

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ
КОМПЛЕКСА ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ ВИДА
STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS

© 2018 г. А.Е. Кательникова^{1,2*}, К.Л. Крышень², М.Н. Макарова²,
В.Г. Макаров², А.Н. Шиков²

*E-mail: katelnikova.ae@doclinika.ru

¹Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, Россия;

²ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Россия

Поступила: 27.11.2017. Принята: 25.12.2017

По результатам исследований субстанция, представляющая собой комплекс гликозилированных полипептидов (КГП), на двух моделях острого бронхита, индуцированного сигаретным дымом и индуцированного формалином, у крыс, оказывала противовоспалительное действие. На основании полученных данных начался поиск механизмов противовоспалительного действия КГП. Целью исследования являлось изучение влияния КГП, выделенного из внутренностей морских ежей вида *S. droebachiensis* на активность двух изоформ циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), фермента 5-липооксигеназы (5-ЛОГ), липополисахарид (ЛПС)-индуцированное фосфорилирование митоген-активированной протеинкиназы (МАР-киназы) p38, толл-подобный рецептор 4 (TLR4). Активность КГП в отношении ферментов ЦОГ1/2 и 5-ЛОГ изучали с использованием коммерческих наборов (Cayman Chemicals, USA). Влияние на ЛПС-индуцированную активацию (фосфорилирование) МАР-киназы p38 изучали в культуре моноцитов человека линии U937. Для оценки взаимодействия КГП с TLR4 использовали клеточную линию НЕК-Blue-hTLR4 (Invivogen, США). Результаты проведенного исследования показали, что в тестах *in vitro* КГП ингибировал активность ЦОГ2 с IC50 равной 67 мкг/мл и ЛПС-индуцированную активацию (фосфорилирование) МАР-киназы p38 с IC50—2,7 мкг/мл за счет блокады TLR4. На активность ЦОГ1 и 5-ЛОГ КГП не влиял. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что мишенями противовоспалительного действия КГП являются: ЦОГ2, МАР-киназа p38 и TLR4.

Ключевые слова: гликозилированный полипептидный комплекс; морские ежи; *S. droebachiensis*; циклооксигеназа; липооксигеназа; p38 МАРК.

DOI: 10.7868/S1028722118010094

Адрес: 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолковский, 245. Кательникова Анастасия Евгеньевна. Тел. 8(911)0039975. E-mail: katelnikova.ae@doclinika.ru

Авторы:

Кательникова А.Е., аспирант кафедры фармакологии, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, руководитель группы иммунобиологических исследований ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Россия;

Крышень К.Л., к.б.н., руководитель отдела токсикологии и микробиологии исследований ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Россия;
Макарова М.Н., д.м.н., заместитель по науке исследований ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Россия;
Макаров В.Г., д.м.н., профессор, генеральный директор исследований ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Россия;
Шиков А.Н., д.фарм.н., заместитель по инновационной деятельности исследований ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Ленинградская обл., Россия

ВВЕДЕНИЕ

Морские организмы представляют собой колоссальный источник природных ресурсов. Во всем мире среди фармацевтических компаний ведется борьба за разработку препаратов из сырьевой базы океана, поскольку соединения из морских организмов обладают огромным спектром фармакологической активности, в том числе антимикробной, противовирусной, антиоксидантной, противовоспалительной и другой [1, 2].

Открытие роли различных регуляторных пептидов в организме, а также понимание их молекулярных механизмов действия, позволяют рассматривать пептиды, полученные из природных источников, как перспективные кандидаты в препараты. Сложность разработки эффективных и в то же время безопасных противовоспалительных средств заключается в том, что воспаление поливалентный, весьма динамичный процесс с множеством альтернативных и перекрещивающихся путей, существующих, как на уровне внутриклеточных взаимодействий сигнальных каскадов, так и на уровне регуляции продукции медиаторов воспаления [3, 4]. В силу этого существует необходимость создания новых препаратов, способных регулировать функциональную активность не одной, а многих молекул, участвующих в воспалении [5], с минимальным набором или полным отсутствием побочных эффектов.

Одним из возможных механизмов противовоспалительного действия новых лекарственных средств является угнетение продукции простагландинов из арахидоновой кислоты путем ингибирования фермента циклооксигеназы (ЦОГ). Существует две изоформы данного фермента ЦОГ1 и ЦОГ2. Известно, что именно ингибирование ЦОГ2 обуславливает противовоспалительное действие нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) [6]. В свою очередь, подавление фермента ЦОГ1 НПВС связано с целым рядом побочных эффектов, таких как эрозии и язвы желудочно-кишечного тракта, печеночная и почечная недостаточности, а также нарушение свертываемости крови и явления бронхоспазма. Данные эффекты терапии НПВС обусловлены блокадой синтеза цитопротекторных простагландинов (PG), в частности PGI₂, PGE₂ и тромбоксана A₂ [7]. Противовоспалительное действие может быть также связано с ингибированием фермента 5-липоксигеназы (5-ЛОГ) [8]. В качестве противовоспалительного механизма

действия можно также рассматривать блокаду TLR и ингибирование фосфорилирования MAP-киназы p38. TLR отвечают за распознавание антигена, активацию антиген-презентирующих клеток, синтез медиаторов воспаления и развитие иммунного ответа [9]. Кроме того, передача сигнала через MAP-киназный каскад происходит через различные рецепторы, участвующие в инициации и развитии воспаления, в том числе TLR [10]. По данным ряда исследований, MAP-киназа p38 играет ключевую роль в развитии воспаления: она фосфорилирует и, таким образом, активирует многие факторы транскрипции, в числе которых ядерный фактор κB (NF-κappaB), ATF-2 и ELK-1; во-вторых, p38 обеспечивает посттранскрипционную регуляцию синтеза ряда белков воспаления [11, 12].

MAP-киназа p38, являясь звеном внутриклеточного сигналинга, участвует в синтезе провоспалительных цитокинов. При стимуляции клеток факторами воспаления (бактериальные агенты, цитокины, вирусы и др.) происходит фосфорилирование MAP-киназ, что активирует факторы, запускающие транскрипцию медиаторов воспаления (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8 и другие) [13, 14, 15]. В то же время, регуляция защитных реакций организма медиаторами воспаления, происходит за счет активации иммунного ответа. Продукция цитокинов является составной частью клеточного ответа, связанного с распознаванием клетками миеломоноцитарного ряда сходных структурных компонентов различных патогенов. Стимуляция большинства дальнейших реакций в развитии воспалительной реакции обеспечивает расширение активации различных типов клеток, участвующих в поддержании и регуляции воспаления, включая все типы лейкоцитов, макрофаги, дендритные клетки Т- и В-лимфоциты. Это обеспечивает последовательные этапы развития воспалительной реакции, являющейся основным механизмом реализации иммунитета [9].

Таким образом, активность ферментов ЦОГ1, ЦОГ2 и 5-ЛОГ, MAP-киназа p38, а также выраженность клеточного иммунитета являются перспективными мишенями для поиска новых противовоспалительных средств.

Целью данного исследования являлась оценка влияния комплекса гликозилированных полипептидов, выделенного из морских ежей вида *S. droebachiensis* на активность двух изоформ циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), фермента 5-ЛОГ, липополисахарид (ЛПС)-индуцированное фосфорилирование митоген-активированной протеинкиназы (MAP-киназы) p38, TLR4 *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая субстанция представляет собой комплекс гликозилированных полипептидов (КГП), выделенных из внутренностей зеленых морских ежей вида *S. droebachiensis* в нашей лаборатории. Методами ГЖХ–МС и ВЭЖХ–ELSD установлено, что субстанция содержит 10–15% пептидов, 35–45% аминокислот, 4–8% фосфолипидов, микроэлементы, сахара. При проведении электрофореза в полиакриламидном геле идентифицированы пептиды с молекулярными массами 19–15 кДа, 6–3,5 кДа и менее 3,5 кДа [16].

Оценка влияния на активность
циклооксигеназы 1 и 2

Исследование влияния КГП на активность ЦОГ1 и ЦОГ2 проводили с использованием набора COX inhibitor screening assay kit (Cayman Chemicals, USA) в соответствии с инструкцией производителя.

Субстанцию изучали в концентрациях 200, 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл. В качестве позитивных контролей использовали селективный ингибитор ЦОГ1 SC-560 (Cayman Chemicals, USA) в концентрациях 0,0035–3,5 мкг/мл и селективный ингибитор ЦОГ2 нифлумовую кислоту (Cayman Chemicals, USA) в концентрациях 0,0028–2,8 мкг/мл. Негативным контролем служил растворитель – дистиллированная вода. Оценку активности ферментов проводили по концентрации конечного продукта реакции простагландина F2 α (PGF2 α) с помощью иммуноферментного анализа.

Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США). Концентрацию простагландина, продуцируемого в ходе каталитической реакции с участием ЦОГ1/2, вычисляли по калибровочной кривой, построенной по оптической плотности разных концентраций стандарта. Значения, характеризующие контрольные пробы, объединяли в группу контроля, определяли среднее и принимали за 100%. Значения концентрации остальных групп выражали в проценте от контроля (% ингибирования).

Процент ингибирования считали по формуле (1):

$$100 - \frac{C_{\text{проба}}}{C_{\text{контроль}}} \times 100 \quad (1)$$

где C – концентрация продукта реакции.

Оценка влияния на активность
5-липооксигеназы

Исследование влияния КГП на энзиматическую активность 5-ЛОГ проводили в концентрациях 1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 мкг/мл с использованием коммерческого набора Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) и очищенной 5-ЛОГ картофеля (Cayman Chemical, USA). В качестве препарата сравнения в соответствии с данными производителя тест-системы использовали неселективный ингибитор 5-ЛОГ – NDGA (Cayman Chemicals, USA) в концентрациях 0,5–15 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель – дистиллированную воду.

С помощью тест-системы оценивали количество гидропероксидов, продуцируемых в реакции липооксигенации.

Время инкубации неселективного ингибитора NDGA/исследуемого препарата с 5-ЛОГ (фермент) и линоленовой кислотой (субстрат) составляло 10 минут. Ферментативный катализ останавливали внесением хромогена через 5 минут, после чего проводили фотометрическое измерение на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, USA) при длине волны 490 нм.

По величине оптической плотности вычисляли активность фермента 5-ЛОГ по формуле (2):

$$\frac{A_{490} / \text{мин}}{9,47 \text{ мМ}^{-1}} \times \frac{0,21 \text{ мл}}{0,09 \text{ мл}} \times 1000 =$$

$$= \text{ммоль} / \text{мин} / \text{мл} \quad (2)$$

где: $A_{490}/\text{мин}$ – оптическая плотность при длине волны 490 нм; $9,47 \text{ мМ}^{-1}$ – коэффициент экстинкции; 0,21 мл – общий объем пробы; 0,09 мл – объем образца.

Процент ингибирования вычисляли по формуле (3):

$$100 - \frac{A\Phi_{\text{проба}}}{A\Phi_{\text{контроль}}} \times 100 \quad (3)$$

где $A\Phi$ – активность фермента

Оценка влияния на ЛПС-индуцированную
активацию (МАР)-киназы p38

Исследование проводили в культуре моноцитов человека линии U937.

Фосфорилирование МАР-киназы оценивали методом иммуноблотинга по количеству фосфорилированных форм белков после инкубации

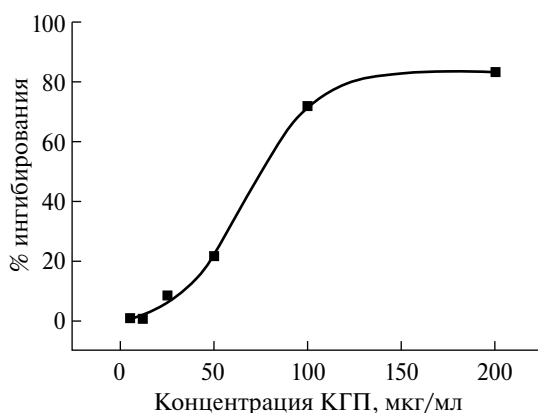


Рис. 1. График зависимости количества простагландина PGF_{2a}, продуцируемого в ходе каталитической реакции с участием фермента ЦОГ₂, от концентрации КГП.

клеток с КГП в течение 16 часов и обработкой ЛПС в концентрации 1 мкг/мл в течение 60 мин. КГП тестировали в концентрациях 16, 8, 4, 2, 1 и 0,5 мкг/мл.

Исследование проводили в сравнении со специфическим ингибитором активации MAP-киназы ERK1/2 U0126 (3,8 мкг/мл) и неспецифическим ингибитором ЛПС-сигналинга – антителами к толл-лайк рецептору 4-го типа (Anti-hTLR4 IgA25) в концентрации 5 мкг/мл.

Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия (SDS-PAGE) [17].

Оценку полученных результатов производили путем сканирования рентгеновской пленки на сканере Epson Perfection V330 Photo и последующего измерения относительной плотности проявленных полос с использованием программного обеспечения Scion Image. На каждой пластине рентгеновской плёнки значения, характеризующие контрольные пробы, объединяли в группу контроля, определяли среднее и принимали за 100%. Значения плотности остальных полос выражали в проценте от контроля. Перевод значений в относительные величины (% от контроля) позволил объединить результаты трех экспериментов и, таким образом, увеличить выборку до $n=9$.

Оценка взаимодействия с рецепторами TLR4

В исследовании использовали клеточную линию HEK-Blue-hTLR4 (Invivogen, США). В эту клеточную линию трансфицирована плазмида, несущая ген секретируемого фермента эмбриональной щелочной фосфатазы. Стимуляция рецептора агонистом приводит к активации

транскрипционных факторов NF- κ B и AP1 и последующей выработке фермента. Уровень стимуляции рецепторов определяли по ферментативной цветной реакции после добавления реагента QUANTI-Blue (Invivogen). Измеряли оптическую плотность при длине волны 625–655 нм (пурпурно-синяя окраска). Для нейтрализации рецепторов TLR4 использовали соответствующие поликлональные антитела TLR4 Anti-hTLR4-IgA (InvivoGen, USA) в концентрации 1 мкг/мл.

КГП тестировали в концентрациях 16, 8, 4, 2, 1 и 0,5 мкг/мл. В качестве лиганда использовался ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл.

Статистическая обработка

Статистический анализ данных в исследовании выполняли с помощью программного обеспечения Статистика 10.0 (StatSoft, США). Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка влияния КГП на активность циклооксигеназы 1

Установлено, что IC₅₀ для селективного ингибитора SC-560 составила 0,1 мкМ (35 нг/мл). Субстанция КГП во всех исследуемых концентрациях не оказывала влияния на активность ЦОГ1 (ANOVA, $p>0,05$).

Оценка влияния КГП на активность циклооксигеназы 2

КГП ингибировал активность фермента ЦОГ₂ дозозависимо. Кривая имела сигмоидный характер с выходом на плато на уровне 80% в концентрациях 50–200 мкг/мл (**рис. 1**).

Рассчитанная эффективная концентрация (IC₅₀, 50% ингибирующей активности) КГП составила $67 \pm 3,1$ мкг/мл. Для стандартного селективного ингибитора ЦОГ₂ (нифлумовой кислоты), IC₅₀ составила 0,03 мкг/мл, что хорошо согласуется с данными от производителя тест-системы [18].

Оценка влияния КГП на активность 5-липооксигеназы

Результаты проведенного исследования показали, что неселективный ингибитор липооксигеназы NDGA снижал активность фермента. IC₅₀ вычислили с помощью программного обеспечения Excel 2003 (Microsoft Office, USA), где

она составила 5,3 мкМ (1,6 мкг/мл). Таким образом, выявленная ингибирующая активность NDGA позволяет сделать вывод об адекватности выполнения тестирования.

Результаты тестирования показали, что КГП не был эффективен в отношении активности фермента 5-ЛОГ ни в одной из исследованных концентраций.

Оценка влияния КГП на ЛПС-индуцированную активацию митоген-активированной (МАР)-киназы р38

Оценка количества фосфорилированных форм МАР-киназы р38 показала, что субстанция КГП оказывает ингибирующее действие на ЛПС-индуцированную активацию (фосфорилирование) МАР-киназы р38. Данный эффект носил дозозависимый характер в виде экспоненциальной зависимости. IC₅₀ субстанции КГП составило $2,7 \pm 0,3$ мкг/мл (рис. 2).

По литературным данным подавление внутриклеточного сигналинга р38 оказывает противовоспалительное действие. Так специфические ингибиторы р38 (SB203580, SB220025, R-130823, FR167653) эффективно предотвращали развитие коллаген-индуцированного артрита у мышей [19, 20]. SB242235 подавлял развитие адьювант-индуцированного артрита у крыс [21]. SB203580 блокировал ЛПС-индуцированную продукцию TNF α у мышей и крыс, а также снижал ЛПС-индуцированную смертность у мышей [21]. Ингибитор р38 CNI-1493 вызвал улучшение клинической картины и оказал терапевтическое действие на слизистую оболочку пациентов, страдающих болезнью Крона [22].

Нами было показано ингибирующее действие КГП на ЛПС-стимулированное фосфорилирование МАР-киназы р38, поэтому мы предположили, что КГП может взаимодействовать с TLR4 рецепторами, отвечающих за распознавание ЛПС.

Результаты исследования представлены на рис. 3.

По результатам исследования стимуляция клеточной линии ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл привела к NF- κ B зависимой выработке фермента щелочной фосфатазы, обнаруженной при помощи цветной субстрат-ферментной реакции, интенсивность которой составила $0,71 \pm 0,01$ единиц оптической плотности при длине волны 630 нм. Нейтрализация антителами в концентрации 1 мкг/мл привела к блокированию экспрессии фермента до фонового уровня.

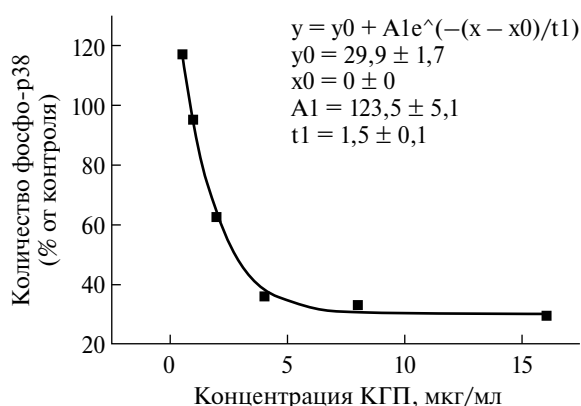


Рис. 2. График зависимости количества фосфорилированной формы МАР-киназы р38 в культуре клеток линии U937 от концентрации КГП.

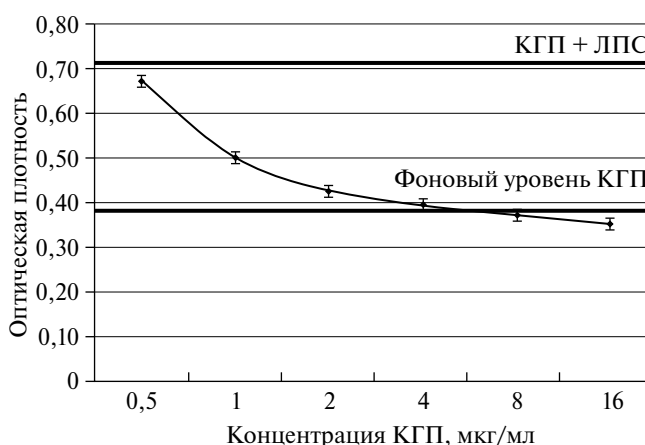


Рис. 3. Результаты взаимодействия КГП с рецепторами TLR4.

КГП во всех используемых концентрациях уменьшал взаимодействие ЛПС с рецептором TLR4 дозозависимо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании установлена ингибирующая активность КГП в отношении фермента ЦОГ2. По результатам эксперимента КГП является селективным ингибитором и не подавляет активность ЦОГ1, тем самым, снижая риск развития тяжелых побочных эффектов со стороны крови и желудочно-кишечного тракта, которые характерны для классических НПВС, таких как аспирин, индометацин, диклофенак и др.

Кроме того, КГП оказывает влияние на количество фосфорилированных форм МАР-киназы р38 за счет блокирования TLR4 рецепторов. В эксперименте КГП показал ингибирующее действие на ЛПС-индуцированную активацию

(фосфорилирование) MAP-киназы p38 и снижение взаимодействия ЛПС с TLR4, что определяет механизм его противовоспалительного действия.

Таким образом, проведенные исследования позволяют рассматривать КГП, как перспективный кандидат в лекарственные средства для лечения заболеваний воспалительного генеза с минимальными побочными эффектами. Мишенями противовоспалительного действия КГП являются: ЦОГ2, MAP-киназа p38 и TLR4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Aneiros A., Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B* 2004, 803(1), 41–53.
2. Уракова И.Н., Пожарицкая О.Н., Демченко Д.В., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Биологическая активность и способы получения пептидов из рыб. *Биология моря* 2012, 38 (6), 421–427. [Urakova I.N., Pozharitskaya O.N., Demchenko D.V., Shikov A.N., Makarov V.G. The biological activities of fish peptides and methods of their isolation. *Marine Biology* 2012, 38(6), 421–427.]
3. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен. Цитокины и воспаление 2002, 1(2), 17. [Chereshnev V.A., Gusev E.Yu. Systemic inflammation as immunopathologically phenomenon. *Cytokines and Inflammation* 2002, 1(2), 17.]
4. Руднов В.А. От локального воспаления к системному: выход на новые представления патогенеза критических состояний и перспективы терапии. *Интенсивная терапия* 2006, 3(1), 5–8. [Rudnov V.A. From local inflammation to systemic: a new view of the pathogenesis of critical States and prospects for therapy. *Intensive therapy* 2006, 3(1), 5–8.]
5. Krakauer T. Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF-kappaB. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004, 3(3), 317–324.
6. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. ГОЭТАР-Медиа, Москва, 2009, 985. [Kukes V.G. Clinical pharmacology. GOITER-Media, Moscow, 2009, 985.]
7. Suleyman H., Demircan B., Karagoz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007, 59(3), 247–258.
8. Holgate S.T., Peters-Golden M., Panettieri R.A., Henderson W.R. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J. Allergy Clin Immunol* 2003, 111(1), 18–34.
9. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. ООО “Издательство Фолиант”, СПб, 2008, 552. [Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. “Izdatel'stvo Foliant”, St. Petersburg, 2008, 552.]
10. Huang G., Shi L.Z., Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 2009, 48(3), 161–169.
11. Cuadrado A., Nebreda A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochemical Journal* 2010, 429(3), 403–417.
12. Елисеева Т.И., Балаболкин И.И. Современные технологии контроля бронхиальной астмы у детей (обзор). *Соврем. технол. мед.* 2015, 2, 168–184. [Eliseeva T.I., Balabolkin I.I. Modern Technologies of Bronchial Asthma Control in Children (Review). *Sovrem. tehnol. med.* 2015, 2, 168–184.]
13. Dumitru C.D., Ceci J.D., Tsatsanis C., Kontoyiannis D., Stamatakis K., Lin J.H., Patriotis C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kollias G., Tschlis P.N. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000, 103, 1071–1083.
14. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 2009, 81, 807–869.
15. Saklatvala J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Current Opinion Pharmacology* 2004, 4, 372–377.
16. Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Воробьева В.В., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Е. Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенного из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis* на модели острого бронхита, индуцированного формалином у крыс. *Биофармацевтический журнал* 2016, 8(6), 56–63. [Katelnikova A.E., Kryshen K.L., Makarova M.N., Makarov V.G., Vorobeve V.V., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N. Specific pharmacological activity study of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in the model of acute bronchitis induced by formalin in rats. *Russian Journal of Biopharmaceuticals* 2016, 8(6), 56–63.]
17. Mauer H. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel. *Electrophoresis* 1971, 44–45.
18. Barnett J., Chow J., Ives D. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1209, 130–139.
19. Wada Y., Nakajima-Yamada T., Yamada K., Tsuchida J., Yasumoto T., Shimoato T., Aoki K., Kimura T., Ushiyama S. R-130823, a novel inhibitor of p38 MAPK, ameliorates hyperalgesia and swelling in arthritis models. *European Journal of Pharmacology* 2005, 506, 285–295.
20. Nishikawa M., Myoui A., Tomita T., Takahi K., Nampei A., Yoshikawa H. Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats

- by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis and Rheumatism* 2003, 48, 2670–2681.
21. Badger A.M., Griswold D.E., Kapadia R., Blake S., Swift B.A., Hoffman S.J., Stroup G.B., Webb E., Rieman D.J., Gowen M., Boehm J.C., Adams J.L., Lee J.C. Disease-modifying activity of SB242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2000, 43, 175–183.
22. Hommes D., Blink B., Plasse T., Bartelsman J., Xu C., Macpherson B., Tytgat G., Peppelenbosch M., Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002, 122, 7–14.

MECHANISMS OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE COMPLEX EXTRACTED FROM SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS*

A. E. Katelnikova^{1,2*}, K. L. Kryshen², M. N. Makarova²,
V. G. Makarov², A. N. Shikov²

*E-mail: katelnikova.ae@doclinika.ru

¹Northwest State Medical University of I.I. Mechnikov,
Saint-Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Russia, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia

Received: 27.11.2017. Accepted: 25.12.2017

The results of research on two models of acute bronchitis induced by cigarette smoke and formaldehyde, in rats the substance of glycosylated polypeptides complex (GPC) provided anti-inflammatory effect. Based on these data, a search of anti-inflammatory action mechanisms of GPC. The aim of the study was to investigate the activity of GPC obtained from viscera of sea urchins *S. droebachiensis* on two cyclooxygenase isoforms (COX1 and COX2), 5 – lipoxygenase (5-LOX), lipopolysaccharide (LPS)-induced p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation, toll-like receptor 4 (TLR4). COX1/2 and 5-LOX activity studied using commercial kits (Cayman Chemicals, USA). GPC effects on LPS-induced p38 MAPK phosphorylation were studied using human monocyte cellline U937. To assess the interaction of GPC with toll-like receptor 4 (TLR4) cell line HEK-Blue-hTLR4 (Invivogen, USA) was used. Results of the study showed that GPC inhibited COX2 activity with IC₅₀ 67 µg/ml. Also, GPC inhibited LPS-induced p38 MAPK phosphorylation by blockade of TLR4 with EC₅₀ 2.7 µg/ml. In the other hand, GPC did not affect the activity of COX1 and 5-LOX. The obtained results allow to conclude that targets of GPC anti-inflammatory action are: COX2, of p38 MAPK and TLR4.

Key words: glycosylated polypeptide complex; sea urchins; *S. droebachiensis*; cyclooxygenase; lipoxygenase; p38 MAPK.

Authors:

Katelnikova A.E.,  Postgraduate Student, Department of Pharmacology Northwest State Medical University of I.I. Mechnikov, 191015, Saint-Petersburg, Russia, Head of the immunobiological research group Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia; 188663, Russia, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy. Tel.: 8(911)0039975. E-mail: katelnikova.ae@doclinika.ru

Kryshen K.L., PhD (Biology), Head of Department of Toxicology and Microbiology²Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia;

Makarova M.N., MD (Medicine), Deputy for science Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia;

Makarov V.G., MD (Medicine), professor, General Director Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia;

Shikov A.N., MD (Pharm.), Deputy on innovation activity Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, Leningradskaya reg., Vsevolozhskiy district, Russia.