



Kultury komórkowe nabłonka jelitowego jako model do badania transportu transnabłonkowego

Włodzimierz Grajek, Anna Olejnik, Katarzyna Staniaszek
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Epithelial cell cultures as a model system to study the transepithelial transport

Summary

Epithelial cell lines are commonly accepted model systems to determine intestinal permeability and transepithelial transport. The application of Caco-2 human epithelial cell culture can be used to study bioavailability of drug and food compounds. This culture grows on porous membranes and forms a monolayer of well differentiated cells joined by intracellular tight junctions. This system provides selective barrier to study passive and active transport of different molecules. The Caco-2 cells possess some enzymes and transport systems similar to intestinal epithelium *in vivo*, however, these proteins are expressed to a lesser extent compared to normal enterocytes. In this paper, the advantages and limitations of Caco-2 model are discussed.

Key words:

transport, epithelium, Caco-2, bioavailability, model.

Adres do korespondencji

Włodzimierz Grajek,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza
im. Augusta
Cieszkowskiego,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
grajek@au.poznan.pl

1. Biodostępność – definicje

Termin biodostępność jest definiowany jako szybkość i zakres, w jakim dany składnik jest absorbowany z przewodu pokarmowego i staje się dostępny w organizmie w miejscu, w którym ma oddziaływać (15,16). Inaczej mówiąc, chodzi w pierwszym rzędzie o transfer substancji ze światła przewodu pokarmowego do układu krążenia, a zatem do krwiobiegu, natomiast

w przypadku leków sytuacja jest bardziej złożona, gdyż aktywny składnik powinien dotrzeć do miejsca jego działania, a zatem do konkretnych narządów i tkanek i dopiero wówczas można mówić o jego biodostępności.

Rozpatrując biodostępność danego składnika po jego spożyciu drogą pokarmową (ang. *oral bioavailability*) należy brać pod uwagę trzy następujące po sobie procesy:

- uwalnianie składnika z produktu spożywczego w przewodzie pokarmowym (biodostępność),
- rozkładu danego składnika w jelitach i transport przez ścianę jelit do organizmu (wchłanianie),
- wprowadzenie niezmodyfikowanej części do centralnego krwioobiegu i jej rozkład w wątrobie (metabolizm).

Większość produktów spożywczych podawanych jest *per os* w stanie stałym i poszczególne związki chemiczne są ściśle związane z organiczną matrycą. Ich dostępność zależy od rozmiarów cząstek matrycy, porowatości i dostępności matrycy dla rozpuszczalników, oraz takich cech składnika, jak siła interakcji z innymi składnikami matrycy, hydrofobowości/hydrofilności składnika, powinowactwa do rozpuszczalnika (zwykle do fazy wodnej), a także stabilności w obecności enzymów. Ważną rolę spełnia także obróbka technologiczna matrycy w czasie procesów przetwórczych oraz warunki panujące w przewodzie pokarmowym. W przypadku leków składnik aktywny jest często zakapsułkowany lub związany z nośnikiem, co wiąże się z koniecznością rozpuszczenia kapsułki/nośnika w żołądku lub w jelitach. Dotychczasowa wiedza wskazuje, że biodostępność danego składnika jest różna w zależności od rodzaju produktu, który go zawiera, oraz sposobu obróbki technologicznej i kulinarnej. Przykładowo, biodostępność β -karotenu z surowców roślinnych jest niska, zwykle nie przekracza kilkunastu procent, tymczasem po doprawieniu warzyw sosem sałatkowym zawierającym oleje roślinne, znacznie wzrasta. Absorpcji jelitowej mogą podlegać tylko te składniki, które zostały uwolnione (wyekstrahowane) z matrycy. Sytuację komplikuje niekiedy dodatkowo konkurencja w procesie wchłaniania między poszczególnymi składnikami uwolnionymi z matrycy. Przykładem może być konkurencja między jonami metali.

Efektywność działania środków farmakologicznych i żywnościowych zależy w dużym stopniu od ich biodostępności. Badania biodostępności są jednak trudne, gdyż nie ma możliwości bezpośredniej obserwacji wnętrza jelit, a pobieranie próbek do analiz w sposób nieinwazyjny jest trudne i ograniczone. W większości przypadków stosuje się pobieranie próbek krwi, a sama analiza, z uwagi na małe stężenia badanych substancji, ich zanieczyszczenie innymi, często podobnymi związkami chemicznymi, i ich szybki metabolizm, jest bardzo utrudniona. W badaniach nad biodostępnością najbardziej miarodajnym źródłem informacji są dane uzyskane w badaniach *in vivo* na człowieku. Badania takie są jednak poważnie ograniczone wieloma czynnikami i wymagają zgody komisji etycznych. Podobne ograniczenia występują również w badaniach modelowych prowadzonych przy użyciu zwierząt

doświadczalnych. Trudności pogłębia fakt, że jak dotąd brak jest gatunku zwierząt, które mogłyby być uznane jako pełny, fizjologiczny odpowiednik człowieka (1). W związku z tym poszukiwane są uproszczone modele do badań *in vitro*, które możliwie wiernie odtwarzają warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Do największych osiągnięć nad modelowaniem wchłaniania składników żywnościowych i leków należy sztuczny przewód pokarmowy opracowany przez holenderską Organizację Stosowanych Badań Naukowych (TNO; www.tno.nl), imitujący perfekcyjnie proces trawienia pokarmów. Aparatura ta potrafi odtworzyć sekrecję soków żołądkowych i jelitowych, dozowanie wydzielin gruczołów związanych z przewodem pokarmowym (sok trzustkowy, żółć), wchłanianie strawionych składników przez ściany jelit oraz ruchy perystaltyczne jelit. Model ten jest jednak bardzo drogi, stąd w licznych laboratoriach stosowane są uproszczone wersje sztucznego przewodu pokarmowego w formie reaktorów do inkubacji produktów spożywczych lub leków w roztworach enzymów i soli żółciowych, niekiedy zakończone fermentorami zawierającymi mikroflorę jelitową, a następnie poddanych wchłanianiu w warunkach *in vitro*. Aktualnie coraz większą rolę w badaniach nad biodostępnością substancji chemicznych odgrywają kultury komórkowe. Opanowanie hodowli ludzkich enterocytów *in vitro* pozwoliło na szczegółowe studia nad ich fizjologią i doprowadziło do zastosowania uzyskanych linii jako modeli w badaniach nad transportem transnabłonkowym.

Popularność nabłonkowych linii komórkowych w studiach nad transportem transnabłonkowym wynika przede wszystkim z szybko uzyskiwanych i możliwych do uogólnienia informacji uzyskiwanych przy zastosowaniu tego relatywnie prostego modelu doświadczalnego. Należy przy tym podkreślić, że dane otrzymane w oparciu na doświadczeniach przeprowadzonych na modelu kultur komórkowych nabłonka jelitowego *in vitro* pozwoliły na uzyskanie informacji na temat mechanizmów aktywnego i biernego transportu substancji chemicznych. Wiele danych wskazuje, że istnieje korelacja między biernym transportem leków przez nabłonek jelitowy *in vitro* a transportem tych substancji przez ścianę jelit *in vivo* (2). W branży farmaceutycznej model kultur nabłonkowych *in vitro* został zautomatyzowany i jest szeroko wykorzystywany jako metoda badania szybkości transportu różnych substancji chemicznych do organizmu człowieka.

Przedmiotem artykułu, jest aktualny stan wiedzy na temat modeli kultur tkankowych nabłonka jelitowego stosowanych do badania wchłaniania składników żywności oraz leków.

2. Podstawowe linie komórek nabłonka jelitowego

Początek badań nad hodowlami komórek nabłonkowych sięga lat siedemdziesiątych, natomiast główny rozwój miał miejsce w latach 80-90. ubiegłego wieku. W celu uzyskania ciągłych linii komórkowych wykorzystano różnicowanie komórek

złośliwych nowotworów jelita grubego w komórki zbliżone morfologicznie i fizjologicznie do prawidłowych enterocytów pod wpływem czynników indukujących różnicowanie, jak maślan sodu, dimetylosulfotlenek lub galaktoza (3-7). Różnicowanie komórek nowotworowych może także zachodzić samorzutnie w długotrwałych hodowlach (7). Komórki pobrane z guzów jelit mogą się przekształcać do form o morfologii identycznej z enterocytami. Posiadają one dobrze wykształcony rąbek szczoteczkowy oraz produkują takie enzymy, jak alkaliczna fosfataza, sacharaza i aminopeptydaza (8,9). Należy podkreślić, że wszystkie aktualnie stosowane linie komórkowe nabłonka jelitowego wywodzące się z gruczolakoraków jelita grubego (adenocarcinoma). Zaliczane są one pod względem bezpieczeństwa biologicznego do klasy II i wymagają odpowiednich procedur przy ich hodowli i przechowywaniu oraz odpowiednio wyposażonych laboratoriów, m. in. w komory laminarne kl. II.

W liniach komórkowych nabłonka jelitowego szybka proliferacja następuje po krótkim, dwudobowym okresie fazy spoczynkowej i, przy inoculum na poziomie 10^5 komórek/cm² butelki, uzyskuje się po tygodniu pełne pokrycie powierzchni butelki hodowlanej, zaś między pierwszym a drugim tygodniem kultura wchodzi w stacjonarną fazę wzrostu. Przy odpowiednio częstych wymianach pożywki można utrzymać kulturę enterocytów przez miesiąc. Pod koniec hodowli monowarstwa komórkowa odzepia się od podłoża głównie przy krawędziach zajmowanej powierzchni.

Pierwszy etap tworzenia rąbka szczoteczkowego polega na uformowaniu monowarstwy spolaryzowanych komórek, między którymi tworzą się międzykomórkowe połączenia. Równolegle tworzą się zagęszczenia komórek, które pokrywają się mikrokosmkami. Te ostatnie zawierają filamenty zbudowane z białka aktyny (10). U komórek enterocytopodobnych (np. linia Caco-2) mikrokosmki występują w dwóch postaciach morfologicznych: połowa komórek ma kosmki rozłożone równomiernie w formie kobierca, natomiast druga połowa pokryta jest zbitkami kosmków układających się w formy przypominające kwiaty, w których poszczególne kosmki, jak się wydaje, łączą się w ich górnej części (7). W pierwszym okresie, w czasie pokrywania danej powierzchni przez kulturę enterocytów tworzone są kopulaste zagęszczenia komórek sięgające nawet ponad 100 jednostek na każdy cm², a w późniejszych stadiach kultury zmniejszające swą liczebność do połowy. Kopulastych zagęszczeń nie spotyka się natomiast w kulturach, w których obok enterocytów znajdują się komórki kubkowe, np. w linii HT-29. Komórki tej linii nie tworzą także charakterystycznych kosmków. Przypuszcza się, że wyjątkowa zdolność linii Caco-2 do tworzenia rąbka szczoteczkowego wiąże się z podobieństwem tych komórek nowotworowych do komórek płodowych. Długotrwałe prowadzenie kultur nabłonkowych ma również swoje ograniczenia. W miarę postępujących pasażów hodowane komórki coraz bardziej odbiegają od wyjściowego fenotypu. Widoczne są duże zmiany w morfologii i biochemii tych komórek.

Linie komórkowe wyprowadza się również z eksplantów prawidłowych tkanek pobranych z organizmu człowieka. Wycinki jelit poddaje się procesowi niszczenia struktury tkankowej bądź mechanicznie przez delikatną homogenizację, bądź enzy-

matycznie przez hydrolizę za pomocą trypsyny. Po oddzieleniu pojedynczych komórek od resztek tkanki dodaje się antybiotyki w celu zapobieżenia zakażeniom hodowli. Pierwsze kolonie komórek tworzą tzw. kulturę pierwotną w formie warstwy komórek przyczepionych do ścian naczynia hodowlanego. Kultura pierwotna przekształca się w kulturę diploidalną po 2-3 pasażach na świeżej pożywce. Charakteryzuje się ona tym, że ponad 75% komórek posiada identyczny kariotyp z komórkami tego gatunku, z którego się wywodzą. Jednocześnie komórki takie posiadają diploidalną liczbę chromosomów. Taka forma komórek jest uważana za normalną. W kolejnych pasażach linia diploidalna wykazuje stały, równomierny wzrost. W pierwszych pasażach komórki diploidalne zachowują swoją pierwotną, nabłonkową morfologię, jednak po kolejnych pasażach tracą zdolność przyczepiania się do powierzchni, a ich wzrost jest hamowany przy dużych gęstościach komórek. Zwykle po kolejnych 50 generacjach (liczba Hayflicka) komórki diploidalne samoistnie giną lub ulegają transformacji nowotworowej i przekształcają się w kulturę ciągłą. Charakterystyczną cechą linii ciągłych (ustalonych) jest zdolność do nieustannego rozmnażania się w kolejnych pasażach. Za ustaloną linię przyjmuje się taką, którą pasażowano powyżej 70 razy. Należy podkreślić, że linie komórkowe stosowane w laboratoriach mają charakterystykę zależną od liczby pasaży. Zwykle linie pozyskane z renomowanych kolekcji są sprzedawane po 20-40 pasażach, jednak w badaniach stosowane są nawet takie linie, których liczba pasaży znacznie przekracza 100. Do najbardziej znanych linii ciągłych ludzkiego nabłonka jelitowego należą Caco-2 i HT-29 (tab.).

Tabela

Charakterystyka linii ludzkich komórek nabłonkowych jelit

Nazwa linii	Pochodzenie	Charakterystyka	Kolekcja
1	2	3	4
Caco-2	gruczolakorak jelita grubego 72-letniego mężczyzny	Wzrost adherentny. Dobrze zróżnicowana. Wykorzystywana do badania adhezji bakterii jelitowych, transportu transmembranowego, studiów nad inwazją patogenów bakteryjnych	ATCC (USA) DSMZ (Niemcy) LGC (W. Brytania)
HT-29	gruczolakorak jelita grubego 44-letniej kobiety	Wzrost adherentny. Nie tworzą rąbka szczoteczkowego. Składnik sekrecyjny, antygen karcino-embryonowy. Wytwarzają śluz jelitowy. Wykorzystywane głównie do badania adhezji bakterii jelitowych oraz mniej do badania transportu	ATCC (USA) DSMZ (Niemcy)
T84	gruczolakorak (adenocarcinoma)	Morfologia podobna do komórek krypt jelitowych. Wzrost adherentny, 2-3 warstwowy, tworzą rąbek szczoteczkowy. Wykorzystywana do badania adhezji białek pokarmowych	ATCC (USA)
MDCK	nabłonek psich nerek	Wzrost adherentny. Niska ekspresja systemu wydalniczego. Systemy ekspresyjne dla białek transportowych. Stosowana do badania transportu leków	ATCC (USA) ECACC

1	2	3	4
IEC-18	nabłonek jelita szczura, pochodzący z krypt jelitowych	Wzrost adherentny. Stosowana szczególnie do badania transportu pasywnego substancji hydrofilowych. Mniejsze zagęszczenie komórek w monowarstwie. Lepsza przepuszczalność niż Caco-2	ATCC (USA)
2/4/A1	nabłonek jelita płodu szczura	Wzrost adherentny. Mniejsze zagęszczenie komórek w monowarstwie. Najlepiej imituje przepuszczalność jelita człowieka	brak depozytu

2.1. Caco-2

Od lat dziewięćdziesiątych XX w. najczęściej stosowaną linią komórkową w badaniach nad transportem transnabłonkowym jest Caco-2. Została ona wyizolowana z guza nowotworowego jelita grubego 72-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Jest to ustalona linia gruczolakoraka jelita grubego. Wykazuje ona zdolność do wzrostu adherentnego na powierzchniach stałych i na mikroporowatych membranach. W czasie hodowli przechodzi proces spontanicznego różnicowania się. Po 2-3 tygodniach hodowli tworzy monowarstwę wysoko spolaryzowanych komórek, o budowie typowej dla enterocytów, z jądrem umiejscowionym w części podstawnej, licznymi mitochondriami i rąbkim szczoteczkowym w części szczytowej. Dzięki tej budowie jest używana jako modelowa linia enterocytów w kulturach *in vitro*. Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy disacharydazy, peptydazy, izoenzymy CYP450, transferazę-S-glutationową, sulfotransferazę i glukuronidazę oraz białka transportowe, wytwarzane przez komórki absorbujące nabłonka, biorące udział w transporcie cukrów, aminokwasów, peptydów i witamin. Wytwarza także P-glikoproteinę oraz białka oporności wielolekowej, związane z transportem leków. Ponadto komórki tej linii produkują na swej powierzchni od strony apikalnej niewielkie ilości śluzu jelitowego. Linia ta jest przechowywana w amerykańskiej kolekcji ATCC-American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>) pod numerem katalogowym HTB-37, w kolekcji niemieckiej DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) pod numerem: ACC, 169 oraz w kolekcji europejskiej European Collection of Cell Cultures (ECACC) (<http://www.ecacc.org>) pod numerem katalogowym 86010202. Z uwagi na swoje podobieństwo morfologiczne i funkcjonalne jest uważana za odpowiednik enterocytów jelita cienkiego *in vivo*, stąd jest główną linią komórkową stosowaną w badaniach biodostępności. W zasadzie przyjmuje się, że do badań nad transportem transnabłonkowym stosuje się kultury 21-dniowe, które wykazują pełne zróżnicowanie i pełne pokrycie (konfluencję) powierzchni. Warto jednak podkreślić, że w literaturze można znaleźć opisy kultur o przyspieszonym wzroście, nawet poniżej 1 tygodnia (<http://www.bd.com/labware>) (11-13).

2.2. HT-29

Linia HT-29 została wyizolowana z gruczolakoraka jelita grubego 44-letniej kobiety. Można ją pozyskać z kolekcji ATCC (linia HBT-38) oraz DSMZ (linia ACC 299). W kulturach *in vitro* wykazuje morfologię typową dla komórek nabłonkowych, jednak nie różnicuje się do form tworzących rąbek szczoteczkowy. Dużą część populacji komórek HT-29 stanowią komórki kubkowe, stąd linia ta tworzy duże ilości śluzu jelitowego. Szczególnie intensywną produkcją śluzu odznacza się mutant HT-29 MTX. W ultrastrukturze komórkowej tej linii można wyróżnić mikrokosmki, mikrofilamenty, mitochondria zawierające ciemne granule, siateczkę śródplazmatyczną z wolnymi rybosomami, krople tłuszczu i dużą liczbę lizosomów. Z uwagi na cechy morfologiczne i funkcjonalne linia ta może być uznana jako reprezentatywną dla nabłonka jelita grubego. Komórki HT-29 wytwarzają receptor dla urokinazy i witaminy D, lecz nie mają receptora dla aktywatora plazminogenu. Zawierają mutację w genomie liczne onkogeny, jak MYC^+ , RAS^+ , MYB^+ , FOS^+ oraz $p53^+$. W genie *p53* stwierdzono mutację $G \rightarrow A$, co spowodowało zamianę w białku argininy na histaminę. Stwierdzono także nadprodukcję antygenu *p53*. Linia HT-29 posiada szereg izoenzymów: Me-2,1; PGM3, 1-2; PGM1, 1-2; ES-D, 1; AK-1,1; GLO-1, 1-2 i G6PD, B (<http://www.atcc.org>), i wykazuje wrażliwość na wirusy HIV i LAV.

2.3. MDCK i LLC PK1

Linie te zostały wyizolowane z nabłonka psich nerek i odznaczają się niską ekspresją systemu wydalniczego, szczególnie niską endogenną ekspresją białek transporterowych. Umożliwia to selekcję komórek produkujących transportery ABC. Linia ta jest wykorzystywana do badania transportu leków.

2.4. IEC-18

Linia IEC-18 jest linią nabłonkową, która została wyprowadzona z krypt jelita cienkiego szczura. W porównaniu z linią Caco-2 charakteryzuje się słabszym zróżnicowaniem i luźniejszą strukturą monowarstwy komórkowej. Posiada znacznie mniejszą wartość transmembranowej oporności elektrycznej (TEER, ang. *transepithelial electric resistance*), przy czym TEER dla IEC-18 jest bardzo zbliżony do TEER jelita cienkiego szczura. Rośnie bardzo dobrze na porowatych membranach poliwęglanowych (Mostar) w pożywce DMEM z 5% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej. Jest bardzo dobrym modelem do badania transportu pasywnego substancji hydrofilowych przez przestrzenie międzykomórkowe. Posiada także mechanizmy dla transportu aktywnego oraz system wydzielania związany z glikoproteiną P-gp oraz z ro-

dziną białek oporności wielolekowej. Odznacza się szybszym transportem znakowanego mannitolu i PEG-4000 niż Caco-2.

2.5. 2/4/A1

Linia 2/4/A1, wyizolowana z jelit płodu szczura, najlepiej z wszystkich linii komórkowych imituje przepuszczalność ludzkiego nabłonka jelitowego, szczególnie w zakresie trykomórkowego transportu pasywnego. Ma ona znacznie luźniejszą strukturę monowarstwy niż linia Caco-2. Maksymalna wartość TEER, jaką osiąga dojrzała kultura, nie przekracza $50 \Omega\text{cm}^2$, a zatem pięciokrotnie mniej niż dla Caco-2. Posiada ona typową morfologię enterocytów, z rąbkami szczoteczkowym produkującym enzymy membranowe. Średnica por w monowarstwie komórkowej wynosi ok. 9 \AA , a zatem podobnie jak to ma miejsce u człowieka. Szybkość transportu mannitolu i kreatyniny jest identyczna jak w jelicie czczym człowieka i około 300 razy większa niż dla Caco-2.

3. Metody hodowli

Wszystkie linie nabłonkowe są kulturami przyczepno-zależnymi. Oznacza to, że ich wzrost odbywa się na powierzchni ciał stałych, co wymaga stosowania odpowiednich naczyń hodowlanych. Najczęściej wykorzystuje się do tego celu płaskie butelki plastikowe (T-butelki) lub płytki wielodołkowe. Do hodowli linii Caco-2 stosowana jest minimalna pożywka Eagle'a w modyfikacji Dulbecco, z dodatkiem nieegzogennych aminokwasów (MEM) i 10% płodowej surowicy cielęcej (14). Pożywka ta zawiera czterokrotnie podwyższoną zawartość aminokwasów i witamin oraz wysokie stężenie glukozy sięgające $4,5 \text{ g/L}$. W celu zabezpieczenia kultury przed zakażeniem mikrobiologicznym dodawane są antybiotyki (np. $0,1 \text{ mg/ml}$ streptomycyny, 100 jednostek penicyliny). Dla hodowli komórek HT-29 stosowana jest najczęściej pożywka McCoy'a 5A (90%) i płodowa surowica bydlęca (10%). Należy pamiętać, że do przygotowania wszystkich pożywek stosowanych w kulturach komórkowych stosuje się wyłącznie ultraczystą wodę.

W ostatnich latach zostały podjęte próby zastosowania pożywek bezsurowicznych. Wiąże się to z próbami obniżenia ceny pożywek, które stanowią większość ogólnych kosztów hodowli. Jedną z takich pożywek dostępnych komercyjnie jest pożywka Ultrosor G, IBF. Zwykle surowica jest zastępowana przez mieszaninę hydrokortizonu, transferryny, insuliny, etanoloaminy, selenitu i innych aktywnych składników.

Hodowle komórek nabłonkowych przeprowadza się w temperaturze 37°C w specjalnych inkubatorach z regulowaną atmosferą gazów tak, aby zawierały one 5% CO_2 , co imituje stężenie tego gazu we krwi. Inkubatory te są podłączone do butli

z dwutlenkiem węgla. We wnętrzu komory inkubacyjnej utrzymywana jest wilgotność >95%, co zabezpiecza kulturę przed wysychaniem. W nowoczesnych inkubatorach zainstalowane są systemy autosterylizacji. Osiąga się to bądź przez podgrzanie wnętrza komory do ponad 90°C, bądź przez zainstalowanie lampy UV sterylizującej cyrkulujące powietrze. Dodatkowym zabezpieczeniem jest wykonanie komory inkubacyjnej z blachy miedzianej. Praca z otwartymi naczyniami hodowlanymi powinna być prowadzona w komorach laminarnych z nawiewem pionowym, wyposażonych w filtry HEPA. Komory powinny spełniać wymogi bezpieczeństwa klasy II. Do pipetowania płynów zawierających kulturę komórkową należy stosować pipety automatyczne. Bezwzględnie należy unikać bezpośredniego kontaktu z kulturą.

Poważnym zagrożeniem kultur komórkowych są mykoplazmy. Stanowią one bezpośrednie zagrożenie dla badacza. Z tego powodu kultury komórkowe i stosowane do ich hodowli surowice powinny być systematycznie badane na obecność mykoplazm. Dodatkowym zabezpieczeniem powinno być stosowanie surowic nie zawierających czynnika wywołującego gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) i chorobotwórczych wirusów (specjalne atesty).

W celu pomiaru liczebności komórek i ich żywotności, konieczne jest odklejenie monowarstwy od powierzchni hodowlanej oraz rozerwanie wzajemnych połączeń między komórkami. W tym celu przeprowadza się trypsynizację. Polega ona na zlaniu z nad powierzchni monowarstwy zużytej pożywki oraz wprowadzenie roztworu trypsyny i kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA). Oba te składniki są rozpuszczone w roztworze soli buforowanych buforem fosforowym (PBS, ang. *phosphate-buffered saline*). Pod wpływem proteazy następuje rozpuszczenie kolagenu i uwolnienie pojedynczych komórek.

Opracowanie metod kultur *in vitro* przyniosło wiele korzyści: możliwe było bardziej szczegółowe badanie metabolizmu komórkowego w warunkach kontrolowanych, uzyskano szansę prowadzenia badań na tkankach ludzkich w ściśle kontrolowanych warunkach bez zwierząt doświadczalnych. Należy jednak podkreślić, że badania kultur *in vitro* mają istotne wady. W miarę postępujących pasażów hodowane komórki coraz bardziej odbiegają od wyjściowego fenotypu. Widoczne są duże zmiany w morfologii i biochemii tych komórek.

4. Oznaczanie biodostępności

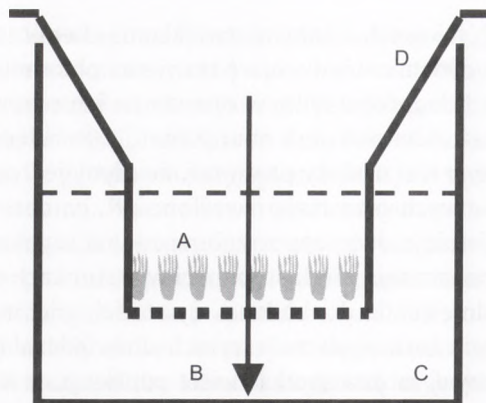
Ilościowe oznaczanie biodostępności jest bardzo trudne. Wymaga ono w pierwszym rzędzie skutecznych metod ekstrakcji określonych składników z matrycy w celu określenia ich zawartości. Na wynik analizy ma duży wpływ rodzaj użytego rozpuszczalnika. Do najczęściej stosowanych rozpuszczalników należą bufony, roztwory kwasów organicznych i nieorganicznych, roztwory alkoholi, DMSO, aceton oraz inne rozpuszczalniki. W warunkach naturalnych w jelicie człowieka podstawowym rozpuszczalnikiem jest woda wraz z rozpuszczonymi w niej solami nieorganiczny-

mi, solami kwasów żółciowych i innymi związkami chemicznymi, których rodzaj i stężenie zmienia się dynamicznie w miarę trawienia pokarmu. Badanie biodostępności poszczególnych składników tylko w oparciu na ich rozpuszczalności w „niefizjologicznych” rozpuszczalnikach jest obarczona dużym błędem i wykazuje słabą korelację z pomiarami *in vivo*. Należy pamiętać, że płyny jelitowe nie zawierają rozpuszczalników organicznych oraz mają określone pH, co determinuje rozpuszczalność składnika. Stąd istnieje duże zapotrzebowanie na szybkie, łatwe do standaryzacji i tanie metody oznaczania biodostępności w warunkach *in vitro*, tym bardziej, że szczególnie w odniesieniu do badania żywności, nie można przeprowadzić wszystkich niezbędnych testów na zwierzętach doświadczalnych i ludziach.

W literaturze naukowej można spotkać wiele publikacji, w których opisano biodostępność składników żywności i leków podawanych *per os*. Tymczasem tylko niektóre leki i witaminy są podawane w czystej formie. Cała żywność w codziennej diecie jest wprowadzana do przewodu pokarmowego w formie matrycy organicznej, o złożonym składzie chemicznym. Uwalnianie poszczególnych składników z matrycy zależy od takich czynników, jak pH w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego, obecność enzymów trawiennych i kwasów żółciowych oraz mikroflory jelitowej. Wszystkie wymienione czynniki mają decydujący wpływ na uwalnianie składników pokarmowych i ich dyfuzję do płynów jelitowych, oraz na ich wchłanianie przez ściany jelit do organizmu.

W praktyce nie ma możliwości bezpośredniego pomiaru stężenia danego składnika *in vivo* w różnych odcinkach jelit w określonej sekwencji czasowej, gdyż miejsca te są praktycznie niedostępne dla badacza. Pozostaje pomiar wybranych punktów końcowych, jak stężenie składnika w moczu, kale i krwi. Możliwe też jest wybranie pomiarów, które związane są z procesami wchłaniania tylko pośrednio, jak np. zmiany masy ciała. Podobne ograniczenia występują w badaniach na zwierzętach, choć w tym przypadku możliwe jest uśmiercenie zwierzęcia i szybkie zmierzenie koncentracji składnika w treści jelit i w płynach ustrojowych. Tego typu ograniczenia nie występują w badaniach modelowych *in vitro*. W tym przypadku możliwy jest dokładny pomiar w dowolnie wybranym czasie, a zatem istnieje możliwość znacznie dokładniejszego określania biodostępności i badania tego procesu w układzie dynamicznym. System Klasyfikacji Biofarmaceutycznej zaliczył model komórek nabłonkowych Caco-2 *in vitro* do standardowych metod określania biodostępności leków, w tym do określania biorównoważności leków (17).

Przed przystąpieniem do właściwych badań transportowych należy stwierdzić, czy badana substancja nie wykazuje toksycznego działania na kulturę enterocytów *in vitro* oraz czy nie powoduje odklejenia monowarstwy enterocytów od podłoża stałego. W tym celu przeprowadza się badania toksykologiczne, określając przeżywalność komórek w obecności danej substancji (np. test z bromkiem etydyny i oranżem akrydyny), integralność błony cytoplazmatycznej (test z barwnikiem błękitu trypanowego – trypan blue), aktywność mitochondriów (test MTT polegający na redukcji bromku 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-dofenylotetrazolowego do purpurowego formazanu) i inne parametry komórek.



Rys. 1. Schemat naczynka hodowlanego z monowarstwą enterocytów na powierzchni porowatej membrany. A – komora apikalna. B – komora podstawna (basolateralna). C – pożywka. D – wkładka z membraną.

W przypadku stosowania T-butelek w badaniach nad cytotoksycznością sprawdza się wizualnie spójność monowarstwy pod mikroskopem odwróconym obserwując dno T-butelki pokryte komórkami lub stosując mikroskop fluorescencyjny oraz markery fluorescencyjne wybarwiające jądra, białko łączące komórki ZO-1 (czerwień streptawidyn-Texas) lub aktynę (rodamina). Kultury w T-butelkach nie nadają się jednak do badania transportu transmembranowego.

W badaniach nad transportem transnabłonkowym stosuje się specjalne naczynia hodowlane zbudowane w formie zamkniętego, dwukomorowego pojemnika. Między górną a dolną komorą umieszczona jest poziomo porowata membrana, na której rozwija się kultura komórek nabłonkowych (rys. 1). Zarówno górna (apikalna) komora, jak i dolna (podstawna; basolateralna) wypełnione są pożywką hodowlaną. Półprzepuszczalne membrany stosowane jako nośnik do wzrostu przyczepno-zależnych komórek są wykonane z porowatych poliwęglanów, pochodnych celulozy, polistyrenu lub innych tworzyw sztucznych. W wielu przypadkach powierzchnie polimerów pokrywa się naturalnymi polimerami organicznymi, np. kolagenem I, III i IV, fibronektyną lub laminaryną. Najbardziej znanymi dostawcami naczyń hodowlanych i membran są firmy Corning Mostar, Millipore, NUNC i Beton Dickinson. Najpopularniejszymi naczyniami tego typu są wielodołkowe płytki Transwell firmy Costar oraz Millicell firmy Millipore o porowatości membran 0,4 μm . Naczynka hodowlane, tzw. dołki, mają średnicę 12-24 mm, a objętość pożywki nad i pod membraną wynosi 0,5-3 ml.

Dla zapoczątkowania wzrostu enterocytów powierzchnię membrany umieszczonej w naczyniu hodowlanym inokuluje się komórkami enterocytów o ilości $1 \div 5 \times 10^5/\text{cm}^2$ i hoduje w pożywce DMEM, która znajduje się po obu stronach membrany. Pożywka ta ma zwykle pH 7,4, choć niektórzy badacze stosują gradient pH,

regulując jego wartość po stronie apikalnej na 6,5, a po stronie podstawnej na 7,4, co lepiej symuluje warunki *in vivo*. Naczynie hodowlane umieszcza się na wytrząsarce dla równomiernego wymieszania pożywek w obu komorach naczynia hodowlanego.

Przy pomiarze szybkości transportu transnabłonkowego podstawową rolę odgrywa spójność monowarstwy. Jakiegokolwiek uszkodzenia i nieszczelności powodują „przeciek” między częścią apikalną a podstawną i tym samym uniemożliwiają prawidłowy pomiar transportu danej substancji. Do zagadnienia tego przykłada się bardzo dużą wagę i szczelność monowarstwy komórek nabłonkowych jest badana przed i po każdym eksperymencie. Ocenę spójności monowarstwy komórkowej przeprowadza się na podstawie pomiarów:

- zmian transmembranowej oporności elektrycznej (TEER) pożywki między komorą nad membraną i pod membraną za pomocą specjalnej mikroelektrody (Millicell ERS firmy Millipore lub EVOM firmy WPI),

- szybkości transportu znakowanych radioaktywnie, niskocząsteczkowych, hydrofilnych substancji markerowych, jak ^{14}C lub ^3H -mannitol, ^{14}C -inulina, ^{14}C -glikol polietylenowy i ^3H -dextran, przez warstwę enterocytów.

Wartość TEER wynosi zwykle powyżej $250 \Omega\text{cm}^2$, jednak wartość ta jest cechą charakterystyczną dla danej linii komórkowej. Według Delie i Rubas (18) wartość TEER dla komórek nabłonka jelitowego może wahać się od 62 do $1290 \Omega\text{cm}^2$. Ciekawych danych dostarczyły badania Walter i Kissel (19), w których stosowano trzy różne linie Caco-2, różniące się miejscem, z którego je pozyskano, liczbą pasaży oraz nośnikiem, na którym były hodowane. Wykazano, że te same komórki Caco-2 mogą wykazywać znaczące różnice we właściwościach, takich jak wartość TEER, przepuszczalność, kinetyka wzrostu, przeżywalność i morfologia. Duży wpływ na wartość TEER ma także liczba pasaży danej linii komórkowej. Przykładowo TEER dla pasażów 30-40 dla Caco-2 wynosi ok. $350 \Omega\text{cm}^2$, natomiast dla pasażów 90-105 wynosi $200\text{-}250 \Omega\text{cm}^2$ (2). TEER zależy także od temperatury i można dostrzec wyraźne zmiany po przejściu od temp. 37°C do temperatury pokojowej. Hildago i in. (8) badali transnabłonkową oporność elektryczną membran pokrytych kolagenem i bez kolagenu. Stwierdzili oni, że wartość oporności w poprzek membrany poliwęglanowej pokrytej kolagenem wynosi $30\text{-}60 \Omega$, natomiast bez kolagenu $5\text{-}10 \Omega$, co świadczy o małej oporności warstwy kolagenowej.

Bardzo skutecznym sprawdzianem szczelności monowarstwy i jej właściwości transportowych jest test ze znakowanym ^{14}C -mannitolem. Jako substancja hydrofilowa nie przechodzi on przez fosfolipidowe błony komórkowe, lecz wyłącznie przez połączenia międzykomórkowe. Jest to typowy przykład transportu pasywnego. Jeżeli połączenia międzykomórkowe są nieszczelne obserwuje się szybki transport mannitolu. W miarę coraz lepszego pokrycia membrany komórkami szybkość transportu mannitolu wyraźnie maleje. Przy dobrze uformowanej monowarstwie jego transfer powinien wynosić ok. $1\div 2 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$. Hildago i in. (8) badali transfer żółcieni lucyferazowej i inuliny. Autorzy ci stwierdzili, że zmniejszenie transferu

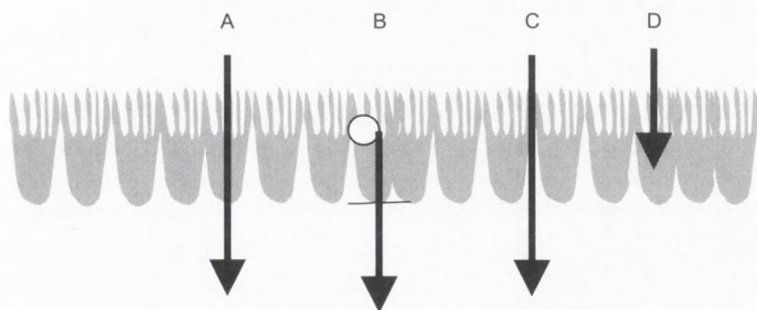
tych związków między pierwszym a dziesiątym dniem wyniosło odpowiednio 160 i 340 razy. Dane te świadczą o postępującej integracji monowarstwy wynikającej z zagęszczenia i wzajemnych powiązań między komórkami enterocytów.

Do badania szczelności monowarstwy można także wykorzystać metody pośrednie, np. mikroskopię fluorescencyjną. W tym przypadku komórki wybarwia się markerem barwiącym jądra komórkowe lub aktyne. Najczęściej stosowany jest preparat faloidyny znakowany rodaminą.

Stwierdzenie jakiegokolwiek nieszczelności eliminuje w praktyce daną kulturę z dalszych badań. Obowiązuje zasada, że monowarstwa powinna być spójna bezpośrednio przed wykonaniem eksperymentu transportowego oraz po jego zakończeniu, stąd pomiar TEER powinien być wykonany co najmniej dwukrotnie: przed i po pomiarze transportu (biodostępności), bądź monitorowany w sposób ciągły. Po osiągnięciu pełnej konfluencji przystępuje się do właściwych eksperymentów transportowych. W tym celu usuwa się zużytą pożywkę hodowlaną znaną monowarstwy komórkowej i wprowadza w jej miejsce badaną substancję rozpuszczoną w zrównoważonym roztworze soli Hanka (HBSS, ang. *Hank's Balanced Salt Solution*; firmy Life Technologies). W jej skład wchodzi mieszanina soli Hanka bez czerwieni fenolowej, diwęglan sodowy (Na_2CO_3) oraz bufor HEPES (10 mM; pH = 7,4; Sigma). Jest to typowe medium do badań nad transportem transnabłonkowym z użyciem monowarstwy enterocytów. W ostatnich latach podjęto poszukiwania innych roztworów stosowanych do nanoszenia na powierzchnię monowarstwy badanych substancji. Dressman i Reppas (20) zaproponowali nowe medium, w skład którego weszły taurocholan sodowy, lecytyna, kwaśny fosforan jednosodowy, NaCl i NaOH (pH 6,5). Ingels i in. (21) wykazali, że medium to jest alternatywą dla roztworu Hanka jako wypełnienie komory podawczej nad membraną pokrytą komórkami nabłonkowymi, do której wprowadzana jest badana substancja.

Transport badanych substancji przez monowarstwę enterocytów może się odbywać przez wnikanie do wnętrza komórek bezpośrednio lub za pomocą specjalnych transporterów, które uczestniczą w tzw. aktywnym transporcie, względnie może się dokonywać przez przestrzenie międzykomórkowe w formie transportu pasywnego (rys. 2). Pewna część wchłanianej substancji może być zaabsorbowana przez komórki i kumulowana lub metabolizowana w warstwie nabłonkowej, zmniejszając tym samym ilość składnika przechodzącego do komory podstawnej.

Dla określenia czy dany transport jest aktywny czy pasywny prowadzi się badanie transportu w dwóch kierunkach A-B i B-A. Przy transporcie pasywnym wartość współczynnika przenikalności pozornej (zdefiniowanego poniżej) jest niezależna od kierunku transportu. Ważnych informacji dostarczają eksperymenty, w którym skokowo zwiększa się stężenie składnika w komorze podawczej. W przypadku transportu pasywnego zmiana stężenia nie ma wpływu na wartość współczynnika przenikalności pozornej, podczas gdy w transporcie aktywnym następuje wyraźna zmiana wartości współczynnika po zmianie stężenia składnika. Innym sposobem na rozróżnienie charakteru transportu jest prowadzenie testu w różnych temperaturach. Je-



Rys. 2. Schemat transportu substancji przez warstwę komórek nabłonkowych *in vitro*. A – bezpośredni transport transkomórkowy. B – transport transkomórkowy za pomocą nośnika/transportera. C – transport międzykomórkowy. D – akumulacja składnika wewnątrz komórki lub rąbka szczoteczki.

zeli substancja przenika przez monowarstwę komórkową w temperaturze 4°C to mamy do czynienia z transportem pasywnym, natomiast przenikanie w temperaturze 37°C, przy jednoczesnym braku lub małym przenikaniu przy 4°C, świadczy o transporcie aktywnym. W tym ostatnim typie transportu biorą udział białka transportowe odpowiedzialne za wchłanianie witamin, kwasów żółciowych, aminokwasów, nukleozydów i di/tripeptydów. Transport aktywny zależy wyraźnie od temperatury, stężenia składnika i pH buforu transportowego HBSS. Dla potwierdzenia aktywnego charakteru transportu można wykorzystywać także testy opierające się na inhibicji białek transportowych lub inhibicji ogólnego metabolizmu komórki (np. przez dodanie azydku sodu i 2-deoksyglukozy). Badania te mają jednak wady, gdyż brak jest specyficznych inhibitorów hamujących wyłącznie pojedyncze białka transporterowe. W ostatnich latach zintensyfikowano bardzo prace nad P-glikoproteiną (P-gp), pełniącą podstawową rolę w wydalaniu różnych substancji i współdziałającą z enzymem P-450 3A5. Aktualnie niektórzy dostawcy oferują znakowane inhibitory, przykładowo glikozylsarkocynę dla transportera peptydów Pep T1, verampil dla transportowego białka P-gp, i dipyridamol dla transportera nukleozydów. Dostępne są też inhibitory P-gp, np. LY335984. W przypadku stosowania inhibitorów systemów transportu lub wydalania dodaje się je do obu komór – podawczej (np. apikalnej) i odbiorczej, do której badana substancja przechodzi (np. podstawnej).

Podstawową metodą pomiaru wchłaniania poszczególnych substancji chemicznych jest analiza chromatograficzna (chromatografii gazowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV), niekiedy połączona ze spektrometrią masową, niezbędną do identyfikacji pochodnych lub produktów metabolizmu badanych substancji. Ważną rolę spełniają także techniki immunochemiczne i znakowanie radioaktywne. Szybkość wchłaniania ocenia się na podstawie bilansu materiałowego transferu substancji przez monowarstwę komórkową. W tym celu, w określonych odstępach czasu, zwykle, co 10-30 min, pobiera się próbkę z komory, do której

przemieszcza się substancja i poddaje analizie. Warto pamiętać, że składniki hydrofilne wchłaniane są znacznie szybciej niż hydrofobowe, co powinno być uwzględnione przy wyznaczaniu częstotliwości pobierania próbek. W komorze, z której pobrano próbkę uzupełnia się płyn przez dodanie takiej samej objętości świeżego, ogrzanego roztworu HBSS.

Analiza ilościowa może być utrudniona przez małe stężenia dyfundujących składników, szczególnie przy badaniu mikroskładników żywności lub niektórych leków podawanych w niskich stężeniach. Zadanie to jest często tym bardziej skomplikowane, że wiele składników, np. związki mineralne, jest wchłaniane w formie związanej z innymi składnikami, co maskuje ich bezpośrednią obecność w roztworze.

Do charakterystyki procesu wchłaniania w modelach monowarstwy nabłonka jelitowego wykorzystuje się najczęściej określenie kinetyki transferu składnika w ciągu 120-360 minut i na tej podstawie oblicza współczynnik przepuszczalności pozornej (22):

$$P_w = V/A C_0 dC/dt \text{ [cm sek}^{-1}\text{]},$$

gdzie :

V – objętość pożywki po stronie, do której składnik przechodzi (cm^3), A – powierzchnia membrany (cm^2), C_0 – początkowe stężenie składnika po stronie, do której składnik wprowadzono ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$), dC/dt – wzrost stężenia w czasie po stronie odbierającej składnik ($\mu\text{g sek}^{-1}$).

Wynik oznaczenia podaje się jako średnią, z co najmniej sześciu pomiarów. Różnice w P_w między kierunkami dyfuzji lub między różnymi składnikami szacuje się na podstawie testu t-Studenta przy poziomie istotności $P < 0,05$. Szeroki opis metodyki obliczania współczynnika przepuszczalności pozornej przedstawiają w swojej pracy Tavelin i in. (2). W badaniach nad transportem danej substancji uwzględnia się zwykle dyfuzję dwukierunkową – od strony apikalnej do podstawnej ($A \rightarrow B$) oraz od strony podstawnej do apikalnej ($B \rightarrow A$).

Jednym z podstawowych zagadnień związanych z badaniem transportu leków jest ich słaba rozpuszczalność w fizjologicznych buforach, w tym w HBSS. Ze względów analitycznych, dla leków szybko wchłanianych stężenie składnika powinno wynosić 0,1-1 mM, natomiast dla leków trudno wchłanianych – 5-10 mM. Przy takich stężeniach wykrycie aktywnego składnika w buforze nie następuje większych trudności. W przypadku składników hydrofobowych konieczne jest ich rozpuszczenie w rozpuszczalnikach organicznych, zwykle w roztworze DMSO lub w etanolu. Oba wymienione rozpuszczalniki w większych stężeniach są jednak toksyczne, stąd stężenie DMSO nie powinno przekraczać 0,1% (v/v), a etanolu 1% (v/v). Dużą liczbę danych na temat rozpuszczalników stosowanych do badania transportu leków przez monowarstwę komórek Caco-2 dostarczyli Takahashi i in. (23). Autorzy ci zastosowali 3- i 21-dniową kulturę komórek Caco-2. Wykazali, że nawet przy małych stęże-

niach, glikol propylenowy, hydroksypropylo- β -cyklodekstryna i glikol polietylenowy 400 hamują wzrost 3-dniowej kultury, co wyklucza stosowanie tak młodej hodowli w testach nad biodostępnością. Użycie 20% glikolu propylenowego, 5% Tweedu 80, 5%, PEG 400, 5% hydroksypropylo- β -cyklodekstryny i mieszaniny 5% Tweed 80 + 5% PEG 400 nie miały wpływu na 21-dniową kulturę komórek Caco-2, ani na współczynnik przepuszczalności pozornej i w związku z czym wszystkie wymienione rozpuszczalniki mogą być z powodzeniem wykorzystywane do rozpuszczania trudno rozpuszczalnych w wodzie substancji. Dla sprawdzenia czy dany składnik jest toksyczny zaleca się także przeprowadzenie badania nad transportem znakowanego mannitolu, stosując pożywkę bez dodatku składnika i z dodatkiem składnika. Tego typu test jest czulszy niż badanie cytotoksyczności przy użyciu testu MTT lub dehydrogenazy mleczanowej.

Ważną rolę odgrywa także powinowactwo badanej substancji do powierzchni plastikowych naczyń hodowlanych i porowatej membrany. W praktyce zaleca się wprowadzenie dodatkowo 0,1 mM nieznakowanego składnika do składnika znakowanego, aby zrekompensować straty wynikające z adsorpcji na powierzchni naczynia. Zakres adsorpcji składnika powinien być uprzednio precyzyjnie oznaczony ilościowo.

Dla zapewnienia właściwych warunków pomiaru należy także pamiętać o zachowaniu odpowiednio dużego gradientu stężeń między komorą, do której podano lek, a komorą, do której lek przechodzi. Zwykle stężenie w komorze odbiorczej nie powinno być większe niż 10% stężenia wprowadzonego do komory podawczej. Przy zachowaniu tego warunku wykres wartości współczynnika przenikalności pozornej w funkcji czasu jest liniowy. Od tej zależności mogą być jednak odstępstwa wynikające z wolniejszego lub szybszego transferu składnika w pierwszym okresie badania, względnie wskutek zmniejszenia integralności monowarstwy i zwiększenia jej przepuszczalności w miarę upływu czasu.

5. Ograniczenia i wady modelu *in vitro*

Model komórek Caco-2, mimo powszechnego stosowania, ma szereg istotnych wad (24). Linie komórkowe nabłonka jelitowego zostały wprowadzone głównie jako model do badania transportu pasywnego leków. Znacznie mniejsza ekspresja genów dla białek transportowych w komórkach Caco-2, w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem jelitowym, powoduje, że przy badaniu transportu aktywnego wyniki znacznie odbiegają od rezultatów uzyskanych w badaniach *in vivo*. Dodatkowym utrudnieniem jest zmienna ekspresja białek transportowych, które komórki Caco-2 normalnie produkują.

Monowarstwa Caco-2 odznacza się także znacznie większym zagęszczeniem w porównaniu z nabłonkiem *in vivo*. Gęstość monowarstwy jest przy tym cechą klonalną, to znaczy jest różna w kulturach wyprowadzonych z poszczególnych komó-

rek należących do tej samej linii Caco-2. Różnice między przepuszczalnością manitolu między poszczególnymi kulturami Caco-2, w zależności od ich pochodzenia, mogą być nawet 100-krotne. Różnice w zagęszczeniu monowarstwy znajdują swoje odbicie w wartościach TEER, które mogą się różnić nawet 20-krotnie między laboratoriami.

Artursson i in. (25) w swoich badaniach wykazali, że transport cząstek przez warstwę Caco-2 jest 20-krotnie mniejszy niż przez jelito grube i około 100-krotnie mniejszy niż przez ludzkie jelito cienkie. Nie przedstawiono, jak dotąd, żadnej kultury Caco-2, która miałaby większą przepuszczalność transmembranową. Różnice w przepuszczalności między monowarstwą Caco-2 a normalnym nabłonkiem jelitowym mają wiele przyczyn. Kultura *in vitro* nie podlega kontroli centralnego systemu nerwowego, nie ma normalnego ukrwienia, nie jest pokryta odpowiednio grubą warstwą mucyny i nie ma pofałdowań pionowych typu kosmki-krypty. Znacznie luźniejszą strukturę mają obszary pokryte przez komórki kubkowe. Tego typu komórki, obok walcowatych enterocytów, posiada linia HT-29. Niestety brak jest, jak dotąd, linii składających się z samych komórek kubkowych.

Kolejną wadą modeli komórkowych jest ich niepełny metabolizm w porównaniu z enterocytami *in vivo*. Szczególnie istotną różnicą jest znacznie słabsza ekspresja cytochromu P450, ważnego enzymu oksydacyjnego. Dużym problemem przy niektórych lekach jest ich adsorpcja na powierzchni komórek Caco-2, co utrudnia analizę ilościową transportu transnabłonkowego.

W przeprowadzonych szczegółowych badaniach nad wchłanianiem niskocząsteczkowych substancji hydrofilowych wykazano duże różnice pomiędzy komórkami Caco-2 a prawidłowym nabłonkiem jelitowym. Wartość modelu Caco-2 polega głównie na tym, że można być pewnym, iż substancje o dobrej przepuszczalności na modelu *in vitro* są na ogół dobrze wchłaniane *in vivo*. Ponadto jest to model, który pozwala na szybkie testowanie ogromnej liczby substancji.

6. Przyszłość

Jednym z głównych czynników wpływających na rozwój zastosowań kultur nabłonkowych będzie skrócenie ich czasu. Już dzisiaj dysponujemy metodami, które pozwalają na skrócenie czasu hodowli do kilku dni. Oszczędza to czas badaczy, obniża koszty badań i zmniejsza zagrożenie zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi. Szybko rosnące kultury wymagają jednak szerokich badań i standaryzacji procedur. Można także oczekiwać dalszego postępu na drodze pozyskiwania nowych linii komórkowych, o właściwościach coraz bardziej zbliżonych do prawidłowego nabłonka jelitowego. Duże nadzieje wiąże się z wprowadzeniem genów kodujących brakujące enzymy, niezbędne dla pełnego metabolizmu komórkowego.

W przyszłości można także oczekiwać automatyzacji i miniaturyzacji technik hodowlanych oraz nowych naczyń do badania transportu (np. powlekanie płytki BIO-

COAT). W chwili obecnej zaczynają być wprowadzane 96-dółkowe płytki. Należy jednak pamiętać, że mniejsze płytki oznaczają mniejszą ilość materiału do analiz chemicznych, co będzie czynnikiem ograniczającym miniaturyzację. Dużą przyszłość ma także robotyzacja analiz (rozlew pożywek, inokulacja, pobieranie próbek do analiz). Konieczny jest także postęp w opracowaniu nowych i tańszych pożywek, lepiej dostosowanych do tego typu badań.

Artykuł przygotowany w ramach projektu zamawianego PBZ-KBN-094/P06/2003.

Literatura

1. Bailey C. A., Bryla P., Malick A. W., (1996), *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 22, 85-103.
2. Tavelin S., Grajsko J., Taipalensuu J., (2002), in: *Methods in molecular biology*, vol. 188. *Epithelial cell culture protocols*, Ed. C. Wise, Humana Press Inc., Totowa, N.J.
3. Dexter D. L., (1977), *Cancer Res.*, 37, 3136-3140.
4. Dexter D. L., Hager J. C., (1980), *Cancer (Phila.)*, 45, 1178-1184.
5. Dzierżewicz Z., Orchel A., Węglarz L., Latocha M., Wilczok T., (2002), *Acta Biochim. Polon.*, 49, 211-220.
6. Kim Y. S., Tsao D., Morita A., Bella Jr. A., (1982), in: *Colonic Carcinogenesis*, Eds. Malt R. A., Williamson R. C. N., MTP Press Ltd., Hingham, 317-323.
7. Pinto M., Robine-Leon S., Appay M-D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Gogh J., Zweibaum A., (1983), *Biol. Cell*, 47, 323-330.
8. Hidalgo I. J., Raub T. J., Borchardt R. T., (1989), *Gastroenterol.*, 96, 736-749.
9. Bolte G., Wolburg H., Beuermann K., Stocker S., Stern M., (1998), *Clinical Chim. Acta*, 270, 151-167.
10. Peterson M. D., Mooseker M. S., (1993), *J. Cell Sci.*, 105, 445-460.
11. Chong S., Dando S. A., Morrison R. A., (1997), *Pharm. Res.*, 14, 1835-1847.
12. Lenz K. A., Hayashi J., Lucisano L. J., Polli J. E., (2000), *Int. J. Pharm.*, 200, 41-51.
13. Olejnik A., Lewandowska M., Grajek W., Czaczyk K., (2003), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12/53, ST1: 60-64.
14. Shaw A. J., (1996), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
15. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Department of Health and Human Services, FDA, (2002), Rockville, July 2002. www.fda.gov/cder/guidance/index.htm
16. Stahl W., van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J., Faulks R. M., Gaertner Ch., Haenen G., Hollman P., Holst B., Kelly F. J., Polidori M. C., Rice-Evans C., Southon S., van Vliet T., Vina-Ribes J., Williamson G., (2002), *Mol. Aspects Med.*, 15, 39-100.
17. Yu L. X., Amidon G. L., Polli J. E., Zhao H., Metha M. U., Conner D. P., Shah V. P., Lesko L. J., Chen M-L., Lee V. H. L., Hussain A. S., (2002), *Pharm. Res.*, 19, 921-925.
18. Delie F., Rubas W., (1997), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 14, 221-286.
19. Walter E., Kissel T., (1995), *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 215-230.
20. Dressman J. B., Reppas C., (2000), *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, S73-S80.
21. Ingels F., Beck B., Oth M., Augustijns P., (2004), *Int. J. Pharm.*, 274, 221-232.
22. Artursson P., (1990), *J. Pharm. Sci.*, 79, 476-482.
23. Takahashi Y., Kondo H., Yasuda T., Watanabe T., Kobayashi S-I., Yokohama S., (2002), *Int. J. Pharm.*, 246, 85-94.
24. Balimane P. V., Chong S., (2005), *DDT*, 10, 335-343.
25. Artursson P., Ungell A-L., Loeffroth J-E., (1993), *Pharm. Res.*, 10, 1123-1129.