

ANNA OLEJNIK, MARCIN SCHMIDT, KATARZYNA WOJNAROWSKA,
WŁODZIMIERZ GRAJEK

**WPLYW TOKSYCZNYCH METABOLITÓW TRAWIENIA NA
PROLIFERACJĘ I USZKODZENIA DNA NABŁONKOWYCH
KOMÓREK JELITOWYCH *IN VITRO***

Streszczenie

Przedmiotem prezentowanej pracy było określenie wpływu wybranych metabolitów (amoniaku, fenolu i krezolu), powstających w czasie procesu trawienia, na przeżywalność i proliferację ludzkich enterocytów *in vitro*. Do badań bezpośredniego oddziaływania wymienionych związków na komórki nabłonka jelitowego wykorzystano linię komórkową Caco-2, która w warunkach *in vitro* tworzy monowarstwę komórek funkcjonalnie i strukturalnie podobnych do ludzkich enterocytów.

W celu oceny cytotoksycznego i genotoksycznego efektu działania wybranych związków na komórki Caco-2 posłużono się następującymi metodami badawczymi: oznaczenie stężenia komórek metodą hemocytometryczną, oznaczenie przeżywalności komórek poprzez barwienie błękitem Trypanu, określenie stopnia uszkodzeń DNA za pomocą testu kometkowego.

Dowodzono, że ekspozycja komórek Caco-2 na stosunkowo niskie stężenia wszystkich testowanych związków powodowała znaczący spadek ich przeżywalności i proliferacji. Stwierdzono, że antyproliferacyjne oddziaływanie metabolitów procesu trawienia było związane z indukcją uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelitowego.

Słowa kluczowe: Caco-2, cytotoksyczność, fenol, krezol, amoniak, test kometkowy

Wprowadzenie

Najbardziej rozpowszechnionym systemem komórkowym imitującym ludzki nabłonek jelitowy jest linia komórkowa Caco-2. W przeciwieństwie do wielu innych ustalonych linii komórkowych nowotworu jelit, linia Caco-2 zachowała zdolność do tworzenia monowarstwy komórek wykazującej morfologiczne, strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do nabłonka jelita cienkiego naturalnie występującego w

Dr inż. A. Olejnik, dr M. Schmidt, mgr inż. K. Wojnarowska, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

warunkach *in vivo*. Do najistotniejszych cech charakterystycznych dla kultury komórkowej Caco-2 zalicza się: wykształcanie ścisłych połączeń międzykomórkowych, różnicowanie komórek enterocyto-podobnych mających na swojej powierzchni dobrze wykształcony rąbek szczoteczkowy, ekspresja charakterystycznych enzymów (alkaliczna fosfataza i in.) oraz systemów transportujących (glikoproteina P, cytochrom P-450 3A4 i in.) [17].

Ze względu na wysoki stopień podobieństwa kultury Caco-2 do normalnego nabłonka jelitowego stanowi ona model komórkowy stosowany w kilku kierunkach badawczych. W ostatnich latach udowodniono, że kultura Caco-2 jest bardzo dobrym systemem modelowym do badań farmaceutycznych i odgrywa istotną rolę przy opracowywaniu coraz bezpieczniejszych i aktywnych leków [1, 5, 9, 15]. Ponadto stwierdzono, że linia Caco-2 jest bardzo przydatna w badaniach adhezji bakterii probiotycznych [4, 14, 18, 21] i chorobotwórczych [2, 6, 18] do komórek nabłonka jelitowego. Kultura Caco-2 znalazła zastosowanie w badaniach nad wieloma innymi mechanizmami zachodzącymi w ludzkim przewodzie pokarmowym, np. odpowiedzią immunologiczną na obecność alergenów pokarmowych [8, 13], metabolizmem toksyn oraz działaniem związków mutagennych i kancerogennych [3, 11].

Celem przedstawionej pracy były badania nad cytotoksycznym oddziaływaniem związków chemicznych, takich jak: amoniak, fenol i krezol, będących wtórnymi metabolitami procesu trawienia, na jelitowe komórki nabłonkowe, przy zastosowaniu linii komórkowej Caco-2. Związki będące przedmiotem badań mogą być przyczyną biegunek, a także zaburzeń w funkcjonowaniu wątroby i układu krążenia. Szkodliwe substancje chemiczne pojawiają się jako efekt rozkładu białka zwierzęcego. Fenol i *p*-krezol są produktami rozkładu tyrozyny i jej pochodnych [20]. Część z nich zostaje wydalona z organizmu, a część wchłonięta przez tkankę, powodując ogniska chorobotwórcze [12].

Materiały i metody badań

Hodowla komórek Caco-2

Linia komórkowa Caco-2 pochodziła z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Hodowle komórek Caco-2 prowadzono w pożywce DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium, Sigma) z 20-procentowym dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej, 1-procentowym dodatkiem mieszaniny aminokwasów endogennych i w obecności gentamycyny (10 mg/dm³). Do hodowli użyto płytek 24-dołkowych (Nunc) o powierzchni wzrostu 1,9 cm². Hodowle przeznaczone do badania cytotoksyczności zakładano przy początkowej gęstości komórek wynoszącej 6,25 x 10⁴ komórek/cm². Hodowle prowadzono w temp. 37°C, w atmosferze o składzie 5% CO₂ i 95% powietrza i wilgotności 99%.

Stężenie komórek Caco-2 oznaczano metodą hemocytometryczną z wykorzystaniem komory Neubauera, a ich przeżywalność poprzez barwienie 0,04% błękitem Trypanu.

Oznaczanie cytotoksyczności związków chemicznych

Roztwory badanych związków (fenolu, amoniaku oraz *o*- i *p*-krezolu) w stężeniach 10^{-3} i 10^{-6} M rozpuszczano w kompletnej pożywce DMEM i poddawano filtracji przez filtry o porowatości 0,22 μm .

Do badania cytotoksycznego oddziaływania wybranych związków na komórki nabłonka jelitowego wykorzystano 7-dniową kulturę Caco-2 hodowaną na płytkach 24-dołkowych. Komórki Caco-2 poddawano ekspozycji na przygotowane roztwory badanych substancji przez 8, 24 i 48 godz., w temp. 37°C i w atmosferze o składzie 5% CO₂ i 95% powietrza. Ponadto, określano wpływ testowanych związków na proliferację komórek Caco-2 w ciągu pierwszych 10 dni hodowli. Każdego dnia hodowli oznaczano gęstość komórek i ich przeżywalność.

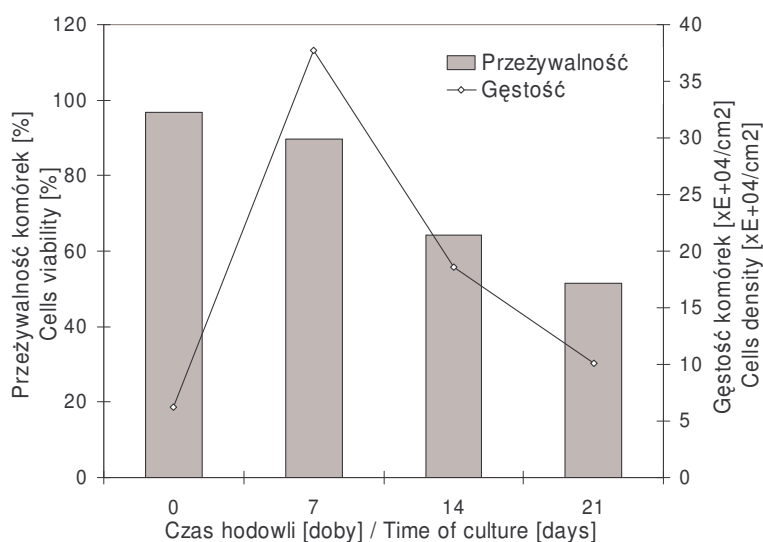
W celu określenia stopnia uszkodzeń DNA indukowanych w komórkach Caco-2 na skutek działania badanych związków zastosowano test kometkowy. Analizie kometkowej poddawano 7-dniową kulturę Caco-2 po 24-godzinnej ekspozycji na amoniak (10^{-6} M), fenol (10^{-6} M), *p*-krezol (10^{-6} M) oraz TPEN (10^{-5} M). Po inkubacji komórki Caco-2 przemywano buforem fosforanowym (PBS / pH 7,4) i poddawano procesowi trypsynizacji. Komórki przemyte zimnym roztworem PBS zawieszano w 1-procentowej agarozie o niskim punkcie topnienia i temp. 37°C. Zawiesinę komórek nakładano na szkiełka podstawowe pokryte 1-procentową agarozą o normalnym punkcie topnienia i przykrywano szkiełkami nakrywkowymi. Po zestaleniu szkiełka nakrywkowe usuwano, a szkiełka podstawowe z komórkami zanurzano w buforze lizującym (100 mM EDTA, 5,5 M NaCl, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 / pH 10) i inkubowano przez 1 godz. w temp. 4°C. Po lizie szkiełka dwukrotnie płukano w roztworze do elektroforezy (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) przez 15 min w 4°C. Następnie prowadzono elektroforezę przy napięciu 230 V przez 30 min, w temp. 4°C. Po elektroforezie szkiełka płukano wodą, następnie buforem neutralizującym (0,4 M TRIS / pH 7,5), po czym odwadniano 70-procentowym etanolem. DNA uzyskane w preparatach barwiono barwnikiem fluorescencyjnym SYBRGold. Do określenia poziomu uszkodzeń DNA brano pod uwagę wszystkie komórki znajdujące się w polu widzenia, wśród których obecnych było co najmniej 100 kometek. Wyniki testu opracowano za pomocą programu komputerowego CometScoreTM. Analizę kometek prowadzono na podstawie parametru określającego procent DNA w ogonie i opisującego odsetek DNA, który wyemigrował z jądra komórkowego.

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawione na wykresach i tabelach stanowią wartości średnie, a obliczone odchylenia standardowe (\pm SD) zaznaczono w postaci słupków błęd. Ocenę istotności różnic przeprowadzono metodą analizy wariancji. Do określenia jednorodności wariancji stosowano test Levene'a. Celem oszacowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

Wpływ badanych związków na kulturę Caco-2

Doświadczenia nad wpływem związków cytotoksycznych na kulturę nabłonka jelitowego przeprowadzono z wykorzystaniem młodej 7-dniowej kultury Caco-2. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że komórki Caco-2 na tym etapie hodowli występują w pełnej konfluencji, charakteryzują się najwyższą przeżywalnością i aktywnością metaboliczną (rys. 1).



Rys. 1. Gęstość i przeżywalność komórek Caco-2 w różnych fazach wzrostu.

Fig. 1. Density and viability of Caco-2 cells in different growth phases.

Ponadto, we wcześniejszych pracach wykazano, że młoda kultura Caco-2 o dużym tempie proliferacji jest najbardziej odporna na działanie czynników toksycznych [11]. Dlatego do dalszych szczegółowych eksperymentów stosowano kulturę Caco-2 uzyskaną w ciągu 7 dni hodowli w pożywce DMEM wzbogaconej 20-procentowym

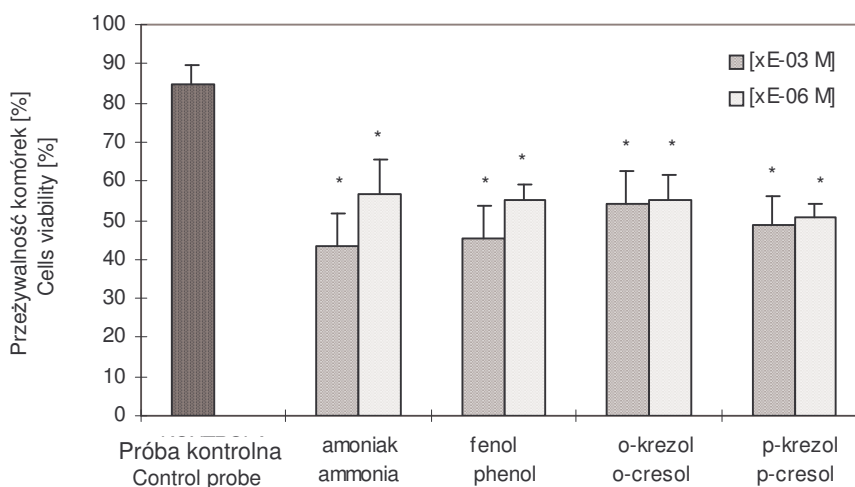
dotądkiem płodowej surowicy bydlęcej, założonej przy inokulum komórkowym wynoszącym $6,25 \times 10^4$ komórek/cm².

Monowarstwę komórek Caco-2 poddawano 8-, 24- i 48-godzinnemu działaniu amoniaku, fenolu, *o*- i *p*-krezolu w stężeniach 10^{-3} i 10^{-6} M. Wykazano brak statystycznie istotnego wpływu czasu ekspozycji kultury na przeżywalność komórek Caco-2. Poziomy istotności różnic pomiędzy żywotnością komórek oznaczoną po różnym czasie inkubacji przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Statystyczna istotność wpływu czasu ekspozycji (8, 24 i 48 h) na przeżywalność komórek Caco-2.
Statistical significance influence of induction time (8, 24 i 48 h) on Caco-2 cells viability.

Stężenie Concentration	Poziom istotności różnic (p<0,05) Statistical significance level (p<0,05)			
	Amoniak Ammonia	Fenol Phenol	<i>o</i> -krezol <i>o</i> -cresol	<i>p</i> -krezol <i>p</i> -cresol
10^{-3} M	0,417	0,457	0,157	0,070
10^{-6} M	0,106	0,858	0,094	0,851



* różnice statystycznie istotne na poziomie p<0,05 w stosunku do próby kontrolnej

* statistically significant differences on p<0,05 level in relation to control probe

Rys. 2. Wpływ wtórnych metabolitów trawienia na przeżywalność kultury Caco-2.

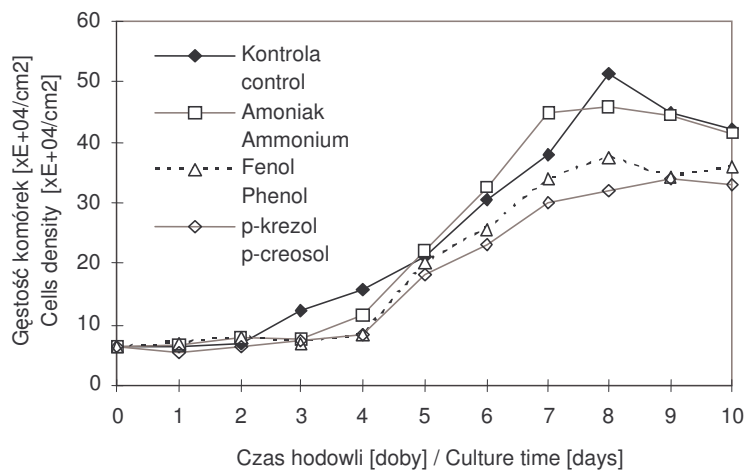
Fig. 2. The influence of digestive metabolites on Caco-2 cell culture viability.

W przeciwieństwie do czasu ekspozycji, stężenie fenolu i amoniaku miało istotne znaczenie dla przeżywalności komórek. Obecność tych związków w hodowli

komórkowej, nawet w niewielkiej ilości wynoszącej 10^{-6} M obniżała ich przeżywalność do poziomu 56%. Natomiast 1000-krotne zwiększenie zawartości amoniaku i fenolu w hodowli Caco-2 powodowało dalszą redukcję żywotności komórek odpowiednio o 13 i 10%. W przypadku *o*- i *p*-krezolu stwierdzono silne oddziaływanie obu badanych stężeń. Różnice statystyczne oszacowano na poziomie wynoszącym odpowiednio: 0,772 i 0,479. Dodatek *p*-krezolu do pożywki hodowlanej wywoływał spadek żywotności komórek do ok. 50%, w przypadku *o*-krezolu do wartości ok. 55%. Średnie przeżywalności kultury Caco-2 inkubowanej w obecności tych związków wskazują, że ich krótkotrwałe oddziaływanie na komórki jelitowe jest bardzo zbliżone (rys. 2). W ich obecności spadek żywotności komórek oszacowano na poziomie ok. 40% przy stężeniu 10^{-3} M i ok. 35% przy stężeniu 10^{-6} M.

Wpływ związków chemicznych na wzrost komórek Caco-2

Kolejnym celem prezentowanej pracy było zbadanie proliferacji komórek Caco-2 poddanych długoterminowemu permanentnemu działaniu związków cytotoksycznych. Hodowlę Caco-2 prowadzono w kompletnej pożywce DMEM, do której dodawano amoniak, fenol, *o*- i *p*-krezol w stężeniu 10^{-6} M. Hodowle Caco-2 zakładano przy inokulum $6,25 \times 10^4$ kom/cm². Krzywe obrazujące wzrost komórek Caco-2 w obecności badanych związków przedstawiono na rys. 3. Parametry hodowli komórkowych przedstawione w tab. 2. wskazują na hamowanie procesu proliferacji komórek przez wszystkie testowane substancje.



Rys. 3. Kinetyka wzrostu komórek Caco-2 w obecności wtórnych metabolitów trawienia.

Fig. 3. Kinetic growth of Caco-2 cells cultured in presence of secondary digestive metabolites.

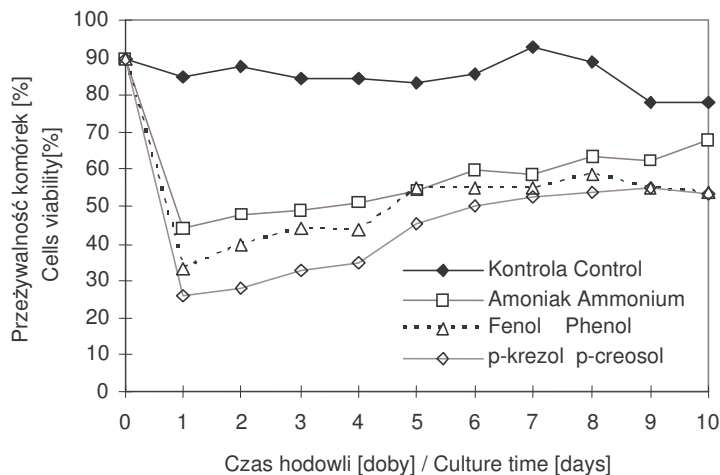
Tabela 2

Parametry wzrostu komórek Caco-2 w obecności badanych związków.
Growth parameters of Caco-2 cells cultured in presence of tested compounds.

Związek chemiczny Compound	Maksymalna gęstość komórek Maximal cell density (± SD)	Żywotność komórek w plateau hodowli Cells viability in culture plateau (± SD)	Czas generacji Generation time (± SD)
	[x10 ⁴ /cm ²]	[%]	[h]
Próba kontrolna Control probe	51,39 (±4,22)	82,5 (±10,45)	55,9 (±5,3)
Amoniak [10 ⁻⁶ M] Ammonia	45,69 (±5,34)	63,5 ±(8,89)	59,7 (±6,1)
Fenol [10 ⁻⁶ M] Phenol	37,63 (±4,20)	63,1 (±9,75)	68,6 (±6,3)
<i>p</i> -krezol [10 ⁻⁶ M] <i>p</i> -cresol	34,00 (±2,14)	55,0 (±7,72)	69,7 (±4,9)

Najbardziej inwazyjne oddziaływanie zaobserwowano w przypadku fenolu i krezoli, których obecność powodowała ograniczenie koncentracji komórek w plateau hodowli o ok. 30% oraz wydłużenie okresu generacji o 13–15 godz. w porównaniu z hodowlą kontrolną prowadzoną bez dodatku czynnika toksycznego. Relatywnie mały efekt przebiegu hodowli obserwowano w obecności amoniaku. W tej hodowli okres niezbędny do podwojenia populacji komórek w logarytmicznej fazie wzrostu był tylko o 4 godz. dłuższy niż w hodowli kontrolnej. Zaobserwowaną odporność kultury Caco-2 na niewielkie stężenie amoniaku (10⁻⁶ M) można tłumaczyć tym, że związek ten jest naturalnym produktem metabolizmu komórkowego, powstającym w erytrocytach na drodze przemian glutaminy [12]. Jego obecność w środowisku hodowlanym z jednej strony powodowała tylko nieznaczne obniżenie maksymalnej gęstości populacji komórkowej, z drugiej strony jednak indukowała 20-procentowy spadek przeżywalności komórek w momencie plateau w stosunku do hodowli kontrolnej. Zmiany żywotności komórek w kolejnych dobach hodowli prowadzonych z dodatkiem testowanych związków przedstawiono na rys. 4.

Badanie efektu działania testowanych związków na proliferację komórek Caco-2 pozwoliło uszeregować je pod względem cytotoksyczności w następującej kolejności: *o*- i *p*-krezol > fenol > amoniak.



Rys. 4. Przeżywalność komórek Caco-2 hodowanych w obecności wtórnych metabolitów trawienia.
Fig. 4. Viability of Caco-2 cells cultured in presence of secondary digestive metabolites.

Badane związki a uszkodzenia DNA komórek Caco-2

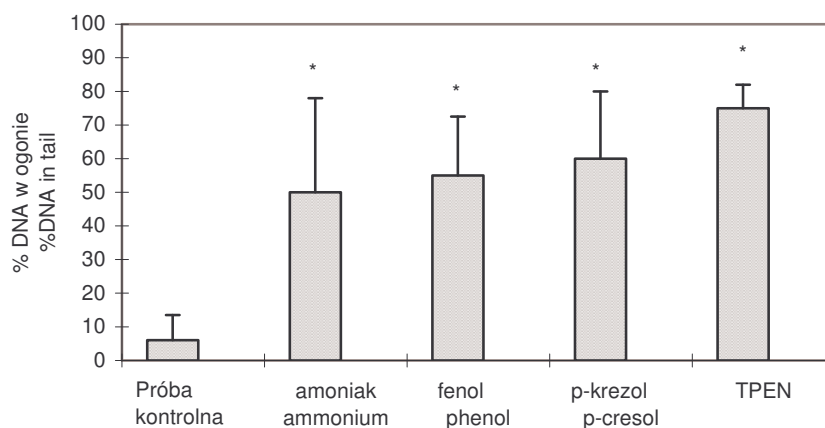
W celu oceny stopnia uszkodzeń DNA powstałych w komórkach pod wpływem badanych związków zastosowano test kometkowy. Metoda kometkowa polega przede wszystkim na analizie poziomu pęknięć jednej lub obu nici DNA oraz wszelkich modyfikacji możliwych do przekształcenia w pęknięcia na drodze chemicznej i enzymatycznej, w komórkach narażonych na działanie czynnika genotoksycznego [10]. Zaletą tej metody jest wysoka czułość i możliwość analizy pojedynczych komórek poprzez bezpośredni pomiar właściwości elektroforetycznych zmodyfikowanego DNA. Przy analizie kometek wzięto pod uwagę parametr opisujący procent DNA znajdujący się w ogonie kometki. Na rys. 5. przedstawiono ten parametr jako średnią arytmetyczną oraz odchylenia standardowe świadczące o stopniu zróżnicowania populacji komórek pod względem wystąpienia kometek.

Analizie kometkowej poddano 7-dniową kulturę Caco-2 po 24-godzinnej ekspozycji na amoniak, fenol i krezol w stężeniu 10^{-6} M oraz TPEN w stężeniu 10^{-5} M.

TPEN (N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmetylo) etylenodiamina) jest błonowym chelatorem jonów metali, w szczególności jonów cynku, które biorą udział w wielu procesach metabolicznych komórek, regulując śmiertelność oraz częstość ich proliferacji [16]. Wykazano, że jony Zn^{2+} zapobiegają fragmentacji DNA w wielu liniach komórkowych poprzez inhibicję endonukleaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Udowodniono również, że chelatowanie jonów Zn^{2+} zwiększa częstotliwość

występowania apoptozy [7]. Na podstawie analizy kometkowej stwierdzono, że TPEN w stężeniu

10^{-5} M indukował w komórkach Caco-2 uszkodzenia DNA na poziomie 80% (rys. 5).



* różnice statystycznie istotne na poziomie $p < 0,05$ w stosunku do próby kontrolnej

* statistically significant differences on $p < 0,05$ level in relation to control probe

Rys. 5. Parametry kometek uzyskanych w teście SCGE po indukcji produktami trawienia.

Fig. 5. Parameters of comets obtained in single cell gel electrophoresis (SCGE) after induction of digestive metabolites.

Kultura Caco-2 poddawana działaniu tego związku stanowiła zarówno kontrolę pozytywną prawidłowo przeprowadzonego testu kometkowego, jak i punkt odniesienia do oszacowania stopnia dezintegracji DNA zachodzącej w komórkach pod wpływem testowanych substancji. Czystą kulturę Caco-2 niepoddawaną procesowi indukcji wykorzystano jako kontrolę negatywną.

Analiza statystyczna wyników testu kometkowego wykazała, że obliczone parametry kometek obarczone są dużym błędem statystycznym, co świadczy o wysokim stopniu różnorodności subpopulacji komórek w 7-dniowej kulturze Caco-2. Odmienną podatność komórek na działanie czynnika genotoksycznego można tłumaczyć różnym stopniem zróżnicowania komórek w tym etapie hodowli. Młoda 7-dniową kulturę Caco-2 stanowią zarówno komórki będące bezpośrednio po podziale, jak i komórki na dalszym etapie różnicowania w struktury enterocyto-podobne mające na swej powierzchni mikrokosmki jelitowe zorganizowane w rąbek szczoteczki.

Badania wpływu 24-godzinnej ekspozycji kultury Caco-2 na testowane związki, dowiodły, że mogą one uaktywnić procesy prowadzące do programowanej śmierci komórek nabłonka jelitowego. Wszystkie testowane substancje powodowały uszkodzenia DNA, lecz w stopniu niższym niż TPEN (rys. 5). W przypadku badanych

związków, częstość występowania kometek w stosunku do komórek nieuszkodzonych była zdecydowanie mniejsza. Fenol, amoniak oraz krezole były związkami o słabszym działaniu genotoksycznym niż TPEN i prawdopodobnie uszkadzały przede wszystkim te komórki, które poprzez wytworzenie na swojej powierzchni zaczątków mikrokosmków, zdolne są do szybszego wchłaniania. Duże wartości odchyień standardowych średnich wartości parametrów opisujących kometki, podobnie jak przy reakcji z TPEN-em, potwierdziły różny stopień wrażliwości subpopulacji komórek Caco-2 na działanie poszczególnych związków. Biorąc pod uwagę parametr określający procentową zawartość DNA w ogonie kometki uszeregowano badane związki pod względem ich genotoksyczności w następującej kolejności: TPEN > krezol > fenol > amoniak.

Mimo powszechnie znanego silnie toksycznego działania testowanych związków na organizm człowieka prezentowane badania mają charakter nowatorski. W literaturze światowej brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu toksycznych metabolitów procesu trawienia na jelitowe komórki nabłonkowe. Badania jednostkowego i bezpośredniego oddziaływania tych substancji możliwe są jedynie z wykorzystaniem modeli komórkowych w systemie *in vitro*. Zastosowanie enterocyto-podobnych komórek Caco-2 pozwoliło na określenie stopnia cytotoksyczności metabolitów trawienia w stężeniach mikromolowych dla ludzkiego nabłonka jelitowego.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wykazały silnie cytotoksyczne oddziaływanie fenolu, krezoli i amoniaku na kulturę komórkową Caco-2 imitującą ludzkie enterocyty.
2. Testowane związki obecne w hodowli w stężeniu mikromolowym znacząco hamowały proliferację komórek Caco-2.
3. Na podstawie analizy kometkowej stwierdzono, że fenol, krezol i amoniak generują uszkodzenia DNA w komórkach enterocyto-podobnych.
4. Badane metabolity trawienia uszeregowano pod względem ich cyto- i genotoksyczności w stosunku do modelowych komórek nabłonka jelitowego w następujący sposób: krezol > fenol > amoniak.

Literatura

- [1] Artursson P., Karlsson J.: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 1991, **175**, 880-885.

- [2] Bernet M.F., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L.: *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 1994, **35**, 483-489.
- [3] Bestwick C.S., Milne L.: Effects of β -carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1474**, 47-55.
- [4] Blum R., Reniero E.J., Schiffrin R., Crittenden T., Mattila-Salholm A.C., Ouwehand, S., Salminen A., von Wright M., Saarela M., Saxelin K., Collins L.: Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, **10**, 405-410.
- [5] Braun S., Hammerle K., Suda B., Rothen-Rutishauser M., Gunthert S.D., Kramer H., Wunderli-Allenspach H.: Cell cultures as tool in biopharmacy, *European J. Pharm. Sci.*, 2000, **11**, S51-S61.
- [6] Cerquetti M., Serafino A., Sebastianelli A., Mastrantonio P.: Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.*, 2002, **32**, 211-218.
- [7] Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J., Favier A.: Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, **62**, 2001, 51-62.
- [8] Eckmann L., Kagnoff M.F., Fierer J.: Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends in Microbiology*, 1995, **3** (3), 118-120.
- [9] Hidalgo I., Raub T., Borchardt R.T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 1989, **98**, 736-749.
- [10] Jałoszyński P.: Analiza pęknięć nici DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay). W: Przykłady analiz DNA-pod red. R. Słomskiego, Wyd. Akademii Rolniczej, Poznań 2001.
- [11] Karczewski J.M., Noordhoek J.: Toxicity of menadione in the differentiating human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro*, 1999, **13**, 35-43.
- [12] Keller J.S.: Podstawy fizjologii żywienia człowieka. Wyd. SGGW. Warszawa 2000.
- [13] Kerneis S., Caliot E., Stubbe H., Bogdanova A., Kreehenbuhl J-P., Pringault E.: Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1119-1124.
- [14] Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L., Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Salminen S.: Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria, *Appl. Environm. Microbiol.*, 2000, **66** (9), 3692-3697.
- [15] Meunier M., Bourrie Y., Berger G., Fabre G.: The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell. Biol. Toxicol.*, 1995, **11**, 187-194.
- [16] Nakatani T., Tawaramoto M., Kennedy D.O., Kojima A., Matsui-Yuasa I.: Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, **125**, 151-163.
- [17] Pinto S., Robine-Leon M.D., Appay M., Keding N., Triadou E., Dussaux B., Lacroix P., Simon-Assmann K., Hafen J., Fogh A., Zweibaum A.: Enterocyte-like differentiation and Polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, 1983, **47**, 323-330.
- [18] Tavelin J., Grasjo J., Taipalensuu G., Ocklind P., Artursson P.: Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods in Molecular Biology W: Epithelial Cell Culture Protocols*, Vol.188 -pod red. C. Wise, Humana Press Inc., Totowa 2001, 233-272.
- [19] Todoriki K., Mukai T., Sato S., Toba T.: Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**, 1-6.

- [20] Tsuruta Y., Watanabe S., Inoue H.: Fluorimetric determination of phenol and p-cresol in urine by precolumn high-performance liquid chromatography using 4-(N-phthalimidinyl) benzenesulfonyl chloride. *Anal. Biochem.*, 1996, **243**, 86-91.
- [21] Tuomola E.M., Salminen S.J.: Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **41**, 45-51.

THE INFLUENCE OF TOXIC DIGESTIVE METABOLITES ON THE PROLIFERATION AND DNA DAMAGE OF EPITHELIAL INTESTINAL CELLS *IN VITRO*

S u m m a r y

The subject of presented paper was to describe the effect of selected digestive metabolites (ammonia, phenol and cresol), arising while digestive process, on viability and proliferation of human enterocytes *in vitro*. The structural as well as functional similarities to intestinal human enterocytes has resulted in Caco-2 cell line was used in our studies.

Based on determination of cell viability, cell concentration and evaluation of the DNA damages level in the cells exposed to the tested compounds, the cytotoxic and genotoxic effects were investigated. Cell concentration was determined using Neubauer hemocytometer and cell viability was evaluated by trypan blue exclusion dye. For the DNA damage determination, the comet assay was used.

It was proved that upon exposure of Caco-2 cells to relatively low concentrations of all tested metabolites, significant decrease in cell viability and proliferation was observed. According to the findings in this study, the growth inhibitory effect of digestive metabolites on the intestinal cells is due to DNA damages.

Key words: Caco-2, cytotoxicity, phenol, cresol, ammonia, comet assay ☒