



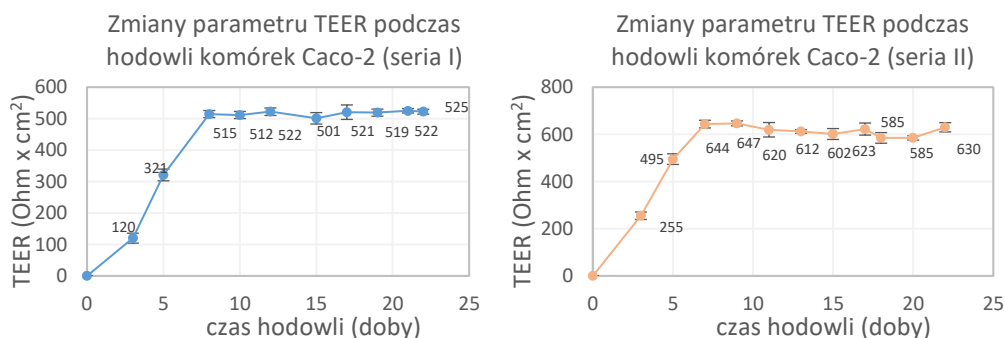
WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności

Poznań, 6.02.2019

SYMULACJA TRANSPORTU JELITOWEGO PREPARATU COLOSTRUM PRP I ANALIZA WCHŁANIANIA WYBRANYCH SKŁADNIKÓW - IgG, IGF-1, LAKTOFERYNY (LFR) I LIZOZYMU (LZM)

W badaniach zastosowano integralny nabłonek jelitowy Caco-2 o ścisłych połączeniach międzykomórkowych, o strukturze i funkcjach typowych dla ludzkiego nabłonka jelita cienkiego. Szczelny i w pełni funkcjonalny model nabłonka jelitowego uzyskano po 22 dniach hodowli (procedurę przygotowania tkanki opisano we wcześniejszym raporcie z II etapu badań). O integralności nabłonka świadczyły wartości przelnabłonkowej oporności elektrycznej – parametr TEER (*TransEpithelial Electrical Resistance*), który był monitorowany podczas hodowli. Wartości TEER utrzymywały się na stałym poziomie począwszy od 7-8 dnia do końca hodowli oraz były stabilne podczas wykonywania analizy transportu przelnabłonkowego (Wykres 1.).



Wykres 1. Zmiany oporności przelnabłonkowej (TEER) w czasie hodowli komórek Caco-2 ukierunkowanych na tworzenie modelu integralnego nabłonka jelitowego (seria I i II)

Przed wykonaniem analizy transportu jelitowego przeprowadzono oznaczenia cytotoksyczności preparatu Colostrum PRP nietrawionego i trawionego oraz innych substancji pomocniczych (czynniki trawienne, wzorce) dla nabłonka jelitowego. Sprawdzano również ich wpływ na integralność bariery jelitowej Caco-2, poprzez pomiar TEER. Wyniki analizy cytotoksyczności zamieszczono w raporcie z drugiego etapu badań w rozdziale pt. „OPIS BADAŃ DOTYCZĄCYCH SYMULACJI TRANSPORTU JELITOWEGO PREPARATU COLOSTRUM PRP”–etap 2 pt. „Oznaczenie cytotoksyczności nietrawionego i trawionego preparatu Colostrum PRP dla komórek nabłonka jelitowego Caco-2”.

Na podstawie wykonanych analiz stwierdzono, że preparat Colostrum PRP nie działa cytotoksycznie na komórki nabłonka jelitowego. Preparat jest w pełni bezpieczny nawet w wysokich stężeniach sięgających 50 mg preparatu siary/ml hodowli. Natomiast treść jelitowa zawierająca czynniki trawienne (sole kwasów żółciowych, enzymy trawienne, kwas i zasada stosowane do regulacji

pH w żołądku i jelicie) wykazują cytotoksyczność dla jelitowych komórek nabłonkowych Caco-2, powodując w większych stężeniach ich obumieranie i dezintegrację modelu nabłonka.

Z uwagi na cytotoksyczność czynników trawiennych obecnych w preparacie po trawieniu żołądkowo-jelitowym, konieczne było zmniejszenie dawki trawionego preparatu wprowadzanego na nabłonek do poziomu 2 mg/ml. W tej dawce preparat trawiony nie wpływał na szczelność i funkcjonalność nabłonka Caco-2 podczas 2-godzinnej inkubacji w warunkach, w których prowadzony był transport przelnabłonkowy (temp. 37 °C, mieszanie 120 rpm).

Dawki preparatu Colostrum PRP zastosowane w symulacji jelitowego transportu przelnabłonkowego ustalono na: 20 mg/ml dla preparatu nietrawionego i 2 mg/ml dla preparatu poddanego trawieniu żołądkowo-jelitowemu. Dawka preparatu trawionego w analizach transportu była 10-krotnie mniejsza niż dawka preparatu nietrawionego.

Analiza jelitowego transportu przelnabłonkowego bioskładników preparatu Colostrum PRP z wykorzystaniem modelu Caco-2

Analizę transportu wykonano dla preparatu Colostrum PRP nietrawionego (Cnt) w stężeniu 20 mg/ml i 50 mg/ml oraz preparatu trawionego (Ct) w stężeniu 2 mg/ml. Opis eksperymentu oraz schemat układu badawczego przedstawiono w protokole z II etapu badań w rozdziale pt. „OPIS BADAŃ DOTYCZĄCYCH SYMULACJI TRANSPORTU JELITOWEGO PREPARATU COLOSTRUM PRP” – etap 3 pt. „Symulacja jelitowego transportu przelnabłonkowego preparatu Colostrum PRP z wykorzystaniem modelu Caco-2”. Zakładano analizy kinetyki transportu biokomponentów preparatu (PRPs, IgG, IGF-1, LFR) oraz ich całkowitego przenikania i kumulacji podczas symulacji wchłaniania jelitowego.

WYNIKI I WNIOSKI Z ANALIZY TRANSPORTU JELITOWEGO

- Analiza przenikalności jelitowej składników (PRPs, IgG, IGF-1, LFR, LZM) z preparatu Colostrum PRP poddanego trawieniu żołądkowo-jelitowemu okazała się niemożliwa z uwagi na zbyt niskie stężenie wyjściowe preparatu wprowadzanego na nabłonek jelitowy. Podanie preparatu po trawieniu w niskim stężeniu (2 mg/ml) było związane z obecnością czynników trawiennych, które negatywnie wpływały na integralność nabłonka i żywotność komórek jelitowych. Dlatego wykonano analizy wchłaniania preparatu Colostrum PRP niepodanego procesowi trawienia.
- Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń polegających na symulacji procesu wchłaniania jelitowego i wyników analiz IgG, IGF-1, LFR, LZM w modelu Caco-2 stwierdzono, że:

* **IGF-1** - może przenikać przez nabłonek jelitowy, ale poziom jego absorpcji jelitowej jest bardzo niski. Po transporcie w modelu Caco-2 stężenie IGF-1 było na progu wykrywalności, przenikalność IGF-1 przez nabłonek Caco-2 może być oszacowana na poziomie ok. 1% lub niższym. Prawdopodobnie przenikalność jelitowa IGF-1 w warunkach fizjologicznych nie będzie wystarczająca, aby przyczynić się do zwiększenia ogólnoustrojowego stężenia IGF-1. Preparat siary po podaniu doustnym będzie wpływał na zwiększenie systemowego IGF-1 za pomocą mechanizmów pośrednich, natomiast bezpośrednie działanie IGF-1 z preparatu będzie miało charakter lokalny i będzie związane z korzystnym – prozdrowotnym działaniem na przewód żołądkowo-jelitowy w aspekcie zarówno morfologicznym, jak i funkcjonalnym.

*** laktoferyna**

- po podaniu preparatu nietrawionego w dawce 50 mg/ml przenikalność przez nabłonek Caco-2 oszacowano na poziomie $2,68 \pm 0,14\%$
- po podaniu preparatu w dawce 20 mg/ml przenikalność przez nabłonek Caco-2 oszacowano na poziomie $1,00 \pm 0,09\%$

Dane mają charakter szacunkowy, gdyż ilość LFR po przeniknięciu przez nabłonek jest na granicy detekcji w teście ELISA, którego dolny zakres podany przez producenta wynosi 12 µg/ml.

* **IgG**

- po podaniu na nabłonek Caco-2 preparatu w dawce 50 mg/ml przenikalność IgG oszacowano na poziomie $1,93 \pm 0,22\%$
- po podaniu na nabłonek preparatu w dawce 20 mg/ml przenikalność IgG oszacowano na poziomie $1,82 \pm 0,19\%$.

* **Lizozym** – po podaniu preparatu Colostrum PRP na nabłonek jelitowy Caco-2 nie stwierdzono absorpcji jelitowej lizozymu w warunkach *in vitro*.

- Na podstawie wykonanych badań stwierdzono niską przenikalność analizowanych składników preparatu Colostrum przez nabłonek Caco-2. Model Caco-2 stanowi dojrzały w pełni wykształcony nabłonek jelitowy o ścisłych połączeniach międzykomórkowych i wysokiej integralności bariery jelitowej, typowej dla dorosłego organizmu człowieka. Prawdopodobnie znacznie większa przenikalność będzie obserwowana u noworodków z uwagi na nie w pełni rozwinięty układ pokarmowy, związany zarówno z mniejszą aktywnością enzymów trawiennych, wyższym pH w żołądku, jak i mniejszą integralnością nabłonka jelitowego i mniej szczelną barierą jelitową, co skutkuje większą absorpcją ze światła jelit do krwiobiegu.

dr hab. Anna Olejnik
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
e-mail: anna.olejnik@up.poznan.pl

