Транс-пицеиды, их транспортировка, дегликозилирование и метаболизм в эпителиальных клетках тонкого кишечника

Caroline Henry-Vitrac
Alexis Desmoulie`re
Delphine Girard
Jean-Michel Me´rillon
Ste´phanie Krisa

Аннотация и история вопроса: Многочисленные эпидемиологические исследования, а также исследования на животных показали, что потребление красного вина связано со снижением заболеваемости сердечнососудистыми заболеваниями и раком. Сообщалось, что транс-ресвератрол (3, 5, 4'-тригидрокси-стильбен), фенольное соединение, имеющееся в вине, потенциально обладает противораковой хемопревентивной активностью. Более того, благодаря своим антиоксидантным свойствам он может оказывать защитное действие против развития атеросклероза. Транс-пицеид (3-ß глюкозид транс-ресвератрола) присутствует в красном вине в большей степени, чем его агликон, но в тонком кишечнике и печени может происходить гидролиз этого гликозилированного производного, что будет приводить к увеличению количества биологически активного транс-транс-ресвератрола.
Цели: Данное исследование направлено на изучение степени интенсивности транс-эпителиальной транспортировки транс-пицеида на клеточных монослоях Caco-2 человеческого кишечника, а также роли этого соединения в метаболизме во время его прохождении через тонкий кишечник и абсорбции.
Методы: Оценивалась **т**ранспортировка транс-пицеидов в человеческих эпителиальных клетках клеточной линии Caco-2, которая в экспериментах *in vitro* обладает свойствами энтероцитов. Для транс-эпителиальных экспериментов, были получены конфлюэнтные (сливающиеся) монослои клеток Caco-2 – они были выращены на вкладышах (в планшеты) Трансвелла®. Для исследования метаболизма мы использовали как клетки Caco-2, высеянные на 6-луночных планшетах, так и бесклеточные экстракты тонкого кишечника крыс.
Результаты: Изучение периода времени транспортировки транс-пицеидов из апикальной (AP) части кишечника к базилатеральной (BL) показало, что на протяжении 6 часов эксперимента коэффициент благоприятной эффективной проницаемости (Papp) быстро падал. Это наблюдение может коррелировать с появлением метаболитов. После инкубации клеток Caco-2 с транс--пицеидами, транс--транс-ресвератрол был обнаружен как на стороне клеток AP, так и на стороне BL. В результате использования экстрактов протеинов, полученных из крыс, мы пришли к выводу, что в гидролиз транс-пицеидов вовлечены лактаза-флоризин-гидролаза (LPH) и цитозольная-ß-глюкозидаза (CBG). Более того, мы показываем, что после дегликозилирования получающийся агликон метаболизируется в транс-транс-ресвератрол-3-O-ß-глюкуронид и в меньшей степени в транс-транс-ресвератрол-4'-O-ß-глюкуронид. Мы также показываем, что в этот метаболизм активно вовлечено вещество UGT1A1.
Выводы: Это исследование демонстрирует, что транс-эпителиальная транспортировка транс-пицеидов происходит в высоком темпе и что это соединение дегликозилируется в транс-транс-ресвератрол. Есть два возможных пути, по которым транс-пицеид гидролизируется в кишечнике. Первый путь – это распад под действием CBG, после прохождения вещества SGLT1 (натрий-зависимого переносчика глюкозы) через мембрану щеточной каемки (из микроворсинок) клеток эпителиальной ткани. Второй путь - дегликозилирование внутренней стороны эпителия мембрано-связанным энзимом LPH, после чего следует пассивная диффузия выделившегося агликона, который далее метаболизируется внутри клеток, превращаясь в два глюкороновых

конъюгата.

Ключевые слова: транс-пицеид – транс-транс-ресвератрол – Caco-2 – транс-эпителиальная транспортировка – метаболиты

Введение

Транс-гидроксистильбены – встречающиеся в живой природе полифенольные соединения, которые, судя по сообщениям, в отношении человеческих заболеваний имеют потенциал проявлять превентивную активность. Среди этих стильбенов, транс-транс-ресвератрол, который, главным образом, находят в винограде и в красном вине, является одним из наиболее важных соединений с точки зрения его биологической активности, поскольку он, как сообщается, оказывает анти-канцерогенное, анти-оксидантное и кардиопротекторное действие [1]. Хотя есть весомые свидетельства того, что транс-транс-ресвератрол обладает сильной биологической активностью, в вине его мало по сравнению с одним из его глюкозидов - транс-пицеидом [2]. Тем не менее, в крупных зонах био-трансформации (в печени и кишечнике) может происходить гидролиз этого гликозилированного производного ß-глюкозидазой, и этот процесс, таким образом, позволяет получать более значительные количества транс-транс-ресвератрола из пищевых продуктов. Хотя биологическая активность этих соединений *in vitro* в целом понятна, об их абсорбции и биодоступности в человеческом организме известно мало. В самом деле, их потенциальная биологическая активность *in vivo* зависит от их абсорбции в тонком кишечнике и последующем поступлении к тканям, которые в них нуждаются (тканям-мишеням). В ряде исследований было показано, что прежде, чем имеющиеся в пищевых продуктах полифенолы достигнут системы кровообращения, они подвергаются метаболической конверсии не только в печени, но также и во время их абсорбции эпителиальными клетками кишечника. [3].

В последние годы мы исследовали распределение транс-транс-ресвератрола по органам и тканям мыши после приема в рот этого соединения, которому присвоен код 14C. Неповрежденный транс-ресвератрол вместе с метаболитами (глюкуронидами и/или сульфатными производными) был обнаружен в печени мышей через 3 часа после приема в рот [4]. Этот результат поддерживает наши предыдущие исследования, в которых было показано, что транс-транс-ресвератрол может быть глюкуронидирован в микросомах как мышиной, так и человеческой печени [5]. Более того, Kuhnle et al. [6] сообщили об аналогичном метаболизме после введения транс-транс-ресвератрола в тонкий кишечник крыс.

В данном исследовании ставится цель исследовать степень интенсивности транс-эпителиальной абсорбции транс-пицеида, для чего используются клеточные монослои Caco-2 человеческого кишечника; причем эта модель была уже в полной мере использована для исследования транс-эпителиальной транспортировки полифенолов [7, 8]. В нашем предыдущем исследовании мы оценивали поступление транс-пицеида с апикальной (AP) стороны клеток (использовались клетки Caco-2 [9]), а в данной работе мы исследуем метаболические процессы при усвоении транс-пицеидов во время их прохождения по тонкому кишечнику и абсорбции.

Материалы и методы

Материалы

Транс-транс-ресвератрол, хризин (5,7-дигидроксифлавон), [14C]- маннитол, ß-глюкуронидаза (телячья печень, 1.106 ед./г), D-глюконолактон, тринитротолуол X100, ß-меркаптоэтанол, EDTA и смесь ингибиторов протеаз были куплены у компании Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Транс-пицеид был экстрагирован и очищен от культур, имеющихся в суспензии клеток Vitis vinifera (винограда культурного), как описано в

предыдущем исследовании [10]. Все растворители были качества уровня HPLC (Scharlaud, Barcelona, Spain). Глюкурониды транс-транс-ресвератрола были получены из микросом человеческой печени, как сообщалось в [5].

Клеточная культура Caco-2

Клетки Caco-2 человеческой аденокарциномы толстой кишки были куплены у руководства Американской коллекции типовых культур (ATCC, Molsheim, France) и культивированы в высоко-модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10%-ной сыворотки крови эмбриона теленка (FBS), 1% L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 100 μг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Клетки Caco-2 были выращены до достижения конфлуентности (слияния) при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием CO_2 в воздухе 5%. Из них были получены субкультуры с использованием 0.02%-ного EDTA и 0.05%-ного трипсина.

Эксперименты по транспортировке

Для экспериментов с транспортировкой через мембрану, клетки Caco-2 (в пассажах 40–90) были высеяны на поликарбонатные с мембранным фильтром вкладыши Трансвелла (размер пор 0.4 μм, площадь разрастания 1.13 см^2, Corning Costar Corp.) в 12-луночных планшетах с плотностью от 9 до 104 клеток на см^2. Культуральная среда каждые 2 дня заменялась свежей средой, и обновление среды было также выполнено за 1 день до исследований по транспортировке. Эксперименты проводились спустя 18–24 дней после слияния с предварительным измерением транс-эпителиального электрического сопротивления (TEER), для чего использовался вольтомметр Millicell-ERS (Millipore Corp). Для экспериментов с транспортировкой были отобраны только вкладыши со значениями TEER >300 Ω см^2 в культуральной среде. Также измерялась целостность монослоев – путем добавления 50-μM [14C]-маннитола на стороне клеток AP в качестве маркера низкой параклеточной проницаемости. Эти клеточные монослои считались плотными, когда параметр Papp для маннитола составлял менее 0.5x10^{-6} см/сек. До начала экспериментов культуральная среда удалялась как с AP-стороны, так и с базилатеральной стороны клеток (BL). Клеточные монослои Caco-2 были инкубированы дважды с предварительным нагретым транспортным буфером, состоящим из (мМ) NaCl (140), KCl (5.33), $CaCl_2$ (1.26), MgSO4 (0.84), KH_2PO_4 (0.44), и маннитола (5.48); под действием буфера при pH=7.4 и температуре 37°C клетки находились в течение 30 минут. Затем до-инкубационный буфер удалялся, и клетки инкубировались со стильбенами, растворенными в транспортном буфере DMSO (диметилсульфоксид) (99.5/0.5, в объёмном отношении). Растворы, содержащие транс-пицеид, добавлялись или на сторону AP для измерения перехода из AP в BL (0.5 мл на AP-сторону) или на BL-сторону для измерения перехода из BL в AP (1.5 мл в зону BL). В другую зону добавлялся только транспортный буфер. В конце периода инкубации, среды (AP и BL) забирались для анализа HPLC.

Исследование дегликозилирования

Для исследования дегликозилирования использовались две модели.

В первой модели использовались клетки Caco-2, выросшие на 6-луночных планшетах спустя 12–14 дней после слияния (конфлуентности). Они инкубировались при температуре 37°C с 100 μM транс—пицеида, растворенного в полной среде DMSO (99.5/0.5, в объёмном отношении). Были использованы различные периоды времени инкубации: 0.5, 1, 3, 6, 9 и 24 часа. В каждый из этих моментов времени среда вместе с клетками (среда + клетки) забиралась путем соскабливания клеток пластиковым шпателем. Эти образцы разрушались ультразвуком в течение 15 секунд и центрифугировались в течение 10 минут при ускорении 20,000 g для получения супернатанта (надосадочной жидкости), которая и использовалась для анализа HPLC.

Во второй модели, самцы крыс Уистера (Charles Rivers, St Aubin les Elbeuf, France) весом

приблизительно 300 г подвергались анестезии путем интраперитонеальной инъекции кетамина (100 мг/кг) (Imalgen, Rhoˆne Me´rieux, Lyon, France) и ксилазина (10 мг/кг) (Rompun, Bayer Pharma, Puteaux, France). Через абдоминальный разрез извлекался тонкий кишечник. Все эксперименты выполнялись с применением общепринятых этических стандартов. Тонкий кишечник промывался ледяным раствором NaCl (0.9%), и с него соскабливалась мукоза. Отделенные клетки гомогенизировали в 3 мл 50-mM фосфатного буфера, pH 7, содержавшего EDTA (1 мМ), $CaCl_2$ (1 мМ), $MgCl_2$ (10 мМ), ß-меркаптоэтанол (10 мМ), и смесь ингибиторов протеаз (15 µл). Для разделения растворимой (CBG) и мембраносвязанной лактаза-флоризин-гидролаза (LPH) ß-глюкозидазы, мы использовали метод, описанный Nemeth et al. [11]. Этот гомогенат центрифугировался при ускорении 48,000 g в течение 60 минут при температуре $4^{O}C$. Так был получен супернатант S, содержащий энзим CBG. Из сгустка вновь получили суспензию в буфере, содержащем 4% (w/v) тринитротолуола X100, и суспензию инкубировали в течение 60 минут при температуре $4^{O}C$ с применением помешивания в целях растворения мембраносвязанных протеинов. После придания сгустку растворимости его центрифугировали (48,000 g, 60 минут, $4^{O}C$) и получали супернатант ST, содержащий энзим LPH. Реакционная смесь (конечный объем 500 µл в 50-мМ фосфатного буфера, pH 6.5), содержащая транс-пицеид (50 µМ), инкубировалась с 300-µг протеина в течение 60 минут при температуре $37^{O}C$. Реакция останавливалась добавлением 0.5 мл метанола, содержащего аскорбиновую кислоту (1 мМ), затем следовало центрифугирование на ускорении 13,600 g в течение 5 минут при температуре $4^{O}C$. Супернатант брался на анализ HPLC.

Эксперименты с метаболизмом

После высевания клеток Caco-2 в 6-луночные планшеты на 4–6 дней (когда происходило слияние клеток), мы начинали предварительную обработку хризином (50-µМ) в полной культуральной клеточной среде (хризин, растворенный в этаноле /DMSO (80/20, в объёмном отношении) в конечной концентрации, не превышавшей 0.5%). Полная культуральная среда с 50 µМ хризина заменялась в каждой лунке каждые 24 часа, и после последней смены среды через 24 часа клетки использовались для анализа метаболизма. Контрольные клетки обрабатывали тем же самым количеством одной только полной культуральной среды. Затем клеточный слой промывался культуральной средой (чтобы удалить хризин, используемый в предварительной обработке клеток). Последующая обработка состояла в инкубации клеток в течение 24 часов вместе с 3 мл транс-пицеида или транс-транс-ресвератрола (50 µМ, в виде раствора в культуральной среде, максимум 1% DMSO) – эта обработка применялась как для клеток. обработанных хризином, так и для контрольных клеток. В предварительно обработанные клетки Caco-2 добавлялась D-сахарная кислота лактон (5 мМ), ингибитор ß-глюкуронидазы,. Спустя 24 часа после обработки среда + клетки восстанавливались и их обрабатывали, как описано в разделе ‘‘Исследование дегликозилирования’’.

Анализ HPLC

До проведения анализа HPLC образцы фильтровались через миллипористые фильтры (0.45 µm). Анализ HPLC проводился на системе, оснащенной колонкой с обращённой фазой (250 x 4-мм протонцил C18 (5 µм)) (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany), защищенной защитной колонкой из того же материала. Разделение выполнялось на скорости потока 1 мл/мин с мобильной фазой, состоящей из (A) H_2O:TFA (97.5:2.5, в объёмном отношении) и (B) ACN:A (80:20, в объёмном отношении). Эксперимент был поставлен следующим образом: 0–10 мин, 15% B; 10–13 мин, от 15% B до 18% B; 13–15 мин, 18% B; 15–17 мин, от 18% до 22% B; 17–30 мин, от 22% B до 25% B; 30–34 мин, от 25% B до 32% B; 34–36 мин, 32% B; 36–39 мин, от 32% B до 40% B; 39–40 мин, 40% B; 40–47 мин, от 40% B до 70% B; 47–50 мин, от 70% B до 100% B.
Проводился мониторинг хроматографических пиков с помощью флуоресцентного

детектора (ProStar 363, Varian, USA), установленного на оптимальные длины волн для обнаружения как транс-транс-ресвератрола, так и транс-пицеида (λ_{exc} 300 нм; λ_{em} 390 нм) [2]. Количественная оценка соединений производилась на основе калибровочных кривых, которые были подготовлены в соответствии со стандартами.

Статистический анализ

Данные выражались как средние значения ± стандартное отклонение от трех до шести знаков. Статистический анализ выполнялся путем применения t-теста Стьюдента, и вероятность $P < 0.05$ считалась значимой.

Результаты

Транс-эпителиальная транспортировка транс-пицеида

Транс-эпителиальная транспортировка транс-пицеида (100 μM) в планшетах Трансвелла измерялась спустя 1 час при температуре 37°C в направлении от AP к BL и от BL к AP. (Таблица 1).

Таблица 1 Интенсивность в различные моменты времени транспортировки транс-пицеидов в клетках Caco-2, росших на вкладышах (в планшеты) Трансвелла

Время (мин)	Транспортировка A-B	Транспортировка B-A
30	15.7 ± 0.4	19.5 ± 0.9*
60	10.5 ± 0.1[a]	15.3 ± 0.6*,[a]
180	7.7 ± 0.6[a,b]	9.8 ± 0.4[a,b]
360	5.6 ± 0.2[a,b,c]	6.5 ± 0.1[a,b,c]

* Показано, что значения параметра Papp при транспортировке (B–A) существенно отличаются от значения Papp при транспортировке (A–B)

a, b, c указывают значения параметра Papp, существенно отличающиеся от значения Papp соответственно в моменты времени 30, 60 и 180 мин.

Параметр Papp выражается в см/сек (x10^{-6}); значения представляют средние значения ± SEM, n = 3

В течение этого времени транс-клеточная абсорбция явно происходила в обоих направлениях. Коэффициенты эффективной проницаемости (Papp), выражаемые в см/сек, вычислялись в соответствии со следующим уравнением: Papp = (dC/dt) x (V/ACo), где dC/dt – изменение концентрации в принимающей зоне в течение времени (μM/сек), V – объем раствора в принимающей зоне (см^3), Co – первоначальная концентрация в донорской зоне (μM), и A – площадь роста монослоя (1.13 см^2). Транспортировка транс-пицеида в направлении от AP к BL (10.5 x 10^{-6} ± 0.1 см/сек) была существенно менее интенсивной, чем в противоположном направлении (от BL к AP) (15.3 x 10^{-6} ± 0.6 см/сек). Значение параметра Papp, приблизительно равное 10 x 10^{-6} см/сек, через 1 час предсказывает высокую абсорбцию *in vivo* [12]. Мы также определяли транспортировку транс—пицеида в направлении от AP к BL и от BL к AP через 6 часов. (Таблица 1). Когда транс-пицеид добавляли на AP или на BL сторону клеток, это соединение можно было обнаружить на противоположной стороне уже через 30 минут и в течение всех 6 часов инкубации. Более того, мы показываем, что в течение этого времени, происходило снижение интенсивности транспортировки, значение параметра Papp быстро убывало. Это может быть связано с интенсивным оттоком из клеток, как это уже было показано в наших предыдущих работах [9] и/или с метаболизмом в отношении транс-пицеида, как сообщают Walle et al. [13] для случая применения флавоноид хризина. В самом деле, агликон транс-пицеида (транс-транс-ресвератрол) появляется в обнаруживаемом, но не обильном количестве как на стороне клеток AP, так и BL, по истечении 6 часов инкубации. Для дальнейших исследований, в целях облегчения обнаружения и идентификации новых соединений, путем высевания клеток Caco-2 в 6-луночные планшеты были получены более значительные количества соединений.

Исследование дегликозилирования

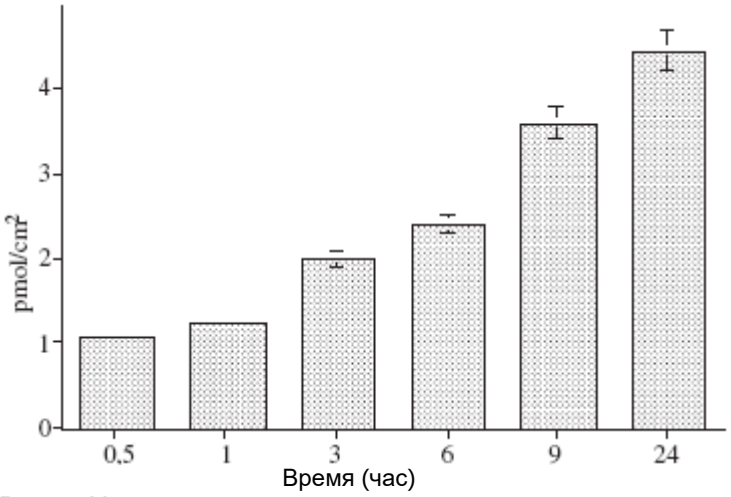


Рис. 1. Хронология при дегликозилировании транс-пицеида в транс–ресвератрол, исследованный на клетках Caco-2, выращенных в 6-луночных планшетах. Количество транс –ресвератрола определялось в единицах пикомоль/см^2 в следующие моменты времени через 0.5, 1, 3, 6, 9 и 24 часа после начала инкубации. Транс-пицеид был растворен в транспортном буфере /DMSO (99.5/0.5, в объемном отношении), и этот процент DMSO не затрагивал транспортировку стильбена (данные не показаны). Значения выражаются как средние значения ± стандартные отклонения (n ‡ 3)

С помощью анализа HPLC изучалась хронология в течение гидролиза транс-пицеида (Рис. 1). Спустя 30 минут при температуре 37°C транс-транс-ресвератрол уже обнаруживался в среде + клетках. Кроме того, наибольшее количество транс-ресвератрола появлялось через 24 часа после начала инкубации (4.5 ± 0.1 пикомоль/см^2). Хотя уже сообщалось, что клетки Caco-2 показывают экспрессию мембрано-связанного энзима LPH и цитозольного энзима CBG, экспрессия этих двух протеинов в этой модели слаба [11, 14]. Поэтому, чтобы исследовать механизмы гидролиза транс-пицеида, для анализа активности глюкозидазы мы использовали энтероциты из тонкого кишечника крысы.
Тонкий кишечник крысы был извлечен и переведен в растворимую фракцию (супернатант S, содержащий энзим CBG) и в не растворимую фракцию, растворимость которой придает обработка тринитротолуолом X100 (супернатант ST, содержащий энзим LPH). После инкубации транс-пицеида в течение 1 часа при температуре 37°C с двумя этими фракциями, транс-транс-ресвератрол был обнаружен в образцах обоего типа. Уровень активности ß-глюкозидазы во фракции ST (311.6 ± 10.2 пмоль/мг протеина в минуту) был приблизительно в 5 раз выше, чем во фракции S (63.0 ± 9.6 пмоль/мг протеина в минуту). Более того, инкубация с D-глюконолактоном (2 мМ), ингибитором как цитозольной, так и мембрано-связанной глюкозидазы, снижала гидролиз транс-пицеида на 93% во фракции ST и на 69% во фракции S. Это указывает на то, что гидролиз транс-пицеида выполняется обоими энзимами – и CBG и LPH.

Эксперименты с метаболизмом

Метаболизм клеток Caco-2 в отношении транс-пицеида был подвергнут анализу HPLC. Рис. 2A показывает вид транс-транс-ресвератрола в среде, содержащей клетки (среда + клетки), когда транс-пицеид добавлялся к культуральной среде на 24 часа. Два других соединения под названием G1 и G2 также были обнаружены спустя время в количествах, близких к количеству транс-пицеида.
Такие же эксперименты были проведены с транс-транс-ресвератролом, и они показали,

что вещества G1 и G2 также были обнаружены и здесь (Рис. 2B).

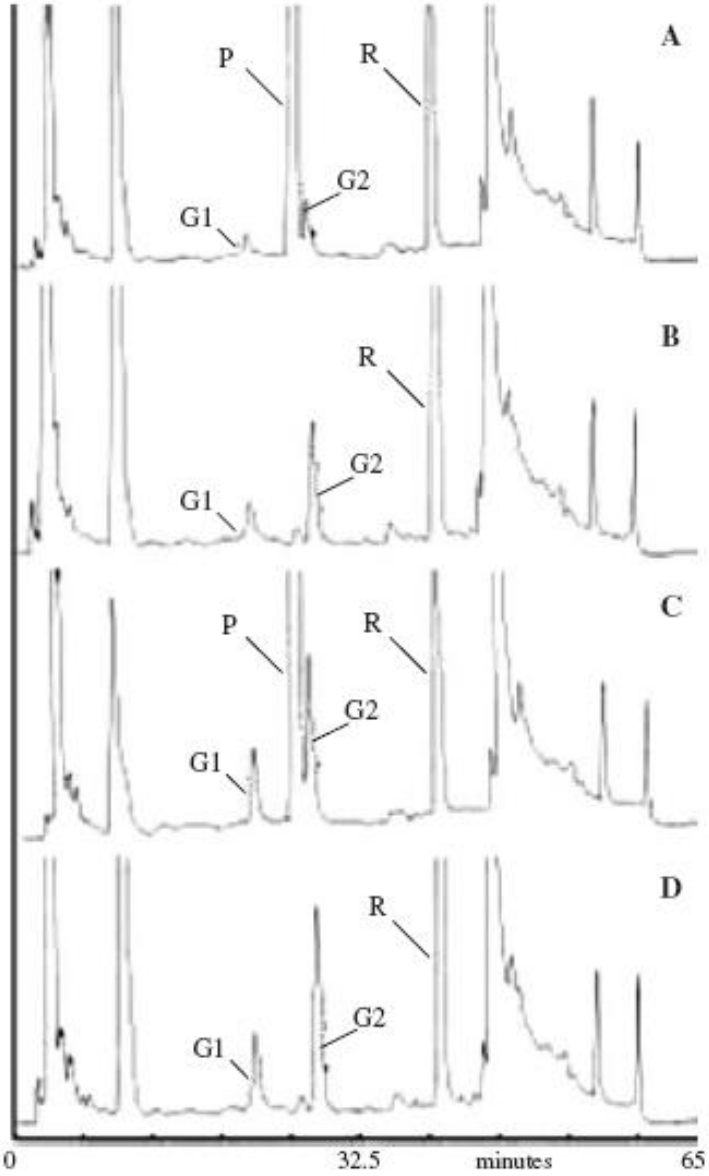


Рис. 2 Анализ HPLC транс-пицеида (P), транс-транс-ресвератрола (R) и метаболитов G1 и G2 в массе <среда + клетки>.
(A) и (B) представляют 24-часовую инкубацию клеток с (A) транс--пицеидом (100 μM) и (B) транс-транс-ресвератролом (100 μM), без предварительной обработки хризином. (C) и (D) представляют метаболизм клеток Caco-2 после предварительной обработки хризином (50 μM) за 3 дня до инкубации, после чего последовала обработка на 24 часа или (C) транс-пицеидом (100 μM) или (D) транс-транс-ресвератролом (100 μM).
Источник: 380 European Journal of Nutrition (2006) Vol. 45, Number 7 Steinkopff Verlag 2006

Поскольку представляется, что метаболизм фазы II, в частности, такой как глюкуронидация, является основным метаболическим путем в усваивании печенью транс-транс-ресвератрола [5], мы предвидим, что UDP(уридиндифосфат)-глюконороносил-транс-феразы (UGT) будут активно участвовать в метаболизме при усвоении стильбенов в кишечнике в модели Caco-2. В ряде исследований уже было показано, что предварительная обработка клеток Caco-2 хризином может вызвать появление соединений из семейства UGT1A1 [15]. Предварительная обработка клеток Caco-2 хризином (50 μM), а через три дня также транс-пицеидом или транс-транс-ресвератролом (100 μM) за 24 часа до анализа привела к значительному возрастанию соединений G1 и G2 (Рис. 2C, D). Более того, инкубация с ß-глюкуронидазой привела к исчезновению пиков G1 и G2, а одновременная инъекция стандартных глюкуронидов

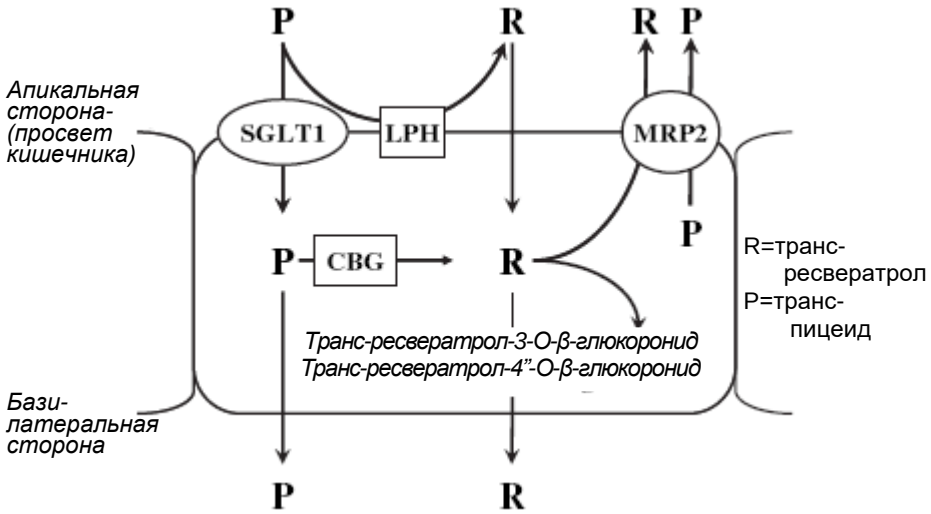
транс-транс-ресвератрола приводит к заключению, что G1 является транс-транс-ресвератрол-4”-O-ß-глюкуронидом, а обильно появляющийся метаболит G2 является транс-ресвератрол-3-O-ß-глюкуронидом (данные не показаны).

Обсуждение

Важно знать био-доступность стильбенов, чтобы понять их потенциальное действие на живой организм (*in vivo*). В данном исследовании мы использовали клетки Caco-2, признанную модель абсорбции в человеческом кишечнике [7]. Транс-эпителиальная транспортировка транс-пицеида явно происходит при значении параметра Papp (около 10 x 10^{-6} см/сек), благоприятном для потока, направленного от AP к BL, что указывает на условно полную абсорбцию транс-пицеида у людей [12]. Более того, сейчас имеется весомое свидетельство, поддерживающее гипотезу о том, что дегликозилирование, происходящее в тонком кишечнике, является первым этапом абсорбции и метаболического преобразования имеющихся пищевых продуктах полифенол-глюкозидов [11, 14, 16]. В данном исследовании мы показываем, что транс-пицеид дегликозилируется в тонком кишечнике как энзимом LPH, так и энзимом CBG. Похоже, для транс-пицеидов потенциально доступны два пути прохода через энтероциты. Первый путь – это вовлечение энзима LPH, которое присутствует на мембране на стороне AP. Это вещество может выделять агликон транс-транс-ресвератрола в просвет кишечника, где последний может затем пассивно диффундировать через AP-сторону клеток Caco-2. Второй путь – это расщепление этого глюкозида энзимом CBG после прохода мембраны щеточной каемки с помощью натрий-зависимого переносчика глюкозы 1 (SGLT1). О таком пути сообщают несколько авторов для ряда полифенол-глюкозидов [9, 17]. В заключение следует сказать, что дегликозилирование представляется наиболее вероятным этапом, происходящим во время транспортировки и метаболизма при усвоении транс-пицеида в данной модели исследования на клетках кишечника. После абсорбции, выделенные соединения агликона могут метаболизироваться энзимами фазы I или фазы II.
Печень играет важную роль в метаболизме при усвоении ксенобиотиков. Тем не менее, не следует недооценивать и вклад тонкого кишечника. Для нескольких полифенолов наиболее вероятный метаболический путь – это их сопряженное действие вместе с глюкуронидом или сульфатом [18]. В этом исследовании мы показываем, что после дегликозилирования транс-пицеида получающийся транс-транс-ресвератрол далее метаболизируется в энтероцитах, и новые соединения являются сложными глюкуроновыми соединениями (конъюгатами), причем из глюкуронидов более обильно представлен транс-транс-ресвератрол-3-O-ß-глюкуронид и в меньшей степени транс-транс-ресвератрол-4”-O-ß-глюкуронид. Последнее уже ранее было показано в работе Aumont et al. [5], где исследование проводилось на микросомах человеческой печени. Уже давно известно, что появление соединений UGT в клетках Caco-2 вызывают различные химические вещества [15, 19]. Walle and Walle [20] наблюдали в 4 раза более интенсивную глюкоронидацию после предварительной обработки клеток хризином за 3 дня до анализа, в то время как на конъюгацию сульфата эта обработка не влияла.
Наши результаты поддерживают эти наблюдения, поскольку количество образовавшихся глюкуронидов транс-транс-ресвератрола было существенно выше в клетках, обработанных хризином, чем в необработанных клетках. Эти результаты подтверждают, что транс-транс-ресвератрол глюкоронидируется в основном соединением UGT1A1, но не только в печени, как сообщалось ранее [5], но также и в энтероцитах. Более того, никаких сложных сульфатных соединений (конъюгатов) в этих исследований не наблюдалось – при применении нашего метода анализа HPLC, - и в этом пункте мы расходимся с другими авторами [21, 22].
Вообще сложные глюкороновые соединения выделяются из энтероцитов и

возвращаются назад в просвет кишечника. Маловероятно, чтобы эти метаболиты пассивно диффундировали через АР-мембрану вследствие отрицательного заряда в условиях физиологического pH [23]. Тем не менее, в основном эти соединения выделяются АТР-связанными кассетными переносчиками множественной лекарственной устойчивости, а именно семейством протеинов MRP, и в особенности протеином MRP2, локализованным исключительно в АР-мембране клеток [8, 19, 24]. Более того, в данном исследовании, чтобы локализовать метаболиты, с АР стороны культуральная среда и клетки были обработаны отдельно. Среду извлекли с планшетов, и клетки подвергли лизису путем применения метанола. Никаких глюкуронидов на АР-стороне клеток (в среде) не наблюдалось; глюкорониды находились только внутри клеток (в метанольном экстракте). В предыдущей работе было продемонстрировано, что в отток как транс-пицеида, так и транс-транс-ресвератрола из клеток Caco-2 вовлечен выкачивающий насос MRP2 [9, 25]. Количество нативных форм (пицеида или транс-ресвератрола) в клетках было выше, чем количество глюкуронидов, поэтому их отток через MRP2 может успешно ингибироваться их родительскими формами.
Поскольку метаболиты не выделяются на внутренней стороне, может происходить сдвиг в экспорте глюкуронидов по направлению к стороне BL (перенос осуществляется протеином MRP3) [21]. Тем не менее, ß-глюкуронидазы, которые широко распространены в человеческих органах, тканях и телесных жидкостях, могут модулировать степень экспрессии глюкуронидов и выделять активный родительский агликон [26]. Этот путь будет увеличивать количество транс-ресвератрола, а следовательно, повышать его эффективность в человеческом организме.
В заключение мы приведем построенную нами в данном исследовании модель абсорбции транс-пицеида в энтероците (Рис. 3).

Рис. 3. Предложенные пути для абсорбции и метаболизма в кишечнике при усвоении транс-транс-ресвератрола и транс—пицеида.



Это соединение активно абсорбируется по поверхности АР- мембраны с помощью SGLT1, и оно также активно истекает из клеток с помощью протеина MRP2 [9]. Результаты, наблюдаемые в этом исследовании, указывают на то, что имеются благоприятные возможности для проникновения транс-пицеида в биологические мембраны, и что эффективный метаболизм, наблюдаемый в клетках Caco-2 может указывать на низкую био-доступность этого соединения в человеческом организме. Мы также продемонстрировали, что первым этапом метаболизма при усвоении транс-пицеида является гидролиз сахарного компонента, который обычно присутствует в большинстве фенольных соединений. Это может возникать в тонком кишечнике под действием мембрано-связанного энзима LPH или энзима CBG после транспортировки транс-пицеида в энтероцит с помощью SGLT1. Получающийся транс-ресвератрол может также подвергаться дальнейшему метаболизму, и в частности, в образовании

сопряжения с глюкороновой кислотой внутри энтероцитов. Тем не менее, требуется проведение дальнейших исследований для выяснения возможного фармакологического действия этих метаболитов на человеческий организм.

Признание
This study was supported by a grant from the Re´gion Aquitaine, France. We are grateful to Dr. Ray Cooke for reading the manuscript.

Литература