

MAŁGORZATA NEUMANN, KAMILA GODERSKA, KATARZYNA GRAJEK,  
WŁODZIMIERZ GRAJEK

## **MODELE PRZEWODU POKARMOWEGO *IN VITRO* DO BADAŃ NAD BIODOSTĘPNOŚCIĄ SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH**

### Streszczenie

Biodostępność składników pokarmowych jest ważnym wskaźnikiem przy ocenie wpływu żywienia człowieka na jego zdrowie. Z uwagi na trudności w dostępie do treści jelitowych *in vivo* rozwinięto modele umożliwiające badanie trawienia i wchłaniania składników pokarmowych w warunkach *in vitro*.

W pracy opisano budowę przewodu pokarmowego i jego fizjologię. Przedstawiono dane dotyczące stężenia aktywnych składników płynów w układzie pokarmowym, kinetykę zmian kwasowości płynów jelitowych oraz szybkość pasażu i trawienie pokarmu przez układ. Omówiono także podstawowe modele *in vitro* do badania trawienia jelitowego i wchłaniania.

Większość stosowanych modeli jest dwu- lub trójstopniowa i obejmuje układy: żołądek – jelito cienkie, jama ustna – żołądek – jelito cienkie lub żołądek – jelito cienkie – jelito grube. W modelach przewodu pokarmowego *in vitro* można zalecać następujące proporcje objętościowe (wagowe) między płynami jelitowymi: pokarm/ślina/płyn żołądkowy/żółć/sok trzustkowy, jak 1,5/1/2/1/2. Jako modele do badania wchłaniania składników pokarmowych wykorzystuje się bądź układy dializacyjne lub ultrafiltracyjne, bądź modele kultur komórek nabłonka jelitowego *in vitro*. Najpopularniejszą linią komórkową wykorzystywaną do badania wchłaniania pokarmów jest Caco-2. Jej morfologia i fizjologia jest bardzo zbliżona do naturalnych ludzkich enterocytów *in vivo*. Model Caco-2 został zastosowany do badania wchłaniania białek, lipidów, cukrów, jonów metali, witamin, przeciwutleniaczy, mikotoksyn i innych składników żywności.

**Słowa kluczowe:** przewód pokarmowy, trawienie *in vitro*, biodostępność, modele

### **Wprowadzenie**

Badaniu biodostępności składników pokarmowych, mineralnych, witamin, a także przeciwutleniaczy roślinnych poświęcono wiele publikacji [6, 7, 10, 17, 18].

---

*Mgr inż. M. Neumann, mgr inż. K. Grajek, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, 60-627 Poznań, ul. Wojska Polskiego 48, dr inż. K. Goderska, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, 60-624 Poznań, ul. Wojska Polskiego 31*

Pojęcie to jest różnie definiowane w literaturze, niemniej wyraża ono stopień, w jakim dany składnik odżywczy może zostać uwolniony i wchłonięty z przewodu pokarmowego oraz wykorzystany przez organizm. Biodostępność (ang. oral bioavailability) można więc rozpatrywać jako sumę trzech następujących po sobie procesów:

- uwalniania składnika z matrycy organicznej w przewodzie pokarmowym (biodostępność),
- transportu przez ścianę jelit w głąb organizmu (wchłanianie),
- rozkładu danego składnika w organizmie, w tym w jelitach i wątrobie, oraz wprowadzenie go do centralnego krwioobiegu (metabolizm).

Należy podkreślić, że badanie biodostępności składników odżywczych jest zagadnieniem jeszcze mało poznanym, dlatego wymaga dużo większej uwagi.

Produkty spożywcze występują w dwóch postaciach: ciekłej i stałej. Szczególnie skomplikowaną strukturę mają produkty stałe zbudowane ze złożonej matrycy organicznej, w której rozmieszczone są różne składniki pokarmowe. Dostępność danego składnika będzie więc funkcją jego właściwości dyfuzyjnych i podatności matrycy na trawienie jelitowe. Biodostępność składników podanych doustnie w czystej formie jest zwykle dużo większa niż biodostępność tego samego składnika znajdującego się w matrycy produktu spożywczego, gdyż do jego wchłonięcia potrzebne jest najpierw uwolnienie z matrycy. W wielu przypadkach poszczególne składniki pokarmowe są chemicznie związane z innymi składnikami, co znacznie ogranicza ich uwalnianie w jelitach.

Z biodostępnością związane jest także pojęcie strawności, czyli podatności produktów lub składników odżywczych na działanie enzymów trawiennych. Określa się strawność poszczególnych składników żywności, np. strawność białek, tłuszczów, węglowodanów, a także pokarmu jako całości. Wielkocząsteczkowe związki przed przeniknięciem przez ścianę przewodu pokarmowego muszą ulec depolimeryzacji do odpowiednio małych cząsteczek. Możliwe jest to w procesie trawienia, które przebiega z udziałem wielu różnych enzymów wydzielanych z sokami trawiennymi do przewodu pokarmowego. Strawność produktów żywnościowych można ocenić określając współczynniki strawności organizmu ludzkiego lub zwierzęcego (strawność *in vivo*) oraz badając stopień hydrolizy enzymatycznej tych produktów w warunkach laboratoryjnych (strawność *in vitro*).

W przypadku oznaczenia strawności *in vitro* buduje się tzw. sztuczny model przewodu pokarmowego. Dlatego też głównym celem niniejszej pracy było przedstawienie różnych modeli *in vitro* imitujących w miarę możliwości procesy zachodzące w warunkach *in vivo*. Modele te są dużo szybszym i tańszym sposobem w porównaniu z badaniami prowadzonymi na zwierzętach. W publikacjach naukowych opisano badania, w których wykorzystano mniej lub bardziej zautomatyzowane

modele przewodów pokarmowego *in vitro*. Najbardziej zaawansowanym modelem przewodów pokarmowych jest holenderski model TNO, monitorowany komputerowo, w którym oprócz regulacji pH i dodatku odpowiednich enzymów, imitowane są ruchy perystaltyczne i wchłanianie przez ścianę jelit [19, 20]. Znane też są badania, w których trawienie w przewodzie pokarmowym próbowano symulować poprzez stworzenie odpowiednich warunków w prostych naczyniach laboratoryjnych [6, 18, 30].

### **Przewód pokarmowy człowieka w warunkach *in vivo***

Przewód pokarmowy człowieka ma długość około 5,5–6 m. Głównymi częściami układu pokarmowego są: jama ustna, gardło, przełyk, żołądek, jelito cienkie, jelito grube i gruczoły trawienne (ślinianki, wątroba, trzustka). Podstawową funkcją przewodów pokarmowych jest przede wszystkim zaopatrywanie ustroju w składniki odżywcze i wodę.

Pierwszym odcinkiem układu pokarmowego człowieka jest jama ustna. W niej dochodzi do pierwszej modyfikacji pokarmu poprzez żucie, miażdżenie, mieszanie ze śliną oraz jego nawilżanie i częściowe trawienie. Żucie ma duże znaczenie dla procesów trawienia, gdyż rozdrobnienie pokarmu w jamie ustnej ułatwia jego rozpad enzymatyczny w dalszych odcinkach przewodów pokarmowych. Poza tym zapewnia także mieszanie kęsa pokarmowego ze śliną i częściowe trawienie węglowodanów przez zawartą w ślinie ptialinę (tab. 1). Ilość wydzielanej śliny w warunkach spoczynkowych wynosi ok. 0,5 ml/min, natomiast po silnym pobudzeniu wydzielniczym pokarmem może się zwiększyć nawet do 10 ml/min [12]. Przy zwiększonej produkcji śliny zwiększa się też ilość wydzielanych jonów wapnia, sodu, chloru i amylazy.

Z jamy ustnej pokarm przedostaje się do gardła, gdzie jest formowany w kęs i zostaje połknięty, tzn. za pomocą mięśni gardła i języka wtłoczony do przełyku na zasadzie odruchu. W przełyku ruch kęsów zachodzi dzięki przechodzącej fali perystaltycznej (tzw. ruch robaczkowy). Długość tej trasy wynosi około 23–25 cm (tab. 2). Ujście przełyku do żołądka zamyka pierścień mięśni gładkich, zwany zwieraczem. Podczas gdy fala skurczów perystaltycznych przemieszcza się wzdłuż przełyku, mięśnie zwieracza odruchowo rozluźniają się i kęs pokarmu dostaje się do żołądka [16].

Żołądek jest najszerszym odcinkiem przewodów pokarmowych. Ma kształt grubego, umięśnionego worka. Błona śluzowa w pustym żołądku jest silnie pofałdowana. W miarę wypełniania żołądka pokarmem fałdy śluzówki ulegają wygładzeniu, a ściany żołądka rozciągają się, ściśle obejmując jego zawartość. Pojemność żołądka wynosi przeciętnie 1,5 litra, ale może wzrosnąć nawet do 6 litrów [16]. Powierzchnię błony śluzowej żołądka wyściela jednowarstwowy nabłonek

walcowaty, który wydziela duże ilości śluzu. Na powierzchni tej widoczne są liczne punktowe ujścia gruczołów żołądkowych, tzw. dołączki żołądkowe, których jest ok. 4 mln.

W żołądku gromadzi się, wyjąławia, miesza i częściowo trawi spożyty pokarm. Tutaj wydzielany jest sok żołądkowy o pH  $1,2 \pm 0,3$  i gęstości 1,006–1,009 g/ml. Sok żołądkowy to mieszanina enzymów, mucyny, czyli śluzu, wodnego roztworu HCl i innych związków organicznych i nieorganicznych (tab. 1). Występujący w żołądku kwas solny wydzielany jest przez komórki okładzinowe gruczołów żołądkowych w stężeniu ok. 0,5%. Wydzielina komórek okładzinowych zawiera ok. 90–170 mM HCl/l, a jej pH wynosi ok. 0,9. W żołądku część kwasu solnego ulega rozcieńczeniu treścią żołądkową, a pozostała zbuforowaniu przez białka, których zjonizowane grupy karboksylowe jako zasady (akceptory protonów) przyłączają jony wodorowe. W efekcie tego w żołądku występuje wysokie stężenie wolnych jonów wodorowych (kwasowość wolna) i pewna część jonów  $H^+$  związanych z białkami czy innymi związkami kwasowymi (kwasowość związana).

Kwas solny ulega w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego zobojętnieniu pod wpływem słabo zasadowych soków trzustkowego i jelitowego. Czynnikiem zobojętniającym jest ten sam jon  $HCO_3^-$ , który powstaje podczas tworzenia HCl. Wydzielający się  $CO_2$  powoduje burzenie się i mieszanie treści pokarmowej, co w efekcie wzmacnia ruchy perystaltyczne jelit i ułatwia trawienie.

Czas zalegania pokarmu w żołądku zależy w dużym stopniu od kaloryczności posiłku. Opróżnianie żołądka jest regulowane w taki sposób, aby w tym samym czasie utrzymać dopływ do dwunastnicy jednakowej ilości kalorii, zwykle 2 kcal/min [15]. Po 2–4 godz. zalegania w żołądku miazga pokarmowa, która powstaje z treści pokarmowej w wyniku wymieszania jej z sokami żołądkowymi, przesuwa się powoli w stronę ujścia żołądka (tzw. odźwiernika) do dwunastnicy, stanowiącej pierwszy odcinek jelita cienkiego. Czas przebywania miazgi pokarmowej w żołądku zależy od rodzaju spożytego produktu. Posiłki bogate w tłuszcze i białka mogą opóźnić opróżnianie żołądka [5]. W skrajnych przypadkach, przy bardzo obfitym i tłustym posiłku, zaleganie pokarmu w żołądku może wynosić nawet 16 godz.

Tougas i wsp. [27] w swoich badaniach wykazali, że godzinę po spożyciu posiłku zawierającego mało tłuszczu, w żołądku pozostaje 69% treści pokarmowej, po 120 min 24%, a po 240 min zaledwie 1,2%. W innych badaniach wykazano, że opróżnienie połowy żołądka po spożyciu posiłku bogatego w tłuszcz zajmuje 108 min, natomiast posiłku bogatego w węglowodany ok. 84 min [23].

Jelito cienkie składa się z trzech części: dwunastnicy, jelita czczego i jelita krętego. Całkowitą długość jelita cienkiego trudno jest jednoznacznie określić. Dane literaturowe podają różne długości tego odcinka przewodu pokarmowego, mieszczące się w przedziale 3–7 m. Różnice w poszczególnych długościach są związane ze

sposobem i różnym czasem ich mierzenia (np. przyżyciowo i pośmiertnie). Długość jelita mierzona pośmiertnie jest większa (6–8 m) z powodu zaniku napięcia mięśniowego [3, 16]. Długości poszczególnych części jelita cienkiego podano w tab. 1.

Jelito cienkie jest specjalnie przystosowane do wchłaniania strawionego pokarmu dzięki dużej powierzchni wewnętrznej wyścielonej błoną śluzową. Tak duża powierzchnia wymiany jest związana z obecnością fałdów śluzówki jelita, dużą gęstością kosmków jelitowych pokrywających całą powierzchnię śluzówki oraz mikrokosmków pokrywających powierzchnię komórki nabłonka jelit. Kosmki jelitowe zwiększają powierzchnię chłonną jelita 8-krotnie. Ogólnie w jelicie jest ich około 90 mln. Generalnie czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim szacuje się średnio na 3 godz. (1–6 godz.).

W dwunastnicy, czyli pierwszym odcinku jelita cienkiego, zachodzi większość chemicznych i enzymatycznych procesów trawiących węglowodany, białka i tłuszcze. Do dwunastnicy uwalniane są enzymy trzustki i żółć z wątroby (tab. 1). Natomiast enzymy produkowane w komórkach nabłonka wyścielającego dwunastnicę katalizują etap trawienia papki pokarmowej głównie w jelicie cienkim.

Narządami pomocniczymi wspomagającymi trawienie i wchłanianie jelitowe są trzustka, wątroba i pęcherzyk żółciowy. Trzustka jest długim i wąskim gruczołem, ułożonym w pętli dwunastnicy poprzecznie za żołądkiem. Wydziela ona sok trzustkowy w ilości 1–1,5 l na dobę. Sok jest cieczą klarowną, bezbarwną o gęstości 1,007–1,014 g/ml; ma odczyn zasadowy (pH 8,0–8,3) uwarunkowany głównie dużą zawartością  $\text{NaHCO}_3$ , którego stężenie wynosi około 100 mM/l. Ze składników nieorganicznych występują w nim przede wszystkim chlorki i wodorowęglany sodu. Te ostatnie zubożniają kwas solny treści żołądkowej, co jest ważne dla procesów trawienia w jelicie. Ze związków organicznych najważniejsze są enzymy, dzięki którym odbywa się w jelitach trawienie trzech podstawowych składników pokarmowych: białek, tłuszczów i cukrów [16].

Żółć wytwarzana przez wątrobę gromadzi się w woreczku żółciowym, który pod wpływem bodźca, jakim jest kontakt dwunastnicy z tłuszczami, kurczy się i wydziela żółć do jelita. Zwykle w pierwszych 30 min trawienia objętość woreczka żółciowego zmniejsza się o połowę. W dwunastnicy w stanie na czczo stężenie żółci wynosi ok. 1–5 g/l treści pokarmowej (chymy). Po spożyciu tłustego posiłku wzrasta nawet do 30–

Tabela 1

Biologiczne i fizyczne parametry przewodu pokarmowego człowieka [6, 11, 12, 14, 16, 17].

Biological and physical properties of human alimentary tract [6, 11, 12, 14, 16, 17].

Odcinek przewodu pokarmowego Part of alimentary tract	Długość odcinka Length [cm]	Powierzchnia Surface	pH	Czas zalegania pokarmu Food residence time	Wydzielina trawienna Secretion fluids	Dziennie wydzielanie Daily secretion [dm <sup>3</sup> ]	Miejsce wytworzenia Place of production	Enzym trawienny Digestive enzymes	Optimum pH (aktywator) pH optimum (activator)	Substrat Substrate
Jama ustna Mouth	-	100 cm <sup>2</sup>	6,5	s; min	Ślina Saliva	1,0–1,5	Gruczoły ślinowe Saliva glands	α-amylaza ślinowa (ptialina) Saliva α-amylase	6,6–6,8 (Cl <sup>-</sup> )	Skrobia, Glikogen Starch, Glycogen
								Lipaza ślinowa Saliva lipase	4,0–4,5	Triacylo-glicerole Triacylglycerols
Żołądek Stomach	0,25	3,5 m <sup>2</sup>	1,0–2,0	1,5-4 h	Sok żołądkowy Gastric fluid	1,5–2,5	Gruczoły żołądkowe Gastric glands	Pepsyna Pepsin	1,0–2,0 (HCl)	Białka Protein
								Lipaza żołądkowa Gastric lipase		Acyloglicerole Acylglycerols
								Renina Renin	4,0 (Ca <sup>++</sup> )	Kazeina Casein
Dwunastnica Duodenum	20-35	1,9 m <sup>2</sup>	4,0–5,5	0,5-0,75 h	Sok trzustkowy Pancreatic fluids	1,0–1,5	Trzustka Pancreas	Amylaza trzustkowa Pancreatic amylase	~ 7,1 (Cl <sup>-</sup> )	Skrobia, Glikogen Starch, Glycogen
								Lipaza trzustkowa Pancreatic lipase	~ 8,0 (żółć, fosfolipidy) (bile, phospholipids)	Acyloglicerole Acylglycerols
								Trypsyna (trypsinogen) Trypsin (trypsinogen)	~ 7,9 Enterokinaza Enterokinase	Białka, polipeptydy Protein, polypeptides
								Chymotrypsyna (chymotrypsynogen) Chymotrypsin (chymotrypsinogen)	~ 8,0 Trypsyna Trypsin	Białka, polipeptydy Protein, polypeptides

								Elastaza (proelastaza)	Trypsyna Trypsin	Białka (elastyna), polipeptydy Protein (elastin), polypeptides
								Karboksy- peptydaza (Prokarboksy- peptydaza) Carboxypeptidase (Procarboxy- peptidase)	Trypsyna Trypsin	Polipeptydy, oligopeptydy Poly- and oligopeptides
								Rybonukleaza Ribonuclease		RNA
								Deoksyrybo-nukleaza Deoxyribonuclease		DNA
					Żółć Bile	0,5–1,0	Wątroba Liver	Sole żółciowe Bile salts	7,0–8,0	Tłuszcze Fats
Jelito czcze Jejunum	250-280	184 m <sup>2</sup>	5,5–70	1,5-2,0 h	Sok jelitowy Intestinal fluids	~1,0	Gruczoły jelitowe Intestinal glands	Lipaza jelitowa Intestinal lipase	Żółć, fosfolipidy Bile, phospho- lipids	Acyloglicerole Acylo-glycerols
Jelito kręte Ileum	350-420	276 m <sup>2</sup>	7,0– 7,5	5,0 -7,0 h				Fosfataza alkaliczna Alkaline phosphatase		Fosfolipidy Phospholipids
Okreźnica i odbytnica Colon and rectum	148-150	1,3 m <sup>2</sup>	7,0– 7,5	1-60 h	Śluz Mucus	~0,2	Komórki kubkowe nabłonka jelitowego Globlet cells	–	7,5–8,0	–

60 g/l chymy (15–30 mM). Średnie stężenie żółci po posiłku wynosi 7–15 mM. Na tak wysokim poziomie utrzymuje się aż do opróżnienia żołądka. Szczególnie silnym bodźcem powodującym wydzielanie żółci są długołańcuchowe triacyloglicerole. Jej stężenie w dwunastnicy i jelicie czczym jest podobne, natomiast szybko zmniejsza się w jelicie krętym, gdzie następuje wchłanianie soli żółciowych z wykorzystaniem mechanizmu transportu aktywnego. Część soli żółciowych spływa do jelita grubego.

Gruzoły śluzówki jelita cienkiego wydzielają do światła przewodu sok jelitowy. Jest to bezbarwna, klarowna ciecz o gęstości ok. 1,010 g/ml, o odczynie lekko zasadowym (pH 7–8). Sok jelitowy zawiera ok. 0,5% NaCl, 0,3% NaHCO<sub>3</sub> i 1% białka. Występują w nim wszystkie rodzaje enzymów, które potrzebne są do przekształcania składników pokarmowych w substancje przyswajalne dla organizmu [16].

Końcowym odcinkiem przewodu pokarmowego jest jelito grube, które ciągnie się od zastawki krętniczo-kątniczej aż do odbytu. Podstawowymi funkcjami jelita grubego są: wchłanianie wody i elektrolitów, formowanie, gromadzenie i okresowe wydalanie kału oraz utrzymywanie wzrostu bogatej flory bakteryjnej. Jelito grube dzieli się na jelito ślepe wraz z wyrostkiem robaczkowym, okrężnicę i odbytnicę razem z kanałem odbytowym (tab. 1). Okrężnica z kolei dzieli się na część wstępującą, poprzeczną, zstępującą i esowatą. Według Snyder i wsp. [25], pierwszy odcinek okrężnicy ma długość 18 cm, a kolejne 50, 30 i 40 cm. Uwzględniając pozostałe części, czyli jelito ślepe (7 cm) i odbytnicę (15 cm), całkowita długość jelita grubego wynosi 160 cm. Szacuje się, że człowiek wypija dziennie średnio 2–3 l płynów, jelita wydzielają 7–8 l soków oraz wchłaniają i wydalają ok. 8–10 l wody. Proporcje objętościowe między spożytymi pokarmami a wydzielinami w poszczególnych odcinkach jelit kształtują się następująco: 1,5 (pobranego pokarmu) : 1 (śliny) : 2 (płynów żołądkowych) : 2 (soków trzustkowych) : 1 (żółci) [24, 26, 29]. Proporcje te mogą być zalecane w sztucznych modelach przewodu pokarmowego.

Enzymy trawienne i inne wydzieliny jelitowe są niszczące dla nabłonka jelitowego. W warunkach naturalnych jest on chroniony warstwą śluzu jelitowego wytwarzanego przez gruczoły Brunnera i krypty Liberkuehna występujące na całej powierzchni jelita cienkiego. Ilość produkowanego śluzu sięga dziennie do 1–1,8 l. Śluz ten ma odczyn lekko alkaliczny (pH 7,5–8,0). Przeważająca część śluzu jest szybko wchłaniana przez kosmki nabłonka jelitowego. Śluz cyrkulujący między kryptami a kosmkami ułatwia absorpcję składników pokarmowych. Do jelita grubego trafia dziennie ok. 1,5 l chymy. Tutaj następuje wchłanianie wody i elektrolitów, co powoduje, że z kałem organizm ludzki opuszcza zaledwie ok. 0,1 l wody.

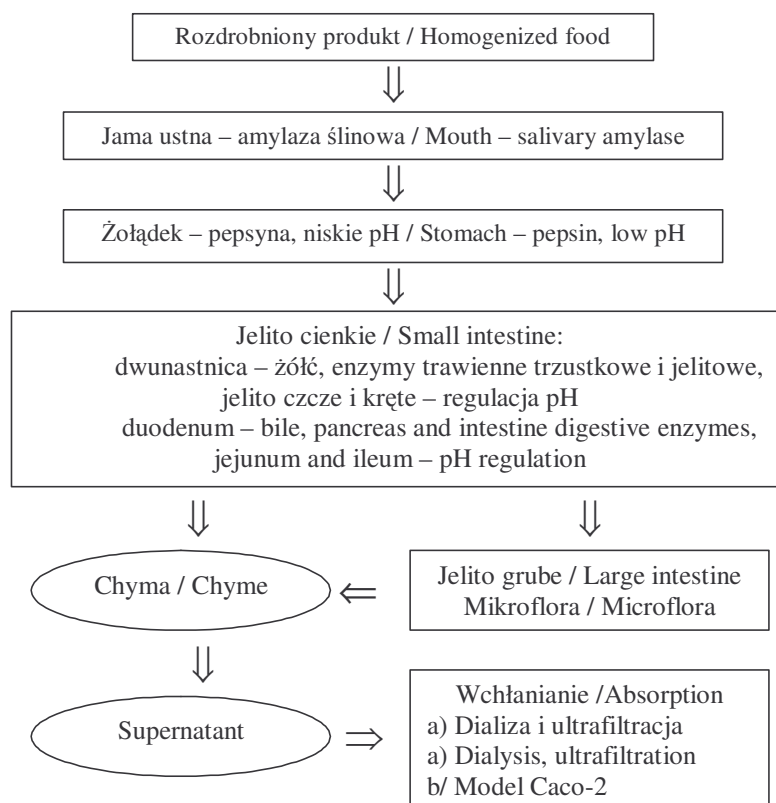
### Modele przewodu pokarmowego *in vitro*

Badanie biodostępności składników pokarmowych i leków w warunkach naturalnych jest bardzo utrudnione, na co decydujący wpływ ma trudny dostęp do światła przewodu pokarmowego człowieka, szczególnie na odcinku jelita cienkiego. Wpłynęło to na szybki rozwój badań prowadzonych na układach modelowych *in vitro*, symulujących mniej lub bardziej dokładnie układ pokarmowy człowieka. Większość opisanych modeli *in vitro* składa się z systemu dwu- lub trójczłonowego: żołądek –



jelito cienkie, jama ustna – żołądek – jelito cienkie lub żołądek – jelito cienkie – jelito grube (rys. 1).

Jednym z pierwszych modeli przewodu pokarmowego *in vitro* był model stworzony przez Millera i wsp. [18]. Imitacja procesów zachodzących w czasie trawienia przebiegała w prostych szklanych naczyniach laboratoryjnych. W modelu uwzględniono dwa etapy trawienia: żołądek i jelito cienkie. W celu stworzenia warunków odzwierciedlających procesy zachodzące w organizmie *in vivo* stosowano enzymy charakterystyczne dla poszczególnych etapów trawienia (pepsyna, sole żółciowe, ekstrakt trzustkowy) odpowiednie pH, w którym enzymy mogły być aktywne (2,0–7,4), właściwą temperaturę (37°C) oraz regulację kwasowości środowiska poprzez dodanie odpowiednio kwasu lub zasady (HCl, NaHCO<sub>3</sub>) (tab. 2.) Układ ten stworzono do badania biodostępności żelaza z wybranych produktów spożywczych.



Rys. 1. Schemat typowego modelu *in vitro* przewodu pokarmowego.

Fig. 1. Scheme of typical model of alimentary tract *in vitro*.

Według danych literaturowych [1, 14], ponad 90% wchłaniania produktów trawienia zachodzi właśnie w jelicie cienkim. Większość powstałych modeli przewodu pokarmowego *in vitro* składa się tylko z żołądka i jelita cienkiego. Produkt poddawany trawieniu odpowiednio wcześniej musi być zhomogenizowany. W ten sposób imituje

się etap gryzienia i rozdrabniania pokarmu w jamie ustnej. Niektóre modele uwzględniają trawienie enzymatyczne, jakie zachodzi w jamie ustnej *in vivo*, poprzez wprowadzenie do układu amylazy ślinowej.

Trawienie w żołądku symulowane jest przez dodanie pepsyny do zhomogenizowanego i rozpuszczonego w wodzie produktu. W większości badań nad biodostępnością, za minimalną dawkę pepsyny konieczną do optymalnego strawienia białek stosuje się minimum od 4000–5000 IU w ciągu 15 min w przeliczeniu na osobę w średnim wieku [5]. Czas trawienia w żołądku zależy od składu pożywienia. W większości prowadzonych badań proces ten prowadzono przez około 2 godz. (tab. 2). W jelicie cienkim imitacja trawienia zachodzi głównie przez dodatek ekstraktu trzustkowego i soli żółciowych. W skład ekstraktu trzustkowego wchodzi takie enzymy, jak: amylaza, trypsyna, rybonukleaza, proteaza i lipaza trzustkowa.

W żołądku pH ma wartość od 1,0 do 3,5, a w większości modeli utrzymywane jest na poziomie 2,0 (tab. 2). Przed posiłkiem pH soków jelitowych jest niższe i wynosi 4,9–6,4 w dwunastnicy, 4,4–6,5 w jelicie czczym i około 6,5–7,4 w jelicie krętym [5]. Po posiłku pH nieznacznie wzrasta i kształtuje się odpowiednio w poszczególnych odcinkach jelita cienkiego: 5,2–5,4 w dwunastnicy, 5,2–6,2 w jelicie czczym i 6,8–7,5 (a nawet 8,0) w jelicie krętym. Regulacja pH odbywa się przez dodatek kwasu solnego lub kwaśnego węgla sodu o różnym stężeniu (tab. 2). Temperatura we wszystkich modelach jest jednakowa i wynosi 37°C. Utrzymywana jest za pomocą łaźni wodnej. W większości badań *in vitro* mieszanie odbywa się za pomocą mieszadła magnetycznego lub wytrząsarek połączonych z łaźnią wodną. Tylko w niektórych publikacjach podano, z jaką częstotliwością wytrząsana jest zawartość treści żołądkowej [1, 7, 21, 22, 28]. Częstotliwość skurczów w żołądku wynosi średnio 3 cykle na min, a w jelicie cienkim w zależności od odcinka: w dwunastnicy 11,7/min, w jelicie krętym 8,9–9,8/ min.

W bardziej złożonych modelach uwzględnia się obecność soków: żołądkowego, jelitowego oraz żółci [17, 28]. W tym celu składa się je sztucznie poprzez dodatek odpowiednich soli organicznych i nieorganicznych. Na ogół przyjmuje się, że stężenie żółci powinno wynosić 7–15 mM. W modelach przewodu pokarmowego *in vitro* można zalecać następujące proporcje objętościowe (wagowe) między płynami jelitowymi: pokarm/ślina/płyn żołądkowy/żółć/sok trzustkowy, jak 1,5/1/2/1/2.

Należy podkreślić, że 90% spożytego pokarmu jest wchłaniana w dwunastnicy i jelicie czczym, a tylko 10% w żołądku i jelicie grubym. Symulacja wchłaniania w modelach *in vitro* strawionych wcześniej produktów odbywa się za pomocą membran dializacyjnych. W prostych układach są to najczęściej woreczki dializacyjne o średnicy porów zależnej od trawionych produktów 6000–8000 Da [30], lub 12000–15000 Da [7, 10]. W bardziej złożonych modelach stosuje się membrany typu hollow-fibre [19, 20]. Oba rozwiązania polegają na zjawisku transportu pasywnego, w którym zasadniczą rolę odgrywa zjawisko dyfuzji. System taki jest jednak bardzo daleki od warunków naturalnych, w których ściana jelitowa, a szczególnie nabłonek

Tabela 2

Parametry trawienia żołądka i jelita cienkiego w wybranych modelach *in vitro*.  
Parameters of digestion process in different *in vitro* models.

Żołądek Stomach	pH, (regulacja pH) pH regulation	Temp. [°C]	Czas trawienia [godz.] Digestion time [h]	Jelito cienkie Small intestine	pH, (regulacja pH) pH regulation	Czas trawienia [godz.] Digestion time [h]	Lit. Ref.
0,5 g (16 g pepsyny rozpuszczono w 100 ml 0,1 N HCl) 0.5 g (16 g pepsin dissolved in 100 ml 1.1N HCl)	2,0 (6 N HCl)	37	2	5 ml mieszaniny ekstraktu trzustkowego (4g/l) i soli żółciowych (25g/l) rozpuszczono w 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 5 ml pancreatic extract (4g/l) and bile salts (25 g/l) dissolved in 0.1M NaHCO <sub>3</sub>	7,0 (NaHCO <sub>3</sub> lub/or NaOH)	2,5	[18]
0,5 ml roztworu pepsyny (40 mg/ml 0,1 M HCl) 0.5 ml pepsin solution (40 mg/ml 0.1 M HCl)	2,0 (1 M HCl)	37	2	2,5 ml(2 mg ekstraktu trzustkowego i 12 mg soli żółciowych/ml 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> ) 2.5 ml (2 mg pancreatic extract and 12 mg bile salts/ml 0.1 M NaHCO <sub>3</sub> )	7,0	2	[6]
0,6-2,0 mg pepsyny rozpuszczono w 1 ml 20 mM HCl 0.6-2.0 mg pepsin dissolved in 1 ml 20mM HCl	2,5 (20 mM HCl)	37	2	0,4-0,7 g soli żółciowych rozpuszczono w 4 ml 150 mM NaHCO <sub>3</sub> , 10-75 mg ekstraktu trzustkowego rozpuszczono w 4 ml 150 mM NaHCO <sub>3</sub> 0.4-0.7 g bile salts dissolved in 4 ml 150 mM NaHCO <sub>3</sub> , 10-75 mg pancreatic extract dissolved in 4 ml 150 mM NaHCO <sub>3</sub>	6,9 (150 mM NaHCO <sub>3</sub> )	3	[1]
0,2 g pepsyny rozpuszczono w 5 ml 0,1 M HCl 0.2 g pepsin dissolved in 5 ml 0.1 M HCL	2,0	37	1	0,05 g ekstraktu trzustkowego i 0,3 g soli żółciowych w 25 ml 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 0.05 g pancreatic extract and 0.3 g bile salts in 25 ml 0.1 M NaHCO <sub>3</sub>	6,0 (1 M NaHCO <sub>3</sub> )	1	[10]

cd. tab. 2

31.500 U pepsyny 31,500 U pepsin	2,0 (stęż. HCl) (concentrated HCl)	37	2	5 ml mieszaniny ekstraktu trzustkowego (4g/l) i soli żółciowych (25g/l) 5 ml pancreatic extract (4 g/l) and bile salts (25 g/l)	7,5 (0,5 N NaHCO <sub>3</sub> )	2,5	[9]
1,6 ml roztworu pepsyny (16 g pepsyny rozpuszczono w 100 ml 0,1 N HCl 1.6 ml pepsin (16 g pepsin dissolved in 100 ml 0.1 N HCl)	2 (6 N HCl)	37	2	0,4 g ekstraktu trzustkowego i 2,5 g soli żółciowych rozpuszczono w 100 ml 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 0.4 g pancreatic extract and 2.5 g bile salts dissolved in 100 ml 0.1 M NaHCO <sub>3</sub>		2	[30]
3 g pepsyny (73.000 Anson J/g produktu) wprowadzono do buforu fosforanowego 3 g pepsin (73,000 Anson units/g) dissolved in phosphate buffer.	1,7 (0,2 N HCl)	37°C	4 h	brak jelita intestine defect (absence)			[14]
6% pepsyny w 0,15 M NaCl 6% pepsin in 0.15 M NaCl	3,0 (6 M HCl)	37°C	5 h	1,5% ekstrakt trzustkowy, 0,5% amylaza, 0,15% sole żółciowe rozpuszczone w 0,15 M NaCl 1.5% pancreatic extract, 0.5% amylase, 0.15% bile salts dissolved in 0.15 M NaCl	6,8	4 h	[2]
2,5 g pepsyny/l soku żołądkowego 2.5 g pepsin/l gastric juice	2-3	37°C	2 h	9 g pankreatyny i 1,5 g lipazy na litr sztucznego soku jelitowego; 30 g żółci na litr soku żołądkowego 9 g pancreatin and 1.5 g lipase/l artificial intestinal juice; 30 g bile/ g gastric juice	6,5 -7		[28, 29]

jelitowy, aktywnie kontroluje transport poszczególnych składników i uczestniczy w ich metabolizmie.

Poważne niedogodności, które występują w prostych modelach *in vitro* spowodowały, że do badań nad transportem produktów trawienia ze światła przewodu pokarmowego do krwi lub limfy wykorzystuje się coraz szerzej modele kultur komórek nabłonka jelitowego. Kultury takie, rosnąc w formie spójnej monowarstwy komórkowej, doskonale imitują morfologię i fizjologię jelitowych enterocytów. Do najpopularniejszych tego typu linii komórkowych należy linia Caco-2 [6, 7, 8, 21, 28]. Jest to ustalona linia nowotworowa, która wykazuje zdolność do wzrostu adherentnego na powierzchniach stałych i mikroporowatych membranach. W czasie hodowli przechodzi ona proces różnicowania, a po trzech tygodniach hodowli, przy pełnej konfluencji, tworzy monowarstwę wysoko spolaryzowanych komórek, o budowie typowej dla enterocytów, z jądrem w części podstawnej, gęstymi mitochondriami i rąbkem szczoteczkowym w części szczytowej. Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy (disacharazy i peptydazy) oraz białka transportowe, charakterystyczne dla komórek absorbujących nabłonek [13]. W badaniach nad transportem transnabłonkowym stosowana jest niekiedy linia komórkowa HT-29, jednak należy zaznaczyć, że linia ta jest typowa dla komórek nabłonka jelita grubego, gdzie wchłanianiu ulegają już tylko nieliczne składniki pokarmowe. Zdecydowana większość publikacji dotyczących wchłaniania składników pokarmowych przy użyciu kultur Caco-2 opisuje transport transnabłonkowy czystych chemicznie składników żywności. Tymczasem w normalnych warunkach składniki pokarmowe wprowadzane są w formie matrycy produktu spożywczego. Aby właściwie ocenić biodostępność poszczególnych składników i szybkość ich wchłaniania matryce organiczne, czyli produkty spożywcze, muszą być wstępnie poddane procesom trawienia w jednym z modeli sztucznego przewodu pokarmowego, które opisano powyżej. Uzyskana treść pokarmowa, o pH ok. 7,0, zawiera zarówno części rozpuszczone w płynie jelitowym, jak i niestrawione części stałe. Przed podaniem treści pokarmowej na powierzchnię nabłonka utworzonego przez monowarstwę komórek Caco-2 należy odwirować części stałe i wprowadzić supernatant na warstwę komórek Caco-2. Zaleca się delikatne wirowanie (2750 obr./min przez 5 min), aby ograniczyć niszczenie miceli utworzonych przez lipidy i żółć [29]. Model Caco-2 został zastosowany do badania wchłaniania białek, lipidów, cukrów, jonów metali, witamin, przeciwutleniaczy, mikotoksyn i innych składników żywności.

## Podsumowanie

Procesy zachodzące w układzie pokarmowym *in vivo* są bardzo złożone, dlatego też badania prowadzone nad skonstruowaniem sztucznego układu pokarmowego oraz odtworzenie jego działania jest bardzo skomplikowane. W ostatnim czasie zauważalny

jest znaczny postęp w tych badaniach. Do największych osiągnięć należy sztuczny przewód pokarmowy opracowany przez holenderskich naukowców (The Netherlands Organization for Applied Scientific Research, TNO), imitujący doskonale procesy trawienia różnych produktów. Model ten sterowany komputerowo odtwarza sekrecję soków żołądkowych i jelitowych, wydzielin gruczołów związanych z przewodem pokarmowym (sok trzustkowy, żółć), systematyczne wchłanianie strawionych składników przez ściany jelit oraz ruchy perystaltyczne w żołądku i jelicie.

Badania nad biodostępnością różnych składników odżywczych są niezbędne w pracy żywieniowców, farmaceutów opracowujących nowe leki i toksykologów do badania szkodliwości niektórych związków na organizm człowieka. Badania z użyciem modeli przewodu pokarmowego *in vitro* są alternatywą dla badań prowadzonych z udziałem ludzi i zwierząt. Są dużo tańsze i szybsze, a przy tym powtarzalne. Wykorzystując tego rodzaju modele bada się między innymi strawność i biodostępność surowców bogatych w przeciwutleniacze i ich wchłanianie do płynów ustrojowych, czy też określa się dawkę i sposób działania składników mineralnych i witamin na organizm człowieka.

*Pracę zrealizowano w ramach projektu badawczego zamawianego KBN- PBZ-KBN-094/P06/2003.*

### Literatura

- [1] Aura A. M., Harkonen H., Fabritius M., Poutanen K.: Development of *in vitro* enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J. Cereal Sci.*, 1999, **29**, 139-152.
- [2] Cabanero A.I., Madrid Y., Camara C.: Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **526**, 51-61.
- [3] Daugherty A., Mrsny R.: Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. Part 1. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1999, **2**, 144-151.
- [4] DeSesso J.M., Jacobson C.F.: Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2001, **39**, 209-228.
- [5] Ekmekcioglu C.: A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem.*, 2002, **76**, 225-230.
- [6] Gangloff M.B., Glahn R.P., Miller D.D., van Campen D.R.: Assessment of iron availability using combined *in vitro* digestion and Caco-2 cell culture. *Nutrition Research*, 1996, **16**, 479-487.
- [7] Garret D.A., Failla M.L., Sarama R.J. Development of an *in vitro* digestion method to access carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4301-4309.
- [8] Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R. J.: Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 574-580.
- [9] Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F., Tomas-Barberan F.A.: *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1035-1041.

- [10] Glahn R.P., Rassier M., Goldman M.I., Lee O. A. Cha J.: A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 62-68.
- [11] Glahn R.P., Wien E.M., van Campen D.R., Miller D.D.: Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.*, 1996, **126**, 332-339.
- [12] Guyton A.C.: Textbook of medical physiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991.
- [13] Hidalgo I.J. Raub T.J, Borchardt R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterol.*, 1989, **96**,736-749.
- [14] Hoebler C., Lecannu G., Belleville C., Devaux M.F., Popineau Y., Barry J. L.: Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2002, **53**, 389-402.
- [15] Hunt J.N., Stubbs D.F.: The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol.*, 1975, **245**, 209-225.
- [16] Konturek St.: Fizjologia układu trawiennego. PZWL. Warszawa 1985.
- [17] Krul C., Luiten-Schuite A., Tenfelde A., Ommem B., Verhagen H., Havenaar R.: Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Mutation Res.*, 2001, **474**, 71-85.
- [18] Miller D.D., Schricker B.R., Rasmussen R.R., van Campen D.B.: An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, **34**, 2248-2256.
- [19] Minekus M., Marteau P., Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. A multi compartmental dynamic computer controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA* 1995, **87**, 197-209.
- [20] Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau A., Alric M., Fonty G., Huis in't Veld J.H. J.: A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **53**, 108-114.
- [21] Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J., Groten J.P.: *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2003, **44**, 116-124.
- [22] Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C., Schoeters G., Verstraete W., Wiele T.V., Wragg J., Rempelberg C.J., Sips A.J., Wijnen J.V.: Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36**, 3326-3334.
- [23] Robertson M.D., Mathers J. C.: Gastric emptying rate of solids is reduced in a group of ileostomy patients. *Dig. Dis. Sci.*, 2000, **45**, 1285-1292.
- [24] Rotard W., Christmann W., Knoth W., Mailahn W.: Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. Simulation der Digestion mit Böden. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.*, 1995, **7**, 3-9.
- [25] Snyder W. S., Cook M.J., Nasset E.S., Karhausen L.R., Howells G.P., Tipton I.H. (Eds.). Report of the Task Group on Reference Man. Pergamon, New York 1975.
- [26] Tortora G.J., Grabowski S.R.: Principles of anatomy and physiology. Eighth Edition. HarperCollins Publishers Inc., 1996.
- [27] Tougas G., Eaker E.Y., Abell T.L., Abrahamsson H., Boivin M., Chen J., Hocking M. P., Quigley E.M., Koch K.L., Tokayer A.Z., Stanghellini V., Chen Y., Huizinga J.D., Ryden J., Bourgeois I., McCallum R.W.: Assessment of gastric emptying using a low fat meal: establishment of international control values. *Am. J. Gastroenterol*, 2000, **95**, 1456-1462.

- [28] Versantvoort C.H., Oomen A.G., van de Kamp E., Rompelberg C.J., Sips A.J.: Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43, 31-40.
- [29] Versantvoort C.H., van de Kamp E., Rompelberg C.J.: Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004, Bilthoven 2004.
- [30] Wolfgor R., Drago S.R., Rodriguez V., Pellegrino N.R., Valencia M.E.: *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. *Food Res. Int.*, 2002, 35, 85-90.

### THE IN VITRO MODELS OF GASTROINTESTINAL TRACT TO STUDY BIOAVAILABILITY OF NUTRIMENTS

#### S u m m a r y

Bioavailability of alimentary components is an important indicator at the estimation of the influence of the nutrition on the human health. Taking into account the difficulty in accessing to intestinal contents *in vivo*, some artificial models enabling research on the intestinal digestion and absorption *in vitro* were elaborated. This paper also presents structure and physiology of gastrointestinal tract *in vivo*. Many detailed data on composition and concentration of active substances in alimentary canal, kinetics of pH changes of intestinal fluids as well as the rate of passage and digestion of food in gastrointestinal tract are discussed. Basic models of gastrointestinal tract *in vitro* used for the investigation of the intestinal digestion and the absorption are also described. The majority of GI models consist of two - or three-stage systems including: stomach - small intestine, mouth - stomach - small intestine or stomach - small intestine - large intestine. The optimal weight (volume) ratio between different components of intestinal fluids: food/saliva/gastric juice/bile/pancreatic juice is 1.5/1/2/1/2. To study the transport of food compound across intestinal epithelium, two types of *in vitro* models are used: dialysis or ultrafiltration membranes and cell cultures of intestinal epithelium *in vitro*. The most commonly used cell line to study intestinal absorption is human intestine cell line Caco-2. Its morphology and physiology is very similar to the human small intestine enterocyte cells *in vivo*. The Caco-2 model was applied to study absorption of protein, carbohydrates, lipids, vitamins, metal ions, antioxidants, mycotoxins and other food ingredients.

**Key words:** gastrointestinal tract, digestion *in vitro*, bioavailability, models ☒