

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-11-9-12

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И ТОКСИЧНОСТЬ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА И ЭДАРАВОНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

А. В. Шулькин, Ю. В. Абаленихина, П. Д. Ерохина, Е. Н. Якушева¹

На клеточной линии НЕК293 сравнивали цитотоксическое действие и антиоксидантную активность этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и эдаравона в диапазоне концентраций 5 – 5000 мкМ. Цитотоксическое действие оценивали в МТТ-тесте. Окислительный стресс (ОС) моделировали инкубацией клеток с пероксидом водорода (H_2O_2) в концентрации 5 мМ и длительностью воздействия 24 ч. Антиоксидантную активность тестируемых веществ анализировали по их влиянию на уровень карбонильных производных белков и ТБК-реактивных продуктов в лизате клеток линии НЕК293. ЭМГПС снижал жизнеспособность клеток только в концентрации 5 мМ до $64,5 \pm 9,2\%$ ($p = 0,021$), а эдаравон в концентрациях 5, 1 и 0,5 мМ до $44,5 \pm 7,4\%$, $57,1 \pm 11,8\%$ и $67,9 \pm 28,1\%$ ($p \leq 0,05$). Моделирование ОС сопровождалось снижением жизнеспособности клеток до $24,5 \pm 14,1\%$ ($p = 0,033$). ЭМГПС и эдаравон в концентрациях 50 и 100 мкМ предотвращали снижение выживаемости клеток в условиях ОС. При этом в концентрации 100 мкМ ЭМГПС на $30,6\%$ ($p = 0,054$) больше, чем эдаравон в аналогичной концентрации снижал содержание карбонильных производных белков в лизате клеток, а в концентрациях 100 и 50 мкМ — на $43,8\%$ ($p = 0,003$) и $38,7\%$ ($p = 0,05$) соответственно снижал уровень ТБК-реактивных продуктов. Таким образом, в результате исследования было показано, что ЭМГПС является менее токсичным веществом и обладает более выраженными антиоксидантными свойствами, по сравнению с эдаравоном.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат; эдаравон; окислительный стресс; пероксид водорода; клетки линии НЕК293.

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс (ОС) — типовой патологический процесс, возникающий в результате дисбаланса между продукцией свободных радикалов и их утилизацией в сторону увеличения образования активных форм кислорода [10]. В настоящее время доказана важная роль ОС в патогенезе широкого спектра заболеваний: сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных, бронхолегочных [6], поэтому применение антиоксидантов в их комплексной терапии является патогенетически оправданным.

В клинических исследованиях доказали свою эффективность лишь единичные препараты. Одними из них являются 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) и 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (эдаравон).

ЭМГПС (Мексидол, ООО “НПК “Фармасофт”, Россия) — отечественный лекарственный препарат, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипок-

сантажной активностью. Показано, что ЭМГПС может связывать супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал, повышать активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, усиливать образование транскрипционного фактора Nrf2 [2, 3]. ЭМГПС подтвердил свою эффективность при острых нарушениях мозгового кровообращения [1].

Эдаравон — синтетический антиоксидант, проявляющий антиоксидантную активность за счет связывания гидроксильного радикала, ингибирования ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов (ПОЛ) без влияния на выработку супероксидного анион-радикала [13].

Эдаравон эффективен при острых нарушениях мозгового кровообращения [5] и входит в японские рекомендации 2015 г. (Япония) по терапии ишемического инсульта [7]. Также препарат применяется при терапии бокового амиотрофического склероза [15] и одобрен FDA по данному показанию.

Эдаравон в Российской Федерации на данный момент не зарегистрирован. Мексидол обращается на рынке РФ более 20 лет. Поэтому целью настоящего ис-

¹ ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Россия, 390026, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9.

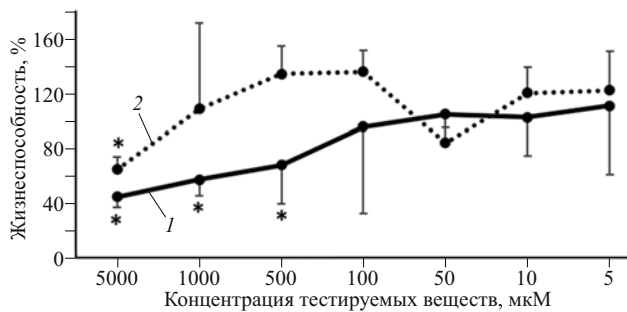


Рис. 1. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината и эдаравона на жизнеспособность клеток линии НЕК293.

1 – эдаравон; 2 – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат. * $p < 0,05$, по сравнению с нормой — 100 % (критерий Фишера).

следования было сравнить токсичность и антиоксидантную активность ЭМГПС и эдаравона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на линии клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). Клетки культивировали согласно протоколу Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) в 6-луночных и 96-луночных планшетах.

ОС моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода H_2O_2 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 5 мМ и инкубацией в течение 24 ч.

Клетки высевали в 96-луночные планшеты для выполнения МТТ-теста [12], в ходе которого оценивали влияние ЭМГПС (Мексидол, ООО “НПК “ФармаСофт”, Россия) и эдаравона (Sigma-Aldrich, США) в диапазоне концентраций 5 – 5000 мкМ и длительностью экспозиции 24 ч на жизнеспособность клеток, а также антиоксидантное действие данных веществ при моделировании ОС.

На монослой клеток в 6-луночных планшетах при моделировании ОС оценивали антиоксидантную активность ЭМГПС и эдаравона в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ и длительностью инкубации 24 ч. К клеткам, служившим нормой, добавляли питательную среду с 1 % диметилсульфоксида (ДМСО — растворитель ЭМГПС и эдаравона), а в контрольные лунки — питательную среду, содержащую 1 % ДМСО и 5 мМ H_2O_2 . После инкубации с H_2O_2 и тестируемыми веществами клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США), добавляли 150 мкл лизирующего буфера (50 мМ, pH 7,4 трис-HCl, 150 мМ KCl, 0,5 % Triton X-100, ингибитор протеиназ, Sigma-Aldrich, Германия), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали 10 мин при 5000 g (СМ-50, Eppendorf, Германия). В полученном лизате клеток с помощью коммерческих наборов определяли

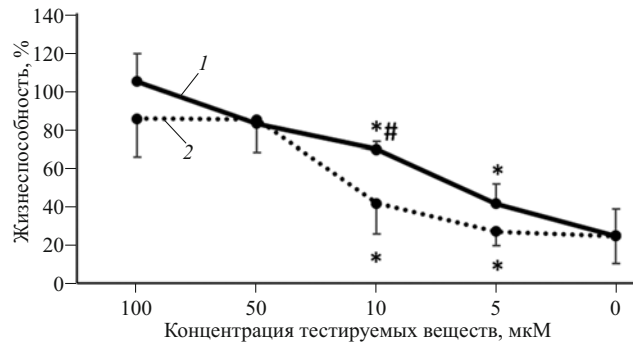


Рис. 2. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината и эдаравона на жизнеспособность клеток линии НЕК293 при моделировании окислительного стресса.

1 – эдаравон; 2 – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат. * $p < 0,05$, по сравнению с нормой — 100 % (критерий Фишера); # $p < 0,05$ — различия между ЭМГПС и эдаравоном (t -критерий Стьюдента).

концентрацию продуктов ПОЛ — по реакции малонового диальдегида (МДА) с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК) (Агат, Россия) [9] и карбонильных производных белков (Sigma-Aldrich, США) [14]. Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [4]. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США).

Полученные результаты оценивали с помощью программы StatSoft Statistica 13.0, дисперсионным анализом (ANOVA) и критерием Фишера попарного сравнения или t -критерием Стьюдента. Результаты представлены в виде $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность клеток, инкубируемых с 1 % ДМСО (норма), в ходе МТТ-теста составила 100 %. ЭМГПС снижал жизнеспособность клеток в концентрации 5000 мкМ до $64,46 \pm 9,17$ % ($p = 0,021$), а эдаравон — в концентрациях 5000, 1000 и 500 мкМ до $44,55 \pm 7,43$ % ($p = 0,008$), $57,11 \pm 11,79$ % ($p = 0,013$), $67,97 \pm 28,07$ % ($p = 0,059$) соответственно (рис. 1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМГПС является менее токсичным веществом, чем эдаравон, что подтверждается дозами данных веществ, используемыми в клинике (500 – 1200 мг/сут ЭМГПС в сравнении с 60 мг/сут эдаравона) [1, 5].

Учитывая токсическое действие эдаравона в концентрации 500 мкМ, при оценке антиоксидантной активности, вещества использовали в более низких концентрациях — 5, 10, 50 и 100 мкМ.

Моделирование ОС (инкубирование клеток с H_2O_2 в концентрации 5 мМ в течение 24 ч, контроль) сопровождалось снижением жизнеспособности клеток до $24,50 \pm 14,14$ % ($p = 0,033$). ЭМГПС в концентрациях 50 – 100 мкМ предотвращал снижение жизнеспособности клеток, вызванное воздействием H_2O_2 , а в кон-

центрациях 5 и 10 мкМ не оказывал влияния на данный показатель относительно значений контроля — жизнеспособность клеток снижалась относительно значений нормы до $26,90 \pm 7,28 \%$ ($p = 0,001$) и $41,54 \pm 16,07 \%$ ($p = 0,041$) соответственно (рис. 2).

Аналогичные результаты были получены и в экспериментах с эдавароном. Данное вещество в концентрациях 50 и 100 мкМ предотвращало снижение выживаемости клеток, вызванное пероксидом водорода. При концентрации эдаварона 5 и 10 мкМ жизнеспособность клеток при развитии ОС снижалась по сравнению с нормой до $41,37 \pm 10,19 \%$ ($p = 0,02$) и $69,33 \pm 4,02 \%$ ($p = 0,024$), соответственно. При оценке влияния тестируемых веществ на жизнеспособность клеток в условиях ОС показано, что эдаварон превосходил ЭМГПС в концентрации 10 мкМ (выживаемость клеток составила $69,33 \pm 4,02 \%$ в сравнении $41,54 \pm 16,07 \%$, $p = 0,044$).

Воздействие H_2O_2 (контрольная серия) приводило к повышению уровня карбонильных производных белков на 395,8 % ($p = 0,001$) и ТБК-реактивных продуктов на 181,6 % ($p = 0,001$), по сравнению с показателями нормы, что свидетельствует о развитии ОС (таблица).

При применении ЭМГПС на фоне H_2O_2 отмечалось снижение уровня карбонильных производных белков в лизате клеток НЕК293 при концентрациях тестируемого вещества 100 и 50 мкМ на 64,9 и 36,4 % ($p \leq 0,05$), соответственно, по сравнению с контролем (таблица). Эдаварон также снижал содержание карбонильных производных белков в концентрации 100 мкМ на 49,5 % ($p = 0,051$), 50 мкМ — на 46,4 % ($p = 0,064$), 10 мкМ — на 42,2 % ($p = 0,089$) на фоне воздействия H_2O_2 . При сравнении влияния ЭМГПС и эдаварона на уровень карбонильных производных белков было показано, что в условиях ОС применение ЭМГПС приводило к снижению данного показателя в большей степени, по сравнению с применением эдаварона в концентрации 100 мкМ на 30,6 % ($p = 0,054$) (таблица).

ЭМГПС при моделировании ОС вызывал снижение уровня ТБК-реактивных продуктов в концентрации 100, 50, 10 и 5 мкМ на 63,2; 61,1; 41,1 и 31,2 %, соответственно, ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем (таблица). Эдаварон в концентрациях 100, 50, 10 и 5 мкМ на фоне воздействия H_2O_2 снижал содержание ТБК-реактивных продуктов на 34,6; 36,4; 35,8 и 17,4 % соответственно ($p \leq 0,05$). При развитии ОС было показано, что на фоне применения ЭМГПС в концентрациях 100 и 50 мкМ уровень ТБК-реактивных продуктов был меньше на 43,8 и 38,7 % соответственно ($p \leq 0,05$) по сравнению с эдавароном (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при моделировании ОС в условиях *in vitro* ЭМГПС и эдаварон проявляют дозозависимую антиоксидантную активность.

При этом ЭМГПС превосходит эдаварон по антиоксидантному действию, о чем свидетельствовало более выраженное снижение уровня ТБК-реактивных продуктов (максимальное снижение на 63,2 в сравнении с 36,4 % при применении эдаварона, $p = 0,021$) и карбонильных производных белков (максимальное снижение на 64,9 в сравнении с 49,5 % при применении эдаварона, $p = 0,027$).

Более выраженное антиоксидантное действие ЭМГПС, по сравнению с эдавароном может быть связано с комплексным действием ЭМГПС — он обладает не только прямой (связывает свободные радикалы), но и непрямой антиоксидантной активностью (повышает активность антиоксидантных ферментов, стимулирует Nrf2) [3], в то время как для эдаварона, в основном, характерна прямая антиоксидантная активность [11, 13].

В то же время, ЭМГПС проявлял свою активность в более высоких концентрациях по сравнению с эдавароном. IC_{50} накопления ТБК-реактивных продуктов для ЭМГПС составила $37,9 \pm 23,5$ мкМ в сравнении с $7,3 \pm 0,3$ мкМ для эдаварона ($p = 0,076$). IC_{50} накопления карбонильных производных белков достоверно

Влияние ЭМГПС и эдаварона на концентрацию карбонильных производных белков и ТБК-реактивных продуктов в лизате клеток линии НЕК293 при моделировании окислительного стресса ($M \pm SD$)

Экспериментальная группа	Концентрация карбонильных производных белков, нмоль/мг белка		Концентрация ТБК-реактивных продуктов, нмоль/мг белка	
	2-Этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина сукцинат + H_2O_2	Эдаварон + H_2O_2	2-Этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина сукцинат + H_2O_2	Эдаварон + H_2O_2
Норма	$58,4 \pm 5,1$		$11,4 \pm 1,0$	
H_2O_2 , 5 мМ	$289,6 \pm 40,5$		$32,1 \pm 2,7$	
Концентрации тестируемых веществ, мкМ				
100	$101,6 \pm 7,4^*$	$146,3 \pm 27,8^{**\#}$	$11,8 \pm 0,3^*$	$21,0 \pm 2,4^{\#\#}$
50	$184,3 \pm 26,1^*$	$155,1 \pm 58,2^{**}$	$12,5 \pm 0,2^*$	$20,4 \pm 5,1^{\#\#}$
10	$264,0 \pm 110,1$	$167,3 \pm 4,1^{**}$	$18,9 \pm 9,5^*$	$20,6 \pm 4,6^*$
5	$305,2 \pm 24,6$	$258,0 \pm 196,0$	$22,1 \pm 3,3^*$	$26,5 \pm 2,6^{**}$

* $p < 0,05$ по сравнению с группой H_2O_2 (контроль) (критерий Фишера);

** $p < 0,1$ по сравнению с группой H_2O_2 (контроль) (критерий Фишера);

$p = 0,054$ — различия между ЭМГПС и эдавароном (*t*-критерий Стьюдента).

между веществами не отличалась: для ЭМГПС — $11,9 \pm 13,1$ мкМ в сравнении с $8,4 \pm 2,6$ мкМ для эдаравона ($p = 0,34$).

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Показано, что эдаравон проявляет антиоксидантную активность в диапазоне концентраций 1 – 10 мкМ [8], а ЭМГПС — 50 – 1000 мкМ [2].

Таким образом, в ходе настоящего исследования показано, что ЭМГПС является менее токсичным веществом, чем эдаравон, и оказывает достоверно более выраженное антиоксидантное действие.

Полученные данные позволяют предполагать лучшую безопасность и, по крайней мере, не меньшую эффективность ЭМГПС, по сравнению с эдаравоном в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. ЭМГПС является менее токсичным веществом, чем эдаравон (минимальная подавляющая жизнеспособность клеток линии HEK293 концентрация ЭМГПС = 5 мМ, для эдаравона 5, 1 и 0,5 мМ).

2. ЭМГПС превосходит эдаравон по антиоксидантной активности при развитии окислительного стресса в клетках линии HEK293. В концентрации 100 мкМ ЭМГПС на 30,6 % ($p = 0,054$) больше, чем эдаравон в аналогичной концентрации снижает содержание карбонильных производных белков в лизате клеток, а в концентрациях 100 и 50 мкМ — на 43,8 % ($p = 0,003$) и 38,7 % ($p = 0,05$) соответственно, снижает уровень ТБК-реактивных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Стаховская, Н. А. Шамалов, Д. Р. Хасанова и др., *Журн. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова. Спецвыпу-*

- ски*, **117**(3) — 2, 55–65 (2017); doi: 10.17116 / jnevro20171173255–65.
2. А. В. Шулькин, *Журн. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова*, **112**(2), 35–39 (2012).
3. А. В. Шулькин, *Журн. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова*, **118**(12–2), 87–93 (2018); doi: 10.17116 / jnevro201811812287.
4. M. M. Bradford, *Anal Biochem.*, **7**(72), 248–54 (1976); doi: 10.1006 / abio.1976.9999. PMID: 942051.
5. The Edaravone Acute Brain Infarction Study Group, *Cerebrovasc Dis.*, **15**(3), 222–229 (2003); doi: 10.1159 / 000069318.
6. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York, (2015); doi: 10.1093 / acprof:oso / 9780198717478.001.0001.
7. The Japan Stroke Society, Stroke Guidelines Committee, *Japanese Guidelines for the Management of Stroke* (2015) [in Japanese].
8. H. Lin, X. Ma, B. C. Wang, et al., *Life Sci.*, **15**(89), 76–83 (2017); doi: 10.1016 / j.lfs.2017.09.024.
9. M. Mihara, M. Uchiyama, *Anal. Biochem.*, **86**(1), 271–278 (1978); doi: 10.1016 / 0003–2697(78)90342–1.
10. A. M. Pisoschi, A. Pop, F. Iordache, et al., *European J. Med. Chem.*, **1**(209), 112891 (2021); doi: 10.1016 / j.ejmech.2020.112891.
11. O. Tokumaru, Y. Shuto, K. Ogata, et al., *J. Surg. Res.*, **228**, 147–153 (2018); doi: 10.1016 / j.jss.2018.03.020.
12. L. Tolosa, M. T. Donato, M. J. Gómez-Lechón, *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333–348 (2015); doi: 10.1007 / 978-1-4939-2074-7 26.
13. T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovasc Ther.*, **26**(2), 101–114 (2008); doi: 10.1111 / j.1527-3466.2008.00041.x.
14. D. Weber, M. J. Davies, T. Grunea, *Redox Biol.*, **5**, 367–380 (2015); doi: 10.1016 / j.redox.2015.06.005.
15. Writing Group; Edaravone (MCI-186) ALS 19, *Study Group Lancet Neurol.*, **16**(7), 505–512 (2017); doi: 10.1016 / S1474-4422(17)30115-1.

Поступила 20.09.21

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOXICITY OF ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE AND EDARAVONE: COMPARATIVE *IN VITRO* EXPERIMENT

A. V. Shchul'kin¹, Yu. V. Abalenikhina¹, P. D. Erokhina¹, and E. N. Yakusheva¹

¹ Ryazan State Medical University, ul. Vysokovolt'naya 9, Ryazan, 390026 Russia

The cytotoxic effect and antioxidant activity of ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS) and edaravone were compared in a concentration range of 5 – 5000 mM. The cytotoxic effect was assessed on the HEK293 cell line using the MTT test. The oxidative stress (OS) was modeled by incubation of cells with hydrogen peroxide (H₂O₂) at a concentration of 5 mM for an exposure duration of 24 h. The antioxidant activity of both substances was analyzed using their effects on the level of carbonyl derivatives of proteins and TBA-reactive products in the lysate of HEK293 cells. EMHPS reduced the viability of cells only at a concentration of 5 mM to 64.46 + 9.17% ($p = 0.021$), while edaravone was effective at concentrations of 5, 1, and 0.5 mM by reducing the viability of cells to 44.55 + 7.43% ($p = 0.008$), 57.11 + 11.79% ($p = 0.013$), and 67.97 + 28.07% ($p = 0.059$), respectively. The OS modeling was accompanied by decrease in the viability of cells to 24.50 + 14.14% ($p = 0.033$). Both EMHPS and edaravone at concentrations of 50 and 100 mM prevented decrease in the cell viability under OS conditions. However, the EMHPS effect at a concentration of 100 mM was stronger by 30.6% ($p = 0.054$) than that of edaravone at a similar concentration in reducing the content of carbonyl derivatives of proteins in the cell lysate. At concentrations of 100 and 50 mM, EMHPS decreased the level of TBA-reactive products in the lysate also stronger than did edaravone – by 43.8% ($p = 0.003$) and 38.7% ($p = 0.05$), respectively. Thus, results of this study show that EMHPS is a less toxic substance and has more pronounced antioxidant properties in comparison to edaravone.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate; edaravone; oxidative stress; hydrogen peroxide; HEK293 cell line; toxicity; viability.