

ŹRÓDŁA ORAZ METODY POZYSKIWANIA HODOWLI PIERWOTNYCH LUB LINII KOMÓRKOWYCH WYKORZYSTYWANYCH W BADANIACH Z ZAKRESU ŻYWIENIA ZWIERZĄT – BADANIA PRZESIEWOWE PRZED BADANIAM IN VIVO

Joanna Romanek

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Żywienia Zwierząt
i Paszoznawstwa, 32-083 Balice k. Krakowa
E-mail: joanna.romanek@iz.edu.pl

 Joanna Romanek: <https://orcid.org/0000-0001-9068-4300>

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadania nr 03-30-01-09 finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Abstrakt

W ostatnich dekadach obserwuje się intensywny rozwój badań nad biodostępnością, wchłanianiem oraz transportem związków bioaktywnych, w tym leków i składników odżywczych w modelach komórkowych. Modele in vitro, takie jak hodowle pierwotne oraz linie komórkowe, odgrywają kluczową rolę jako narzędzie przesiewowe w ocenie działania dodatków paszowych, składników bioaktywnych oraz substancji wpływających na zdrowie i funkcjonowanie przewodu pokarmowego. Umożliwiają one analizę mechanizmów wchłaniania, cytotoksyczności, odpowiedzi zapalnej oraz integralności bariery jelitowej bez konieczności zaangażowania modeli zwierzęcych. Dodatkowo wstępna selekcja związków w warunkach in vitro pozwala na ograniczenie liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach in vivo. Celem niniejszej pracy jest przybliżenie wybranych, najczęściej stosowanych komercyjnych linii komórkowych wykorzystywanych w badaniach z zakresu żywienia zwierząt oraz przedstawienie wybranych metod sposobów izolacji hodowli pierwotnych enterocytów.

Słowa kluczowe: enterocyty, komórki Caco-2, linie komórkowe, hodowle pierwotne, hodowle in vitro

Wstęp

Badania nad biodostępnością, wchłanianiem i transportem związków bioaktywnych, leków oraz składników odżywczych w modelach komórkowych rozwijają się w intensywnym tempie (Rein i in., 2013). Dzięki takiemu podejściu możliwe jest zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach oraz szybsza identyfikacja najbardziej obiecujących związków do dalszych analiz biologicznych i farmakologicznych (Arora i in., 2011). W analizach dodatków paszowych i/lub leków stosowane są zarówno komercyjne linie komórkowe (Kus i in., 2023), jak i linie komórkowe wyizolowane oraz scharakteryzowane przez laboratorium prowadzące

dane badania (Loret i in., 2009; Romanek i in., 2018). Komercyjne linie komórkowe to standardowe modele biologiczne dostępne w sprzedaży, które zapewniają powtarzalność i porównywalność wyników pomiędzy różnymi ośrodkami badawczymi (Capes-Davis i in., 2019). Niestety istotnym ograniczeniem jest dostępność odpowiednich komercyjnych linii komórkowych, zwłaszcza gdy analizie poddawany jest mniej skomercjalizowany gatunek zwierzęcia. Większość dostępnych komercyjnie linii komórkowych pochodzi od ludzi lub kilku najczęściej badanych modeli zwierzęcych, takich jak myszy, szczury czy bydło. W przypadku mniej popularnych gatunków, takich jak drób, ryby hodowlane czy gatunki zwierząt dziko żyjących, oferta komercyjnych linii komórkowych jest znacznie ograniczona lub nie istnieje w ogóle (<https://www.cytion.com/>; <https://www.dsmz.de/>). To wpływa na możliwości prowadzenia badań w warunkach odzwierciedlających rzeczywiste reakcje organizmu danego gatunku. Hodowle pierwotne i/lub linie komórkowe wyizolowane i selekcionowane w laboratorium mogą lepiej odzwierciedlać specyficzne warunki biologiczne lub gatunkowe istotne dla danego badania. Umożliwia to bardziej precyzyjną ocenę skuteczności oraz bezpieczeństwa dodatków paszowych lub leków (Kaur i Dufour, 2012; Park i in., 2024). Niestety izolowanie pierwotnych linii komórkowych lub kultur pierwotnych wiąże się z szeregiem istotnych ograniczeń oraz trudności o charakterze technicznym, organizacyjnym i ekonomicznym (Romanek i in., 2018). Proces ten wymaga znacznych nakładów czasu, pracy oraz środków finansowych. Powodzenie izolacji jest w dużym stopniu uzależnione od dostępu do odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego, obejmującego przede wszystkim sterylne pomieszczenia, specjalistyczny sprzęt do hodowli komórkowych oraz wysokiej jakości odczynniki biologiczne. Kluczowe znaczenie mają również wysokie kwalifikacje i doświadczenie personelu badawczego, ponieważ błędy techniczne mogą prowadzić do zanieczyszczenia hodowli, utraty żywotności komórek bądź zmian w ich właściwościach biologicznych. Dodatkowymi trudnościami są ograniczona trwałość oraz znaczna podatność komórek pierwotnych na stres hodowlany, co sprawia, że mogą być one utrzymywane w kulturze jedynie przez krótki okres bez utraty swojego fenotypu i funkcji. Ponadto po wyizolowaniu komórki wymagają szczegółowej charakterystyki w celu potwierdzenia ich swoistego i niezmienionego charakteru, co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia dodatkowych, często czasochłonnych i kosztownych analiz molekularnych oraz biochemicznych. Wybór linii komórkowej do badań zależy od celu badania, dostępności materiału biologicznego, ale także wymagań dotyczących walidacji i standaryzacji testów, jakim chcemy poddać analizowane komórki (Geraghty i in., 2014).

Linie komórkowe wykorzystywane w badaniach dodatków paszowych i/lub leków dostępne komercyjnie

Komórki Caco-2

Linia komórkowa Caco-2, wywodząca się z ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego, jest linią modelową służącą do oceny wchłaniania jelitowego oraz oddziaływania substancji bioaktywnych na komórki nabłonka jelitowego (Kamiloglu i in., 2015). Po osiągnięciu konfluencji, komórki Caco-2 spontanicznie różnicują się do fenotypu enterocytów, wytwarzając zwarte monowarstwy o właściwościach funkcjonalnych, zbliżonych do ludzkiego nabłonka jelitowego (Isayama i in., 2023). Dzięki tym cechom linia Caco-2 znajduje zastosowanie w badaniach przesiewowych substancji czynnych zawartych zarówno w lekach, jak i dodatkach paszowych, umożliwiając ocenę ich wchłaniania, cytotoksyczności, biodostępności oraz wpływu na integralność bariery jelitowej (Sasaki i in., 2022). Model ten stanowi cenne narzędzie szczególnie w kontekście alternatyw dla badań *in vivo*, zgodnych z zasadami 3R (Replacement, Reduction, Refinement), umożliwiając wstępną selekcję i optymalizację dawek substancji przed przejściem do badań na zwierzętach (Garcia i in., 2018).

W przypadku dodatków paszowych wykorzystanie komórek Caco-2 pozwala ocenić m.in. ich wpływ na funkcjonalność bariery jelitowej, poziom ekspresji nośników składników odżywczych, a także potencjalne działanie immunomodulujące i cytotoksyczne (Sambuy i in., 2005). Jest to szczególnie istotne w kontekście poszukiwania nowych, bezpiecznych i skutecznych substancji bioaktywnych (np. probiotyków, prebiotyków, fitobiotyków), które mogą wspierać zdrowie i produktywność zwierząt gospodarskich (Kus i in., 2023). W badaniach nad lekami model Caco-2 pozwala na oszacowanie potencjalnej biodostępności oraz identyfikację interakcji z nośnikami, co ma kluczowe znaczenie w ocenie bezpieczeństwa i skuteczności produktów farmaceutycznych (Hubatsch i in., 2007).

Zastosowanie komórek Caco-2 w badaniach *in vitro* jest zarówno praktyczne i ekonomiczne, ale także naukowo uzasadnione jako wstępny etap analizy działania substancji czynnych, zarówno w weterynarii, jak i w medycynie człowieka.

Inne linie komórkowe wykorzystywane w badaniach dodatków paszowych i/lub leków

Jedną z najczęściej stosowanych jest linia IPEC-J2, wywodząca się ze świńskich enterocytów pozyskanych z jelita czczego prosiąt. Komórki te służą jako model bariery jelitowej u świni i są wykorzystywane do oceny wpływu dodatków paszowych na zdrowie jelit, procesy wchłaniania, cytotoksyczność oraz odpowiedź zapalną. Ze względu na swoje właściwości fizjologiczne IPEC-J2 są często wykorzystywane w badaniach weterynaryjnych i żywieniowych (Wang i in., 2021). Innym przykładem jest linia CLAB, pochodząca z komórek wątroby kury. Stosowana jest głównie w badaniach nad metabolizmem dodatków paszowych, a także do oceny ich działania antyoksydacyjnego oraz potencjalnej toksyczności (Steube i in., 2012). Linia MAC-T, pochodząca z komórek nabłonka gruczołu mlekowego bydła, znajduje zastosowanie w ocenie wpływu dodatków paszowych na wydzielanie mleka oraz zdrowie gruczołu mlekowego (Ogunnaike i in., 2021). Natomiast linia komórek HT-29 pochodzi z ludzkiego nowotworu jelita grubego, ale w przeciwieństwie do komórek Caco-2 komórki HT-29 mogą różnicować się w kierunku komórek kubkowych, co pozwala na badanie wydzielania śluzu oraz interakcji składników pokarmowych z warstwą śluzową jelita. Linia ta jest szeroko stosowana w badaniach nad odpornością jelitową oraz działaniem substancji bioaktywnych, w tym pre- i probiotyków (Pradhan i in., 2023). W badaniach nad rozwojem jelit i strawnością u niemowląt wykorzystywane są również komórki HIEC (Human Intestinal Epithelial Cells), pochodzące z ludzkiego nabłonka jelitowego. Charakteryzują się one bliższym fizjologicznemu obrazem funkcjonowania jelita niż linie nowotworowe i pozwalają na bardziej precyzyjne odwzorowanie procesów trawienia oraz absorpcji składników odżywczych (Lopez-Escalera i Wellejus, 2022).

W przypadku analiz cytotoksyczności zadanego dodatku i /lub leku wykorzystywane są różnorodne linie komórkowe, z których każda znajduje zastosowanie w określonym zakresie analiz. Jedną z najstarszych i najlepiej poznanych jest linia HeLa, wywodząca się z ludzkiego raka szyjki macicy. Komórki te są powszechnie stosowane w badaniach przesiewowych leków przeciwnowotworowych oraz w analizach toksyczności ogólnej (Park, 2017). Linia HepG2, pochodząca z ludzkiego raka wątrobowokomórkowego, jest ceniona ze względu na zdolność do syntezy enzymów detoksykacyjnych, takich jak cytochrom P450. Dzięki temu znajduje zastosowanie w badaniach toksyczności metabolicznej oraz hepatotoksyczności (Kitano i in., 2022). W testach cytotoksyczności zgodnych z normami ISO często wykorzystywane są fibroblasty mysie linii L929. Komórki te odgrywają istotną rolę w ocenie biokompatybilności materiałów medycznych (Kim i in., 2022). Linia Vero, pochodząca z nerki afrykańskiej małpy zielonej, jest szeroko stosowana w badaniach nad wirusami, szczepionkami oraz w analizach toksyczności produktów biologicznych (Todd i Tripp, 2020). Z kolei komórki MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), wyizolowane z nerki psa, wykorzystywane są jako model do badań nad transportem przez błony komórkowe oraz toksycznością nerkową (Ye i in., 2021).

Każda z wyżej wymienionych linii ma określone właściwości biologiczne i metaboliczne, które determinują ich przydatność w konkretnym typie badania. Zastosowanie wielu linii komórkowych jednocześnie pozwala na kompleksową ocenę toksyczności oraz identyfikację specyficznych mechanizmów działania testowanych substancji.

Hodowle pierwotne wykorzystywane w badaniach dodatków paszowych i/lub leków

Jak wspomniano wcześniej, dostępność komercyjnych linii komórkowych pochodzących z niektórych gatunków jest ograniczona. Dlatego też laboratoria izolują hodowle pierwotne z bezpośrednio z tkanek dla potrzeb danego badania i przeprowadzanych analiz. W badaniach z zakresu żywienia zwierząt wykorzystywane są hodowle enterocytów. Enterocyty to wyspecjalizowane komórki nabłonka jelita cienkiego, które odgrywają kluczową rolę w procesie wchłaniania składników odżywczych z przewodu pokarmowego (Tümer i in., 2013). Ich powierzchnia jest wyłożona mikrokosmkami, co znacząco zwiększa powierzchnię absorpcyjną i umożliwia efektywne przyswajanie witamin, minerałów oraz innych substancji odżywczych (Kieła i Ghishan, 2016). Enterocyty są również zaangażowane w barierę immunologiczną, chroniąc organizm przed patogenami obecnymi w treści jelitowej. Ich funkcjonowanie jest niezbędne dla utrzymania homeostazy metabolicznej i prawidłowego funkcjonowania układu pokarmowego (Ambrogi i Vezina, 2024).

Sposoby izolacji komórek

Izolacja enterocytów, czyli komórek wyścielających jelito, może być przeprowadzana na kilka różnych sposobów, w zależności od celu badania i dostępnych metod (tab. 1).

Tabela 1. Przykładowe sposoby izolacji enterocytów z tkanki jelita cienkiego
Table 1. Examples of methods for isolating enterocytes from small intestine tissue

Sposób izolacji komórek Method of cell isolation	Opis / zastosowanie Description / application
Izolacja przy użyciu płynu dysocjacyjnego (Vermeire i in., 2021) Isolation using dissociation solution (Vermeire et al., 2021)	Rozdzielanie komórek przez rozluźnienie połączeń międzykomórkowych przy pomocy roztworów dysocjacyjnych Separation of cells by loosening intercellular junctions using dissociation solutions
Izolacja przy użyciu trawienia enzymatycznego (Bader i in., 2000) Isolation using enzymatic digestion (Bader et al., 2000)	Rozpad macierzy zewnątrzkomórkowej za pomocą enzymów (np. tripsyna, kolagenaza, hialuronidaza) Degradation of the extracellular matrix using enzymes (e.g. trypsin, collagenase, hyaluronidase)
Metoda wykorzystująca wirowanie różnicowe (Rath i in., 2018) Method using differential centrifugation (Rath et al., 2018)	Rozdział komórek na podstawie różnicy masy i gęstości przez frakcjonowanie w wirówce Separation of cells based on differences in mass and density through centrifugation-based fractionation
Metoda izolacji wykorzystująca komercyjne odczynniki (np. Gentle Cell Dissociation Reagent, StemCell Technologies) (Stem Cell, 2023) Isolation method using commercial reagents (e.g. Gentle Cell Dissociation Reagent, StemCell Technologies) (Stem Cell, 2023)	Delikatne oddzielanie komórek przy pomocy komercyjnego odczynnika Gentle separation of cells using a commercial dissociation reagent
Izolacja przy użyciu hodowli eksplantatów (Chougule i in., 2012) Isolation using explant cultures (Chougule et al., 2012)	Migracja komórek z fragmentów tkanki umieszczonych w hodowli Migration of cells from tissue fragments placed in culture
Izolacja przy użyciu homogenizatora (Dópido i in., 2004) Isolation using a homogenizer (Dópido et al., 2004)	Mechaniczne rozbicie tkanek lub skupisk komórek Mechanical disruption of tissues or cell aggregates
Izolacja przy wykorzystaniu zeszkrobin (Tsvilikhovs'kyi, 1997) Isolation using scrapings (Tsvilikhovs'kyi, 1997)	Mechaniczne pozyskanie komórek przez zeszkrobienie powierzchni tkanek / Mechanical collection of cells by scraping the tissue surface

Izolacje komórek rozpoczyna się od wycięcia dziesięciocentymetrowych fragmentów jelita czczego. Fragmenty te natychmiast zanurza się w zimnym, sterylnym roztworze PBS, aby zapobiec degradacji tkanek. Następnie skrawki dokładnie płucze się w płynie PBS uzupełnionym o 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny, co ma na celu usunięcie zawartości jelit i zanieczyszczeń bakteryjnych (Rath i in., 2018, Vermeire i in., 2021).

Izolacja przy użyciu płynu dysocjacyjnego

Kolejnym krokiem jest wycięcie fragmentów jelita o długości około 5 cm. Tkanę inkubowano w 35 ml zimnego buforu dysocjacyjnego (I) zawierającym:

- 30 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA),
- 1,5 mM ditiotritolu (DTT),
- 6 µM inhibitora kinazy Rho (Y-27632),

Inkubację przeprowadza się przez 30 minut na lodzie, co 5 minut energicznie wytrząsając próbki przez 10–15 sekund, aby wspomóc oderwanie krypt.

Po tym czasie próbki przenosi się do ciepłego (37°C) buforu dysocjacyjnego (II) zawierającym:

- 30 mM EDTA,
- 6 µM Y-27632

Tę mieszkankę inkubuje się przez 10 minut na wytrząsarce orbitalnej, co ma na celu dalsze rozdzielanie krypt. Następnie tkankę przenosi się do zimnego, sterylnego PBS i inkubuje przez 5 minut, zwiększając częstotliwość wytrząsania do co 1–2 minuty. W kolejnym kroku zawartość próbki przepuszcza się przez sitko komórkowe o wielkości porów 70 µm do nowej 15 ml stożkowej próbki. Wyizolowane krypty odwiruje się przy 200 g przez 5 min, a następnie zawiesza w 1 ml zimnego płynu PBS. Tak wyizolowane krypty można wysiać do pożywki hodowlanej (Vermeire i in., 2021).

Izolacja przy użyciu trawienia enzymatycznego

Jelito przed trawieniem kroi się na małe kawałki o długości 1–2 mm. Następnie dokładnie przeemywa się w lodowatym roztworze PBS bez dodatku jonów magnezu i wapnia. Kolejnym krokiem jest trawienie tkanki przez 30 minut w temperaturze 37°C w mieszaninie do trawienia zawierającej mieszaninę pożywki hodowlanej DMEM o wysokiej zawartości glukozy, 1% surowicy płodowej bydlęcej (FBS), 200 U/ml kolagenazy, 100 U/ml hialuronidazy oraz 1x roztworu antybiotyku i związku przeciwwgrzybicznego (AAS). Po zakończeniu trawienia do próbki w celu inaktywacji trawienia dodaje się 5 ml FBS, a następnie wiruje się przy 100 g przez 3 min, aby oddzielić komórki od resztek tkanki. Uzyskany osad zawiesza się w roztworze PBS zawierającym AAS, a następnie przefiltrowuje się przez sitko komórkowe o wielkości porów 100 µm. Odzyskane agregaty komórek można zawiesić w pożywce hodowlanej, co pozwoliło na uzyskanie czystych frakcji enterocytów gotowych do dalszych badań (Bader i in., 2000).

Metoda wykorzystująca wirowanie różnicowe

Pobrane jelito kroi się na kawałki o długości 1–2 mm, które następnie przeemywa lodowatym PBS. Tkanki pozyskane wiruje się o prędkości 300 g przez 10 minut. Otrzymany pelet zawiesza się w roztworze 0,1% hialuronidazie rozpuszczonej w pożywce DMEM i poddaje się trawieniu przez 30 do 40 minut, a następnie odwirowaniu w celu usunięcia supernatantu. Tkanki następnie trawi się w roztworze 0,025% trypsyny-EDTA przez 30 minut. Tak potraktowane komórki poddaje się wirowaniu na medium Histopaque (1,119) przez 30 minut przy 400 g. Warstwę komórek na granicy gradientu (interfaza) zbiera się i trzykrotnie przeemywa w medium DMEM przez odwirowanie. Ostatecznie osad komórek i skupiska komórek wysiewa się na pokryte PureCol™ butelki hodowlane T25, co umożliwia uzyskanie czystych frakcji enterocytów do dalszych badań (Rath i in., 2018).

Metoda izolacji wykorzystująca komercyjny odczynnik: Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cells Technology)

Używając sterylnych nożyczek, należy dokładnie posiekać tkankę na możliwie najmniejsze fragmenty. Do probówki z fragmentami tkanki dodaje się 10 ml odczynnika Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cells Technology), a następnie inkubuje próbkę na lodzie przez 30 minut. W czasie inkubacji zawartość probówki należy mieszać co 5 minut. Po inkubacji próbkę odwirowuje się przy $290 \times g$ przez 5 minut, a następnie odciąga supernatant. Do osadu dodaje się 1 ml lodowatego pożywki DMEM z dodatkiem 1% BSA, a następnie energicznie pipetuje zawartość probówki około 20 razy przy użyciu pipety o pojemności 1 ml, w celu oddzielenia krypt jelitowych od tkanki. Zawartość probówki przefiltrowuje się przez sitko komórkowe o wielkości porów $70 \mu m$. W ten sposób uzyskana zawiesina zawiera izolowane krypty jelitowe, które można wykorzystać do założenia hodowli organoidów jelitowych przy użyciu pożywki IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Stem Cells Technology). Metodyka oparta o protokoły zawarte na stronie producenta (Stem Cell 2023).

Izolacja przy użyciu hodowli eksplantatów

Hodowla wcześniej nadtrawionych skrawków jelita pod szkiełkiem polega na przygotowaniu fragmentów tkanki, które zostały wstępnie poddane łagodnemu trawieniu enzymatycznemu w celu częściowego rozluźnienia połączeń między komórkami. Tak przygotowane skrawki jelita umieszcza się w odpowiedniej pożywce hodowlanej, a następnie przykrywa sterylnym szkiełkiem nakrywkowym, co pozwala uzyskać równomierną, cienką warstwę materiału i poprawić warunki adhezji komórek do podłoża (Chougule i in., 2012). Komórki proliferując migrują poza szkiełko nakrywkowe tworząc kolonie.

Izolacja przy użyciu homogenizatora

Izolacja mechaniczna enterocytów z nabłonka jelita cienkiego polega na rozerwaniu struktury tkanki w kontrolowanych warunkach. W pierwszym etapie fragment jelita poddaje się dokładnemu oczyszczeniu, usunięciu treści pokarmowej i przepłukaniu jelita płynem zawierającym antybiotyki. Następnie tkankę można rozdrobnić mechanicznie, na przykład poprzez homogenizację w buforze izotonicznym, co prowadzi do rozbicia komórek i uwolnienia enterocytów z nabłonka. Taki proces pozwala oddzielić enterocyty od pozostałych struktur błony śluzowej i przygotować je do dalszych analiz biochemicznych lub molekularnych (Dópido i in., 2004). W zależności od potrzeb procedura ta może być uzupełniona wirowaniem różnicowym, co ułatwia oddzielenie enterocytów od fragmentów tkanki i innych komórek.

Izolacja przy wykorzystaniu zeskrobin

Izolację mechaniczną enterocytów można również przeprowadzić poprzez delikatne zeskrobывanie nabłonka jelitowego skalpelem. W tym celu przygotowany fragment jelita cienkiego rozcina się wzdłuż i rozkłada błoną śluzową do góry. Następnie, za pomocą ostrego skalpela, delikatnie zeskrobuje się komórki nabłonka, starając się nie uszkodzić głębszych warstw tkanki. Uzyskany materiał zawiesza się w odpowiedniej pożywce, co pozwala na oddzielenie i utrzymanie enterocytów w zawieszynie komórkowej (Tsvilikhovs'kyi, 1997). Tak przygotowana zawiesina może być następnie poddana dalszej obróbce, np. filtracji czy wirowaniu, w zależności od planowanego zastosowania.

Przytoczone przykłady technik umożliwiają oddzielenie komórek od tkanki, oczyszczenie ich i przygotowanie do hodowli lub dalszych analiz. Każda z metod ma na celu uzyskanie jak najczystszej i najbardziej funkcjonalnej populacji enterocytów do badań naukowych.

Badania dotyczące czynników żywieniowych prowadzone w Instytucie Zootechniki PIB na hodowlach komórkowych

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy prowadzi badania nad potencjalnym wpływem wybranych dodatków roślinnych na zdrowie i funkcjonowanie przewodu pokarmowego zwierząt gospodarskich. Wśród analizowanych substancji znajdują się m.in. czosnek (*Allium sativum*), chmiel (*Humulus lupulus*), jeżówka (*Echinacea purpurea*), kora dębu (*Quercus robur*), kurkuma (*Curcuma longa*), oregano (*Origanum vulgare*) oraz imbir (*Zingiber officinale*). Te naturalne dodatki, znane ze swoich właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwutleniających i immunomodulujących, są oceniane pod kątem ich wpływu na integralność bariery jelita cienkiego, żywotność enterocytów oraz odpowiedź komórek nabłonka jelitowego świni i kury na indukowany stres oksydacyjny. Badania te realizowane są zarówno w modelach pierwotnych, wykorzystujących komórki pochodzące bezpośrednio od zwierząt, jak i na ustabilizowanych liniach komórkowych, w tym linii ludzkiej Caco-2 oraz świńskiej IPEC-J2. Dzięki wykorzystaniu hodowli komórkowych możliwe jest przeprowadzenie wstępnej, wysokoprzepustowej oceny działania wybranych ekstraktów roślinnych lub ich mieszanin na funkcje bariery jelitowej, poziom cytotoksyczności oraz responsywność na obecność reaktywnych form tlenu.

Celem badań Instytutu jest identyfikacja najbardziej obiecujących pojedynczych dodatków lub ich mieszanin, które wykazują korzystny profil działania bez negatywnego wpływu na komórki nabłonka jelitowego. Wyselekcjonowane substancje mogą być następnie wykorzystane w kolejnych etapach badań *in vivo*, prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych. Taka dwufazowa strategia – łącząca badania *in vitro* i *in vivo* – pozwala nie tylko ograniczyć liczbę zwierząt wykorzystywanych w eksperymentach (zgodnie z zasadami 3R), ale również zwiększa efektywność procesu opracowywania nowych dodatków paszowych i wspierających zdrowie przewodu pokarmowego i ogólną kondycję zwierząt gospodarskich.

Podsumowanie

Hodowle komórkowe, zarówno pierwotne wyizolowane samodzielnie, jak i linie komercyjne, stanowią istotny element współczesnych badań z zakresu żywienia zwierząt. Umożliwiają prowadzenie badań przesiewowych, które pozwalają na wczesną ocenę właściwości biologicznych i bezpieczeństwa dodatków paszowych przed ich zastosowaniem w modelach *in vivo*. Komercyjne linie komórkowe oferują powtarzalność i dostępność, co czyni je wygodnym narzędziem w badaniach *in vitro*. Z kolei hodowle pierwotne, choć bardziej wymagające pod względem technicznym, dostarczają danych bliższych warunkom fizjologicznym organizmu. Ogólna ocena działania badanych czynników żywieniowych może być uzupełniona o inne testy *in vitro*, dotyczące np. oceny ich aktywności antymikrobiologicznej skierowanej przeciwko drobnoustrojom patogennym, ich wpływu na bakterie probiotyczne, czy oceny aktywności antyoksydacyjnej pozwalającej pełniej ocenić możliwy wpływ testowanych czynników w warunkach rzeczywistych.

Piśmiennictwo

- Ambrogi M., Vezina C.M. (2024). Roles of airway and intestinal epithelia in responding to pathogens and maintaining tissue homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 14: 1346087.
- Arora T., Mehta A.K., Joshi V., Mehta K.D., Rathor N., Mediratta P.K., Sharma K.K. (2011). Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4R's. *Indian J. Pharm. Sci.*, 73(1): 1–6.

- Bader A., Hansen T., Kirchner G., Allmeling C., Haverich A., Borlak J.T. (2000). Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *Br. J. Pharmacol.*, 129(2): 331–342.
- Capes-Davis A., Bairoch A., Barrett T., Burnett E.C., Dirks W.G., Hall E.M., Healy L., Kniss D.A., Korch C., Liu Y., Neve R.M., Nims R.W., Parodi B., Schweppe R.E., Storts D.R., Tian F. (2019). Cell lines as biological models: Practical steps for more reliable research. *Chem. Res. Toxicol.*, 32(9): 1733–1736.
- Chougule P., Herlenius G., Hernandez N.M., Patil P.B., Xu B., Sumitran-Holgersson S. (2012). Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method. *Scand. J. Gastroenterol.*, 47(11): 1334–1343.
- Dópido R., Rodríguez C., Gómez T., Acosta N.G., Díaz M. (2004). Isolation and characterization of enterocytes along the intestinal tract of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 139(1): 21–31.
- Garcia M.T.J., de Vasconcellos F.L.L., Raffier C.P., Roberts M.S., Grice J.E., Benson H.A.E., Leite-Silva V.R. (2018). Alternative methods to animal studies for the evaluation of topical/transdermal drug delivery systems. *Curr. Top. Med. Chem.*, 18(4): 287–299.
- Geraghty R.J., Capes-Davis A., Davis J.M., Downward J., Freshney R.I., Knezevic I., Lovell-Badge R., Masters J.R., Meredith J., Stacey G.N., Thraves P., Vias M., Cancer Research UK. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer*, 111(6): 1021–1046.
- Hubatsch I., Ragnarsson E.G., Artursson P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.*, 2(9): 2111–2119.
- Isayama K., Rini D.M., Yamamoto Y., Suzuki T. (2023). Propionate regulates tight junction barrier by increasing endothelial-cell selective adhesion molecule in human intestinal Caco-2 cells. *Exp. Cell Res.*, 425(2): 113528.
- Kamiloglu S., Capanoglu E., Grootaert C., Van Camp J. (2015). Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells – a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(9): 21555–21574.
- Kaur G., Dufour J.M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1): 1–5.
- Kiela P.R., Ghishan F.K. (2016). Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 30(2): 145–159.
- Kim J.S., Lim H., Seo J.Y., Kang K.R., Yu S.K., Kim C.S., Kim D.K., Kim H.J., Seo Y.S., Lee G.J., You J.S., Oh J.S. (2022). GPR183 regulates 7 α ,25-dihydroxycholesterol-induced oxiaoptophagy in L929 mouse fibroblast cell. *Molecules*, 27(15): 4798.
- Kitano H., Kawabe Y., Kamihira M. (2022). HepG2-based designer cells with heat-inducible enhanced liver functions. *Cells*, 11(7): 1194.
- Kus M., Ibragimow I., Piotrowska-Kempisty H. (2023). Caco-2 cell line standardization with pharmaceutical requirements and *in vitro* model suitability for permeability assays. *Pharmaceutics*, 15(11): 2523.
- Lopez-Escalera S., Wellejus A. (2022). Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as *in vitro* models of colonic and small intestinal integrity. *Biochem. Biophys. Rep.*, 31: 101314.
- Loret S., Rusu D., El Moualij B., Taminiau B., Heinen E., Dandrifosse G., Mainil J. (2009). Preliminary characterization of jejuncyte and colonocyte cell lines isolated by enzymatic digestion from adult and young cattle. *Res. Vet. Sci.*, 87(1): 123–132.
- Ogunnaike M., Wang H., Zemleni J. (2021). Bovine mammary alveolar MAC-T cells afford a tool for studies of bovine milk exosomes in drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 610: 121263.
- Park G., Rim Y.A., Sohn Y., Nam Y., Ju J.H. (2024). Replacing animal testing with stem cell-organoids: Advantages and limitations. *Stem Cell Rev. Rep.*, 20(6): 1375–1386.

- Park W.H. (2017). Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncol. Rep.*, 37(2): 1277–1283.
- Pradhan D., Gulati G., Avadhani R., H.M.R., Soumya K., Kumari A., Gupta A., Dwivedi D., Kaushik J.K., Grover S. (2023). Postbiotic lipoteichoic acid of probiotic *Lactobacillus* origin ameliorates inflammation in HT-29 cells and colitis mice. *Int. J. Biol. Macromol.*, 236: 123962.
- Rath N.C., Liyanage R., Gupta A., Packialakshmi B., Lay J.O. Jr. (2018). A method to culture chicken enterocytes and their characterization. *Poultry Sci.*, 97(11): 4040–4047.
- Rein M.J., Renouf M., Cruz-Hernandez C., Actis-Goretta L., Thakkar S.K., Da Silva Pinto M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 75: 588–602.
- Romanek J., Opiela J., Lipiński D., Smorąg Z. (2018). Effect of high hydrostatic pressure applied before cryopreservation on the survival rate and quality of porcine mesenchymal stem cells after thawing. *Anim. Biotechnol.*, 29(4): 283–292.
- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stamatii A., Zucco F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.*, 21(1): 1–26.
- Sasaki Y., Tatsuoka H., Tsuda M., Sumi T., Eguchi Y., So K., Higuchi Y., Takayama K., Torisawa Y., Yamashita F. (2022). Intestinal permeability of drugs in Caco-2 cells cultured in microfluidic devices. *Biol. Pharm. Bull.*, 45(9): 1246–1253.
- Stem Cell (2023). <https://www.stemcell.com/products/intesticult-organoid-differentiation-medium-human.html#section-protocols-and-documentation>
- Steube K.G., Koelz A.L., Uphoff C.C., Drexler H.G., Klues J., Steinberg P. (2012). The necessity of identity assessment of animal intestinal cell lines: A case report. *Cytotechnology*, 64(4): 373–378.
- Todd K.V., Tripp R.A. (2020). Vero cells as a mammalian cell substrate for human norovirus. *Viruses*, 12(4): 439.
- Tsvilikhovs'kyi M.I. (1997). Otrymannia fraktsii plazmatychnoi membrany z enterotsytiv tonkoï kyshky tvaryn riznoho viku [The isolation of plasma membrane fractions from the enterocytes of the small intestine in animals of different ages]. *Fiziol. Zh.*, 43(3–4): 101–105. PMID: 9303792
- Tümer E., Bröer A., Balkrishna S., Jülich T., Bröer S. (2013). Enterocyte-specific regulation of the apical nutrient transporter SLC6A19 (B0AT1) by transcriptional and epigenetic networks. *J. Biol. Chem.*, 288(47): 33813–33823.
- Vermeire B., Gonzalez L.M., Jansens R.J.J., Cox E., Devriendt B. (2021). Porcine small intestinal organoids as a model to explore ETEC–host interactions in the gut. *Vet. Res.*, 52: 94.
- Wang D., Zhou L., Zhou H., Hou G. (2021). Chemical composition and anti-inflammatory activity of n-butanol extract of *Piper sarmentosum* Roxb. in the intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2). *J. Ethnopharmacol.*, 269: 113723.
- Ye X., Wang J., Qiao Z., Yang D., Wang J., Abudureyimu A., Yang K., Feng Y., Ma Z., Liu Z. (2021). Quantitative proteomic analysis of MDCK cell adhesion. *Mol. Omics*, 17(1): 121–129.

**SOURCES AND TECHNIQUES FOR OBTAINING PRIMARY CULTURES AND
CELL LINES IN ANIMAL NUTRITION RESEARCH – SCREENING TESTS
BEFORE *IN VIVO* STUDIES**

Joanna Romanek

SUMMARY

In recent decades, there has been rapid progress in research on the bioavailability, absorption, and transport of bioactive compounds, including drugs, and nutrients in cell models. *In vitro* models, including primary cultures and cell lines, serve as important screening tools for evaluating the effects of feed additives, bioactive ingredients, and substances that affect gastrointestinal health and function. They allow analysis of absorption mechanisms, cytotoxicity, inflammatory responses, and intestinal barrier integrity without relying on animal models. Additionally, selecting compounds *in vitro* helps reduce the number of animals needed for *in vivo* studies. This paper aims to present the most commonly used commercial cell lines in animal nutrition research and to describe selected methods for isolating primary enterocyte cultures.

Keywords: enterocytes, Caco-2 cells, primary cultures, cell lines, *in vitro* culture