

# Zastosowanie hodowli komórkowych w badaniach biofarmaceutycznych

Paweł Stasiak, Małgorzata Sznitowska

Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Adres do korespondencji: Paweł Stasiak, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, tel. 058 349 31 85, faks 058 349 31 90, email: pastasiak@gumed.edu.pl

**Application of cell culture models in biopharmaceutical research** · Cell culture models imitating biological barriers present in living organisms enable investigation of transport, cytotoxicity and accumulation of xenobiotics in the cells which allows for selection of compounds bearing desired biopharmaceutical properties. This approach not only reduces considerable costs of animal experiments, but is also ethically justified. The present paper is a brief review of basic properties and applications of cell lines in pharmaceutical sciences as well as describes basic procedures aiming at establishment and maintenance of the cell cultures. Methods of transport and uptake studies of the xenobiotics by cell monolayers are presented as well as the influence of ABC transporters on drug absorption is highlighted.

**Keywords:** cell cultures, drug transport studies, P-glycoprotein.

© Farm Pol, 2010, 66(3): 228-234

## Wstęp

Hodowle komórkowe prowadzone w wyspecjalizowanych laboratoriach badawczych stały się w ostatnim czasie rutynowym narzędziem wykorzystywanym w biotechnologii, biofarmacji i toksykologii. Komórki pozyskiwane z organizmów ludzkich lub zwierzęcych, hodowane i namnażane w odpowiednich warunkach, umożliwiają poznanie biologii komórek, a także wpływu na ich żywotność i funkcję enzymów, hormonów i leków. Powszechne są badania z użyciem hodowli komórkowych w celu przewidywania właściwości toksycznych substancji chemicznych. Hodowle komórkowe pozwalają na badania wchłaniania leków przez nabłonek przewodu pokarmowego, nabłonek oddechowy i inne bariery żywego organizmu, co wykorzystywane jest w pracach rozwojowych nad nowymi lekami, w ocenie ich właściwości biofarmaceutycznych i toksyczności [1].

Odpowiednio dobrana i właściwie prowadzona hodowla komórkowa pozwala odpowiedzieć na szereg zasadniczych pytań natury farmakologicznej, ale także technologicznej, stawianych na etapie wstępnych badań toksykologicznych, farmakokinetycznych i preformulacyjnych. W hodowlach komórkowych *in vitro* określa się mechanizm wchłaniania, minimalne stężenie toksyczne, interakcje z innymi lekami, jak również wpływ substancji pomocniczych na etap wchłaniania przez bariery biologiczne.

Prowadzone w kontrolowanych warunkach hodowle komórkowe pozwalają na dokonywanie badań przesiewowych (*screening*) grup nowo syntezowanych związków, znacznie ograniczając ilość wydatkowanych środków na kosztowne i czasochłonne badania *in vivo* na zwierzętach, które wymagałyby ponadto etycznego uzasadnienia.

Szybki rozwój biotechnologii umożliwił izolację i hodowlę wielu rodzajów komórek, które wykazują różny stopień podobieństwa do rzeczywiście obecnych w żywym organizmie. W ten sposób pozyskano narzędzie umożliwiające skrócenie czasu prowadzenia eksperymentów, pozwalające na uzyskanie wyników powtarzalnych i odtwarzalnych oraz zapewniające wysoką korelację z warunkami *in vivo*.

Nie do przecenienia jest duży potencjał i szerokie możliwości aplikacyjne hodowli komórkowych w badaniach naukowych w dziedzinie fizjologii, transplontologii i genetyki.

Zastosowanie hodowli komórkowych w biofarmacji ma przede wszystkim na celu poznanie mechanizmów przenikania i wychwytu substancji chemicznych przez komórki, co umożliwia wytypowanie, z licznej niekiedy grupy związków, tych, których właściwości są najkorzystniejsze pod względem biofarmaceutycznym. W odniesieniu do leków już stosowanych prowadzi się badania interakcji występujące na etapie wchłaniania, skutkujących obniżeniem

lub zwiększeniem efektu terapeutycznego, a nawet zwiększających toksycność [2].

### Hodowle komórkowe

Prowadzenie badań z wykorzystaniem hodowli komórkowych wymaga zarówno odpowiednio wyszkolonej kadry, jak i dobrze wyposażonego laboratorium. Prowadzone operacje wykonywane są w warunkach aseptycznych, co zapobiega zakażeniom hodowli.

Hodowle komórkowe wyprowadza się z materiału zwierzęcego lub ludzkiego, np.: podczas zabiegów operacyjnych, porodu (komórki śródbłonka naczyń żyły pępowinowej), z tkanek prawidłowych lub patologicznych (nowotworowych). Szerokie wykorzystywanie komórek nowotworowych wynika z ich szybkiego wzrostu i intensywnie zachodzących procesów podziału, przy zachowaniu podobieństwa funkcjonalnego do komórek zdrowych.

Wybór typu komórek do prowadzonej hodowli uzależniony jest od charakteru planowanych eksperymentów. Banki komórek, np. Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ECACC), dysponują materiałem pochodzącym z różnych narządów i reprezentującym odmienne właściwości. W badaniach, w których hodowla stanowić ma model komórek zdrowych, występujących w warunkach fizjologicznych, w celu uzyskania wyników wysoko skorelowanych z otrzymywanymi w warunkach *in vivo*, należy wybrać tę, której cechy geno- i fenotypowe są maksymalnie zbliżone do cech komórek prawidłowych, natomiast w przypadku badania aktywności leków cytostatycznych, w pierwszej kolejności badania wykonuje się w hodowlach komórek nowotworowych. O wyborze odpowiedniej hodowli w znacznej mierze decyduje jej pochodzenie. Przykładowo, badając wchłanianie leku podawanego drogą inhalacyjną, korzysta się z komórek pobranych z nabłonka oddechowego, których hodowla w największym stopniu

reprezentuje warunki charakterystyczne dla miejsca wchłaniania.

O zbieżności funkcji „barierowych” komórek hodowlanych i występujących w prawidłowo funkcjonującej tkance decyduje aktywność białek transportowych odpowiedzialnych za wchłanianie, obecność ścisłych połączeń między komórkami oraz aktywność wydzielnicza prowadząca do wytwarzania produktów specyficznych dla tkanki pochodzenia (np. śluzu).

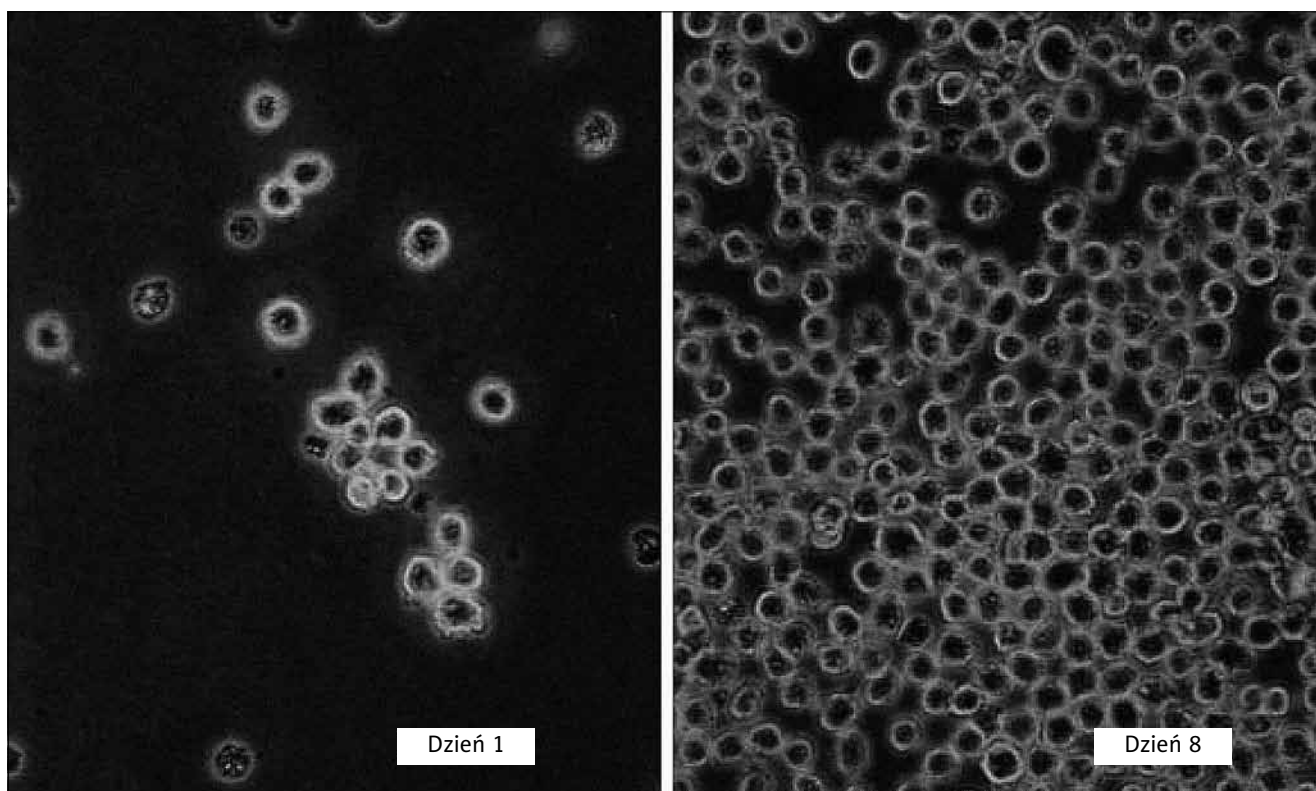
Do czynników wpływających na wybór hodowli zaliczyć można także typ komórek, szybkość wzrostu, wymagania hodowli oraz koszt jej prowadzenia. W każdym przypadku preferuje się hodowle dające we wcześniej prowadzonych badaniach wyniki powtarzalne i odtwarzalne, o potwierdzonej korelacji *in vitro/in vivo*. W badaniach z zakresu farmacji korzysta się przede wszystkim z komórek pochodzenia ludzkiego, lecz w sytuacjach, kiedy uzyskanie takiego materiału jest utrudnione, badania prowadzi się stosując komórki zwierzęce. Krótka charakterystyka najczęściej wykorzystywanych modeli komórkowych przedstawiona jest w **tabeli 1**.

Rozpoczęcie hodowli komórkowej poprzedzone jest pobraniem z organizmu odpowiedniej tkanki lub narządu (np. krwi, fragmentu aorty, napletka, jelita, nabłonka oddechowego, tkanki zmienionej nowotworowo). Pobraną tkankę inkubuje się w roztworze enzymu (kolagenaza) w celu zniszczenia połączeń pomiędzy komórkami. Otrzymane komórki umieszcza się w naczyniu hodowlanym w pożywce zawierającej zestaw niezbędnych aminokwasów, węglowodanów,

O zbieżności funkcji „barierowych” komórek hodowlanych i występujących w prawidłowo funkcjonującej tkance decyduje aktywność białek transportowych odpowiedzialnych za wchłanianie, obecność ścisłych połączeń między komórkami oraz aktywność wydzielnicza prowadząca do wytwarzania produktów specyficznych dla tkanki pochodzenia (np. śluzu). Do czynników wpływających na wybór hodowli zaliczyć można także typ komórek, szybkość wzrostu, wymagania hodowli oraz koszt jej prowadzenia.

**Tabela 1.** Charakterystyka wybranych linii komórkowych [3]

Linia komórkowa	Pochodzenie	Zastosowanie	Zalety	Ograniczenia
Caco-2	Ludzki gruczołakorak okrężnicy	Badania wchłaniania przez nabłonek jelitowy, określanie cytotoksyczności substancji	Zachowanie funkcji enterocytów, aktywność P-gp	Stacjonarna faza wzrostu uzyskiwana dopiero po 20 dniach
Calu-3	Komórki surowicze gruczołów podśluzówkowych	Badania wchłaniania przez nabłonek oddechowy, badanie cytotoksyczności	Wykazywanie zdolności wydzielniczej i aktywności P-gp	Trudności w uzyskaniu korelacji <i>in vitro/in vivo</i>
16HBE14o-	Ludzki nabłonek oskrzelowy	Badania transportu i wychwytu	Wykazywanie aktywności P-gp	Brak produkcji śluzu
BBMECs	Komórki śródbłonka naczyń mózgowych krowy	Badania przenikania przez barierę krew/mózg	Tworzenie monowarstw, wykazywanie aktywności enzymów bariery krew/mózg, wykazywanie aktywności P-gp	Odmienne aktywność transporterów w komórkach ludzkich
PBMECs	Komórki śródbłonka naczyń mózgowych świni			
MDCK	Komórki kanalika dystalnego nerki psa	Badanie reabsorpcji z kanałków nerkowych	Wykazywanie wysokiej wartości TEER	Różnice funkcjonalne pomiędzy komórkami w zależności od pochodzenia
LLC-PK1	Komórki kanalika proksymalnego nerki świni			



Rycina 1. Obraz mikroskopowy mysich komórek szpiczaka w 1. i 8. dniu po podziale hodowli [5]

witamin, soli, a także bydlęcą surowicę płodową i bardzo często antybiotyki. W ten sposób tworzy się tzw. hodowlę pierwotną. Znajdujące się w regularnie wymienianej pożywce komórki dzielą się i różnicują. Procesy te prowadzą do przerostu hodowli, a następnie jej obumierania, stąd istotne jest dokonywanie podziałów hodowli (tzw. pasażowanie) polegające na przenoszeniu części hodowli do nowego naczynia. Dokonanie pierwszego pasażu hodowli pierwotnej prowadzi do utworzenia tzw. linii komórkowej, która, podobnie jak hodowla pierwotna, wymaga regularnej wymiany medium oraz okresowego pasażowania.

Wzrost linii komórkowej dzieli się na trzy zasadnicze etapy:

- 1) fazę „lag” (opóźnienia), kiedy umieszczone w naczyniu komórki przystosowują się do środowiska, nie wykazując aktywności podziałowej,
- 2) fazę „log” (wzrostu), w której następuje szybki wzrost hodowli oraz
- 3) fazę stacjonarną, podczas której komórki tworzą konfluentną monowarstwę i różnicują się.

Za monowarstwę konfluentną uważa się taką, której komórki tworzą jednolitą, pozbawioną wolnych

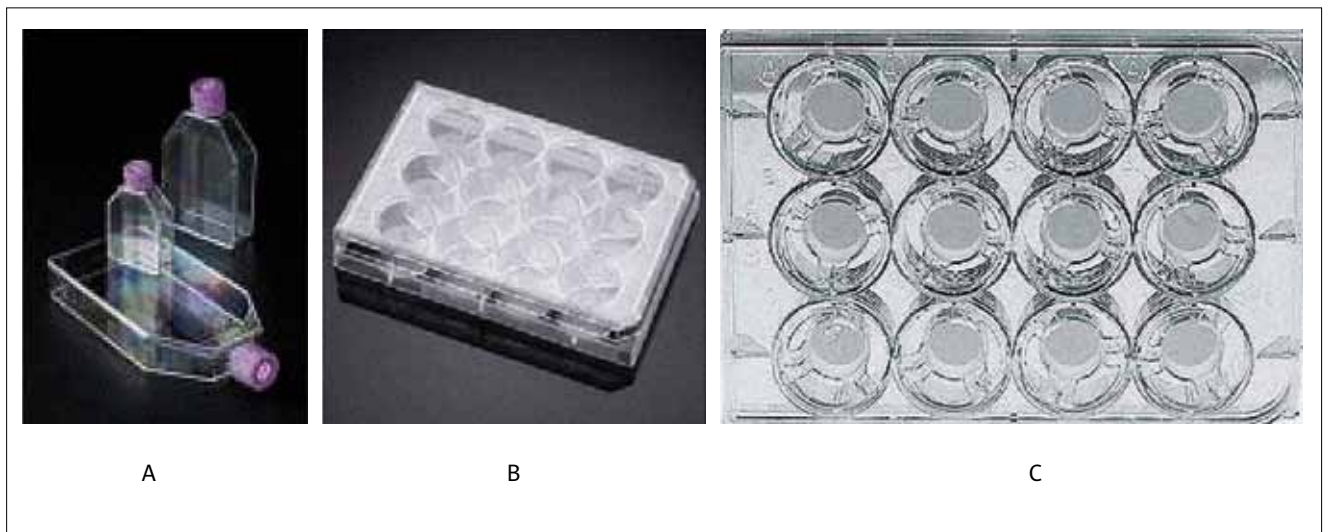
obszarów warstwę, równomiernie pokrywającą dno naczyń, i w której pomiędzy poszczególnymi komórkami istnieją ściste połączenia uniemożliwiające przechodzenie substancji bez pokonania bariery błon komórkowych. Proces uzyskiwania konfluencji, zależnie od typu prowadzonej linii komórkowej, trwa od kilku do kilkudziesięciu dni, podczas których konieczna jest regularna wymiana pożywki oraz utrzymanie optymalnych warunków środowiskowych zapewniających rozwój hodowli (temperatura 37°C, 5% zawartość CO<sub>2</sub> utrzymywane są dzięki zastosowaniu inkubatorów). Funkcje odżywcze spełnia odpowiednia pożywka pozwalająca na utrzymanie żywotności komórek poza organizmem.

Ostatnim etapem funkcjonowania linii komórkowej, do którego dochodzi w przypadku pozostawienia bez pasażowania konfluentnej hodowli, jest stopniowe zmniejszanie ilości żywych komórek i zamieranie linii [1].

Intensywność podziałów komórek podczas fazy wzrostu zależy od specyficznych cech linii komórkowej. Przykładowe obrazy mikroskopowe wzrastającej hodowli przedstawione są na **rycynie 1**.

Nie każda linia komórkowa ma nieograniczoną żywotność. Stąd linie komórkowe dzieli się na ciągłe, które mogą być teoretycznie prowadzone bez ograniczeń czasowych oraz linie o ograniczonej żywotności, których zmienność prowadzi do stopniowego obumierania po przekroczeniu pewnej liczby pasażów [1]. Aby nie dopuścić do utraty linii komórkowej,

Nie każda linia komórkowa ma nieograniczoną żywotność. Stąd linie komórkowe dzieli się na ciągłe, które mogą być teoretycznie prowadzone bez ograniczeń czasowych oraz linie o ograniczonej żywotności, których zmienność prowadzi do stopniowego obumierania po przekroczeniu pewnej liczby pasażów. Aby nie dopuścić do utraty linii komórkowej, niewykorzystywane aktualnie komórki przechowuje się w stanie zamrożonym.



**Rycina 2.** Naczynia hodowlane: A – butelki plastikowe, B – płytka wielodołkowa, C – płytka do hodowli na filtrach membranowych

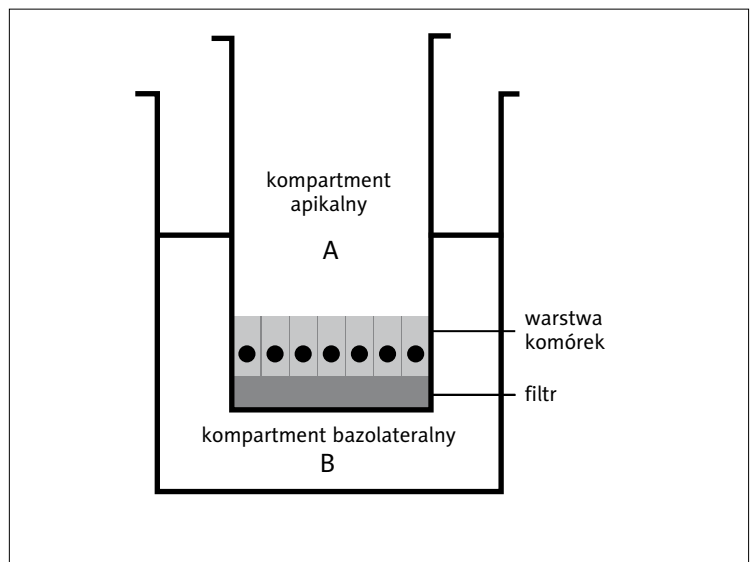
niewykorzystywane aktualnie komórki przechowywane są w stanie zamrożonym. W tym celu komórki umieszcza się w roztworze zawierającym substancję krioprotekcyjną (DMSO, glicerol), stopniowo zamraża, a następnie probówkę z zamrożonymi komórkami przechowywane w ciekłym azocie ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). W zastosowanych warunkach zahamowane są procesy wzrostu i różnicowania komórek.

Do podstawowych operacji wykonywanych w laboratoriach hodowli komórkowych należą: utrzymywanie zakupionych hodowli, dokonywanie wymiany pożywki, pasażowanie, czyli dzielenie hodowli, zamrażanie i przechowywanie komórek oraz wykonywanie właściwych eksperymentów (np. badanie toksyczności, transportu i absorpcji substancji chemicznych przez komórki).

Hodowle prowadzi się, w zależności od przeznaczenia, w pojemnikach płaskodennych z tworzywa sztucznego, na płytkach wielodołkowych lub na insertach (rycina 2).

Przeprowadzenie pasażu wiąże się z koniecznością oderwania komórek od powierzchni naczynia, czego dokonuje się wprowadzając niewielką objętość roztworów trypsyny, trypsyny z EDTA lub kolagenazy [1]. W ten sposób uzyskuje się zawiesinę komórek. Po obliczeniu stężenia komórek w zawiesinie, odpowiednią jej część przenosi się do nowego naczynia hodowlanego tak, aby uzyskać wymaganą gęstość posiewu, np. dla komórek Calu-3 gęstość wynosi około  $100 \text{ tys.}/\text{cm}^2$  [4].

Eksperymenty dotyczące transportu substancji przez utworzoną z komórek warstwę, będącą modelem bariery wchłaniania w żywym organizmie prowadzi się po uzyskaniu konfluencji hodowli. Wspomniana wymiana pożywki ma najczęściej miejsce kilkakrotnie w ciągu tygodnia i należy do najprostszych czynności wykonywanych w laboratorium hodowli komórkowych. Operacja polega na usunięciu za pomocą pipety



**Rycina 3.** Schemat hodowli komórkowej na insertach z filtrem, wykorzystywanej w badaniu transportu transmembranowego

zużytego medium oraz wprowadzeniu na jego miejsce ogrzanej do temperatury  $37^{\circ}\text{C}$  świeżej pożywki.

### Zastosowanie hodowli komórkowych w biofarmacji

Badania z zakresu biofarmacji dotyczyć mogą transportu substancji leczniczej przez monowarstwę komórkową lub wychwyty tej substancji przez komórki. Badania prowadzi się w stacjonarnej fazie wzrostu, kiedy pomiędzy komórkami nie ma wolnych przestrzeni, a więc transport przez warstwę komórkową zachodzi wyłącznie przez komórki lub przez ściste połączenia między nimi.

Badanie przenikania prowadzi się z wykorzystaniem hodowli komórkowych reprezentujących fizjologiczne środowisko wchłaniania badanych substancji



Badania z zakresu biofarmacji dotyczyć mogą transportu substancji leczniczej przez monowarstwę komórkową lub wychwyty tej substancji przez komórki. Badania prowadzi się w stacjonarnej fazie wzrostu, kiedy pomiędzy komórkami nie ma wolnych przestrzeni, a więc transport przez warstwę komórkową zachodzi wyłącznie przez komórki lub przez ścisłe połączenia między nimi. Dobór właściwej linii komórkowej stanowi kluczowy element badania, wpływający na stopień korelacji *in vitro/in vivo* uzyskanych wyników.

leczniczych. Modelem dla leków podawanych drogą doustną mogą być komórki gruczołakoraka okrężnicy linii Caco-2. Linia ta została zaakceptowana przez instytucje rejestracyjne jako wiarygodny model barier biologicznych występujących w przewodzie pokarmowym [9]. Dla leków podawanych drogą inhalacyjną odpowiednie mogą być natomiast komórki podśluzówkowe gruczołów ludzkich dróg oddechowych Calu-3 [3]. Dobór właściwej linii komórkowej stanowi kluczowy element badania, wpływający na stopień korelacji *in vitro/in vivo* uzyskanych wyników.

Badanie transportu przezkomórkowego (przenikania) prowadzi się z użyciem hodowli na filtrach oddzielających kompartment apikalny (górny) od bazolateralnego (dolnego). Dzięki temu, pomiędzy kompartmentami powstaje ścisła warstwa filmu komórkowego, pokrywająca powierzchnię filtra

(rycina 3). Układ taki tworzy się dzięki specjalnym płytkom wielodołkowym zawierającym inserty z filtrami z poliestru (średnica porów 0,4 μm). Komórki w formie zawiesiny umieszcza się na powierzchni filtra (kompartment apikalny), przestrzeń zewnętrzną (kompartment bazolateralny) jest natomiast wypełniona pożywką umożliwiającą wzrost hodowli [6]. Wzrost komórek poprzedzony jest okresem adaptacji, po którym rozpoczyna się proces uzyskiwania konfluencji. Proces ten obserwuje się śledząc zmiany wartości oporu elektrycznego (*Trans epithelial Electrical Resistance, TEER*) pomiędzy kompartmentami. Osiągnięcie wysokich i niezmiennych wartości TEER świadczy o tym, że hodowla znajduje się w fazie stacjonarnej [7], co jest momentem właściwym do rozpoczęcia eksperymentu. Badanie transportu polega na umieszczeniu w jednym z kompartmentów (np. apikalnym) roztworu badanej substancji w pożywce lub w odpowiednim buforze przy pozostawieniu w drugim kompartmentcie płynu akceptorowego. Okresowo pobiera się próbki płynu akceptorowego i oznacza stężenia substancji badanej z wykorzystaniem stosownych metod analitycznych (np. HPLC, spektrofлуorymetria).

Ilościowo przenikanie przez pojedynczą warstwę komórek opisuje tzw. współczynnik przenikania  $P_{app}$  [cm·s<sup>-1</sup>):

$$P_{app} = \frac{M/t}{C_0 \times S}$$

gdzie:  $M$  – ilość badanego związku w płynie akceptorowym po czasie  $t$ ,  $C_0$  – stężenie w płynie donorowym w czasie  $t_0$ ,  $S$  – powierzchnia filtra [8].

W sposób odmienny od opisanego powyżej prowadzi się badania wychwyty substancji przez komórki. W tym przypadku dokonuje się pomiaru zawartości badanego leku nie po przeciwnej stronie monowarstwy komórkowej, ale w warstwie komórkowej. Wykorzystuje się w tym wypadku hodowlę komórkową na płytkach, a nie na filtrach. Po uzyskaniu konfluentnej i zróżnicowanej monowarstwy komórek, pożywkę zastępuje się roztworem badanej substancji. Po określonym czasie oznacza się stężenie badanego związku w komórkach, po uprzednim zniszczeniu błon np. przez inkubację w roztworze związku powierzchniowo czynnego [10].

Badanie wychwyty pozwala na ocenę kumulacji badanej substancji *in vivo*, co jest istotne dla określenia jej skuteczności i toksyczności. Na podstawie uzyskanych wyników dokonuje się selekcji tych substancji, których kumulacja w komórkach jest dostateczna dla wywołania pożądanego efektu terapeutycznego.

W ten sposób, korzystając z hodowli komórkowych na płytkach, prowadzi się także badania cytotoxyczności ksenobiotyków. Do tego celu używa się gotowych zestawów odczynników, które pozwalają na oznaczenie żywotności komórek po inkubacji z roztworami badanych substancji [11].

### Badania mechanizmów transportu leków przez błony biologiczne

Przenikanie substancji przez błony biologiczne odbywa się na zasadzie dyfuzji biernej, dyfuzji ułatwionej, transportu czynnego, pinocytozy, fagocytozy lub persorpcji.

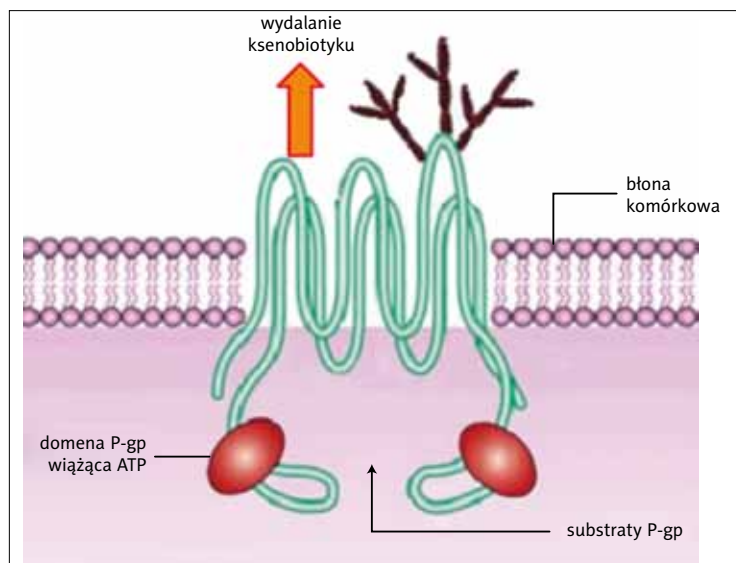
Odbywający się wbrew gradientowi stężeń transport aktywny wymaga udziału nośników, czyli białek umożliwiających transport ksenobiotyku, przy zaistnieniu nakładu energetycznego. W przypadku substancji leczniczych podawanych drogą doustną, ocena tego transportu możliwa jest z zastosowaniem linii komórkowych odpowiadających funkcjonalnie ludzkim enterocytom. W tego typu komórkach (podobnie jak w komórkach obecnych np. w wątrobie, nerkach, ścianach naczyń krwionośnych tworzących barierę krew-mózg, komórkach nabłonka oddechowego), ważną rolę odgrywają obecne w błonie białka transportowe klasy ABC (ATP-binding cassette), których zadaniem jest transport ksenobiotyków (w tym leków) na zewnątrz komórki. Transport ksenobiotyku do komórki odbywa się na drodze dyfuzji biernej. Jednocześnie następuje transport w kierunku przeciwnym (z komórki na zewnątrz), dzięki aktywności białek błonowych ABC (transport aktywny). Istnienie transportu w kierunku ku środowisku zewnętrznemu umożliwia więc usuwanie z wnętrza komórki substancji toksycznych, w tym substancji leczniczych.

Do grupy omawianych białek transportowych należy glikoproteina P (P-gp, P170). Efektem działania P-gp jest zmniejszenie stężenia leku w komórce. Substratami dla P-gp jest wiele substancji leczniczych jak celiprolol, ranitydyna, erytromycyna, digoksyna, loperamid, a także niektóre leki cytostatyczne (taksol, doksorubicyna, winblastyna). Trudności w uzyskaniu odpowiedniego stężenia leku w komórkach nowotworowych wykazujących aktywność P-gp mogą być właśnie wynikiem tej funkcji białka transportowego [3, 12].

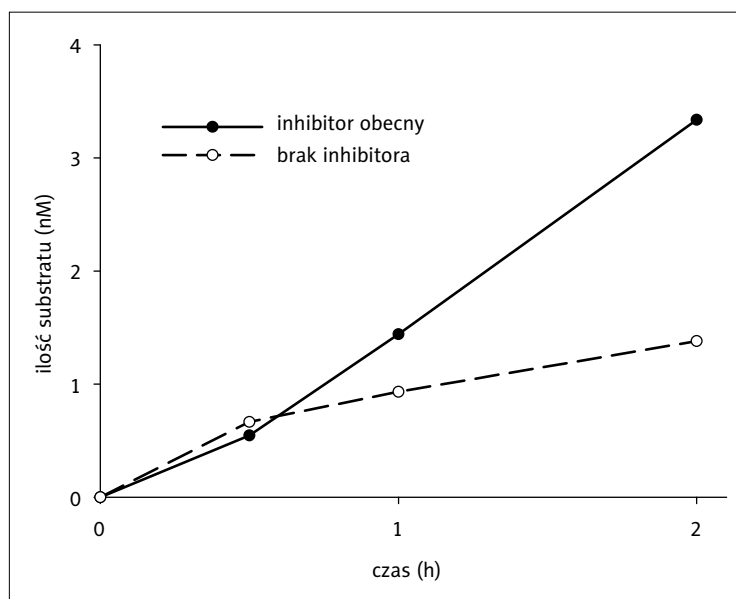
Funkcja P-gp, podobnie jak innych białek biorących udział w tym mechanizmie transportu, może być ograniczona przez substancje hamujące, tzw. inhibitory P-gp (np. werapamil, diltiazem, cyklosporyna A, chinidyna, rezerpina), a także niektóre substancje pomocnicze np. polisorbitat czy polietylenoglikol [13]. Podanie leku, substratu P-gp wraz z inhibitorem może w znaczący sposób zwiększyć jego biodostępność, czyli zwiększyć osiągnięte stężenia we krwi (rycina 4). Obserwowano np. znaczący wzrost stężenia digoksyny po doustnym podaniu inhibitora P-gp – chinidyny [14]. Poszukiwanie wśród leków i substancji obecnych w żywności związków oddziałujących z białkami transportowymi pozwala na wyjaśnienie różnic w osiągniętych we krwi stężeniach substancji leczniczych oraz może się przyczynić do uniknięcia niektórych niepożądanych efektów farmakoterapii. Wykorzystując linię komórkową wykazującą aktywność P-gp (np. Caco-2) można obserwować zjawisko oporności wielolekowej, polegające właśnie na zmniejszaniu się stężenia substancji leczniczej w komórkach na skutek działania białka transportowego.

Ponieważ P-gp znajduje się jedynie w błonie apikalnej [16, 17], w opisanym wcześniej układzie do badania przenikania, ksenobiotyki będące substratami dla P-gp będą wypompowywane na zewnątrz komórek, do kompartmentu apikalnego, co obserwowane będzie jako zahamowany przyrost stężenia badanej substancji w kompartmentie bazolateralnym. Umieszczając natomiast na powierzchni komórek (kompartment apikalny) roztwór ksenobiotyku wraz z inhibitorem P-gp, można zaobserwować, że zahamowanie transportu będzie ograniczone w stopniu zależnym od ilości wysyconych inhibitorem cząsteczek białka transportowego. Przykładowy wykres obrazujący wpływ inhibitora na przenikanie rodami-123, modelowego substratu dla P-gp, przedstawiony jest na rycinie 5.

Korzystając z wyników badań przenikania można dokonać klasyfikacji substancji pod względem właściwości biofarmaceutycznych (Biopharmaceutics Classification System, BCS). Klasyfikacji tej dokonuje się biorąc pod uwagę rozpuszczalność oraz przenikanie przez bariery biologiczne [18]. O ile określenie rozpuszczalności jest z reguły dość proste, ocena



Rycina 4. Schemat budowy P-gp oraz drogi usuwania z jej udziałem ksenobiotyków z komórki [15]



Rycina 5. Zwiększenie szybkości transportu substratu P-glikoproteiny przez komórki Caco-2 w obecności inhibitora (z kompartmentu apikalnego do bazolateralnego)

przenikalności *in vivo* przez błony biologiczne jest trudna, stąd wykonuje się badania na hodowlach komórkowych. Istniejące różne mechanizmy transportu, na podstawie budowy chemicznej, rozpuszczalności w wodzie, współczynnika podziału olej/woda oraz masy cząsteczkowej, pozwalają tylko w sposób przybliżony przewidzieć, czy i w jakim stopniu dojdzie do absorpcji ksenobiotyku. Wiedza na temat przynależności danego leku do odpowiedniej klasy BCS umożliwia natomiast opracowanie odpowiedniej dla niego postaci farmaceutycznej. Wykorzystanie kultur komórkowych staje się zatem powszechnym sposobem na przeprowadzenie kwalifikacji w warunkach *in vitro*.

## Podsumowanie

Szereg linii komórkowych, zarówno pochodzenia ludzkiego, jak i zwierzęcego, znalazło zastosowanie w badaniach przenikania, kumulacji oraz cytotoksyczności ksenobiotyków. Wykorzystywane linie komórkowe pozwalają na przewidywanie transportu zachodzącego w warunkach *in vivo*, także z udziałem specyficznych białek transportowych oraz umożliwiają prowadzenie prac nad poprawą biodostępności leków. Dlatego też badania z ich wykorzystaniem stają się coraz chętniej używanym narzędziem oceny biofarmaceutycznej substancji aktywnych.

Otrzymano: 2009.12.08 · Zaakceptowano: 2009.01.05

## Piśmiennictwo

1. Stokłosowa S.: Hodowla komórek i tkanek. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
2. Kuwayama K., Inoue H., Kanamori T., Tsujikawa K., Miyaguchi H., Iwata Sesji., Miyauch S., Kamo Toru., Kisi T.: Interactions between 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, ketamine, and caffeine in human intestinal Caco-2 cells and in oral administration to rats. *Forensic Sci. Int.* 2007, 170: 183–8.
3. Korjamo T., Honkakoski P., Toppinen MR., Niva S., Reinisalo M., Palmgrén JJ., Mönkkönen J.: Absorption properties and P-glycoprotein activity of modified Caco-2 cell lines. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005, 26: 266–279.
4. Forbes B., Ehrhardt C.: Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005, 60: 193–205.
5. <http://cellbank.nibio.go.jp/pictures/clp01353.jpg> (stan z 30.10.2009).
6. Deachapunya C., Poonyachoti S., Krishnamra N.: Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *J. Endocrinol.* 2008, 197: 575–582.
7. Anthony R. Calabro, Roula Konsoula, Frank A. Barile: Evaluation of *in vitro* cytotoxicity and paracellular permeability of intact monolayers with mouse embryonic stem cells. *Toxicol. In Vitro* 2008, 22: 1273–1284.
8. Ender S., Becker U., Daum N., Huwer H., Lehr C-M., Gumbleton M., Ehrhardt C.: P-glycoprotein (MDR1) functional activity in human alveolar epithelial cell monolayers. *Cell Tissue Res.* 2007, 328: 77–84.
9. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A.: Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22: 186–198.
10. Zastre J., Jackson J., Bajwa M., Liggins R., Iqbal F., Burt H.: Enhanced cellular accumulation of a P-glycoprotein substrate, rhodamine-123, by Caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002, 54: 299–309.
11. Krzysztoń-Russjan J., Książek I., Anuszewska E.: Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farm. Pol.* 2009, 65: 395–402.
12. Haslam IS., Jones K., Coleman T, Simmons NL.: Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). *Biochem. Pharmacol.* 2008, 76: 850–861.
13. Elamanchili P., McEachern C., Burt H.: Reversal of multidrug resistance by methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers through the inhibition of P-glycoprotein function. *J. Pharm. Sci.* 2009, 98: 945–958.
14. Fromm MF.: Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003, 33: 6–9.
15. Sorrentino BP.: Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2: 186–198.
16. Wang B., Siahaan T., Soltero R.: *Drug delivery: principles and applications.* Hoboken: Wiley Interscience, 2005.
17. Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regardh CG., Lipka E., Amidon GL., Langguth P.: Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside- directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 2000, 89: 63–75.
18. Emami J.: *In vitro – in vivo* correlation: from theory to applications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2006, 9: 169–189.