



Клеточная линия Caco-2 как модель для оценки мукопротекторных свойств

L. Rizza^a, G. Frasca^a, M. Nicholls^a, C. Puglia^a, V. Cardile^{b,*}

^a Кафедра фармацевтических наук, Университет Катании, V.le A. Doria 6, 95125 Катания, Италия

^b Департамент биомедицинских наук, Университет Катании, V.le A. Doria 6, 95125 Катания, Италия

Информация

Article history:

Received 5 May 2011

Accepted 6 November 2011

Available online 11 November 2011

Keywords:

Bioadhesion

Cell culture

ICAM-1

In vitro model

Mucoprotective

Mucosal inflammation

Аннотация

Физическая защита поверхности слизистой оболочки и уменьшение воспалительных процессов в настоящее время считаются основными стратегиями лечения и профилактики заболеваний слизистой оболочки. Однако большинство моделей, используемых для проверки активности новых мукопротективных агентов, основаны на ограниченной инструментальной оценке или на умерщвлении экспериментальных животных. В этом исследовании впервые предлагаются некоторые экспериментальные методы *in vitro* с использованием линии клеток Caco-2 для прогнозирования поведения и действия мукопротективных агентов *in vivo*. С этой целью были выбраны гиалуроновая кислота и природные полисахариды из-за их биоадгезивной активности, гидрокортизон и природные полифенолы в качестве противовоспалительных агентов. Полученные результаты продемонстрировали, что методы (анализ Cop A / o-rd и система клеток Франца) оценки мукоадгезии на клетках Caco-2 полезны для сравнения активности каждого экспериментального образца и оценки времени адгезии к клеткам слизистой оболочки поверхности. Более того, снижение экспрессии молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) в клетках Caco-2 можно рассматривать как прямую корреляцию с противовоспалительным эффектом слизистой оболочки, вызванным гидрокортизоном и природными полифенолами. В заключение, исследование поддержало использование клетки Caco-2 в качестве модели для сравнения и исследования влияния различных активных веществ на слизистую оболочку и ее заболевания.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Введение

Заболевания слизистых оболочек стали более распространенными, особенно в промышленно развитых странах Запада, и ожидается, что в ближайшие годы их заболеваемость резко возрастет. Изменение образа жизни, диетические составляющие и компоненты окружающей среды были определены как основная причина повышения предрасположенности людей к дисфункциям слизистых оболочек (Groschwitz and Hogan, 2009; Liakakos et al., 2009; Liu et al., 2009). Примеры заболеваний слизистой оболочки включают воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), язвенный колит, болезнь Крона, гастроэзофагеальный рефлюкс в желудочно-кишечном тракте; синусит и ринит на слизистой оболочке носа; интерстициальный цистит мочевого пузыря. Кроме

того, наблюдаются болезненные язвенные поражения слизистой оболочки, которые приводят к побочным эффектам из-за специфических методов лечения, таких как химиотерапия и лучевая терапия (мукозит и эзофагит) (Allende and Yerian, 2009; Holgate, 2007; Lazard et al., 2009 г.).

Хорошо известно, что нарушения слизистой оболочки обычно характеризуются двумя основными процессами: нарушением целостности слизистой оболочки и воспалением тканей. Изменение поверхностного барьера слизистой оболочки может увеличить проницаемость слизистой оболочки, что приведет к абсорбции токсичных и агрессивных факторов в организм. Более того, повреждения слизистой оболочки вызывают активацию специфических механизмов репарации, которые включают воспалительные процессы, затрагивающие как более глубокие слои, так и популяцию неэпителиальных клеток (Romier et al., 2009; Sturm and

Dignass, 2008). Как следствие, средства защиты слизистой оболочки могут улучшать заживление, воздействуя на поверхность слизистой оболочки, за счет применения биоадгезивного защитного барьера и уменьшения процессов воспаления.

В настоящее время ведутся активные исследования по поиску эффективных защитных агентов, особенно натуральных активных веществ, которые предпочтительны из-за многих преимуществ, таких как биосовместимость, безопасность, нетоксичность и нераздражающие свойства. Однако большинство моделей, используемых для оценки и исследования активности и эффектов новых слизистых защитных агентов, основаны на ограниченной инструментальной оценке (например, на тестере на растяжение) или на умерщвлении экспериментальных животных (Belgamwar and Surana, 2010; Davidovich-Pinhas and Бьянко-Пелед, 2010). Насколько нам известно, мало что известно об использовании клеточных линий *in vitro* для оценки свойств защитных агентов слизистой оболочки. В настоящей работе экспериментальные модели *in vitro* с использованием клеточной линии Caco-2 предлагаются в качестве методов прогнозирования поведения *in vivo* и исследования действия мукопротективных агентов. До сих пор клеточная линия Caco-2 в основном рассматривалась как модель кишечного барьера при определении абсорбции и проникновения лекарств (Levy et al., 1995; Meunier et al., 1995; Shah et al., 2006B *in vitro*, используемые в этой работе, позволяют оценить биоадгезивные свойства активных агентов, время адгезии в условиях, имитирующих постоянный контакт с физиологической жидкостью, и их способность противодействовать перепроизводству молекулы межклеточной адгезии -1 (ICAM-1), специфически вовлеченный в воспалительные процессы слизистых оболочек (Malizia et al., 1991).

Физическая защита слизистой оболочки часто представляет собой первую важную стратегию лечения и профилактики заболеваний слизистой оболочки. Мукоадгезивные материалы могут использоваться как самостоятельные терапевтические агенты, для покрытия и защиты поврежденных тканей (язвы желудка, повреждений пищевода или поражения слизистой оболочки полости рта) или в качестве смазывающих агентов (в полости рта, глазах и влагалище) (Smart, 2005).

Более того, заболевания слизистых оболочек включают состояния, часто характеризующиеся сложной патофизиологией. Было продемонстрировано, что события воспаления происходят в поврежденных или измененных слизистых оболочках. Следовательно, при заболеваниях слизистой оболочки происходит несбалансированное производство провоспалительных факторов, таких как факторы роста, цитокины, молекулы адгезии и нейропептиды (Rafee et al., 2003). Например, слизистые оболочки кишечника постоянно подвергаются воздействию

просветных антигенов, включая бактериальный липополисахарид (ЛПС), компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий (Pang et al., 1994; Panja et al., 1998). Сигнальные события, индуцированные LPS, приводят к активации NFκB и к экспрессии провоспалительных генов. В свою очередь, NFκB регулирует экспрессию ICAM-1, гликопротеина клеточной поверхности, который играет ключевую роль в рекрутинге лейкоцитов на участках кишечного воспаления. Следовательно, эта молекула адгезии активируется в воспаленной слизистой оболочке (Kim et al., 2005; Malizia et al., 1991; Strugess et al., 1990). В модели *in vitro*, предложенной в этом исследовании, снижение экспрессии ICAM-1 в клетках Caco-2 можно рассматривать как прямую корреляцию с противовоспалительным эффектом слизистой оболочки. В нашей работе были выбраны различные агенты, воздействующие на слизистую оболочку, в силу их различной природы и механизмов действия. Хорошо известная мукоадгезивная гиалуроновая кислота и противовоспалительный гидрокортизон используются в качестве контроля в экспериментах *in vitro*, тогда как были исследованы природные мукопротекторные полисахариды из *Opuntia ficus indica* (L.) и полифенолы из *Olea europaea* (L.). Полисахариды опунции используются как мукопротекторные средства, поскольку они способны образовывать защитный слой на поверхности слизистой оболочки и ускорять реэпителизацию кожной раны (Galati et al., 2001, 2002; Wittschier et al., 2009); но нам известно немного о адгезивной способности и времени адгезии полисахаридов на клетках слизистой оболочки. Недавно были получены убедительные научные данные, подтверждающие действие оливковых биофенолов как защитных агентов против окислительного повреждения и воспаления, связанных с нарушениями слизистой оболочки (Min et al., 2005, 2006; Romier et al., 2009). В частности, Dekanski et al. (2009) указали на гастропротекторную активность экстракта листьев оливы в отношении вызванных стрессом холода поражений желудка у крыс. Общепринято считать, что активность оливковых фенолов может быть связана с их антиоксидантными свойствами и улавливанием радикалов (Mylonaki et al., 2008; Obied et al., 2007; Pieroni et al., 1996). Однако дальнейшие исследования могут быть полезными для изучения способности этого активного вещества влиять на процессы воспаления слизистой оболочки.

2. Материалы и методы.

2.1. Материалы

Экстракт полисахаридов из *O. ficus indica* (L.) cladode и экстракт полифенолов (содержащий 18% (мас. / Мас.) Полифенолов, определенных методом Фолина-Чокальтеу) из листьев *O. europaea* (L.)

были любезно предоставлены компанией Вiонар (Бионап, Италия). Стрептавидинпероксидаза, биотинилированный конканавалин А из *Canavalia ensiformis* (Con-A), о-фенилендиамин дигидрохлорид (o-pd), трипановый синий, водород перекись и другие реактивы аналитической или особой чистоты закуплены у Sigma – Aldrich (Италия); все растворители от Carlo Erba (Италия).

2.2. Клеточные культуры

Клетки Caco-2 поддерживали в минимальной необходимой среде (MEM) (Sigma-Aldrich, Италия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 Ед / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина и инкубировали при 37 °С. в увлажненной атмосфере 95% воздуха / 5% CO₂. Среда меняли каждые 2–3 дня.

2.3. Анализ Con A / o-pd

Анализ Con A / o-pd был основан на анализе, описанном Cardile et al. (2008) и Patel et al. (1999). Клетки Caco-2 были обработаны трипсином, промыты физиологическим раствором и разделены на семь групп, обработанных следующим образом: (1) контрольная группа (только физиологический раствор); (2) гиалуроновая кислота 0,1%; (3) гиалуроновая кислота 0,25%; (4) гиалуроновая кислота 0,5%; (5) природные полисахариды 0,1%; (6) природные полисахариды 0,25%; (7) природные полисахариды 0,5%

Каждый экспериментальный раствор (5 мл) добавляли к суспензии клеток (2 мл) и инкубировали в течение 15 мин при 30 °С при осторожном встряхивании. Затем клетки дважды промывали, добавляя 5 мл изотонического 0,05 М раствора.

Забуференный трис физиологический раствор (TBS) с последующим центрифугированием при 2000 об / мин в течение 5 мин. После второй промывки клетки переносили в чистую пробирку и подвергали последней промывке. Этот шаг был необходим для того, чтобы любой материал, связанный со стенками пробирки, не переносился и не мешал анализу. Клетки осаждали центрифугированием при 2000 об / мин в течение 5 мин, после чего удаляли весь супернатант, кроме 2 мл. Затем остаток интенсивно перемешивали с помощью вихревой мешалки и промывали, добавляя 12 мл изотонического 0,05 М TBS, с последующим центрифугированием при 2000 об / мин в течение 5 минут. Стадия промывки повторяли дважды, после чего клетки переносили в чистую пробирку и подвергали последней промывке перед добавлением следующего реагента. 5 мл 0,05 М TBS, содержащего 1 мМ хлорида кальция и 10 мг / л биотинилированного Con-A добавляли к клеткам и смесь инкубировали при 30 °С в течение 30 мин при осторожном встряхивании. Затем его центрифугировали при 2000 об / мин в течение 5 минут и супернатант удаляли, оставляя 2 мл буфера. Клетки дважды промывали TBS и их суспензию переносили в

чистую пробирку. 5 мл

Добавляли 0,125 М TBS, содержащего 5 мг / л стрептавидинпероксидазы, и каждую пробирку инкубировали при 30 °С в течение 60 мин при осторожном встряхивании. Затем клетки дважды промывали, переносили в чистую пробирку и снова промыли.

К каждому осадку добавляли 1 мл раствора о-фенилендиамин дигидрохлорида (o-pd) (содержащего 0,4 мг o-pd и 0,4 мкл 30% H₂O₂ в 1 мл 0,05 М цитрат-фосфатного буфера) и суспензию постоянно перемешивали. Окисление o-pd прекращали через 2 мин с помощью 1 мл 1 М H₂SO₄ после получения желтого цвета и измерения оптической плотности при 492 нм (спектрофотометр Genesis, Sigma-Aldrich, Италия).

2.4. Оценка времени схватывания

Время адгезии гиалуроновой кислоты и природных полисахаридов оценивали с использованием наборов из восьми ячеек Франца (рис. 1). Ячейка Франца состоит из донора, а рецепторная камера и мембрана расположены между этими двумя отсеками. Рецептор термостатирован на 36 °С за счет циркуляции воды, помещенной во внешнюю рубашку, чтобы имитировать реальное применение. В нашем эксперименте мы поместили донору суспензию клеток Caco-2, обработанных 0,5% гиалуроновой кислотой и 0,5% природных полисахаридов. Донору подавали непрерывный поток (0,5 мл / мин) физиологического раствора, термостатированного при 36 °С и состоящего из изотонического раствора, содержащего фосфатный буфер, рН 7. Для циркуляции физиологического раствора использовался перистальтический насос с восемью каналами использовались для обслуживания как вся батарея ячеек Франца.

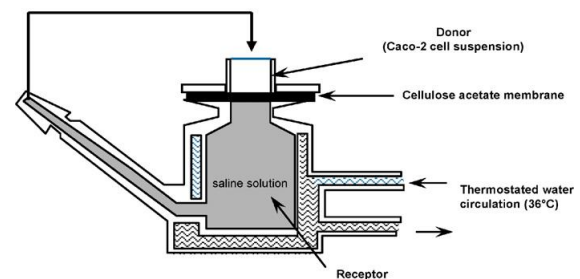


Рис. 1. Схема клеток Франца, используемых для оценки времени мукоадгезии.

Мембрану из ацетата целлюлозы помещали к основанию донора в зоне разделения с рецептором, чтобы обеспечить выход физиологического раствора от донора к рецептору, удерживая клетки в донорской камере. Физиологический раствор протекал через клетки, обработанные гиалуроновой кислотой или природными полисахаридами, в течение 0, 30 и 60 минут. В конце каждой точки клетки переносили от донора в соответствующие пробирки, обрабатывали биотинилированным лектином (Con-A), а затем стрептавидином в присутствии дигидрохлорида о-фенилендиамина, чтобы определить активность

остаточной мукоадгезии после обработки физиологическим раствором в разное время. Результаты были выражены в виде процентного снижения по сравнению с контролем. Каждый эксперимент, относительно определенного диапазона времени воздействия потока физиологического раствора, проводился трижды.

2.5. Вестерн-блот анализ

Клетки Сасо-2 стимулировали или нет (необработанные контроли) LPS 1 мкг / мл в течение 24 ч в отсутствие или в присутствии гидрокортизона (10–5 М), полисахаридов (100 мкг / мл), полифенолов (100 мкг / мл). μ , г / мл) или полисахариды и полифенолы. Каждый образец тестировали на экспрессию молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) и оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, необработанные и обработанные клетки Сасо-2 дважды промывали ледяным PBS и собирали лизирующим буфером (10 мМ трис-НСl плюс 10 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 0,6 мМ PMSF и 1% SDS, pH 7,4.). После охлаждения в течение 30 мин при 0 °С клетки обрабатывали ультразвуком. Шестьдесят микрограммов общего белка, присутствующего в супернатанте, загружали на каждую дорожку и разделяли электрофорезом в геле 4–12% Novex Bis-Tris (NuPAGE, Invitrogen, Италия). Затем белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Invitrogen, Италия) во влажной системе. Перенос белков проверяли окрашиванием нитроцеллюлозных мембран с помощью Ронсеау S. Мембраны были заблокированы в забуференном солевом растворе, содержащем 0,01% твин-20 (TBST) и 5% обезжиренного сухого молока в течение 1 часа при комнатной температуре. Мышинные моноклональные антитела против ICAM-1 (1H4: sc-51632, Santa Cruz Biotechnology, Санта-Крус, Калифорния) (1: 200) и мышинные моноклональные антитела против α -тубулина (Sigma, Милан, Италия) (1: 5000) разбавляли в TBST и мембраны инкубировали при 4 °С в течение ночи. Антитела детектировали с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, с использованием усиленного хемилюминесцентного детектирования Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Полосы измеряли денситометрически, и их относительную плотность рассчитывали на основе плотности полос α -тубулина в каждом образце. Значения выражены в произвольных денситометрических единицах, соответствующих интенсивности сигнала.

2.6. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с помощью пакета статистических программ SYSTAT, версия 9 (Systat Inc., Evanston, IL, USA). Каждый результат рассчитывали, как среднее значение \pm стандартная ошибка (SEM).

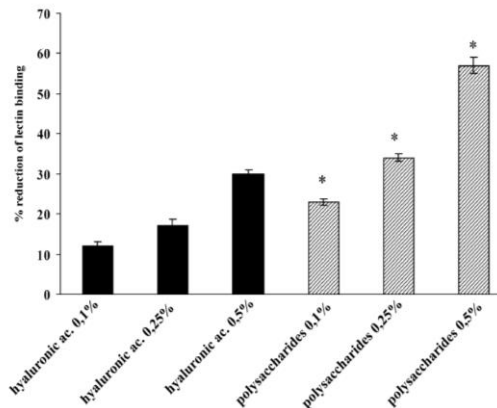


Рис. 2. Мукоадгезия природных полисахаридов, определяемая как % уменьшения связывания лектина на клетках Сасо-2 при различных концентрациях; * $p < 0,05$ по сравнению с гиалуроновой кислотой.

Оценка статистической значимости проводилась с помощью t-критерия Стьюдента. Считалось, что значения $p < 0,05$ представляют статистическую значимость.

3. Результаты

В этом исследовании для оценки биоадгезивной способности активных веществ использовался метод прогнозирования поведения *in vivo*. Основа анализа заключается в следующем: если экспериментальный образец связывается с клетками слизистой оболочки, он замаскирует гликоконъюгаты клеточной поверхности, таким образом, пропорционально подавляя связывание лектина Соп-А. Лектин - это белок с высоким сродством к глюкозидным и маннозидным группам мембранных гликопротеинов, и он искусственно связан с биотином; пероксид стрептавидина, добавленный к клеточной суспензии, связывается с биотином и образует комплекс белок-глюкоза-лектин-биотин-стрептавидин-пероксидаза.

Если присутствует стрептавидинпероксидаза (таким образом, комплекс белок-глюкоза-лектин-биотин-стрептавидин-пероксидаза), она катализирует реакцию полимеризации, чтобы получить желтую окраску клеточного образца из-за продукции 2,3-диаминофеназина (желтый) из дигидрохлорида о-фенилендиамина. Более того, если клетки подвергаются непрерывному потоку физиологической жидкости с использованием системы ячеек Франца, оценка желтой окраски в различные интервалы времени коррелирует с силой сцепления между поверхностью клетки и биоадгезивными веществами. Наши результаты показали дозозависимую мукоадгезию гиалуроновой кислоты и природных полисахаридов *Opuntia cladode* (рис. 2). Снижение связывания лектина составляло от 12% до 30% для гиалуроновой кислоты и от 23% до 57% для полисахаридов трав. Более того, при одинаковой концентрации (0,5%, мас. / Мас.) Полисахариды демонстрировали более высокое сцепление лектина по сравнению с гиалуроновой кислотой в разные интервалы времени (Таблица 1). Фактически, гиалуроновая кислота не вызывала связывания лектина через 60 минут, когда подвергалась непрерывному потоку

Time of treatment (mean% ± SEM)	Reduction in lectin binding		
	0	30 min	60 min
Hyaluronic acid	30 ± 1	10 ± 0.4	None
Natural polysaccharides	47 ± 2 _a	34 ± 2 _a	18 ± 1

Данные выражены как средний процент снижения связывания лектина на клетках Сасо-2 по сравнению с контролем в разное время (0, 30, 60 мин).

p < 0,05 по сравнению с гиалуроновой кислотой.

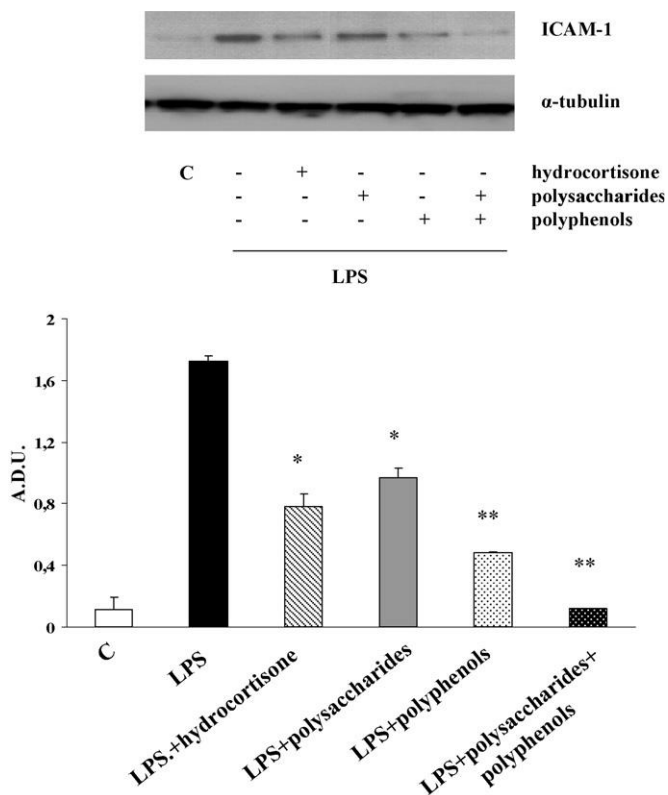


Рис. 3. Влияние природных полисахаридов и полифенолов на экспрессию ICAM-1.

- индуцированный LPS на клетках Сасо-2, определенный с помощью вестерн-блоттинга. Сасо-2 клетки
- лечили LPS 1 г / мл в течение 24 ч в присутствии гидрокортизона (10⁻⁵ М),
- полисахариды (100 г / мл), полифенолы (100 г / мл) или оба экстракта. Данные показывают
- относительное выражение (среднее

±

- SEM) ICAM-1, рассчитанный как произвольный денситометрический
- единиц (A.D.U.), собранных в трех независимых экспериментах. * p < 0,05; ** p < 0,01
- по сравнению с LPS-индуцированным ICAM-1. физиологической жидкости. Наконец, как и ожидалось, мукоадгезивные свойства были отнесены к оливковым полифенолам в любой концентрации (данные не показаны).

Что касается модели противовоспалительных

клеток, необработанные клетки Сасо-2 показали очень низкую экспрессию ICAM-1, тогда как инкубация культур клеток с LPS 1 мкг / мл в течение 24 часов индуцировала сильную экспрессию ICAM-1. Добавление гидрокортизона (положительный контроль), природных полисахаридов и полифенолов вызывало значительное снижение экспрессии ICAM-1 по сравнению с клетками, обработанными LPS (рис. 3). Наконец, чтобы оценить возможное взаимодействие между активными веществами, наблюдали ингибирование экспрессии ICAM-1 (фиг. 3). Воздействие полисахаридов с полифенолами на клетки Сасо-2 приводило к сильному подавлению экспрессии ICAM-1 со значениями, аналогичными контролю. Подавление LPS-стимулированной экспрессии ICAM-1 в клетках Сасо-2 полифенолами и полисахаридами не было связано с их цитотоксичностью, как оценивалось с помощью анализа МТТ (данные не показаны).

4. Обсуждение

Изменения в структуре или повреждение поверхности слизистой оболочки могут привести к серьезным заболеваниям, которые существенно влияют на повседневную деятельность и качество жизни. В настоящее время лечение изменений слизистой оболочки включает защиту слизистой оболочки, сокращение времени заживления и подавление тканевого воспаления (Rajendran and Kumar, 2010; Romier et al., 2009; Sturm and Dignass, 2008). Для защиты слизистой оболочки обычно предлагается несколько агентов, но очень сложно исследовать механизмы их действия и предсказать их эффективность *in vivo*. Общие протоколы, предлагаемые для оценки мукопротективных агентов, основаны на ограничивающей инструментальной оценке (такой как тестер на растяжение) или на умерщвлении экспериментальных животных (Belgamwar and Surana, 2010; Davidovich-Pinhas and Bianco-Peled, 2010).

В этом исследовании мы впервые оценили некоторые методы *in vitro* на клетках Сасо-2 с целью оценки физической защиты и противовоспалительного действия на слизистую оболочку, две важные стратегии, используемые для лечения и профилактики слизистой оболочки. Мукоадгезивные модели, предложенные в нашем исследовании, позволяют количественно определять адгезионную способность образцов и сравнивать друг друга. Состояние, более похожее на поведение *in vivo*, чем в традиционных моделях, было реализовано за счет использования системы клеток Франца и непрерывного потока физиологической жидкости на поверхности клетки. Наконец, оценивали противовоспалительный эффект, отслеживая экспрессию маркера, специфически связанного с событиями воспаления слизистой оболочки. Были исследованы различные активные агенты, такие как гиалуроновая кислота и полисахариды из опунции в качестве биоадгезивных агентов, гидрокортизон и полифенолы

Принятые здесь модели показали хорошую способность сравнивать и дифференцировать активность образцов в зависимости от их природы: гиалуроновая кислота и природные полисахариды продемонстрировали хорошую и длительную адгезию к поверхности клетки, даже если они подвергались непрерывному воздействию физиологической жидкости. Как и ожидалось, полифенольные вещества не обладают биоадгезивными свойствами.

Что касается противовоспалительной активности, измеренной на клетках Caco-2, помимо гидрокортизона, оба природных вещества были способны противодействовать перепроизводству медиаторов воспаления, коррелированных с заболеваниями слизистых оболочек, даже если с полисахаридами опунции была связана меньшая активность, чем с полифенолами оливы. Наконец, интересная активность сохранялась при одновременном использовании полисахаридов и полифенолов на клетках Caco-2, стимулированных LPS. Одновременное присутствие обоих экстрактов приводит к очень значительному снижению белка ICAM-1. Наши результаты показали, что модель противовоспалительных клеток была способна оценить эффект смешанных активных веществ и их взаимодействие на экспрессию ICAM-1.

Следовательно, в соответствии с современными научными знаниями, мукопротекторная активность полисахаридов *Opuntia* может быть в основном связана с их биоадгезивными свойствами на эпителиальной слизистой оболочке (Galati et al., 2001, 2002). Как сообщает Galati et al. (2001, 2002), лечение *O. ficus indica cladodes* предотвращало развитие язв, вызванных этанолом (профилактическое лечение), или способствовало более быстрому восстановлению. Известно, что природные полисахариды могут взаимодействовать с такими белками, как муцин и полярная головка фосфолипидов мембран. Они могут иметь защитный эффект, если заменяют водородные связи молекул воды, создавая и увеличивая локальную вязкость (Vázquez-Ramírez et al., 2006). Результаты, полученные в этой работе, подтвердили эту гипотезу и способность полисахаридов *Opuntia* прилипать к поверхности клетки и формировать физическую защиту, демонстрирующую хорошее сопротивление постоянному контакту с физиологическим потоком жидкости.

Другой интересный результат нашего исследования заключается в том, что по сравнению с гидрокортизоном полифенолы более эффективно блокируют некоторые провоспалительные действия ЛПС на эпителиальные клетки кишечника, снижая экспрессию медиаторов, строго коррелированных с заболеваниями слизистых оболочек (Kim et al., 2005; Malizia et al., 1991; Стругесс и др., 1990).

Как было предложено другими авторами (Эль и Каракая, 2009; Милонаки и др., 2008; Обид и др., 2007; Пьерони и др., 1996), полифенолы, такие как простые фенольные соединения, флавоноиды, секоиридоиды,

коричная кислота или лигнаны обладают сильным противовоспалительным и смягчающим действием. На основании полученных результатов мы можем подтвердить, что оливковые полифенолы способны защищать слизистую оболочку не только как простые антиоксиданты и поглотители радикалов, но и могут блокировать LPS-индуцированную активность клеток NFκB и, следовательно, они могут влиять на воспалительные процессы, связанные со слизистой оболочкой.

5. Заключение

В заключение, методы *in vitro*, предложенные в этом исследовании с использованием линии клеток Caco-2 в качестве модели, можно считать простыми и быстрыми предварительными методами, полезными для прогнозирования поведения *in vivo* и способными оценить защитный эффект новых веществ на слизистую оболочку.

Ссылки и литература:

- Альенде Д.С., Йериан Л.М., 2009. Диагностика гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: взгляд патолога. *Adv. Anat. Патол.* 16, 161–165.
- Белгамвар, В.С., Сурана, С.Дж., 2010. Дизайн и разработка оральной мукоадгезивной системы из нескольких частиц, содержащей атенолол: характеристика *in vitro* – *in vivo*. *Chem. Pharm. Бык.* 58, 1168–1175.
- Кардил, В., Фраска, Г., Рицца, Л., Бонина, Ф., Апулия, К., Бардж, А., Чиабретти, Н., Кравотто, Г., 2008. Улучшенная адгезия водно-слизистых клеток к клеткам слизистой оболочки растворимые соли тетраалкиламмония хитозана. *Int. J. Pharm.* 362, 88–92.
- Давидович-Пинхас, М., Бьянко-Пелед, Х., 2010. Мукоадгезия: обзор методов характеристики. Мнение эксперта. *Препарат Делив.* 7, 259–267.
- Декански, Д., Яничичи-Худомал, С., Ристич, С., Радонич, Н.В., Петрониевич, Н.Д., Пиперски, В., Митрович, Д.М., 2009. Ослабление вызванного напряжением удержания холода поражения желудка экстрактом листьев оливы. *Gen. Physiol. Биофиз.* 28, 135–142.
- Эль, С.Н., Каракая, С., 2009. Листья оливкового дерева (*Olea europaea*): потенциальное положительное воздействие на здоровье человека. *Nutr. Ред.* 67, 632–638.
- Galati, E.M., Manforte, M.T., Tripodo, M.M., d'Aquino, A., Mondello, M.R., 2001. Противовозвратная активность *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ультраструктурное исследование. *J. Ethnopharmacol.* 76, 1–19.
- Galati, E.M., Pergolizzi, S., Miceli, N., Monforte, M.T., Tripodo, M.M., 2002. Исследование увеличения продукции желудочной слизи у крыс, получавших *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. *Cladodes*. *J. Ethnopharmacol.* 83, 229–233.
- Грошвиц, К.Р., Хоган, С.П., 2009. Функция кишечного барьера: молекулярная регуляция и патогенез заболевания. *J. Allergy Clin. Иммунол.* 124, 3–20.
- Холгейт, С.Т., 2007. Дисфункция эпителия при астме. *J. Allergy Clin. Иммунол.* 120, 1233–1244.
- Ким, Д.С., Нарула, А.С., Джобин, С., 2005. Водорастворимый экстракт шалфея *multiorrhiza*, но не входящая в его состав сальвианоловая кислота В, отменяет

LPS-индуцированную передачу сигналов NFκB в эпителиальных клетках кишечника. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 288–297.

Лазард, Д.С., Мур, А., Хупертан, В., Мартин, К., Эскабасс, В., Дрейфус, П., Бургель, П.Р., Амселем, С., Эскудые, Э., Кост, А., 2009. Слизисто-цилиарная дифференцировка эпителиальных клеток носа снижается после заживления ран *in vitro*. *Аллергия* 64, 1136–1143.

Леви, Э., Мехран, М., Сейдман, Э., 1995. Клетки Caco-2 как модель кишечных липопротеинов синтез и секреция тейнов. *FASEB J.* 9, 626–635.

Лиакакос, Т., Караманолис, Г., Патапис, П., Мисиакос, Е.П., 2009. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь: медикаментозное или хирургическое лечение? *Гастроэнтерол. Res. Практик.* 2009, 1–15.

Лю, К., Ли, А., Вэн, Ю.Б., Дуань, М.Л., Ван, Б.Е., Чжан, С.В., 2009. Изменения иммунного барьера слизистой оболочки кишечника у крыс с эндотоксемией. *Мир J. Gastroenterol.* 15, 5843–5850.

Малиция, Г., Калабресе, А., Коттон, М., Раймондо, М., Трейдосевич, Л.К., Смарт, К.Дж., Олива, Л., Пальярро, Л., 1991. Экспрессия молекул адгезии лейкоцитов при воспалительном заболевании кишечника. *Гастроэнтерология* 100, 150–159.

Менье, В.,

Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G., 1995. Линия эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2; фармакологические и фармакокинетические применения. *Cell Biol. Toxicol.* 11, 187–194.

Мин, Ю.С., Йим, Ш., Бай, К.Л., Чхве, Х.Дж., Чон, Дж. Х., Сонг, Х.Дж., Парк, С.Ю., Хэм, И., Ван, В.К., Сон, У.Д., 2005. Эффекты апигенина-7-Обд-глюкуронопиранозид при рефлюкс-эзофагите и гастрите у крыс. *Auton. Автокоид. Pharmacol.* 25, 85–91.

Мин, Ю.С., Бай, К.Л., Йим, С.Х., Ли, Й.Дж., Сонг, Х.Дж., Ким, Дж.Х., Хэм, И., Ван, В.К., Сон, У.Д., 2006. Влияние лютеолин-7-О-бета-d-глюкуронопиранозид на гастрит и эзофагит у крыс. *Arch. Pharm. Res.* 29, 484–489.

Милонаки, С., Киассос, Э., Макрис, Д.П., Кефалас, П., 2008. Оптимизация экстракции фенольных соединений листьев оливы (*Olea europaea*) с использованием систем растворителей на основе воды / этанола и методологии поверхности отклика. *Анальный. Биоанал. Chem.* 392, 977–985.

Обид, Х.К., Бедгуд, Д.Р., Пренцлер, П.Д., Робардс, К., 2007. Химический скрининг экстрактов биофенолов оливок методом жидкостной хроматографии с дефисами. *Анальный. Чим. Acta* 603, 176–189.

Панг, Г., Коуч, Л., Бейти, Р., Клэнси, Р., Криппс, А., 1994. GM-CSF, IL-1a, IL-1113, IL-6, IL-8, IL-10. , Экспрессия генов ICAM-1 и VCAM-1 и продукция цитокинов в дуоденальных фибробластах человека, стимулированных липополисахаридом, IL-1a и TNF-α. *Clin. Exp. Immunol.* 96, 437–443.

Panja, A., Goldberg, S., Eckmann, L., Krishen, P., Mayer, L., 1998. Регуляция и функциональные последствия связывания провоспалительных цитокинов на эпителиальных клетках кишечника человека. *J. Immunol.* 161, 3675–3684.

Патель, Д., Смит, А. В., Грист, Н., Барнет, П., Смарт, Д. Д., 1999. Модель слизистой оболочки *in vitro*, позволяющая прогнозировать наличие биоадгезивных

агентов в полости рта. *J. Control. Выпуск* 61, 175–183.

Пьерони, А., Хеймлер, Д., Питерс, Л., ван Поел, Б., Влитинк, А.Дж., 1996. Антикомплементарная активность флавоноидов из листьев оливы (*Olea europaea* L.) *in vitro*. *Pharmazie* 51, 765–768.

Rafee, P., Ogawa, H., Heidemann, J., Li, MS, Aslam, M., Lamirand, TH, Fisher, PJ, Graewin, SJ, Dwinell, MB, Johnson, CP, Шейкер, Р., Бинион, Д.Г., 2003. Выделение и характеристика эндотелиальных клеток микрососудов пищевода человека: механизмы воспалительной активации. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1277 – G1292.

Раджендран, Н., Кумар, Д., 2010. Роль диеты в лечении воспалительного заболевания кишечника. *Мир J. Gastroenterol.* 16, 1442–1448.

Ромьер, Б., Шнайдер, Ю.Дж., Ларонделл, Ю., Во время, А., 2009. Полифенолы, получаемые с пищей, могут модулировать воспалительную реакцию кишечника. *Nutr. Ред.* 67, 363–378.

Шах, П., Джогани, В., Багчи, Т., Мисра, А., 2006. Роль монослоев клеток Caco-2 в прогнозировании всасывания лекарств в кишечнике. *Biotechnol. Прог.* 22, 186–198.

Смарт, Дж. Д., 2005. Основы и лежащие в основе механизмы мукоадгезии. *Adv. Препарат Делив. Ред.* 57, 1556–1568.

Стругесс, Р., Макартни, Дж., Макгоба, М., Хунг, С.Х., Хаскард, Д.О., Циклитира, П.Дж., 1990. Дифференциальная регуляция молекулы межклеточной адгезии-1 при целиакии. *Clin. Exp. Immunol.* 82, 489–492.

Штурм А., Дигнасс А.У., 2008. Реституция эпителия и заживление ран при воспалительном заболевании кишечника. *Мир J. Gastroenterol.* 14, 348–353.

Васкес-Рамирес, Р., Ольгин-Мартинес, М., Кубли-Гарфиас, К., Эрнандес-Муноз, Р., 2006. Обращение вспять изменений слизистой оболочки желудка во время хронического гастрита, вызванного этанолом, у крыс путем перорального введения *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Мир J. Gastroenterol.* 12, 4318–4324.

Виттшиер, Н., Фаллер, Г., Хенсель, А., 2009. Водные экстракты и полисахариды из корней лакрицы (*Glycyrrhiza glabra* L.) ингибируют адгезию *Helicobacter pylori* к слизистой оболочке желудка человека. *J. Ethnopharmacol.* 125, 218–223.

