

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ГУ НИИ ФАРМАКОЛОГИИ ИМ.В.В.ЗАКУСОВА

Утверждаю:

Директор Института,
академик РАМН



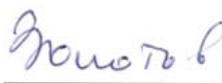
С.Б.Середенин

О Т Ч Е Т

по договору с ООО «Фармпрепарат» по проведению исследования по влиянию препарата «Стелланин» на активность циклооксигеназы 2 и фосфолипазы А2, определение свободного и окисленного глутатиона, малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов как маркеров окислительного стресса на форменных элементах крови человека.

Руководитель НИР:

главн.н.сотр., д.б.н.



Н.Н.Золотов

Отв. Исполнитель

главн.н.сотр., д.б.н.



Н.Н.Золотов

МОСКВА - 2008

РЕФЕРАТ

Отчет 21 стр., 3 таблицы, 7 рисунков.

Ключевые слова : Стелланин, 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид, тромбоциты человека, циклооксигеназа-2, фосфолипаза A2, глутатион, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, свободнорадикальное окисление липидов, антиоксидантная активность

Цель работы - Определение способности препарата Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида) влиять: на активность циклооксигеназы-2 и фосфолипазы A2 тромбоцитов человека; на содержание малонового диальдегида (MDA) и диеновых конъюгатов; окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона в тромбоцитах человека.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Исполнитель:

выполнены разделы:

главн.н.сотр.

Н.Н.Золотов

лаб.исследователь

Н.Е.Никушкина

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире наблюдается тенденция к увеличению количества воспалительных заболеваний, связанных с ухудшающейся экологической обстановкой и производственным травматизмом.

Циклооксигеназы -1 и -2 (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) катализируют синтез простагландинов (ПГ) из арахидоновой кислоты. ЦОГ-1 экспрессируется в большинстве тканей и, скорее всего, отвечает за продукцию ПГ в нормальных физиологических условиях, например при функционировании слизистой желудка и регуляции кровотока в почках. ЦОГ-2, наоборот, не экспрессируется в большинстве нормальных тканей, но индуцируется различными воспалительными и/или митогенными стимулами, например, цитокинами, ростовыми факторами и промоутерами опухолевого роста.

В настоящее время широко применяются так называемые нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), являющиеся в большинстве случаев ингибиторами ЦОГ-2.

Противовоспалительные средства также в ряде случаев ингибируют фосфолипазу А-2, при помощи которой из фосфолипидов высвобождается арахидоновая кислота для синтеза ПГ.

Известно влияние противовоспалительных средств на состояние пероксидации липидов и антиоксидантный статус организма, показателем которого является уровень окисленного и восстановленного глутатиона.

Таким образом, для изучения биохимических механизмов действия Стелланина было необходимо изучить его влияние на ферменты ЦОГ-2 и фосфолипазу А-2 как индикаторы воспалительного процесса, уровень первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов и содержание окисленного и восстановленного глутатиона в тромбоцитах крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Выделение тромбоцитов.

Кровь собирали в 0,109 М тринатрийцитрат в качестве антикоагулянта. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием цельной крови при комнатной температуре в течение 15 мин при 100xg на центрифуге J6-B (Beckman-Coulter, США). Плазму аккуратно отделяли от осевших клеток и центрифугировали при 2000xg в течение 20 мин. Полученные тромбоциты замораживали в жидком азоте и хранили при -80° С.

Непосредственно перед активацией тромбоциты ресуспендировали в 140 mM NaCl, 27 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5.5 mM глюкозы, 10 mM HEPES, 1.2 mM CaCl₂.

Активация тромбоцитов.

Активация тромбоцитов была необходима для экспрессии ЦОГ-2. Для этого тромбоциты инкубировали с липополисахаридом (LPS) из E.coli (10 мкг/мл) в течение 6 час при комнатной температуре. После активации тромбоциты лизировали реактивом CytoBuster™ Protein Extraction Reagent (Calbiochem, cat. No71009). В лизированных тромбоцитах определяли белок и хранили при -80°С.

Определение циклооксигеназы-2 иммуноферментным методом.

Для определения количества ЦОГ-2 использовали набор фирмы Calbiochem (CBA053)

Набор включает в себя 96-гнездный микропланшет покрытый поликлональными антителами кролика против ЦОГ-2 человека. Стандарты и образцы добавляются в ячейки где ЦОГ-2 связывается с антителами. Фермент затем определяется с моноклональными анти-ЦОГ-2 антителами и конъюгатом козьего антимышиного IgG с пероксидазой. Добавление субстрата для пероксидазы приводит к образованию синей окраски.

Чувствительность повышается добавлением раствора серной кислоты и образованию желтой окраски. Поглощение света в каждой ячейке определяется при длине волны 450 нм, а уровень ЦОГ-2 вычисляется по стандартной кривой.

Использованные реактивы и материалы

- Анти-ЦОГ-2 покрытый 96-гнездный микропланшет (Кат.№ JA9172)
- Стандарт рекомбинантной ЦОГ-2 человека (Кат.№ JA9173).
- ЦОГ-2 детектирующие антитела (Кат.№ JA9174).
- Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Кат.№ JA9372)
- Растворитель для определения (Кат.№ JA7644).
- Концентрированный раствор для промывки планшета (Кат.№ JA1617).
- ТМВ-субстрат (5,5'-тетраметилбензидин) (Кат.№ JA1608).
- Раствор для остановки реакции (Кат.№ JA1616).
- Пипеттор со сменными наконечниками
- Многоканальный диспенсор
- Индуктор ЦОГ-2 липополисахарид из E.coli (LPS)
- Раствор для лизиса клеток с ингибитором протеаз (фенилметилсульфонифторид – ISN Biochemicals Inc. No 19581)
- Набор для определения белка по методу Bradford M. с Кумасси G-250.

Ход определения.

Все реактивы из набора для определения ЦОГ-2 согревают при комнатной температуре (18-25°C) перед определением. Реактивы готовят непосредственно перед анализом. Схема приготовления реактивов для определения количества ЦОГ-2 в 16 лунках микропланшета (2x8 лунок) приведена в таблице 1.

Стандарты

Растворяют ЦОГ-2 стандарт в 1000 мкл дистиллированной воды для получения раствора, содержащего 2000 нг/мл. Разливают неиспользованный стандарт на аликвоты (100 мкл) в пластиковые пробирки и хранят при -80°C.

Таблица 1

Приготовление реактивов для определения ЦОГ-2

Реактив	Объем (на 16 лунок)	Состав
1. ЦОГ-2 антитела	2 мл	Разведением 1:1000 (1998 мкл растворителя для анализа + 2 мкл ЦОГ-2 антител)
2. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой	2 мл	Разведение 1:400 (1995 мкл растворителя для анализа + 5 мкл вторичных антител)
3.Промывочный буферный раствор	20 мл	Разведение 1:20 (19 мл воды + 1 мл концентрата промывочного буфера)

Калибровочную кривую строили из разведений стандарта ЦОГ-2 и растворителя согласно таблице 2.

Таблица 2

Номер пробирки	Объем растворителя	Объем стандарта ЦОГ-2	Концентрация ЦОГ-2
1	900 мкл	100 мкл стандарта ЦОГ-2 (2000 нг/мл)	200 нг/мл
2	500 мкл	500 мкл из проб.1	100 нг/мл
3	500 мкл	500 мкл из проб.2	50 нг/мл
4	500 мкл	500 мкл из проб.3	25 нг/мл
5	500 мкл	500 мкл из проб.4	12,5 нг/мл
6	500 мкл	500 мкл из проб.5	6,25 нг/мл
7	500 мкл	500 мкл из проб.6	3,125 нг/мл
8	500 мкл	ничего	0 нг/мл

Протокол измерения

Все образцы и стандарты определяли в 2-х параллелях.

1. Удаляют фольгу в необходимом для анализа количестве ячеек покрытого анти-ЦОГ-2 микропланшета. Неиспользованные ячейки закрывают фольгой и хранят при 4 или -20°C.

2. Добавляют 100 мкл разведенного стандарта и образцы (2-5 мг/мл общего белка) в ячейки. Закрывают планшет и инкубируют 90 мин при комнатной температуре.
3. Удаляют жидкость из ячеек, промывают 4 раза промывочной жидкостью из набора. После последней промывки полностью удаляют жидкость из ячеек, переворачивая микропланшет верх дном на фильтровальную бумагу.
4. Добавляют 100 мкл детекторных антител против ЦОГ-2 в каждую ячейку. Накрывают крышкой и инкубируют 90 мин при комнатной температуре.
5. Промывают микропланшет как описано в п.3.
6. Добавляют 100 мкл конъюгированных с пероксидазой вторичных антител. Накрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре в течение 60 мин.
7. Промывают микропланшет как описано в п.3.
8. Добавляют 100 мкл ТМВ-субстрата в каждую ячейку и инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
9. Добавляют 100 мкл раствора для остановки ферментной реакции. Измеряют оптическую плотность при 450 нм с длиной волны сравнения 595 нм (может быть использована длина волны сравнения 540 или 550 нм). При невозможности проведения двухволновых измерений их проводят только при 450 нм.
10. Рассчитывают результаты по калибровочной кривой.

Калибровочная кривая, полученная с данным набором для измерения при 450 нм в микропланшетном ридере Titertek Multiscan MCC (Labsystem OY & Flow Laboratories, Финляндия), представлена на рисунке 1.

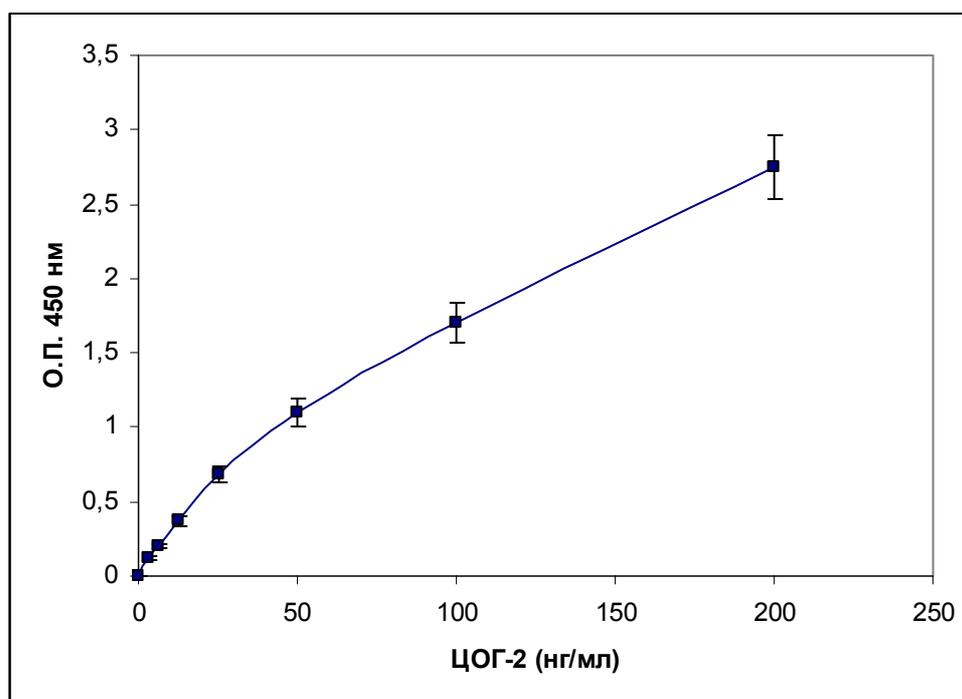


Рисунок 1. Калибровочная кривая для определения количества ЦОГ-2.

Определение активности фосфолипазы A_2

В качестве субстрата для фосфолипазы A_2 использовали умбеллифериларахидонат (Sigma-Aldrich Cat.No U083).

Гидролиз субстрата регистрировали флуориметрически по приросту флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 380 нм) на спектрофлуорометре LS-5B (Perkin-Elmer, США). Интенсивность флуоресценции коррелировала с высвобождением 7-гидроксикумарина. Количество гидролизованного субстрата определяли по калибровочной кривой, построенной по стандарту 7-гидроксикумарина.

Субстрат готовили, смешивая 0.1 мкмоль умбеллифериларахидоната с 0.9 мкмоль 1-олеил-2-стеароил-sn-3-фосфохолином в хлороформе. Растворитель удаляли в токе азота. Липидную пленку ресуспендировали до конечной концентрации 1 мМ в 10 мМ HEPES (pH 7.0), 0.1 мМ ЭДТА и смесь обрабатывали ультразвуком (22 КГц, УЗДГН-1, СССР) в течение 3-5 мин. Полученную суспензию разводили в 10 раз до использования в 1 мл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.1 мМ ЭДТА, 1.1 мМ $CaCl_2$ при 30°C в кювете спектрофлуорометра. Скорость сольволиза

умбеллифериларахидоната мониторировали в течение 2-3 мин до начала реакции добавлением препарата фосфолипазы A_2 . Скорость ферментативной реакции рассчитывали после вычитания скорости сольволиза.

Для определения фосфолипазы A_2 реакцию останавливали добавлением 5 mM EGTA, 1 mM дитиотреитола и 10 mM глицерина с последующей обработкой ультразвуком.

Метод определения малонового диальдегида.

Метод определения MDA основан на его взаимодействии с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТВА), которая при высокой температуре и кислом значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу MDA и две молекулы ТВА. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм с коэффициентом молярной экстинкции $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972).

К 0.1 мл плазмы крови добавляли 0.5 мл 10% трихлоруксусной кислоты (ТСА). Осадок белков удаляли центрифугированием и супернатант использовали для определения MDA. К 0.2 мл супернатанта добавляли 1.8 мл физиологического раствора, содержащего 10 % ТСА, 1.5 мл 0.9% раствора ТСА в 50% уксусной кислоте и раствор хлорного железа (FeCl_3) для распада до MDA предобразованных гидроперекисей липидов (Wade C.R., Van Rij A.V., 1988), нагревали при 100°C и после охлаждения определяли концентрацию MDA по поглощению раствора при 532 нм на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) в 1-см кювете. Нами была ранее установлена прямая корреляция между результатами определения MDA использованным способом и методом, предусматривающим реакцию с ТВА экстракта липидов плазмы смесью хлороформа и метанола ($r=+0.874$).

Метод определения диеновых конъюгатов.

Принцип метода.

В ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения при 233 нм с коэффициентом молярной экстинкции $\varepsilon = 2,2 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Реактивы

n-Гептан

2-Пропанол (изопропиловый спирт)

0,9% раствор хлорида натрия

0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,6).

Ход определения

1 мл суспензии тромбоцитов (10-15 мг белка) после обработки ультразвуком экстрагировали 9 мл смеси гептан-изопропанол (1:1, по объему). Полученную суспензию помещали в закрытые пробками центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g на центрифуге J-6В (Beckman, США). Надосадочную жидкость переносили в мерные пробирки и добавляли 1/10 объема дистиллированной воды. После двукратного встряхивания и расслаивания фаз отбирали верхнюю гептановую фазу. К равным объемам по 0,5 мл добавляли этиловый спирт в объемном соотношении 1:5 – 1:10. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) при 233 нм. В качестве контроля использовали пробы, содержащие только экстрагирующую фазу, где вместо 1 мл суспензии тромбоцитов был 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6).

Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывали, исходя из величины экстинкции при 233 нм для сопряженных диенов полиненасыщенных жирных кислот, равного $2,2 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

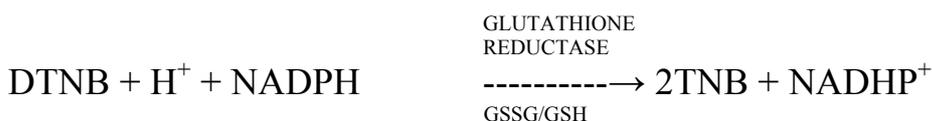
Метод определения окисленного и восстановленного глутатиона.

Определение окисленного глутатиона проводили с набором “Glutathione Assay Kit” фирмы “Sigma” кат.№ CS0260 (США). Поскольку набор был рассчитан только на анализ общего глутатиона, то для определения GSSG предварительно проводили дериватизацию GSH 2-винилпиридином (Aldrich, США, кат.№13229-2). Время проведения кинетических измерений по сравнению с рекомендованным фирмой-производителем было увеличено до 25 мин.

Метод определения GSSG основан на следующих реакциях:



Или объединенной реакции:



Скорость реакции с данным набором пропорциональна концентрации GSH вплоть до 2 мМ. Образовавшийся в результате реакции желтый продукт 5-тио2-нитробензойная кислота (TNB) измеряется спектрофотометрически в микропланшете при 412 нм. Для определения GSSG в плазме крови используют построенную по GSH стандартную калибровочную кривую. Измерения оптической плотности TNB проводили в микропланшетном ридере Titertek Multiscan MCC (Labsystem OY & Flow Laboratories, Финляндия).

1. Настраивают микропланшетный ридер на длину волны 412 нм для измерений в кинетическом режиме с интервалом времени 1 мин в течение 25 мин.
2. Выполняют смешивание образцов и стандартов в соответствии с табл.1.

Таблица 3.

Определяемый образец	Смешать и инкубировать в течение 25 мин			Старт
	Объем образца	5% SSA	Рабочая смесь	NADPH (0.16 мг/мл)
Реагент бланк	-	10 мкл	150 мкл	50 мкл
Станд.кривая (разл.развед.)	10 мкл	-	150 мкл	50 мкл
Неизв.образец	X мкл	10-X	150 мкл	50 мкл

Примечание: конечная концентрация компонентов в реакционной смеси составляет 95 мМ К-фосфатного буфера, pH 7.0, 0.95 мМ ЭДТА, 0.038 мг/мл (48 мкМ) NADPH, 0.031 мг/мл DTNB, 0.115 ед/мл глутатионредуктазы и 0.24% 5-сульфосалициловой кислоты (SSA).

3. В 2 первые лунки микропланшета, содержащие 5% раствор SSA в качестве бланка добавляют по 10 мкл раствора стандарта GSH. В остальные лунки добавляют различные объемы неизвестного образца в 2 параллелях (до 10 мкл образца). Примечание: при необходимости использования меньшего количества образца его объем доводят до 10 мкл 5% раствором SSA.
4. Многоканальной пипеткой добавляют по 150 мкл рабочей смеси в каждую лунку. Смешивают при помощи пипетки.
5. Инкубируют 5 мин при комнатной температуре и добавляют многоканальной пипеткой по 50 мкл раствора NADPH и перемешивают.
6. Используют ридер для измерения поглощения в каждой ячейке. Вычитают значения бланка.

Вычисление: Используют значения, полученные для стандартного раствора GSH, чтобы построить калибровочную кривую и рассчитать $\Delta A_{412}/\text{мин}$, эквивалентное 1 нмолю GSH в лунке.

Количество нмолей GSH в неизвестном образце вычисляют по формуле:

$$\frac{\text{нмоль GSH}}{\text{мл образца}} = \frac{\Delta A_{412}/\text{мин} (\text{образец}) \cdot \text{Разведение обр.}}{\Delta A_{412}/\text{мин} (1 \text{ нмоль}) \cdot \text{Объем обр. (мл)}}$$

Обычно разведение образца составляло 15-20.

Статистический анализ полученных результатов.

Для статистического анализа полученных результатов использовали t-тест Стьюдента или ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование препарата Стелланин проводили в концентрациях 1,0; 0,5; 0,1 и 0,01 ммоль/л.

Влияние препарата на экспрессию ЦОГ-2 тромбоцитов человека.

Влияние препарата в различных концентрациях на ЦОГ-2 в тромбоцитах человека исследовали в течение 1-6-часовой активации их липополисахаридом с интервалом 1 час.

Результаты определения влияния стелланина на экспрессию ЦОГ-2 представлены на рис. 2.

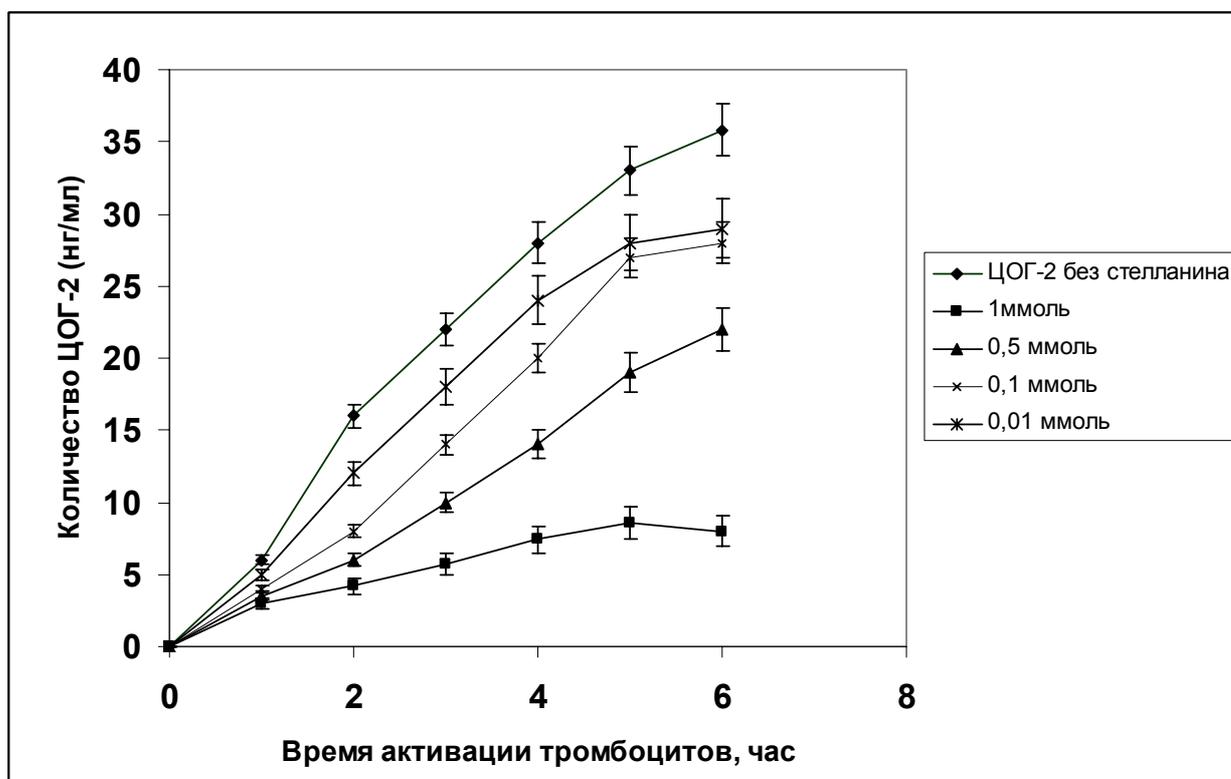


Рисунок 2.

Определение влияния стелланина на количество ЦОГ-2, экспрессируемой при активации тромбоцитов человека липополисахаридом.

Как видно из рисунка при активации тромбоцитов человека происходит экспрессия ЦОГ-2. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л достоверно угнетает экспрессию фермента в тромбоцитах, что может объяснять противовоспалительный эффект препарата. Значение IC_{50} для ингибирования экспрессии ЦОГ-2 стелланином не превышает 0,1 ммоль/л. Однако о механизме взаимодействия препарата с ЦОГ-2 говорить сложно.

Влияние стелланина на активность фосфолипазы A_2 в тромбоцитах человека при активации липополисахаридом.

Влияние препарата в различных концентрациях на фосфолипазы- A_2 в тромбоцитах человека исследовали в течение 1-6-часовой активации их липополисахаридом с интервалом 1 час.

Результаты определения влияния стелланина на активность фосфолипазы- A_2 представлены на рис. 3.

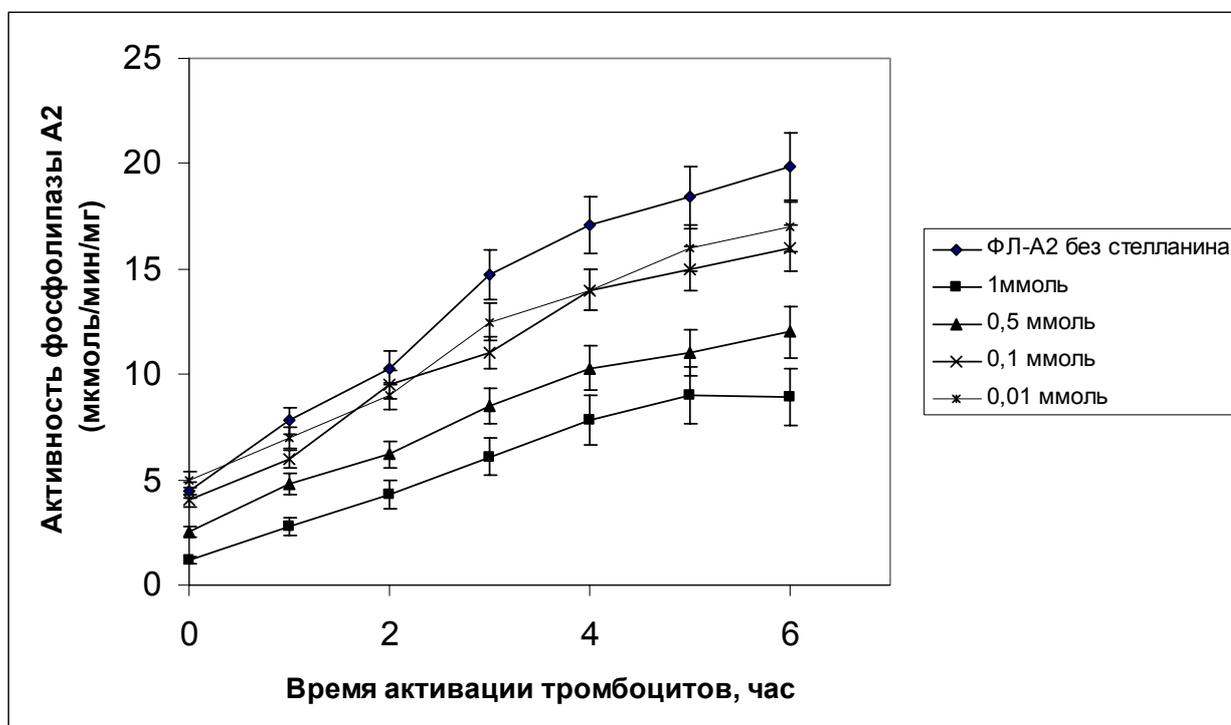


Рисунок 3.

Определение влияния стелланина на активность фосфолипазы A_2 , экспрессируемой при активации тромбоцитов человека липополисахаридом.

Как видно из рисунка при активации тромбоцитов человека наблюдается возрастание активности фосфолипазы А-2. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л достоверно угнетает активность фермента в тромбоцитах, что может объяснять противовоспалительный эффект препарата. Значение IC_{50} для ингибирования фосфолипазы А-2 стелланином не превышает 0,1 ммоль/л. Однако о механизме взаимодействия препарата с фосфолипазой А-2 говорить сложно.

Влияние стелланина на уровень пероксидации липидов

Для исследования влияние стелланина на уровень пероксидации липидов в тромбоцитах человека использовали определение диеновых конъюгатов и малонового диальдегида.

Влияние стелланина на уровень диеновых конъюгатов в тромбоцитах человека.

В процессе активации тромбоцитов происходило повышение концентрации диеновых конъюгатов. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л снижал уровень диеновых конъюгатов. Результаты влияния стелланина на уровень диеновых конъюгатов в процессе активации тромбоцитов человека под действием липополисахарида представлены на рис. 4.

Полученные результаты могут указывать на взаимодействие содержащегося в препарате йода с липоперекисями, образующимися в процессе активации тромбоцитов, что и приводит к наблюдаемому снижению концентрации диеновых конъюгатов.

Влияние стелланина на уровень малонового диальдегида в тромбоцитах человека.

В процессе активации тромбоцитов происходило повышение концентрации малонового диальдегида. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0

ммоль/л снижал уровень МДА. Результаты влияния стелланина на уровень МДА в процессе активации тромбоцитов человека под действием липополисахарида представлены на рис. 5.

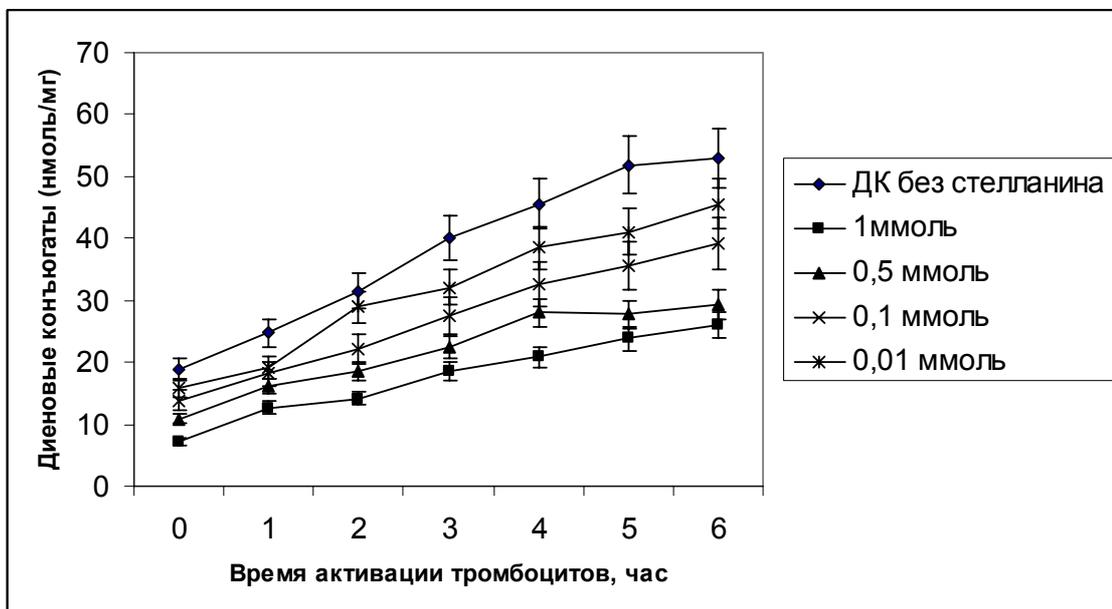


Рисунок 4.

Влияние стелланина на содержание диеновых конъюгатов (ДК) в тромбоцитах крови человека в течение активации липополисахаридом

Полученные результаты могут указывать на взаимодействие содержащегося в препарате йода с образующимися в процессе активации тромбоцитов липоперекисями. Этим взаимодействием и можно объяснить наблюдаемое нами ингибирование образования МДА.

Влияние стелланина на содержание окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона в тромбоцитах при активации липополисахаридом

Уровень общего глутатиона, как окисленного (GSSG), так и восстановленного (GSH) является важным показателем окислительно-восстановительного статуса организма. Отражением этого можно считать изменение содержания GSH и GSSG в тромбоцитах крови человека при

различных патологических процессах и коррекции фармакологическими препаратами.

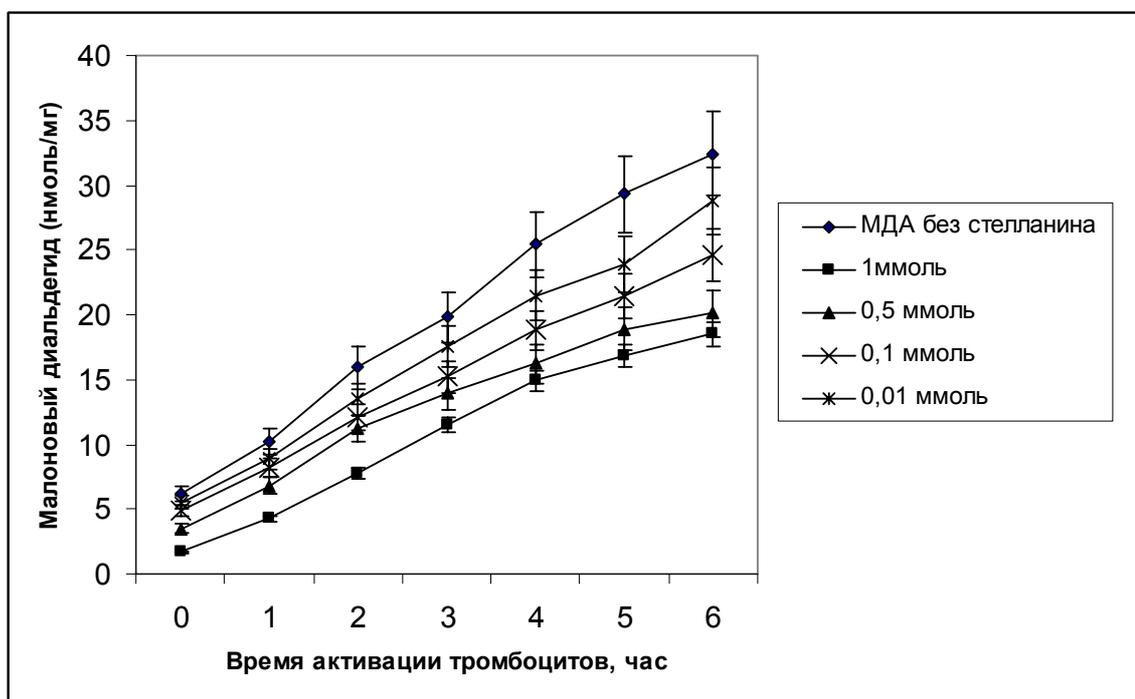


Рисунок 5.

Влияние стелланина на содержание малонового диальдегида (МДА) в тромбоцитах крови человека в течение активации липополисахаридом

В процессе активации тромбоцитов липополисахаридом из *E.coli* наблюдалось некоторое снижение уровня GSSG и слабое повышение уровня GSH. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л приводил к небольшому, но значимому снижению уровня восстановленного (GSH) и повышению уровня окисленного (GSSG) глутатиона. Уровень общего глутатиона при этом практически не изменялся. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 6 и 7.

На основании полученных данных можно предположить, что стелланин оказывает положительное влияние на процесс активации тромбоцитов и может, таким образом, обладать антиагрегантными свойствами.

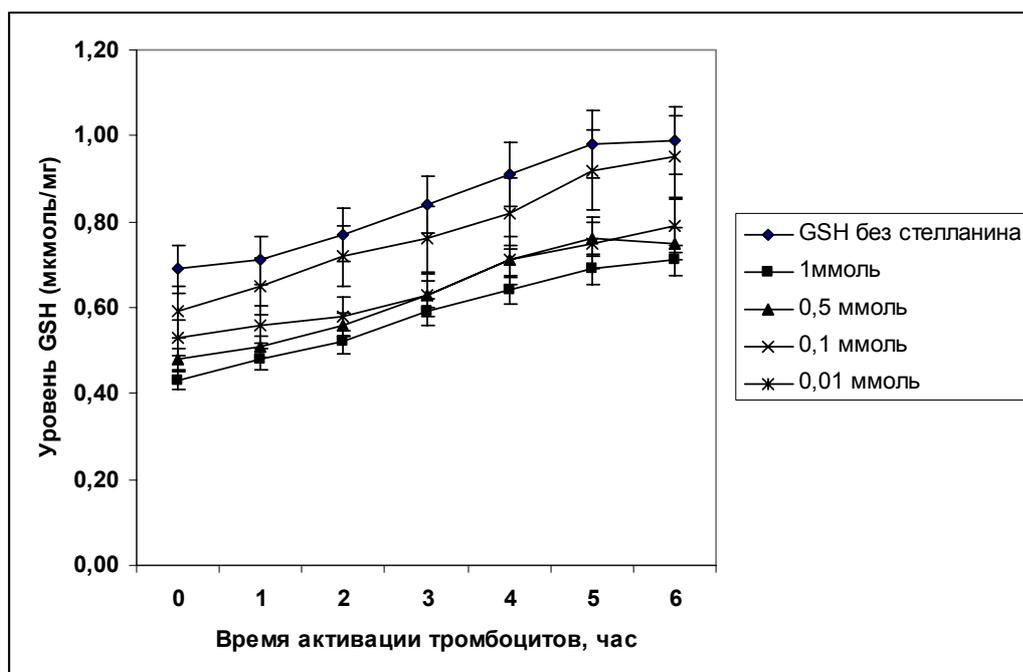


Рис.6

Влияние стелланина на содержание восстановленного глутатиона (GSH) в тромбоцитах при активации липополисахаридом.

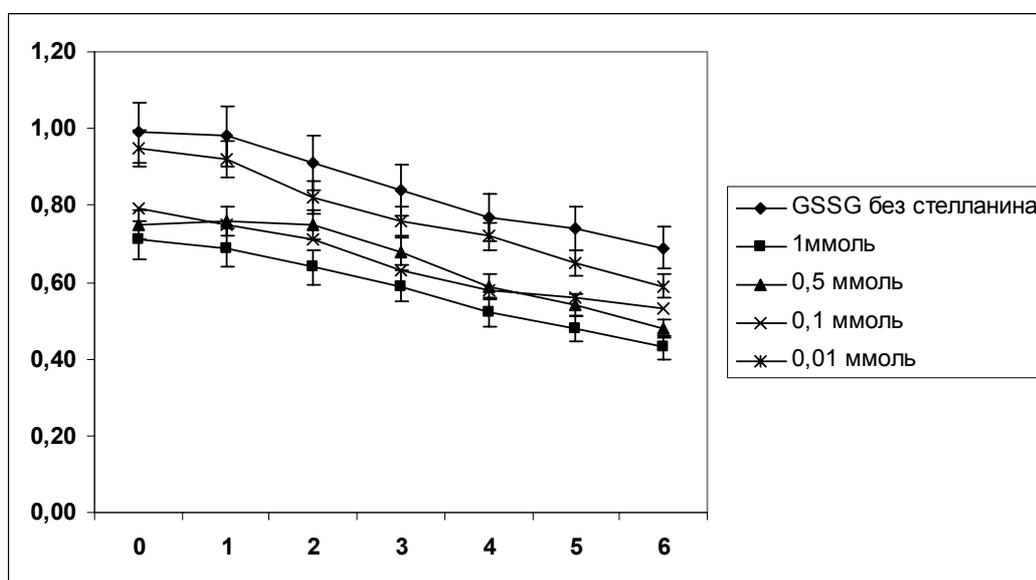


Рис.7

Влияние стелланина на содержание окисленного глутатиона (GSSG) в тромбоцитах при активации липополисахаридом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в эксперименте результаты четко показали, что препарат Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид) в исследованных концентрациях влияет на активность циклооксигеназы-2 и фосфолипазы А₂, на содержание малонового диальдегида (MDA) и диеновых конъюгатов, окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона в тромбоцитах человека.

Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л достоверно угнетает экспрессию ЦОГ-2 в тромбоцитах, что может объяснять противовоспалительный эффект препарата. Значение IC₅₀ для ингибирования экспрессии фермента стелланином не превышает 0,1 ммоль/л.

Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л достоверно также угнетает активность фосфолипазы А-2 в тромбоцитах, что может объяснять противовоспалительный эффект препарата. Значение IC₅₀ для ингибирования фермента стелланином не превышает 0,1 ммоль/л.

Однако о механизме взаимодействия препарата с ЦОГ-2 и фосфолипазой А-2 говорить сложно. Возможно, что ингибируя последнюю, стелланин тормозит гидролиз фосфолипидов с высвобождением арахидоновой кислоты как субстрата ЦОГ-2.

Полученные результаты согласуются с данными литературы по ингибированию ЦОГ-2, различными производными бензимидазола, чем и объясняется их противовоспалительная активность

В процессе активации тромбоцитов происходит повышение концентрации диеновых конъюгатов. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л снижает уровень диеновых конъюгатов.

В процессе активации тромбоцитов также происходит повышение концентрации малонового диальдегида. Стелланин в концентрациях 0,01–1,0 ммоль/л снижает уровень МДА.

Полученные результаты могут указывать на взаимодействие содержащегося в препарате йода с образующимися в процессе активации

тромбоцитов липоперекисями, что и приводит к наблюдаемому снижению концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида.

В процессе активации тромбоцитов липополисахаридом из *E.coli* наблюдалось некоторое снижение уровня GSSG и слабое повышение уровня GSH. Стелланин в концентрациях 0,01–1.0 ммоль/л приводил к небольшому, но значимому снижению уровня восстановленного (GSH) и повышению уровня окисленного (GSSG) глутатиона. Уровень общего глутатиона при этом практически не изменялся. На основании полученных данных можно предположить, что стелланин оказывает положительное влияние на процесс активации тромбоцитов и может обладать антиагрегантными свойствами.

Результаты исследования могут быть использованы при подготовке к клиническому изучению препарата Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид), а также для расширения показаний к его медицинскому применению.