Биомедицинская химия, 2025 том 71, вып. 6, с. 432–440.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНЪЮГАТОВ ПИРИДОКСИНА И КЕТОРОЛАКА *IN VITRO*

М.Н. Агафонова*, О.С. Васильева, Е.М. Фафанова, Д.Ю. Гришаев, М.Н. Сарынин, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, Казань, ул. Кремлевская, 18; *эл. почта: Mariya.Agafonova@kpfu.ru

Пролекарственные бифармакофорные конъюгаты на основе пиридоксина и наиболее мощного из всех известных НПВС анальгетика кеторолака *in vivo* проявляют сопоставимую с кеторолаком анальгетическую активность, но при этом обладают значительно более высокой безопасностью и пролонгированностью действия. В настоящей работе *in vitro* исследованы антиоксидантные и протекторные свойства двух пролекарственных бифармакофорных конъюгатов на основе пиридоксина и кеторолака, их ингибирующая активность в отношении циклооксигеназы (ЦОГ), а также внутриклеточная проницаемость на модели клеток кишечника линии Caco-2. Показано, что данные соединения ингибируют ЦОГ-1 и ЦОГ-2 на уровне кеторолака со значениями IC_{50} в интервале от 12,0 мкМ до 34,7 мкМ. Они оказывают выраженное протекторное действие в условиях теплового и химического воздействия мочевины и лимонной кислоты в отношении альбумина и могут проникать в клетки посредством пассивной диффузии.

Ключевые слова: пиридоксин; кеторолак; конъюгат; протекторное действие; циклооксигеназа; проницаемость

DOI: 10.18097/PBMCR1620

ВВЕДЕНИЕ

Кеторолак — представитель обширной фармакологической группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), который применяется в основном для кратковременного купирования умеренной и острой боли [1, 2]. В отличие от опиоидных анальгетиков, кеторолак не влияет на опиоидные рецепторы, что исключает характерные для них побочные эффекты — угнетение дыхания и развитие лекарственной зависимости [3, 4]. Фармакологический эффект обусловлен неселективным ингибированием циклооксигеназ (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), что приводит к подавлению синтеза простагландинов и, как следствие, ключевых фаз воспаления, обеспечивая высокое анальгезирующее и умеренное противовоспалительное и жаропонижающее действие [5, 6]. Однако применение кеторолака связано с высоким риском развития нежелательных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, печени и почек, обусловленных неселективным ингибированием ЦОГ и прямым ульцерогенным действием препарата, что ограничивает возможность его длительного применения, в частности, при хронических болевых синдромах [7, 8]. В связи с этим разработка НПВС с улучшенным профилем безопасности и эффективности является одной из ключевых задач современной фармакологии [9].

Ранее в нашей исследовательской группе были синтезированы пролекарственные бифармакофорные конъюгаты на основе пиридоксина и кеторолака (соединения **1** и **2**, рисунок 1). Для полученных соединений была исследована анальгетическая и противовоспалительная активность и осуществлена оценка их безопасности *in vitro* и *in vivo* [10, 11]. Согласно результатам *in vivo*, соединения **1** и **2** не уступают кеторолака трометамину по анальгетической и противовоспалительной активности в тестах термического и химического раздражения (“горячая пластина”, “каррагениновый отёк”, “уксусные корчи”, “острое экссудативное воспаление”) и обладают более пролонгированным действием [10, 11]. При этом исследуемые соединения оказались значительно более безопасными как при однократном ($ЛД_{50}$ = 2000 мг/кг, по сравнению с $ЛД_{50}$ кеторолака — 189 мг/кг), так и при ежедневном внутрижелудочном введении в течение 14 суток. В настоящей работе исследованы факторы, влияющие на установленный ранее в исследованиях *in vivo* благоприятный профиль безопасности, а также изучен механизм их действия.

МЕТОДИКА

Исследуемые соединения

В данной работе были изучены пролекарственные бифармакофорные конъюгаты на основе пиридоксина и кеторолака **1** и **2** (рис. 1). Соединения **1** и **2** синтезированы по методике, описанной в работе [10].

Клеточные линии, условия культивирования

Линии клеток Caco-2 и MCF-7 (полученные от ATCC, American Type Culture Collection) культивировали согласно рекомендациям ATCC: культуральные флаконы 75 $см^2$ при 37°C, влажность 95% и 5% CO_2. Клетки пересевали 2 раза с частотой примерно раз в неделю (~0,25–1,0×10^6 клеток), используя среду Dulbecco's

© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

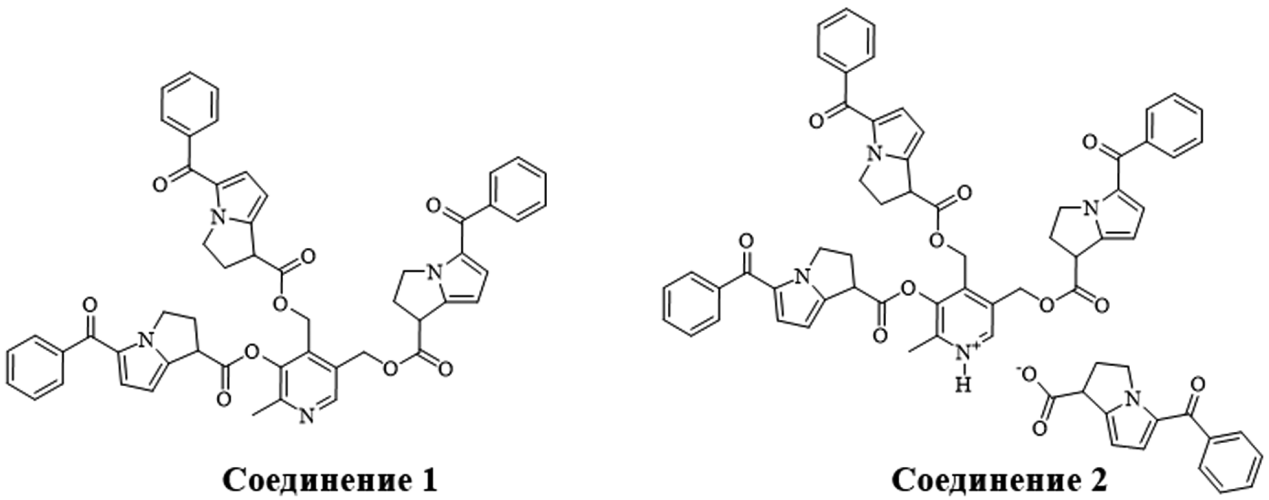

Рисунок 1. Структуры соединений **1** (5-((5-бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин-1-карбонил)окси)-6-метилпиридин-3,4-диил)бис(метилен)бис(5-бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин-1-карбоксилат) и **2** (3-((5-бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин-1-карбонил)окси)-4,5-бис(((5-бензоил-2,3-дигидро-1H-пирролизин-1-карбонил)окси)метил)-2-метилпиридиний 5-бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин1-карбоксилат) [10].

Modified Eagle's Medium (DMEM), содержащую L-глутамин (0,584 г/л), 10% эмбриональную телячью сыворотку (по объёму), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл) [12, 13].

Реактивы и оборудование

Оборудование: центрифуга Mikro 200R (“Hettich”, Германия); планшетные спектрофотометры Tecan Infinite 200 PRO (“Tecan”, Швейцария) и Varioskan LUX (“Thermo Scientific”, США); инкубатор MCO-15AC (“Sanyo”, Япония); ультразвуковая баня S30 Elmasonic (“Elma”, Германия); эпителиальный измеритель вольт/Ом EVOM2 с электродом STX2 (“WPI”, США); хроматограф Agilent 1260 Infinity (“Agilent Technologies”, США), сопряжённый с масс-спектрометром ABSciex 5600 (“SCIEX”, Сингапур); амплификатор CFX96 Touch Bio-Rad (“Bio-Rad”, США); ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls HD (“Bandelin”, Германия).

Реактивы: питательная среда (“ПанЭко”, Россия); пенициллин-стрептомицин (“ПанЭко”); L-глутамин (“ПанЭко”); эмбриональная телячья сыворотка (“Hyclone”, США); трипсина-ЭДТА (“ПанЭко”); тест-набор Human Cyclooxygenase (COX) ELISA Kit (“Abclonal”, Китай); коктейль ингибиторов протеаз (“Thermo Scientific”); фосфатно-солевой буфер (PBS) и буфер HEPES (“ПанЭко”; “ЭкоСЕРВИС”, Россия); детергент NP 40 (“Sigma”, США); детергент CHAPS (“Sigma”); АБТС (ABTS) 2,2′-азино-бис-(3-этил-бензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевая соль (“Macklin”, Китай); альбумин/лецитин (“Servicebio”, Китай); краситель SYPRO Orange Protein Gel Stain (“Lumiprobe”, Россия); диметилсульфоксид (ДМСО) (“Servicebio”); трихлоруксусная кислота (“Macklin”); тиобарбитуровая кислота (“Macklin”); сульфат железа (“Macklin”); буфер Tris-HCl (“Servicebio”); хлорид калия (“Macklin”); хлороформ (“Татхимпродукт”, Россия); соляная кислота (“Татхимпродукт”); мочевина (“Servicebio”); лимонная кислота (“Macklin”); метанол (“Biosolve”, Франция); муравьиная кислота (“Sigma”), верапамил (“Sigma”), Ранитидин (“Sigma”), пропранолол (“Sigma”).

Определение ингибирующей активности в отношении ЦОГ в клетках MCF-7 с помощью ИФА

Клетки MCF-7 (3,5 млн) промывали буфером PBS (pH 7,3) и осаждали на центрифуге Hettich Mikro 200R (5 мин, 2000 об/мин). Процедуру повторяли дважды. Для разрушения клеток к осадку добавляли лизирующий буфер (PBS pH 7,3, 1% (по объёму) NP40, 4% (масса/объём) CHAPS и ингибиторы протеаз). Лизат перемешивали и помещали клетки в ультразвуковую баню на 20 мин (GT SONIC-P20, 10 мин при комнатной температуре, частота 40 кГц), центрифигуривали 15 мин при 15000 об/мин (Hettich Mikro 200R). Далее надосадок отбирали, помещали на лед и использовали для исследования ингибирующей активности. Реагенты, входящие в состав набора Human Cyclooxygenase (COX) ELISA Kit, готовили в соответствии с инструкцией к набору. Стоковые растворы исследуемых соединений и препарата сравнения (кеторолака трометамин) разводили в 85% (по объёму) ДМСО таким образом, чтобы концентрация в реакционной смеси составила 100 мкМ, 25 мкМ, 6,25 мкМ и 1,56 мкМ соответственно. Реакционная смесь включала 93 мкл лизата клеток, 5 мкл исследуемого вещества, 2 мкл ингибиторов изоформ ЦОГ, входящих в состав набора (SC560/Celecoxib) или равного объёма разведений стандартов из коммерческого набора. Образцы инкубировали в течение 2 ч при 37°C, а не связавшиеся компоненты удаляли отмывкой. Далее добавляли биотинилированные антитела и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, не связавшиеся компоненты удаляли отмывкой. Далее добавляли HRP-стрептавидин и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем после ещё одной стадии промывки добавляли раствор входящего в состав

набора субстрата ТМБ (3,3′,5,5′-тетраметилбензидин), и инкубировали в течение 20 мин при 37°C, не допуская попадания света. Реакцию останавливали добавлением прилагаемого стоп-раствора и сразу же детектировали образцы спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды. Используя стандартную кривую, вычисляли процент ингибирования ЦОГ (программа Annova, критерий хи-квадрат, значения поглощения для необработанного лизата клеток принимали за 100%). Далее по имеющимся данным строили кривую ингибирования для определения значений IC_{50} исследуемых соединений. Значимость различий средних значений IC_{50} определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p \le 0{,}01$) с учётом поправки Бонферрони. Графические и табличные данные содержат средние значения и стандартное отклонение.

Изучение проницаемости на модели клеток кишечника линии Caco-2

В верхний отсек 12-луночного планшета со вставками (“Nest”, Китай), где дно ячейки состоит из полупроницаемого фильтра, на котором формируется монослой клеток: площадь поверхности мембраны 1,2 см^2, размер пор 0,4 нм, помещали суспензию клеток (не менее 70000 клеток). В нижний отсек добавляли 2 мл среды, накрывали планшет крышкой и инкубировали клетки в течение 21 дня со сменой среды каждые 2 дня. Последнюю замену среды проводили не позднее, чем за 24 ч до эксперимента. Целостность монослоя проверяли путём измерения электрического сопротивления электродом с помощью прибора EVOM2.

Готовили растворы: 10 мМ HEPES, pH 7,4 (буфер I); 10 мМ HEPES, содержащий 1% (по объёму) ДМСО, pH 7,4 (буфер II); 0,2 мМ стоковые растворы исследуемых соединений и препаратов сравнения (кеторолака трометамин, пропранолол, ранитидин, верапамила) в объёме 5 мл ДМСО. Стоковые растворы разводили в 200 раз буфером I до конечной концентрации верапамила 10 мкМ и конечных концентраций соединений **1** и **2**, кеторолака трометамина, ранитидина и пропранолола 1 мкМ. Далее буфер I нагревали до 37°C и добавляли по 300 мкл в каждую вставку и по 1800 мкл в каждую лунку, инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. С помощью аспиратора аккуратно удаляли среду из вставок и лунок планшета (промывку повторяли дважды). Определяли транспорт исследуемых соединений и кеторолака трометамина с помощью контрольных соединений — пропранолола (контроль с высокой проницаемостью) и ранитидина (контроль с низкой проницаемостью). Скорость транспорта определяли в направлении A→B (из апикального отсека в базолатеральный) и B→A (из базолатерального отсека в апикальный).

Для определения скорости транспорта добавляли по 300 мкл буфера II во вставки с фильтрами и по 1800 мкл исследуемых соединений и кеторолака трометамина в буфере I в лунки планшета. Далее накрывали планшет крышкой и инкубировали 1,5 ч при 37°C. По окончании инкубации добавляли по 200 мкл осаждающего раствора (смесь ацетонитрила/метанола (3:1, по объёму) и 0,1% (по объёму) муравьиной кислоты); пробы встряхивали, центрифугировали при 10000 об/мин, 10 мин, отбирали надосадок в хроматографические виалы и проводили ВЭЖХ-МС анализ. В таблицах 1 и 2 отражены хроматографические параметры и параметры МС-детектирования соответственно.

Концентрацию исследуемого вещества в пробах определяли по площади хроматографического пика по выбранному иону (XIC). Расчёт концентрации осуществляли на программном обеспечении MultiQuant (ABSciex, v. 3.0.2) с использованием алгоритма MQ4.

Проницаемость (P_{app}, см/с) через монослой Caco-2 клеток оценивали по формуле:

$$P_{app} = (V_A / \text{Area} \times \text{Time}) \times (C_{A(t)} / C_{D(0)}),$$

где V_A — объём (мл) в акцепторной лунке, который равен 0,6 мл или 0,1 мл в зависимости от направления транспорта; Area — площадь поверхности (см^2), которая составляет 0,33 см^2 для вставок 24-луночных планшетов SPLInsert™ Hanging; Time — время транспорта (7200 с); $C_{A(t)}$ — A / IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_{D(0)}$ — A / IS исходного раствора вещества в донорной лунке.

Таблица 1. Хроматографические параметры анализа исследуемых соединений

Растворитель A	0,005 М раствор формиата аммония в смеси вода/формамид (99:1, по объёму)			
Растворитель B	Ацетонитрил			
Хроматографическая колонка	Колонка ZIC-HILIC: размер 2×20 мм, размер частиц 3,5 мкм («Merck KGaA», Германия), температура колонки 40ºC, общее время анализа 7 мин			
Градиент	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	A, %*	B, %*
	0,0	0,6	0	100
	0,1	0,6	0	100
	1,1	0,6	80	20
	2,8	0,6	95	5
	2,9	0,6	0	100
	7,0	0,6	0	100

Примечание: * – по объёму.

Таблица 2. Параметры МС-детектирования исследуемых соединений

Тип источника ионов / Режим ионизации	**Turbo Ion Spray / Отрицательный**
Температура источника, ºС / Напряжение в источнике (IS), В	550 / 4500
Газ-небулайзер (GS1), psi / Газ-нагреватель (GS2), psi	55 (воздух)
Режим сбора данных	TOFMS + HRMRM через SWATH
Режим МС/МС фокусировки	Высокая чувствительность
Потенциал декластеризации (DP) в режиме TOFMS, eB	-80
Энергия соударения (CE) в режиме TOFMS, eB	-10
Дискретность накопления сигнала в режиме TOFMS, с	0,05
Изолируемые ионы-прекурсоры, (*m/z*) / Размер окна изолирования	244,04 / 3 Да
Контролируемые MRM-переходы	262,04→244,03 172,01→79,96
Потенциал декластеризации (DP) в режиме HRMRM через SWATH для иона с *m/z* 262,04, eB	-80
Энергия соударения (CE) в режиме HRMRM через SWATH для иона с *m/z* 262,04, eB	-20
Потенциал декластеризации (DP) в режиме HRMRM через SWATH для иона с *m/z* 172,01, eB	-80
Энергия соударения (CE) в режиме HRMRM через SWATH для иона с *m/z* 172,01, eB	-40
Дискретность накопления сигнала в режимах MRM через SWATH, с	0,025

Эффлюкс оценивали с помощью соотношения значений P_{app}, рассчитанных на основе данных о проницаемости как в отсутствие ингибитора верапамила, так и в его присутствии:

$$\text{Эффлюкс} = P_{app}(B \rightarrow A) / P_{app}(A \rightarrow B).$$

*Антиоксидантная активность соединений **1** и **2** в ABTS-тесте*

В лунки 96-луночного планшета (“SPL”, Корея) вносили 260 мкл растворов исследуемых и контрольных соединений (аскорбиновая кислота, кверцетин). В качестве растворителя использовали смесь метанол/вода (1:1, по объёму). Концентрации исследуемых соединений и кеторолака трометамина варьировали в диапазоне 5,5–700 мкМ. Далее в каждую лунку добавляли 260 мкл раствора ABTS (0,7 мМ), образцы инкубировали 15 мин при 37°С, а затем измеряли поглощение при длине волны 734 нм. Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды. Результаты обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel 2013 и Origin 8 Pro. Процент нейтрализации ABTS-радикала вычисляли как отношение оптической плотности опытных образцов к контрольным (поглощение реакционной смеси без исследуемого вещества). Для определения IC_{50} строили график зависимости ингибирования процесса окисления от концентрации исследуемого вещества.

Антиоксидантная активность исследуемых соединений на модельной системе фосфатидилхолиновых липосом

Яичный лецитин растворяли в хлороформе и растворитель выпаривали до образования равномерной лецитиновой плёнки, после чего вносили Tris-HCl/KCl буфер (pH 7,4). Далее смесь обрабатывали ультразвуком на импульсном режиме при средней мощности в течение 90 с. Концентрации исследуемых соединений и кеторолака трометамина варьировали в диапазоне 5,5–700 мкМ. В лунки 96-луночного планшета помещали полученную из лецитина суспензию и растворы исследуемых веществ, а также растворы аскорбиновой кислоты и сульфата железа, после чего смесь инкубировали 1,5 ч при 37°С. После инкубации реакционную смесь из планшета переносили в эппендорфы и добавляли смесь кислот (7,5% трихлоруксусная, 0,375% тиобарбитуровая и 0,25 молярная соляная). Реакционную смесь выдерживали 15 мин при 85°С, после чего центрифугировали при 4°С (5 мин, 10000 об/мин). Освобождённую от осадка смесь переносили в 96-луночные планшеты (“SPL”) и проводили детекцию при длине волны 535 нм с референсом 600 нм. Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды. Результаты обрабатывали с использованием Microsoft Excel 2013 и пакета программы Origin 8 Pro. Процент ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ) вычисляли как отношение величины поглощения образцов к контролю, в качестве которого использовали величину поглощения реакционной смеси в отсутствии исследуемого соединения в водном растворе ДМСО. Для определения IC_{50} строили график зависимости ингибирования реакции ПОЛ от концентрации исследуемого вещества.

Исследование протекторных свойств в условиях теплового воздействия на модельный белок

Стоковые растворы исследуемых соединений растворяли в 85% (по объёму) водном растворе ДМСО. В условиях отсутствия прямого света концентрированный сток красителя SYPRO Orange Protein Gel Stain (5000×) разводили в 100 раз

дистиллированной водой. Готовили реакционную смесь в буфере PBS (pH 6,5), содержащую 10 мкл белкового раствора (содержание белка в реакционной смеси составило 4 мкг) и по 12,5 мкл смеси буфера и раствора исследуемых соединений (конечная концентрация 500 мкМ и 250 мкМ). В контрольные лунки вместо исследуемых соединений добавляли ДМСО. В каждую лунку вносили по 2,5 мкл 50-кратного раствора красителя и тщательно перемешивали, после чего измеряли флуоресценцию (длина волны возбуждения 470 нм, длина волны испускания 570 нм) с помощью системы CFX 96, фиксируя изменения сигнала при последовательном нагреве образцов от 20°С до 95°С, шаг нагрева — 0,5°С/5 с.

Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды, результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Excel 2013 и Anova с критерием хи-квадрат, вычисляли процент снижения денатурированного белка в реакционной смеси, принимая значения сигнала в контрольных лунках за 100%. Табличные данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Исследование протекторных свойств в условиях химического воздействия на модельный белок

Реакционная смесь состояла из раствора яичного альбумина (1 мкг/мкл) и исследуемых соединений (конечная концентрация 500 мкМ и 250 мкМ соответственно). Вместо исследуемых соединений в контроль добавляли буфер. Пробы инкубировали 30 мин при 37°С. В отсутствие прямого света добавляли краситель SYPRO Orange Protein Gel Stain (50×) и лимонную кислоту (конечная концентрация 1 мМ, в буфере PBS, pH 5) и мочевину (конечная концентрация 500 мМ, в буфере PBS, pH 7,5). Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны возбуждения 470 нм и длине волны испускания 570 нм в течение 150 мин, регистрируя сигнал каждые 5 мин. Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды, результаты обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel 2013 и Origin 8 Pro, вычисляли среднее значение флуоресценции для каждой временной точки, а затем строили графики изменения сигнала с течением времени. Значимость различий средних значений определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p \le 0{,}01$) с учётом поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирующая активность исследуемых соединений в отношении ЦОГ в лизатах клеток MCF-7

Известно, что действие едва ли не всех НПВС основано на ингибировании ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, которые являются ключевым звеном в синтезе простагландинов (ПГЕ) [14, 15]. Поскольку соединения **1** и **2** являются пролекарствами, было исследовано их влияние на активность ЦОГ по остаточному содержанию простагландинов в лизатах клеток MCF-7. Для оценки селективности действия исследуемых соединений в отношении различных изоформ ЦОГ в образцы дополнительно добавляли специфический ингибитор ЦОГ-1 (SC560) или ЦОГ-2 (Celecoxib).

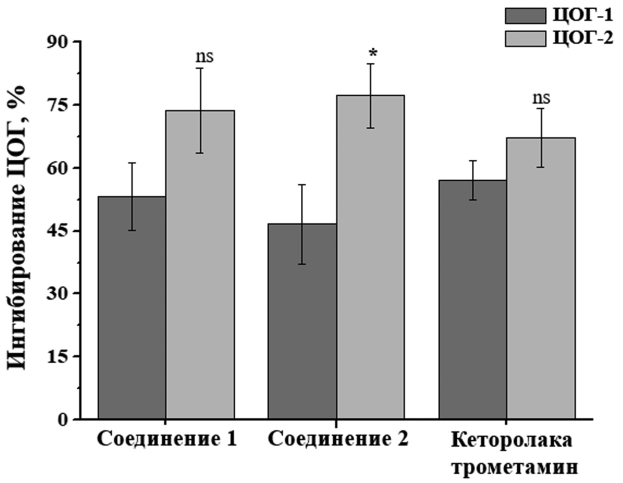

Рисунок 2. Ингибирование ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в лизатах клеток MCF-7 кеторолака трометамином и соединениями **1** и **2** с концентрацией 25 мкМ. Значимые различия обозначены звёздочками * $p < 0{,}05$, ns $p \ge 0{,}05$ – нет значимых различий.

Согласно полученным результатам, 25 мкМ кеторолака трометамин и соединения **1** и **2** в той же концентрации ингибируют ЦОГ-1 на 56%, 50% и 44% и ЦОГ-2 на 71%, 73% и 76% соответственно (рис. 2).

Величины концентраций, вызывающие 50% ингибирования (IC_{50}) ЦОГ-1 для кеторолака и соединений **1** и **2** составляли 21,90±2,30 мкМ, 23,00±3,00 мкМ, 34,70±2,90 мкМ соответственно, а значения IC_{50} для ЦОГ-2 — 13,50±2,10 мкМ, 12,30±1,50 мкМ, 12,02±0,12 мкМ соответственно. Из полученных данных можно сделать вывод, что конъюгаты пиридоксина и кеторолака являются неселективными ингибиторами ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (табл. 3).

Следует отметить, что соединения **1** и **2** не уступают или даже превосходят по ингибирующей активности другие известные коммерческие НПВС, такие как диклофенак (IC_{50} для ЦОГ-1 — 35 мкМ; IC_{50} для ЦОГ-2 — 41 мкМ), индометацин (IC_{50} для ЦОГ-1 — 10 мкМ; IC_{50} для ЦОГ-2 — 660 мкМ) и ибупрофен (IC_{50} для ЦОГ-1 — 2400 мкМ; IC_{50} для ЦОГ-2 — 5700 мкМ) [15, 16].

Исследование проницаемости исследуемых соединений через монослой клеток аденокарциномы кишечника Caco-2

С целью изучения внутриклеточного транспорта исследуемых соединений нами была использована модель Caco-2, которая позволяет оценивать различные механизмы транспорта, включая пассивную диффузию и активный транспорт [17]. Клетки эпителиальной аденокарциномы кишечника Caco-2 морфологически и функционально похожи на барьерный эпителий кишечника и успешно применяются для оценки проницаемости и абсорбции в ЖКТ [18].

Таблица 3. Значения IC_{50} (мкМ) соединений **1** и **2** при ингибировании ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в лизатах клеток MCF-7

Соединение	IC_{50}, ЦОГ-1, мкМ	IC_{50}, ЦОГ-2, мкМ
Кеторолака трометамин	21,90±2,30	13,50±2,10
Соединение **1**	23,00±3,00	12,30±1,50
Соединение **2**	34,70±2,90	12,02±0,12*

Примечание. Различия ингибирующей активности в отношении ЦОГ-1 и ЦОГ-2 для соединения **2** обозначены звёздочкой * $p \le 0{,}01$.

Таблица 4. Значения коэффициента проницаемости ($P_{app}\times10^{-6}$, см/с) и эффлюкса соединений

Соединение	**A→B** $P_{app}\times10^{-6}$, см/с	**B→A** $P_{app}\times10^{-6}$, см/с	**Эффлюкс***
Соединение **1**	0,100	6,080	60,800
Соединение **1** + Верапамил	0,110	0,640	5,800
Соединение **2**	0,100	1,340	13,400
Соединение **2**+ Верапамил	0,110	1,800	16,400
Кеторолака трометамин	1,030	3,280	3,180
Кеторолака трометамин + Верапамил	1,000	4,000	4,000
Ранитидин	0,006	—	—
Пропранолол	30,750	—	—

Примечание: * – эффлюкс выражается в численном значении коэффициента переноса.

Клетки данной линии также содержат транспортеры, включая Р-гликопротеин (Pgp), и могут быть использованы для изучения активного транспорта веществ через клеточный монослой. В данной работе, используя специфичный ингибитор Pgp (верапамил), мы оценили вклад этих транспортеров при транспорте исследуемых соединений через клеточный монослой. Ряд исследований показывает, что данные, полученные в этом тесте, хорошо коррелируют с результатами *in vivo* [19].

Исследование транспорта соединений **1** и **2**, а также кеторолака трометамина проводили на 21-дневной культуре Caco-2 в условиях инкубации исследуемых соединений в концентрации 1 мкМ в течение 1,5 ч, используя в качестве сравнения соединения с низкой и высокой проницаемостью — ранитидин и пропранолол соответственно (табл. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что все исследуемые соединения способны проникать через модельный липидный бислой посредством пассивной диффузии, определяющей их принципиальную биодоступность. Однако для соединения **1** был выявлен дополнительный эффект: коэффициент эффлюкса > 2 ($P_{app}(B\rightarrow A)/P_{app}(A\rightarrow B)$), который снижается при добавлении ингибитора Pgp — верапамила. Это позволяет предположить, что соединение **1**, является субстратом Pgp, вовлечённым в активный транспорт.

*Антиоксидантная и ингибирующая активность соединений **1** и **2** в ABTS-тесте и тесте перекисного окисления липидов*

При возникновении воспаления происходит угнетение естественных антиоксидантных систем, что неизбежно приводит к общему повышению количества молекул, способных вызывать окислительное повреждение клеток [20, 21]. Дополнительное использование антиоксидантов в данном случае позволяет предотвратить окислительное повреждение и защитить клетки и ткани. Поскольку в конъюгатах **1** и **2** присутствует обладающий антиоксидантными свойствами фрагмент пиридоксина [22], то представлялось целесообразным провести исследование антиоксидантной и ингибирующей активности конъюгатов как с помощью ABTS-теста, так и теста ПОЛ на модели фосфатидилхолиновых липосом. Однако, в обоих экспериментах соединения **1** и **2** оказались неактивными и значения IC_{50} превышали 700 мкМ.

*Протекторные свойства соединений **1** и **2** при тепловом воздействии на модельный белок*

Попытки исследования протекторного действия НПВС с целью выявить среди них соединения, способные защищать эндогенные белки от денатурации, известны довольно давно [23, 24]. Тем не менее, для существующих НПВС до сих пор не доказана подобная активность, в том числе по причине ограничений длительного приёма этих препаратов, что связано с наличием побочных эффектов [25].

Протекторное действие для исследуемых соединений **1** и **2** на модели тепловой денатурации яичного альбумина изучали с использованием специфического флуоресцентного красителя SYPRO Orange [26, 27]. В условиях последовательного нагрева альбумина от 37°С до 85°С в присутствии соединений **1** и **2**, а также препарата сравнения кеторолака трометамина проводили фиксацию изменения флуоресценции красителя в режиме реального времени относительно контрольных образцов, содержащих только белок.

Результаты представлены в таблице 5.

Установлено, что соединения **1** и **2** на модели тепловой денатурации проявляют протекторное действие, понижая денатурацию альбумина на 7–11%, в отличие от препарата сравнения, который не оказывал подобного действия.

*Протекторные свойства соединений **1** и **2** при химическом воздействии на модельный белок*

Известно, что денатурацию и постепенное разворачивание белка вызывают различные химические агенты: щелочи, кислоты, детергенты, мочевина и т.д. В качестве денатурирующего химического агента в данном исследовании были использованы лимонная кислота и мочевина. Мочевина расщепляет водородные связи, ослабляет электростатическое и гидрофобное взаимодействия, а кислоты изменяют заряд белковых молекул и ионизируют кислотные группы [28]. Исследование проводили в приближённых к физиологическим условиях (37°C, буфер PBS, pH 5 и pH 7,5), концентрация мочевины в реакционной смеси составляла 500 мМ, лимонной кислоты — 1 мМ.

Установлено, что процесс денатурации белка в контрольных образцах протекает очень быстро и интенсивность флуоресценции уменьшается до минимума уже через 10–15 мин после начала инкубации. В присутствии исследуемых соединений наблюдается отчётливое протекторное действие (рис. 3). При воздействии лимонной кислоты в присутствии соединений **1** и **2** время достижения максимума флуоресценции увеличивается на 40 мин, а в случае с мочевиной — 10–20 мин в сравнении с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о наличии выраженного протекторного действия исследуемых соединений в отношении модельного белка при воздействии химических агентов, что позволяет рассматривать их не только в качестве эффективных средств при острых состояниях боли или воспаления, но также при заболеваниях, связанных с конденсацией белков (ревматические заболевания, катаракта, болезнь Альцгеймера и др.) [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конъюгаты пиридоксина и кеторолака **1** и **2** *in vitro* обладают высокой ингибирующей способностью в отношении ЦОГ-1 и ЦОГ-2, сопоставимой с кеторолака трометамином. На модели проницаемости через эпителиальную стенку кишечника показана способность исследуемых соединений к пассивной диффузии через липидный бислой, а для соединения **1** дополнительно выявлена возможность вовлечения механизмов активного транспорта. Эти данные могут свидетельствовать в пользу высокой абсорбции конъюгатов при внутрижелудочном введении. Дополнительным фактором, влияющим на установленный ранее при исследованиях *in vivo* благоприятный профиль безопасности, является наличие у исследуемых соединений выраженных протекторных свойств. Полученные результаты позволяют рассматривать конъюгаты пиридоксина и кеторолака в качестве перспективных высокоэффективных и безопасных кандидатов в анальгетические лекарственные средства.

Таблица 5. Протекторное действие соединений **1** и **2** на модели тепловой денатурации яичного альбумина. Интенсивность флуоресценции представлена в виде средних значений и стандартного отклонения

Температурный диапазон, °C	**Интенсивность флуоресценции (*I*), отн. ед.**		
	Кеторолака трометамин	Соединение **1**	Соединение **2**
40–50	1,34±0,23	9,30±2,60	6,90±1,30
50–60	0,78±0,11	11,00±3,00	8,80±1,40
60–70	0,45±0,08	8,80±1,30	7,60±1,70

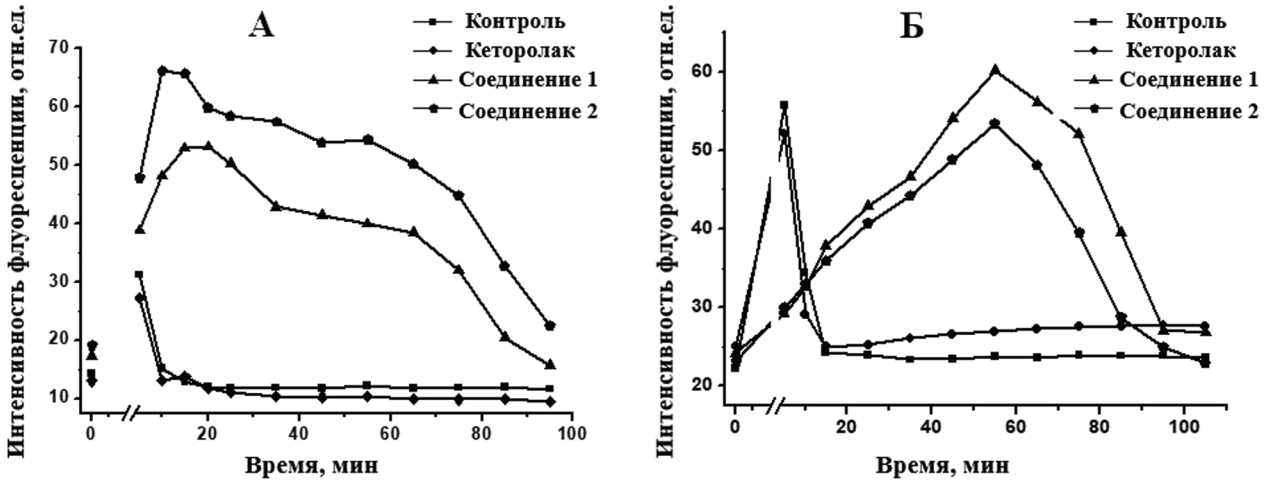

Рисунок 3. Интенсивность флуоресценции красителя SYPRO Orange в присутствии соединений **1** и **2** и кеторолака в условиях химического воздействия на яичный альбумин: **А** – мочевина (500 мМ, 37°C, PBS, pH 7,5), **Б** – лимонная кислота (1 мМ, 37°C, PBS, pH 5).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию “Lumiprobe” за предоставленный краситель SYPRO Orange.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-23-00350. https://rscf.ru/project/24-23-00350/

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Каратеев А.Е.* (2011) Кеторолак в клинической практике. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, **3**(4), 81–89. [*Karateev A.E.* (2011) Ketorolac in clinical practice. Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics, **3**(4), 81–89.] DOI: 10.14412/2074-2711-2011-352
2. *Матвеев А.В., Крашенинников А.Е., Егорова Е.А.* (2018) Современный взгляд на эффективность и безопасность кеторолака. РМЖ. Медицинское обозрение, **2**(4), 34–39. [*Matveev A.V., Krasheninnikov A.E., Egorova E.A.* (2018) Modern view on the efficacy and safety of ketorolac. RMJ. Medical Review, **2**(4), 34–39.]
3. *Cepeda M.S., Carr D.B., Miranda N., Diaz A., Silva C., Morales O.* (2005) Comparison of morphine, ketorolac, and their combination for postoperative pain: results from a large, randomized, double-blind trial. Anesthesiology, **103**(6), 1225–1232. DOI: 10.1097/00000542-200512000-00018
4. *Журавлева М.В., Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Сереброва С.Ю., Городецкая Г.И., Бердникова Н.Г.* (2016) Рациональное применение НПВП — баланс эффективности и безопасности (обзор литературы). Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, **6**(4), 687–696. [*Zhuravleva M.V., Kukes V.G., Prokofiev A.B., Serebrova S.Yu., Gorodetskaya G.I., Berdnikova N.G.* (2016) Rational use of NSAIDs — balance of efficiency and safety (review). International Journal of Applied and Fundamental Research, **6**(4), 687–696.]
5. *Григорович Р.И., Немахова Е.А., Лаврентьев А.А., Попов П.А.* (2010) Нестероидные противовоспалительные средства: анестезиологическая эффективность и основы безопасного применения (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий, **17**(2), 175–179. [*Grigorovich R.I., Nemakhova E.A., Lavrentiev A.A., Popov P.A.* (2010) NAID: anesthesiology effectiveness and basis of safe using (review of literature). Journal of New Medical Technologies, **17**(2), 175–179.]
6. *Каратеев А.Е., Алейникова Т.Л.* (2016) Эйкозаноиды и воспаление. Современная ревматология, **10**(4), 73–86. [*Karateev A.E., Aleynikova T.L.* (2016) Eicosanoids and inflammation. Modern Rheumatology Journal, **10**(4), 73–86.] DOI: 10.14412/1996-7012-2016-4-73-86
7. *Drini M.* (2017) Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Australian Prescriber, **40**(3), 91–93. DOI: 10.18773/austprescr.2017.037
8. *Sohail R., Mathew M., Patel K.K., Reddy S.A., Haider Z., Naria M., Habib A., Abdin Z.U., Razzaq Chaudhry W., Akbar A.* (2023) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gastroprotective NSAIDs on the gastrointestinal tract: a narrative review. Cureus, **15**(4), e37080. DOI: 10.7759/cureus.37080
9. *Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U.* (2020) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. Biochem. Pharmacol., **180**, 114147. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147
10. *Пугачев М.В., Штырлин Н.В., Агафонова М.Н., Васильева О.С., Фафанова Е.М., Штырлин Ю.Г.* (2024) Синтез и анальгетическая активность пролекарственных бифармакофорных производных на основе пиридоксина и кеторолака. Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, **166**(4), 608–622. [*Pugachev M.V., Shtyrlin N.V., Agafonova M.N., Vasileva O.S., Fafanova E.M., Shtyrlin Yu.G.* (2024) Synthesis and analgesic properties of prodrug bipharmacophore compounds based on pyridoxine and ketorolac. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta Seriya Estestvennye Nauki, **166**(4), 608–622.] DOI: 10.26907/2542-064X.2024.4.608-622
11. *Васильева О.С., Агафонова М.Н., Пугачев М.В., Маланьева А.Г., Штырлин Ю.Г.* (2025) Анальгетические и противовоспалительные свойства пролекарственных бифармакофорных производных на основе пиридоксина и кеторолака. Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, **167**(3), 371–384. [*Vasileva O.S., Agafonova M.N., Pugachev M.V., Malanyeva A.G., Shtyrlin Yu.G.* (2025) Analgesic and anti-inflammatory properties of bipharmacophore prodrug derivatives based on pyridoxine and ketorolac. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta Seriya Estestvennye Nauki, **167**(3), 371–384.] DOI: 10.26907/2542-064X.2025.3.371-384
12. *Lea T.* (2015) Caco-2 Cell Line. In: The Impact of Food Bioactives on Health: *In Vitro* and *Ex Vivo* Models (Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H., eds.), Cham (CH): Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4_10
13. *Chen G., Liu W., Yan B.* (2022) Breast cancer MCF-7 cell spheroid culture for drug discovery and development. J. Cancer Ther., **13**(3), 117–130. DOI: 10.4236/jct.2022.133009
14. *Тельгузиева Ж.А.* (2009) Применение ингибиторов ЦОГ-2 в онкологической практике. Медицина и экология, **2**(51), 18–22. [*Telguziyeva Zh.A.* (2009) Application of inhibitors of cyclooxygenase-2 in oncologic practice. Medicine and Ecology, **2**(51), 18–22.]
15. *Курсов С.В., Никонов В.В.* (2016) Циклооксигеназа: физиологические эффекты, действие ингибиторов и перспективы дальнейшего использования парацетамола (аналитический обзор). Медицина неотложных состояний, **5**(76), 27–35. [*Kursov S.V., Nikonov V.V.* (2016) Cyclooxygenase: physiological effects, inhibitors action and perspectives of paracetamol usage (analytical review). Emergency Medicine, **5**(76), 27–35.] DOI: 10.22141/2224-0586.5.76.2016.76430
16. *Шостак Н.А., Клименко А.А., Демидова Н.А., Аничков Д.А.* (2020) Безопасность селективных нестероидных противовоспалительных препаратов: анализ данных последних лет. Клиницист, **14**(1–2), 91–99. [*Shostak N.A., Klimenko A.A., Demidova N.A., Anichkov D.A.* (2020) Safety

of selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: analysis of the last years data. The Clinician, **14**(1–2), 91–99.] DOI: 10.17650/1818-8338-2020-14-1-2-91-99
17. *Bermejo M., Avdeef A., Ruiz A., Nalda R., Ruell J.A., Tsinman O., González I., Fernández C., Sánchez G., Garrigues T.M., Merino V.* (2004) PAMPA — a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. Eur. J. Pharm. Sci., **21**(4), 429–441. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.10.009
18. *Sambuy Y., de Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stammati A., Zucco F.* (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol. Toxicol., **21**(1), 1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6
19. *Artursson P., Karlsson J.* (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., **175**(3), 880–885. DOI: 10.1016/0006-291x(91)91647-u
20. *Soeters P.B., Wolfe R.R., Shenkin A.* (2019) Hypoalbuminemia: pathogenesis and clinical significance. J. Parenter. Enteral Nutr., **43**(2), 181–193. DOI: 10.1002/jpen.1451
21. *Bourdon E., Blache D.* (2001) The importance of proteins in defense against oxidation. Antioxid. Redox Signal., **3**(2), 293–311. DOI: 10.1089/152308601300185241
22. *Mooney S., Leuendorf J.-E., Hendrickson C., Hellmann H.* (2009) Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. Molecules, **14**(1), 329–351. DOI: 10.3390/molecules14010329
23. *Saso L., Valentini G., Casini M.L., Grippa E., Gatto M.T., Leone M.G., Silvestrini B.* (2001) Inhibition of heat-induced denaturation of albumin by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): pharmacological implications. Arch. Pharm. Res., **24**(2), 150–158. DOI: 10.1007/BF02976483
24. *Ziesenitz V.C., Welzel T., van Dyk M., Saur P., Gorenflo M., van den Anker J.N.* (2022) Efficacy and safety of NSAIDs in infants: a comprehensive review of the literature of the past 20 years. Pediatric Drugs, **24**(6), 603–655. DOI: 10.1007/s40272-022-00514-1
25. *Vlad S.C., Miller D.R., Kowall N.W., Felson D.T.* (2008) Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. Neurology, **70**(19), 1672–1677. DOI: 10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63
26. *Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Шумаев К.Б., Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Топунов А.Ф.* (2021) Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации. Прикладная биохимия и микробиология, **57**(4), 315–325. DOI: 10.31857/S0555109921040097 [*Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Chumikina L.V., Arabova L.I., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Topunov A.F.* (2021) Dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands intercept peroxynitrite and protect hemoglobin from oxidative modification. Appl. Biochem. Microbiol., **57**(4), 411–420. DOI: 10.1134/S0003683821040098]
27. *Mahran R., Vello N., Komulainen A., Malakoutikhah M., Härmä H., Kopra K.* (2023) Isothermal chemical denaturation assay for monitoring protein stability and inhibitor interactions. Sci. Rep., **13**, 20066. DOI: 10.1038/s41598-023-46720-w
28. *Bennion B.J., Daggett V.* (2003) The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(9), 5142–5147. DOI: 10.1073/pnas.0930122100

Поступила в редакцию: 30.09.2025.
После доработки: 03.12.2025.
Принята к печати: 05.12.2025.

IN VITRO BIOLOGICAL PROPERTIES OF PYRIDOXINE AND KETOROLAC CONJUGATES

M.N. Agafonova*, O.S. Vasileva, E.M. Fafanova, D.J. Grishaev, M.N. Sarynin, M.V. Pugachev, Yu.G. Shtyrlin

Kazan (Volga Region) Federal University,
18 Kremlevskaya str., Kazan, 420008 Russia; *e-mail: Mariya.Agafonova@kpfu.ru

Prodrugs based on pyridoxine and ketorolac (the most potent analgesic NSAIDs) exhibit analgesic activity comparable to ketorolac *in vivo* and significantly higher safety and prolonged action. In this study the antioxidant and protective properties, inhibitory activity against cyclooxygenase (COX) and intracellular permeability for two prodrug bipharmacophoric conjugates based on pyridoxine and ketorolac have been investigated *in vitro*. Their inhibitory activity towards the COX-1 and COX-2 enzymes was comparable to that of ketorolac (the IC_{50} values ranged from 12.0 μM to 34.7 μM). These compounds markedly protected albumin against thermal and chemical (urea and citric acid) treatments and demonstrated the cell-penetrating ability through passive diffusion.

The whole English version is available at http://pbmc.ibmc.msk.ru.

Keywords: pyridoxine; ketorolac; conjugate; protective action; cyclooxygenase; permeability

Funding. The study was funded by the Russian Science Foundation grant no. 24-23-00350. https://rscf.ru/project/24-23-00350/

Received: 30.09.2025; revised: 03.12.2025; accepted: 05.12.2025.