

Ocena substancji aktywnych i leków w warunkach *in vitro* – modele komórkowe i wybrane oznaczenia

Justyna Mirosława Płonka-Czerw¹, Małgorzata Latocha¹, Wiktoria Kozłowska²

¹Zakład Biologii Komórki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

²Studentka, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Justyna Mirosława Płonka-Czerw,
Zakład Biologii Komórki, Wydział Nauk
Farmaceutycznych w Sosnowcu,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska;
e-mail: jplonka@sum.edu.pl

Źródła finansowania

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
nr grantu: PCN-1-092/K/1/F

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2023.10.31

Zaakceptowano: 2024.01.12


Opublikowano on-line: 2024.01.23

DOI

10.32383/farmpol/181131

ORCID

Justyna Mirosława Płonka-Czerw

–  0000-0003-0201-525X


Małgorzata Latocha –  0000-0003-4109-2629

Wiktoria Kozłowska –  0009-0004-9122-2828

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Evaluation of active substances and drugs *in vitro* – cell models and selected assays

Intensive search for new drugs necessitates the development of quick and reliable methods for their evaluation. These methods, already at the stage of laboratory tests, are intended to allow obtaining the broadest possible knowledge about the mechanisms of action, absorption and transport of the drug, determine its therapeutic concentration, half-life and metabolism, and should be repeatable and relatively cheap. Currently, almost all processes important in the context of the effectiveness of therapy can be assessed based on tissue and cell cultures. It is possible not only to keep any cells alive, but also to construct spatial cultures where the interactions of cells with each other – just like *in vivo* – are multidirectional. Improving and refining the methods of cultivating human cells – from highly differentiated cells to stem cells – allows for the creation of a research model that largely reproduces most of the processes occurring in the body and reflects the relationships there. Additionally, *in vitro* research allows for the simultaneous assessment of multiple drug evaluation parameters as well as the identification of the precise cells and structures within an organ or organism that are affected by the tested drug. Simple methods have become widely available for assessing the cytotoxicity and genotoxicity of compounds, selecting optimal concentrations of test substances with respect to their effects on selected cells and organs, assessing changes at the molecular level, transport across membranes, and finally drug biotransformation processes. Assessment of the drug in terms of LADME (*liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion*) – the processes to which each drug is subjected in the body can be almost entirely carried out in laboratory conditions. The results obtained *in vitro* are important both in terms of general knowledge about the action of a given drug and for determining the directions of development of technology

for attaining its most effective form. This, in turn, opens a new path – the implementation of personalized therapy. The aim of the work was to present the reader with increasing possibilities in this area and to show the enormous progress that has been made in recent years in extracorporeal research models mapping the course of the body's reaction to a potential drug or other xenobiotics. The authors also wanted to show and compare information on new, in their own way very complicated, but also simple in their concept, *in vitro* models, with specific assays used (both for 2D and 3D cultures) to assess the effect of a drug or other xenobiotic on cells in cultures – thus indicating that these are accessible methods and technologies that could be introduced into currently operating laboratories.

Keywords: evaluation of the drug, 3D cell cultures, *in vitro*, toxicology evaluation.

© Farm Pol, 2023, 79(10): 579–594

Wstęp

Ciągle poszukiwania nowych leków wymuszają opracowanie szybkich i wiarygodnych metod ich oceny. Ogólnoświatowe tendencje odchodzenia od prac na zwierzętach oraz potrzeba możliwie maksymalnego skrócenia czasu badań (przy zachowaniu odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa dla potencjalnego pacjenta) zwracają uwagę naukowców na kultury tkankowe i komórkowe jako modelu badawczego. Celem pracy jest przedstawienie czytelnikowi możliwości w tym zakresie i pokazanie ogromnego postępu, jaki w ostatnich latach dokonał się odnośnie pozaustrojowych modeli badawczych odwzorowujących przebieg reakcji organizmu na potencjalny lek lub inne ksenobiotyki. Podjęto próbę pokazania i zestawienia informacji dotyczących nowych, na swój sposób skomplikowanych, ale i prostych w swej koncepcji modeli *in vitro* z konkretnymi oznaczeniami, jakie się wykonuje (zarówno dla hodowli 2D, jak i 3D) do oceny wpływu leku lub innego ksenobiotyku na komórki w hodowlach. Wskazując tym samym, że obecnie nie są to już tak niedostępne metody i technologie jak kiedyś, których nie dałoby się wprowadzić do większości funkcjonujących pracowni.

Praca powstała na bazie szerszego opracowania dotyczącego nowych metod stosowanych do analizy leków i innych ksenobiotyków w układzie *in vitro*, w ramach realizacji potrzeb na cele dydaktyczne. Dane przedstawione w opracowaniu pochodzą głównie z publikacji pozyskanych z internetowej bazy danych PubMed z zakresu medycyny i nauk biologicznych, a wybrane informacje skupiają się

na zagadnieniach, które budziły największe zainteresowanie słuchaczy.

Główne kierunki oceny leku dotyczą: skuteczności działania, bezpieczeństwa stosowania leku oraz jego jakości. Podstawowe procesy, którym podlega każdy lek w organizmie, określane jako LADME (ang. *liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion*), przez lata były oceniane w oparciu o wyniki doświadczeń *in vivo* prowadzonych na zwierzętach oraz obserwacji pacjentów i ochotników w badaniach klinicznych. Obecnie dla skrócenia czasu trwania oceny leku i możliwości szybszego wprowadzenia go na rynek, coraz częściej i w coraz większym zakresie badania prowadzone są na hodowlach komórkowych. Możliwe jest nie tylko utrzymanie przy życiu dowolnych komórek, ale konstruowanie hodowli przestrzennych, gdzie wzajemne oddziaływanie komórek na siebie, podobnie jak *in vivo*, są wielokierunkowe – tworzenie tzw.: ekwiwalentów tkanek, odtwarzanie warunków związanych z przepływem krwi przez obszary zasiedlone komórkami, a nawet odtwarzanie w dużym stopniu przepływu płynów ustrojowych kolejno przez kilka hodowli komórek charakterystycznych dla konkretnych narządów (wątroba, nerki, płuco, mięśnie itd.). Dodatkowo, badania prowadzone w warunkach *in vitro* umożliwiają równoczesne wykonywanie oznaczeń odnoszących się do różnych aspektów oceny leku i ułatwiają wskazanie, na które konkretnie komórki i struktury w obrębie danego narządu i organizmu działa badana substancja.

Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, ECACC), Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych (ang. *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, DSMZ) czy Amerykański Bank Tkanek (ang. *American Type Culture Collection*, ATCC) posiadają materiał pochodzący od ludzi i zwierząt, reprezentujący różne właściwości, wywodzący się z różnych narządów i tkanek – prawidłowych i chorobowo zmienionych [1–3]. Stwarza to ogromne możliwości prowadzenia badań na komórkach, które są realnie najbardziej narażone na działanie leku. Z kolei oznaczenia wykonane na hodowlach komórek pobranych od konkretnego pacjenta nie tylko poszerzają wiedzę ogólną dotyczącą działania danego leku, wyznaczają kierunki rozwoju technologii otrzymywania najskuteczniejszej formy i postaci leku, ale też stają się ważnym elementem terapii personalizowanej.

Na podstawie badań prowadzonych na hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro* dokonuje się wstępnej selekcji potencjalnych substancji leczniczych, oceniając ich wpływ na

wybrane modele komórkowe. Etap ten jest niezwykle istotny, ponieważ pozwala wyłonić spośród ogromnej liczby substancji te, które wywierają na komórki pożądane efekty (np. ograniczają proliferację komórek nowotworowych, działają przeciwzapalnie, nasilają syntezę określonych białek itp.). Dodatkowo pozwala ograniczyć do minimum wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych podczas badań przedklinicznych, które są jednak niezbędne do sprawdzenia farmakokinetyki potencjalnych leków. Dopiero po etapie badań przedklinicznych i wyeliminowaniu substancji nie wykazujących pożądanego działania lub substancji toksycznych, możliwe jest rozpoczęcie podawania leków ludziom w fazie badań klinicznych, obejmujących początkowo niewielką grupę ochotników. W trakcie tego etapu badań może się okazać, że substancja która pozytywnie przeszła etap badań przedklinicznych jest w organizmie człowieka metabolizowana odmiennie niż u zwierząt i wykazuje działanie toksyczne. Dopiero wykluczenie tego działania daje podstawę do rozpoczęcia badań klinicznych na większej grupie pacjentów.

Właściwości fizykochemiczne leku

Punktem wyjścia każdego badania są właściwości fizyczne i chemiczne analizowanych substancji. Potencjał terapeutyczny leku uzależniony jest od lipofilności, zdolności do dyfuzji oraz rozpuszczalności. Klasyfikacja BCS (ang. *Biopharmaceutics Classification System*) umożliwia szybkie powiązanie cechy biologicznej z cechą fizyczną, dzięki czemu można przewidzieć dostępność biologiczną i wpływ na nią czynników technologicznych. Klasa I – substancje o wysokiej dostępności farmaceutycznej i biologicznej, dobrze rozpuszczalne i szybko się wchłaniające. Klasa II – substancje słabo rozpuszczające się, których biodostępność jest określona możliwościami rozpuszczenia się danej substancji. Klasa III – substancje dobrze rozpuszczalne, ale słabo przenikające; substancja lecznicza uwalnia się szybko, ale jest powoli wchłaniana. Klasa IV – substancje słabo rozpuszczalne i słabo przenikające – substancje o niskiej dostępności farmaceutycznej i biologicznej [4].

Skuteczność, miejsce oraz określony czas działania substancji leczniczej zależy od odpowiednio zaprojektowanej postaci leku. Dzięki procesom technologicznym możliwe jest zwiększenie wchłaniania substancji leczniczych, np. z przewodu pokarmowego, które cechują się małą dostępnością biologiczną po doustnym podaniu leku. Uzyskanie pożądanego szybkości uwalniania substancji zawartej w leku zależy m.in. od postaci leku, modyfikacji

jego składu czy wielkości cząstek. Wielkość nie powinna przekraczać 30 μm , a jeżeli jest to substancja bardzo trudno rozpuszczalna można np. zastosować postać zmikronizowaną [5]. W przypadku nanocząsteczek wiadomo o wyjątkowym zestawie właściwości w zakresie dostarczania substancji leczniczych: bardzo wysoka zdolność upakowania substancji aktywnych, długotrwałe i kontrolowane ich uwalnianie, stabilność, a także możliwość ukierunkowanego dostarczania leku. Dodatkowo, aby zwiększyć indeks terapeutyczny, głównie w przypadku miejscowego stosowania leku, nanocząsteczki mogą być wiązane z hydrożelami, tworząc hybrydowy biomateriał [6].

Przenikanie substancji leczniczych przez bariery biologiczne – transport przez błony

Wchłanianie substancji leczniczej związane jest z pokonaniem bariery biologicznej w postaci warstwy komórek nabłonkowych, często z warstwą śluzu. Szybkość procesu wchłaniania jest zależna od ukrwienia w miejscu wchłaniania, zdolności przenikania substancji przez błony komórkowe, wielkości cząsteczek, postaci chemicznej (sól, ester lub wolny związek, forma krystaliczna) czy pH środowiska [5]. Szybkość i stopień wchłaniania substancji leczniczej w dużej mierze może również zależeć od interakcji z innymi substancjami obecnymi w środowisku (np. w przewodzie pokarmowym interakcji ze składnikami żywności), co jest coraz częściej obiektem zainteresowań naukowców [7]. Wymienione zjawiska do niedawna były badane tylko na organizmach żywych. Obecnie wiele z tych procesów można oceniać na hodowlach komórkowych lub innych modelach w układzie *in vitro*.

Metabolizm leku

Większość leków metabolizowana jest w wątrobie, która posiada układy mikrosomalne zawierające szereg enzymów. W pierwszym etapie dochodzi tam do hydrolizy, utleniania oraz redukcji, które prowadzą do aktywacji, inaktywacji lub nie wpływają na działanie substancji leczniczej. W drugim etapie zachodzą procesy sprzęgania substancji leczniczej lub produktów powstałych w pierwszej fazie, umożliwiające wydalenie leku z organizmu. Płeć, wiek, choroby wątrobowe, alkohol oraz inne używki, czynniki genetyczne i środowiskowe mogą istotnie wpływać na przebieg tych procesów. Zmniejszona zdolność metabolizowania leków u nowo narodzonych dzieci wynika z niewykształcenia jeszcze układów enzymatycznych, a u osób starszych jest efektem słabszej

aktywności enzymów mikrosomalnych [8]. Największe znaczenie dla biotransformacji leków ma grupa enzymów mikrosomalnych – rodzina cytochromu P450 – CYP3A, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 oraz CYP2C19 [9]. Pamiętać należy, że hamowanie lub indukcja enzymów metabolicznych w wątrobie przez jeden lek może wpłynąć na metabolizm innych stosowanych leków. Albassam i wsp. [10] prowadząc badania z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych wskazali, na podstawie hamowania przez tymochinon aktywności metabolicznej enzymów mikrosomalnych cytochromu P450, na możliwość interakcji badanego przez nich związku z lekami, które są metabolizowane przy udziale zwłaszcza CYP2C9. Z kolei Zhou i wsp. [11] podobny mechanizm wykazali prowadząc badania na mikrosomach wątrobowych z plantainozydem D zawartym w roślinie *Plantago asiatica*, który nieznacznie hamował aktywność CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A.

Badania przeprowadzane na zwierzętach w tym zakresie, mimo że bardzo ważne, mają ograniczoną wartość, ponieważ istnieją spore różnice w szlakach metabolicznych wątroby u różnych gatunków. W przemyśle farmaceutycznym coraz częściej wykorzystuje się więc modele *in vitro* – zaczynając od mikrosomów, poprzez transfekowane linie komórkowe, aż po hodowle pierwotnych ludzkich hepatocytów (ang. *primary human hepatocytes*, PHH). Ze wszystkich wymienionych modeli najczęściej wykorzystuje się PHH, ponieważ zapewniają one przeprowadzanie badań z dużą wydajnością, a komórki wykazują wszystkie charakterystyczne transportery, kofaktory oraz enzymy [12]. I tak np. pierwotne ludzkie hepatocyty, jak i mikrosomy wątrobowe wykorzystano do oceny metabolizmu iwermektyny – leku przeciw pasożytniczego, który ma też działanie przeciwwirusowe, w tym przeciwko SARS-CoV-2, wykazując, że iwermektyna jest metabolizowana głównie przy udziale CYP3A4 [13]. Analizując mikrosomy wątrobowe poddane działaniu atalurenu ustalono, że głównym szlakiem metabolicznym tego leku jest bezpośrednia glukuronidacja, a nie metabolizm zachodzący przy udziale cytochromu P450 [14].

Wydalenie leku

Wydalenie to ostatni etap związany z obecnością leku w organizmie, polegający na usunięciu substancji leczniczej lub jej metabolitu z organizmu. Wydalenie może odbywać się kilkoma, niezależnymi od siebie drogami, przez: nerki – mocz, gruczoły ślinowe – ślina, wątrobę – żółć, płuca – wydychane powietrze, gruczoły potowe w skórze – pot, gruczoły mleczne – mleko. Najczęstszą

i najważniejszą drogą wydalania leku z organizmu jest wydalanie go przez nerki wraz z moczem i obejmuje: przesączanie kłębuszkowe, aktywne wydzielanie kanalikowe oraz bierną i aktywną resorpcję zwrotną. Wszystkie wymienione procesy zachodzą w różnych odcinkach nefronu. Dzięki przesączaniu kłębuszkowym do moczu pierwotnego dostają się substancje, które nie są związane z białkami i występują w postaci wolnej. Związki niejonizowane ulegają resorpcji zwrotnej biernej w kanalikach nerkowych, zgodnie z gradientem stężeń oraz w zależności od rozpuszczalności w lipidach, pH i pKa. Szczególne znaczenie w procesie resorpcji zwrotnej ma pH, a także stopień dysocjacji związku [5].

Ocena *in vitro* działania substancji aktywnych i leków

Hodowle tkankowe i komórkowe

Do niedawna badania prowadzono głównie na hodowlach jednowarstwowych-dwuwymiarowych (2D) na różnych płaskich podłożach. Najczęściej były to hodowle komórek jednego rodzaju wywodzących się z różnych narządów i tkanek (hepatocyty, miocyty, fibroblasty, melanocyty, komórki płuc, śródbłonka, krwi) lub kokultury zawierające mieszaninę komórek charakterystycznych dla danej tkanki czy narządu. Obecnie banki tkanek oferują całe panele komórek wywodzących się np. z różnego rodzaju zmian chorobowych – najczęściej nowotworów razem z linią komórek prawidłowych pochodzących z tego samego narządu. Jest to zwykle kilka lub kilkanaście linii tak dobranych, aby reprezentowane tam były komórki z różnych miejsc ogniska pierwotnego czy przerzutów, komórki z różnymi receptorami i ekspresją różnych białek enzymatycznych, adhezyjnych, transportujących. W tabeli 1 przedstawiono dostępne w ATCC panele nowotworów: piersi – panel ogólny to 45 linii, szyjki macicy – 4 linie, wątroby – 7 linii, żołądka – 6 linii, mózgu – 4 linie, trzustki – 7 linii i inne [3]. Do każdego panelu – dla każdej linii dostarczany jest certyfikat analiz i karta produktu. Linie mogą być dobrane pod kątem określonych zmian genetycznych, aktywności lub jej braku, regulatorów cyklu komórkowego (p53, EGRF, BRAF, PI3K, AKT) i wielu innych.

Coraz częściej w badaniach wykorzystuje się już trójwymiarowe modele komórek (3D), które lepiej oddają wzajemne relacje przestrzenne komórek. Do tego rodzaju hodowli należą: wielokomórkowe sferoidy, organoidy, hodowle na rusztowaniach, hydrożelach oraz narządy na chipach [15]. Modele hodowli trójwymiarowej promują różne poziomy różnicowania komórek i organizacji tkanek, które

Tabela 1. Panele nowotworowe dostępne w ATCC [3].**Table 1.** Cancer panels available at ATCC [3].

Panel nowotworowy	Linie komórkowe
Mózg	PFSK-1, A172, SW1088, Daoy
Głowa i szyja	A-253, SCC-15, SCC-25, SCC-9, FaDu, Detroit 562
Płuco	NCI-H2126, NCI-H1299, NCI-H1437, NCI-H1563, NCI-H1573, NCI-H1975, NCI-H661
Pierś panel ogólny	184B5, AU-565, BT-20, BT-474, BT-483, BT-549, CAMA-1, DU4475, HCC38, HCC70, HCC202, HCC1187, HCC1395, HCC1419, HCC1428, HCC1500, HCC1569, HCC1599, HCC1806, HCC1937, HCC1954, HCC2157, HCC2218, Hs 578Bst, Hs 578T, MCF7, MCF 10A, MCF10F, MCF-12A, MDA-kb2, MDA-MB-134-VI, MDA-MB-157, MDA-MB-175-VII, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, T47D, UACC-812, UACC-893, ZR-75-1, ZR-75-30
Pierś rak potrójnie ujemny	HCC1599, HCC1937, HCC1143, MDA-MB-468, HCC38, HCC70, HCC1806, HCC1187, DU4475, BT-549, Hs 578T, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-453, BT-20, HCC1395
Żołądek	KATOIII, NCI-N87, SNU-16, SNU-5, AGS, SNU-1
Trzustka	Capan-2, Panc 10.05, CFPAC-1, HPAF-II, SW 1990, BxPC-3, AsPC-1
Wątroba	SNU-475, C3A, SNU-449, PLC/PRF/5, SNU-387, SK-HEP-1, SNU-423
Szyjka macicy	Ca-Ski, DoTc2 4510, SiHa, C-33-A
Jajnik	PA-1, Caov-3, SW 626, SK-OV-3
Pęcherz moczowy	5637, HT-1197, HT-1376, RT4, SW780, T-24, TCCSUP, UM-UC-3

nie są możliwe w konwencjonalnych systemach hodowli 2D. Zyskały one szczególną popularność w wyjaśnianiu biologii nowotworów – przerzutów, oporności na leki czy nawrotów choroby. Hodowle te są wykorzystywane również do oceny toksyczności badanych leków. Sferoidy i organoidy wątroby oraz narządy na chipach są coraz częściej wykorzystywane do badań metabolizmu leku. Tak zwane narządy na chipach – *organ-on-a-chip*, pozwalają na badanie fizjologii człowieka w kontekście wybranego narządu, umożliwiają opracowanie nowych modeli chorób *in vitro* i mogą również służyć jako zamienniki dla badań na zwierzętach [16]. W ostatnich latach tworzy się coraz bardziej złożone urządzenia mikroprzepływowe w celu uzyskania kontrolowanego środowiska do manipulacji oraz długotrwałego różnicowania się różnych typów hodowanych komórek. Opracowano urządzenie mikroprzepływowe, które zawiera bioreaktor złożony z dwóch równoległych mikrokanalów, oddzielonych cienką przepuszczalną membraną, do oceny wysokich wymagań metabolicznych hodowli pierwotnych hepatocytów. Początkowo produkcja takich systemów była oparta na kosztownej i złożonej mikroobróbce krzemu. Obecnie opracowano już systemy mikroprzepływowe wykonane z polidimetylosiloksanu (ang. *polydimethylsiloxane*, PDMS). Charakteryzują się one bardzo wysoką przepuszczalnością gazu [17] i przezroczystością optyczną, co umożliwia przeprowadzenie w czasie rzeczywistym różnych pomiarów [18]. Rozwój mikroinżynierii pozwala na tworzenie nowych modeli *in vitro*, które odtwarzają coraz bardziej skomplikowane struktury 3D obecne w narządach oraz

integrują kluczowe dynamiczne, mechaniczne i chemiczne sygnały. Opracowano mikroprzepływową platformę kokulturową, pozwalającą na komunikację pomiędzy różnymi typami tkanek. Integracja wielu typów narządów w jeden chip (*body-on-chip*) jest szczególnie przydatna w zrozumieniu farmakodynamiki i farmakokinetyki leków [19].

Ważnym rozdziałem w badaniach trójwymiarowych *in vitro* było wprowadzenie do hodowli komórek macierzystych – embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ESC), a następnie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSC). Wykazano, że w takich przypadkach organoidy samoorganizują się podobnie jak w narządach *in vivo* i mogą intensywnie rosnąć w hodowli przy zachowaniu stabilności genomowej. Wykazano ich szczególną przydatność w tworzeniu modeli chorób zaburzeń neurodegeneracyjnych, neurorozwojowych, psychiatrycznych, neurookulistycznych, ale i wielu innych [20]. Pojawiły się firmy oferujące organoidy komercyjne, a liczba oczekujących na patenty w tym zakresie ciągle rośnie.

Liczba nowych metod i testów oferowanych na rynku i opisywanych przez naukowców z różnych ośrodków badawczych z jednej strony pokazuje ogromne potencjalne możliwości wykorzystania metod *in vitro* do testowania leków, w każdym możliwym aspekcie z odwzorowaniem warunków panujących w organizmie, ale z drugiej strony zmusza do wyselekcjonowania, sprawdzenia, wystandaryzowania, znormalizowania oraz legalizacji wybranych metod do oceny leku – co

przy takim szybkim rozwoju nauki w tym zakresie często bywa trudne. Wiele organizacji podejmuje działania na tym polu. The Innovation & Quality Microphysiological Systems (IQ MPS) Affiliate – konsorcjum firm farmaceutycznych i biotechnologicznych w ramach Międzynarodowego Konsorcjum na rzecz Innowacji i Jakości w Rozwoju Farmaceutycznym (IQ Consortium) wraz z Food and Drug Administration (FDA) przygotowują odpowiednie opracowania dotyczące złożonych modeli *in vitro* (ang. *complex in vitro models*, CIVM) i technologii systemów mikrofizjologicznych (ang. *microphysiological systems*, MPS), które mogą być wykorzystywane w ocenie leków. Organizacje te wypracowały ogólny konsensus w sprawie CIVM i ich stosowania w ocenie LADME oraz ocenie bezpieczeństwa leku, wskazując na konieczność zróżnicowania metod w kontekście użytkowania (ang. *contexts of use*, COU). Odnoszą się one zarówno do komórek zwierzęcych, jako głównego modelu badań przedklinicznych *in vivo* stosowanego do tej pory, jak również do komórek ludzkich [21].

Transport przez błony – ocena w warunkach *in vitro*

Możliwości transportu przez błony danego leku można oceniać przeprowadzając badania z wykorzystaniem sztucznie otrzymanych błon fosfolipidowych. Żeby przeprowadzić doświadczenia dotyczące aktywności białek błonowych stosuje się błony rekonstruowane, które zawierają jedno lub kilka białek, umożliwiając badanie struktury i dynamiki kanałów występujących w błonach biologicznych, to znaczy pomiar przepływu jonów przez pojedynczy kanał w błonie [22]. Do pomiaru stosowane są odpowiednie elektrody. Metoda pomiaru aktywności kanałów jonowych powierzchni całej błony komórkowej to *voltage-clamp*, a pomiary dla małych fragmentów błon, tzw. łatek (ang. *patch*) z niewielką liczbą kanałów jonowych to metoda *patch-clamp* [23]. Ta ostatnia metoda umożliwia rozróżnienie prądów, które płyną przez pojedyncze kanały i jest obecnie tzw. złotym standardem w pracowniach elektrofizjologii.

Aby uzyskać odpowiedź na temat mechanizmów transportu biernego i aktywnego substancji leczniczej, a także przeprowadzać badania dotyczące szybkości transportu substancji przez błony, wykorzystuje się modele kultur nabłonka jelitowego *in vitro*. Stosowane linie najczęściej wywodzą się z gruczolaków jelita grubego, ale mogą również pochodzić z eksplantów prawidłowych tkanek, które zostały pobrane z organizmu człowieka w związku z innymi badaniami lub zabiegami. Najlepiej poznanymi komórkami nabłonka

jelitowego są komórki linii Caco-2 i HT29. Są to komórki nowotworowe, ale wiele ich cech przypominających enterocyty prawidłowe pozwala na zastosowanie ich do oceny transportu różnych substancji przez błony [24, 25]. Komórki Caco-2 wywodzą się z ludzkiego gruczolaka jelita grubego [1–3] i produkują wiele enzymów oraz białek transportowych, biorących udział w transporcie aminokwasów, peptydów, cukrów oraz witamin, a także wytwarzają białka oporności wielolekowej – glikoproteinę P (P-gp) [26]. Wykazują wzrost adherentny na stałych powierzchniach i mikroporowatych membranach, gdzie charakteryzują się zdolnością do spontanicznego różnicowania w czasie hodowli w komórki podobne pod względem morfologicznym i funkcjonalnym do prawidłowych enterocytów [27]. Po 2–3 tygodniach prowadzenia hodowli w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) w standardowych warunkach (temperatura 37°C, 5% stężenie CO₂, stałe nasycenie parą wodną), komórki tworzą monowarstwę, w której wykazują charakterystyczną dla enterocytów biegunowość – jądro komórkowe umiejscowione jest w części podstawnej komórki, a w części szczytowej widoczny system mikrokosmków tworzy tzw. rąbek szczoteczkowy. Komórki Caco-2 tworzą ściśle połączenia między sobą, produkują aminopeptydazy, alkaliczną fosfatazę, sacharazy [28]. Analizując możliwości transportu badanej substancji, komórki hoduje się w specjalnych naczyniach z insertami. W wewnętrznym naczyniu dno tworzy porowata membrana, na której umieszcza się komórki, a w zewnętrznym naczyniu umieszcza się pożywkę. Dostęp do pożywki w tym układzie pozwala na wytworzenie wysokiego stopnia spolaryzowania komórek. Ich wzrost i namnażanie trwa aż do osiągnięcia stanu konfluencji [26]. Pomocą w ocenie spójności monowarstwy komórek linii Caco-2 są pomiary szybkości transportu znakowanych hydrofilnych substancji markerowych (inulina, mannitol, glikol polietylenowy) lub oporu elektrycznego TEER (ang. *transepithelial electrical resistance*) między naczyniami [28]. Roztwór leku lub innej substancji badanej umieszcza się w naczyniu wewnętrznym – na komórkach i po określonym czasie inkubacji, wykonuje się pomiary tej substancji w pożywce naczynia zewnętrznego. Jest to wskaźnik przebiegu transportu badanej substancji przez ściany jelita [26]. Oznaczenia prowadzi się równolegle ze związkami referencyjnymi, których poziom wchłaniania u ludzi jest znany, takimi jak atenolol (słaba przepuszczalność, pasywny transport parakomórkowy) i propranolol (wysoka przepuszczalność, pasywny transport transcelularny) [27]. Problemem związanym z komórkami Caco-2 jest

stosunkowa słaba ekspresja cytochromu P450 i większe zagęszczenie komórek w porównaniu z prawidłowymi enterocytami [26].

W warunkach *in vitro* możliwe jest określenie, jakiemu rodzajowi transportu podlega badana substancja – transport bierny czy aktywny. Jeżeli substancja przenika przez monowarstwę komórkową w temperaturze 4°C, to uznaje się, że substancja ulega transportowi pasywnemu. Przenikanie w temperaturze 37°C, przy jednoczesnym braku lub małym przenikaniu przy 4°C, świadczy o transporcie aktywnym. Pamiętać jednak należy, że transport aktywny zależy nie tylko od temperatury, ale również od stężenia składnika i pH buforu transportowego [28]. Opracowano kilka modeli, które wykorzystują rusztowania 3D, aby pomóc komórkom Caco-2 i organoidom w osiągnięciu układu przestrzennego odpowiadającemu warunkom panującym *in vivo*, który pomaga w różnicowaniu i zwiększa znaczenie fizjologiczne badań [29].

Kolejna linia komórkowa, wykorzystywana równie często w badaniach co Caco-2, to linia gruczołakoraka jelita grubego – HT-29, uznawana za reprezentatywną dla nabłonka jelita grubego. Komórki tej linii wykazują morfologię typową dla komórek nabłonkowych, jednak nie różnicują się do form tworzących rąbek szczoteczki. Dużą część populacji komórek HT-29 stanowią za to komórki kubkowe odpowiedzialne za tworzenie dużej ilości śluzu jelitowego (szczególnie mutant HT29 MTX). Komórki HT-29 posiadają mutację prowadzącą do nadprodukcji białka p53, receptora urokinazy i witaminy D, lecz nie mają receptora dla aktywatora plazminogenu. Wykazują wrażliwość na wirusy HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) i LAV (ang. *lymphadenopathy-associated virus*) [3].

Bardziej złożonymi modelami przewodu pokarmowego, które są ostatnio testowane, to organoidy nabłonkowe przewodu pokarmowego – samoorganizujące się trójwymiarowe (3D) hodowle ww. komórek lub komórek konkretnego pacjenta, osadzone w macierzy zewnątrzkomórkowej zawierającej duże ilości lamininy, wzrastające w podłożu wzbogaconym o specyficzne czynniki wzrostu. Organoidy nabłonkowe pochodzące z pierwotnych dorosłych komórek żołądka nazywane są gastroidami, jelita cienkiego – enteroidami i okrężnicy – kolonoidami. Organoidy nabłonkowe mogą też być wytwarzane poprzez różnicowanie *in vitro* z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (ang. *human embryonic stem cells*, hESC) lub ludzkich indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (ang. *human induced pluripotent stem cell*, hiPSC). Indukowane organoidy jelitowe uważane są za najbardziej

reprezentatywne dla warunków jelitowych panujących *in vivo*, a protokół różnicowania organoidów jelitowych sprzyja wytwarzaniu mezenchymy [29].

Ważnym zagadnieniem w badaniach biofarmaceutycznych, obok badań dotyczących transportu przez ścianę jelita, jest transport przez skórę. Do oceny tego zjawiska wykorzystuje się metody *in vitro* z użyciem fragmentów skóry ludzkiej, badania na ekwiwalentach skóry, badania mikroskopowe, pomiar transepidermalnej ucieczki wody czy badania w specjalnej komorze dyfuzyjnej Franza [30]. W zależności od rodzaju prowadzonych badań można wykorzystać tutaj: jednorodne hodowle (keratynocytów, fibroblastów, melanocytów, komórek Langerhansa), hodowle komórek genetycznie modyfikowanych czy komórek w różnych stadiach transformacji i różnicowania, kokultury różnych typów komórek (np. keratynocyty z melanocytami i fibroblastami, keratynocyty z komórkami układu odpornościowego itp.) oraz trójwymiarowe substytuty naskórka, skóry właściwej oraz pełnej grubości substytuty skóry. Są one już dostępne komercyjnie, np. ekwiwalenty naskórka – EpiSkin (ludzkie keratynocyty hodowane na kolagenie – możliwe końcowe różnicowanie z funkcjonalną warstwą rogową), EpiDerm (ludzkie keratynocyty noworodka, tworzące wysoce zróżnicowany i wielowarstwowy model), SkinEthic Rhe (zrekonstruowany ludzki naskórek – keratynocyty hodowane są na poliwęglanowym filtrze na granicy faz powietrze-pożywką), Epidermal Skin test (EST1000) (model naskórka zawierający w pełni zróżnicowany naskórek składający się z żywych i zrogowaciałych warstw). Pełnej grubości ekwiwalenty skóry to Testskin oraz EpiDermFT (noworodkowe skórne fibroblasty z noworodkowymi ludzkimi keratynocytami w strukturze wielowarstwowej), Strata Test (model pełnej grubości skóry z keratocytami NIKS – progenitorowe keratynocyty), Advanced Skin Test 2000 (AST2000) (model pełnej grubości skóry z fibroblastami i keratynocytami) [30–32].

Liczba chorób układu oddechowego oraz światowa pandemia COVID-19 dowiodły ogromnej potrzeby wypracowania modeli *in vitro* oddających funkcjonowanie układu oddechowego i naśladujących schorzenia tego układu. Zwrócono też uwagę na fakt, że wykorzystywane w tym zakresie modele zwierzęce w dużym stopniu nie oddają złożoności procesów, jakie zachodzą u człowieka (uznaje się, że 80% niepowodzeń w ocenie skuteczności leków testowanych na zwierzętach, a przeznaczonych dla ludzi, wynika z różnic w funkcjonowaniu układu oddechowego u zwierząt i człowieka) [33].

Wykorzystanie ludzkich komórek jako modelu transportu leków w płucach jest ograniczone do linii komórkowych dróg oddechowych. Ustalone linie komórkowe nabłonka pęcherzyków płucnych, jak np. A549 czy TTI, są tu nieprzydatne, ponieważ nie tworzą warstw komórkowych o właściwościach barierowych reprezentatywnych dla nabłonka płuc. Do oceny *in vitro* wchłaniania przez nabłonek oddechowy od lat wykorzystywano komórki linii Calu-3 (komórki surowicze gruczołów podśluzówkowych o wysokiej aktywności P-gp i zdolnościach wydzielniczych) [34]. Do badań transportu i wychwytu cząsteczek, które mogą być dostarczane z powietrzem wdychanym, dobrym modelem są komórki linii 16HBE14 – komórki ludzkiego nabłonka oskrzelowego [18], do odtworzenia bariery pęcherzykowej – komórki AEC I (komórki płaskonabłonkowe, które tworzą brukowaną strukturę w głębokich obszarach oddechowych, stanowiąc ponad 90% powierzchni pęcherzyków płucnych) oraz AEC II (komórki wydzielające środek powierzchniowo czynny (PS)). Opisywane są też badania na pierwotnych komórkach AEC (ang. *human aortic endothelial cells*, hAEC), komórkach śródbłonka mikronaczyniowego płuc człowieka (ang. *human cardiac microvascular endothelial cells*, hMVECh), prawidłowych ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (ang. *normal human bronchial epithelial cells*, NHBE), komórkach pierwotnych nabłonka pęcherzyków płucnych (ang. *primary human pulmonary alveolar epithelial cells*, pHPAEC) [33]. Zwraca się przy tym uwagę na to, że tradycyjnie prowadzona hodowla komórek nabłonkowych dróg oddechowych, polegająca na zanurzeniu komórek w pożywce, nie oddaje właściwych warunków pracy tych komórek i wskazuje się na przydatność zastosowania wkładek zawierających porowate błony i opartych na interfejsie powietrze-ciecz. Dodatkowo taki sposób prowadzenia hodowli przyczynia się do zróżnicowania populacji komórek nabłonkowych, silniejszej integralności monowarstwy i zwiększonego wydzielania środka powierzchniowo czynnego [33].

Kaluzhny i wsp. [35] stworzyli na granicy faz pożywka-powietrze model 3D nabłonka rogowki, który może być wykorzystany podczas opracowywania nowych leków okulistycznych. Przepuszczalność modelu, integralność i żywotność, a tym samym jego użyteczność potwierdzona została oceną przenikania przez barierę dwóch leków okulistycznych – latanoprostu i bimatoprostu.

Bardzo ważnym aspektem działania leków jest ocena zdolności pokonywania bariery krew-mózg. Od lat stosowano tu komórki śródbłonka naczyń mózgowych krowy BBMECs (ang. *bovine brain microvessel endothelial cells*) i PBMECs

(ang. *porcine brain microvessel endothelial cells*) – komórki śródbłonka naczyń mózgowych świni. Jednak różnice w ekspresji wielu białek i aktywności transporterów, wynikające z pochodzenia komórek, są powodem do odchodzenia od tego modelu. Obecnie do badań w tym zakresie rekomenduje się komórki ludzkie i kokultury – hodowle ludzkich komórek śródbłonka, astrocytów i perycytów. Komórki śródbłonka mikronaczyniowego ludzkiego mózgu (ang. *human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) tworzą ciasne połączenia, które w naturalnych warunkach regulują wymianę składników odżywczych, tlenu, jonów i metabolitów między krążącą krwią a płynami zewnątrzkomórkowymi tkanki nerwowej. Astrocyty odgrywają kluczową rolę w rozwoju i funkcjonowaniu mózgu poprzez regulację fenotypu komórek śródbłonka i kontrolę komunikacji komórka-komórka za pośrednictwem takich czynników jak: transformujący czynnik wzrostu- β (ang. *transforming growth factor- β* , TGF β), neurotroficzny czynnik pochodzenia glijowego (ang. *glial cell derived neurotrophic factor*, GDNF) czy podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, bFGF). Astrocyty regulują wymianę cząsteczek do i z mózgu, które kontrolują i modulują efekty neurotoksyczne oraz utrzymują homeostazę mózgu – związane jest to z wysoką ekspresją kładyny (np. kładyna-3, kładyna-5), cytoplazmatycznego białka okcludens (ang. *zonula occludens*, ZO) oraz cząsteczek adhezyjnych [36]. Ponadto, wskazuje się, że w modelu tym tradycyjne półprzepuszczalne membrany powinny być zastępowane błonami biologicznymi opartymi na białkach macierzy zewnątrzkomórkowej lub hydrożelami naśladującymi blaszkę podstawną, aby zapewnić bliski kontakt komórka-komórka [37]. Najnowocześniejsze modele pokonywania bariery krew-mózg u człowieka (ang. *blood brain barrier*, BBB) *in vitro* to obecnie: 1) w modelu statycznym – hodowle z wkładkami Transwell; 2) w modelu dynamicznym – systemy mikroprzepływowe i hodowle z systemami włókien naśladujących naczynia krwionośne [36]. Systemy statyczne składają się z dwóch przedziałów oddzielonych półprzepuszczalną membraną z tworzywa sztucznego, w której zachodzi dyfuzja pionowa. Ten model hodowli obejmuje monowarstwę komórek śródbłonka (ang. *endothelial cells*, EC) na błonie wkładki Transwell oraz w studziencie – hodowle astrogleju. W modelach bezkontaktowych komórki astrogleju rosną na dnie płytki hodowlanej, natomiast w modelach kontaktowych rosną po przeciwnej stronie błony Transwell [38, 39]. Zastosowanie techniki obrazowania superrozdzielczego, takich

jak skaningowy mikroskop elektronowy (ang. *environmental scanning electron microscopy*, ESEM), mikroskopia światła strukturalnego (ang. *structured illuminated microscopy*, SIM), mikroskopia wymuszonej emisji (ang. *stimulated emission depletion*, STED) i mikroskopia lokalizacji pojedynczych cząsteczek fluoroforów (ang. *single-molecule localization microscopy*, SMLM), umożliwia obrazowanie ciasnych i przylegających połączeń w nanoskali, które pojawiają się jako sieć punktów styku między zewnątrzkomórkowymi kładynami, okładynami i innymi białkami transblonowymi.

Ważnym aspektem działania leku na organizm jest jego wpływ na nerki – toksyczność jest jednym z najczęstszych zdarzeń niepożądanych zgłaszanych podczas opracowywania leku. Uszkodzenie może dotyczyć miąższu nerki lub funkcjonowania błony kanalików nerkowych odpowiedzialnych za wydalanie i reabsorpcję jonów i związków. Brak dokładnych predykcyjnych modeli hodowli komórkowych i niewiarygodność badań na zwierzętach stwarzają potrzebę lepszego podejścia do rekapitulacji czynności nerek *in vitro*. Miarą reabsorpcji z kanalików nerkowych mogą być wyniki uzyskane na hodowlach MDCK (komórki kanalik dystalnego nerki psa) czy hodowlach komórek LLC-PK1 (komórki kanalik proksymalnego nerki świni). Jednak ze względu na pochodzenie widoczne są tu różnice funkcjonalne w odniesieniu do komórek ludzkich. Wśród ponad 20 różnych typów komórek nerek, które mogą być potencjalnymi celami ksenobiotyków, komórki nabłonka kanalików proksymalnych (ang. *renal proximal tubular epithelial cells*, PTEC) są najczęściej opisywane w uszkodzeniach nerek. Ze względu na dużą liczbę transporterów wierzchołkowych i podstawno-bocznych odgrywają one kluczową rolę w modulowaniu przepływu wielu leków i endogennych substratów. Najczęściej opisywane transportery występujące w nerkach to OAT1 (ang. *organic anion transporter 1*), OAT3 (ang. *organic anion transporter 3*), OCT2 (ang. *organic cation transporter 2*) i MATE1 (ang. *multidrug and toxin extrusion protein 1*). Najwięcej w korze nerkowej jest OCT2 i MATE 1. Niektórzy autorzy wskazują, że chętnie wykorzystywane do tej pory modele *in vitro* – linie HK-2 i LLC-PK1 nie mają ważnych transporterów nerkowych, takich jak OAT1 i OAT3, a więc wykazują niską predykcyjność w wykrywaniu nefrotoksyczności. Dobrym modelem są natomiast pierwotne PTEC, które cechuje silna ekspresja wielu ważnych białek transportujących i dobra przewidywalność. Opisano też unieśmiertelnione PTEC (ciPTEC) z nadekspresją OAT1 i PTEC pochodzące

z komórek macierzystych o wysokiej predykcyjności w ocenie nefrotoksyczności [40]. W literaturze znajduje się jednak wiele publikacji przedstawiających wyniki badań odnoszących się do nefrotoksyczności wykonanych na hodowlach HK-2. HK-2 to linia wywodząca się z prawidłowych komórek części proksymalnej kanalika nerkowego, które zostały unieśmiertelnione przez *human papilloma virus 16* (HPV-16) E6/E7, a na podstawie analizy Southern i FISH stwierdzono, że linia pochodzi od pojedynczej komórki [3]. Są one zdolne do glukoneogenezy, o czym świadczy możliwość wytwarzania i przechowywania glikogenu. Badanie, w którym bezpośrednio porównywano komórki HK-2 z pierwotnymi ludzkimi komórkami nabłonka kanalików proksymalnych wykazało, że w optymalnych warunkach hodowli są one morfologicznie i funkcjonalnie podobne, co było też podstawą wykorzystywania ich przez długi czas jako modelu do oceny nefrotoksyczności [41].

W oparciu o badania *in vitro* Zhu i wsp. [42] podjęli próbę określenia mechanizmu wydalania przez nerki bestatyny – dipeptydu o właściwościach przeciwnowotworowych i immunomodulujących. Na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem transfekowanych linii komórkowych hOAT1-HEK293 i hOAT3-HEK293 (HEK293 – linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerki), wykazano, że proces wydalania bestatyny w nerkach jest zależny od obecności transporterów OAT1 i OAT3. Z kolei Zhang i wsp. [43] wykorzystując w badaniach te same linie komórkowe (hOAT1-HEK293, hOAT3-HEK293) wykazali, że mechanizm wydalania bentysrepiny – dipeptydu fenyloalaninowego, badanego pod kątem wykorzystania u chorych z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV), jest niezależny od transporterów OAT1 i OAT3, natomiast jeden z metabolitów bentysrepiny jest wydalany z udziałem transportera OAT3.

Powstały już też systemy mikroprzepływowe wyłożone żywymi ludzkimi komórkami nabłonka nerki z ciągłym przepływem pożywki, które naśladują kluczowe funkcje kanalika bliższego ludzkiej nerki. Pierwotne komórki nabłonka nerki wyizolowane z ludzkich kanalików bliższych są hodowane na górnej powierzchni powlekannej macierzą zewnątrzkomórkową, porowatej, poliestrowej membrany, która dzieli główny kanał urządzenia na dwa sąsiednie kanały – kanał światła kanalika nerkowego i kanał odpowiadający części śródmiąższowej. Ekspozycja monowarstwy nabłonkowej na przepływający płyn powoduje zwiększoną polaryzację komórek nabłonkowych i tworzenie pierwotnych rzęsek w porównaniu

z tradycyjnymi systemami hodowli Transwella. Komórki w tych systemach wykazują znacznie większy transport albuminy, wchłanianie zwrotne glukozy, aktywność fosfatazy alkalicznej i aktywność transportera błonowego Pgp. Wykazano, że systemy te bardziej naśladują odpowiedź *in vivo* niż komórki w konwencjonalnych warunkach hodowli [44].

Wpływ leku na narządy i tkanki – ocena w warunkach *in vitro*

Badania dotyczące wpływu danej substancji aktywnej/leku na poszczególne narządy możliwe są dzięki dostępności obecnie prawie wszystkich typów komórek pobranych z różnych narządów od pacjentów chorujących na różne choroby. Pozwala to zaplanować liczne badania na hodowlach komórek jednego rodzaju, wywodzących się z różnych narządów i tkanek. „Narządy na chipach” pozwalają na ocenę działania danej substancji w kontekście specyficznym dla wybranego narządu, umożliwiają opracowanie nowych modeli chorób *in vitro* i mogą służyć jako zamienniki badań na zwierzętach [16]. Ze względu na ograniczenia dotyczące obszerności tekstu publikacji i przy uwzględnieniu narządów, które najczęściej wchodzi w kontakt z lekiem (w nawiązaniu do dróg podania leku) autorzy dokonali przeglądu aktualnego piśmiennictwa i podsumowania w odniesieniu do modeli *in vitro*: żołądka, wątroby, jelita i nerki.

Żołądek *in vitro*

Opisano wiele modeli organoidów żołądka myszy, a w ostatnim czasie również zbudowanych z komórek ludzkich pochodzących zarówno z pierwotnej ludzkiej tkanki żołądka, jak i hPSC. Prowadzono również badania na kokulturach mysich pluripotencjalnych gastroidów pochodzących z komórek macierzystych z autologicznymi komórkami odpornościowymi i uniesmiertelnionymi komórkami mezenchymalnymi żołądka (badania dotyczące infekcji *H. pylori*, nowotworów żołądka, zrozumienia progresji choroby, oceny toksyczności leku i farmakokinetyki) [29]. W badaniach na liniach nowotworowych AGS, MKN45 i MKN74 wykazano antyproliferacyjne działanie metforminy w odniesieniu do nabłonkowych, rakowych komórek żołądka. Dowiedziono też, że metformina wpływa na ekspresję genów regulatorów cyklu komórkowego (GADD45, p21, E2F1 i PCNA), zatrzymując komórki w fazie G0/G1. W hodowlach 3D opisane działanie metforminy skutkowało ograniczeniem formowania agregatów komórek nowotworowych [45].

Żołądek na chipie opisali już Lee i in. [46] – komórki uzyskano z ludzkich pluripotencjalnych

komórek macierzystych hPSC (ang. *human pluripotent stem cells*) hodowanych w Matrigelu. Organoidy umieszczano w specjalnie zaprojektowanej platformie wyposażonej w pompę perystaltyczną pozwalającą naśladować rytmiczne skurcze żołądka. Ta replika „mikrofizjologii” żołądka może być wykorzystana do oceny szybkości rozpuszczania na przykład doustnych stałych postaci leku.

Wątroba *in vitro*

Modelowanie metabolizmu leków w wątrobie ma kluczowe znaczenie dla wartości leku. Początkowo badania *in vitro* w tym zakresie prowadzono na świeżo wyizolowanych hepatocytach, zróżnicowanych komórkach HepaRG (komórki uniesmiertelnione zachowujące wiele cech pierwotnych ludzkich hepatocytów – morfologię, ekspresję kluczowych enzymów metabolicznych i transportery leków; w przeciwieństwie do komórek HepG2 i Fa2N-4, komórki HepaRG mają wysoką aktywność P450 i całkowitą ekspresję wszystkich receptorów jądrowych; wykorzystywane do oceny potencjalnych interakcji lek-lek) lub komórkach nowotworowych [47]. W ostatnim dziesięcioleciu opracowano różne modele wątroby z wykorzystaniem pierwotnych lub indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC). Wątroba na chipie lub inne systemy mikrofizjologiczne wykazują duży potencjał w ocenie właściwości farmakokinetycznych i toksyczności leków [48]. Wybór odpowiedniego rodzaju komórek pochodzących z wątroby zależy od przewidywanego działania leku. Hodowla komórek Kupffera z hepatocytami może odtworzyć czynniki zapalne, które indukują toksyczność wątroby. Kokultura komórek Kupffera z komórkami śródbłonka, komórkami gwiazdzistymi i cholangiocytami może mieć znaczenie przy badaniu efektów leków. Pojawiły się sferoidy wątrobowe 3D lub mikrotkanki ludzkiej wątroby (ang. *human liver microtissues*, hLiMTs), składające się z samozorganizowanych pierwotnych ludzkich hepatocytów, które mogą poprawić zdolność oceny mechanizmów hepatotoksyczności [49]. Opracowano też system złożonej kokultury, który pozwala na kontrolę interakcji homotypowych hepatocytów i heterotypowych z komórkami zrębu (ang. *micro-patterned hepatocyte coculture*, MPCC) i zapewnia lepszą predykcyjność. Taki model jest dostępny na rynku pod nazwą HepatoPac i składa się z wielu wysp hepatocytów otoczonych komórkami zrębu umieszczonymi na płytce wielodołkowej – jest narzędziem do przewidywania prawdopodobnych wyników *in vivo* w odniesieniu do transportu, toksyczności oraz metabolizmu leków i ksenobiotyków [50].

Jelita in vitro

Hodowle enterocytów opisywano od dawna w kontekście oceny transportu przez błony. Opracowano też enteroidy w oparciu o komórki z ludzkiej i mysiej tkanki pierwotnej. Są one głównie wykorzystywane jako modele procesu chorobowego do badania interakcji gospodarz-patogen. Wypracowane do tej pory modele *organ-on-a-chip* jelita cienkiego w większości są zasiedlane wcześniej opisywanymi komórkami Caco-2 i HT-29, pochodzącymi z gruczolakoraka jelita grubego. Hodowle reprezentujące okrężnicę to hodowle kolonocytów i komórek imitujących pochodzących od myszy, świń, nietoperzy, a w ostatnich kilkudziesięciu już latach – od człowieka. W 2011 r. opracowano i opisano hodowlę organoidów nabłonkowych z mysiej i ludzkiej okrężnicy. Wyprowadzono również organoidy ludzkiej okrężnicy z hiPSC. Kolonoidy są wykorzystane do badania chorób genetycznych takich jak np. mukowiscydoza jako model chorób zakaźnych (ludzki rotawirus, *E. Coli*, SARS-CoV-2), do badań przesiewowych leków i substancji wspomagających walkę z rakiem jelita grubego. Chipy okrężnicy okazały się przełomem w badaniu ludzkiej błony śluzowej okrężnicy. Warstwa śluzowa okrężnicy jest pierwszą linią obrony przed inwazyjnymi patogenami i silnie wpływa na rozpuszczalność związków molekularnych w pobliżu komórek, tym samym jest kluczowym czynnikiem w badaniach dotyczących przepuszczalności leków. W 2021 r. opracowano myszy chip okrężnicy ze złożoną mikrobiotą, co znacznie poszerza zakres możliwych badań w układzie *in vitro* związanych z funkcjonowaniem i rolą okrężnicy [29].

Nerki in vitro

Badania związane z nerkami prowadzone są z wykorzystaniem pierwotnych komórek pobranych ze świeżej tkanki nerkowej, które zachowują zróżnicowane cechy dla kilku pasażerów w hodowli. Takie komórki mają ograniczoną dostępność, a ich cechy mogą się znacznie różnić w zależności od pacjenta. Ponieważ pierwotne komórki nerki nie są nieśmiertelne, są mniej odpowiednie do edycji genomu w porównaniu z pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi. Obecnie wyzwania związane z pozyskiwaniem komórek stanowią istotną przeszkodę w stosowaniu systemów mikrofizjologicznych (MPS) do modelowania chorób nerek. Brak podocytów w MPS nerki ogranicza również zdolność do badania mechanizmów filtracji kłębuszków nerkowych. Kilka lat temu podjęto próby różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i udało się stworzyć ludzkie organoidy nerkowe przypominające

prymitywne macierze nefronowe. Cechą charakterystyczną organoidów nerkowych jest tworzenie dystalnych kanalików, kanalików bliższych i podocytów (komórek filtrujących) w sąsiadujących segmentach wzdłuż osi dystalnej do bliższej. Organoidy nerek z mutacjami nokautującymi w genach *PKD1* lub *PKD2* tworzą nawet duże torbiele [51].

Najczęściej wykonywane testy w badaniach prowadzonych in vitro

Liczba komórek (cytotoksyczność związków, żywotność, proliferacja komórek)

Wykonywane na hodowlach oznaczenia to głównie: cytotoksyczność i genotoksyczność związku, uszkodzenia DNA, dobór optymalnych stężeń leku, oddziaływania z różnymi komórkami, wpływ na układ odpornościowy, ocena molekularnego mechanizmu działania, ocena wybranych procesów biotransformacji leku. Przy określaniu działania toksycznego poszczególnych związków i wyznaczaniu (przybliżonego zakresu) stężenia terapeutycznego wykorzystuje się powszechnie stosowane testy na żywotność, cytotoksyczność czy proliferację, takie jak: barwienie błękitem trypanu, DAPI, oranżem akrydyny, bromkiem etyldyny, testy MTT, XTT, WST, znakowanie izotopami, czułe testy fluorescencyjne, oznaczanie uwalniania z komórek dehydrogenazy mleczanowej i wiele innych [52].

Najczęściej stosowane metody do oznaczania względnej liczby komórek (w odniesieniu do liczby komórek w hodowlach kontrolnych) to testy kolorymetryczne wykorzystujące sole tetrazolowe do ilościowego określenia stężenia NAD(P)H i aktywności enzymatycznej dehydrogenaz zależnych od NAD(P). Redukcja barwnika tetrazolowego odzwierciedla tu w dużym stopniu liczbę komórek w hodowli, jednak uzyskane wyniki są też zależne od stężenia glukozy i aktywności metabolicznej komórek. Połączenie testów na bazie tetrazolu z testem ATP może być nowatorskim sposobem monitorowania komórkowego metabolizmu glukozy. Wykazano, że krótkotrwale wycofanie glukozy i glutaminy z hodowli ma niewielki wpływ na wewnątrzkomórkowy poziomy ATP, ale silne działanie hamujące na redukcję barwnika tetrazolowego. Jednak długotrwale wycofanie glukozy i glutaminy prowadzi do wyczerpania ATP w komórkach i ostatecznie do śmierci komórek. Testy na bazie tetrazolu są bardziej wrażliwe na komórkowe blokery metaboliczne niż testy ATP, tak więc mogą być dobrym wyborem do badania leków lub inhibitorów ukierunkowanych na komórkowy metabolizm glukozy. Uwzględniając

fakt, że komórki nowotworowe pobierają więcej glukozy i mają bardziej aktywny metabolizm glukozy niż komórki prawidłowe, testy wykorzystujące tetrazol mogą być pomocne w identyfikacji typów nowotworów i opracowaniu leków przeciwnowotworowych ukierunkowanych na komórkowy metabolizm glukozy [53]. Wartość uzyskanych wyników znacząco różnie po zastosowaniu w odniesieniu do tej samej hodowli kilku testów o innej zasadzie działania, np. wyznaczanie liczby komórek na podstawie barwnika wiążącego się z DNA, aktywności metabolicznej komórek (żywe komórki) i enzymu uwalnianego z martwych komórek. Obecnie dostępne są już gotowe zestawy do równoczesnego oznaczania w tej samej próbce 2–3 parametrów, tzw. zestawy multipleksowe. Barwniki, które nie mogą przenikać przez nienaruszone błony plazmatyczne, takie jak na przykład błękit trypanu lub jodek propidyny, znakują tylko martwe komórki. Inne barwniki, takie jak ester acetoksymetylowy kalceiny (calcein-AM), mogą być stosowane do selektywnego znakowania żywych komórek. Dzięki właściwościom lipofilowym mogą łatwo przenikać do komórek, gdzie są hydrolizowane przez esterazy wewnątrzkomórkowe, a powstające produkty (wykazujące fluorescencję) zatrzymywane są w komórce. Jedną z najbardziej wiarygodnych metod badania śmierci komórki jest pomiar wycieku składników komórkowych (najczęściej enzymów) z uszkodzonych komórek. Najczęściej oznaczenia w tym zakresie dotyczą dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) – zestawy do fluorometrycznego lub kolorymetrycznego wykrywania LDH. Stosowane są też, chociaż znacznie rzadziej, oznaczenia utraty aktywności kinazy adenylowej i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w martwych komórkach. Gotowe zestawy do oznaczania enzymów zostały na tyle uproszczone, że wystarcza dodanie odczynnika do hodowli i wykonanie pomiaru spektrofotometrycznego. Niedogodnością tych metod jest jednak wpływ czynników fizykochemicznych, takich jak np. pH pożywki hodowlanej na aktywność enzymów i możliwość przekłamywania wyników. Dobór różnych testów i punktów czasowych pomiaru może pomóc ustalić zarówno, czy dana substancja niszczy komórki doprowadzając je do śmierci, czy też w pierwszym rzędzie blokuje ich cykl komórkowy i podziały [54]. Pozwala też na ustalenie wielu przydatnych wskaźników, takich jak LC50 (ang. *lethal concentration* dla 50% populacji komórek), EC50 (ang. *effective concentration* dla mierzonej zmiennej), NOEC (ang. *no observed effect concentration* – najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się istotnych efektów działania substancji badanej),

LOEC (ang. *lowest observed effect concentration* – najniższe stężenie, przy którym pojawia się istotny efekt działania danej substancji).

Fototoksyczność

Uznany i wiarygodnym testem na fototoksyczność różnych związków jest test 3T3NRU. Test przeprowadzany na komórkach linii 3T3 w obecności lub przy braku światła UV – cytotoksyczność ocenia się na podstawie wychwytu czerwieni obojętnej po ekspozycji na badaną substancję i UV. Metoda ta została zatwierdzona do przewidywania ostrej fototoksyczności różnych substancji u zwierząt i ludzi *in vivo*. Jest uwzględniona w wytycznych OECD (ang. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) i została włączona do wielu rozporządzeń WE dotyczących oceny bezpieczeństwa chemicznego (metoda zweryfikowana przez Naukowy Komitet Doradczy EURL ECVAM (ESAC)) [55].

Pirogenność

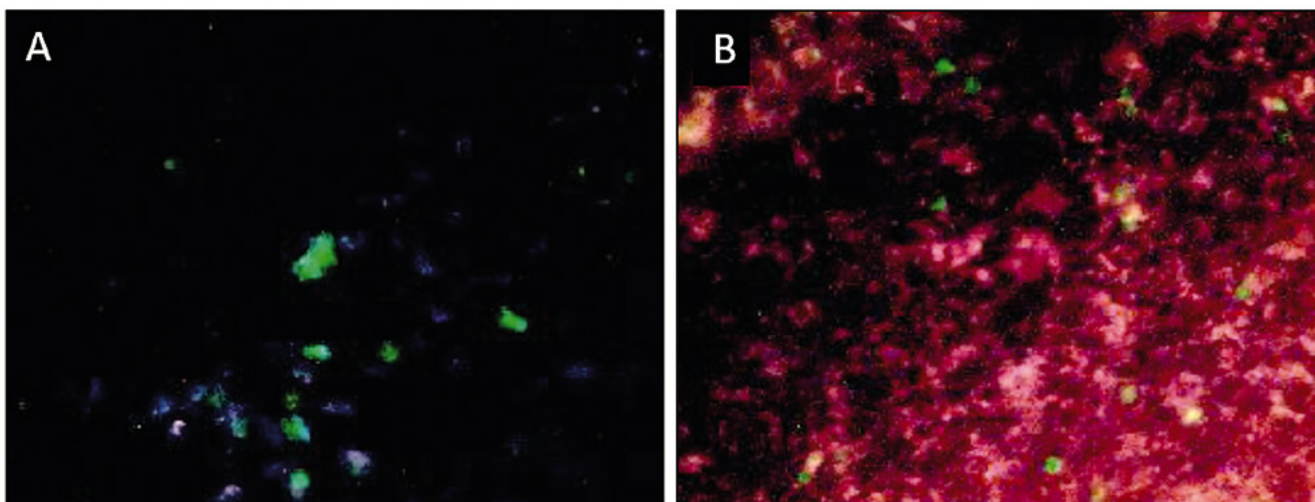
Wiarygodnym testem wykonywanym w układzie *in vitro* jest test na pirogenność różnych substancji, polegający na pomiarach interleukiny-1b i interleukiny-6 w hodowlach monocytów/limfocytów [56].

Genotoksyczność

Hodowle *in vitro* dają duże możliwości w zakresie ustalenia potencjalnego działania genotoksycznego badanej substancji. Uznawane są tutaj oznaczenia wykonane na komórkach chłoniaka myszy L5178Y Tk+/-, znane jako test mutacji genu kinazy tymidynowej. Umożliwia on detekcję szerokiego spektrum uszkodzeń genetycznych, a pomiar mutacji kinazy tymidynowej pozwala na wykrycie różnego rodzaju zaburzeń genetycznych (zgodnie z wytycznymi OECD) [39]. Innym pomocnym badaniem w tym zakresie jest test mikrojader (ang. *Micronucleus Assay*, MNA). Mikrojadra to fragmenty chromosomów nieprawidłowo rozdzielonych podczas podziału komórkowego lub wynik złamania chromosomów. Badania przeprowadza się m.in. na komórkach jajnika chomika chińskiego CHO-K1 poddanych działaniu badanej substancji. Ocena dotyczy stopnia uszkodzeń chromosomów na poziomie pojedynczej komórki (wytyczne OECD) [57].

Toksyczność skórna i oczna

Dużym udogodnieniem w badaniach toksyczności skórnej i ocznej jest możliwość wykorzystania substytutów naskórka i skóry (testy *in vitro* na Episkin, EpiDerm, Prediskin i innych), chociaż pamiętać należy, że w tym przypadku nie wypracowano metody, która w pełni pozwoliłaby



Rycina 1. Obrazy mikroskopowe hodowli komórkowych HT-29 barwionych: A i B – Annexin-V-FLUOUS Staining Kit – barwienie jodkiem propidyny (czerwona fluorescencja) i aneksyną V (zielona fluorescencja); powiększenie x200 [zdjęcia własne].

Figure 1. Microscopic images of HT-29 cell cultures stained: A and B – Annexin-V-FLUOUS Staining Kit – staining with propidium iodide (red fluorescence) and annexin V (green fluorescence); x200 magnification [own photos].

zastąpić test wybrczyn na tęczęwce oka królika (test Draize'a) [56]. Liczba testów jakie można wykonać na hodowlach w warunkach *in vitro* jednak ciągle rośnie i przybywa też informacji dotyczących zaleceń ich stosowania (np. wytyczne OECD), wiarygodności uzyskiwanych wyników i możliwości wykorzystania do badań nowych leków czy ich modyfikowanych postaci.

Cytotoksyczność – rodzaje śmierci komórek

Cytotoksyczność wiąże się z określonym szlakiem śmierci komórki. Rozróżnianie rodzaju śmierci komórkowej jest istotną informacją dotyczącą działania leków.

Apoptoza komórek rozpoznawana jest z zastosowaniem testów na aktywność kaspaz, zmian błonowych, fragmentacji DNA i zmian mitochondrialnych. Aktywność kaspaz w komórce podczas apoptozy prowadzi do rozszczepienia określonych substratów, które później można łatwo wykryć jako markery aktywacji kaspaz. Najczęściej stosowane są tu metody immunoblotu, immunofluorescencji i cytometrii przepływowej. Wśród cech wczesnej apoptozy identyfikuje się lokalizację fosfatydoseryny (ang. *phosphatidylserine*, PS) w obrębie błony komórkowej. Rozróżnienie komórek apoptotycznych od nieapoptotycznych jest możliwe z zastosowaniem aneksyny-V i nieprzepuszczalnego dla komórek barwnika jodku propidyny – komórki wczesnoapoptotyczne i apoptotyczne są wybarwiane aneksyną-V, a komórki nekrotyczne z naruszoną ciągłością błony – jodkiem propidyny (**rycina 1**).

Fragmentacja DNA podczas apoptozy prowadzi do specyficznych pęknięć DNA z wytworzeniem

fragmentów wielokrotności 180 par zasad. Do identyfikacji fragmentów DNA stosowana jest elektroforeza żelowa – komórki apoptotyczne wykazują charakterystyczną drabinę DNA, podczas gdy komórki martwicze wykazują rozmasz losowo zdegradowanego DNA [52]. Z kolei test kometowy (ang. *comet assay*), w którym przeprowadza się elektroforezę jądrowego DNA pojedynczych komórek unieruchomionych w żelu agarozowym, pozwala wykryć pęknięcia pojedynczych nici DNA oraz podwójne pęknięcia łańcuchów DNA. Komórki poddawane są lizie alkalicznej, z jądra komórkowego uwalniane jest DNA, a następnie przeprowadzana jest elektroforeza. Po rozdziale, DNA wybarwia się barwnikami fluorescencyjnymi lub solami srebra (DAPI – 4',6-Diamidino-2-fenylindol, bromek etydyny i SYBR Green). Wędrowka fragmentów DNA jest zależna od stopnia fragmentacji materiału genetycznego, co w obrazie mikroskopowym przypomina wyglądem kometę („głowa” odpowiada miejscu, w którym unieruchomiono komórkę przed lizą, a „ogon” stanowią fragmenty uszkodzonego DNA) [58].

Inną metodą szeroko stosowaną do badania i pomiaru fragmentacji DNA jest technika znakowania końca dUTP oparta na tworzeniu pęknięć DNA generowanych przez endonukleazę. Fragmentacja DNA jest oceniana ilościowo za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej lub cytometrii przepływowej [52].

Nekroza identyfikowana jest przede wszystkim w obrazie mikroskopowym komórek – pęcznienie organelli i całych komórek prowadzące do ich rozpadu. Opisywane są również biomarkery komórek martwiczych, takie jak: izomeraza peptydyloprolilowa A (cyklofilina A, CYPA),

Tabela 2. Metody wykorzystywane w ocenie toksyczności *in vitro*.

Table 2. Methods used to assess *in vitro* toxicity.

Ocena toksyczności <i>in vitro</i>	Przykłady testów <i>in vitro</i>
Testy cytotoksyczności podstawowej	
Żywotność komórek – na podstawie aktywności wybranych enzymów	- barwienie estrem kalceiny.
Żywotność, proliferacja komórek, cytotoksyczność badanej substancji/leku – na podstawie aktywności metabolicznej komórek	- test MTT; - test XTT; - test WST.
Żywotność komórek, cytotoksyczność badanej substancji/leku – na podstawie stanu integralności błony komórkowej	- barwienie błękitem trypanu; - barwienie jodkiem propidyn; - barwienie bromkiem etydyn; - test LDH.
Oceniany parametr Żywotność komórek, cytotoksyczność badanej substancji/leku – na podstawie wiązania z DNA	- barwienie oranżem akrydyny; - barwienie DAPI; - barwienie bromkiem etydyn; - barwienie jodkiem propidyny.
Uszkodzenie DNA	- elektroforeza żelowa; - technika znakowania końca dUTP; - test kometowy.
Apoptoza komórek	- oznaczenie lokalizacji fosfatydyloseryny w błonie komórkowej (np. barwienie aneksyną V); - barwienie DAPI.
Nekroza komórek	- oznaczanie biomarkerów komórek martwiczych CYPA i HMGB1.
Fototoksyczność	- test 3T3NRU.
Pirogenność	- pomiar IL-1b, IL-6 w hodowlach monocytów/limfocytów.
Genotoksyczność	- test mutacji genu kinazy tymidynowej; - test mikrojąder.
Toksyczność skórna	- testy z wykorzystaniem substytutów naskórka i skóry.

zewnątrzkomórkowe uwalnianie grupy o wysokiej mobilności box 1 (HMGB1) – białka wiążącego chromatynę niehistonową regulujące transkrypcję.

W przypadku ferroptozy komórek widoczne są mniejsze mitochondria o zwiększonej gęstości, które można łatwo zidentyfikować [52].

Metody pomiaru autofagii obejmują mikroskopię elektronową do ilościowego oznaczania autofagosomów, immunoblotting do wykrywania lipidacji łańcucha lekkiego 1 białka 3 związanego z mikrotubulami (znanego również jako LC3) lub mikroskopię immunofluorescencyjną do monitorowania redystrybucji LC3. Ostatnio opracowane testy umożliwiają określenie statusu fosforylacji substratów z krytycznych kinaz regulatorowych autofagii, takich jak kinaza mTORC1 i UNC51-podobna 1 [52].

W tabeli 2 przedstawiono podsumowanie najczęściej wykonywanych testów pozwalających oceniać działanie toksyczne substancji będących potencjalnymi lekami w badaniach *in vitro*.

Podsumowanie

Tradycyjne metody przeprowadzania testów potencjalnych leków i substancji aktywnych na

zwierzętach z jednej strony budzą coraz więcej wątpliwości natury etycznej, a z drugiej często nie są w stanie przewidzieć skuteczności u ludzi. Nieustanny rozwój oraz postęp technologiczny dotyczący hodowli tkankowych i komórkowych pozwalają na przeprowadzanie wielu badań, które są niezbędne do wprowadzenia nowych leków na rynek, w warunkach *in vitro*. Nowe technologie pomagają w rozwijaniu technik i metod badawczych lepiej odwzorowujących procesy zachodzące w organizmach. Hodowle narządowe na chipie można wykorzystać do oceny działania i wpływu leków na różne organy i określenia ich właściwości farmakokinetycznych na wyższym poziomie funkcjonalności niż dawniej. Zdolność do integracji funkcjonalnych mimetyków narządów takich jak wątroba, jelita, płuca i skóra na chipach, może znacząco przyczynić się do opracowania nowych postaci leków i lepszych dróg ich dostarczenia. Jednak pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w badaniach *in vitro*, wciąż w większości przypadków stanowią one jednak wstęp i punkt wyjścia do niezbędnych badań przedklinicznych prowadzonych na zwierzętach i prób klinicznych. Etap badań *in vitro* jest niezwykle istotny, ponieważ pozwala ograniczyć liczbę zwierząt laboratoryjnych wykorzystywanych podczas

opracowywania nowych leków, ale ze względu na liczne ograniczenia – niejednokrotnie podczas badań *in vitro* trudno jest odzwierciedlić złożone procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie – nie jest więc możliwe i być może nigdy nie będzie całkowite zastąpienie badań na zwierzętach badaniami *in vitro*.

Piśmiennictwo

1. ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures. Dostępne w internecie: <https://culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>. Dostęp 17.12.2023.
2. DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Dostępne w internecie: <https://www.dsmz.de>. Dostęp 17.12.2023.
3. ATCC – American Type Culture Collection. Dostępne w internecie: <https://www.atcc.org>. Dostęp 17.12.2023.
4. Chavda HV, Patel CN, Anand IS. Biopharmaceutics classification system. *Sys Rev Pharm*. 2010; 1(1): 62–69. doi: 10.4103/0975-8453.59514.
5. Sznitowska M, Bączek T. Biofarmacja. Wrocław: Edra Urban & Partner; 2023.
6. Gao W, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-hydrogel: a hybrid biomaterial system for localized drug delivery. *Ann Biomed Eng*. 2016; 44(6): 2049–2061. doi: 10.1007/s10439-016-1583-9.
7. Deng J, Zhu X, Chen Z, et al. A Review of food–drug interactions on oral drug absorption. *Drugs* 2017; 77(17): 1833–1855. doi: 10.1007/s40265-017-0832-z.
8. Żurawska-Kliś M. Podstawy farmakokinetyki klinicznej. Dostępny w internecie: URL: <http://diabfarmklin.umed.lodz.pl/data/accounts/735890cd-e5eb-4B87-A110-dedf65053e67/Prelekcja%20-%20Farmakokinetyka%20i%20działania%20niepożądane.pdf>. Dostęp 28.09.2023.
9. Gilani B, Cassagnol M. Biochemistry, cytochrome P450. Treasure Island: StatPearls; 2023.
10. Albassam AA, Ahad A, Alsultan A, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by thymoquinone in human liver microsomes. *Saudi Pharm J*. 2018; 26(5): 673–677. doi: 10.1016/j.jsps.2018.02.024.
11. Zhou J, Qian X, Zhou Y, et al. Human liver microsomes study on the inhibitory effect of plantainoside D on the activity of cytochrome P450 activity. *BMC Complement Med Ther*. 2022; 22: 197. doi: 10.1186/s12906-022-03671-5.
12. Underhill GH, Khetani SR. Advances in engineered human liver platforms for drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*. 2018; 46(11): 1626–1637. doi: 10.1124/dmd.118.083295.
13. Tiphara P, Kobylinski KC, Godejohann M, et al. Identification of the metabolites of ivermectin in humans. *Pharmacol Res Perspect*. 2021; 9(1): e00712. doi: 10.1002/prp2.712.
14. Kong R, Ma J, Hwang S, et al. In vitro metabolism, reaction phenotyping, enzyme kinetics, CYP inhibition and induction potential of ataluren. *Pharmacol Res Perspect*. 2020; 8(2): e00576. doi: 10.1002/prp2.576.
15. Sun W, Luo Z, Lee J, et al. Organ-on-a-chip for cancer and immune organs modeling. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(4): e1801363. doi: 10.1002/adhm.201801363.
16. Ahmed T. Organ-on-a-chip microengineering for bio-mimicking disease models and revolutionizing drug discovery. *Biosens Bioelectron X* 2022; 11: 100194. doi: 10.1016/j.biosx.2022.100194.
17. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog*. 2004; 20(3): 750–755. doi: 10.1021/bp0300568.
18. Bosquillon C, Madiova M, Patel N, et al. A comparison of drug transport in pulmonary absorption models: isolated perfused rat lungs, respiratory epithelial cell lines and primary cell culture. *Pharm Res*. 2017; 34(12): 2532–2540. doi: 10.1007/s11095-017-2251-y.
19. Sun W, Luo Z, Lee J, et al. Organ-on-a-chip for cancer and immune organs modeling. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(4): e1801363. doi: 10.1002/adhm.201801363.
20. Costamagna G, Comi GP, Corti S. Advancing drug discovery for neurological disorders using iPSC-derived neural organoids. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5): 2659. doi: 10.3390/ijms22052659.
21. Baran SZW, Brown PC, Baudy AR, et al. Perspectives on the evaluation and adoption of complex in vitro models in drug development: Workshop with the FDA and the pharmaceutical industry (IQ MPS Affiliate). *ALTEX*. 2022; 39(2): 297–314. doi: 10.14573/altex.2112203.
22. De Planque M. Lipid bilayer platforms for parallel ion channel recordings. *Japanese Journal of Applied Physics* 2022; 61(SC):SC0804. doi:10.35848/1347-4065/ac4f7a.
23. Montnach J, Lorenzini M, Lesage A, et al. Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 3282. doi: 10.1038/s41598-021-82077-8.
24. Jarc T, Novak M, Hevir N, et al. Demonstrating suitability of the Caco-2 cell model for BCS-based biowaiver according to the recent FDA and ICH harmonized guidelines. *J Pharm Pharmacol*. 2019; 71(8): 1231–1242. doi: 10.1111/jphp.13111.
25. Zeiringer S, Wiltschko L, Glader Ch, et al. Development and characterization of an in vitro intestinal model including extracellular matrix and macrovascular endothelium. *Mol Pharm*. 2023; 20(10): 5173–5184. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00532.
26. Zhou Y, Hu W, Zhang X, et al. Cellular uptake and transport characteristics of FL118 derivatives in Caco-2 cell monolayers. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2021; 69(11): 1054–1060. doi: 10.1248/cpb.c21-00467.
27. Xiu-Wen W, Ru-Feng W, Ming Y, et al. Dulbecco's modified eagle's medium and minimum essential medium – which one is more preferred for establishment of Caco-2 cell monolayer model used in evaluation of drug absorption? *Pharmazie* 2013; 68: 805–810. doi: 10.1691/ph.2013.2225.
28. Grajek W, Olejnik A, Staniaszek K. Kultury komórkowe nabłonka jelitowego jako model do badania transportu transblonkowego. *Biotechnologia* 2006; 2(73): 148–165.
29. O'Farrell C, Stamatopoulos K, Simmons M, Batchelor H. In vitro models to evaluate ingestible devices: Present status and current trends. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021; 178: 113924. doi: 10.1016/j.addr.2021.113924.
30. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005; 60(2): 167–178. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.03.004.
31. SkinThtic™ RHE / Reconstructed human epidermis. Dostępny w internecie: URL: <https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE>. Dostęp 27.09.2023.
32. OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for an update of test guideline 431. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RhE) test method. Dostępny w internecie: URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50305099.pdf>. Dostęp 27.09.2023.
33. Artzy-Schnirman A, Arber Raviv S, Doppelt Flikshstein O, et al. Advanced human-relevant in vitro pulmonary platforms for respiratory therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021; 176: 113901. doi: 10.1016/j.addr.2021.113901.
34. Chen J, Ahmed MU, Zhu CH, et al. In vitro evaluation of drug delivery behavior for inhalable amorphous nanoparticle formulations in a human lung epithelial cell model. *Int J Pharm*. 2021; 1: 596: 120211. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120211.
35. Kaluzhny Y, Kinuthia MW, Truong T, et al. New human organotypic corneal tissue model for ophthalmic drug delivery studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018; 59(7): 2880–2898. doi: 10.1167/iovs.18-23944.
36. Mantecón-Oria M, Rivero MJ, Diban N, Urriaga A. On the quest of reliable 3D dynamic in vitro blood–brain barrier models using polymer hollow fiber membranes: Pitfalls, progress, and future perspectives. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022; 22: 10-1056162. doi: 10.3389/fbioe.2022.1056162.
37. Märmöl I, Abizanda-Campo S, Ayuso JM, et al. Towards novel bio-mimetic in vitro models of the blood–brain barrier for drug permeability evaluation. *Bioengineering (Basel)*. 2023; 10(5): 572. doi: 10.3390/bioengineering10050572.
38. Jagtiani E, Yeolekar M, Naik S, Patravale V. In vitro blood brain barrier models: An overview. *J Control Release*. 2022; 343: 13–30. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.011.
39. Cai P, Zheng Y, Sun Y, et al. New blood–brain barrier models using primary Parkinson's disease rat brain endothelial cells and astrocytes for the development of central nervous system drug delivery systems. *ACS Chem Neurosci*. 2021; 12(20): 3829–3837. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00118.
40. Bajaj P, Chung G, Pye K, et al. Freshly isolated primary human proximal tubule cells as an in vitro model for the detection of renal tubular toxicity. *Toxicology* 2020; 442: 152535. doi: 10.1016/j.tox.2020.152535.

41. Mossoba ME, Sprando RL. *In vitro* to *in vivo* concordance of toxicity using the human proximal tubule cell line HK-2. *Int J Toxicol*. 2020; 39(5): 452–464. doi: 10.1177/1091581820942534.
42. Zhu Y, Meng Q, Wang Ch, et al. Organic anion transporters involved in the excretion of bestatin in the kidney. *Peptides* 2012; 33(2): 265–271. doi: 10.1016/j.peptides.2012.01.007.
43. Zhang A, Yang F, Yuan Y, et al. OAT3 participates in drug-drug interaction between bentysrepinine and entecavir through interactions with M8 – a metabolite of bentysrepinine – in rats and humans *in vitro*. *Molecules* 2023; 28(4): 1995. doi: 10.3390/molecules28041995.
44. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb)*. 2013; 5(9): 1119–1129. doi: 10.1039/c3ib40049b.
45. Courtois S, Duran RV, Giraud J, et al. Metformin targets gastric cancer stem cells. *Eur J Cancer*. 2017; 84: 193–201. doi:10.1016/j.ejca.2017.07.020.
46. Lee KK, McCauley HA, Broda TR, et al. Human stomach-on-a-chip with luminal flow and peristaltic-like motility. *Lab Chip*. 2018; 18(20): 3079–3085.
47. HepaRG™ Cells, Certificates of analysis. Dostępny w internecie: URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2Fcertificate%2FFRK%2FCOA%2FCOA_HPRGC10_HPR116347-TA10.pdf. Dostęp 3.10.2023.
48. Zeilinger K, Freyer N, Damm G, et al. Cell sources for *in vitro* human liver cell culture models. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016; 241(15): 1684–1698. doi: 10.1177/1535370216657448.
49. Huang D, Gibeley SB, Xu C, et al. Engineering liver microtissues for disease modeling and regenerative medicine. *Adv Funct Mater*. 2020; 30(44): 1909553. doi: 10.1002/adfm.201909553.
50. Trask Jr OJ, Moore A, LeCluyse EL. A micropatterned hepatocyte coculture model for assessment of liver toxicity using high-content imaging analysis. *Assay Drug Dev Technol*. 2014; 12(1): 16–27. doi: 10.1089/adt.2013.525.
51. Wang H, Brown PC, Chow EY, et al. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clin Transl Sci*. 2021; 14(5): 1659–1680. doi: 10.1111/cts.13066.
52. Méry B, Guy JB, Vallard A, et al. *In vitro* cell death determination for drug discovery: A landscape review of real issues. *J Cell Death*. 2017. doi:10.1177/1179670717691251.
53. Xie L, Dai Z, Pang CH, et al. Cellular glucose metabolism is essential for the reduction of cell-impermeable water-soluble tetrazolium (WST) dyes. *Int J Biol Sci*. 2018; 14: 1535–1544. doi: 10.7150/ijbs.25629.
54. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD); 2023. Dostępny w internecie: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf. Dostęp 3.10.2023.
55. OECD guideline for testing of chemicals. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Dostępny w internecie: URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071162-en.pdf?expires=1695886804&id=id&accname=guest&checksum=38E89CF05F69E01A6A802332DB75B27D>. Dostęp 28.09.2023.
56. Stokłosowa S. *Hodowla komórek i tkanek*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2020.
57. Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines. Dostępny w internecie: URL: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Guidance%20Document%20on%20OECD%20Genetic%20Toxicology%20Test%20Guidelines.pdf>. Dostęp 2.10.2023.
58. OECD guideline for testing of chemicals. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. Dostępny w internecie: URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264885-en.pdf?expires=1702736228&id=id&accname=guest&checksum=153747C5729CD1C00D2E-28BEA184CAE7>. Dostęp 17.12.2023.