



УДК: 616-092.4

DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-7

С.Я. Скачилова,
А.С. Котельникова,
А.С. Тимохина,
О.В. Щеплыкина

**ОЦЕНКА АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА
В ОПЫТАХ IN VITRO**

Акционерное общество «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ»,
ул. Кирова, д. 23, г. Старая Купавна, Ногинский район, Московская область, 142450,
Российская Федерация

Автор для переписки: А.С. Тимохина (*timoxina_alena@bk.ru*)

Информация для цитирования: Оценка антигипоксической активности этилметилгидроксипиридина сукцината в опытах *in vitro* / С.Я. Скачилова [и др.] // Научные результаты биомедицинских исследований. 2018. Т. 4, N 3. С. 70-75. [Skachilova SYa, Kotelnikova AS, Timokhina AS, et al. Evaluation of antihypoxic activity of ethylmethylhydroxypyridine sukcinat in *in vitro* experiments. Research Results in Biomedicine. 2018;4(3):70-75 (In Russian)]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-7

Аннотация

Актуальность: Поиск потенциальных кардио- и церебропротекторных средств, среди производных оксипиридина, является актуальным, поскольку среди них обнаружены соединения, обладающие антигипоксической, антиоксидантной активностью, оригинальный спектр нейротропного действия лекарственных препаратов на уровне нейронов (анксиолитический, антистрессовый, противосудорожный, церебропротекторный, противопаркинсонический, антиамнестический и противоалкогольный), улучшают мозговое кровообращение, ингибируют агрегацию тромбоцитов, увеличивают антитромбогенный потенциал крови, снижают общий уровень холестерина, оказывают кардиопротекторный и антиатеросклеротический эффекты. **Цель исследования:** Изучить влияние препаратов этилметилгидроксипиридина сукцинат на интенсивность протеолиза в экстракте ткани головного мозга и сыворотке крови крыс *in vitro*. **Материалы и методы:** Оценка антигипоксической активности производилась с помощью тест-системы моделирующей условия гипоксии *in vitro*. **Результаты:** В ходе эксперимента было установлено: количество живых клеток в группе №1 (положительный контроль) составляло 46.82 ± 8.15 , мертвых – 23.64 ± 5.52 ; в группе №2 (отрицательный контроль, 10% раствора формалина) – живых клеток – 32.27 ± 5.18 ; мертвых – 40.91 ± 7.69 ; в группе №3 (модель гипоксии) – живых клеток – 30.91 ± 3.75 , мертвых – 35.45 ± 10.60 ; в группе №4 (добавление Мексиприма 0.01 моль/л) живых клеток – 56.36 ± 6.36 , мертвых клеток 31.82 ± 4.05 ; в группе №5 (добавление Мексиприма 0.01 моль/л при гипоксии) количество живых клеток составило 53.18 ± 7.17 , мертвых клеток 35.45 ± 4.72 . На модели гипоксии *in vitro* установлено, что препарат Мексидол достоверно повышает жизнеспособность клеток в условиях гипоксии по сравнению с группой контроля ($53.18 \pm 7.17\%$ против 30.91 ± 3.75 , при $p < 0.05$). **Заключение:** Установлено, что предложенный метод оценки антигипоксической активности *in vitro* с

использованием в качестве препарата-референса этилметилгидроксипиридина сукцината актуально при скрининге инновационных молекул.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат; мексидол; мексиприм; гипоксия

Sofya Ya. Skachilova,
Alla S. Kotelnikova,
Alyona S. Timokhina,
Olesya V. Shcheblykina

EVALUATION OF ANTIHYPOXIC ACTIVITY OF ETHYLMETHYLHYDROXIPYRIDINE SUKCCINATE IN IN VITRO EXPERIMENTS

All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances,
23 Kirov St., Staraya Kupavna, Noginsk District, Moscow Region, 142450, Russia
Corresponding author: Alyona S. Timokhina (timoxina_alena@bk.ru)

Abstract

Background: The search for potential cardio- and cerebroprotective agents among the derivatives of oxypyridine is topical, since they are proven to contain the compounds with antihypoxic, antioxidant activity, and the original spectrum of neurotropic action of drugs at the level of neurons (anxiolytic, antistress, anticonvulsant, cerebroprotective, antiparkinsonic, antiamnestic and antialcoholic), improve cerebral circulation, inhibit platelet aggregation, increase the antithrombogenic potential of blood, reduce total cholesterol, have a cardioprotective and anti-atherosclerotic effects. **The aim of the study:** To study the effect of the preparations of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the intensity of proteolysis in the extract of the brain tissue and serum of rats in vitro. **Materials and methods:** The evaluation of antihypoxic activity was performed using a test system for modeling the hypoxia condition in vitro. **Results:** In the course of the experiment it was established that the number of living cells in group No. 1 (positive control) was 46.82 ± 8.15 , the dead number was 23.64 ± 5.52 ; in group 2 (negative control, 10% formalin solution) – living cells – 32.27 ± 5.18 ; of the dead – 40.91 ± 7.69 ; in the group №3 (model of hypoxia) – living cells – 30.91 ± 3.75 , dead – 35.45 ± 10.60 ; in group number 4 (addition of Mexiprim 0.01 mol/l) of living cells – 56.36 ± 6.36 , dead cells 31.82 ± 4.05 ; in group number 5 (addition of Mexiprim 0.01 mole/l in hypoxia), the number of living cells was 53.18 ± 7.17 , dead cells 35.45 ± 4.72 . On the model of hypoxia in vitro, it was established that the Meksid product significantly increases the viability of cells under conditions of hypoxia in comparison with the control group ($53.18 \pm 7.17\%$ vs. 30.91 ± 3.75 , with $p < 0.05$). **Conclusion:** It has been established that the proposed method for evaluating antihypoxic activity in vitro, using ethylmethyl hydroxypyridine succinate as a reference substance, is relevant in screening of innovative molecules.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate; mexidol; mexiprim; hypoxia

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в структуре заболеваемости и смертности, и являются важной медицинской и социальной проблемой [1]. Среди смертельных случаев в Российской Федерации доля ишемической бо-

лезни сердца составляет 25.7%, инсультов – 21.4% [2].

В связи с такой далеко неутешительной статистикой существует необходимость в современных инновациях для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Для достижения этой цели, необходимо дальней-

шее развитие фундаментальных исследований, целью которых является изменение эндогенного потенциала сердечно-сосудистой системы [3].

Основной задачей лечения сердечно-сосудистых заболеваний является улучшение прогноза заболевания, предупреждение развития осложнений, увеличение продолжительности и улучшение качества жизни, также важно обратить внимание на поиск новых кардио- и церебропротекторных препаратов [4, 5].

Производные 3-оксипиридинового ряда имеют широкий спектр биологических эффектов. Среди них обнаружены соединения, которые обладают антигипоксической, антиоксидантной активностью, оригинальный спектр нейротропного действия лекарственных препаратов на уровне нейронов (анксиолитический, антистрессовый, противосудорожный, церебропротекторный, противопаркинсонический, антиамнестический и противоалкогольный), улучшают мозговое кровообращение, ингибируют агрегацию тромбоцитов, увеличивают антитромбогенный потенциал крови, снижают общий уровень холестерина, оказывают кардиопротекторный и антиатеросклеротический эффекты. Таким образом, целесообразно искать потенциальные кардио- и церебропротективные средства среди производных оксипиридинового ряда [3, 6]. В последние годы активно изучаются лекарственные средства этилметилгидроксипиридина сукцинат и тиотриазолин.

Этилметилмеркаптопиридина сукцинат ингибирует свободно-радикальные процессы окисления липидов и оказывает модулирующее действие на активность связанных с мембраной ферментов и ионных каналов [7, 8]. Выявлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не оказывает влияния на активность трипсиноподобных, цистеиновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстракте мозговой ткани крысы *in vitro* [9]. Однако, способность этилметилгидроксипиридина сукцината воздействовать на активность протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов в ткани головного мозга и сыворотке недостаточно изучена [10].

Цель исследования. Изучить влияние препаратов этилметилгидроксипиридина сукцинат и тиотриазолин на интенсивность протеолиза в экстракте ткани головного мозга и сыворотке крови крыс *in vitro*.

Материалы и методы.

Дизайн исследования включал несколько этапов:

1. Выделение лейкоцитов.
2. Культивирование.
3. Окрашивание прижизненными красителями.
4. Флуоресцентная микроскопия.
5. Анализ результатов методом статистической обработки.

В каждую ячейку 24 луночного планшета добавляли 500 мкл полученной суспензии лейкоцитов, поверх которой добавляли 500 мкл питательной среды RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко) – контрольная группа 6 лунок.

В качестве отрицательного контроля использовали 10% раствор формалина – 6 лунок. Для моделирования гипоксии использовали масло Oil for Tissue Culture (для тканевых культур) (SAGE, США), которое вносилось в лунки в количестве 500 мкл поверх питательной среды с глутамином – 6 лунок.

В качестве тестируемого препарата использовался этилметилгидроксипиридина сукцинат или препарат с торговой маркой Мексиприм в концентрации 0.01 моль/л, без гипоксии – 6 лунок и с гипоксией – 6 лунок.

Культивирование клеток осуществляли в течении 8 часов в CO₂-инкубаторе, заполненном газовой смесью (95% воздуха + 5% CO₂), при температуре 37°C и относительной влажности 100%.

Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием двухкомпонентного красителя, включающего 2μM calcein-AM (Sigma-Aldrich, США) и 4μM Ethidium bromide (Sigma-Aldrich, США). Регистрацию флуоресценции живых и мертвых клеток проводили при помощи микроскопа EclipseTi-S (Nikon, Япония), увеличение x20.

Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле: количество мертвых клеток / (количество живых клеток + количество мертвых клеток) x100% [11].

Для подсчета количества клеток использовали специализированное программное обеспечение программу EZ-C1 FreeViewer Ver3.90 (Nikon, Япония).

Статистический анализ производился с помощью программного обеспечения

Результаты и их обсуждение. В ходе эксперимента при сравнении статистических данных в представленных исследуемых группах были установлены достоверные статистические различия количества клеток.

Четко прослеживаются достоверные различия в сравнительном количестве клеток в группах (рисунок):

- 1) Контроль положительный.
- 2) Контроль отрицательный (с 10% р-ом формалина).
- 3) Контроль (гипоксия).

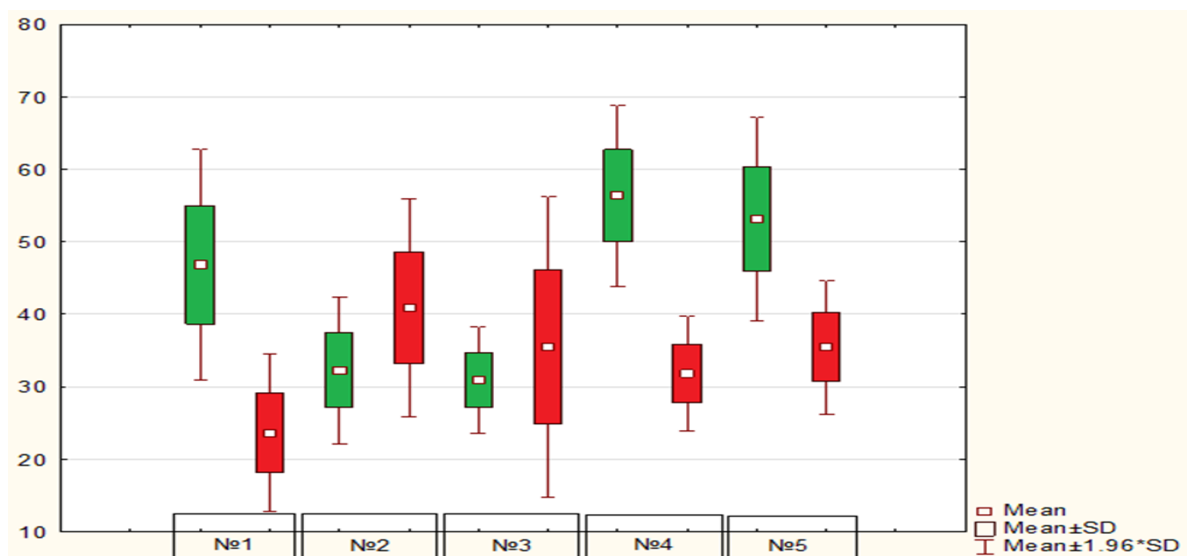
4) Контроль положительный + Мексиприм.

5) Контроль (гипоксия) + Мексиприм.

Были установлены достоверные различия (при $p < 0.01$) между группой №1 (положительный контроль) и группами №2 (отрицательный контроль, 10% раствора формалина) №3 (модель гипоксии) со снижением количества жизнеспособных клеток.

Так жизнеспособность клеток во №2 (27%) и №3 (130.91%) снижалась по сравнению с №1 группой – 146.82%, что свидетельствует о цитотоксическом эффекте.

На ряду с этим в группе №4 (156.36%) и группе №5 (153.18%) процент жизнеспособных клеток был больше по сравнению с группой №1 и имел достоверные различия (при $p < 0.01$), что свидетельствует о стимулирующем и антигипоксическом эффекте препарата Мексиприм, добавленного в культуральную среду.



Примечание: №1 – положительный контроль, №2 – отрицательный контроль (с 10% р-ом формалина), №3 – условия гипоксии, №4 – Мексиприм 0,01 моль/л в нормальных условиях; №5 – Мексиприм 0,01 моль/л в условиях гипоксии. * – $p < 0.05$.

Note: №1 – positive control, №2 – negative control (with 10% pth formalin), №3 – conditions of hypoxia, №4 – Mexiprim 0.01 mol/l under normal conditions; №5 – Meciprim 0.01 mol/l under hypoxic conditions. * – $p < 0.05$.

Рис. Результаты эксперимента in vitro

Fig. The results of the in vitro experiment

В ходе эксперимента было установлено: количество живых клеток в группе №1 (положительный контроль) составляло 46.82 ± 8.15 , мертвых – 23.64 ± 5.52 ; в группе №2 (отрицательный контроль, 10% раствора формалина) – живых клеток – 32.27 ± 5.18 ;

мертвых – 40.91 ± 7.69 ; в группе №3 (модель гипоксии) – живых клеток – 30.91 ± 3.75 , мертвых – 35.45 ± 10.60 ; в группе №4 (добавление Мексиприма 0.01 моль/л) живых клеток – 56.36 ± 6.36 , мертвых клеток 31.82 ± 4.05 ; в группе №5 (добавление Мек-

сиприма 0.01 моль/л при гипоксии) количество живых клеток составило 53.18 ± 7.17 , мертвых клеток 35.45 ± 4.72 .

О стимулирующем антигипоксическом эффекте препарата Мексиприм, добавленного в культуральную среду, свидетельствует процент жизнеспособных клеток в группе 4 (Мексиприм) и группе 5 (Мексиприм+гипоксия) по сравнению с группой №1 (контроль) и имел достоверные различия (при $p < 0.01$).

Заключение. Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что предложенный метод оценки антигипоксической активности *in vitro* с использованием в качестве препарата-референса этилметилгидроксипиридина сукцината актуально при скрининге инновационных молекул.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Effect of a 3-hydroxypyridine derivative membrane modulator on pharmacological activity of some psychotropic drugs / L.D. Smirnov [et al.] // Bulletin of experimental biology and medicine. 1985. Vol. 99(5). P. 537-540.
2. Pharmacological protection of the ischemic myocardium by derivatives of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate and evaluation of their antioxidant activity / S.Ya. Skachilova [et al.] // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2015. Vol.1(1). P. 23-27.
3. Pharmacological screening of substances with cardioprotective effect in the group of 3-oxypyridine derivatives / L.M. Danilenko [et al.] // Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. 2018. Vol. 4(2). P. 125-131.
4. Effect of Trimetazidine on Carnitine Palmitoyltransferase-1 in the Rat Heart / J. Kennedy, J. Horowitz // Cardiovascular Drugs and Therapy. 1998. N 12. P. 359-363.
5. Evaluation of cardioprotective effects of the incretinmimetics exenatide and vildagliptin in the experiment / A.P. Tarasova [et al.] // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017. Vol. 3(2). P. 57-63.
6. 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate: new concept of realization of cardioprotective effect / L. Danilenko, M. Pokrovskii // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014. Vol. 5(6). P. 1419-1422.

7. Лисицкая К.В. Цитопротективный и антиоксидантный эффекты препарата «мексидол-вет» на культивируемых клетках человека и собаки (доклинические исследования) // Российский ветеринарный журнал. 2016. Т. 6, N 34. С. 18-22.

8. Чанчаева Е.А., Айзман Р.И., Герасев А.Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека // Экология человека. 2013. N 7. С. 50-58.

9. Trimetazidine: *in vitro* influence on heart mitochondrial function / L. Demaison [et al.] // Am J Cardiol. 1995. N 76. P. 31B-37B.

10. Study of dose-dependent effect of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate on the contractile function of isolated rat heart / O.G. Kesarev [et al.] // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017. Vol. 3(1). P. 3-9.

11. Frimmel G. Immunological methods. Medicine, 1987.

References

1. Smirnov LD, Voronina TA, Dyumaev KM. Effect of a 3-hydroxypyridine derivative membrane modulator on pharmacological activity of some psychotropic drugs. Bulletin of experimental biology and medicine. 1985;99(5):537-540.
2. Skachilova SYa, Danilenko LM, Kesarev OG, et al. Pharmacological protection of the ischemic myocardium by derivatives of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate and evaluation of their antioxidant activity. Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2015;1(1):23-27.
3. Danilenko LM, Skachilova SYa, Nadezhdin SV, et al. Pharmacological screening of substances with cardioprotective effect in the group of 3-oxypyridine derivatives. Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. 2018;4(2):125-131.
4. Kennedy J, Horowitz J. Effect of trimetazidine on carnitine palmitoyltransferase-1 in the rat heart. Cardiovascular Drugs and Therapy. 1998;12:359-363.
5. Tarasova AP, Danilenko LM, Tatarenkova IA, et al. Evaluation of cardioprotective effects of the incretinmimetics exenatide and vildagliptin in the experiment. Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017;3(2):57-63.
6. Danilenko LM, Pokrovskiy MV. 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate: new concept of realization of cardioprotective effect. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014;5(6):1419-1422.
7. Lisitskaya KV. [Cytoprotective and antioxidant effects of the drug "mexidol" on cultured

human and dog cells (preclinical studies)]. *Rossiyskiy veterinarny zhurnal*. 2016;6(34):18-22. Russian.

8. Chanchayeva EA, Ayzman RI, Gerasev AD. [Modern concept of the antioxidant system of the human body]. *Ekologiya cheloveka*. 2013;7:50-58. Russian.

9. Demaison L, Fantini L, Sentex E, et al. Trimetazidine: in vitro influence on heart mitochondrial function. *Am J Cardiol*. 1995;76:31B-37B.

10. Kesarev OG, Danilenko LM, Pokrovskii MV, et al. Study of dose-dependent effect of 2-ethyl-6-methyl-3 hydroxypyridine succinate on the contractile function of isolated rat heart. *Research result: pharmacology and clinical pharmacology*. 2017;3(1):3-9.

11. Frimmel G. *Immunological methods*. Medicine; 1987.

Софья Яковлевна Скачилова, доктор химических наук, профессор, заведующая отделом химии и технологии, АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ».

Алла Сергеевна Котельникова, научный сотрудник, АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ».

Алёна Сергеевна Тимохина, научный сотрудник, АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ».

Олеся Викторовна Щеблыкина, научный сотрудник, АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ».

Sofya Ya. Skachilova, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Chemistry and Technology, All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances.

Alla S. Kotelnikova, Researcher, All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances.

Alyona S. Timokhina, Researcher, All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances.

Olesya V. Shcheblykina, Researcher, All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances.

Статья поступила в редакцию 3 июля 2018 г.
Receipt date 2018 July 3.