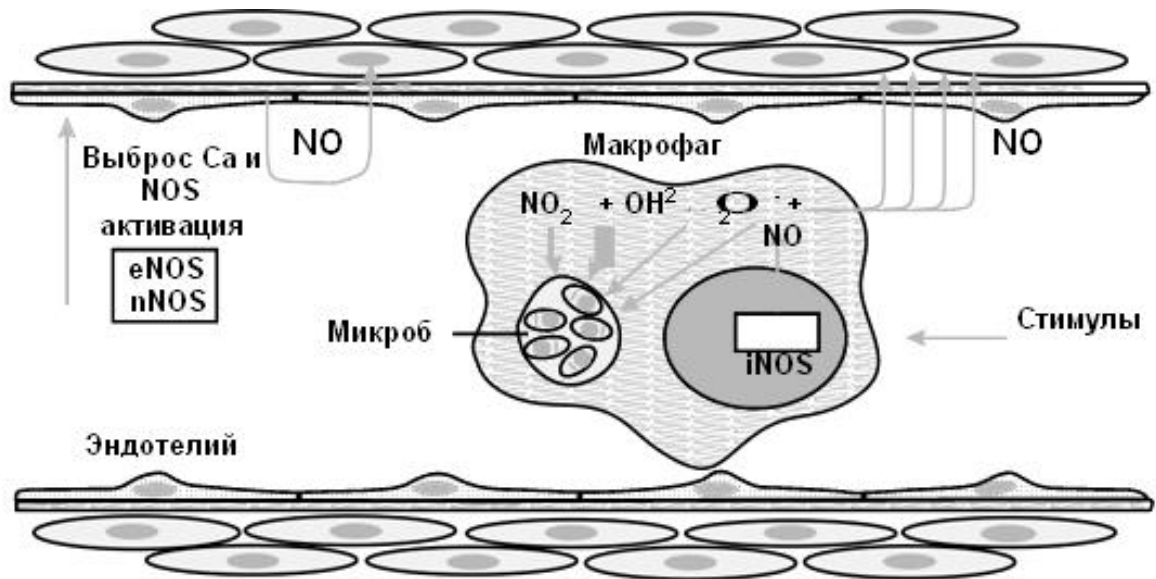


Рисунок 10 - Образование NO вследствие активации NO-синтазы

Другой признак воспалительного процесса, вызванного введением раствора каррагинена, это экссудация жидкости. Экссудат в мешочке образуется в результате накопления богатой белками жидкости во внутритканевое пространство под действием гистамина, брадикинина, лейкотриенов, компонентов комплемента, субстанции P и тромбоцит-активирующего фактора PAF. Все эти факторы заметно изменяют барьерную функцию малых кровеносных сосудов и увеличивают проницаемость капилляров и венул как для воды, так и для белков (Friedl H. et al. 1989; Denzlinger C. et al. 1985).

Вазодилатация и экссудация жидкости сопровождается миграцией лейкоцитов. Нейтрофилы первыми среди лейкоцитов мигрируют в зону воспаления. Процесс трансмиграции нейтрофилов можно разделить на несколько стадий: роллинг, адгезия, диапедез (трансмиграция) и хемотаксис (Sherwood E., Toliver-Kinsky T.,

2004) (Рисунок 11).

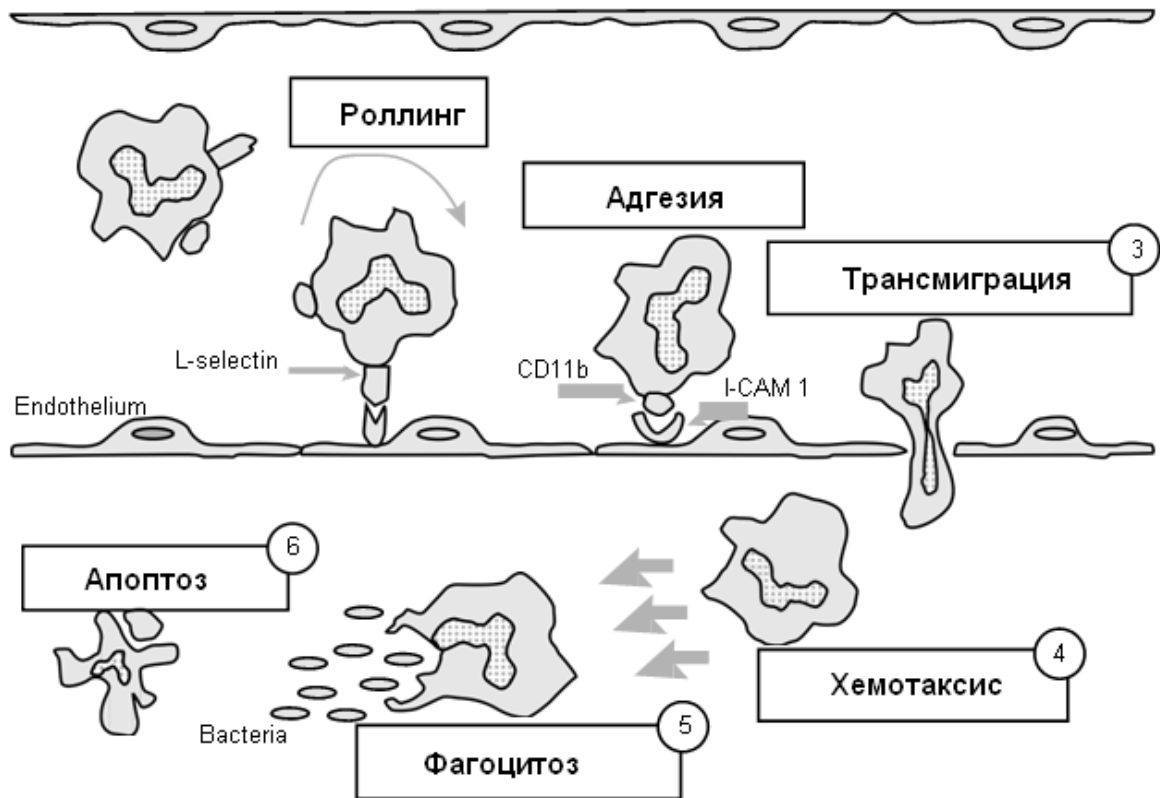


Рисунок 11 - Хемотаксис нейтрофилов через эндотелий сосудов

В результате через 6 часов после введения раствора каррагинина наблюдается резкое увеличение в экссудате лейкоцитов (до $10-20 \times 10^6$ кл/мл). Из них 80-90% составляют нейтрофилы. Значительно повышается уровень провоспалительных медиаторов, включая $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, лейкотриенов и простагландинов (Martin S. et al., 1994).

Таким образом, ограниченное воспаление в мешочке характеризуется инфильтрацией клеток в экссудат и образованием биохимических медиаторов. (Edwards J. et al., 1981). Модель широко используется для исследования процессов разрешения воспаления (Ariel A., Serhan C. 2007; Serhan C. et al. 2011).

1.3.2 Модель контактного дерматита у мышей

Контактный дерматит – это воспалительная кожная реакция, характеризующаяся повреждением кожи и эритемой, вызванными контактом кожи с аллергеном, в роли которого чаще всего выступает химическое вещество. Контактный дерматит возникает как минимум при двукратном контакте кожи с химическим аллергеном (стадии сенсibilизации и разрешения). По Gell and Coombs реакцию классифицируют как клеточно-опосредованный 4 тип (Gell P., Coombs R., 1975).

В отличие от других типов аллергических реакций, аллергические реакции замедленного типа являются не гуморальными, а клеточными реакциями. Эти реакции обусловлены взаимодействием сенсibilизированных Т-лимфоцитов с антигенами. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) обозначает группу аллергических реакций, развивающихся в сенсibilизированном организме через 24–48 часов после контакта с аллергеном. Процесс развития реакции гиперчувствительности принято разделять на две стадии – стадию сенсibilизации и стадию разрешения. При первичном контакте кожи с химическим аллергеном (стадия сенсibilизации) последний проникает в роговой слой эпидермиса, где контактирует с клетками Лангерганса (антиген-презентирующие клетки), образуя комплекс, который мигрирует в региональные лимфатические узлы, где в паракортикальной зоне происходит дифференцировка CD8⁺ и CD4⁺ популяции Т-лимфоцитов. Образуются клетки памяти (T_{ДТН}). T_{ДТН} пролиферируют и мигрируют из лимфатических узлов в кровь, где циркулируют между лимфатическими сосудами и дермальным слоем кожи (рисунок 12) (Marzulli F., Maibach H., 2008).

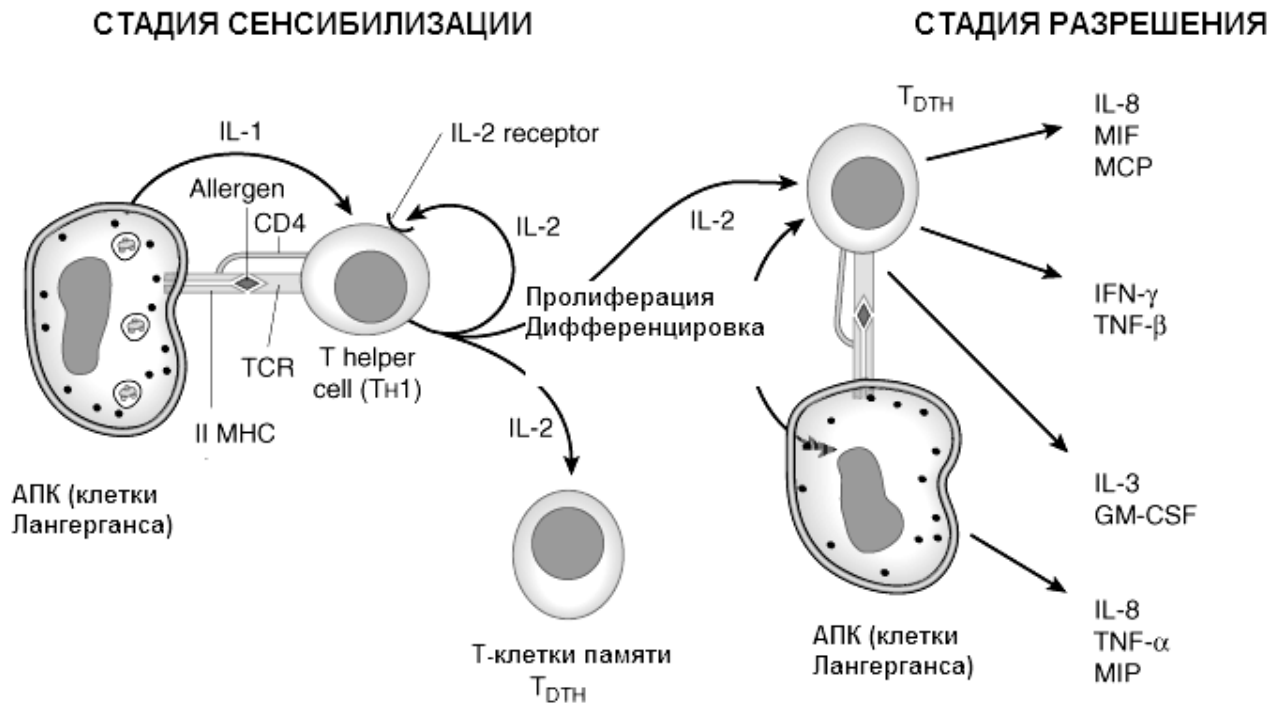


Рисунок 12 - Схема развития реакции ГЗТ (контактного дерматита)

Процесс распознавания химического аллергена схож с процессом узнавания естественных патогенов (грибов, бактерий и вирусов). Для разных химических аллергенов этот процесс может проходить либо прямо через взаимодействие с TLR рецепторами либо опосредовано. Например, Ni взаимодействует напрямую через TLR4 рецептор, а химический аллерген ДНХБ сначала способствует разрушению гиалуроновой кислоты. Процесс распознавания химического аллергена необходим как на стадии разрешения, так и сенсibilизации. На стадии сенсibilизации он приводит к презентации антигена Т-лимфоцитам, а на стадии разрешения к началу воспалительного патологического процесса (рисунок 13) (Martin S. et al., 2011).

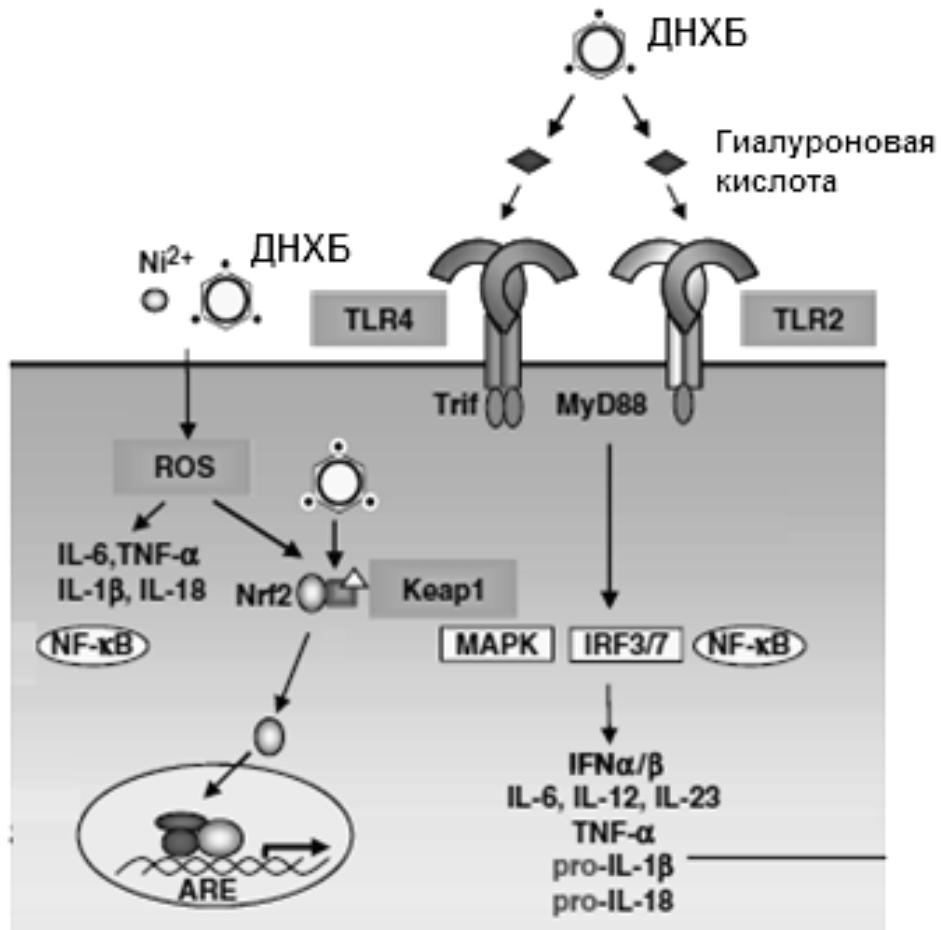


Рисунок 13 - Процесс распознавания химического аллергена и внутриклеточный сигналинг в клетках Лангерганса

При повторном контакте эпидермиса с химическим аллергеном (стадия разрешения) происходит активация Т-лимфоцитов и синтез провоспалительных медиаторов клетками эпидермального слоя кожи, что приводит к развитию воспалительной реакции в месте контакта (Marzulli F., Maibach H., 2008).

На следующем рисунке показана схема событий, происходящих в течении первых 4 часов после контакта с аллергеном (рисунок 14).

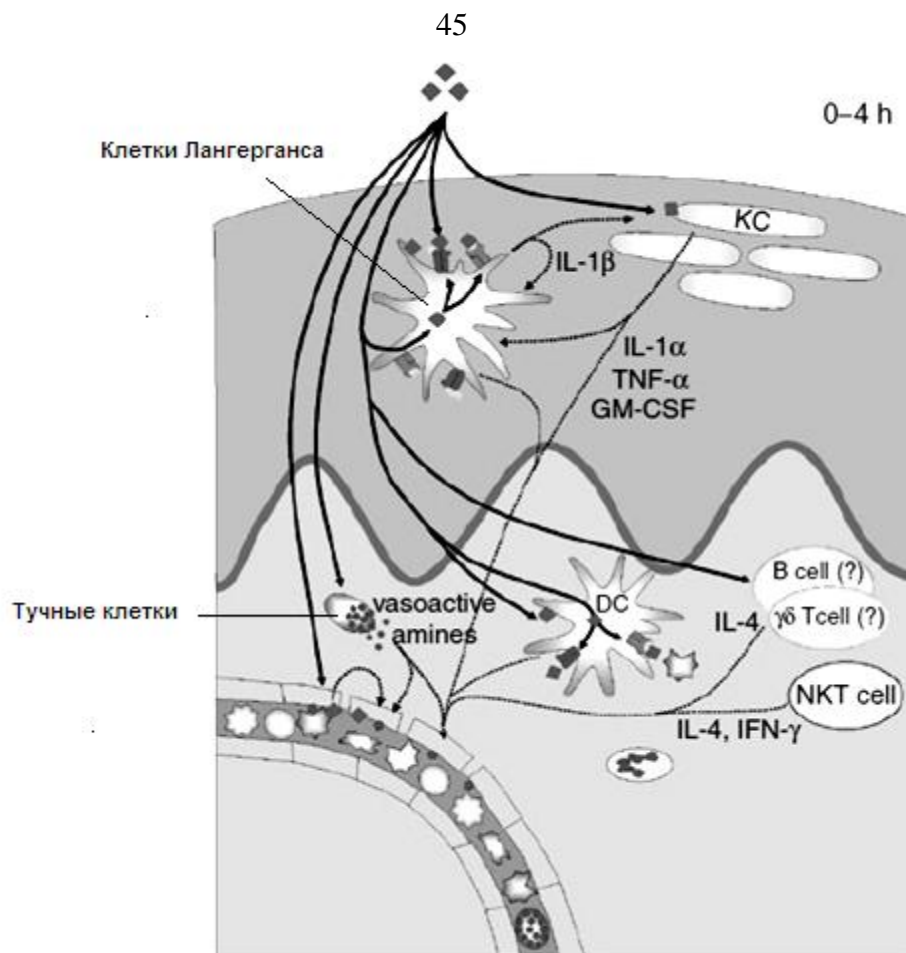


Рисунок 14 - Схема событий, происходящих в течение первых четырех часов после встречи с химическим аллергеном

Как видно из рисунка, в процесс инициации развития воспаления в коже задействованы разные типы клеток, включая кератиноциты (KC), клетки Лангерганса, дендритные клетки (макрофаги тканей), тучные клетки, В- и Т-лимфоциты, натуральные киллеры NKT cell). В первые часы происходит активный выброс медиаторов воспаления – vasoactive amines, продуктов арахидоновой кислоты, широкого спектра цитокинов, активных форм кислорода. Главной задачей этих медиаторов является подготовка окружения для элиминации аллергена за счет привлечения новых иммунокомпетентных клеток – моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов разных популяций.

На рисунке 15 описан процесс развития реакции в интервале от 12-48 часов. В этот промежуток времени воспаление достигает своего максимума, и характеризуется клеточной инфильтрацией и разрушением близлежащих тканей.

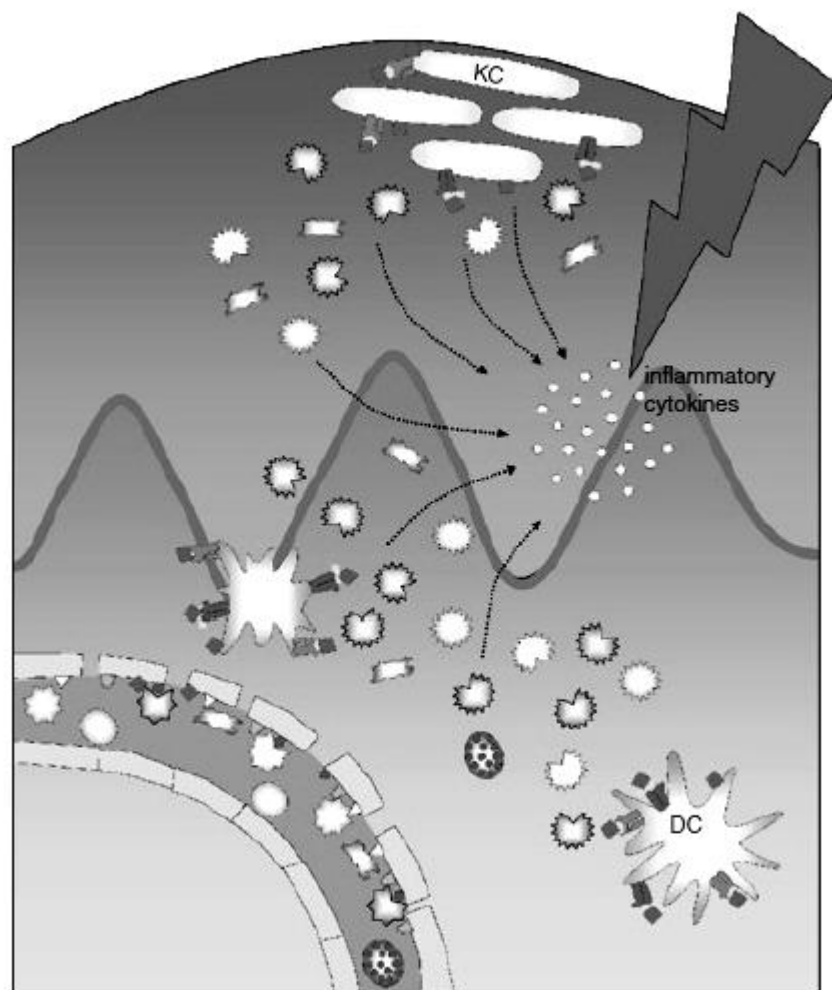


Рисунок 15 - Воспалительный процесс в период от 12-48 часов после разрешающей инъекции

За время от 48 - 120 часов после повторной встречи с аллергеном запускаются механизмы, приводящие к элиминации клеточного инфильтрата и устранению повреждений (Johansen J. et al., 2011).

Для фармакологических исследований используются разные модели аллергического контактного дерматита на мышах и морских свинках (Polak L. Rinck S., 1977; Zhang E. et al., 2009). Чаще всего контактный дерматит вызывают у мышей химическими аллергенами, такими как ДНХБ или ДНФБ. Существуют разные схемы сенсibilизации и разрешения. Классическим методом является однократное нанесение раствора ДНФБ или ДНХБ для сенсibilизации на выбритый участок спины или живота мышей и однократное нанесение

разрешающей дозы аллергена на дорсальную поверхность уха. Такая схема была использована в первом эксперименте.

Были рассмотрены разные схемы индукции контактного дерматита (Zhang E. et al., 2009). Максимально выраженные патологические изменения наблюдались при трехкратном воздействии 2% спиртового раствора ДНХБ на выбритый участок спины мышей (сенсibilизация на 0,7 и 13 день эксперимента) и двукратным нанесением с интервалом в 1 час на 17 день эксперимента разрешающей дозы аллергена на дорсальную поверхность уха (схема эксперимента была выбрана для второго исследования). При такой схеме наблюдается ярко выраженное воспаление. При этом, только при такой схеме, в организме животных вырабатываются специфические к ДНХБ IgE. Фактически второе нанесение ДНХБ, это уже стадия разрешения, которая приводит к воспалению на коже спины.

Наиболее широко используемыми показателями для оценки патологии и противовоспалительной активности являются разница веса пораженного (“опытного”) и контрольного (интактного) уха, толщина уха, гистологически выявленное воспаление, уровень IgE в сыворотке крови, уровни различных цитокинов в тканях уха (Daisuke H. et al., 2006).

Важно отметить, что модель контактного дерматита представляет собой воспалительный процесс кожи, при котором важную роль играют тучные клетки и гистамин.

1.4 ГИДРОБИОНТЫ КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ КАНДИДАТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Океан, покрывающий более 70% поверхности Земли, является домом для почти миллиона многоклеточных (растений и животных) и более одного миллиарда одноклеточных организмов (Burgess J., 2012). Морская среда обитания для многих организмов является высококонкурентной, в связи с чем они вынуждены продуцировать различные биоактивные химические соединения.

Миллионы лет развития и генетического разнообразия делают морских обитателей золотой жилой для поиска новых вторичных метаболитов. По ряду причин, а именно, недоступность среды их обитания и очень низкий выход биологически активных метаболитов, систематические исследования этих объектов несколько десятилетий назад не пользовались большой популярностью. Тем не менее, последние достижения в области подводных исследований, химии природных продуктов и их получения привели к существенному расширению поиска новых биомолекул из гидробионтов.

Биологически активные вещества (БАВ) морского происхождения могут использоваться в качестве фармацевтических субстанций и служить исходными соединениями (синтонами) для получения лекарств с новыми или улучшенными фармакологическими характеристиками. Эти вещества являются вторичными метаболитами, то есть природными соединениями, не имеющими всеобщего распространения и присутствующими только у представителей отдельных таксонов или даже одного вида (Стоник В.А., Толстиков Г.А., 2008).

О важности морских организмов и их метаболитов свидетельствует тот факт, что около 50% утвержденных FDA препаратов в течение 1981-2002 были созданы либо из морских метаболитов или из их синтетических аналогов. На рынке фармацевтических препаратов находятся ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), Ara-C (Цитарабин, противоопухолевая активность), Ara-A (противовирусная активность), Ziconotide (анальгетик), Trabectedin (противоопухолевая активность) и другие. Кроме того, еще несколько соединений, таких как бриостатин, дидегидродидемнин, ерибулин мезилат, доластатин, кахалалид F, KRN 7000, скваламин и другие находятся на разных стадиях клинических испытаний (Mayer A. et al., 2010).

Последние собранные статистические данные вплоть до начала 2008 года в области достижений в изучении метаболитов морских организмов выявили самые разнообразные биологические свойства (Mayer A. et al., 2011). На рисунке 16 представлена классификация веществ в зависимости от вида биологической активности .

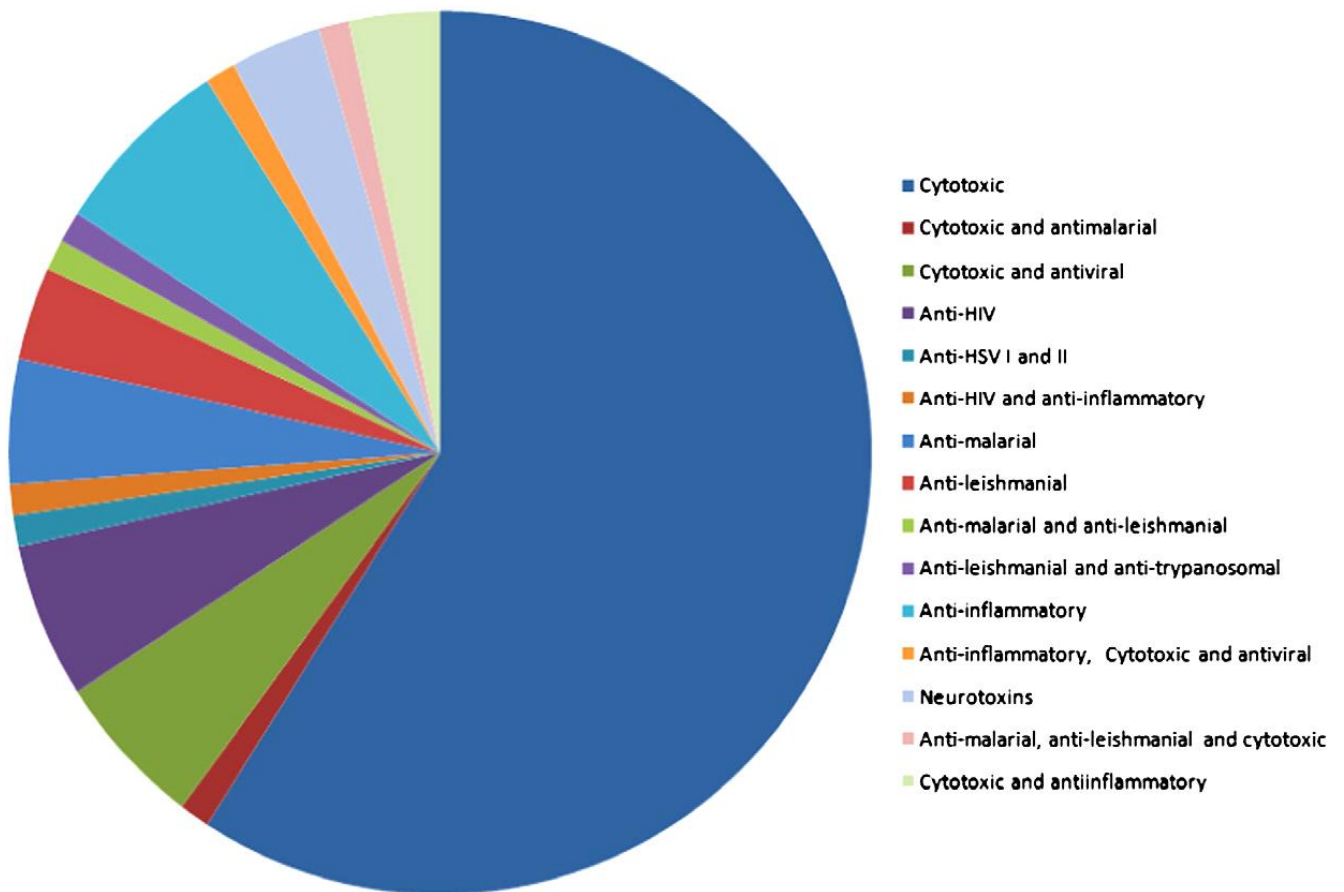


Рисунок 16 - Классификация веществ на основании их биологической активности
(цит. по Mayer A. et al., 2011)

Результаты исследований по выделению биологически активных веществ из гидробионтов, обитающих в различных водных ресурсах, показывают, что основными классами биологически активных соединений являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), полисахариды, витамины и минералы, антиоксиданты, ферменты и пептиды (Kobayashi M., Satari R. 1998; Kim S., Mendis E., 2006).

Представители рыб являются источниками незначительного числа вторичных метаболитов. Рыбные жиры, обогащенные ω -3 полиненасыщенными жирными кислотами (главным образом эйкозапентаеновой и докозагексаеновой), составляют основу биологически активных добавок к пище и лекарственных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, кожных болезней, заболеваний суставов и злокачественных новообразований. Заслуживают внимания и другие компоненты морских жиров, в

частности, алкилглицерины и этаноламиды жирных кислот (N-ацилэтаноламины). Первые представляют собой глицеролипиды с алкильной связью. Они встречаются в продуктах животного происхождения, но наиболее богаты ими морские рыбы и млекопитающие. Алкилглицерины могут найти применение при нарушениях жирового обмена и в качестве иммуномодуляторов. Морская ихтиофауна насчитывает примерно 500 видов токсичных рыб, среди которых наиболее известна рыба фугу и ее тетродотоксин. Токсины рыб рассматриваются как потенциальный источник высокоактивных соединений (Watters M., 2005). Новый класс соединений, скваламинов, полученных из акулы *Squalus acanthias*, обладает широким спектром антибиотической активности (Moore K. et al., 1993).

Филе, обрезки и хребет, получаемые в процессе филетирования рыбы, содержат значительное количество протеинов, которые характеризуются высокой питательной ценностью и хорошо сбалансированным аминокислотным составом (Venugopal V. et al., 1996). В результате ферментативного гидролиза филе, рыбных обрезков и скелета могут быть получены биологически активные пептиды с различными физико-химическими свойствами. Эти пептиды характеризуются такими фармакологическими эффектами как антигипертензивным, противотромботическим, иммуномодулирующим, антиоксидантным т.д. (Benkajul S., Morrissey M., 1997).

Кожа рыб является потенциальным источником выделения коллагена и желатина. Коллаген и желатин – уникальные протеины, схожие с мышечными протеинами рыб по аминокислотному составу, которые на 80% содержат такие неполярные аминокислоты, как: глицин, аланин, валин и пролин. Желатин – это продукт частичного гидролиза коллагена.

В медицинской и фармацевтической промышленности коллаген обычно используют в качестве носителя действующих веществ (Lee H. et al., 2001). Особенно микрофибриллы коллагена считаются перспективными носителями противораковых веществ. Коллаген может входить в состав систем доставки направленного действия, например, гена, стимулирующего образование кости и хряща (Sato H. et al., 1996). Клинические исследования приводят к

предположению, что прием внутрь гидролизатов коллагена/желатина уменьшают боль у пациентов, страдающих от остеоартритов; гидролизированный коллаген участвует в процессе синтеза хрящевого матрикса (Moskowitz R., 2000).

Желатин, выделенный в результате ферментативного гидролиза кожи рыбы, проявил даже несколько большую антиоксидантную и антигипертензивную активности, чем пептиды из протеиновых гидролизатов рыб. Пептиды, выделенные из желатина, характеризуются наличием в своей структуре повторяющейся последовательностью аминокислот глицин-пролин-аланин. Предположительно, обнаруженные активности пептидов желатина могут быть связаны с их уникальным аминокислотным составом (Kim S. et al., 2001).

В мировой практике имеется множество примеров обнаружения и выделения из печени водных организмов различных биологически активных веществ. Так, в печени и других органах японской камбалы *Paralichthys olivaceus* был обнаружен богатый цистеином пептид, проявляющий высокую антимикробную активность и получивший название гепсидин (Hirono I. et al., 2005). В печени атлантического лосося *Salmo salar* был выделен белок, обладающий антимикробным действием (Richards R., 2001).

Наиболее изученными пептидами из внутренних органов являются пептиды, выделенные из гидролизатов кишечника и печени рыбы бонито (тунец-бонито, скумбриевидный тунец). Последовательный двухступенчатый гидролиз печени тунца позволил установить, что выделенный экстракт оказывал значительный антиоксидантный эффект в отношении DPPH-радикала, OH-радикала, пероксид водорода, а также оказывал ингибирующее действие в отношении ангиотензин превращающего фермента (Je J. et al., 2009; Ahn C. et al., 2010).

Таким образом, морские организмы, в частности рыба и особенно печень различных рыб может служить источником большого количества, как низкомолекулярных веществ, так и целого набора высокомолекулярных соединений, которые можно применять для изготовления препаратов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.1 Способ получения

Липидный комплекс (ЛК) получали 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.*). Способ предусматривает использование для извлечения липидного комплекса из смеси растительного масла и воды и последующее отделение субстанции. В разработанной технологии не использовались вредные для здоровья вещества и термообработка, сохраняются ценнейшие свойства продуктов переработки печени рыб семейства тресковых.

2.1.2 Химический анализ субстанции

Методом ВЭЖХ-ELSD установлено, что ЛК содержит фосфолипиды, эфиры холестерина, холестерин, моноглицериды и др. вещества, при этом основным фосфолипидом является фосфатидилхолин, содержание которого составляет не менее 40 мг/г (4%). Таким образом, субстанция является производным глицерофосфолипидов.

Жирнокислотный состав был определен методом ГХ-МС и 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 фосфатидилэтаноламине 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%).

2.2 ЖИВОТНЫЕ

Мыши, крысы и морские свинки для исследований были получены из Российской академии медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово». Характеристика животных указана в таблицах 5-7.

Таблица 5.

Характеристика животных для проведения исследования на модели контактного дерматита у мышей

Вид животных:	Аутбредные мыши
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	18 - 20 г
Возраст животных:	3 – 4 месяца
Количество самцов:	70

Таблица 6.

Характеристика животных для проведения исследования на модели каррагенинового воздушного мешочка у крыс

Вид животных:	Крысы породы Wistar
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	250-300 г
Возраст животных:	3 – 4 месяца
Количество самцов:	112

Характеристика животных для проведения теста *ex vivo* с использованием
подвздошной кишки морской свинки (анализ взаимодействия с H1-
гистаминовыми рецепторами)

Вид животных:	Морские свинки
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	250 – 300 г
Возраст животных:	3 – 4 месяца
Количество самцов:	12

Лабораторные животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и ГОСТ Р 53434-2009.

Лабораторные мыши размещались в поликарбонатных клетках Charles River laboratories Inc тип 3Н, $S=1126,25 \text{ см}^2$, группами по 15 особей одного пола, на подстиле; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 75 см^2 (минимально допустимая площадь 150 см^2). Уборка клеток и смена подстила производилась минимум 2 раза в неделю.

В период акклиматизации и эксперимента лабораторные крысы были размещены в поликарбонатных клетках Charles River laboratories Inc тип 4Н, $S=1800 \text{ см}^2$, группами по 10 особей одного пола, на подстиле. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 180 см^2 (минимально допустимая площадь 150 см^2).

В период акклиматизации и эксперимента морские свинки были размещены в поликарбонатных клетках BENEX а.с. (Чешская республика) тип Т4А, $S=2194 \text{ см}^2$, группами по 5 особей одного пола, на подстиле; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Площадь пола в клетке

содержания для одного животного составила 438,8 см² (минимально допустимая площадь 150 см²).

Лабораторных животных кормили комбикормом «Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, приготовленным по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.

Лабораторные животные получали воду, соответствующую ГОСТу «Вода питьевая» 2874-82. Корм и вода довались *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки.

В качестве подстила использовали древесные гранулы (ООО «Биосфера», Санкт-Петербург, Россия).

Лабораторные животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (20-22°C и относительной влажности воздуха 60-70%). Световой режим составлял 12 часов света и 12 часов темноты. Воздухообмен в помещении контролировался с помощью анемометра и путем измерения содержания в воздухе углекислого газа и аммиака. Устанавливали режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ не более 0,15 объемных %, аммиака — не более 0,001 мг/л.

Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

Лабораторные животные до начала исследования содержались 14 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Лабораторные животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Перед началом исследования лабораторные животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы методом блочной рандомизации.

2.3 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 5-ЛОГ И ЦОГ-2 В УСЛОВИЯХ IN VITRO

2.3.1 Изучение влияния липидного комплекса на энзиматическую активность 5-ЛОГ

Исследование влияния субстанции ЛК на энзиматическую активность 5-ЛОГ проводили в конечных концентрациях 50; 25; 12,5; 6,75; 3,375 и 1,69 мкг/мл (растворитель диметилсульфоксид, ДМСО) с использованием набора Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, США) и очищенной 5-ЛОГ картофеля (Cayman Chemical, США). В качестве препарата сравнения использовали неселективный ингибитор 5-ЛОГ – NDGA (Nordihydroguaiaretic acid, Cayman Chemicals, США) в конечной концентрации 15 мкМ (IC₅₀ по данным производителя тест-системы Cayman Chemicals). В качестве отрицательного контроля использовали растворитель субстанции диметилсульфоксид.

С помощью тест-системы оценивали количество гидропероксидов, продуцируемых в реакции липооксигенации. Образцы исследовали в четырех повторностях. Реакцию проводили при комнатной температуре на орбитальном шейкере (Immochem 1100, США). Время инкубации неселективного ингибитора NDGA/ЛК с 5-ЛОГ (фермент) и линоленовой кислотой (субстрат) 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 % ингибирования фермента.

2.3.2 Анализ влияния липидного комплекса на энзиматическую активность ЦОГ-2

Исследование влияния субстанции 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 человеческую рекомбинантную ЦОГ-2. ЛК исследовали в

концентрациях 25, 20, 15, 10 и 1 мкг/мл. В качестве позитивного контроля для ЦОГ-2 использовали селективный ингибитор нифлумовую кислоту (Cayman Chemicals, США) в концентрации 0,1 мкМ. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель субстанции диметилсульфоксид. В ходе ферментативной реакции циклооксигеназы и арахидоновой кислоты формируется нестабильный продукт PGH_2 . С помощью иммуноферментного анализа определяли количество простагландина $F2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$), который образуется после редукции хлоридом олова ($SnCl_2$) нестабильного простагландина PGH_2 . Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США). После снятия оптической плотности вычисляли % ингибирования фермента.

2.4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ПРОДУКЦИЮ ГИСТАМИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Определение влияния ЛК на индуцированную продукцию гистамина проводилось в перевиваемой культуре клеток базофильной лейкемии крысы (RBL-1), полученной из Российской коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН. Клетки культивировали в среде MEM с двойным набором аминокислот (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия) и 80 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения).

Перед проведением исследования клетки линии RBL-1 осаждали на центрифуге при 270 g в течение 5 мин и ресуспендировали в среде MEM без сыворотки, доводя концентрацию клеток до 10^6 клеток/мл. Полученную суспензию вносили в 24-луночные культуральные планшеты по 900 мкл/лунка. В лунки вносили растворы (в объеме 50 мкл) субстанции ЛК и кетотифена в конечной концентрации 1, 2, 4, 16 мкг/мл и 16 мкг/мл, соответственно. В лунки контроля и интактных вносили среду MEM. Экспозиция клеток с субстанциями длилась 15 минут при 37°C и 5% CO_2 . Далее в культуру вносили индуктор

дегрануляции - раствор Compound 48/80 (Sigma, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл и выдерживали в тех же условиях в течение 60 минут.

По истечении указанного срока культуральную жидкость переносили в стерильные пробирки, клетки осаждали на центрифуге в течение 7 мин при 270 g и +5°C. Все манипуляции с культуральной жидкостью проводили на льду. 50 мкл надосадка переносили в стерильные пробирки и проводили ацилирование образцов. В ацилированных образцах определяли концентрацию гистамина методом твердофазного-иммуоферментного анализа (ИФА). Ацилирование и ИФА осуществляли с использованием набора Histamine ELISA (IBL International GmbH).

2.5 АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ MAP-КИНАЗ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Для изучения влияния ЛК на фосфорилирование внутриклеточных MAP-киназ использовали суспензионную клеточную линию моноцитов человека U937, полученную из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали, в соответствии в среде RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Москва), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Эмбриональная телячья сыворотка добавлялась в культуральную среду для создания физиологических условий, гентамицин – для предотвращения заражения микрофлорой. Для экспериментов использовали культуры, достигшие концентрации клеток около 3 млн/мл.

Перед опытом клетки, достигшие нужной концентрации, ресуспендировали в культуральной среде и, без дополнительного концентрирования центрифугированием, раскапывали в 12-луночные платы по 1 мл на лунку. ЛК в концентрации 10 мкг/мл вносили в культуру в объеме 50 мкл/лунка. Из препарата сравнения ловастатина (Tocris, США) готовили 20-кратный сток (80 мкг/мл) и добавляли в культуру клеток в том же объеме. С препаратами клетки

инкубировали 2 часа при 37 °C и атмосфере 5 % CO₂. По истечении указанного времени в культуру добавляли 20-кратный сток ЛПС (20 мкг/мл, эндотоксин из *Escherichia coli* серотипа 0111:B4; Fluka) в объеме 50 мкг/лунка и инкубировали 1 час при 37 °C и атмосфере 5 % CO₂.

После окончания инкубации клетки переносили в эппендорфы, помещали на лед и все дальнейшие процедуры проводили при 0 °C. Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 500g, 4 °C), ресуспендировали в 1 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS, 8 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7.4), повторно осаждали центрифугированием (5 мин, 500g, 4 °C), добавляли по 50 мкл лизирующего буфера (50 mM Трис-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Тритона X-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM ЭДТА, 1 mM PMSF, коктейль протеазных ингибиторов (Protease inhibitor cocktail, Sigma) в разведении 1:300 и выдерживали на льду в течение 10 мин. Затем клеточный лизат центрифугировали (10 мин, 16000g), к супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (буфер Лэммли: 300 mM Трис (pH 6.8), 10 % SDS, 25 % 2-меркаптоэтанола и 50 % глицерина) и кипятили при 100°C в течение 5 мин. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, используя овалбумин для построения калибровочной кривой (Bradford M., 1976).

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 диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) (Mauer H., 1971). Концентрирующий гель (pH 6,8) содержал 4% полиакриламида, разделяющий гель (pH 8,8) - 10 %. Полимеризацию гелей вызывали последовательным добавлением TEMED и 10% р-ра персульфата аммония.

Разделение белков проводили в блоках геля площадью 20x20x1,5 мм при силе тока 20 мА на пластину в течение 16-18 часов.

Разделённые в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad) в камере для "мокрого" переноса (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя. Электроперенос проводили при напряжении 100 В и силе тока не более 300 мА в течение 2,5 часов в буфере для "мокрого" переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037% SDS, 15% метанола). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma).

Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL (Western blotting protocols (Amersham), соблюдая указания производителя антител. Сразу после переноса мембрану промывали несколько раз буфером TTBS (20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20). Затем мембрану инкубировали в 5 % растворе сухого обезжиренного молока (Valio), приготовленного на буфере TTBS в течение 1 ч при комнатной температуре. По истечении указанного срока мембрану отмывали от остатков молока буфером TTBS (3 раза по 2-3 минуты) и добавляли раствор первичных антител в 1-3 % растворе BSA в TTBS. Все инкубации с первичными антителами против фосфорилированных MAP-киназ проводили при +4 0С в течение ночи. Все остальные процедуры осуществляли при комнатной температуре.

После инкубации с первичными антителами мембрану промывали TTBS (3 раза по 5 мин). Далее мембрану помещали на 1 ч в раствор вторичных антител в 5 % растворе молока в TTBS, после чего также промывали TTBS (3 раза по 5 мин). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции (ECL). Для этого нитроцеллюлозную мембрану промывали один раз водой (10-15 сек.) после чего инкубировали в растворе ECL в течение 1 мин и закладывали мембрану между двумя слоями полиэтиленовой пленки. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую плёнку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Оценку полученных результатов производили путем сканирования рентгеновской пленки на сканере Samsung SCX-4220 и последующего измерения

относительной плотности проявленных полос с использованием программного обеспечения Scion Image.

Полученное значение плотности полосы, характеризующей контрольную пробу, принимали за 100%, значения плотности остальных полос выражались в проценте от контроля.

2.6 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С TOLL-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

ЛК тестировали в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл. В качестве растворителя субстанции использовали 5% DMSO.

В качестве тест-системы для оценки взаимодействия с парами рецепторов TLR 1/2, 2/2, 2/6 были выбраны адгезионные клеточные линии HEK-Blue-hTLR2 (InvivoGen, США), полученные производителем трансфекцией плазмиды, кодирующей рецептор hTLR2. Клеточная линия HEK-Blue-hTLR2 также экспрессирует эндогенный высокий уровень рецепторов hTLR1 и hTLR6, которые работают в паре с hTLR2. Таким образом, клеточная линия hTLR2 позволяет исследовать взаимодействие с тремя парами рецепторов hTLR1/2, hTLR2/6, hTLR2/2.

В качестве тест-системы для оценки взаимодействия с hTLR4 были выбраны адгезионные клеточные линии HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5, полученные производителем трансфекцией плазмиды, кодирующей только один отдельный рецептор.

В клеточные линии также производителем трансфицирована плазида, несущая ген секретлируемого фермента эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP, embryonic alkaline phosphatase). Стимуляция соответствующего рецептора агонистом приводит к активации транскрипционных факторов NF- κ B и AP1 и последующей выработке фермента SEAP. Уровень стимуляции рецепторов детектируется по ферментативной цветной реакции после добавления реагента QUANTI-Blue (InvivoGen, США), содержащего субстрат для фермента SEAP.

Измеряли оптическую плотность на длине волны 630 нм (пурпурно-синяя окраска) с помощью планшетного спектрофотометра xMark (BioRad, США).

Адгезионные клетки HEK-Blue-hTLRs растили в среде DMEM с добавлением L-глутамина, 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, Англия), антибиотика предотвращающего заражение микоплазмой Normocin (100 мкг/мл, InvivoGen).

Для клеточной линии hTLR5, начиная со второго пассажа использовали селективирующие антибиотики Zeocin (100 мкг/мл) и Blastidin (30 мкг/мл) (InvivoGen). Для культивирования клеточных линий hTLR4 и 5, начиная со второго пассажа использовали коммерческий набор селективных антибиотиков HEK-Blue-Selection (200X, InvivoGen).

Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе (Shellab, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки растили во флаконах площадью 25 см² с вентилируемыми крышками (Nunc, Дания), добавляя по 5 мл культуральной среды на флакон. Клетки, достигшие монослойного состояния, пересевали каждые 2-3 дня. Для этого убирали кондиционную среду, клетки снимали со дна флакона тщательным пипетированием в 5 мл свежей ростовой среде. К полученной суспензии добавляли 1 мл культуральной среды и снова тщательно пипетировали. Определяли концентрацию клеток в суспензии и пересевали в новый флакон в концентрации 300-400 тыс. клеток/см².

Перед проведением эксперимента старая культуральная среда сливалась и добавлялось 5 мл новой среды Test Medium (TM), содержащей 10% FBS и 100 мкг/мл антибиотика Normocin (100 мкг/мл) и без добавления селективирующих антибиотиков. Подсчитывали количество клеток в камере Горяева и доводили концентрацию до 156 250 кл/мл TM (25000 клеток на лунку).

Стимуляцию рецепторов проводили специфическими агонистами производства InvivoGen в следующих рабочих концентрациях:

- 1) TLR1/2 – Pam3CSK (InvivoGen, США), 1 нг/мл
- 2) TLR2/2 – HKLM (InvivoGen, США), 10⁸ клеток/мл
- 3) TLR2/6 – FSL1 (InvivoGen, США), 1 нг/мл
- 4) TLR5 – Flagellin (InvivoGen, США), 1 нг/мл

5) TLR4 - LPS (InvivoGen, США), 10 нг/мл

Для нейтрализации рецепторов и определения специфичности стимуляции использовали соответствующие поликлональные антитела:

- 1) TLR1 Anti-hTLR1-IgG (InvivoGen, США) в концентрации 1 мкг/мл;
- 2) TLR2 Anti-hTLR2-IgA (InvivoGen, США) в концентрации 1 мкг/мл;
- 3) TLR6 Anti-hTLR6-IgG (InvivoGen, США) в концентрации 1 мкг/мл;
- 4) TLR4 Anti-hTLR4-IgA (InvivoGen, США) в концентрации 1 мкг/мл;
- 5) TLR5 Anti-hTLR5-IgA (InvivoGen, США) в концентрации 1 мкг/мл.

2.7 МЕТОД ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С Н1-ГИСТАМИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Изучение связывания ЛК Н1-гистаминовыми рецепторами проводили на фрагментах подвздошной кишки морских свинок (Matsumoto T. et al., 2009). Использовали взрослых самцов беспородных морских свинок массой 250-350 г (питомник лабораторных животных РАМН «Рапполово», Лен. область).

Экспериментальных животных наркотизировали ветеринарным препаратом «Золетил 100», извлекали подвздошную кишку и помещали в емкость с охлажденным до +4°C раствором Кребса-Хенселейта (КХС). Фрагменты кишки длиной около 1 см закрепляли металлическими крючками в проточных камерах установки для изолированных тканей и начинали перфузировать оксигенированным раствором КХС при температуре +30°C. Для получения стандартного натяжения во всех фрагментах создавали преднагрузку в 1 грамм.

После 60 минутной адаптации к условиям перфузии поток перфузата останавливали, и проточные камеры заполняли 80 mM KCl, который вызывал сильное сокращение сегментов кишки. Это позволяло оценить жизнеспособность фрагментов и их способность к сокращению. Полученные результаты в дальнейшем принимались за 100% сокращения. Затем снова возобновляли перфузию для отмывки тканей и восстановления их способности к сокращению. По прошествии 60 минут отмывки начинали перфузию исследуемым веществом.

Через 30 минут растворы сливали, а проточные камеры заполняли водным раствором гистамина (10^{-6} М). В течение 10 минут осуществляли регистрацию силы сокращения.

Во время всего опыта регистрировали кривую изометрической силы сокращения, учитывали амплитуду сокращения и время наступления максимального сокращения, используя программное обеспечение «PhysExp» (ООО «Кардиопротект», Россия)

2.8 ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ

2.8.1 Дизайн исследования

Всего в эксперименте было сформировано 7 групп по 10 животных в каждой. В качестве аллергена использовался 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 наносилось 100 мкл 2% раствора ДНХБ с целью сенсibilизации организма. На 18 день на правое «опытное» ухо животных наносилось 20 мкл 2% спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 час.

Исследуемое лекарственное средство, препарат сравнения и плацебо вводили по лечебной схеме, начиная с 8 по 20 день эксперимента внутримышечно один раз в сутки.

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

2.8.2 Тестируемые вещества и выбор доз

ЛК в форме 0,1% раствора для инъекций вводили внутримышечно в дозах 2, 4 и 8 мг/кг. В качестве препарата сравнения был выбран противогистаминный препарат из группы блокаторов H₁-рецепторов Супрастин (20 мг/мл

хлоропирамина гидрохлорид, EGIS PHARMACEUTICALS, Венгрия). Супрастин вводили внутримышечно в дозе 22 мг/кг, эквивалентной терапевтической для человека.

С интактной группой животных манипуляций не проводилось. У животных контрольной группы была вызвана патология, лечения и введения веществ не проводилось. Группе плацебо вводили растворитель исследуемого препарата (физиологической раствор, 0,9% NaCl).

2.8.3 Оценка степени отека пораженного уха

Для оценки степени отека после эвтаназии определялась масса «опытного» и «контрольного» уха. Вычислялся индекс реакции (ИР), который для каждого животного определяли по формуле:
$$\text{ИР} = \frac{M_{\text{оп}} - M_{\text{к}}}{M_{\text{к}}} \times 100\%$$
, где $M_{\text{оп}}$ и $M_{\text{к}}$ – масса «опытного» и «контрольного» уха, соответственно.

2.8.4 Гистологическая оценка повреждения уха

Гистологическая оценка включала в себя микроскопию пораженного уха у 5 животных из группы. Весь материал непосредственно после некропсии был фиксирован в достаточном количестве 10% нейтрального забуференного формалина не менее 24 часов, после чего материал проходил стандартную обработку в спиртах нарастающей концентрации, просветлен в хлороформе и залит в парафин. С парафиновых блоков были изготовлены срезы толщиной 4-6 мкм. Для микроскопического исследования срезы были окрашены гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа Zeiss AxioScope A1 (Carl Zeiss, Germany), микрофотографии были сделаны с помощью камеры AxioCam ICc1 (Carl Zeiss, Germany).

Микроскопическая 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.

Анализ для каждого исследованного животного был представлен в баллах, характеризующих патологические изменения по следующей шкале: 0 баллов - Отсутствие каких-либо патологических изменений в ткани; 1 балл - Патологический процесс представлен: слабо выраженной лейкоцитарно-плазмацитарной инфильтрацией эпидермального слоя, без вовлечения дермальных структур. 2 балла - Умеренная воспалительная инфильтрация, поражение эпидермиса с вовлечением поверхностного слоя дермы, намечающийся фиброз. 3 балла - Резко выраженная воспалительная инфильтрация с очаговым некрозом, с поражением эпидермиса, вовлечением дермы, без поражения хрящевой ткани. 4 балла - диффузная лейкоцитарно-плазмацитарная инфильтрация некроз с тенденцией к распространению и переходу на хрящевую ткань, с формированием деструктивного склероза. 5 баллов - некроз с вовлечением всех структур (эпидермиса, дермы, хряща), с формированием выраженных склеротических изменений.

Бальная система была использована впервые и разработана специально для оценки патологии контактного дерматита.

**2.9 МЕТОД АНАЛИЗА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ
ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ
“КАРРАГЕНИНОВЫЙ ВОЗДУШНЫЙ МЕШОЧЕК” У КРЫС**

Было сформировано 6 групп по 7 животных в каждой группе в соответствии с планом эксперимента (Таблица 8)

Таблица 8.

План исследования

Номер группы	Характеристика групп	Количество животных	Доза,
1	Интактные (введение п/к физ. раствора) + плацебо (5% ДМСО)	7	0
2	Контроль (введение п/к каррагинина без лечения) + плацебо (5% ДМСО)	7	0
3	Введение п/к каррагинина + Диклофенак р-р в объеме 1 мл	7	2 мг/кг
4	Введение п/к каррагинина + ЛК	7	0,04 мг/кг
5	Введение п/к каррагинина + ЛК	7	0,4 мг/кг
6	Введение п/к каррагинина + ЛК	7	4 мг/кг

За шесть дней до начала лечения крыс помещали в CO₂ камеру до достижения анестезии на 30 секунд. Стерильным шприцом объемом 20 мл, заполненным воздухом, вводил 20 мл воздуха подкожно во внутрикапсульную область спины крысы. Эта инъекция воздуха создает воздушный мешочек. Спустя 3 дня вводили 10 мл воздуха в то же место. Эта вторая инъекция составляет половину от первоначального объема воздуха и используется, чтобы поддержать целостность воздушного мешочка без увеличения раны.

На 6 день под CO₂ анестезией вызывали воспаление, вводя 5 мл 0,5 % раствора каррагинина (λ -Carrageenan, Sigma-Aldrich, USA) непосредственно в мешочек, используя шприц на 5 мл, 20 G.

Тестируемые объекты вводили сразу же после введения раствора каррагинина.

Липидный комплекс тестировали в трех различных дозах 4 мг/кг, 0,4 мкг/мл и 0,04 мкг/мл. Растворителем служил 5% ДМСО. ЛК в каждой концентрации вводили в одинаковом объеме 1 мл на каждое животное внутрь мешочка. В качестве плацебо служил раствор 5% ДМСО.

В качестве препарата сравнения использовали препарат Диклофенак в лекарственной форме раствор для инъекций 25 мг/мл (Неморфарм, Сербия). Диклофенак вводили внутрь мешочка сразу после инъекции раствора каррагинина. Терапевтическая доза для человека равна ≈ 2 мг/кг (исходя из максимальной дозы 150 мг на человека массой 70 кг). Поскольку препарат вводили внутрь мешочка, метаболический коэффициент при расчете дозы не учитывали. Для крысы массой 200 г доза была равна 2 мг/кг или 400 мкг на животное. Ампула диклофенака представляет собой раствор объемом 3 мл, содержащий 75 мг действующего вещества "диклофенак". 400 мкг на крысу соответствует ≈ 17 мкл раствора для инъекций. Поскольку вводимые объемы должны быть равными для всех вводимых веществ, 17 мкл раствора для инъекций был доведен до объема 1000 мкл физиологическим раствором.

Спустя 6 часов после инъекции, животное подвергалось эвтаназии ингаляцией CO₂. Для забора экссудата в воздушный мешочек каждой крысе вводили физиологический раствор по 10 мл, используя шприц 10 мл. Смешивали содержимое мешочка, мягко массируя область. Вскрывали воздушный мешочек сагиттальным разрезом поперек мешочка (5 см) и собирали весь объем экссудата в стерильную центрифужную пробирку на 15 мл.

Сразу после забора экссудат был исследован на клеточный состав при помощи ветеринарного гематологического анализатора ABACUS VET (Австрия).

Экссудат центрифугировали 10 мин при 300g. Отбирали 1 мл супернатанта и замораживали при -20°C до проведения анализа на содержание простагландина PGF_{2 α} . Анализ PGF_{2 α} проводился с помощью набора для количественного определения простагландина F_{2 α} методом иммуноферментного анализа Prostaglandin F_{2 α} EIA kit (Cayman Chemicals, USA).

2.10 МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ СТАТИСТИКИ

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 анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия был использован критерий Стьюдента для зависимых и независимых переменных.

В качестве непараметрических критериев – критерий Манна-Уитни. Различия были определены при 0.05 уровне значимости.

Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 5-ЛОГ

Исследование влияния ЛК на энзиматическую активность 5-липооксигеназы (5-ЛОГ) проводилось с использованием коммерческого набора Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) и очищенной 5-ЛОГ картофеля (Cayman Chemical, USA). В качестве препарата сравнения использовали неселективный ингибитор 5-ЛОГ – NDGA (Cayman Chemicals, USA) в концентрации 15 мкМ.

В ходе эксперимента, определяли скорость реакции образования гидропероксидов, продуцируемых в реакции липоксигенации, и вычисляли энзиматическую активность фермента 5-ЛОГ в исследуемых образцах. Вычисляли процент активности 5-ЛОГ в образцах, по сравнению с контролем (интактная 5-ЛОГ). Каждый образец исследовали в четырех параллелях.

Для проведения анализа образцы, в четырех параллелях каждой концентрации, смешивали в пропорциях, указанных в таблице 9.

Пропорции смешения образцов для исследования активности 5-ЛОГ

Проба	Реактивы, мкл				
	Реакционный буфер	5-ЛОГ	Ингибитор/исследуемый препарат	Линоленовая кислота	Хромоген
Бланк	100	-	-	10	100
Контроль	-	90	-	10	100
Неселективный ингибитор 5-ЛОГ NDGA, 15 мкМ	-	90	10	10	100
ЛК, 50 мкг/мл	-	90	10	10	100
ЛК, 25 мкг/мл	-	90	10	10	100
ЛК, 12,5 мкг/мл	-	90	10	10	100
ЛК 6,75 мкг/мл	-	90	10	10	100
ЛК 3,375 мкг/мл	-	90	10	10	100
ЛК 1,69 мкг/мл	-	90	10	10	100

Реакцию проводили при комнатной температуре на орбитальном шейкере в 4-х параллелях (повторностях). Время инкубации неселективного ингибитора NDGA/исследуемого препарата ЛК с 5-ЛОГ (фермент) и линоленовой кислотой (субстрат) составляло 10 минут. Энзиматический катализ останавливали внесением хромогена. Через 5 минут инкубации проводили измерение оптической плотности на длине волны 492 нм.

После снятия оптической плотности вычисляли следующие параметры:

1) Скорость реакции вычисляли по формуле:

$$A_{492}/\text{мин} (\text{ед. опт. плотности}/\text{мин}) = (A_{492_{\text{контроль}}} - A_{492_{\text{проба}}})/5 \text{ минут}$$

2) Активность фермента 5-ЛОГ вычисляли по формуле:

$$\text{Активность 5-ЛОГ (мкМоль}/\text{мин}/\text{мл}) = A_{492}/\text{мин} \times 0,21 \text{ мкл}/9,47 \text{ mM}^{-1} \times 0,09 \text{ мкл}$$

*Где 9,47 – коэффициент экстинкции определенный для данного исследования.

3) Процент ингибирования:

$$\% \text{ ингибирования} = (A_{492_{\text{контроль}}} - A_{492_{\text{проба}}}) * 100 / A_{492_{\text{контроль}}}$$

Из данных, приведенных в таблице 8 видно, что неселективный ингибитор 5-ЛОГ (NDGA) значительно снижал скорость реакции липооксигенации, по сравнению с контролем в 3,6 раза.

Из таблицы 10 видно, что изменение скорости реакции от концентрации ЛК носит дозозависимый характер.

Таблица 10.

Анализ влияния ЛК на скорость ферментативной реакции 5-ЛОГ в
ед.опт.плотности/мин

	A ₄₉₂ /мин – скорость реакции, определенная при длине волны 492 нм				Ср.знач ± ош.среднего
	1	2	3	4	
Контроль	0,0516	0,0532	0,046	0,0516	0,051 ± 0,002
Неселективный ингибитор 15-ЛОГ (NDGA), 15 мкМ	0,0152	0,0156	0,0122	0,0148	0,014 ± 0,001*
ЛК, 50 мкг/мл	0,023	0,0168	0,0132	0,0196	0,018 ± 0,002*
ЛК, 25 мкг/мл	0,0258	0,0184	0,0158	0,0214	0,020 ± 0,002*
ЛК, 12,5 мкг/мл	0,042	0,0292	0,0206	0,0262	0,030 ± 0,005*
ЛК, 6,75 мкг/мл	0,0472	0,0342	0,032	0,034	0,037 ± 0,003*
ЛК, 3,375 мкг/мл	0,0424	0,0462	0,0456	0,0474	0,045 ± 0,001*
ЛК, 1,69 мкг/мл	0,0534	0,0548	0,0506	0,0534	0,053 ± 0,001

Примечание - * - различие статистически значимо в сравнение с контролем, по критерию Стьюдента, при $p < 0,05$

В минимальной концентрации препарата 1,69 мкг/мл скорость реакции не отличалась от контроля. С увеличением концентрации скорость реакции падает и выходит на плато. В концентрациях 25 и 50 мкг/мл результаты сравнимы с данными, полученными для неселективного ингибитора NDGA в концентрации 15 мкМ. Для расчета также была вычислена активность фермента 5-ЛОГ, представленная в таблице 11.

Активность фермента 5-ЛОГ, нмоль/мин/мл

Проба	Активность 5-ЛОГ, нмоль/мин/мл				
	1	2	3	4	Ср. знач. \pm ош. среднего
Контроль	12,7	13,1	11,3	12,7	12,5 \pm 0,4
NDGA, 15 мкМ	3,7	3,8	3,0	3,6	3,6 \pm 0,2*
ЛК 50 мкг/мл	5,7	4,1	3,3	4,8	4,5 \pm 0,5*
ЛК 25 мкг/мл	6,4	4,5	3,9	5,3	5,0 \pm 0,5*
ЛК 12,5 мкг/мл	10,3	7,2	5,1	6,5	7,3 \pm 1,1*
ЛК 6,75 мкг/мл	11,6	8,4	7,9	8,4	9,1 \pm 0,9*
ЛК 3,375 мкг/мл	10,4	11,4	11,2	11,7	11,2 \pm 0,2*
ЛК 1,69 мкг/мл	13,2	13,5	12,5	13,2	13,1 \pm 0,2

Примечание - * - различие статистически значимо в сравнении с контролем, по критерию Стьюдента, при $p < 0,05$

Ниже на рисунке 17 приведен соответствующий график зависимости % снижения продукта реакции от концентрации ЛК.

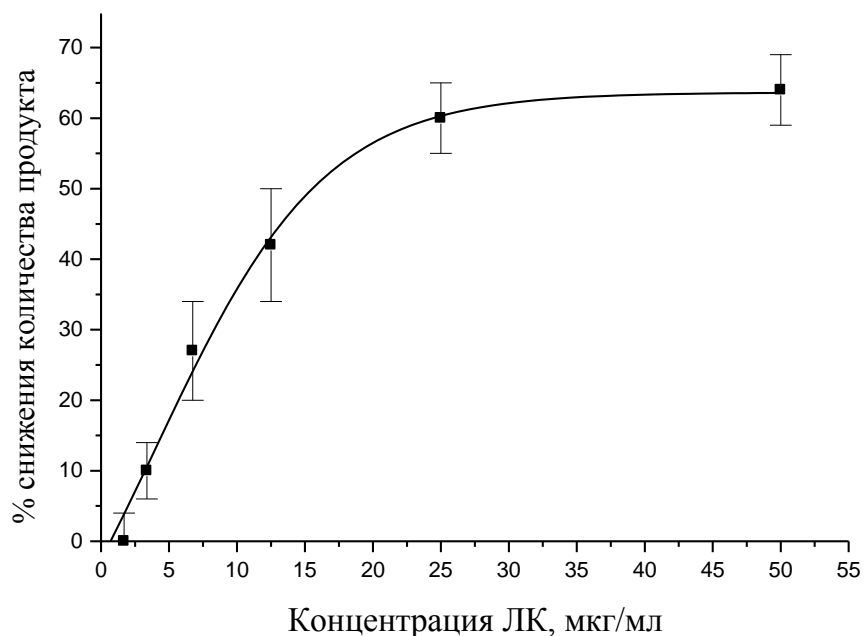


Рисунок 17 - Влияние ЛК на энзиматическую активность 5-ЛОГ

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

EC50 вычисляли в программном обеспечении ORIGIN4.1 по формуле:

$Inh(\%) = a * EC / (b + IC)$, где $Inh(\%)$ – процент ингибирования, EC – концентрация ЛК, “a” и “b” – вычисляемые параметры при аппроксимировании графика на рисунке 17. Параметры “a” и “b” характеризуют аппроксимирующую кривую.

3.2 ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2

Исследование влияния образцов на энзиматическую активность ЦОГ-2 проводили с использованием набора COX inhibitor screening assay kit (Cayman Chemicals, USA).

Тест-система напрямую оценивает количество простагландина F2 α (PGF_{2 α}), сформированного в ходе редукции индуцированной хлоридом олова (SnCl₂) PGH₂ – продукта взаимодействия циклооксигеназы (фермента) и арахидоновой кислоты (субстрата) (рисунок 18)

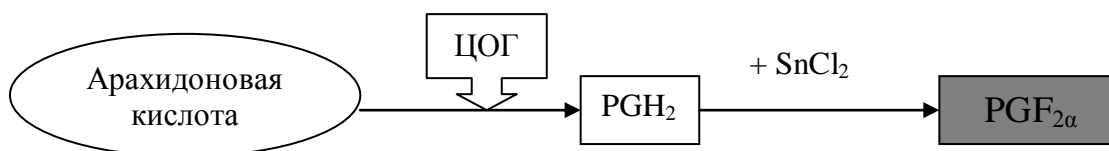


Рисунок 18 – Упрощенная схема проведения реакции

В качестве позитивного контроля ингибирования ЦОГ-2 использовали селективный ингибитор нифлумовую кислоту в концентрации 0,1 мкМ. По литературным данным IC₅₀ для нифлумовой кислоты составил 0,1 мкМ (Barnett J. et al., 1994).

Анализ проводили в три этапа. На первом этапе проводили энзиматическую реакцию, в ходе которой происходила наработка простагландина H₂. Образцы в указанных концентрациях смешивали в пропорциях, указанных в таблице 12.

Пропорции смешения образцов для исследования активности ЦОГ-2

Проба	Реактивы, мкл						
	Реакционный буфер	Гем	ЦОГ-2	Ингибитор	Растворитель ингибитора	Арахидоновая кислота	1М HCl
Контроль	950	10	10	-	20	10	50
Специфический ингибитор ЦОГ-2 нифлумовая кислота	950	10	10	20	-	10	50
ЛК, 25 мкг/мл	950	10	10	20	-	10	50
ЛК, 20 мкг/мл	950	10	10	20	-	10	50
ЛК, 10 мкг/мл	950	10	10	20	-	10	50
ЛК, 5 мкг/мл	950	10	10	20	-	10	50
ЛК, 1 мкг/мл	950	10	10	20	-	10	50

Реакцию проводили на водяной бане при температуре 37°C. Время инкубации специфического ингибитора/исследуемого ЛК с ЦОГ-2 составляет 10 минут, далее в реакционную смесь вносили арахидоновую кислоту (субстрат), через 2 минуты реакцию останавливали добавлением 1М HCl. Далее редуцировали простагландин H₂ в простагландин F_{2α} путем добавления в реакционную смесь SnCl₂. В каждую пробу вносили по 100 мкл насыщенного раствора хлорида олова.

Количество PGF_{2α} оценивали методом ИФА. Метод основан на конкурентном связывании PGF_{2α} (простагландины, присутствующие в образцах, контроле и стандартах) и PGF_{2α}-ацетилхолинэстеразы (AChE) конъюгата (PGF_{2α}-tracer) со специфическими моноклональными антителами (Cayman Chemicals, USA). По количеству продукта PGF_{2α}, найденном по результатам ИФА, вычисляли % снижения продукта реакции по формуле:

% снижения продукта реакции = $C[PGF_{2\alpha}]_{ЛК} * 100 / C[PGF_{2\alpha}]_{контроль}$, где $C[PGF_{2\alpha}]$ – концентрация PGF_{2α} в пробе.

ЛК ингибировал активность фермента ЦОГ-2 дозозависимо, при этом полного ингибирования фермента достигнуто не было (рисунок 19).

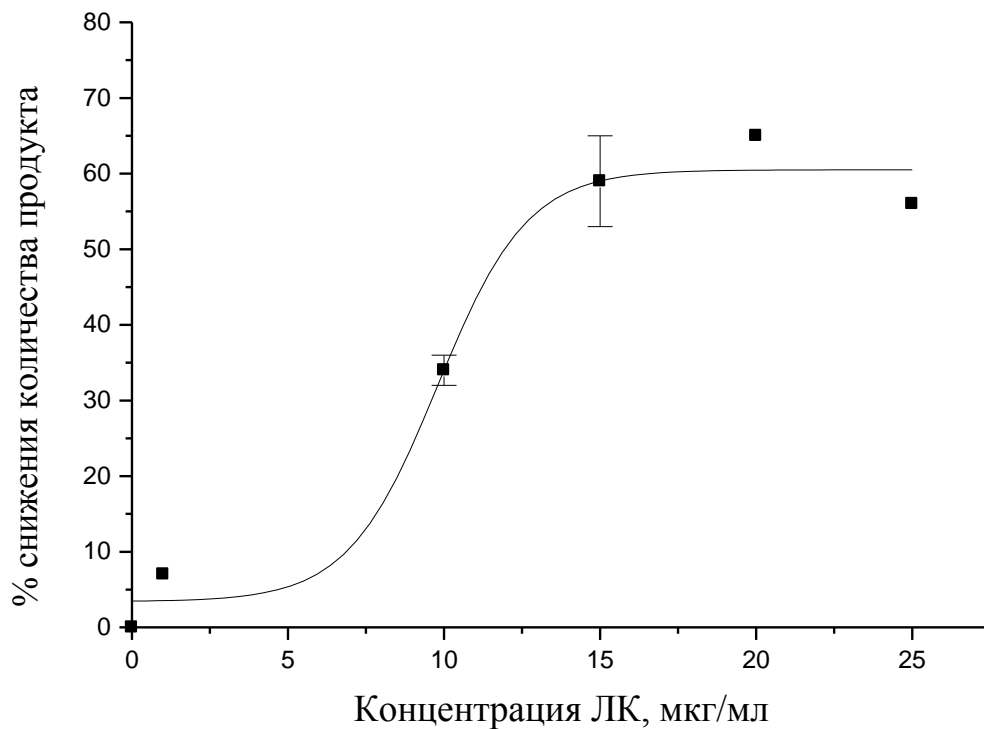


Рисунок 19 - Влияние ЛК на энзиматическую активность ЦОГ-2

Кривая имела сигмоидный вид с выходом на плато на уровне 60% ингибирования в концентрациях 15-25 мкг/мл. По уровню аппроксимирующей кривой в программе ORIGIN 4.1 вычисляли EC50, равную 9,8 мкг/мл.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ВЛИЯНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ГИСТАМИНА

Гистамин – важный химический медиатор аллергической реакции и воспаления. Он синтезируется и хранится во вторичных гранулах тучных клеток различных тканей и циркулирующих в крови базофилах (Cooper J. et al., 1986). Гистамин высвобождается из клеток и взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами, отвечающими за сокращение гладкой мускулатуры, повышает проницаемость сосудов и продукцию слизи (Eiser N. et al., 1980).

Из рисунка 20 видно, что уровень гистамина в культуре клеток, стимулированных веществом Comraund 48/80 (контроль) был в 5 раз выше, чем в культуре интактных клеток. Это позволяет заключить, что внесение в культуру базофилов Comraund 48/80 индуцировало выброс гистамина (рисунок 20).

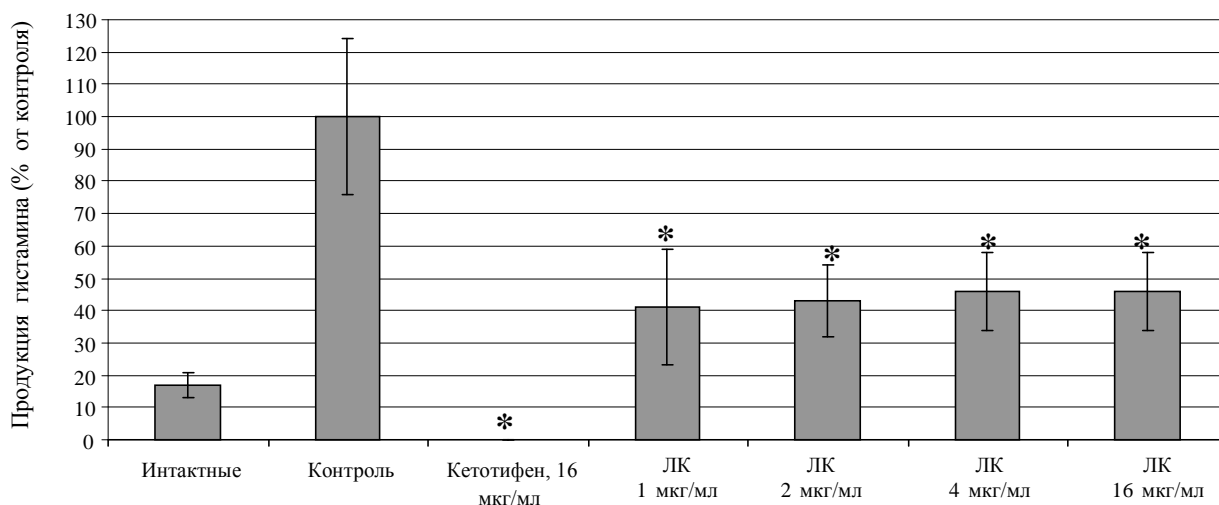


Рисунок 20 - Влияние субстанции ЛК на индуцированную продукцию гистамина в культуре базофилов крысы линии RBL-1

Примечание - * - статистически значимо отличается от контроля по критерию Стьюдента, при $p < 0,05$.

Дополнительная инкубация клеток с субстанцией Кетотифена (16 мкг/мл), выбранной в качестве веществ сравнения, привела к полному подавлению продукции гистамина. По литературным данным субстанция Кетотифена является стабилизатором клеточной мембраны, в соответствии с чем ингибируют

Compound 48/80-индуцированный выброс гистамина из тучных клеток (Nader M., 2011).

Проведенное исследование показало, что субстанция ЛК подавляет индуцированный выброс гистамина из базофилов (рисунок 4). Инкубация клеток с субстанцией в течение 75 минут (15 мин до внесения в культуру клеток индуктора дегрануляции и 60 минут после) снижала появление гистамина в культуральной среде более чем в 2 раза. Субстанция оказывала действие во всех тестируемых концентрациях 1, 2, 4 и 16 мкг/мл.

3.4 РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ MAP-КИНАЗЫ

Проведенное исследование было направлено на оценку влияния ЛК на ЛПС - индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2. Исследование проводили в культуре моноцитов человека линии U937. Клетки моноцитарного ряда играют одну из основных ролей в развитии воспаления. Они продуцируют провоспалительные цитокины. Культура U937 является модельным объектом для оценки внутриклеточного сигналинга, в частности фосфорилирования MAP-киназ (Sundararaj K. et al., 2008).

С целью выявить наличие активности ЛК тестировали в максимально возможной концентрации (50 мкг/мл). В качестве препарата сравнения использовали ловастатин (4 мкг/мл) (Sundararaj K. et al., 2008).

Дизайн исследования включал инкубацию клеток с ЛК и ловастатином в течение 2-х часов и стимуляцию липополисахаридом клеточной стенки бактерий (ЛПС) в течение 1 часа. Результаты исследования представлены в таблице 13.

Влияние ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2 в культуре моноцитов человека линии U937 (n=3, Me±Q₂)

Пробы	Количество фосфо-MAPK (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 –

* - статистически значимо отличается от интактных клеток по U критерию Манна-Уитни, при p<0.05.

- статистически значимо отличается от контроля по U критерию Манна-Уитни, при p<0.05

Из таблицы 13 видно, что инкубация культуры клеток линии U937 с ЛПС индуцировала фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2. Внесение в культуру ловастатина статистически значимо снижало количество фосфо-p38 и оказывало тенденцию на подавление фосфо-ERK1/2. Полученные результаты согласуются с литературными данными, что подтверждает корректность проведенного исследования (Sundararaj K. et al., 2008).

Оценка действия ЛК на ЛПС-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2 показала отсутствие эффекта.

Полученные данные позволяют заключить, что в концентрации 50 мкг/мл ЛК не оказывает влияние на фосфорилирование MAP-киназ ERK1/2 и p38.

3.5 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С TOLL-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Другим возможным механизмом противовоспалительного действия может быть ингибирование рецепторов TLR (толл-подобные рецепторы, TLR-рецепторы). Toll рецепторы у человека представляют собой семейство

трансмембранных белков, состоящее на сегодняшний день из 10 рецепторов, обозначаемых как TLR1,2,3 и т.д.

Природные лиганды к TLR подразделяют на три основные категории: липиды и липопептиды (TLR1/2; TLR2/6, TLR2/2, TLR4), протеины (TLR5) и нуклеиновые кислоты (TLR3,7,8 и 9).

Выделяют три основные функции TLR рецепторов:

- обнаружение и идентификация патогена;
- мгновенный или ранний ответ, сопровождающийся секрецией медиаторов воспаления, таких как провоспалительные цитокины и хемокины, выработка NO-синтазы и свободных форм кислорода и др.;
- поздний ответ, проявляющийся в модуляции адаптивного иммунного ответа по механизму, необходимому для элиминации данного конкретного вида патогена или их совокупности (Кетлинский С., Симбирцев А., 2008).

Для оценки взаимодействия ЛК с парами рецепторов TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6 была выбрана клеточная линия HEK-Blue-hTLR2 (Invivogen, США). Поскольку линия HEK-Blue-hTLR2 экспрессирует эндогенный уровень рецепторов hTLR1 и hTLR6, это позволяет исследовать взаимодействие с тремя парами рецепторов 1/2, 2/6 и 2/2. Для проверки взаимодействия с рецепторами hTLR4 и hTLR5 использовались клеточные линии HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 (Invivogen, США).

Таким образом, целью исследования явилась оценка взаимодействия препарата ЛК с рецепторами TLR1/2; TLR2/2; TLR2/6; TLR4 и TLR5 в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл.

На рисунке 21 представлены результаты взаимодействия препарата Урчинол с рецептором TLR5. В эксперименте использовалась клеточная линия HEK-Blue-hTLR5, экспрессирующая только один рецептор hTLR5. В качестве лиганда использовали Flagellin в концентрации 1 нг/мл.

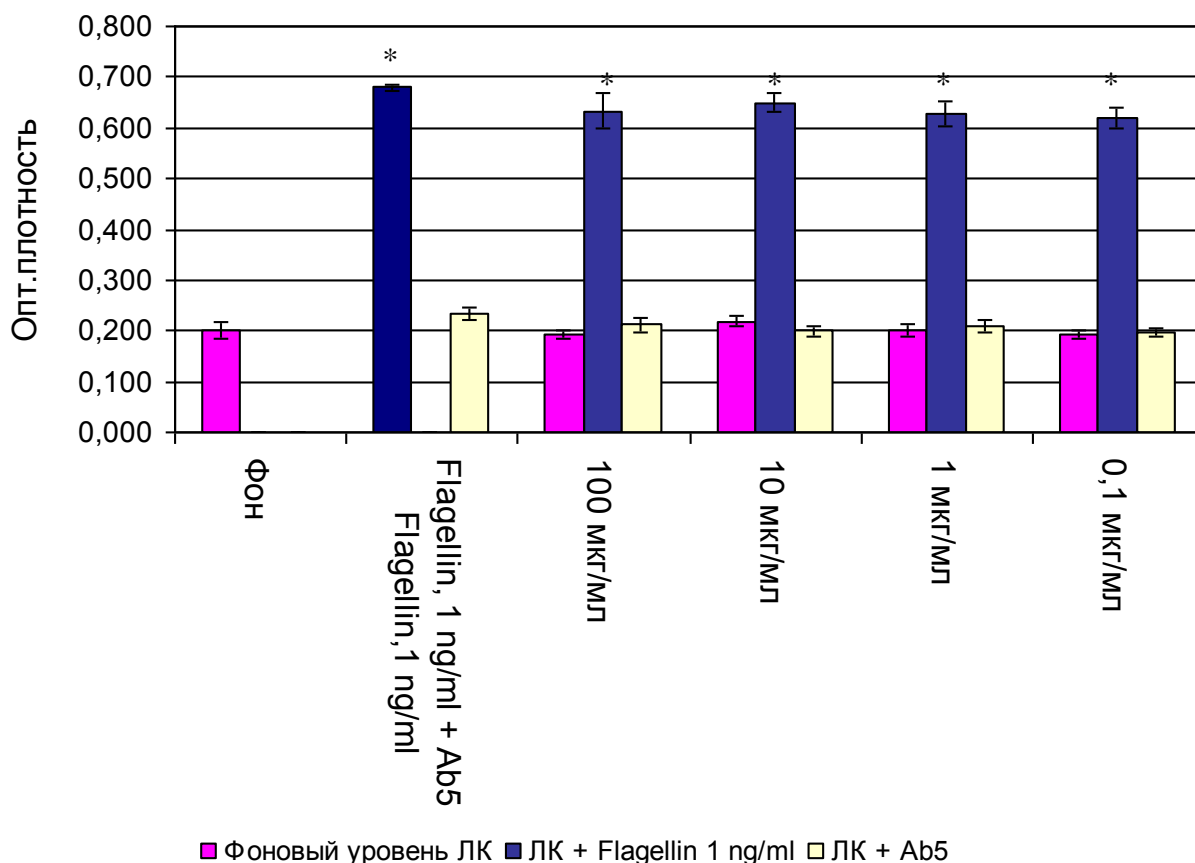


Рисунок 21 - Результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR5

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

Стимуляция клеточной линии специфическим агонистом к TLR5 Flagellin привела к NF-κB зависимой выработке фермента SEAP, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции, интенсивность которой составила $0,68 \pm 0,01$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм (первый синий столбец). Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к полному блокированию экспрессии фермента SEAP (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии препаратом ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно (первый столбец на диаграмме рисунка 21, розовый цвет). Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций.

Совместное действие агониста к TLR5 Flagellin 1 нг/мл с ЛК отражено во втором столбце для каждой отдельной концентрации препарата ЛК. Во всех используемых концентрациях препарат не повлиял на взаимодействие Flagellin с рецептором hTLR5.

Таким образом, мы показали, что ЛК не взаимодействует с рецептором hTLR5.

На рисунке 22 представлены результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR4. В эксперименте использовалась клеточная линия HEK-Blue-hTLR4, экспрессирующая только один рецептор hTLR4. В качестве лиганда использовался ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл.

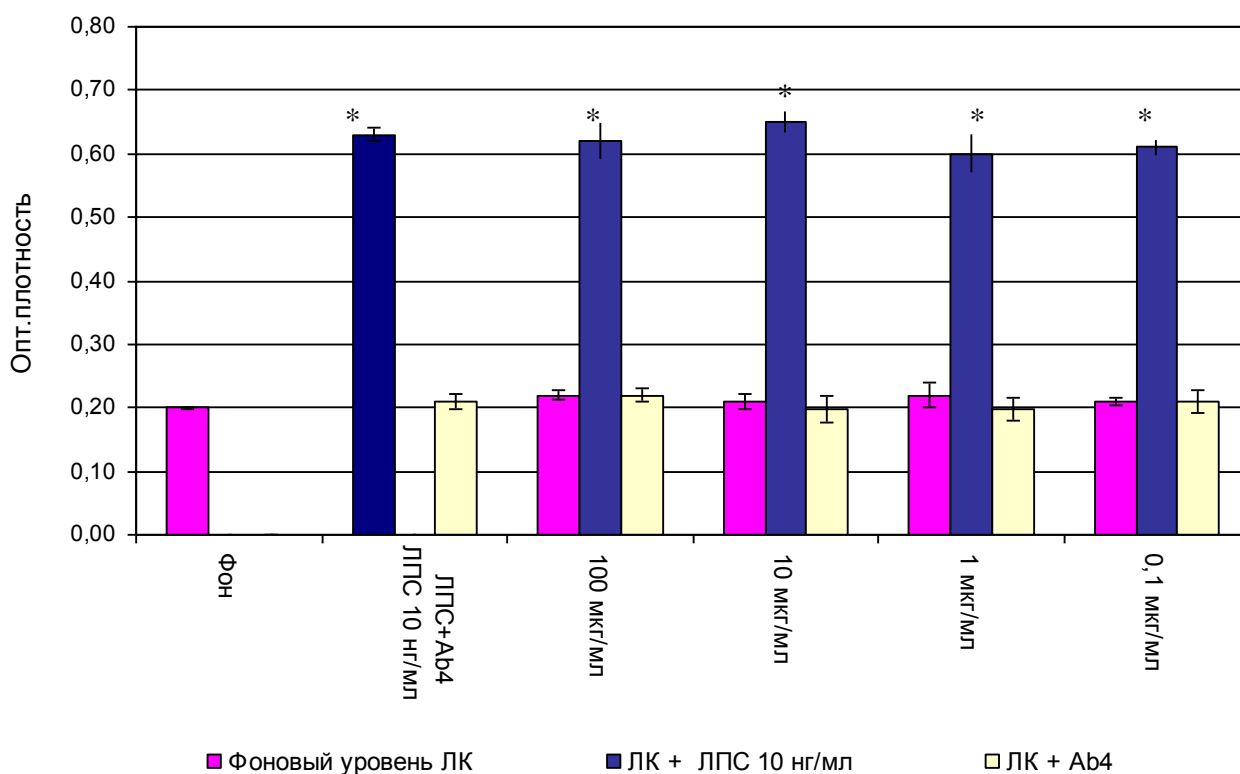


Рисунок 22 - Результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR4

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

Стимуляция клеточной линии специфическим агонистом к TLR4 ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл привела к NF-κB зависимой выработке фермента SEAP, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции,

интенсивность которой составила $0,63 \pm 0,01$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм (первый синий столбец). Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к полному блокированию экспрессии фермента SEAP (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии препаратом ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно (первый столбец на диаграмме рисунка 22, розовый цвет). Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций.

Совместное действие агониста к TLR4 10 нг/мл с субстанцией ЛК отражено во втором столбце для каждой отдельной концентрации ЛК. Во всех используемых концентрациях препарат не повлиял на взаимодействие ЛПС с рецептором hTLR4.

На рисунке 23 представлены результаты взаимодействия субстанции ЛК с рецептором TLR2/2. В качестве лиганда использовался НКЛМ в конечной концентрации 10^8 cells/мл.

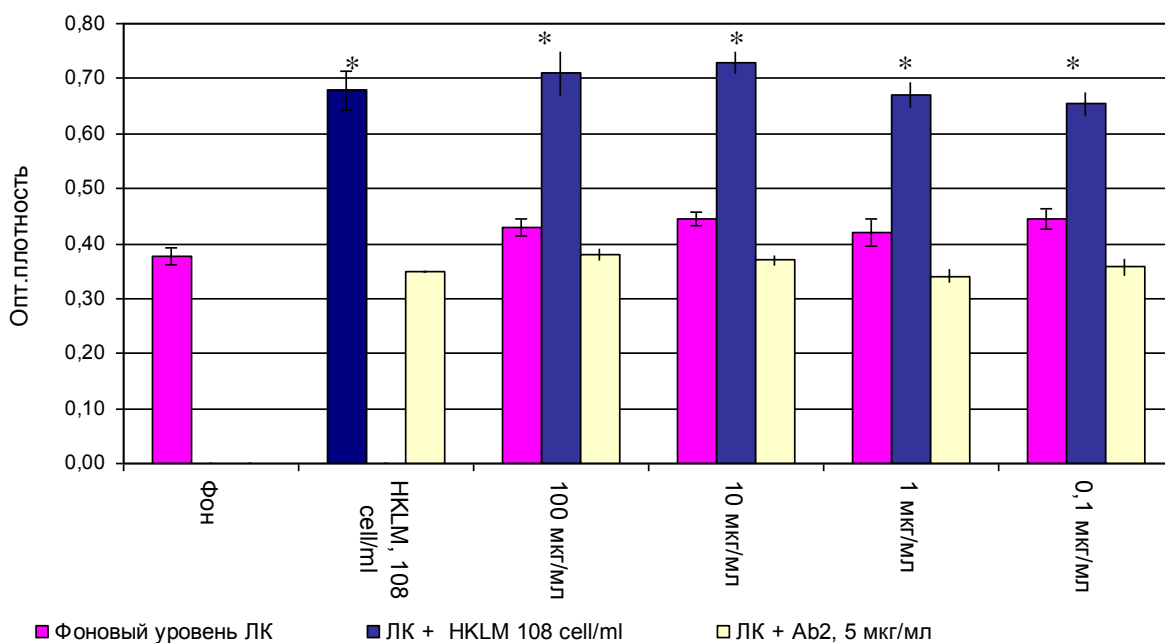


Рисунок 23 - Результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR2/2

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

Стимуляция клеточной линии специфическим агонистом привела к NF- κ B зависимой выработке фермента SEAP, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции, интенсивность которой составила $0,68 \pm 0,04$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм (первый синий столбец). Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к полному блокированию экспрессии фермента SEAP (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно (первый столбец на диаграмме рисунка 23, розовый цвет). Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций.

Совместное действие агониста НКЛМ с ЛК отражено во втором столбце для каждой отдельной концентрации. Во всех используемых концентрациях препарат не повлиял на взаимодействие НКЛМ с рецептором hTLR2/2.

На рисунке 24 представлены результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR1/2. В качестве лиганда использовался PAM3CSK4 в конечной концентрации 1 нг/мл.

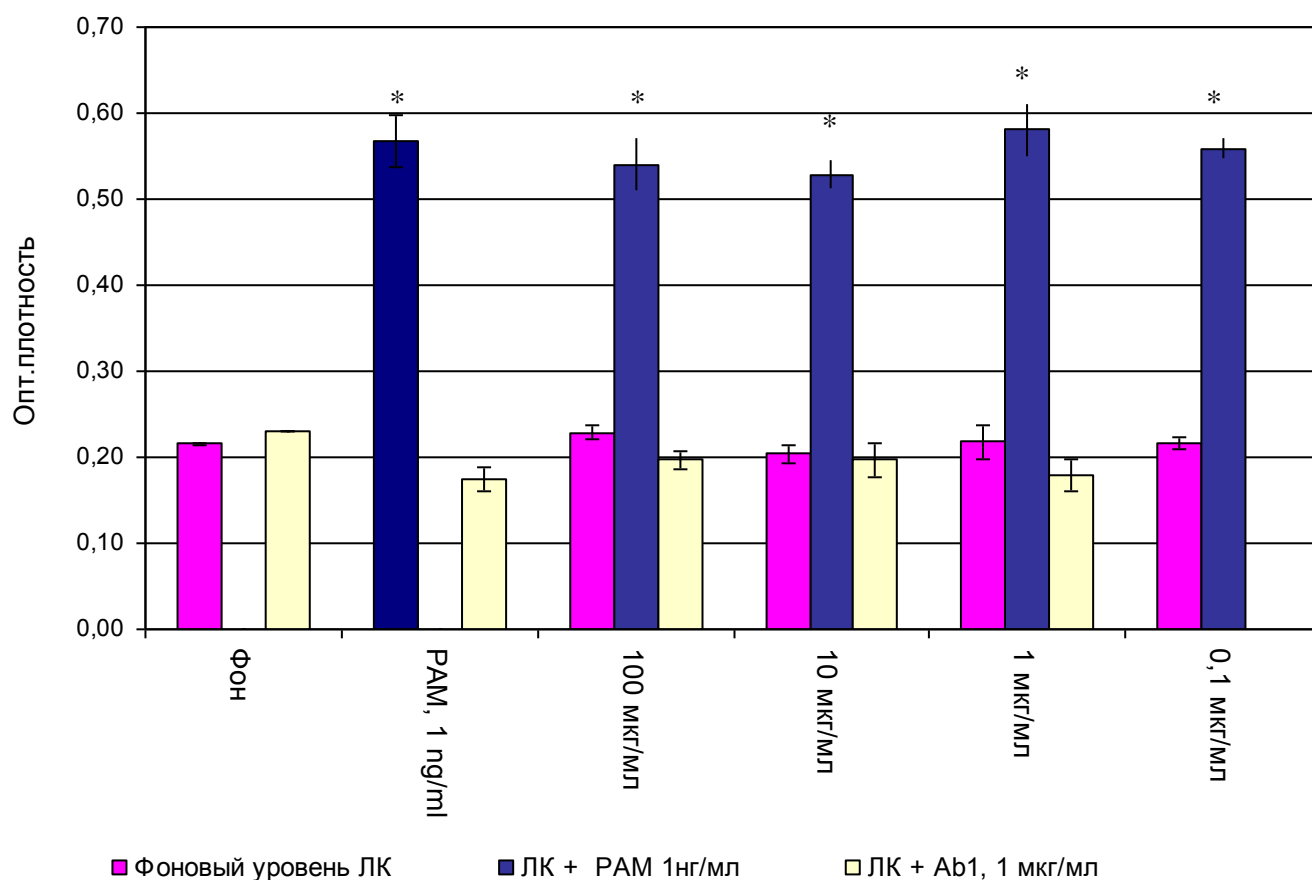


Рисунок 24 - Результаты взаимодействия ЛК с рецептором TLR1/2

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

Стимуляция клеточной линии специфическим агонистом к TLR1/2 PAM3CSK4 (РАМ на диаграмме) в конечной концентрации 1 нг/мл привела к NF- κ B зависимой выработке фермента SEAP, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции, интенсивность которой составила $0,57 \pm 0,03$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм (первый синий столбец). Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к полному блокированию экспрессии фермента SEAP (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно (первый столбец на диаграмме рисунка 24,

розовый цвет). Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций.

Совместное действие агониста к TLR1/2 с препаратом ЛК отражено во втором столбце для каждой отдельной концентрации препарата. Во всех используемых концентрациях препарат не повлиял на взаимодействие PAM3CSK4 с рецептором hTLR1/2.

На рисунке 25 представлены результаты взаимодействия препарата ЛК с рецептором TLR2/6. В качестве лиганда использовался PAM3CSK4 в конечной концентрации 1 нг/мл.

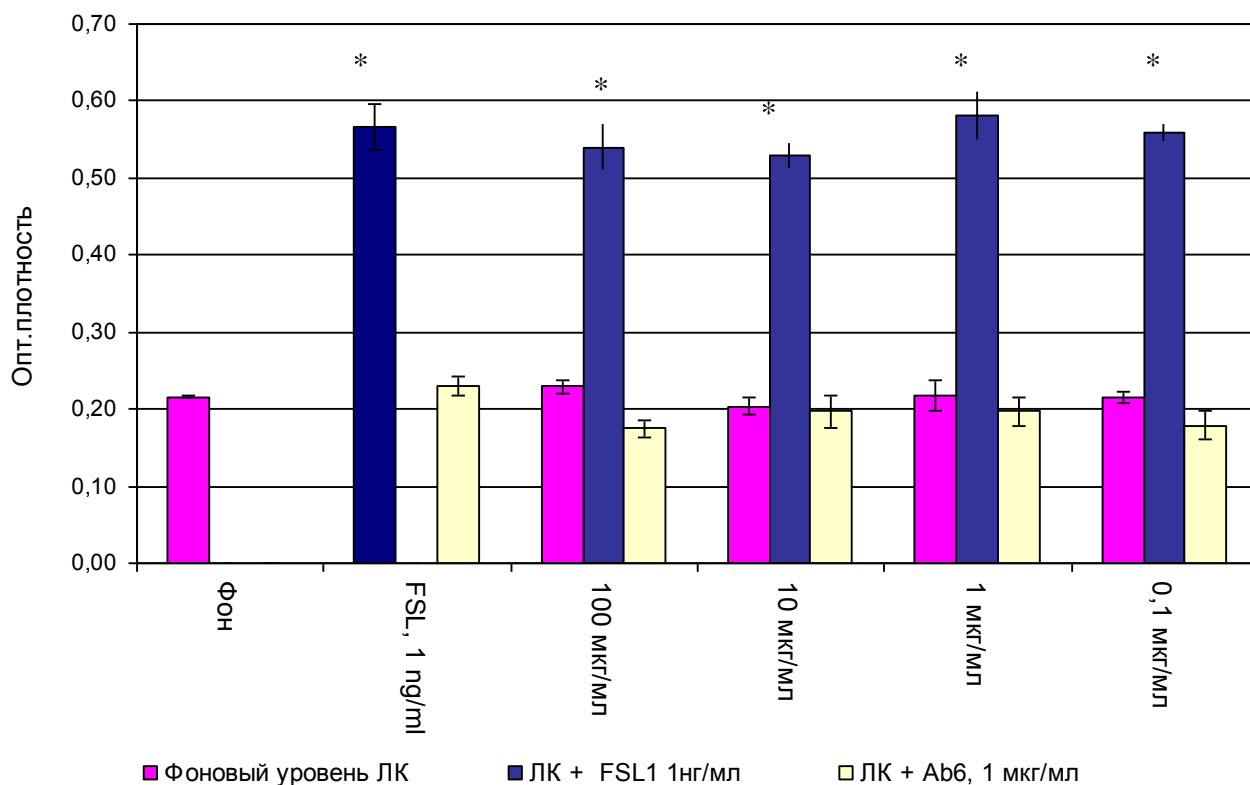


Рисунок 25 - Результаты взаимодействия препарата ЛК с рецептором TLR2/6

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

Стимуляция клеточной линии специфическим агонистом к TLR2/6 FSL1 в конечной концентрации 1 нг/мл привела к NF- κ B зависимой выработке фермента SEAP, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции,

интенсивность которой составила $0,51 \pm 0,02$ единиц оптической плотности на длине волны 630 нм (первый синий столбец). Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к полному блокированию экспрессии фермента SEAP (уровень сигнала не отличался от фонового).

Стимуляция клеточной линии препаратом ЛК отражает исходный уровень активации для каждой концентрации отдельно (первый столбец на диаграмме рисунка 25, розовый цвет). Активации рецептора обнаружено не было ни в одной из исследуемых концентраций.

Совместное действие агониста к TLR2/6 с субстанцией ЛК отражено во втором столбце для каждой отдельной концентрации. Во всех используемых концентрациях препарат не повлиял на взаимодействие FSL1 с рецептором hTLR2/6.

Таким образом, совокупность результатов экспериментов на клеточной линии HEK-Blue-hTLR2 демонстрирует, что ЛК в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл не проявляет свойства агониста ко всем парам рецепторов TLR1/2, TLR2/2 и TLR2/6 (интенсивность сигнала при стимуляции клеток препаратом оставалась на уровне фона). Для оценки возможности проявления свойств ЛК как антагониста использовалась совместная стимуляция клеток препаратом и соответствующим природным лигандом. Было выявлено отсутствие антагонистического эффекта на клеточной линии HEK-Blue-hTLR2. В эксперименте на клеточных линиях, экспрессирующих рецепторы TLR4 и TLR5 также было показано отсутствие агонистического и антагонистического действия препарата ЛК в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл.

3.6 РЕЗУЛЬТАТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА С H1-ГИСТАМИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Эксперименты с изолированными тканями оказали решающую роль в исследованиях механизмов взаимодействия рецепторов и медиаторов, поскольку изучение воздействия веществ *in vivo* позволяет оценить всю сумму эффектов вещества на организм, а не на точку приложения, так же сложно выяснить взаимоотношение «доза-эффект». Данные методы лишены этих недостатков, и позволяют получать полноценные и точные данные о направленности и механизме действия тех или иных медиаторов непосредственно на рецепторный аппарат тканей и органов.

В работе использовано 48 фрагментов подвздошной кишки, извлеченных из 12 беспородных морских свинок-самцов. Схема исследования представлена в таблице 14.

Таблица 14.

Схема исследования на изолированной подвздошной кишке

№ группы	Количество экспериментальных органов	Описание группы	Концентрация вещества
1	8	Контрольная (гистамин)	10^{-6} М
2	8	Кетотифен+гистамин	0,005 мкг/мл
3	8	ЛК + гистамин	1000 мкг/мл
4	8	ЛК + гистамин	100 мкг/мл
5	8	ЛК + гистамин	20 мкг/мл
6	8	ЛК + гистамин	10 мкг/мл

Экспериментальных животных наркотизировали ветеринарным препаратом «Золетил 100» и фиксировали на хирургическом столике, после чего производили срединную лапаротомию (рисунок 26).



Рисунок 26 – Срединная лапаротомия и препарировывание подвздошной кишки

Подвздошную кишку извлекали из брюшной полости и помещали в емкость с охлажденным до $+4^{\circ}\text{C}$ раствором Кребса-Хенселейта. Затем подвздошная кишка разрезалась на фрагменты длиной около 1 см. Данные фрагменты закреплялись в проточных камерах при помощи металлических крючков, один из которых прикреплялся к датчику веса, а другой к держателю (рисунок 27).



Рисунок 27 – Фиксация сегмента кишки на крючках

После установки сегменты кишки начинали перфузировать оксигенированным раствором Кребса-Хенселейта при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ (рисунок 28). Открывали программу «PhysExp» и начинали запись графика изменения силы натяжения сегмента кишки. Для получения стандартного натяжения во всех фрагментах, под

контролем программного обеспечения создавали преднагрузку в 1 грамм. Данная нагрузка корректировалась перед введением раствора КС1 и раствора гистамина.

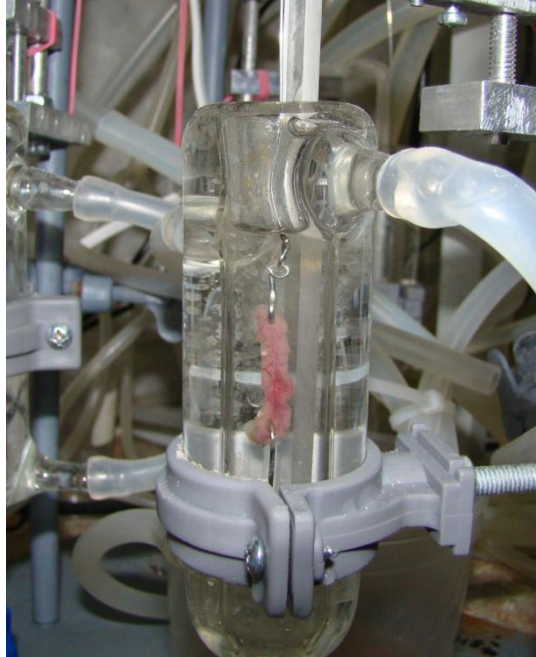


Рисунок 28 – Фрагмент кишки, закрепленный в проточной камере

Эксперимент проводили по схеме, представленной на рисунке 29.

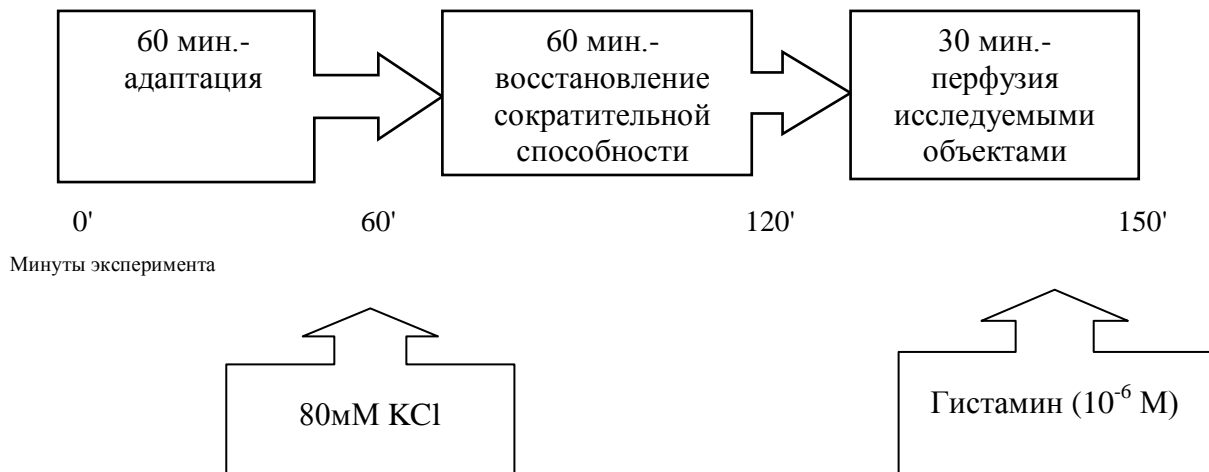


Рисунок 29 - Схема эксперимента на изолированной подвздошной кишке морской свинки

Во время всего опыта регистрировали кривую изометрической силы сокращения. Учитывали амплитуду сокращения и время наступления максимального сокращения (рисунок 30,31).

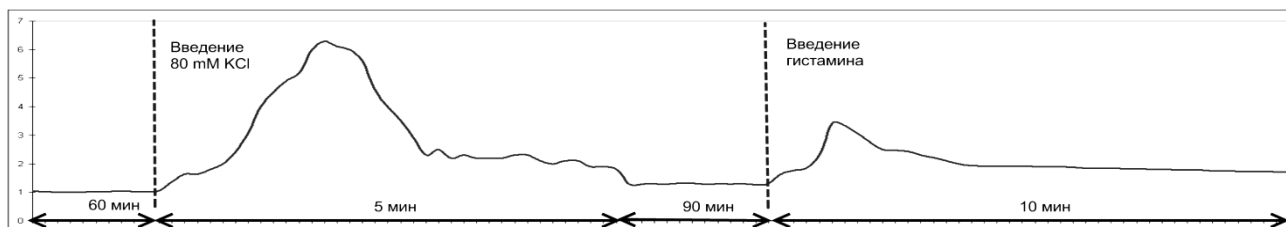


Рисунок 30 – График изменения амплитуды сокращения в контрольной группе

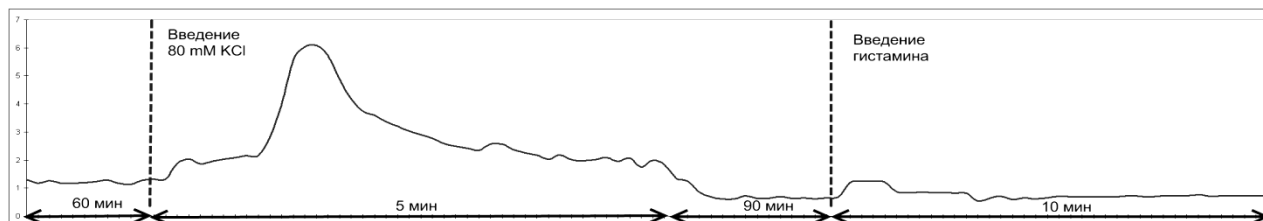


Рисунок 31 – График изменения амплитуды сокращения при применении Кетотифена

Полученные данные позволяют судить о способности исследуемого препарата связываться с Н1-гистаминовыми рецепторами и блокировать их в различных концентрациях.

В результате исследования выявлено, что при введении только гистамина развивалось максимальное сокращение, соизмеримое с констрикцией, вызванной хлоридом калия. Время реакции увеличилось всего в 5 раз по отношению к показателям КСl (Таблица 15).

Амплитуда гистамин-индуцированного сокращения и
время наступления максимального ответа ($Me \pm Q$)

Группа	Амплитуда (% от 80мМ КСl)	Время (единицы от 80мМ КСl)
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 –

1 - * - значения статистически значимы по сравнению с контрольной группой, при $p < 0,05$

2 - ** - значения статистически значимы по сравнению с группой кетотифена, при $p < 0,05$

При перфузии фрагмента кишки липидными комплексом в максимальной концентрации 1 мг/мл в течение 10 минут наблюдения после введения гистамина ответная реакция была минимальна и составляла 5% от сокращения, вызванного хлоридом калия. Что довольно близко к показателям эталонного препарата Кетотифен (0,005 мкг/мл), который снижал амплитуду сокращения до 2%. В остальных группах исследуемого препарата амплитуда гистамин-индуцированного сокращения уменьшалась пропорционально концентрации вещества в перфузате, при этом время реакции соответственно увеличивалось (рисунок 32,33).

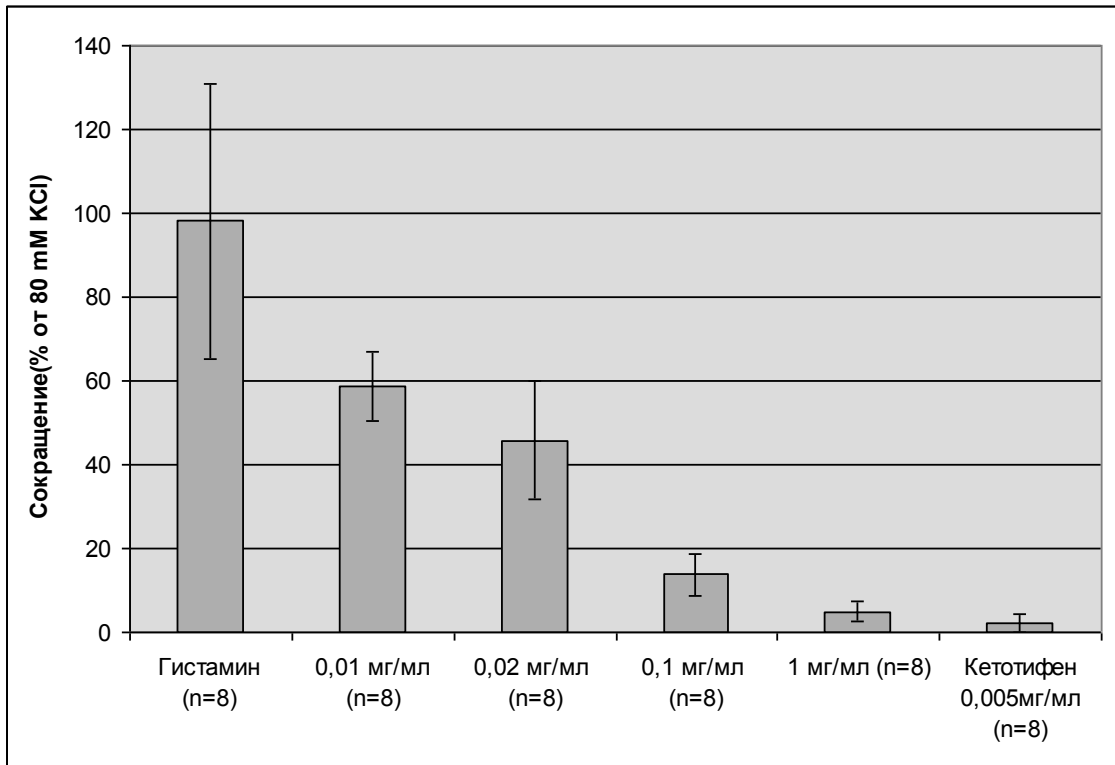


Рисунок 32 - Амплитуда гистамин-индуцированного сокращения

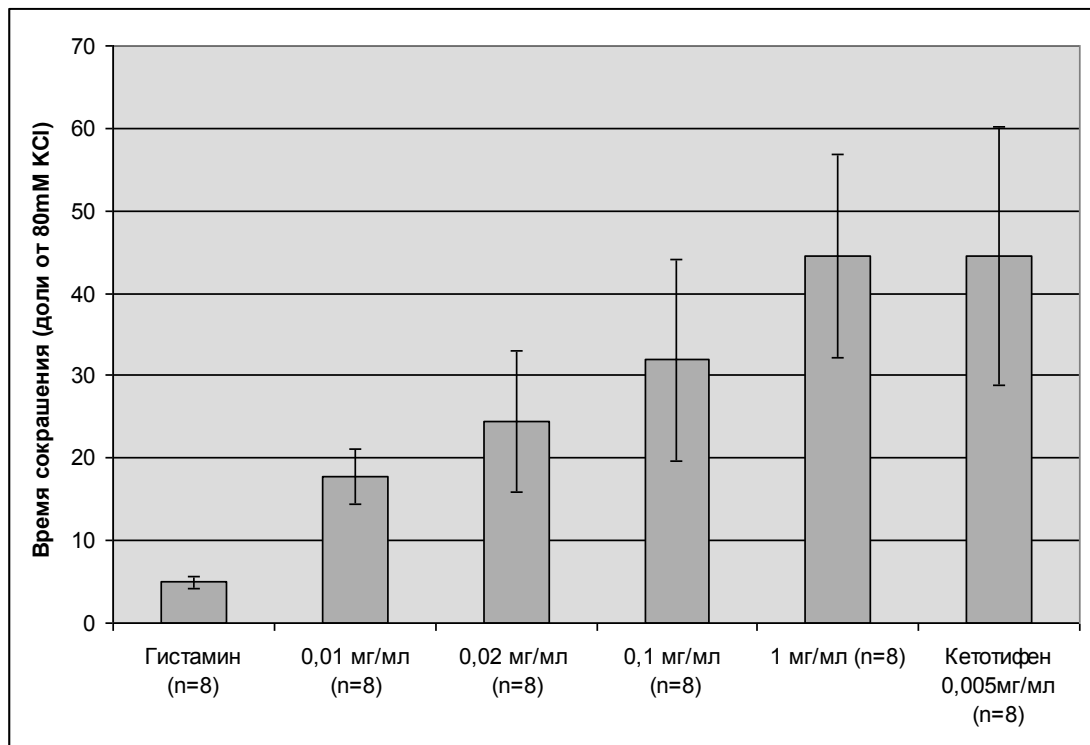


Рисунок 33 - Время наступления максимального гистамин-индуцированного сокращения

Математический анализ максимальной амплитуды гистамин-индуцированного сокращения позволяет рассчитать формулу зависимости концентрации от амплитуды:

$C = (A - 1,428 - 0,014) / 0,18$ при $R^2 = 0,936$ (где C - концентрация препарата, A - амплитуда сокращения), при этом ЭД50 составляет 16,4 мкг/мл.

A зависимость концентрации вещества от времени наступления максимального ответа выражается как $C = (0,0206 * T)^{5,555}$ при $R^2 = 0,862$ (где C - концентрация препарата, T - время максимального ответа), таким образом, ЭД50 составляет 19,9 мкг/мл.

Вычисленное среднее значение ЕС50 по отношению к амплитуде сокращения и времени наступления максимального ответа составило 18,1 мкг/мл.

Таким образом, гистамин, связываясь с H1-рецепторами подвздошной кишки, вызывает быстрое и мощное сокращение гладких мышц. Этот эффект наиболее полноценно наблюдался в контрольной группе.

Препарат сравнения - Кетотифен, являясь блокатором H1-гистаминовых рецепторов, предотвращал развитие констрикции и пролонгировал время ответа более чем на 10 минут. Подобное действие оказывал и исследуемый препарат в максимальной концентрации 1 мг/мл. ЛК в меньших концентрациях так же оказывал положительное влияние на сегмент кишки. Он снижал амплитуду гистамин-индуцированного сокращения и увеличивал время максимальной констрикции в соответствии с концентрацией вещества в перфузате.

На основании полученных данных можно сделать выводы, что ЛК во всех предложенных концентрациях блокировал H1-гистаминовые рецепторы сарколеммы гладких мышц подвздошной кишки. Эффект от применения ЛК в максимальной концентрации 1 мг/мл был соизмерим с эффектом Кетотифена в дозе 0,005 мкг/мл.

3.7 ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ

Результаты оценки степени отека представлены на рисунке 34. Индекс реакции в контрольной группе животных через трое суток после нанесения разрешающей дозы химического аллергена ДНХБ составил 52%. У животных, получавших плацебо, ИР не отличался от контроля, что дает основание заключить адекватность полученных эффектов на фоне введения исследуемых препаратов.

Препарат сравнения супрастин снижал степень отека пораженного уха на 78%. Исследуемый 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%.

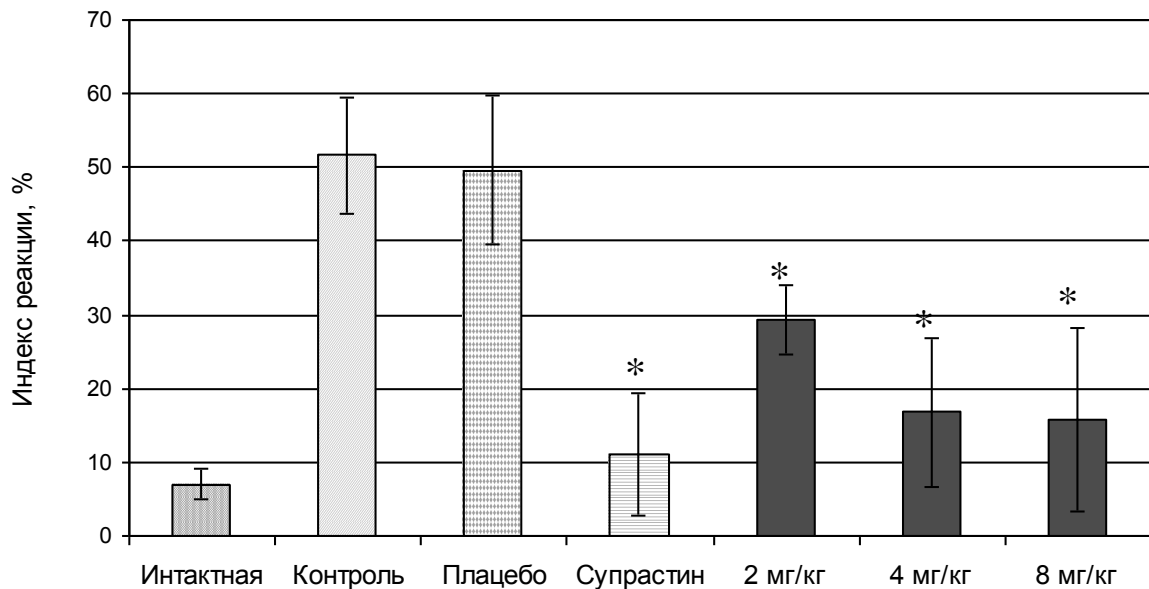


Рисунок 34 - Степень отека пораженного уха

Примечание - * - различие статистически значимо в сравнении с группой плацебо по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

На рисунке 35 представлены результаты морфологической оценки “опытного” уха в различных группах. Выставленные баллы характеризуют интенсивность морфологических проявлений патологического воспалительного процесса (рисунок 36-41).

Исходя из полученных результатов, “опытное” ухо интактных животных было нормальным, патологических изменений ни у одного животного выявлено не было. Интактной группе животных был присвоен балл 0. “Опытное” ухо контрольных животных характеризовалась 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.

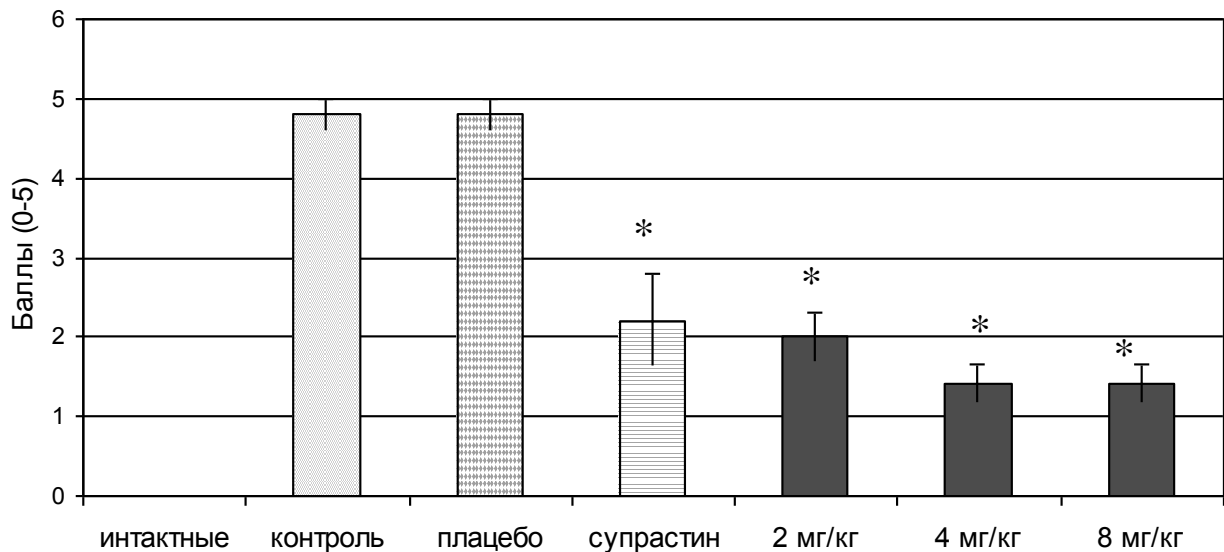


Рисунок 35 - Результаты гистологического исследования “опытного” уха в баллах

Примечание:

* - различие статистически значимо в сравнение с контрольной группой по непараметрическому критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$;

0 баллов

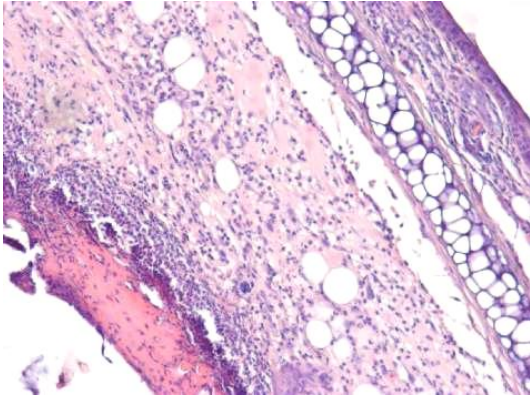


Рисунок 36. Нормальное ухо intactных животных. Без патологических изменений

3 балла

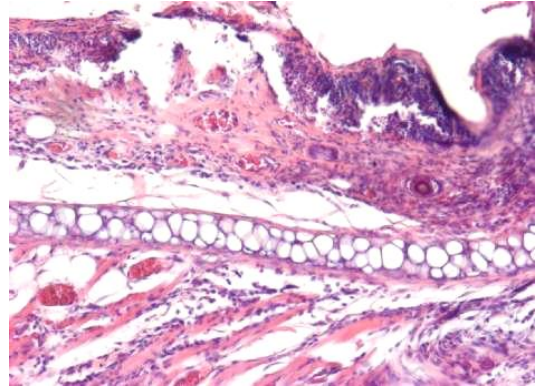


Рисунок 37. Резко выраженная воспалительная инфильтрация с очаговым некрозом, с поражением эпидермиса, вовлечением дермы, без поражения хрящевой ткани

1 балл

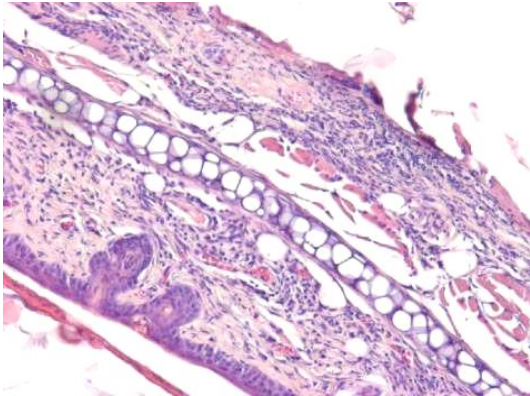


Рисунок 38. Патологический процесс представлен: слабо выраженной лейкоцитарно-плазматической инфильтрацией эпидермального слоя, без вовлечения дермальных структур

4 балла

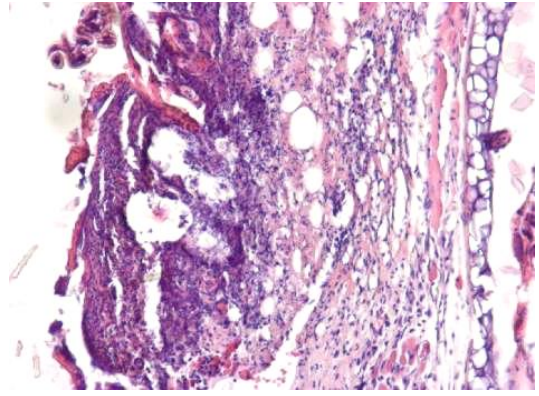


Рисунок 39. Диффузная лейкоцитарно-плазматическая инфильтрация, некроз с тенденцией к распространению и переходу на хрящевую ткань, с формированием деструктивного склероз

2 балла

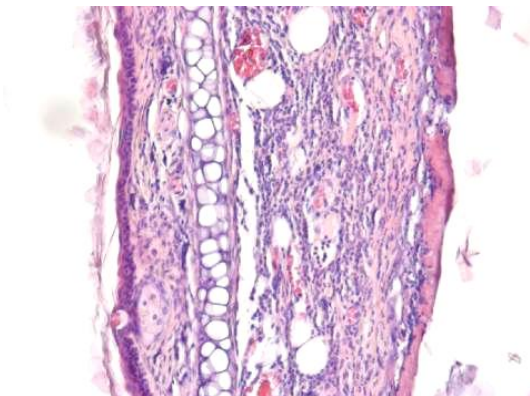


Рисунок 40. Умеренная воспалительная инфильтрация, поражение эпидермиса с вовлечением поверхностного слоя дермы, намечающийся фиброз

5 баллов

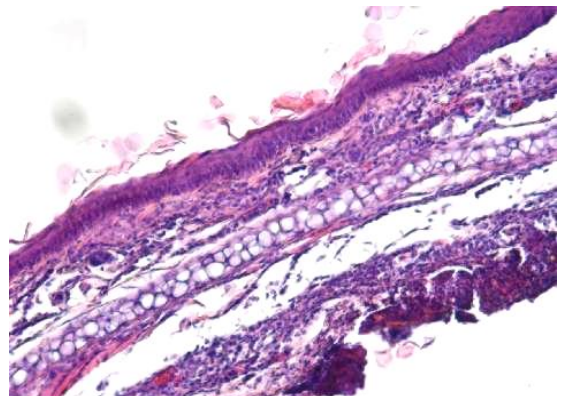


Рисунок 41. Некроз с вовлечением всех структур (эпидермиса, дермы, хряща), с формированием выраженных склеротических изменений

В группе животных, получавших препарат Супрастин, наблюдалось умеренно выраженное воспаление, не затрагивающее нижние слои дермы, которое в соответствии с бальной системой было снижено на 54%, что согласуется с данными полученными при оценки отека (ИР).

Исследуемый 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 бальной системе, в дозах 4 и 8 мг/кг была снижена на 71% в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, трехкратное нанесение 2% спиртового раствора ДНХБ на выбритый участок спины мышей (сенсбилизация на 1,8 и 14 день эксперимента) и двукратное нанесение с интервалом в 1 час на 18 день эксперимента разрешающей дозы аллергена на дорсальную поверхность уха (второе исследование) позволила достичь выраженных патологических изменений в группе контрольных животных, что выразилось в увеличении веса “опытного” по сравнению с контрольным ухом на 52% (степень отека).

Гистологически был выявлен воспалительный процесс, характеризующийся лейкоцитарно-плазмоцитарной инфильтрацией с вовлечением в продуктивный процесс нижних слоев кожи, также наблюдался некроз с распространением и переходу на хрящевую ткань, в ряде случаев было отмечено формирование деструктивного склероза. В эксперименте была сформирована полноценная патология аллергического контактного дерматита.

Схема введения исследуемых препаратов включала внутримышечное ежедневное введение, начиная с 8 дня (после второго нанесения раствора ДНХБ на выбритый участок спины) до 20 дня эксперимента, т.е. 13 дней. Такая схема введения препаратов является лечебной и позволяет оценить фармакологическую активность в отношении степени развития воспалительной реакции пораженного участка.

Изменения в группе плацебо, которой вводился растворитель исследуемого полипептидного препарата, не отличались от контроля. Тем самым, можно

утверждать, что полученные эффекты на фоне введения препаратов адекватны. На фоне применения препарата сравнения Супрастин картина воспаления значительно улучшилась. Гистологические параметры отражали слабо выраженную воспалительную реакцию.

Проведенное исследование позволило установить, что исследуемый ЛК обладает противовоспалительным действием в дозах 2; 4 и 8 мг/кг. По совокупности данных исследуемый препарат обладал дозозависимым эффектом. В наиболее эффективной дозе 8 мг/кг наблюдались все признаки снижения патологии контактного дерматита. В этой дозе были выявлены: снижение отека на 68%, а также выраженность снижения гистологических признаков воспалительного процесса на 71%.

3.8 ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ «КАРРАГЕНИНОВЫЙ ВОЗДУШНЫЙ МЕШОЧЕК» У КРЫС

Субстанцию ЛК вводили местно, внутрь каррагенинового мешочка, сразу после индукции воспаления в объеме 1 мл на каждое животное. Для оценки фармакологической активности использовали анализ клеточного состава экссудата. ЛК тестировали в трех дозах 4 мг/кг, 0,4 мг/кг и 0,04 мкг/кг при введении внутрь каррагенинового мешочка сразу после введения индуктора воспаления раствора каррагенина.

В качестве показателей противовоспалительной активности субстанции ЛК служил клеточный состав забираемого экссудата, а также продукция провоспалительного медиатора $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Интактная группа характеризовалась низкими значениями общего количества лейкоцитов $1,2 \times 10^6$ кл/мл. Введение внутрь воздушного мешочка 0,5% раствора каррагенина привело к развитию острой воспалительной реакции с инфильтрацией лейкоцитов через 6 часов до $9,2 \times 10^6$ кл/мл, из которых 82% составляли нейтрофилы (Таблица 16).

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

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 (без индукции воспаления), n=7	$1,2 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,6$	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$
2	Контрольная (плацебо), n=7	$9,2 \pm 2,3^*$	$1,4 \pm 0,7$	$0,58 \pm 0,32^{*\#}$	$8,8 \pm 2,3^*$
3	Диклофенак, n=7	$3,7 \pm 0,8^{*\#}$	$0,5 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,11^{*\#}$	$2,8 \pm 0,3^{*\#}$
4	ЛК, 0,04 мг/кг, n=7	$7,9 \pm 2,3^*$	$1,2 \pm 0,5$	$0,13 \pm 0,08^*$	$6,6 \pm 0,9^*$
5	ЛК, 0,4 мг/кг, n=7	$6,8 \pm 2,2^*$	$0,9 \pm 0,4$	$0,08 \pm 0,03^*$	$5,8 \pm 1,1^*$
6	ЛК, 4 мг/кг, n=7	$5,3 \pm 1,2^{*\#}$	$0,6 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,08^{*\#}$	$4,6 \pm 0,5^{*\#}$

Примечание –

1. * - статистически значимые отличия с интактной группой по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$;
2. # - статистически значимые отличия с группой контроля по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Препарат сравнения диклофенак 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. Во всех используемых дозах были достигнуты статистически значимые отличия ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой (таблица 16).

Полученные результаты по развитию воспаления полностью согласуются с результатами зарубежного исследования, в котором была проведена валидация модели каррагенинового воздушного мешочка (Martin S. et al., 1994).

Острое воспаление также характеризовалось продукцией провоспалительных медиаторов. Так, оценка содержания $PGF_{2\alpha}$ в экссудате, продукта каталитической активности ЦОГ-2, 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 42).

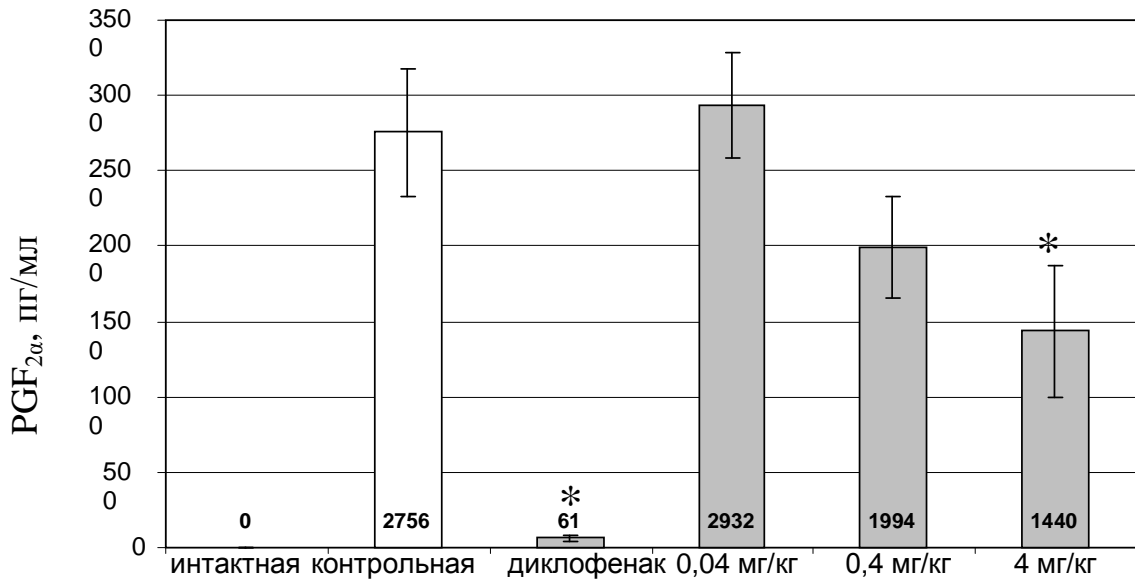


Рисунок 42 - Концентрация PGF_{2α} через 6 часов после индукции воспаления

Примечание - * - различие статистически значимо в сравнении с контрольной группой по t критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

В дозе 4 мг/кг было обнаружено снижение количества PGF_{2α} 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 “каррагининовый 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_{2α} в зоне воспаления.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Из морских организмов получают биоактивные липиды, которые включают в себя жирные кислоты, сфинголипиды, стеролы, диацилглицеролы, дитерпены, сапонины (Glaser K., Lock Y., 1995; Huynh C. et al., 1997; Li D., Sinclair A., 2002). Хорошо известно, что рыбий жир используют для лечения таких заболеваний как артрит, кожные заболевания и астма (Calder P., 2001), а также для профилактики и снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний (Herold P., Kinsella J., 1986; Paganelli F., 2001).

Наиболее широко применяемой группой лекарственных средств для лечения воспалительных заболеваний по-прежнему являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) (Celotti F., Laufer S., 2001). Однако, классические НПВС, такие как аспирин, индометацин, диклофенак, ассоциируются с высокой частотой побочных эффектов за счет неселективного угнетения ЦОГ-1. Наиболее часто побочные эффекты классических НПВС развиваются со стороны желудочно-кишечного тракта - гастропатии и желудочно-кишечные расстройства. Это связано с тормозящим действием НПВС на ЦОГ-1 в слизистой оболочке и снижением синтеза гастропротективных простагландинов (в частности PGE_2), что приводит к уменьшению секреции слизи, повышению кислотности желудочного содержимого и увеличению проницаемости клеточных мембран (Bertolini A. et al., 2001; Kumar K., 2011). Также ингибирование ЦОГ классическими НПВС сдвигает баланс в сторону биосинтеза лейкотриенов, что может приводить к сокращению гладкой мускулатуры и бронхоспазму (Charlier C. et al., 2003; Girloy D. et al., 1998).

Новое поколение НПВС разрабатывают как умеренноселективные (мелоксикам, нимесулид) и высокоселективные ингибиторы ЦОГ-2 (целекоксиб). Поскольку противовоспалительный эффект НПВС обусловлен ингибированием ЦОГ-2, селективные ингибиторы не уступают по противовоспалительной эффективности традиционным НПВС и при этом, в разной степени, относительно безопасны для ЖКТ (FitzGerald G., Patrono C., 2001). Тем не менее накапливается

все больше данных о побочных эффектах со стороны сердечно-сосудистой системы (McPhee S. et al., 2007).

Таким образом, разработка безопасных противовоспалительных лекарственных средств является актуальной задачей.

В мировой практике имеется множество примеров обнаружения и выделения из печени водных организмов различных биологически активных веществ. Так, в печени и других органах японской камбалы *Paralichthys olivaceus* был обнаружен богатый цистеином пептид, проявляющий высокую антимикробную активность и получивший название гепсидин (Hirono I. et al., 2005). В печени атлантического лосося *Salmo salar* найдены и локализованы клетки, вырабатывающие эстроген и ксеноэстроген (Arukwe A., 1999).

Липидный комплекс (ЛК), полученный из печени трески, представляет собой уникальную композицию липофильных соединений (Шиков А. и др., 2012), включая фосфолипиды, свободные жирные кислоты, холестерин, эфиры холестерина и др. По результатам аналитических исследований известно, что исследуемый ЛК содержит фосфолипиды, главным образом, фосфатидилхолин содержащий в своем составе остатки ω -3 полиненасыщенных жирных кислот – эйкозапентаеновую, способную к конкурентному ингибированию фермента циклооксигеназы.

Для анализа биохимических механизмов ингибирования процессов инициации и разрешения острый воспалительный процесс можно представить схематично (рисунок 43).

Развитие острого воспалительного процесса

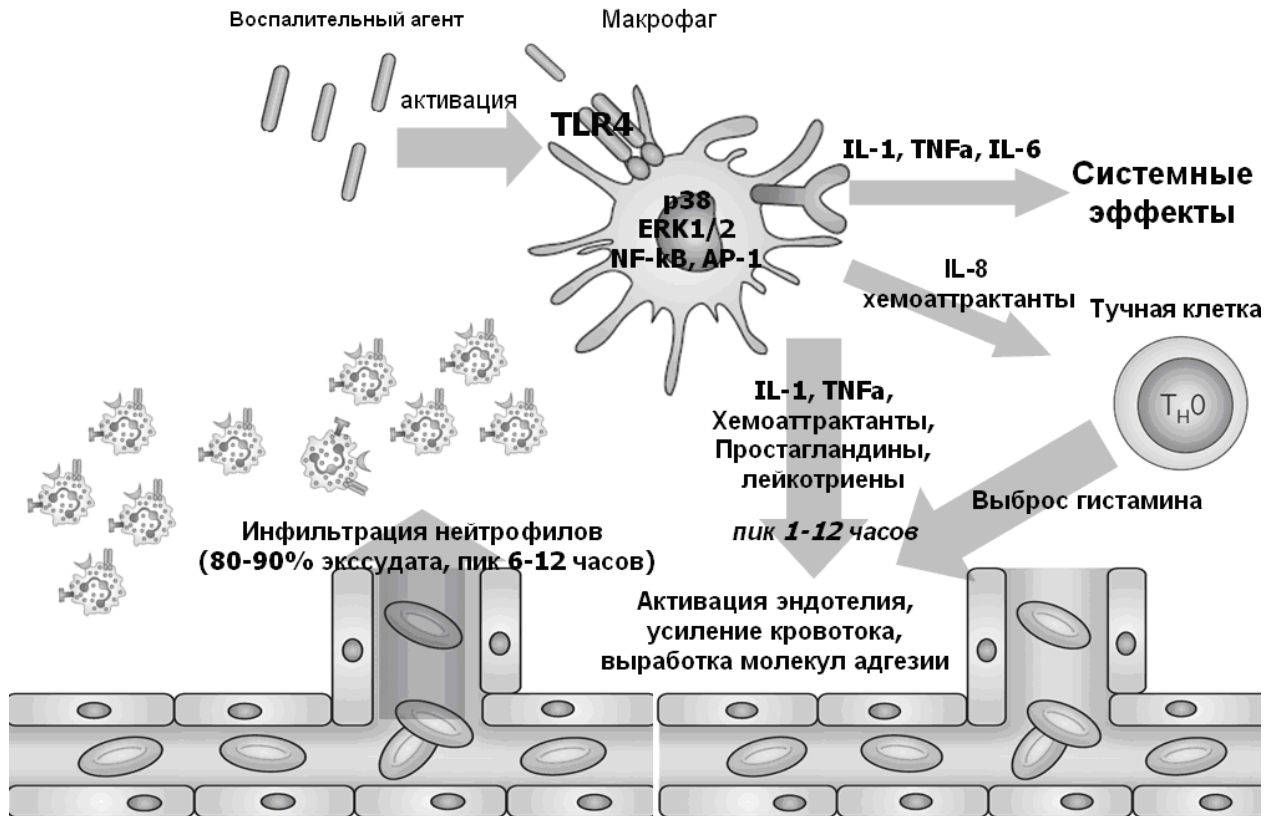


Рисунок 43 - Схематическое описание развития острого воспалительного процесса на примере модели “каррагениновый воздушный мешочек”

На первом этапе каррагенин взаимодействует с рецепторами Toll like на поверхности макрофагов, выстилающих внутрикапсульную область мешочка, что вызывает их активацию и последующий синтез (секрецию) провоспалительных медиаторов (IL-1; IL-6; TNFα, IL-8, простагландинов и лейкотриенов, NO, активных форм кислорода) (Martin S. et al., 1994). Коррекция острого воспалительного процесса на этом этапе делает Toll рецепторы перспективными терапевтическими мишенями (Connolly D., O'Neill L., 2012).

Однако совокупность результатов экспериментов на клеточной линии HEK-Blue-hTLR2, HEK-Blue-hTLR4 и HEK-Blue-hTLR5 демонстрирует, что ЛК в концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 не проявлял агонистического и антагонистического действия в отношении рецепторов TLR1/2, TLR2/2, TLR2/6, TLR4 и TLR5.

Продукция провоспалительных медиаторов в самом начале воспалительного процесса также находится под контролем внутриклеточных сигнальных молекул MAPK p38, ERK1/2, ядерных транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 (Dumitru C., 2000; Caput D. et al., 1986; Ming X. et al., 1998; Winzen et al., 1999) (рисунок 44).

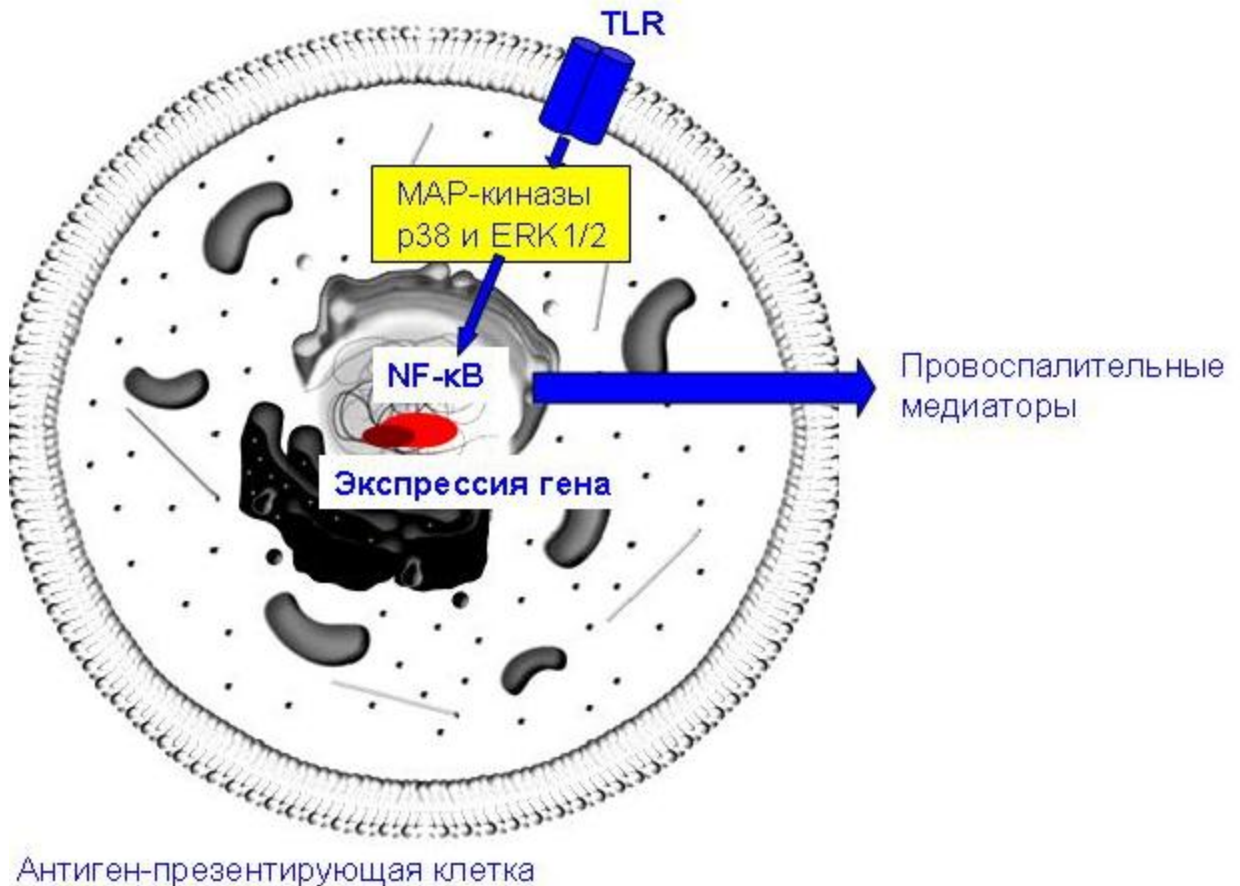


Рисунок 44 – Схематическое отображение передачи сигнала через MAP-киназы от TLR-рецепторов

Оценка действия ЛК в концентрации 50 мкг/мл на ЛПС-индуцированное фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2 показала отсутствие эффекта.

Выброс провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNFα) приводит к развитию как местных, так и системных эффектов. К системным эффектам относится повышение температуры тела, активация гемопоэза, ощущение боли, синтез

белков острой фазы и комплемента, активации различных иммунных клеток крови. К местным эффектам относится активация эндотелия и повышение проницаемости сосудов, усиление местного кровотока в очаге воспаления. В развитии местных эффектов также задействованы хемоаттрактанты, эйкозаноиды, продукты ферментативной реакции ЦОГ-2 и липооксигеназ 5-ЛОГ, 15-ЛОГ, 12-ЛОГ, гистамин, вырабатываемый тучными клетками в ответ на воздействие хемоаттрактантов (Sherwood E., Toliver-Kinsky T., 2004).

Гистамин – важный химический медиатор аллергической реакции и воспаления. Он синтезируется и хранится во вторичных гранулах тучных клеток различных тканей и циркулирующих в крови базофилах. При запуске анафилактической реакции гистамин высвобождается из клеток и взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами. На сегодняшний день охарактеризовано 4 типа гистаминовых рецепторов, однако при аллергическом воспалении наибольшую роль играет взаимодействие гистамина с рецептором первого типа. Через H1-гистаминовые рецепторы медиатор 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 (Nijmeijer S. et al., 2010).

В соответствие с этим существуют две стратегии профилактики воспалительных реакций: ингибирование выброса гистамина из тучных клеток/базофилов и блокада H1-гистаминовых рецепторов пораженного органа. При этом сочетание возможности обеих стратегий в одном препарате повышает его эффективность (Simons F., Simons K., 2011).

Эксперименты по анализу гистамин-индуцированного сокращения гладкой мускулатуры подвздошной кишки морской свинки выявили, что ЛК блокирует H1-гистаминовые рецепторы с EC50, равной 18,1 мкг/мл.

Добавление субстанции ЛК в культуру базофилов крысы также показало, что субстанция оказывает антигистаминное действие, снижая выброс гистамина из клеток более чем в 2 раза в диапазоне концентраций 1, 2, 4 и 16 мкг/мл.

Следующие события начала острой фазы связаны с миграцией в зону воспаления нейтрофилов по градиенту хемоаттрактантов (IL-8 и др). На поверхности эндотелиоцитов находятся рецепторы к перечисленным выше провоспалительным медиаторам (IL-1R, TNFR, гепарансульфат протеогликан). Эндотелиальные клетки синтезируют на свою поверхность молекулы адгезии лейкоцитов (E-селектин, ICAM1, VCAM1), хемокины (IL-8), ЦОГ-2 и соответствующие продукты простагландины. В ответ на стимулы происходит перестройка актинового цитоскелета эндотелиальных клеток для обеспечения миграции лейкоцитов (Jordan S., Sessa W., 2007). Нейтрофилы являются основными клетками очага воспаления (пик достигается к 6-12 часам, 80-90% всех лейкоцитов). Главная роль нейтрофилов в начале воспаления – это элиминация бактерий (антигенов). Время жизни нейтрофилов варьирует и в среднем составляет от 12-24 часов (Mackay C., 2008; Phillipson M., Kubes P., 2011).

Одним из возможных механизмов снижения инфильтрации лейкоцитов может быть ингибирование синтеза простагландинов и лейкотриенов (Holgate S. et al., 2003).

Простагландины обладают широким биологическим действием, участвуют в нормальном гомеостазе, являются ключевыми медиаторами в развитии воспалительного процесса (Rissioti R. et al., 2011). Простагландины синтезируются под действием фермента циклооксигеназы (ЦОГ). В организме обнаружены две ее изоформы – ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (Smith W. et al., 2000). ЦОГ-1 экспрессируется конститутивно, практически, во всех клеточных типах (Dubois R. et al., 1998). В тромбоцитах она обеспечивает превращение арахидоновой кислоты в тромбоксан, в стенках желудка и кишечника – является источником цитопротективных простагландинов, защищающих слизистую оболочку от возможных повреждающих факторов. Экспрессия же гена ЦОГ-2 индуцируется провоспалительными стимулами (Jouzeau J. et al., 1997; Fu J. et al., 1990]. В

результате действия ЦОГ из арахидоновой кислоты образуется нестабильный простагландин (PG) PGH_2 , который под воздействием различных эндопероксидаз превращается в конечные продукты каскада - PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (простациклин) и TXA_2 (тромбоксан A_2) (Funk C., 2001).

Липооксигеназная ферментная система относится к растворимым цитозольным ферментам, она обнаружена в цитоплазме альвеолярных макрофагов, тромбоцитах, тучных клетках и лейкоцитах (Werz O., 2002). Наиболее важным среди ферментов этой системы является 5-липооксигеназа (5-ЛОГ). 5-ЛОГ является индуцибельным ферментом в результате воздействия на клетки различных стимулов (провоспалительные цитокины и антигены) (Werz O., 2002). Конечные метаболиты включают в себя 6 типов лейкотриенов (LT) LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 , LTF_4 (Peters-Golden M., Brock T., 2001; Werz O., 2002). LTB_4 является важным стимулятором активации лейкоцитов (нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов), адгезии к эндотелию сосудов и хемотаксиса клеток в зону воспаления, увеличивает проницаемость сосудов (Bray M., 1980; Ford-Hutchinson A. et al., 1980). Лейкотриены LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 и LTF_4 образуются из нестабильного LTA_4 и главным образом задействованы в патогенезе бронхиальной астмы, вызывая сокращение гладкой мускулатуры. При воспалении усиливают хемотаксис лимфоцитов и эозинофилов (Holgate S. et al., 2003).

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что ЛК ингибировал энзиматическую активность 5-ЛОГ с EC_{50} , равной 16,2 мкг/мл, и ЦОГ-2 с EC_{50} , равной 9,8 мкг/мл. Поскольку в качестве субстратов при постановке ферментативных реакций использовали ω -6 полиненасыщенные жирные кислоты, ингибирование ферментов в условиях *in vitro* может объясняться присутствием в комплексе ω -3 полиненасыщенных жирных кислот. Так эйкозапентаеновая кислота по литературным данным приводит к ингибированию фермента ЦОГ-2 на 85% (Larsen L. et al., 1996).

Исследование биохимических процессов метаболизма жирных кислот в последнее десятилетие привело к открытию новых классов липидных медиаторов,

структурно отличающихся от известных ранее простагландинов и лейкотриенов. К ним относятся резолвины, протектины и марезины (Serhan C. et al., 2011). Предшественники этих медиаторов образуются под действием ЦОГ и ЛОГ из ω -3 полиненасыщенных жирных кислот, включая эйкозапентаеновую кислоту и докозагексаеновую. Главной биологической ролью этих медиаторов является участие в завершении острой фазы воспаления и переход в стадию разрешения (рисунок 45).

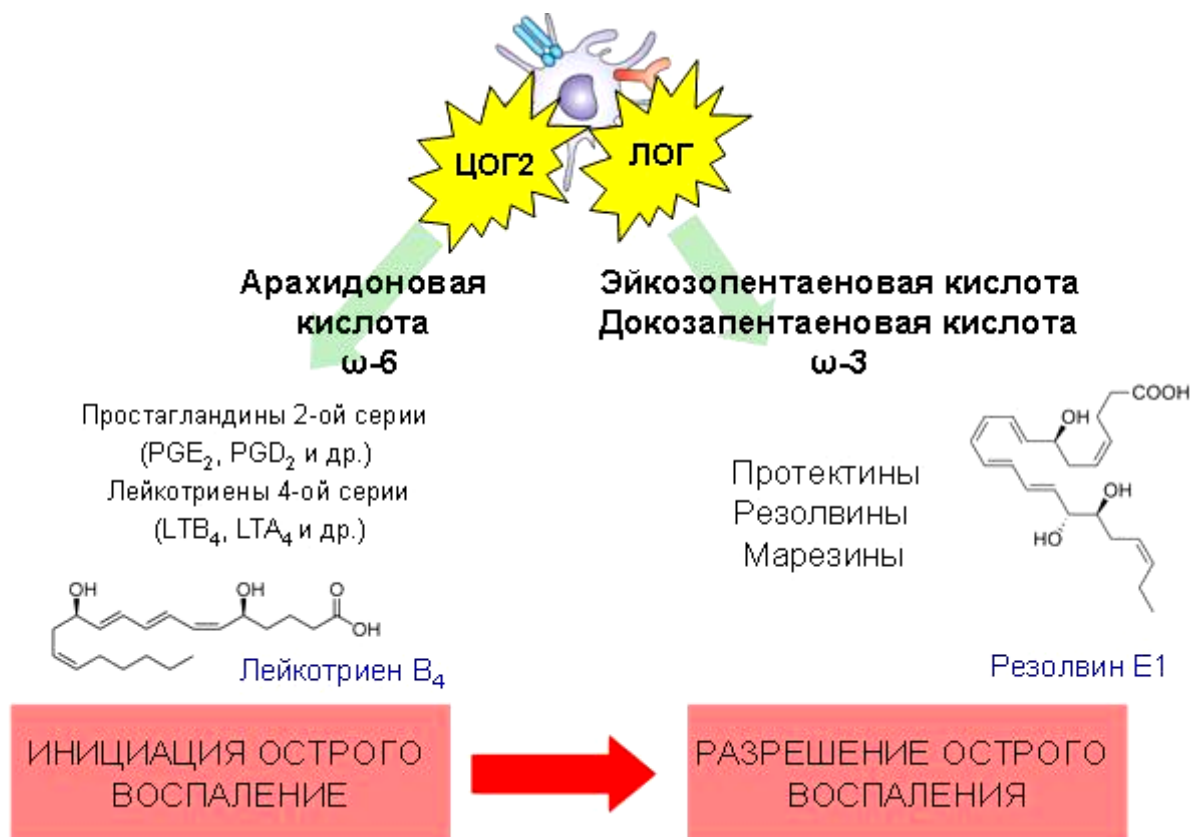


Рисунок 45 – Участие ω -6 и ω -3 ПНЖК в инициации и развитии острого воспаления

Эти медиаторы блокируют инфильтрацию нейтрофилов, привлекают моноциты, нормализуют проницаемость сосудов, вызывают апоптоз остатков нейтрофилов и содействуют их дальнейшему фагоцитозу, контролируют отток макрофагов через лимфатические сосуды и облегчают удаление экссудата и фибрина из воспаленной ткани, что способствует нормальному гомеостазу (Serhan C., Chiang N., 2008).

Таким образом, можно заключить что ЛК приводит к торможению синтеза простагландинов и лейкотриенов из арахидоновой кислоты, и инициирует образование резолвинов, протектинов и марезинов, участвующих в разрешении воспалительного процесса.

Для подтверждения роли ЛК в разрешении воспалительного процесса и ингибирования ферментов ЦОГ-2 и 5-ЛОГ был спланирован эксперимент на классической модели острого воспаления, каррагениновом воздушном мешочке (Taylor G., 2003).

Воздушный мешочек формировался подкожной инъекцией воздуха во внутрикапсульную область спины крысы. Мешочек состоит из покровных клеток, прежде всего из макрофагов и фибробластов. Инъекция раствора каррагенина в мешочек вызывает воспалительную реакцию, которая характеризуется инфильтрацией клеток, увеличением экссудата, и синтезом медиаторов воспаления типа простагландинов, лейкотриенов и цитокинов. Модель удобна как метод *in vivo* для изучения ограниченного воспаления без системных эффектов. Подкожная инъекция воздуха в область спины, за несколько дней приводит к морфологическим изменениям в клеточной выстилке мешочка (Edwards J. et al., 1981). Мешочек состоит главным образом из макрофагов и фибробластов, хорошо васкуляризирован и имеет замечательное сходство с синовиальной сумкой. Ограниченное воспаление характеризуется инфильтрацией клеток в экссудат и образованием биохимических медиаторов, что может быть индуцировано введением внутрь мешочка раздражителей типа каррагенина. Эта модель используется успешно в доклинических изучениях нестероидных противовоспалительных средств (Futaki N. et al., 1993).

Введение внутрь воздушного мешочка 0,5% раствора каррагенина привело к развитию острой воспалительной реакции с инфильтрацией лейкоцитов через 6 часов до $9,2 \times 10^6$ кл/мл, из которых 82% составляли нейтрофилы. Липидный комплекс вводили внутрь мешочка в дозах 4 мг/кг, 0,4 мг/кг и 0,04 мг/кг. Было продемонстрировано, что в дозе 4 мг/кг общее количество лейкоцитов снижалось на 42%, в дозах 0,4 и 0,04 мг/кг на 26 и 14% соответственно.

Важнейшим обнаруженным эффектом явилось снижение концентрации $\text{PGF}_{2\alpha}$ в пробах в 2,2 раза по отношению к контролю, что полностью подтверждает механизм действия, связанный с ингибированием ЦОГ-2 (Крышень К.Л., 2013).

Поскольку в экспериментах было показано, что ЛК снижает выброс гистамина тучными клетками и блокирует H1-гистаминовые рецепторы была выбрана модель контактного дерматита у мышей, где в развитии воспалительного процесса важную роль играют тучные клетки и гистамин.

Проведенные исследования показали, что ЛК обладает противовоспалительной активностью в диапазоне доз 2, 4 и 8 мг/кг. Внутримышечное введение препарата по лечебно-профилактической схеме в дозе 8 мг/кг приводило к снижению отека пораженного уха на 68% спустя трое суток после начала воспаления. Гистологический анализ по бальной системе выявил снижение морфологических признаков воспаления на 78% (Крышень К.Л., 2012).

По-видимому, благодаря комплексному составу ЛК, выделенный из печени трески, действует сразу на несколько терапевтических мишеней, включая ЦОГ-2, 5-ЛОГ, H1-гистаминовые рецепторы и проявляет мембрано-стабилизирующие свойства, ингибируя выброс гистамина тучными клетками (рисунок 46).

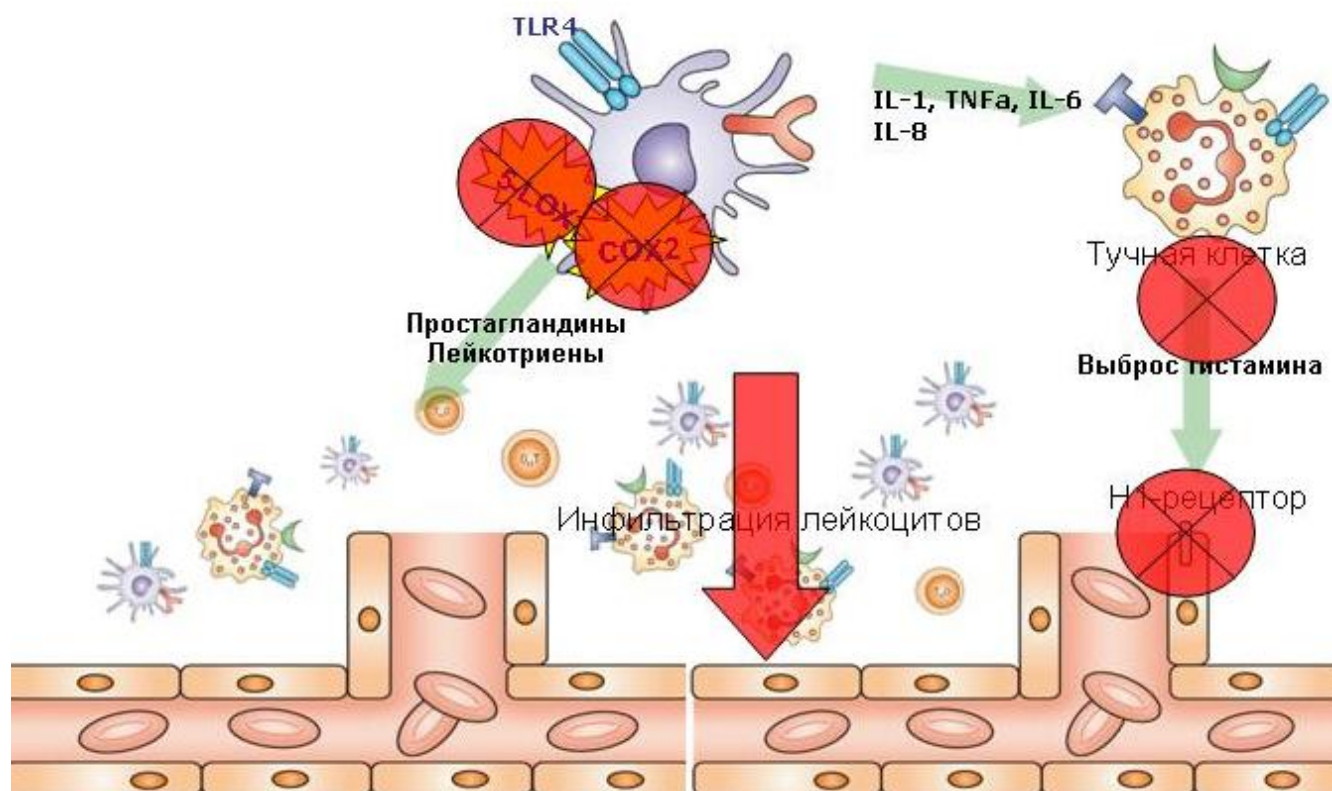


Рисунок 46 – Механизмы противовоспалительного действия липидного комплекса, выделенного из печени трески

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-I;
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 “карагениновый 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 липидомедики 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-1 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА	-	Арахидоновая кислота
ДНК	-	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛК	-	Липидный комплекс
ЛОГ	-	Липооксигеназа
ЛПС	-	Липополисахарид
НПВС	-	Нестероидные противовоспалительные средства
ПАМП	-	Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
ПНЖК	-	Полиненасыщенные жирные кислоты
РНК	-	Рибонуклеиновая кислота
ТД	-	Терапевтическая доза
ЦОГ	-	Циклооксигеназа
AMP	-	Adenosine monophosphate
COX	-	Cyclooxygenase
DNA	-	Deoxyribonucleic acid
DHA	-	Docosahexaenoic acid
EPA	-	Eicosapentaenoic acid
ERK	-	Extracellular signal-regulated kinase
fMLP	-	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
H1R	-	Histamine 1 receptor
5-HPETE	-	5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid
IL	-	Interleukin
IFN	-	Interferon
IRAK	-	IL-1 receptor associated kinase
IRF3	-	interferon responsive factor 3
JNK	-	c-jun N-terminal kinase
LOX	-	Lipoxygenase
LT	-	Leukotriene
LTB4	-	Leukotriene B4

MyD88	-	Myeloid differentiation primary response protein 88
MAPK	-	Mitogen-activated protein kinase
NF- κ B		Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PG	-	Prostaglandin
PGH2	-	Prostaglandin H2
PAF	-	Platelet activating factor
RvE	-	Resolvin E
TBK1	-	TRAF-family binding kinase 1
TCR	-	T-клеточный рецептор
TGF β	-	Transforming growth factor
TLR	-	Toll-подобные рецепторы
TIR-домен	-	Toll/IL-1 гомологичный домен
TNFR	-	Tumor necrosis factor receptor
TNF	-	Tumor necrosis factor
TRAF	-	TNF receptor associated factor 6
TRIF	-	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белан, Э.Б., Гутов, М.В. Антигистаминные производные хинуклидинов / Белан Э.Б. Гутов М.В. // Клиническая дерматология и венерология. - 2010. - Т.5 - С.76-83.
2. Кетлинский, С.А. / Кетлинский, С.А., Симбирцев, А.С. // Цитокины. СПб. Фолиант. - 2008. – 552с.
3. Крышень, К.Л. Оценка противоаллергенных свойств нового полипептидного препарата из печени тресковых / Крышень, К.Л., Демченко, Д.В, Рыбакова, А.В., Дадали, В.А., Рыдловская, А.В., Пожарицкая, О.Н., Макарова, М.Н., Шиков, А.Н., Макаров, В.Г. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2012 №2. - С.38-42.
4. 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.
5. Рыбакова, А.В. Сравнительная оценка эффективности полипептидного препарата при эндометритах коров / Рыбакова, А.В., Крышень, К.Л. Макарова, М.Н., Соколов, В.Д. // Международный вестник ветеринарии. - 2012. - №4. - С.38-41.
6. 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.
7. Стоник, В.А. Природные соединения и создание отечественных лекарственных препаратов / Стоник, В.А., Толстиков, Г.А. // Вестник РАН. - 2008. - Т.78(8). - С.675–687.
8. 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. // Материалы конференции. Фармацевтические и медицинские биотехнологии.

Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва. Россия. - 2012. - С. 385.

9. Ahn, C. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity / Ahn, C., Lee, K., Je, J. // *Int. J. Food Sci. Technol.* - 2010. - Vol.45. - P.562–568.

10. Akira, S. Toll-like receptor signaling / Akira, S., Takeda, K. // *Nature Rev. Immunol.* - 2004. - Vol.4. - P.499-511.

11. Aoki, H. Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation / Aoki, H., Hisada, T., Ishizuka, T., Utsugi, M., Ono, A., Koga, Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. - Vol.400. - P.128–133.

12. Ariel, A. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression / Ariel, A., Fredman, G., Sun, Y., Kantarci, A., Van Dyke, T., Luster, A. // *Nat. Immunol.* - 2006. - Vol.7. - P.1209–1216.

13. Ariel, A. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation / Ariel, A., Serhan, C. // *Trends Immunol.* - 2007. - Vol.28. - P.176–183.

14. Arita, M. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1 / Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S. // *J. Exp. Med.* - 2005. - Vol.201. - P.713–722.

15. Arita, M. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation / Arita, M., Ohira, T., Sun, Y., Elangovan, S., Chiang, N., Serhan, C. // *J. Immunol.* - 2007. - Vol.178. - P.3912–3917.

16. Arukwe, A. Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites / Arukwe, A., Grotmol, T., Haugen, T. // *Sci. Total Environ.* - 1999. - Vol.236(1-3). - P.153-161.

17. Badger, A. Pharmacological profile of SB203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock, and immune function / Badger, A., Bradbeer, J., Votta, B., Lee, J., Adams, J., Griswold, D. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1996. - Vol. 279. - P.1453-1461.

18. Badger, A. Disease-modifying activity of SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-arthritis / Badger, A., Griswold, D., Kapadia, R., Blake, S., Swift, B., Hoffman, S. // *Arthritis Rheum.* - 2000. - Vol.43. - P.175-183.
19. Bagga, D. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion / Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J., Reddy, S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2003. - Vol.100. - P.1751-1756.
20. Barnett, J. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system / Barnett, J., Chow, J., Ives, D. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1994. - Vol.1209. - P.130-139.
21. Bertolini, A. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal pharmacological research / Bertolini, A., Ottani, A., Sandrini, M. // *Pharmacological Research.* - 2001.- Vol.44(6). - P.437-450.
22. Beller, T. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis / Beller, T., Friend, D., Maekawa, A, Lam, B., Austen, K., Kanaoka, Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - Vol.101. - P.3047-3052.
23. Bellingan, G. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes / Bellingan, G., Caldwell, H., Howie, S., Dransfield, I., Haslett, C. // *J. Immunol.* - 1996. - Vol.157. - P.2577-2585.
24. Benkajul, S. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes / Benkajul, S., Morrissey, M. // *J. Agricultural Food Chem.* - 1997. - Vol.45. - P.3423-3430.
25. Bezugla, Y. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages / Bezugla, Y., Kolada, A., Kamionka, S., Bernard, B., Scheibe, R., Dieter, P. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* - 2006. - Vol.79. - P.93-100.

26. Borgeat, P. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187 / Borgeat, P., Samuelsson, B. // Proc Natl Acad Sci USA. - 1979. - Vol.76. - P.2148-2152.
27. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford, M. // Anal. Biochem. - 1976. - Vol.72. - P.248-254.
28. Bray, M. Leukotriene B₄: an inflammatory mediator in vivo / Bray, M., Ford-Hutchinson, A., Smith, M. // Prostaglandins. - 1981. - Vol.22. - P.213-222;
29. Burgess, J. New and emerging analytical techniques for marine biotechnology / Burgess, J. // Curr. Opin. Biotechnol. - 2012. - Vol.23. - P.29-33.
30. Calder, P. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale / Calder, P. // Nutr. Res. - 2001. - Vol.21. - P.309–341.
31. Campbell, E. Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification / Campbell, E., MacManus, C., Kominsky, D., Keely, S., Glover, L., Bowers, B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2010. - Vol.107. - P.14298–14303.
32. Capdevila, J. Cytochrome P-450 arachidonate oxygenase / Capdevila, J., Falck, J., Dishman, E., Karara, A. // Methods Enzymol. - 1990. - Vol.187. - P.385–394.
33. Caput, D. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators / Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., Cerami, A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1986. - Vol. 83. - P.1670-1674.
34. Celotti, F. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept / Celotti, F., Laufer, S. // Pharmacol Res. - 2001. - Vol.43 (5). - P.429-436.
35. Chiang, N. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements / Chiang, N., Fredman, G., Backhed, F., Oh, S., Vickery, T., Schmidt, B. // Nature. - 2012. - Vol.484. - P.524–528.

36. Connolly, D. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics / Connolly, D., O'Neill, L. // *Curr Opin Pharmacol.* - 2012. - Vol.12(4). -P.510-518.
37. Cooper, J. Serotonin (5-hydroxy tryptamine) and histamine / Cooper, J., Bloom, F., Roth, R. // *In The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* - 1986. - Vol.5. - P.315-351.
38. Daisuke, H. Effect of orally administered rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, on a mouse model of the dermatitis caused by 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-repeated application / Daisuke, H., Yukihiro, T., Yuko, T., Haruhiko, M. // *European Journal of Pharmacology.* - 2006. - Vol.532. - P.128-137.
39. DeWitt, D. Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein / DeWitt, D., Smith, W. // *J. Biol Chem.* - 1983. - Vol. 258. - P.3285-3293.
40. Denzlinger, C. Leukotrienes as mediators in tissue trauma / Denzlinger, C., Rapp, S., Hagmann, W., Keppler, D. // *Science.* - 1985. - Vol.230. - P.330-332.
41. Dubois, R. Cyclooxygenase in biology and disease / Dubois, R., Abramson, S., Crofford, L, Gupta, R., Simon, L., Van De Putte, L. // *FASEB J.* - 1998. - Vol.12.- P.1063-1073.
42. Dumitru, C. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway / Dumitru, C., Ceci, J., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J., Patriotis, C., Jenkins, N., Copeland, N., Kollias, G. // *Cell.* 2000. - Vol.103. - P.1071-1083.
43. Dvorak, A. New aspects of mast cell biology / Dvorak, A. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* - 1997. - Vol.114. - P.1-9.
44. Eckenfels, A., Vane, J. Prostaglandins, oxygen tension and smooth muscle tone / Eckenfels, A., Vane, J. // *Br. J. Pharmacol.* - 1972. - Vol.45. - P.451-462.
45. Edwards, J. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An in vivo tissue culture system / Edwards, J., Sedgwick, A., Willoughby, D. // *J. Pathol.* - 1981. - Vol.134. - P.147-153.
46. Eiser, N. Histamine receptors in normal human bronchi / Eiser, N., Mills, J., McRae, K., Snashall, P., Guz, A. // *Clin Sci.* - 1980. - Vol.58. - P.537-544.

47. Euler, U. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandins and vesiglandins) / Euler, U. // *J. Physiol.* - 1936. - Vol.88. - P.213-234.
48. Ferreira, S. Proceedings: prostaglandin generation maintains the smooth muscle tone of the rabbit isolated jejunum / Ferreira, S., Herman, A., Vane, J. // *Br. J. Pharmacol.* - 1972. - Vol.44. - P.328-329.
49. Ferreira, S., Nakamura, M., de Abreu Castro, M. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2 / Ferreira, S., Nakamura, M., de Abreu Castro, M. // *Prostaglandins.* - 1978. - Vol.16. - P.31-37.
50. Feldberg, W. Fever produced by prostaglandin E1 / Feldberg, W., Saxena, P. // *J. Physiol.* - 1971. - Vol.217. - P.547-556.
51. FitzGerald, G. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2 / FitzGerald, G., Patrono, C. // *N. Engl. J. Med.* - 2001. - Vol.345. - P.433-442
52. Ford-Hutchinson, A. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes / Ford-Hutchinson, A., Bray, M., Doig, M., Shipley, M., Smith, M. // *Nature.* - 1980. - Vol.286. - P.264-265.
53. Fredman, G. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: rescue by resolvin E1. / Fredman, G., Oh, S., Ayilavarapu, S., Hasturk, H., Serhan, C., Van Dyke, T. // *PLoS ONE.* - 2011. - Vol.6. - P.24422.
54. Friedl, H. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin / Friedl, H., Till, G., Trentz, O., Ward, P. // *American Journal of Pathology.* - 1989. - Vol.135. - P.203-217.
55. Fu, J. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes / Fu, J., Masferrer, J., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P. // *J. Biol. Chem.* - 1990. - Vol.265. - P.16737-16740.
56. Funk C. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology / Funk C. // *Science.* - 2001. - Vol.294. - P.1871-1875.
57. Futaki, N. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammations / Futaki, N., Arai, I., Hamasaka, Y.,

Takahashi, S., Higuchi, S., Otomo, S. // J. Pharm. Pharmacol. - 1993. - Vol.45. - P.753-755.

58. Garcia Rodriguez, L. Role of dose potency in the prediction of risk of myocardial infarction associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs in the general population / Garcia Rodriguez, L., Tacconelli, S, Patrignani, P. // J. Am. Coll. Cardiol. - 2008. - Vol.52. - P.1628-1636.

59. Gell, P., Coombs, R. Clinical aspects of immunology / Gell, P., Coombs, R. // Oxford. Edinburg. - 1975. - P.1754.

60. Glaser, K. Regulation of prostaglandin H synthase 2 expression in human monocytes by the marine natural products manoalide and scalaradial: novel effects independent of inhibition of lipid mediator production / Glaser, K., Lock, Y. // Biochem. Pharmacol. - Vol.50. - P.913-922.

61. Gilroy, D. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery / Gilroy, D., Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A. // Nat. Rev. Drug Discov. - 2004. - Vol.3. - P.401-416.

62. Golpon, H. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth / Golpon, H., Fadok, V., Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Sauer, C., Welte, T. // FASEB J. - 2004. - Vol.18. - P.1716-1718.

63. Gronert, K. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage / Gronert, K., Kantarci, A., Levy, B., Clish, C., Odparlik, S., Hasturk, H. // J. Immunol. - 2004. - Vol.172. - P.1856-1861.

64. Grutzkau, A. Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206 / Grutzkau, A., Kruger-Krasagakes, S., Baumeister, H., Schwarz, C., Kogel, H., Welker, P., Lippert, U., Henz, B., Moller, A. // Mol.Biol.Cell. - 1998. - Vol.9. - P. 875-884.

65. Gum, R. Acquisition of sensitivity of stress activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket / Gum, R., McLaughlin, M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M., Lee, J. // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol.273. - P.15605-15610.

66. Hamberg, M. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis / Hamberg, M., Samuelsson, B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1973. - Vol.70. - P.899-903.
67. Hayashi, H. Enzymatic conversion of prostaglandin H₂ to prostaglandin F₂ alpha by aldehyde reductase from human liver: comparison to the prostaglandin F synthetase from bovine lung / Hayashi, H., Fujii, Y., Watanabe, K., Urade, Y., Hayaishi, O. // *J. Biol. Chem.* - 1989. - Vol.264. - P.1036-1040.
68. Harada D. Effect of orally administered rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, on a mouse model of the dermatitis caused by 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-repeated application / Harada D. // *European Journal of Pharmacology.* - 2006. - Vol.532. - P.128-137.
69. Harvima, I. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis / Harvima, I., Viinamäki, H., Naukkarinen, A., Paukkonen, K., Neittaanmäki, H., Harvima, R., Horsmanheimo, M. // *Psychother Psychosom.* - 1993. - Vol.60(3-4). - P.168-176.
70. Hasturk, H. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis / Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N. // *FASEB J.* - 2006. - Vol.20. - P.401-403.
71. Hasturk, H. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo / Hasturk, H., Kantarci, A., Goguet-Surmenian, E., Blackwood, A., Andry, C., Serhan, C. // *J. Immunol.* - 2007. - Vol.179. - P.7021-7029.
72. Herold, P. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials / Herold, P., Kinsella, J. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1986. - Vol.43. - P.566-598.
73. Hata A. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation / Hata A., Breyer R. // *Pharmacol. Ther.* - 2004. - Vol.103. - P.147-166.
74. Haworth, O. NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation / Haworth, O., Cernadas, M., Levy, B. // *J. Immunol.* 2011. - Vol.186. - P.6129-6135.

75. Hirai, H. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2 / Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y. // *J Exp. Med.* - 2001. - Vol.193. - P.255-261.
76. Hirono, I. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* / Hirono, I., Hwang, J., Ono, Y. // *FEBS J.* - 2005. - Vol. 272(20). - P.5257-5264.
77. Hong, S. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation / Hong, S., Gronert, K., Devchand, P., Moussignac, R., Serhan, C. // *J. Biol. Chem.* 2003. - Vol.278. - P.14677-14687.
78. Horsmanheimo, M. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis / Horsmanheimo, M. // *Psychother. Psychosom.* 1993. - Vol.60. - P.168-176.
79. Hollenbach, E. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaBs signaling suppresses inflammatory bowel disease / Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., Naumann, M. // *FASEB J.* - 2004. - Vol.18. - P.1550-1552.
80. Holgate, S. The role of mast cells and basophils in inflammation / Holgate, S. // *Clin. Exp.Allergy.* - 2000. - Vol.30. - P.28-32.
81. 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.
82. Hommes, D. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease / Hommes, D., Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G. // *Gastroenterology.* - 2002. - Vol.122. - P.7-14.
83. Hornung, V. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides / Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A.,

- Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G. // *J.Immunol.* - 2002. - Vol.168. - P.4531-4537.
84. Huang, G. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination / Huang, G., Shi, L., Chi, H. // *Cytokine.* - 2009. - Vol.48(3) - P.161-169.
85. Hui, Y. Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure / Hui, Y., Cheng, Y., Smalera, I., Jian, W., Goldhahn, L., Fitzgerald, G. // *Circulation.* - 2004. - Vol.110. - P.3360-3366.
86. Huynh, C. Okadaic acid stimulates phospholipase A2, cyclooxygenase and lipoxygenase / Huynh, C., Pinelli, E., Puiseux-Dao, S. Pfohl-Leszkowicz, A. // *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenesis.* - 1997. - Vol.379. - P.53.
87. Ishizuka, T. Resolvin E1: a novel lipid mediator in the resolution of allergic airway inflammation / Ishizuka, T., Hisada, T., Aoki, H., Mori, M. // *Expert Rev. Clin. Immunol.* - 2008. - Vol.4. - P.669-672.
88. Isobe, Y. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid / Isobe, Y., Arita, M., Matsueda, S., Iwamoto, R., Fujihara, T., Nakanishi, H. // *J. Biol. Chem.* - 2012. - Vol.287. - P.10525-10534.
89. Jackson, J. Pharmacological effects of SB220025, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models / Jackson, J., Bolognese, B., Hillegass, L., Kassis, S., Adams, J., Griswold, D., Winkler, J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1998. - Vol. 284. - P.687-692.
90. Je, J. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis / Je, J., Lee, K., Lee, M., Ahn, C. // *Food Res. Int.* - 2009. - Vol.42(9). - P.1266-1272.
91. Jouzeau, J. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Jouzeau, J., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., Netter, P. // *Drugs.* - 1997. - Vol.53. - P.563-582.

92. Johansen, J. Contact dermatitis / Johansen, J., Frosch, P., Lepoittevin, J. // Springer. - 2011. – P.1240.
93. Jordan, S. Evolving functions of endothelial cells in inflammation / Jordan, S., Sessa, W. // Nature Reviews Immunology. - 2007. - Vol.7. - P.803-815.
94. Kanaoka, Y. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses / Kanaoka, Y., Boyce, J. // J. Immunol. - 2004. - Vol.173. - P.1503-1510.
95. Kiyoshi, T. Toll-like receptors in innate immunity / Kiyoshi, T., Akira, S. // International Immunology. - 2005. - Vol.17. - P.1-14.
96. Krishnamurthy, V. Total synthesis and bioactivity of 18(R)-hydroxyeicosapentaenoic acid / Krishnamurthy, V., Dougherty, A., Haller, C., Chaikof, E. // J. Org. Chem. - 2011. - Vol.76. - P.5433-5437.
97. Kobayashi, M. Overview of marine natural products chemistry / Kobayashi, M., Satari, R. // Proc. Seminar biotechnology. - 1998. - P.23-32.
98. Kim, S. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Allaska Pollack skin / Kim, S., Kim, Y., Byun, H. // J. Agric. Food Chem. - 2001. - Vol.49. - P.1984-1989.
99. Kim, S., Mendis, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review / Kim, S., Mendis, E. // Food Res. Int. - 2006. - Vol.39. - P.383-393.
100. Kumar, K. High-through screening assays for cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, the targets for inflammatory disorders / Kumar, K. // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. - 2011. - Vol.48. - P.256-261;
101. Kyriakis, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation / Kyriakis, J., Avruch, J. // Physiol. Rev. - 2001. - Vol. 81. - P. 807-869.
102. Lam, B. The mechanism of leukotriene B₄ export from human polymorphonuclear leukocytes / Lam, B., Gagnon, L., Austen, K., Soberman, R. // J. Biol. Chem. - 1990. - Vol.265. - P.13438-13441.

103. Larsen, L. Peroxidative oxidation of leucodichlorofluorescein by prostaglandin H synthase in prostaglandin biosynthesis from polyunsaturated fatty acids / Larsen, L., Dahl, E., Bremer, J. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1996. - Vol.1299. - P.47-53.
104. Latz, E. Mechanisms of TLR9 activation / Latz, E., Visintin, A., Espevik, T., Golenbock, D. // *J.Endotoxin Res.* - 2004. - Vol.10. - P.406-412.
105. Le Bon, A. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon / Le Bon, A., Tough, D. // *Curr.Opin.Immunol.* - 2002. - Vol.14. - P.432-436.
106. Lee, H. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders / Lee, H., Surh, Y. // *Biochemical Pharmacology.* - 2012. - Vol.84. - P.1340-1350.
107. Lee, H. Biomedical applications of collagen / Lee, H., Singla, A., Lee, Y. // *Int. J. Pharm.* - 2001. - Vol.221. - P.1-22.
108. Leier, I. Characterization of the ATPdependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells / Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Keppler, D. // *Eur. J. Biochem.* - 1994. - Vol.220. - P.599-606.
109. Levy, B. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution / Levy, B., Clish, C., Schmidt, B., Gronert, K., Serhan, C. // *Nat. Immunol.* - 2001. - Vol.2. - P.612-619.
110. Lewis, R. Slow reacting substances of anaphylaxis: identification of leukotrienes C-1 and D from human and rat sources / Lewis, R., Austen, K., Drazen, J., Clark, D., Marfat, A., Corey, E. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1980. - Vol.77. - P.3710-3714.
111. Li, D. Macronutrient innovations: the role of fats and sterols in human health / Li, D., Sinclair, A. // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* - 2002. - Vol.11. - P.155-162.
112. Lopez-Castejon, G. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules / Lopez-Castejon, G., Baroja-Mazo, A., Pelegrin, P. // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2011. - Vol.68. - P.3095-3107.
113. Lynch, K. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor / Lynch, K., O'Neill, G., Liu, Q., Im, D., Sawyer, N., Metters, K. // *Nature.* - 1999. - Vol.399. - P.789-793.

114. Mackay, C. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies / Mackay, C. // *Nature Immunology*. - 2008. - Vol.9. - P.988-998.
115. MacGlashan, D. Histamine: A mediator of inflammation / MacGlashan, D. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2003. - Vol.112(4). - P.53-59
116. Martin, S. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan / Martin, S., Stevens, A., Brennan, B., Davies, D., Rowland, M., Houston, J. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. - 1994. - Vol.32. - P.139-147.
117. 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.
118. Martinez, F. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective / Martinez, F., Helming, L., Gordon, S. // *Annu. Rev. Immunol.* - 2009. - Vol.27. - P.451-483.
119. Marzulli, F. *Dermatotoxicology* / Marzulli, F., Maibach, H. // Taylor & Francis Group. - 2008. - P.1116.
120. Mauer, H. Disc Electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel / Mauer, H. // *Electrophoresis*. - 1971. - P.44-45.
121. Matsumoto, M. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells / Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T. // *J.Immunol.* - 2003. - Vol.171. – P.3154-3162.
122. Matsumoto, T. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* scherff treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea pig ileum and on histamine release from mast cells / Matsumoto, T., Horiuchi, M., Kamata, K., Seyama, Y. // *J. Smooth Muscle Res.* - 2009. - Vol.45(2-3). - P.75-86.
123. Mayer, A. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective / Mayer, A., Glaser, K., Cuevas, C., Jacobs, R., Kem, W., Little, R. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2010. - Vol.31. - P.255-265.
124. Medzhitov, R. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / Medzhitov, R., Janeway, C. // *Cell*. - 1997. - Vol.91. - P.295-298.

125. McPhee, S. Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* / McPhee, S., Hodges, L., Wright, P., Wynne, P., Kalafatis, N., Harney, D., Macrides, T. // *Comparative Biochemistry and Physiology*. - 2007. - Vol.146. - P.346-356
126. Ming, X. c-Jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells / Ming, X., Kaiser, M., Moroni, C. // *EMBO J.* - 1998. - Vol.4 - P.6039-6048.
127. Minami, M. Molecular cloning of a cDNA coding for human leukotriene A4 hydrolase. Complete primary structure of an enzyme involved in eicosanoid synthesis / Minami, M., Ohno, S., Kawasaki, H., Radmark, O., Samuelsson, B., Jornvall, H. // *J. Biol. Chem.* - 1987. - Vol.262. - P.13873-13876.
128. Monneret, G. Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor / Monneret, G., Gravel, S., Diamond, M., Rokach, J., Powell, W. // *Blood*. - 2001. - Vol.98. - P.1942-1948.
129. Moncada, S. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance inhibits platelet aggregation / Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J. // *Nature*. - 1976. - Vol.263. - P.663-665.
130. Moore, K. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark / Moore, K., Wehrli, S., Roder, H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1993. - Vol. 90(4). - P.1354-1358.
131. Moskowitz, R. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease / Moskowitz, R. // *Semin. Arthritis Rheum.* - 2000. - Vol.30. - P.87-99.
132. Naoki, I. Inhibition of scratching behavior associated with allergic dermatitis in mice by tacrolimus, but not by dexamethasone / Naoki, I. // *European Journal of Pharmacology*. - 2006. - Vol.546. - P.189-196.
133. Nader, M. Inhibition of anaphylaxis like reaction and mast cell activation by Sitagliptin / Nader, M. // *Int. Immunopharmacol.* - 2011. - Vol. 11(8). - P.1052-1056.
134. Nathan, C. Nonresolving inflammation / Nathan, C., Ding, A. // *Cell*. - 2010. - Vol.140. - P.871-882.
135. Nijmeijer, S. Constitutive activity of the histamine H(1) receptor / Nijmeijer, S., Leurs, R., Vischer, H. // *Methods Enzymol.* - 2010. - Vol.484. - P.127-147.

136. Nishikawa, M. Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653 / Nishikawa, M., Myoui, A., Tomita, T., Takahi, K., Nampei, A., Yoshikawa, H. // *Arthritis Rheum.* - 2003. - Vol.48. - P.2670-2681.
137. Nugteren, D. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis / Nugteren, D., Hazelhof, E. // *Biochim Biophys Acta.* - 1973. - Vol.326. - P.448-461.
138. Norling, L. Cutting edge: humanized nano-proresolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing / Norling, L., Spite, M., Yang, R., Flower, R., Perretti, M., Serhan, C. // *J. Immunol.* - 2011. - Vol.186. - P.5543-5547.
139. Odegaard, J. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance / Odegaard, J., Ricardo-Gonzalez, R., Goforth, M., Morel, C., Subramanian, V., Mukundan, L. // *Nature.* - 2007. - Vol.447. - P.1116-1120.
140. Oh, S. Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation / Oh, S., Pillai, P., Recchiuti, A., Yang, R., Serhan, C. // *J. Clin. Invest.* - 2011. - Vol.121. - P.569-581.
141. Oh, S. Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution / Oh, S., Dona, M., Fredman, G., Krishnamoorthy, S., Irimia, D., Serhan, C. // *J. Immunol.* - 2012. - Vol.188. - P.4527-4534.
142. Ozdamar, S. Mast cells in psoriasis / Ozdamar, S., Seckin, D., Kandemir, B., Turanlt, A. // *Dermatology.* - 1996. - Vol.192. - P.190.
143. Paganelli, F. Altered erythrocyte n-3 fatty acids in Mediterranean patients with coronary artery disease / Paganelli, F., Maixent, J., Duran, M., Parhizgar, R., Pieroni, G., Sennoune, S. // *Int. J. Cardiol.* - 2001. - Vol. 78. - P.27-32.
144. Pagels, W. Immunochemical evidence for the involvement of prostaglandin H synthase in hydroperoxide-dependent oxidations by ram seminal vesicle microsomes / Pagels, W., Sachs, R., Marnett, L., Dewitt, D., Day, J., Smith, W. // *J. Biol. Chem.* 1983. - Vol.258. - P.6517-6523.

145. Peters-Golden, M. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets / Peters-Golden, M., Brock, T. // *FEBS Lett.* - 2001. - Vol. 487. - P.323-326;
146. Phillipson, M. The neutrophil in vascular inflammation / Phillipson, M., Kubes, P. // *Nature Medicine.* - 2011. - Vol.17. - P.1381-1390.
147. Piper, P. The release of prostaglandins from lung and other tissues / Piper, P., Vane, J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1971. - Vol.180. - P.363-385.
148. Polak, L. Effect of the elimination of suppressor cells on the development of DNCB contact sensitivity in guinea-pig / Polak, L. Rinck, C. // *Immunology.* - 1977. - Vol.33(3). - P.305-311.
149. Rajasagi, N. Controlling herpes simplex virus-induced ocular inflammatory lesions with the lipid-derived mediator resolvin E1 / Rajasagi, N., Reddy, P., Suryawanshi, A., Mulik, S., Gjorstrup, P., Rouse, B. // *J. Immunol.* - 2011. - Vol.186. - P.1735-1746.
150. Ricciotti, E. Prostaglandins and Inflammation / Ricciotti, E., FitzGerald, G. // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* - 2011. - Vol.31. - P.986-1000.
151. Richards, R. Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*) / Richards, R., O'Neil, D., Thibault, P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2001. - Vol. 284(3). - P.549-555.
152. Saklatvala, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease / Saklatvala, J. // *Curr. Opin. Pharmacol.* - 2004. - Vol.4. - P.372-377.
153. Samuelsson, B. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects / Samuelsson, B., Dahlen, S., Lindgren, J., Rouzer, C. Serhan C. // *Science.* - 1987. - Vol. 237. - P.1171-1176.
154. Sundararaj, K. Simvastatin suppresses LPS-induced MMP-1 expression in U937 mononuclear cells by inhibiting protein isoprenylation-mediated ERK activation / Sundararaj, K., Samuvel, D., Li, Y. // *J. Leukoc. Biol.* - 2008. - Vol.84(4). - P.1120-1129.

155. Sato, H. Microdialysis assessment of microfibrinous collagen containing a p-glycoprotein-mediated transport inhibitor, cyclosporine A, for local delivery of etoposide / Sato, H., Kitazawa, H., Adachi, I., Horikoshi, I. // *Pharm. Research.* - 1996. - Vol.13. P.1565-1569.
156. Saxena, P. Prostaglandin-like activity in the cerebrospinal fluid of febrile patients / Saxena, P., Beg, M., Singhal, K., Ahmad, M. // *Ind. J. Med. Res.* - 1979. - Vol.70. - P.495-498.
157. Savill, J. Corpse clearance defines the meaning of cell death / Savill, J., Fadok, V. // *Nature.* - 2000. - Vol.407. - P.784-788.
158. Serafin, W. Mediators of immediate hypersensitivity reactions / Serafin, W., Austen, K. // *N. Engl. J. Med.* - 1987. - Vol.317. - P.30-34.
159. Serhan, C. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes / Serhan, C., Hamberg, M., Samuelsson, B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1984. - Vol.118. - P.943-949.
160. Serhan, C. Resolution of inflammation: the beginning programs the end / Serhan, C., Savill, J. // *Nat. Immunol.* - 2005. - Vol.6. - P.1191-1197.
161. 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.
162. Serhan, C. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus / Serhan, C., Chiang, N. // *Br. J. Pharmacol.* - 2008. - Vol.153. - P.200-215.
163. Serhan, C. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators / Serhan, C., Chiang, N., Van Dyke, T. // *Nat. Rev. Immunol.* - 2008. - Vol.8. - P.349-361.
164. Serhan, C. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions / Serhan, C., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P., Porter, T. // *J. Exp. Med.* - 2009. - Vol.206. - P.15-23.

165. Serhan, C. Novel anti-inflammatory pro-resolving mediators and their receptors / Serhan, C., Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N. // *Curr. Top. Med. Chem.* - 2011. - Vol.11. - P.629-647.
166. Serhan, C. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain / Serhan, C., Dalli, J., Karamnov, S., Choi, A., Park, C., Xu, Z. // *FASEB J.* - 2012. - Vol.26. - P.1755-1765.
167. Seki, H. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury / Seki, H., Fukunaga, K., Arita, M., Arai, H., Nakanishi, H., Taguchi, R. // *J. Immunol.* - 2010. - Vol.184. - P.836-843.
168. Schwartz, L. Mediators of human mast cells and human mast cell subsets / Schwartz, L. // *Ann. Allergy.* - 1987. - Vol.58. - P.226-235.
169. Schif-Zuck, S. Saturated efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids / Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C., Ariel, A. // *Eur. J. Immunol.* - 2011. - Vol.41. - P.366-379.
170. Sherwood, E. Mechanisms of the inflammatory response / Sherwood, E., Toliver-Kinsky, T. // *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* - 2004. - Vol.18(3). - P.385-405.
171. Shimizu, T. Purification of PGH-PGD isomerase from rat brain / Shimizu, T., Yamamoto, S., Hayaishi, O. // *Methods Enzymol.* - 1982. - Vol.86. - P.73-77.
172. Schwab, J. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes / Schwab, J., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C. // *Nature.* - 2007. - Vol.447. - P.869-874.
173. 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.
174. Simons, F. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress / Simons, F., Simons, K. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2011. - Vol.128. - P.1139-1150.
175. Simopoulos, A. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids / Simopoulos, A., Leaf, A., Salem, J. // *J. Am. Coll. Nutr.* - 1999. - Vol.18. - P.487-499.

176. Smith, M. Prostaglandins and the polymorphonuclear leucocyte / Smith, M. // Agents Actions Suppl. - 1979. - P.91-103.
177. Smyth, E. Prostanoids in health and Disease / Smyth, E., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., FitzGerald, G. // J. Lipid Res. - 2009. - Vol.50. - P.423-428.
178. Smith, W. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology / Smith, W., DeWitt, D., Garavito, R. // Annu. Rev. Biochem. - 2000. - Vol. 69. - P.145.
179. Spite, M. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis / Spite, M., Norling, L., Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N. // Nature. - 2009. - Vol.461. - P.1287-1291.
180. Stables, M. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution / Stables, M., Gilroy, D. // Progress in Lipid Research. - 2011. - Vol.50. - P.35-51.
181. Stein, M. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation / Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. // J. Exp. Med. - 1992. - Vol.176. - P.287-292.
182. Sun, Y. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation / Sun, Y., Oh, S., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E. // J. Biol. Chem. - 2007. - Vol.282. - P.9323-9334.
183. Taylor, G. Current protocols in Pharmacology. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch in the Rat / Taylor, G. // Wiley Interscience. - 2003. - P.3489.
184. Tager, A. LT1 and LT2: the leukotriene B(4) receptors / Tager, A., Luster, A., Luster, B. // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. - 2003. - Vol.69. - P.123-134.
185. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis / Tabas, I. // Nat. Rev. Immunol. - 2010. - Vol.10. - P.36-46.
186. Tanaka, Y. Immunochemical and kinetic evidence for two different prostaglandin H-prostaglandin E isomerases in sheep vesicular gland microsomes / Tanaka, Y., Ward, S., Smith, W. // J Biol Chem. - 1987. - Vol.262. - P.1374-1381.
187. Tjonahen, E. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis / Tjonahen, E., Oh, S.,

- Siegelman, J., Elangovan, S., Percarpio, K., Hong, S. // *Chem. Biol.* - 2006. - Vol.13. - P.1193-1202.
188. Theoharides, T. Mast cells: the immune gate to the brain / Theoharides, T. // *Life Sci.* - 1990. - Vol.46. - P.607-617.
189. Theoharides, T. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress / Theoharides, T., Cochrane, D. // *J. Neuroimmunol.* - 2004. - Vol.146. - P.1-12.
190. Theoharides, T. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation / Theoharides, T., Kempuraj, D., Tagen, M., Conti, P., Kalogeromitros, D. // *Immunol.Rev.* - 2007. - Vol.217. - P.65-78.
191. Theoharides, T. Mast cells and inflammation / Theoharides, T., Alysandratos, K., Angelidou, A., Delivanis, D., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., Kalogeromitros, D. // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 2012. - Vol.1822. - P.21-33.
192. Thurmond, R. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines / Thurmond, R., Gelfand, E., Dunford, P. // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2008. - Vol.7(1). - P.41-53.
193. Tsuji, R. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity / Tsuji, R., Hoshino, K., Noro, Y., Tsuji, N., Kurokawa, T., Masuda, T., Akira, S., Nowak, B. // *Clin. Exp. Allergy.* - 2003. - Vol.33(2). - P.249-258.
194. Ullrich, V. Thromboxane synthase as a cytochrome P450 enzyme / Ullrich, V., Haurand, M. // *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* - 1983. - Vol.11. - P.105-110.
195. Van Hove, C., Maes, T., Joos, G., Tournoy, K. Chronic inflammation in asthma: a contest of persistence vs resolution / Van Hove, C., Maes, T., Joos, G., Tournoy, K. // *Allergy.* - 2008. - Vol.63. - P.1095-1109.
196. Vandivier, R., Henson, P., Douglas, I. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease / Vandivier, R., Henson, P., Douglas, I. // *Chest.* - 2006. - Vol.129. - P.1673-1682.

197. Vassiliou, E. Bone marrow-derived dendritic cells generated in the presence of resolvin E1 induce apoptosis of activated CD4⁺ T cells / Vassiliou, E., Kesler, O., Tadros, J., Ganea, D. // *J. Immunol.* - 2008. - Vol.181. - P.4534-4544.
198. Venugopal, V. Spray dried protein powder from threadfin beam: Preparation, properties and comparison with FPC type B / Venugopal, V., Chawla, S., Nair, P. // *J. Muscle Foods.* - 1996. - Vol.7. - P.55-58.
199. Vogel, S. TLRs: different adapter utilization by Toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression / Vogel, S., Fitzgerald, K., Fenton, M. // *Molecular interventions.* - 2003. - Vol.3. - P.466-477.
200. Voll, R. Immunosuppressive effects of apoptotic cells / Voll, R., Herrmann, M., Roth, E., Stach, C., Kalde, J., Girkontaite, I. // *Nature.* - 1997. - Vol.390. - P.350-351.
201. Wada, Y. R-130823, a novel inhibitor of p38 MAPK, ameliorates hyperalgesia and swelling in arthritis models / Wada, Y., Nakajima-Yamada, T., Yamada, K., Tsuchida, J., Yasumoto, T., Shimozato, T., Aoki, K., Kimura, T., Ushiyama, S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 2005. - Vol.506. - P.285-295.
202. Watters, M. Tropical marine neurotoxins: venoms to drugs / Watters, M. // *Semin. Neurol.* - 2005. - Vol.25(3). - P.278-289.
203. Werz, O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology / Werz, O. // *Curr. Drug Targets Inflamm. - Allergy.* - 2002. - Vol.1. - P.23-44.
204. Winzen, R. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism / Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C., Shyu, A., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., Holtmann, H. // *EMBO.* - 1999. - Vol.18. - P.4969-4980.
205. Williams, T. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation / Williams, T. // *Br. J. Pharmacol.* - 1979. - Vol.65. - P.517-524.
206. Williams, T. Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine-independent action of rabbit C5a / Williams, T., Jose, P. // *J. Exp. Med.* - 1981. - Vol.153. - P.136-153.

207. Woolley, D. The mast cell in inflammatory arthritis / Woolley, D. // *N. Engl. J. Med.* - 2003. - Vol.348. - P.1709-1711.
208. Xue, L. Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells / Xue, L., Gyles, S., Wetley, F., Gazi, L., Townsend, E., Hunter, M. // *J. Immunol.* - 2005. - Vol.175. - P.6531-6536.
209. Zhang, E., Chen, A., Zhu, B. Mechanism of Dinitrochlorobenzene-Induced Dermatitis in Mice: Role of Specific Antibodies in Pathogenesis / Zhang, E., Chen, A., Zhu, B. // *PLoS ONE.* - 2009. - Vol.4(11). - P.1-12.
210. Zarembek, K. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines / Zarembek, K., Godovsky, P. // *J. Immunol.* - 2002. - Vol.168. - P.554-561.