



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Žarnyno *in vitro* modelio kūrimas ir pritaikymas elektrolitų rezorbcijos tyrimams

Baigiamasis magistro projektas

Karina Jelkinaitė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Baigiamojo projekto pavadinimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Karina Jelkinaitė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

m. d. dr. Rasa Bernotienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Karina Jelkinaitė

Žarnyno *in vitro* modelio kūrimas ir pritaikymas elektrolitų rezorbcijos tyrimams

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto teisės aktų, reglamentuojančių akademinę etiką, intelektinės nuosavybės teises, jų valdymą ir perdavimą;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Kauno technologijos universitete ir(ar) Lietuvos sveikatos mokslų universitete galiojančią tvarką ir mano studijų sutartis bus nutraukta, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai dėl galimo akademinės etikos pažeidimo.

Karina Jelkinaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Jelkinaitė Karina. Žarnyno *in vitro* modelio kūrimas ir pritaikymas elektrolitų rezorbcijos tyrimams. Baigiamasis magistro projektas / vadovė Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: žarnyno modelis *in vitro*, epitelio barjeras, elektrolitai.

Kaunas, 2021. 60 p.

Santrauka

Žmogaus žarnynas yra dinaminis barjeras, turintis svarbų vaidmenį įsisavinant pagrindines maistines medžiagas, vandenį, elektrolitus ir vitaminus. Padidėjęs žarnyno barjero pralaidumas, funkcijų sutrikimas yra susijęs su įvairiomis autoimuninėmis, uždegiminėmis ir atopinėmis ligomis. Elektrolitų absorbcijos sutrikimai gali būti svarbių ligų pagrindas, o *in vitro* modeliai, pagaminti iš žmogaus žarnyno ląstelių, gali padėti geriau suprasti mechanizmus, susijusius su elektrolitų absorbcijos procesais.

Šio darbo tikslas – panaudojant žmogaus žarnyno epitelio ląstelių liniją, sukurti žarnyno barjerinę funkciją atkartojantį *in vitro* modelį ir pritaikyti jį elektrolitų rezorbcijos tyrimams. Šiam tikslui pasiekti išsikelti uždaviniai: 1) parinkti tinkamas sąlygas *in vitro* barjero formavimui iš žarnų epitelio ląstelių ant membraninių ląstelių kultūrų įdėklų; 2) įvertinti parinktomis sąlygomis formuojamo barjero savybes pagal plyšinių jungčių skaičių atspindintį transepitelinės varžos dydį; 3) iširti elektrolitų įtaką HCEC-1CT metaboliniam aktyvumui; 4) nustatyti ląstelių sąlygojamus elektrolitų tirpalų koncentracijos kitimus laiko bėgyje; 5) įvertinti elektrolitų rezorbciją per žarnų epitelį išmatuojant įvedamą ir per barjerą perėjusių elektrolitų koncentracijas.

Pirmiausia, tyrimo metu, buvo nustatytos elektrolitų koncentracijos tirpaluose ir įvertinta elektrolitų įtaka HCEC-1CT ląstelių metaboliniam aktyvumui. Sukurtas naujas žmogaus žarnyno barjero modelis *in vitro* pritaikytas tiriant elektrolitų reazorbciją per žarnyno epitelį. Žmogaus storjo žarnyno epitelio ląstelės (HCEC-1CT) buvo auginamos ant pralaidžių membraninių kultūrinių įdėklų, kurie padėjo sukurti žarnyno barjero sistemą susidarančią iš dviejų skyrių – viršutinio ir apatinio, taip imituojant žarnyno spindį ir kraujotakos sistemą. Suformavus žarnyno modelį, buvo vertinama transepitelinė elektrinė varža, kuri parodo suformavusias glaudžiausias ir plyšines jungtis, kurios užtikrina barjero vientisumą.

Pritaikius sukurtą žarnyno modelį *in vitro* elektrolitų reazorbcijos tyrimams nustatyta, kad tirpaluose esantys K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ jonai yra transportuojami iš žarnyno spindžio į kraujotaką pagal koncentracijos gradientą, tačiau esant didesnėms elektrolitų koncentracijoms susidarius elektrocheminiui potencialui įvyksta jonų reazorbcija prieš koncentracijos gradientą.

Jelkinaitė Karina. *In Vitro* Intestinal Model Development and Application for Electrolyte Resorption Studies. Master's Final Degree Project / supervisor Senior Researcher Dr. Aistė Jekabsone; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: intestinal model *in vitro*, epithelial barrier, electrolytes.

Kaunas, 2021. 60 pages.

Summary

The human gut is a dynamic barrier that plays an important role in the absorption of essential nutrients, water, electrolytes and vitamins. Increased intestinal barrier permeability dysfunction is associated with various autoimmune, inflammatory and atopic diseases. Disorders of electrolyte absorption may be at the root of important diseases, and *in vitro* models made from human intestinal cells may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in electrolyte absorption processes.

The aim of this work was to develop an *in vitro* model that replicates the intestinal barrier function using a human intestinal epithelial cell line and to apply it to electrolyte absorption studies. To achieve this goal, the following tasks were set: 1) to select suitable conditions for *in vitro* barrier formation from intestinal epithelial cells on membrane culture inserts; 2) to evaluate the properties of the barrier formed under the selected conditions according to the number of gap junctions and the size of the transepithelial resistance; 3) to investigate the influence of electrolytes on the metabolic activity of HCEC-1CT cells; 4) to determine the concentration of electrolyte solutions induced by cells over time; 5) to evaluate the absorption of electrolytes through the intestinal epithelium by measuring the concentrations of electrolytes entering and crossing the barrier.

First, the electrolyte concentrations in the solutions were determined during the study and the influence of electrolytes on the metabolic activity of HCEC-1CT cells was evaluated. A new model of the human intestinal barrier has been developed *in vitro* to study the reabsorption of electrolytes through the intestinal epithelium. Human colon epithelial cells (HCEC-1CT) were grown on permeable membrane culture inserts, which helped create a gut barrier system consisting of two compartments, the inner and outer, thus mimicking the intestinal lumen and circulatory system. After the formation of the intestinal model, the transepithelial electrical resistance was evaluated, which shows the formed tight and fractured connections that ensure the integrity of the barrier.

Applying the developed intestinal model to *in vitro* electrolyte reabsorption studies, it was found that the K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ions in the solutions are transported from the intestinal lumen into the bloodstream according to the concentration gradient, but at higher electrolytes concentrations, ion reabsorption against the concentration gradient occurred when the electrochemical potential was formed.

Turinys

Lentelių sąrašas.....	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų sąrašas	10
Įvadas	11
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Žmogaus žarnyno funkcija, fiziologija ir anatomija	12
1.1.1. Mikrobiotos svarba.....	13
1.1.2. Žarnyno epitelis.....	13
1.2. Žarnyno epitelio barjeras.....	14
1.3. Medžiagų pernašos per barjero epitelį keliai	16
1.3.1. Apiląstelinis pernašos kelias	17
1.3.2. Perląstelinis pernašos kelias	17
1.3.3. Endocitozė	18
1.4. Elektrolitų transportavimo mechanizmai	18
1.4.1. Absorbicija.....	18
1.4.2. Sekreticija	19
1.5. Makroelementai	19
1.5.1. Kalcis.....	19
1.5.2. Kalis	20
1.5.3. Magnis	20
1.5.4. Natris	21
1.6. Žarnyno modeliai <i>in vitro</i>	21
1.6.1. Ląstelių kultūros.....	22
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	22
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	24
2.1. Įranga, reagentai ir priemonės	24
2.2. Imortalizuotos žmogaus storosios žarnos epitelio ląstelės	24
2.2.1. HCEC ląstelių kultivavimas	25
2.2.2. Ląstelių skaičiavimo procedūra	27
2.3. Žarnyno barjero modelio kūrimas <i>in vitro</i>	27
2.3.1. Optimalių sąlygų nustatymas barjero formavime	28
2.3.2. Modelio formavimas	29
2.4. Transepitelinės elektrinės varžos matavimas.....	30
2.4.1. Pasiruošimas TEER matavimams	30
2.4.2. TEER matavimo protokolas	30
2.5. Elektrolitų tirpalų paruošimas.....	31
2.6. HCEC-1CT ląstelių, paveiktų elektrolitų tirpalais, gyvybingumo vertinimas	31
2.6.1. Ląstelių metabolinio aktyvumo nustatymas ir vertinimas.....	31
2.7. Elektrolitų pernašos per barjerą tyrimai <i>in vitro</i>	32
2.7.1. Elektrolitų rezorbcijos tyrimai su induktyviai susietos plazmos masių spektrometrijos	33
2.8. Statistinė analizė	33
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1. Žarnyno barjero modelio formavimas <i>in vitro</i>	34
3.1.1. Transepitelinės varžos vertinimas.....	34

3.2. Elektrolitų tirpalų koncentracijų nustatymas.....	36
3.3. Elektrolitų tirpalų tiesioginis poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui.....	37
3.3.1. Elektrolitų tirpalų koncentracijų pokytis paveikus HCEC-1CT ląsteles.....	38
3.4. Žarnyno modelio <i>in vitro</i> pritaikymas elektrolitų tyrimams	41
3.4.1. Transepitelinės elektrinės varžos vertinimas modelį paveikus elektrolitų tirpalais.....	41
3.4.2. Elektrolitų pernaša per barjerą.....	43
Išvados	50
Literatūros sąrašas	52
Publikacijų sąrašas	60

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Tyrimo metu naudotų reagentų sąrašas	24
2 lentelė. Elektrolitų tirpalų sąrašas	31
3 lentelė. Daugiafunkcinio plokštelių skaitytuvo nustatymai	32
4 lentelė. ICP-MS veikimo sąlygos ir matavimo parametrai.....	33
5 lentelė. Makroelementų koncentracijos grynuose elektrolitų tirpaluose g / l.....	36
6 lentelė. Makroelementų koncentracijos ląstelių mitybinėje terpėje g / l.....	36
7 lentelė. Makroelementų koncentracijos elektrolitų ir terpės 1:4 tirpaluose g / l.....	36
8 lentelė. Kalio jonų koreliacijos duomenys.....	49
9 lentelė. Kalcio jonų koreliacijos duomenys	49
10 lentelė. Magnio jonų koreliacijos duomenys	49
11 lentelė. Natrio jonų koreliacijos duomenys.....	49

Paveikslų sąrašas

1 pav. Žmogaus virškinimo sistema. Pritaikyta pagal [13]	12
2 pav. Žarnyno epitelio morfologija. Pritaikyta pagal [32]	14
3 pav. Tarpląstelių jungčių tipai. Pritaikyta pagal [13]	15
4 pav. Medžiagų pernašos per žarnyno epitelį keliai. Pritaikyta pagal [51].....	16
5 pav. Statinis žarnyno barjero modelio <i>in vitro</i> vaizdavimas. Pritaikyta pagal [85]	22
6 pav. Žarnyno epitelio HCEC-1CT ląstelių morfologija	25
7 pav. Ląstelių persėjimo schema. Pavaizduota naudojantis programine įranga <i>Biorender.com</i>	26
8 pav. Ląstelių skaičiavimo schema. Pavaizduota naudojantis programine įranga <i>Biorender.com</i> .	27
9 pav. 6 šulinėlių lėkštelė kartu su kultūriniais ląstelių auginimo įdėklais. Pavaizduota naudojantis programine įranga <i>Biorender.com</i>	28
10 pav. Žarnyno modelio formavimas ant kultūrinių įdėklų <i>in vitro</i> . Pavaizduota naudojantis programine įranga <i>Biorender.com</i>	29
11 pav. Transepitelinės elektrinės varžos matavimai <i>in vitro</i> modelyje	30
12 pav. Elektrolitų tyrimų sąlygų schema. Pavaizduota naudojantis programine įranga <i>Biorender.com</i>	32
13 pav. Žarnyno epitelio barjeras <i>in vitro</i>	34
14 pav. Žarnyno modelio <i>in vitro</i> transepitelinės elektrinės varžos matavimai	35
15 pav. Elektrolitų tirpalų poveikis HCEC-1CT ląstelių metaboliniam aktyvumui	37
16 pav. Kalio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais.....	38
17 pav. Kalcio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais.....	39
18 pav. Magnio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais.....	40
19 pav. Natrio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais.....	41
20 pav. Elektrolitų tirpalų poveikis žarnyno barjero transepitelinės elektrinės varžos pokyčiams, po 4, 24 ir 48 valandų	42
21 pav. Kalio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 val.....	43
22 pav. Kalcio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 val	45
23 pav. Magnio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 val	46
24 pav. Magnio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 val	47

Santrumpų sąrašas

ADP – adenozindifosfatas;

AMP – adenozinmonofosfatas;

AT – aktyvus transportas;

ATP – adenozintrifosfatas (angl. *adenosine triphosphate*);

ATPazė – adenozintrifosfaatazė;

cAMP – ciklinis adenozino monofosfatas;

cGMP – ciklinis guanozino monofosfatas;

DMEM – *Dulbecco* modifikuota ląstelių auginimo terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*);

DMSO – dimetilsulfoksidas (angl. *Dimethyl Sulfoxide*);

ENaC – epitelinis natrio kanalas;

FBS – fetalinis veršelio serumas (angl. *Fetal Bovine Serum*);

GLUT – gliukozės nešiotojas;

HCEC – imortalizuotos žmogaus storos žarnos ląstelės;

ICP–MS – induktyviai susietos plazmos masių spektrometrija;

MA – metabolinis aktyvumas;

MLCK – miozino lengvosios grandinės kinazė;

PBS – fosfatinis druskos buferis (angl. *Phosphate Buffered Saline*);

PET – polietileno tereftalatas;

PTFE – politetrafluoretilenas;

SGLT – nuo natrio priklausomi gliukozės kotransporteriai;

TEER – transepitelinė elektrinė varža (angl. *Transepithelial Electrical Resistance*);

ZO – *Zonula occludens* baltymas.

Įvadas

Kasdien pro žarnyno spindį praeina apie 8–10 l skysčio, kuriame galima nustatyti nuo 100 iki 800 mmol natrio (Na^+), chlorido (Cl^-) ir kalio (K^+) jonų [1]. Žmogaus žarnynas yra unikalus dinaminis barjeras, atliekantis įvairias homeostatines funkcijas, įskaitant barjero susidarymą ir palaikymą, maistinių medžiagų virškinimą ir absorbciją, apsaugą nuo nepageidaujamų patogenų ir toksinų, mikrobiotos moduliavimą ir dalyvavimą imuniniame procese [2–4].

Padidėjęs žarnyno barjero pralaidumas, funkcijų sutrikimas yra susijęs su autoimuninėmis, uždegiminėmis ir atopinėmis ligomis, kurios gali pasireikšti tiek lokaliai (žarnyno gleivinėje), tiek sistemškai [5]. Elektrolitų absorbcijos sutrikimai gali būti svarbių ligų pagrindas. Nepavykus efektyviai absorbuoti vandens ir elektrolitų, tai sukelia dehidratacijos ir elektrolitų pusiausvyros sutrikimus. Daugelis virškinamojo trakto ligų, pavyzdžiui, uždegiminės žarnyno ligos, įskaitant Krono ligą, opinį kolitą, celiakiją, atsiranda dėl žarnyno imuninės homeostazės sutrikimo. Lėtinis žarnyno uždegimas veikia normalią skysčių ir elektrolitų absorbciją, kuri sukelia viduriavimą [6].

Nuo 1990 m. iki 2017 m. visame pasaulyje uždegimine žarnyno liga sergančių asmenų skaičius padidėjo nuo 3,7 mln. iki daugiau kaip 6,8 mln. (85 proc.) [7]. Tiksliai šių ligų patologinė fiziologija nėra iki galo suprantama ir trūksta mokslinių tyrimų. Vaistų paieškos sistema remiasi gyvūnų ir ląstelių kultūrų ikiklinikiniais modeliais, tačiau šie modeliai neatspindi realios žmogaus audinių fiziologijos, todėl juose gauti rezultatai dažnai klinikiniuose tyrimuose nepasiteisina. Todėl pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas realistiškesnių, audinių fiziologiją atspindinčių *in vitro* modelių kūrimui [8].

Žarnyno absorbcijos mechanizmo sutrikimai yra vienas iš svarbiausių žarnyno patologijas sukeliančių veiksnių, o terapinių priemonių paiešką riboja tinkamų žmogaus žarnyno modelių trūkumas. Žarnyno modeliuose *in vivo*, naudojami organų audiniai, kurie nėra optimalūs tokiems tyrimams. Realistiniai *in vitro* modeliai, pagaminti iš žmogaus žarnyno ląstelių, gali padėti geriau suprasti įvairius mechanizmus, susijusius su elektrolitų absorbcijos procesais, išvengiant etinių problemų, susijusių su gyvūnų naudojimu eksperimentuose, ir sumažinant bandymų išlaidas [9].

Darbo tikslas: Panaudojant žmogaus žarnyno epitelio ląstelių liniją, sukurti žarnyno barjerinę funkciją atkartojantį *in vitro* modelį ir pritaikyti jį elektrolitų rezorbcijos tyrimams.

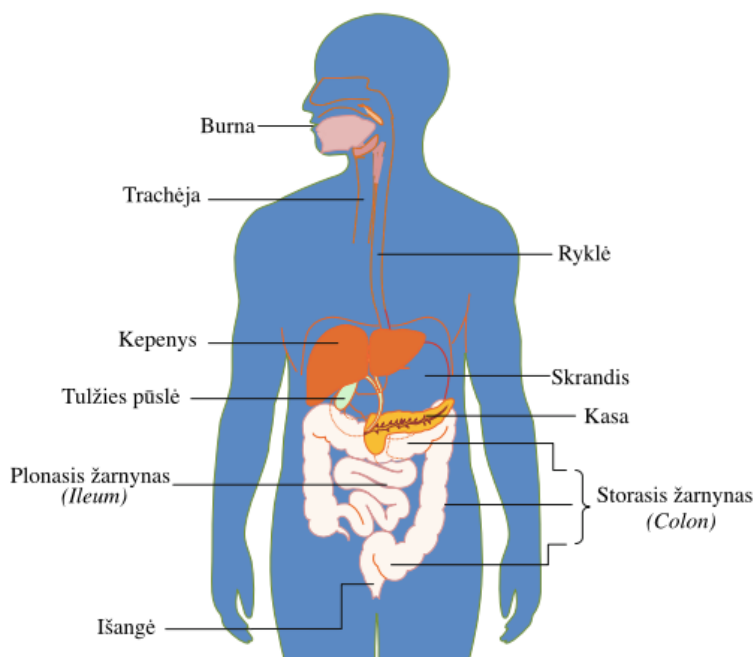
Darbo uždaviniai:

1. parinkti tinkamas sąlygas *in vitro* barjero formavimui iš žarnų epitelio ląstelių ant membraninių ląstelių kultūrų įdėklų;
2. įvertinti parinktomis sąlygomis formuojamo barjero savybes pagal plyšinių jungčių skaičių atspindintį transepitelinės varžos dydį;
3. iširti elektrolitų įtaką HCEC-1CT metaboliniam aktyvumui;
4. nustatyti ląstelių sąlygojamus elektrolitų tirpalų koncentracijos kitimus laiko bėgyje;
5. įvertinti elektrolitų rezorbciją per žarnų epitelį išmatuojant įvedamų ir per barjerą perėjusių elektrolitų koncentracijas.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Žmogaus žarnyno funkcija, fiziologija ir anatomija

Virškinimo traktas yra pagrindinė mikroorganizmų ir imuninės sistemos sąveikos vieta [10]. Žmogaus virškinimo sistema apima virškinamąjį traktą ir pagalbinius organus, susidedančius iš – burnos ertmės, ryklės, stemplės, skrandžio, plonosios ir storosios žarnos (žr. 1 pav.). Ši sistema veikia mechaniškai apdorodama, virškinant, absorbuojant maistą, išskiriant vandenį, rūgštis, fermentus, druską, taip pat šalinant atliekas [11]. Maisto judėjimas virškinimo sistema yra kruopščiai suderintas procesas, su savalaikiu atitinkamų skysčių ir fermentų tirpalų tiekimu (sekrecija), kad maiste esančios makromolekulės būtų hidrolizuojamos (virškinamos), o išsiskyrusias maistinių medžiagų molekules būtų galima transportuoti į kraujotakos sistemą (absorbcija) [12].



1 pav. Žmogaus virškinimo sistema. Pritaikyta pagal [13]

Žarnyno vykdomos funkcijos yra ne tik svarbios medžiagų pasisavinime, tačiau taip pat, tai yra veiksmingas apsaugantis barjeras nuo egzogeninių patogenų, toksinų ar kancerogeninių mikroorganizmų, esančių virškinamojo trakto spindyje [2, 14]. Žarnynas yra ilgiausias virškinamojo trakto organas, besitęsiantis nuo skrandžio iki tiesiosios žarnos [15]. Pagrindinė žarnyno funkcija yra virškinimas, iš skrandžio išsiskiriančio maisto irimas ir maistinių medžiagų, vandens įsisavinimas bei absorbcija iš žarnyno sprindžio į kraujotakos sistemą [11, 16].

Žmogaus žarnynas susideda iš dviejų dalių: plonojo ir storjo žarnyno [1]. Plonasis žarnynas yra ilgiausia virškinimo trakto atkarpa, apie 6 metrų ilgio, sudaryta iš trijų funkcinių segmentų: dvylikapirštės, tuščiosios ir klubinės žarnos [17]. Storąjį žarnyną sudaro trys dalys: akloji, gaubtinė, kuri dalijama į – kylančią, skersinę, nusileidžiančią ir riestinę bei tiesioji žarna. Storasis žarnynas sudaro penktadalį virškinamojo trakto, jis yra maždaug 1,5 metrų ilgio [12, 18]. Didžioji dalis makroelementų, vitaminų ir mineralų absorbuojama plonojoje žarnoje, nors plonasis žarnynas yra pagrindinė maistinių medžiagų ir metabolitų pasisavinimo vieta, esminė storosios žarnos funkcija yra vandens ir elektrolitų absorbcija [19].

1.1.1. Mikrobiotos svarba

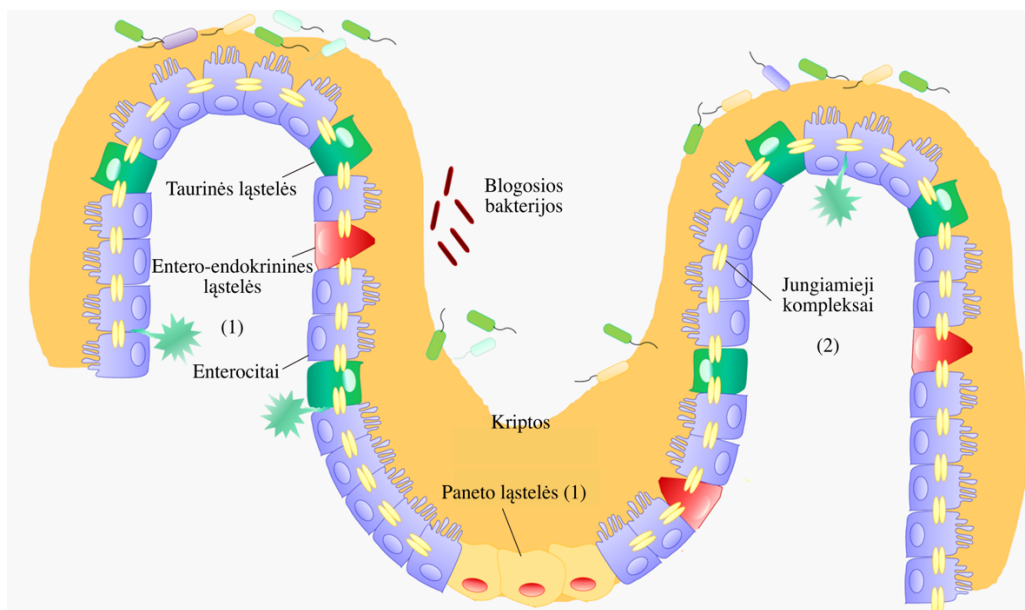
Žarnyno gleivinėje yra daug įvairių imuninių ląstelių. Žmogaus žarnynas susideda iš įvairių ir sudėtingų mikrobų bendruomenės, kuri turi įtakos žmogaus fiziologijai, metabolizmui, mitybai ir imuninei funkcijai [20]. Mikrobiota suteikia šeimininkui daugybę naudingų savybių vykdydama įvairias funkcijas, tokias kaip – žarnyno vientisumo stiprinimas ar žarnyno epitelio formavimas, energijos kaupimas, apsauga nuo patogenų ir šeimininko imuniteto reguliavimas. Tačiau, pasikeitus mikrobų sudėčiai, šie mechanizmai gali būti sutrikdyti [21]. Svarbiausios žarnyno bakterijų funkcijos apima daugelio endogeninių medžiagų, tokių kaip – bilirubinas, cholesterolis, tulžies rūgštys, steroidiniai hormonai, riebalų rūgštys, B ir K vitaminų sintezė, imuninės funkcijos ir žarnyno fermentacija, metabolizmą. Žarnyno mikroflora teikia papildomų fermentų ir reguliuoja genų, dalyvaujančių angliavandenių ir lipidų panaudojime bei vaistų biotransformacijoje, raišką [22].

Sustiprėjęs imuninis atsakas žarnyno gleivinėje pastebimas pacientams, sergantiems uždegiminėmis žarnyno ligomis, todėl, imuninis atsakas į žarnyne esančią mikrobiotą turėtų būti griežtai reguliuojamas, kad būtų išvengta žarnyno uždegimo, sukeliančio žarnyno uždegimines ligas. Žarnyno epitelio ląstelių sluoksnis veikia kaip barjeras, neleidžiantis imuninėms ląstelėms, esančioms žarnyno gleivinėje, atpažinti žarnyno spindyje esančios mikrobiotos. Taip pat, naujausi tyrimai rodo, kad metabolitai, kurie žarnyne gaminami priklausomai nuo mikrobiotos, tarpininkauja imuninės sistemos ir epitelio ląstelių aktyvacijos procese [23, 24].

1.1.2. Žarnyno epitelis

Žarnyno epitelis yra koloninių ląstelių vienasluoksnis, kuris sudaro pagrindinį barjerą, skiriančią mūsų kūną nuo išorinės aplinkos. Trilijonai komensalinių bakterijų gyvena virškinimo trakte ir turi gyvybiškai svarbų vaidmenį virškinant ir vystant imuninę sistemą, tačiau jos taip pat gali sukelti ir įvairias infekcijos rizikas [24]. Žarnyno epitelis nuolatos patiria įvairius pašalinius veiksnius, tokius kaip – pH svyravimai, mechaninė trintis, kurie gali sukelti ląstelių žūtį. Nustatyta, kad kiekvieną dieną žmogaus žarnyne prarandama apie 10^{11} epitelio ląstelių. Siekiant užtikrinti barjero vientisumą, optimalias funkcijas, epitelio ląstelės nuolatos ir greitai atsinaujina, vidutiniškai per 3–5 dienas [20, 25]. Žarnyno epitelis yra laikomas vienu iš greičiausiai regeneruojančių audinių, užtikrinančių natūralų ląstelių praradimo kompensavimą [26]. Epitelio ląsteles gamina kamieninės ląstelės, esančios kriptose žarnyno liaukų pagrinde, jos sukuria pirmtakus, kurie diferencijuojasi į brandžius epitelio ląsteles tipus, kurie migruoja aukštyn kriptos – gaurelių ašimi [27].

Žarnyno epitelio vienasluoksnis susideda iš įvairių tipų specializuotų ląstelių, tokių kaip – enterocitai, paneto, taurinės, endokrininės ląstelės (žr. 2 pav. 1) [28]. Šios ląstelės funkcionaliai sąveikaudamos tarpusavyje, užtikrina epitelio barjero vientisumą. Žarnyno epitelio ląstelės daugiausia yra absorbciniai enterocitai, kitaip vadinami koloninėmis ląstelėmis (jie sudaro daugiau kaip 80 proc. visų žarnyno epitelio ląstelių) ir atlieka svarbų vaidmenį įsisavinant maistines medžiagas (pvz., jonus, vandenį, cukrų, peptidus ir lipidus) bei išskiriant imunoglobulinius [29, 30]. Paneto ląstelės gamina ir išskiria antimikrobinius peptidus, kurie prisideda prie patogeninių bakterijų šalinimo, jos yra ilgaamžės, išsiskyrę iš kamieninių ląstelių, jos migruoja žemyn į kriptų pagrindą [31].



2 pav. Žarnyno epitelio morfologija. Pritaikyta pagal [32]

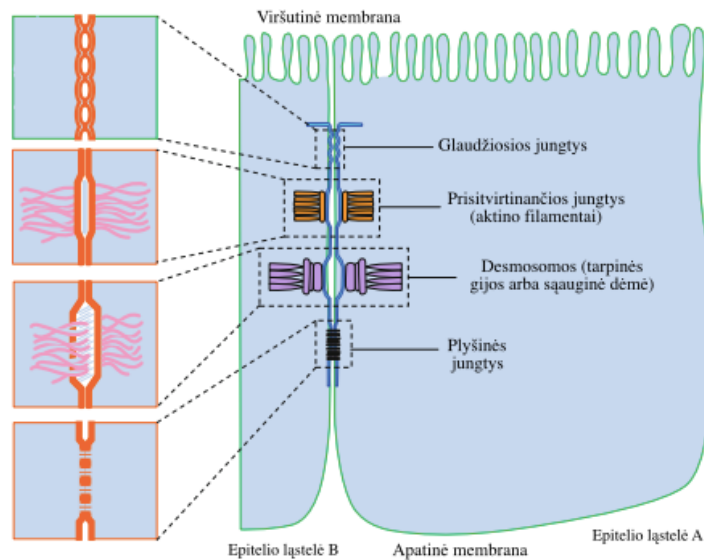
Taurinės ląstelės sudaro apie 10 proc. visų žarnyno epitelio ląstelių. Taurinės ląstelės išskiria gleives, kurios sutepa maisto pratekėjimą per žarnyną ir apsaugo žarnyno sienelės nuo virškinimo fermentų. Endokrinines ląsteles stimuliuojant gali išsiskirti žarnyno hormonai ar peptidai į kraują, kurie suaktyvina nervines reakcijas. Endokrininės ląstelės taip pat yra chemoreceptoriai, aptinkantys kenksmingas medžiagas, inicijuojantys virškinimą ir apsaugines reakcijas [30, 33].

Visas specifines epitelio ląsteles glaudžiai sujungia tarpląsteliniai jungiamieji kompleksai (žr. 2 pav. 2), kurie reguliuoja apieląstelinį pralaidumą ir yra nepaprastai svarbūs epitelio barjero vientisumui [34].

1.2. Žarnyno epitelio barjeras

Žarnyno epitelio barjerą sudaro ląstelių vienasluoksnis su tarpląstelinėmis glaudžiosiomis jungtimis, kurios yra būtinos norint išlaikyti barjero vientisumą [35, 36]. Žarnyno barjeras vienu metu, užtikrina dvi pagrindines funkcijas: pirma, apsaugo nuo kenksmingų medžiagų, toksinų ir bakterijų, patekimo per žarnyno epitelį į pagrindinį audinį, antra, absorbuoja maistines medžiagas, elektrolitus ir vandenį iš žarnyno spindžio į kraujotaką [14, 37].

Žarnyno barjero vientisumui palaikyti labai svarbūs jungiamieji kompleksai – glaudžiosios jungtys (angl. *tight junction*), prisitvirtinančios jungtys (angl. *adherens junction*), plyšinės jungtys (angl. *gap junction*) ir desmosomos (žr. 3 pav.). Glaudžiosios jungtys yra tarpląstelinio tinklo daugiafunkcinis kompleksas, kuris susiformuoja sujungiant gretimų epitelio ląstelių membranas, taip sukuriant veikiančią apieląstelinio barjero struktūrą. Jos reguliuoja vandens ir ištirpusių medžiagų judėjimą tarp epitelio sluoksnių, bei atitinkamai uždaro apieląstelinį tarpą tarp epitelio ląstelių, taip užkertant kelią mikroorganizmų ir kitų antigenų difuzijai per epitelį. Glaudžiosios jungtys yra labai selektyvios tirpalams pagal jų dydį, krūvį, poliškumą ir transepitelinį pasipriešinimą [38, 39].



3 pav. Tarpląstelių jungčių tipai. Pritaikyta pagal [13]

Keletas skirtingų baltymų tipų prisideda prie jungiamųjų kompleksų vystymosi, įskaitant baltymų klaudinių šeimą, formuojančią apieląstelinę porą sandarioje jungties vietoje ir susijusių su kitais transmembraniniais baltymais, vadinamais okcludiniais. *Zonula occludens* (ZO)-1 ir kiti citoplazminiai baltymai, tokie kaip ZO-2 ir ZO-3, prisijungia ir tarnauja kaip jungiamieji kompleksiniai baltymai [19]. Glaudžiosios jungtys susideda iš transmembraninių baltymų (pvz., klaudinių, okcludino), periferinių membranų baltymų (pvz., ZO-1, ZO-2) ir reguliuojančių baltymų. Kartu su desmosomomis prisitvirtinusios jungtys suteikia tvirtą adhezinių ryši, išlaikant epitelio vientisumą [14, 40].

Prisitvirtinančios jungtys yra baltymų kompleksai, kurie atsiranda kai ląstelę juosiančios juostos prilimpa, arba pritvirtina prie tarpląstelių medžiagų. Šios jungtys vadinamos „sukibimo diržu“, nes visiškai uždaro ląsteles kartu su F-aktino filamentu (aktino gija arba mikrofilamentu) kuris ypač reikalingas viršūninio epitelio ląstelių susitraukimui arba atsipalaidavimui ir morfogenezei [41].

Plyšinės jungtys yra specializuotų tarpląstelių kanalų, jungiančių gretimas ląsteles, kompleksas, reguliuojantis mažų molekulių, tokių kaip K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} jonų, antrinių siganlo perdavėjų (cAMP, cGMP ir inozitolio 1,4,5-trifosfatas), metabolitų (gliukozė, glutamatas, adozinas, AMP, ADP, ATP ir glutationas), taip pat cheminių ir elektorių jungčių tarp gretimų ląstelių srautą [13, 42].

Desmosomos yra dinamiškas, užtikrinantis stiprų sukibimą tarp ląstelių, kompleksas, susidarantis sujungus kadherino transmembraninius baltymus su tarpinėmis gijomis. Jos jungiasi ląstelėje su tarpinių gijų citoskeletu, sudarydamos adhezinius ryšius, kuris audiniams suteikia mechaninį tvirtumą, padeda išlaikyti šlyties jėgas [43].

Epitelio barjero suskaidymas ar pažeidimas laikomas vienu iš pagrindinių veiksnių, lemiančių polinkį į žarnyno uždegimą ir daugelį virškinimo trakto ligų, įskaitant uždegiminę žarnų ligą ir alergiją maistui [44]. Žarnyno barjero epitelio jungtys vaidina svarbų vaidmenį vystantis autoimuninėms ligoms, selektyviam maistinių medžiagų pralaidumui, kontroliuojamam mikroorganizmų perkėlimui ir keliems uždegiminiams virškinimo trakto sutrikimams, įskaitant Krono ligą ir opinį kolitą [45].

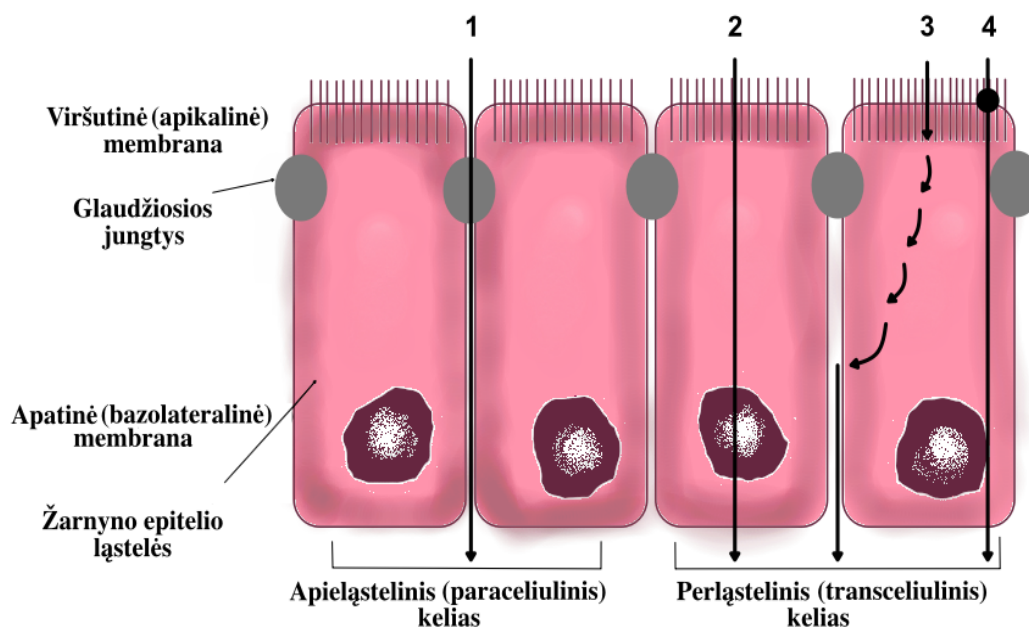
Glaudžiųjų jungčių kompleksai riboja pasyvios medžiagos difuziją per apieląstelines erdves tarp epitelio ląstelių, o šis procesas gali būti pažeistas sergančiame epitelio audinyje, esant fiziologinėms

sąlygom. Žarnyno barjerinės struktūros pusiausvyros pažeidimas ar sutrikimas gali išsivystyti į nekontroliuojamą imuninę reakciją žarnyno mikroaplinkoje arba leisti nevaržomai augti mikrobiotai, kuri gali sukelti įvairias ligas, įskaitant žarnyno uždegiminius sutrikimus. Žarnyno barjerinės funkcijos praradimas ir dėl to atsirandantis neribotas liuminalinių antigenų srautas į gleivinę, imuninę sistemą yra susijęs su keletu žinomų ligų, įskaitant – I tipo cukrinį diabetą, išsėtinę sklerozę, reumatoidinį artritą, uždegiminę žarnyno ligą, celiakiją ir dirgliosios žarnos sindromo patologija. Šios patologijos susijusios su žarnyno pralaidumo padidėjimu ir nenormalia barjero funkcija, bei lėtiniu uždegimu epitelio ląstelių sluoksnyje gleivinėje. Turimi duomenys apie barjero funkciją yra koreliaciniai ir nepateikia išsamaus mechaninio supratimo apie barjero praradimo vaidmenį šiose ligose [46–48].

1.3. Medžiagų pernašos per barjero epitelį keliai

Medžiagų pernaša per epitelio vienasluoksnį vadinama transepiteliniu transportu. Tirpios medžiagos ir kietosios dalelės reguliuojamai juda per žarnyno epitelį arba tarp epitelio ląstelių, arba per epitelio ląstelių viršūninę membraną [19, 49].

Selektyvus makromolekulių įsisavinimas ir judėjimas per epitelio ląstelių sluoksnį vyksta skirtingais medžiagų pernešimo mechanizmais (žr. 4 pav.). Transepitelinis jonų judėjimas tarp kraujo ir spindžio vyksta per apieląstelinius ir perląstelinius kelius, kurie susiduria su daugybe kliūčių, įskaitant glikokaliksą, skirtingas viršūtinės (apikalinės) ir apatinės (bazolateralinės) membranos kompozicijas, citozolį, glaudžiąsias jungtis, tarpląstelinių erdvių geometriją ir pamatinę membrana [50].



4 pav. Medžiagų pernašos per žarnyno epitelį keliai. Pritaikyta pagal [51]

Molekulių pernešimas per epitelį apieląsteliniu keliu yra reguliuojamas sudėtingų tarpląstelinių procesų, kurių metu yra svarbu tiksliai sureguliuoti glaudžiųjų jungčių komplekso pralaidumą (žr. 4 pav. 1). Pasyvi difuzija per enterocitų plazmos membraną ir per ląstelę, kuri išsiskiria apatinėje (bazolateralinėje) pusėje, vyksta su kai kuriomis maistinės medžiagomis arba mikrobu metabolitais turinčiais atrankių savybių (žr. 4 pav. 2). Endocitozė (vykstanti per membraninius receptorius) leidžia pūslelių sukeltą pasisavinimą, transportavimą ir išsiskyrimą bazolateralinėje pusėje procese, vadinamoje transcitoze (žr. 4 pav. 3, 4). Įvairios su membrana susijusios nešiklio sistemos gali

prisidėti prie spindžio molekulių internalizavimo, leidžiančio difunduoti per ląstelės citoplazmą ir išsiskirti apatinėje (bazolateralinėje) membranos pusėje [51, 52].

1.3.1. Apie ląstelinius pernašos kelias

Apie ląstelinius transportas pasyvus – tai molekulių judėjimas, iš viršutinės (apikalinės) membranos per glaudžiausias jungtis tarp gretimų ląstelių, į apatinę (bazolateralinę) membraną, kuri lemia junginio koncentracijos gradientas. Ši transporto rūšis paprastai nėra prisotinama, nepriklauso nuo molekulės stereochemijos ir nėra jautri transporto inhibitoriams ir dažniausiai taikoma lipofiliniams junginiams, kurie lengvai ištirpsta membranose [53, 54]. Apie ląstelinius kelias gali būti skirstomas į porų kelią, kuris yra selektyvus dydžiui ir krūviui (jonai ir teigiamai įkrautos molekulės praeina lengviau) ir kuri pirmiausia reguliuoja kaudinai, ir nuotėkio kelią – kuris yra ne toks selektyvus ir kurio bendrą pralaidumą reguliuoja ZO1, okludinais ir MLCK [53, 55].

Glaudžiųjų jungčių pralaidumo reguliavimas vaidina svarbų vaidmenį fiziologiniame ir patologiniame transporte bei palaikant epitelio ląstelių poliškumą [49, 56]. Glaudžiosios jungtys apie ląstelinių pernašos metu leidžia praeiti mažoms molekulėms, kurių molekulinė masė yra iki 200 Da [57] ir vidutinio dydžio hidrofiliinėms molekulėms, kurios negali įveikti lipofilinės ląstelės membranos ir neturi specifinės transporterių sistemos, leidžiančios praeiti žarnyno barjerą [58]. Paprastai apie ląstelinius kelias yra nepralaidus baltymo dydžio molekulėms, taigi yra veiksmingas barjeras antigeninėms makromolekulėms [59].

1.3.2. Per ląstelinius pernašos kelias

Per ląstelinius transportas apima tiek pasyvų, tiek nuo energijos priklausančią aktyvų transportavimo mechanizmą [58], kuris vyksta per epitelio ląstelę, einantis nuosekliai per viršūninės ir apatinės plazmos membranose esančius transmembraninius baltymus ir įsiterpusią citoplazmą [54]. Molekulių difuzija vykstanti virš viršūninės ląstelės membranos vadinama per ląsteliniu pasyviuoju transportu. Šio transportavimo metu tik hidrofobinės molekulės gali praeiti pro lipofilinės ląstelės membraną, kurioms reikalingas koncentracijos gradientas [60].

Norint transportuoti elektrolitus, vandenyje tirpias maistines medžiagas ir didesnes lipofilines molekules, reikalingi specializuoti transmembraniniai baltymai [61], kurie yra labai specifiški. Per ląstelinius transportas vyksta dėl epitelio membranoje esančių poliarizuotų pernešančių baltymų, kurie yra ekspresuojami skirtingose membranos srityse – viršūninėje (apikalinėje) ir apatinėje (bazolateralinėje) [58]. Ląstelių poliškumas leidžia konkretiems transporteriams veikti nuosekliai, užtikrinant vektorinį, kryptinį transportą per epitelį. Priklausomai nuo krypties, transepitelio pernaša gali būti vadinama absorbcija (reabsorbcija), kai ji vyksta tarpląstelinio skysčio skyriaus link arba sekrecija, kai ji vyksta iš tarpląstelinio skysčio [62].

Priešingai, nei pasyvios pernašos metu, aktyvi vyksta nesant vyraujančio elektrocheminio gradiento arba prieš jį. Kitaip tariant, aktyvus transportas vyksta įkalnėje esančio elektrocheminio gradiento link, todėl jam reikalinga energija [63]. Ši energija gaunama iš ATP hidrolizuojant į ADP, kurios metu tarpininkauja transmembraninių transporto baltymų klasė, žinoma kaip siurbliai arba ATPazės. Pirminis aktyvus transportas leidžia pernešti jonus per ląstelės membraną, naudojant ATP, norint sukurti gradientus [54]. Antrinis aktyvus transportas yra bendras substrato transportas su jonais, kurie pasyviai transportuojami palei gradientą. Galima atskirti sąnašą, kai tiek jonas, tiek substratas yra

gabunami palei gradientą (pvz., Gliukozės simporteris SGLT1) ir priešnašą, kuri transportuoja kartu transportuojamą substratą priešinga kryptimi (pvz., Natrio – kalcio keitikli) [64, 65].

Hidrofilinio pobūdžio jonams ir molekulėms pernešti reikalingi specifiniai kanalai, nešikliai ar siurbliai. Visi šie transmembraniniai transporteriai yra reguliuojami ir selektyvūs jų specifinei molekulei [61, 66]. Siurbliai, tokie kaip natrio ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPazė}$) ir protonų ($\text{H}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPazė}$) siurblys yra varomi energija ir gali pernešti jonus prieš didelius elektrocheminius gradientus. Kanaliniai baltymai yra selektyvios membranos „poros“ tokiems jonams kaip Na^+ ir Cl^- . Kanalų pernaša priklauso nuo palankių elektrocheminių gradientų, dažnai yra jautri membranos potencialui ir paprastai yra elektrogeninė, t. y. sukianti potencialų skirtumą epitelio sluoksnyje, kuris skatina pasyvią priešinio jono difuziją [65, 67].

Nešikliai – pernešantys baltymai, palengvina jonų ir maistinių medžiagų pernašą per ląstelės membraną, o jų transportinis aktyvumas priklauso nuo esamų elektrocheminių gradientų. Žarnyno epitelyje yra keletas baltymų nešėjų tipų. Uniporteriai nešimo baltymai, tokie kaip palengvintas gliukozės pernešėjas GLUT2, tarpininkauja vieno jono ar maistinės molekulės transportavimui; sąnašos baltymai, tokie kaip natrio / gliukozės kotransportas-1 (SGLT-1) baltymas, yra nešėjai, kurie vienu metu perneša dvi ar daugiau molekulių, dažnai pasinaudodami vienos molekulės palankiais elektrocheminiais gradientais, kad galėtų aktyviai transportuoti kitas. Transportas šiais nešikliais vyksta tik tuo atveju, jei yra visų ištirpusių medžiagų [65, 68].

1.3.3. Endocitozė

Visiškai kitokia aktyviojo transporto rūšis yra endocitozė, kuri yra didesnių ištirpusių molekulių ar dalelių pasisavinimas įtraukiant į ląstelės membraną ir galiausiai suformuojant ląstelių pūsleles. Didelės dalelės ir molekulės, pvz., baltymai ir bakteriniai produktai, negalintys praeiti pro ląstelės membraną ar apieląstelinę erdvę, gali būti pasisavinami endocitozės būdu. Endocitozė tarpininkauja įsisavinant svetimus antigenus, prieš kuriuos organizmas gali sukelti tinkamą imuninį atsaką. Po endocitozės įsisavintos medžiagos aktyviai pernešamos per citoplazmą transcitozės būdu, ir šis kelias yra būtinas antigenų stebėjimui virškinamajame trakte [69, 70].

1.4. Elektrolitų transportavimo mechanizmai

1.4.1. Absorbicija

Elektrolitų absorbicija gali vykti perląsteliniu arba apieląsteliniu būdu, o dažniausiai – abiem būdais. Storosios žarnos epitelis yra mažiau „nesandarus“ ir nėra selektyvus jonams lyginant su plonuuoju žarnynu. Gaubtinės žarnos jonų judėjimą per apieląstelinį kelią lemia kiekvieno jono judrumas laisvame tirpale. Skysčių ir elektrolitų absorbiciją lemia perląstelinė Na^+ absorbicija, Na^+ perėjimas į apatinę (bazolateralinę) erdvę $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPazės}$ pagalba. Na^+ , K^+ aktyvuota ATPazė yra ant storosios žarnos epitelio ląstelės bazolateralinės membranos [71, 72].

Žmogaus storajame žarnyne vanduo yra absorbuojamas osmozės būdu. Vanduo difuziškai reaguoja į osmotinį gradientą, susidarantį dėl absorbuotų elektrolitų. Natriis aktyviai absorbuojamas storojoje žarnoje natrio kanalais. Kalis absorbuojamas arba išsiskiria, priklausomai nuo koncentracijos spindyje. Tai užtikrina elektrocheminis gradientas, kurį sukuria aktyvi natrio absorbicija [73].

Kadangi epitelio vandens pralaidumas audiniuose skiriasi, skysčių ir elektrolitų absorbicija gali būti arba hiposmosinė (liuminalinis skystis turi mažesnę osmoliškumą, palyginti su plazma), arba

izotoninė (liuminalinis skystis turi tą patį osmoliškumą, kaip ir plazma). Epitelio pralaidumas priklauso nuo Na^+ nešiklio sukeltų absorbcijos mechanizmų, kuris dažniausiai dalyvauja izotoninėje skysčių absorbcijoje. Priešingai, epitelis, naudojantis nuo ENaC priklausantį aktyvų druskos transportą, paprastai vyksta hiposmosinės absorbcijos būdu [74, 75].

1.4.2. Sekretija

Kita pagrindinė storosios žarnos funkcija yra elektrolitų sekretija, kurią subalansuoja absorbcija [76]. Be vandens, virškinimo trakte nuolat išskiriama daugybė jonų, fermentų ir kitų biologiškai aktyvių molekulių, kurios visos reikalingos normaliam žarnyno ir kitų audinių ar organų funkcionavimui. Pagrindiniai žarnyno išskiriami jonai yra – bikarbonatas, chloridas, natrijs, hidroksilas, kalis ir protonas. Dauguma išskiriamų elektrolitų iš naujo reabsorbuojasi žarnyne [13]. Žarnyno skysčių sekretija atsiranda dėl aktyvios Cl^- ir (arba) HCO_3^- sekretijos arba pasyvios sekretijos, kurią sukelia osmosiškai aktyvių ištirpusių medžiagų kaupimasis spindyje [64].

Absorbuojančioje gaubtinėje žarnoje K^+ išsiskyrimą į sprindį lemia elektrinis potencialas ir kurią daugiausia palaiko ENaC. Tai lemia liuminalinę kalio koncentraciją, viršijančią serumo koncentraciją. Aktyvios sekretijos metu, dalyvauja penki komponentai: viršūniniai Cl^- kanalai, bazolateralinė $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPazė}$, basolateralinis $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kotransporteris, K^+ -selektyvūs kanalai, ląstelinis kelias [76, 77].

1.5. Makroelementai

Makroelementai yra natūralūs elementai, kurių organizmui reikia didesnio kiekio ir kurie yra svarbesni nei kiti mineralai. Makroelementai apima – natrį (Na^+), kalį (K^+), kalcį (Ca^{2+}) magnį (Mg^{2+}) ir kita [78]. Elektrolitai yra būtini gyvybiniam funkcionalumui, pavyzdžiui, išlaikyti elektrinį neutralumą ląstelėse, generuoti ir atlikti nervų ir raumenų veikimo potencialą. Elektrolitai į organizmą patenka kartu su maistinėmis medžiagomis, skysčiais mitybos metu [79].

Elektrolitai vaidina svarbų vaidmenį daugelyje kūno procesų, pavyzdžiui, kontroliuojant skysčių lygį, rūgščių ir šarmų pusiausvyrą (pH), nervų laidumą, kraujo krešėjimą ir raumenų susitraukimą. Elektrolitų pusiausvyros sutrikimas, atsirandantis dėl inkstų nepakankamumo, dehidratacijos, karščiavimo ir vėmimo, laikomas vienu iš veiksnių, lemiančių įvairių uždegiminių ligų komplikacijas [80]. Aukštas ar žemas elektrolitų kiekis sutrikdo normalias kūno funkcijas ir gali sukelti net gyvybei pavojingas komplikacijas [79].

1.5.1. Kalcis

Kalcis turi reikšmingą fiziologinį vaidmenį organizme. Jis dalyvauja skeleto mineralizacijoje, raumenų susitraukime, nervinio impulso perdavime, kraujo krešėjime ir hormonų sekretijoje. Mityba yra vyraujantis pagrindinis kalcio šaltinis. Daugiausia kalcio yra tarpląsteliniame skystyje [79]. Kalcis yra gyvybiškai svarbus normalios kaulų struktūros palaikyme. Ca^{2+} koncentracija kraujyje turi būti labai ribota, kad užtikrintų normalią nervų ir raumenų veiklą ir palaikytų reikalingą Ca^{2+} kiekį naujam kaulų formavimuisi [64].

Kalcio absorbcija žarnyne yra labai svarbi palaikant pusiausvyrą, nes ji pirmiausia tarpininkauja Ca^{2+} įsisavinime iš maistinių medžiagų. Su maistu absorbuojama tik apie 30 proc. kalcio. Perląstelinė kalcio absorbcija vyksta daugiausia dvylikapirštėje žarnoje ir tuščiosios žarnos pradinėje dalyje, o apieląstelinė Ca^{2+} absorbcija vyksta visame plonajame žarnyne [81, 82].

Apieląstelinė Ca^{2+} absorbcija gali vykti pasyviai difuziškai tarp epitelio ląstelių bet kurioje virškinamojo trakto dalyje, kai jonizuoto Ca^{2+} koncentracija virškinimo skysčiuose tiesiai virš gleivinės ir sandarių jungčių viršija maždaug 6 mM, o tai yra beveik 5 kartus daugiau nei jonizuoto Ca^{2+} koncentracija tarpląsteliniuose skysčiuose [64].

Visame žarnyne kalcio jonai yra absorbuojami aktyviai. Dvivalenčiai jonai absorbuojami daug lėčiau lyginant su vienvalenčiais jonais, pavyzdžiui, kalcio jonai žarnyne absorbuojami 50 kartų lėčiau nei vienvalenčiai. Kalcio homeostazę reguliuojantys hormonai kalcitriolis, paratirinas ir kalcitoninas, turi svarbią reikšmę vykdant absorbcijos procesus [82].

1.5.2. Kalis

Kalis yra laikomas vienu iš svarbiausių ląstelių katijonu [82]. Kalis daugiausia yra tarpląstelinis jonas. Natrio–kalio adenosino trifosfazės siurbliui tenka pagrindinė atsakomybė reguliuoti homeostazę tarp natrio ir kalio, kuris pumpuoja natrij mainais į kalį, kuris juda į ląsteles [79].

Kalio pernešėjai yra būtinas žarnyno epitelio funkcijos elementas. Be savo vaidmens Na^+ / K^+ siurblyje, grynasis transepitelinis K^+ transportas yra svarbus padedant žarnyno pusiausvyrai skysčių ir elektrolitų pernaša. K^+ sekrecija ir absorbcija vyksta žarnyno ilgyje su skirtingomis segmentinėmis variacijomis. Plonojoje žarnoje K^+ transportas iš esmės yra pasyvus, o storioje žarnoje ląstelių transportavimo procesai prisideda prie transepitelinio K^+ pernašos [61].

Plonosios žarnos ir storosios žarnos ląstelių viršūninėje membranoje yra elektroneutralių K^+ / Cl^- kotransporterių. Kai kalis patenka į ląstelę, paprasta difuzija jį nuneša į bazolateralinę membraną [76]. Didžioji K^+ absorbcijos dalis yra paprasta apieląsteline difuzija. Koncentracijos gradiento kryptimi K^+ jonai difunduoja iš ląstelės vidaus į išorę. Tarpląstelinio K^+ koncentracija yra gana maža, todėl susidarius glaudžiosioms jungtims išsivysto didelis koncentracijos gradientas. Ląstelėje esantys anijonai (baltymų anijonai) negali difunduoti pro membraną dėl didelio molekulinės skersmens. Tai sukelia katijonų persvarą membranos išorėje, todėl vidinis membranos paviršius tampa elektroneigiamas taip paskatinant K^+ jonų judėjimą priešinga kryptimi negu koncentracijos gradientas [64, 82].

1.5.3. Magnis

Magnis (Mg^{2+}) yra būtinas (makro) mineralas, turintis daug fiziologinių vaidmenų organizme. Šis elementas dalyvauja fermentų aktyvavime, medžiagų apykaitos keliuose, membranos kanalų reguliavime ir raumenų susitraukime [13]. Magnis yra tarpląstelinis katijonas, daugiausia susijęs su ATP metabolizmu, raumenų susitraukimu ir atsipalaidavimu, tinkamu neurologiniu veikimu ir neuromediatorių išsiskyrimu [79].

Magnis yra antras pagal dažnumą sutinkamas tarpląstelinis katijonas ir kofaktorius daugiau nei 300 fermentinių reakcijų, kurios skiriasi nuo energijos apykaitos iki baltymų ir nukleorūgščių sintezės. Keli reguliavimo procesai kontroliuoja šiuos Mg^{2+} pernašos procesus inkstuose ir žarnyne. Mg^{2+} transportuojamas per apieląstelinį ir perląstelinį kelią [81].

Mg^{2+} absorbuojamas visame žarnyne, tačiau pagrindinė įsisavinimo vieta yra storajame žarnyne. Magnio absorbcija vyksta pasyvia difuzija ir aktyviu transportu. Pirmoji, absorbcija vyksta apieląstelinio, o vėliau – perląstelinio keliu. Ląstelinis Mg^{2+} judėjimas yra svarbus tik nesandariame epitelyje ir sudaro – didžiąją dalį į apyvartą absorbuoto magnio kiekio. Perląsteliniam Mg^{2+}

pernešimui, įsisavinimui ir bazolateralinei pernašai reikalingi membraniniai baltymai, kurie padidina membranų pralaidumą ir palengvina Mg^{2+} judėjimą per šiuos lipidinius dvisluoksnius [13, 83].

1.5.4. Natris

Natris, kuris yra osmosiškai aktyvus anijonas, yra vienas iš svarbiausių tarpląsteliniame skystyje esančių elektrolitų. Jis atsakingas už tarpląstelinio skysčio tūrio palaikymą, taip pat už ląstelių membraninio potencialo reguliavimą. Natris kartu su kaliu keičiasi ląstelių membranose kaip aktyvaus transporto dalis [79].

Virškinimo sistemoje vyksta intensyvi natrio absorbcija ir sekrecija. Natrio jonai (Na^+) daugiausiai absorbuojami tuščioje žarnoje (60 proc.). Jie į enterocitą gali būti pernešami pasyviai, pagal elektrocheminį gradientą, vykstant Na^+ / gliukozės, Na^+ / aminorūgščių ir Na^+ / Cl^- antriniai aktyviajai pernašai ir vykstant antrinei aktyviajai Na^+/H^+ pernašai [82]. Distaliniame plonajame žarnyne ir proksimalinėje storajoje žarnoje Na^+ ir Cl^- absorbcija yra susieta ir elektroneutrali [65].

Dauguma natrio transportavimo procesų vyksta perląstelinės absorbcijos metu. Na^+ judėjimas, vykstantis sekrecijos metu, vyksta per šoniniuose tarpuose esančias sandarias jungtis. Pagrindinė natrio absorbcijos varomoji jėga yra apatinėje (bazolaterinėje) membranoje esanti Na^+ / K^+ ATPazė. Priklausomai nuo žarnyno segmento prienašos, nuo maistinių medžiagų priklausančių sąnašos ir kanalų derinys naudoja šį gradientą, kad Na^+ perneštų į ląstelę per membraną. Nepriklausomai nuo jo patekimo mechanizmo, Na^+ išėjimas iš ląstelės vyksta aktyviu transportu per Na^+ siurblių prie apatinės membranos. Teigiama, kad nuo tirpalo priklausomas kotransportas sudaro net 80 proc. grynosios Na^+ absorbcijos, likę 20 proc. vyksta per prienašą arba per kanalą [13, 61].

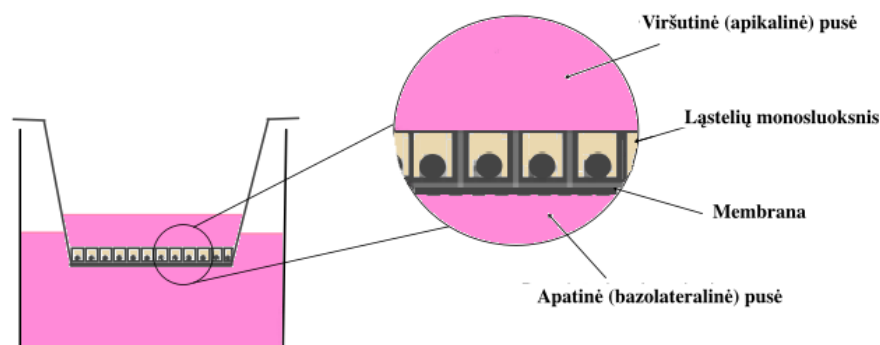
1.6. Žarnyno modeliai *in vitro*

Pastaraisiais dešimtmečiais, siekiant atkurti įvairius virškinimo trakte vykstančius procesus, vykdoma daug metodiškai skirtingų tyrimų. Didelis dėmesys skiriamas žarnyno *in vitro* sistemų kūrimui ir apibūdinimui [84, 85]. Žarnyno modeliai *in vitro* yra laikomi supaprastintomis sistemomis, leidžiančiomis atlikti išsamias analizes, norint gauti informacijos apie galimų vaistų toksiškumą ar įsisavinimą, tyrinėti infekcijas ar įvairias žarnyno ligas, tokias kaip – vėžys, žarnyno uždegiminė liga, dirgliosios žarnos sindromas. Šių modelių, pagalba galima atlikti įvairius biologinius tyrimus, bei kartu sumažinti išlaidas ir etinius klausimus, iškilusius dėl eksperimentuose naudojamų gyvūnų *in vivo* [86–89].

Gyvūnų modeliai gali apibendrinti žmogaus žarnyną anatominiu ir struktūriniu požiūriu, tačiau, priklausomai nuo gyvūno rūšies, yra duomenų rodančių neatitikimus tarp gyvūnų gautų duomenų ir žmonių, dėl tarprūšinių fiziologijos, metabolizmo ir biocheminių būdų skirtumų [90, 91]. Kiti veiksniai, ribojantys gyvūnų modelių naudojimą kuriant žarnyno terapiją *in vivo* – tai reikalauja daug laiko ir didelės darbo jėgos, gyvūnų išlaikymo kaštai yra dideli, taip pat yra etiniai apribojimai, genetinės įvairovės trūkumas, dažnai svarbus ligos vystymuisi, atranka ir nesugebėjimas modeliuoti žmogaus specifinės fiziologijos su didelio našumo analize [91, 92]. Priešingai nei *in vivo* metodikoje, *in vitro* metodai suteikia galimybę tirti žmogaus žarnyno barjero ir atskirų ląstelių mechaninius procesus, taip pat, šios sistemos turi ir sąnaudų pranašumą, leidžiantį automatizuotai lygiagrečiai tikrinti dešimtis tūkstančių molekulių [53].

Dabartiniai žarnyno *in vitro* modeliai gali padėti žymiai sumažinti *in vivo* modelių naudojimą, leidžiant pritaikyti žmogaus ląstelių kultūrų linijas, o tai pašalina konkrečiai rūšiai būdingus molekulinį mechanizmą, reguliuojančių transportavimą ir metabolizmą, skirtumus [93].

Žarnyno modeliai *in vitro* gali būti statiniai arba dinaminiai. Literatūroje statiniai ar biocheminiai modeliai apibūdinami kaip membranos ir ląstelių modeliai, iš esmės sutelkti į aktyviųjų molekulių išsiskyrimo, absorbcijos ir biologinio prieinamumo tyrimus. Kita vertus, dinaminiai modeliai imituoja fizinį apdorojimą ir fiziologinius veiksmus, vykstančius *in vivo*, tokius kaip šlyties įtempis, maišymas ar drėkinimas ir laikui bėgant besikeičiančios sąlygos [90, 94].



5 pav. Statinis žarnyno barjero modelio *in vitro* vaizdavimas. Pritaikyta pagal [85]

Statiniai modeliai yra viena iš labiausiai paplitusių sistemų, naudojamų atkurti žarnyno sąsają *in vitro* (žr. 5 pav.) [94]. Norint atkurti heterogeninę žarnyno populiaciją, reikia naudoti žmogaus ląstelių linijas, geriausia – įvairias ląstelių linijas. Epitelio ląstelės pasėjamos ant membranos, esančios kultūriniame įdėkle, kuri atskiria viršūninį (apikalinį) nuo apatinio (bazolateralinio) skyriaus, atitinkančio žarnyno spindį ir kraujotaką. Ši sistema tam tikru mastu imituoja barjerinę žarnyno konfigūraciją *in vivo* [85].

1.6.1. Ląstelių kultūros

Žarnyno modelio formavimui *in vitro* gali būti naudojamos pirminės arba imortalizuotos ląstelių kultūrų linijos. Paprastų modelių *in vitro* apribojimams paskatino sukurti metodus, kuriuose naudojamos pirminės žmogaus žarnyno ląstelės. Nors pirminės monokultūros labiau panašios į audinius *in vivo*, palyginti su ląstelių linijomis, epitelio atskyrimas nuo palaikančiųjų ląstelių gali pakenkti funkcijai ir apriboti gebėjimą tirti sudėtingą ląstelių sąveiką, įskaitant sąveiką su intersticinėmis ląstelėmis ar uždegiminiu atsaku [95]. Taip pat pirminių ląstelių, turinčių svarbias fiziologines savybes, gyvybingumas yra ribotas. Izoliuotų žmogaus žarnyno epitelio ląstelių kultūra yra sudėtinga ir brangi. Dėl šių priežasčių toksiškumo ir absorbcijos mechanizmams tirti dažniausiai naudojamos imortalizuotos ląstelių linijos, tokios kaip – Caco-2, T84, TC7, HT29-MTX, Raji B ir HCEC [85, 96].

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Žmogaus virškinimo traktas yra sudėtinga organų visuma, atsakinga už veiksmingą virškinimo procesą ir maistinių medžiagų absorbciją. Žarnyne, medžiagų absorbcija vyksta per epitelio barjerą, kurį daugiausia sudaro ląstelių vienasluoksniu su tarpląstelinėmis sandariomis jungtimis. Siekiant užtikrinti žarnyno barjero vientisumą, labai svarbu, kad tarp epitelio ląstelių susiformuotų sandarios

glaudžiosios, prisitvirtinančios ir plyšinės jungtys. Susidariusios tvirtos jungtys yra norint būtinos išlaikyti žarnyno vientisumą, kuris gali veiksmingai užkirsti kelią kenksmingų medžiagų patekimui į kraują per žarnyno barjerą ir užtikrinti efektyvius elektrolitų absorbcijos procesus.

Makroelementai gaunami mitybos metu, yra gyvybiškai svarbūs žmogaus organizmui. Elektrolitai, organizme užtikrina rūgščių ir šarmų pusiausvyrą bei skysčių balansą (homeostazę) ir normalų neurologinį, miokardo, nervų ir raumenų funkcijų palaikymą.

Žarnyno epitelio barjero sutrikimai gali sukelti pataloginį virškinimo trakto pažeidimą, žarnyno uždegimą, esant fiziologinėms sąlygoms. Šiuo metu, trūksta žinių apie tikslius mechanizmus, pagrindžiančius sudėtingą žarnyno barjero absorbcijos, sekrecijos, uždegimo ir jutimo fiziologiją. Žmogaus žarnyno barjero *in vitro* modeliai suteikia galimybę atlikti įvairius tyrimus, siekiant išsamiau išsiaiškinti vykstančius absorbcijos ir sekrecijos mechanizmus.

Šiame tyrime siekiama sukurti naują, fiziologinius mechanizmus imituojantį žmogaus žarnyno barjero modelį *in vitro*. Dažniausiai šiuo metu naudojami ląstelių linijos modeliai, turi daugybę apribojimų, nes ląstelės skiriasi morfologija, ląstelių poliškumu, pakitusia genų ekspresija dėl savo vėžinės kilmės ir barjero funkcija, palyginti su *in vivo* žarnyno fiziologija. Pirmame darbo etape, atliekami modelio formavimo ir integralumo nustatymo tyrimai, vėliau sukurtas modelis pritaikomas elektrolitų reabsorbcijos tyrimams per žarnyno barjerą *in vitro*.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Įranga, reagentai ir priemonės

Tyrimams atlikti buvo naudota II klasės biologinio saugumo laminarinė traukos spinta (ESCO Airstream, JAV), ląstelių kultivavimo inkubatorius (New Brunswick™ Galaxy® 170 S CO₂, JAV), centrifuga (BioSan Centrifuge, Latvija), šviesaus lauko mikroskopas (Leica Microsystems, GmbH, Vokietija), vandens vonelė, hemocitomas (Fuchs-Rosenthal, Vokietija), masių spektrometras (PerkinElmer, JAV).

In vitro žarnyno modelio monosluoksniu formavimui ir kūrimui buvo naudotos 6-ių šulinėlių lėkštelės (Falcon®, ir Multiwell™ Dickinson Labware, JAV) kultūrų auginimo įdėklai su skaidria PET membrana, 3 μm porų dydžio (Falcon®, Becton Dickinson Labware, JAV) ir su nepermatoma *Biopore* PTFE membrana, 0,4 μm porų dydžio (Millicell™, Dickinson Labware, JAV).

Ląstelių metaboliniui aktyvumui nustatyti buvo naudotos permatomos ir juodos spalvos 96 šulinėlių plokštelės ir daigafunkcinis plokštelių skaitytuvas *Infinite M Nano Plex* (Tecan Group Ltd., JAV).

Transepitelinės elektrinės varžos matavimai buvo atlikti naudojant nešiojamą voltmetrą *Millicell ERS- 2* (Volt-Ohm Meter, JAV).

Elektrolitų nustatymo tyrimams atlikti buvo naudojamas plazmos masių spektrometras su analizatoriumi *ICP-MS NexION 300D* (PerkinElmer, JAV).

Tyrimo metu naudoti reagentai aprašyti apačioje. Žiūrėti 1 lentelę.

1 lentelė. Tyrimo metu naudotų reagentų sąrašas

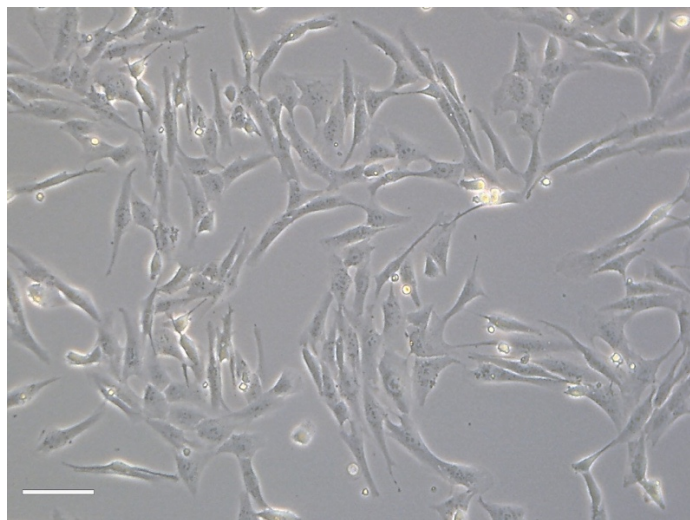
Reagentų pavadinimas	Gamintojas	Šalis
Ląstelių auginimo terpė (DMEM(1X) +GlutaMAX-I (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>))	<i>Gibco™, Thermo Fisher Scientific</i>	JAV
Penicilino ir streptomicino antibiotikų sudėtinis tirpalas (angl. <i>Pen-Strep</i>)	<i>Gibco™, Thermo Fisher Scientific</i>	JAV
Tripsino / EDTA 10x tirpalas (0,5 proc. tripsinas ir 0,2 proc. EDTA)	<i>Sigma-Aldrich</i>	Vokietija
Tripiano mėlio dažų tirpalas (0,4 proc.)	<i>Sigma-Aldrich</i>	Vokietija
PrestoBlue reagentas	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	JAV
Etanolis	<i>UAB „Stumbras“</i>	Lietuva
Fetalinis vaisiaus serumas (angl. <i>FBS</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>	Vokietija
Fosfatinis buferinis druskos tirpalas (angl. <i>PBS</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>	Vokietija
Dimetilsulfoksidas (angl. <i>DMSO</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>	Vokietija
Natrio chloridas 0,9 mg/ml	<i>Carl Roth</i>	Vokietija
Elektrolitų tirpalai	<i>Birštono vandenys</i>	Lietuva

2.2. Imortalizuotos žmogaus storosios žarnos epitelio ląstelės

Tyrimo metu buvo naudojama imortalizuotos žmogaus storosios žarnos epitelio ląstelių linija – (HCEC-1CT) (angl. *Human colon epithelial cells*), kuri buvo įsigyta iš „Evercyte GmbH“ (Austrija).

Ši linija buvo sukurta iš žmogaus storosios žarnos epitelio ląstelių, jas transdukuojant retrovirusiniais vektoriais, turinčiais *cdk-4* ir *hTERT* geną. Imortolizuota žmogaus gaubtinės žarnos epitelio ląstelių linija HCEC ekspresuoja citochromą P450 panašiu lygiu, kaip ir žmogaus storosios žarnos audinyje. Ši transformuota ląstelių linija turi žarnyno epitelio pobūdį, formuodama glaudžiausias jungtis ir desmosomas [97].

Ląstelių morfologija po atlikto persėjimo, netaisyklingos formos, pasiekus paviršiaus ploto pasidengimą ląstelėmis susiformuoja – verpstės formos. (žr. 6 pav.). HCEC-1CT ląstelių pasidauginimo laikas yra vidutiniškai nuo 18 iki 24 valandų. Visi eksperimentiniai darbai su ląstelių kultūros linija buvo atliekami II klasės biologinio saugumo laminarinėje traukos spintoje.



6 pav. Žarnyno epitelio HCEC-1CT ląstelių morfologija. Nuotrauka daryta šviesiniu mikroskopu Leica Microsystems, nustačius 40x padidinimo funkciją. Skalė – 20 μm

2.2.1. HCEC ląstelių kultivavimas

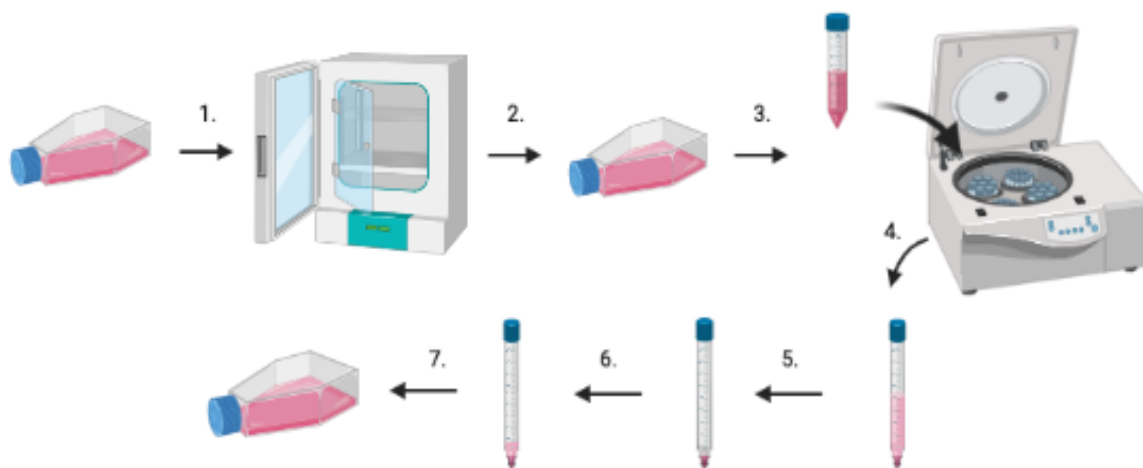
Ląstelių augimo terpės ruošimas. Taikant kruopščiai atrinktus komponentus, ląstelių augimo terpę (DMEM(1X)) + GlutaMAX-I, nufiltruotą fetalinį veršelio vaisiaus serumą (angl. *FBS*) ir penicilino ir streptomicino antibiotikų sudėtinį tirpalą (angl. *Pen-Strep*) buvo ruošama HCEC-1CT ląstelių linijos mitybinė terpė.

Protokolas: 5 ml nufiltruoto FBS serumo atšildoma vandens vonelėje, į jį pridedama 500 μl *Penicilino-Streptomicino* tirpalo ir praskiedžiama iki 50 ml ribos su ląstelių augimo terpe DMEM(1X) + GlutaMAX-I.

Ląstelių atšildymo procedūra. Paruošiama ląstelių augimo terpė, ji atšildoma vandens vonelėje ir paliekama laminare kambario temperatūroje. Mėgintuvėlis su ląstelėmis išimamas iš skysto azoto talpos ir įdedamas į šiltą vandens vonelę. Kriomėgintuvėliui atitirpus, po kelių minučių, turinys perpilamas į centrifugavimo mėgintuvėlį, iš anksto užpildytą 9 ml augimo ląstelių terpės. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 minutes esant 170 x g nustatymams. Po centrifugavimo supernatantas nupilamas, į likusias ląstelių nuosėdas pridedama 1 ml augimo terpės ir suspenduojama. Atlikus suspendavimą, ląstelių suspensija perkeliama į paruoštą ląstelių auginimo flakoną ir papildoma atitinkamu kiekiu mitybinės terpės. Flakonai su ląstelėmis perkeliama į 37 ° C temperatūros, 5 proc. CO₂ atmosferos inkubatorių. Praėjus 24 valandoms, atliekamas augimo terpės pakeitimas nauja.

Auginimo sąlygos. Ląstelės auginamos prieš tai aprašytoje terpėje 37 ° C temperatūroje, drėgnos atmosferos inkubatoriuje, kuriame yra 5 proc. CO₂ ir 2–5 proc. deguonies. HCEC-1CT ląstelių linija augimo metu prisitvirtina prie paviršiaus, todėl auginimo flakonas yra laikomas paguldytas – horizontalioje padėtyje, siekiant padidinti ląstelių prieinamumą ir prisitvirtinimą prie laisvo paviršiaus ploto. Atitinkamai pasirinkus ląstelių auginimo flakoną, nominalusis augimo terpės tūris skiriasi, vidutiniškai į 75 cm² flakoną pridedama 12 ml, o 25 cm² atitinkamai 6 ml ląstelių mitybinės terpės. Siekiant užtikrinti ląstelių suaugimą, rekomenduojama ląstelių augimo terpę keisti atitinkamai nuo pasodinto ląstelių kiekio, jei kiekis mažas – kas dvi dienas, jei didelis, kas dieną.

Ląstelių persėjimo procedūra. Ląstelių persėjimo schema pateikta 7 paveikslėlyje. Ląstelės persodinamos, kai jų populiacijos suaugimas pasiekia maždaug 85–95 proc. Ląstelių mitybinė terpė pašalinama iš flakono ir perplaunama du kartus su PBS, pašalinant visus augimo terpės likučius. Tada, į flakoną, priklausomai nuo jo dydžio, pridedama Tripsino – EDTA (10x) tirpalo ir švelniai pavartoma, kad tirpalas pasiskirstytų tolygiai po flakono paviršių. Inkubuojama 37 ° C temperatūroje maždaug 3–4 minutes (žr. 7 pav. 1). Ištraukus iš inkubatoriaus, ląstelių flakonas švelniai supurtomas tam, kad visos ląstelės atkibtų nuo apatinio vidinio flakono paviršiaus (žr. 7 pav. 2). Ląstelių atsiskyrimas nuo paviršiaus stebimas apverstu mikroskopu. Ląstelėms atkibus, tripsino nepageidaujamas poveikis sustabdomas pridedant ląstelių augimo terpės. Ląstelių suspensija perkeliama į mėgintuvėlį ir 5 minutes centrifuguojama esant 170 x g (žr. 7 pav. 3). Po centrifugavimo, susidaręs supernatantas nupilamas, pridedama 1 ml terpės ir ląstelės suspenduojamos (žr. 7 pav. 4, 5, 6). Atitinkamas kiekis ląstelių suspensijos perkeliamas į naujus auginimo flakonus, papildytus augimo terpės (žr. 7 pav. 7). Pilnas ląstelių suaugimo ant flakono vidaus paviršiaus santykis priklauso nuo užsėjamų ląstelių skaičiaus naujo persodinimo metu.

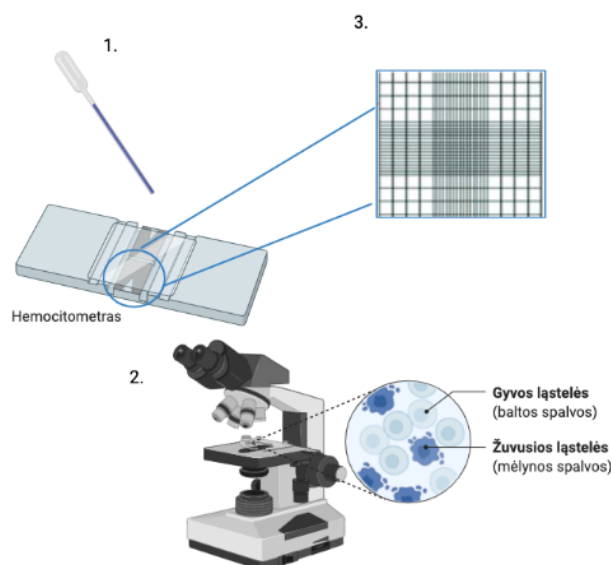


7 pav. Ląstelių persėjimo schema. Pavaizduota naudojantis programine įranga *Biorender.com*

Ląstelių užšaldymo procedūra. Ląstelių augimo flakonas išimamas iš inkubatoriaus. Ląstelės, paveikus Tripsino-EDTA (10x) tirpalu, jos atsiskiria nuo auginimo apatinio vidinio flakono paviršiaus. Atkibusios ląstelės kartu su mitybine terpe surenkamos į mėgintuvėlį ir centrifuguojamos 5 minutes esant 170 x g. Tada supernatantas nupilamas, ląstelių nuosėdos suspenduojamos likusiame lašelyje ir pridedama 700 µl augimo terpės, 100 µl DMSO ir 200 µl FBS. Atitinkami kiekiai supilami į kiekvieną iš anksto atvėsintą kriomėgintuvėlį pridedama 1 ml šios ląstelių suspensijos, kuri nedelsiant perkeliama į –80 ° C. Po 24 valandų kriomėgintuvėliai perkeliama į skystą azotą ilgalaikiam saugojimui.

2.2.2. Ląstelių skaičiavimo procedūra

Ląstelių skaičiavimo schema pavaizduota 8 paveikslėlyje. Atlikus suspendavimą su ląstelių mitybine terpe, į *Eppendorf* mėgintuvėlį supilama 20 µl suspenduotos ląstelių suspensijos. *Eppendorf* mėgintuvėlyje esanti suspensija sumaišoma su 20 µl tripano mėliu santykiu 1:1. Skaičiavimui pasirošiamas hemocitometras (žr. 8 pav. 1), ant kurio uždedamas ir prispaudžiamas dengiamasis stikliukas. Suspendavus ląstelių ir tripano mėlio dažo mišinį, iš jo paimamas 20 µl kiekis ir atsargiai priliečiant dengiamojo stikliuko apačią, paskleidžiamas į hemocitometro kamerą. Ląstelių skaičiavimas hemocitometro kameroje vyksta pasitelkus šviesinį mikroskopą, pro kurį galima stebėti gyvas ląsteles, nusidažiusias šviesiai balta ir negyvas ląsteles, kurios nusidažo tamsiai mėlyna spalva (žr. 8 pav. 2).



8 pav. Ląstelių skaičiavimo schema. Hemocitometro kamera (1), tripano mėliu nudažytos ląstelės (2), skaičiavimo schema (3). Pavaizduota naudojantis programine įranga *Biorender.com*

Ląstelių skaičius viename mililitre apskaičiuojamas pasinaudojant formule, pagal kurią hemocitometro kameros įstrižainėje esančių keturių kvadratų gyvų ląstelių suma padauginama iš 16 – bendro hemocitometro kameroje esančių kvadratų skaičiaus (žr. 8 pav. 3), tada padauginama iš atlikto skiedimo skaičiaus – 2 ir iš 5000, tūrio koeficiento, kuris gaunamas kvadrato paviršiaus plotą 1 mm² padalijant iš viename kvadrato telpančio kiekio – 0,0002 ml.

2.3. Žarnyno barjero modelio kūrimas *in vitro*

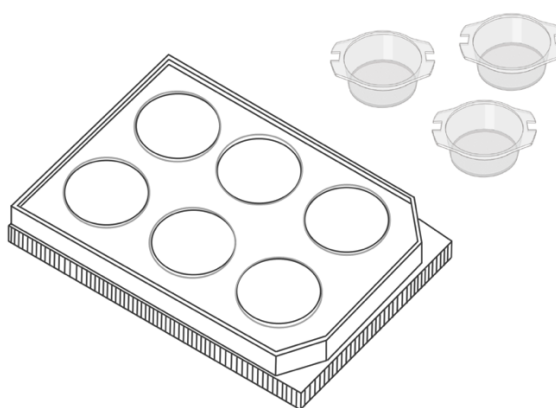
Siekiant rasti optimaliausias ir geriausias sąlygas formuojant žarnyno epitelio barjerą *in vitro* visas dėmesys buvo sutelktas į ląstelių kultivavimą ant membraninių kultūrų įdėklų. Žarnyno barjero kūrimui pasirinkti membraniniai ląstelių kultūrų įdėklai, nes jie geriausiai užtikrina žarnyną atspindinčią dviejų kamerų (žarnyno spindžio ir išorės) sistemą.

Prieš atliekant žarnyno modelio formavimą *in vitro* ant membraninių įdėklų, naudojami įrankiai išvalomi ir dezinfekuojami. Pincetai yra iškaitinami 1,5 val. 140 °C temperatūroje, kaitinimo spintoje, siekiant išvengti užsikrėtimo rizikos. Sterilioje aplinkoje, laminarinėje spintoje pasirošiamas darbo aplinka, priemonės – išpakuojami ląstelių kultūrų auginimo įdėklai ir 6-ių šulinėlių lėkštelės.

2.3.1. Optimalių sąlygų nustatymas barjero formavime

Formuojant žarnyno barjerą *in vitro* buvo pasirinktos skirtingos metodinės sąlygos, siekiant sukurti ir nustatyti optimaliausią žarnyno modelį atitinkantį fiziologiją. Šiam tikslui pasiekti buvo pasirinkta skirtingų membranų kultūriniai įdėklai, ląstelių sėjimo metodika ir ląstelių skaičius suspensijoje.

Žarnyno modelis *in vitro* buvo formuojamas ant skirtingų membraninių kultūrinių įdėklų – 0.4 µm diametro *Millicell Biopore* PTFE membrana ir 3 µm diametro „Falcon®“ skaidria PET membrana. Vykdamas pirminius eksperimentus su *Millicell Biopore* membraniniais kultūriniais įdėklais ląstelės neprisitvirtino prie membranos paviršiaus. Atlikus tyrimus su abiejų rūšių membraniniais įdėklais, nuspręsta, žarnyno modelio barjero formavimui *in vitro* pasirinkti 3 µm porų dydžio, 30 mm skersmens su skaidria PET membrana ląstelių auginimo įdėklus, atitinkamai pritaikomos 6 šulinėlių lėkštelės (žr. 9 pav.).



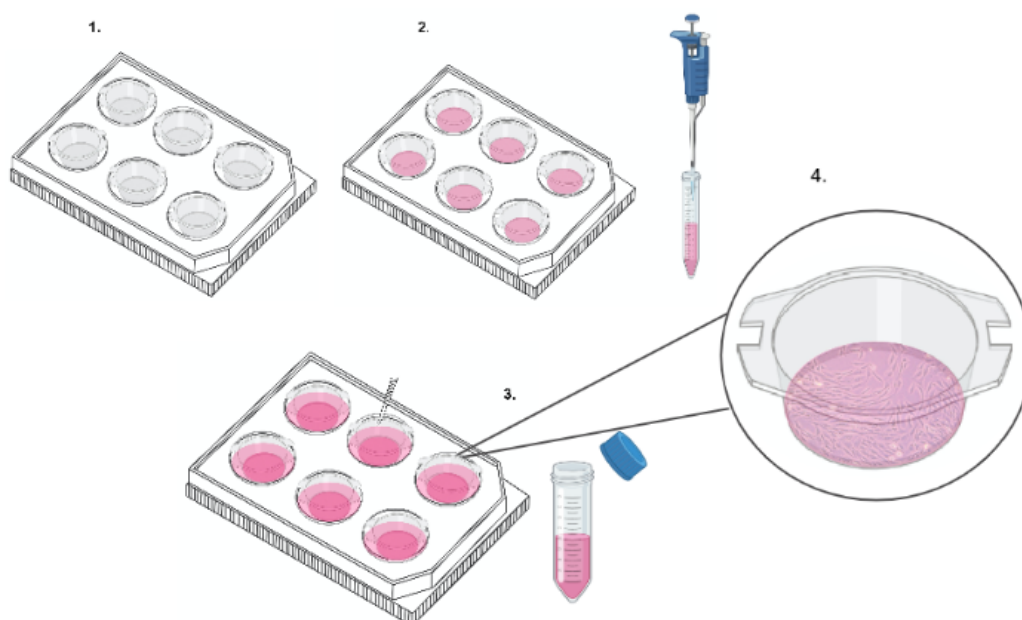
9 pav. 6 šulinėlių lėkštelė kartu su kultūriniais ląstelių auginimo įdėklais. Pavaizduota naudojantis programine įranga *Biorender.com*

Siekiant nustatyti palankiausias sąlygas, turinčias įtakos ląstelių prisitvirtinimui prie membranos paviršiaus buvo panaudoti du skirtingi metodai. Pasitelkus pirmąjį metodą, į apatinį lėkštelės šulinėlį buvo pridėdama 2 ml mitybinės terpės, tada atsargiai su pincetu įdedamas įdėklas ir ant jo pasodinama 2 ml ląstelių suspensija. Lėkštelės kartu su kultūros auginimo įdėklu švelniais judesiais pasukamos ir įdedamos į termostatą. Pasitelkus antrąjį metodą, visų pirma, į šulinėlių lėkšteles atsargiai įstatomi įdėklai, ant įdėklo paviršiaus pasodinama ląstelių suspensija, antra, į šulinėlio lėkštelės dugną pridėdama mitybinė terpė, kuri suformuoja fokalinį barjerą tarp viršutinio ir apatinio sluoksnio. Antrasis metodas, pasižymėjo geresniu ląstelių pasiskirstymu ant membranos paviršiaus stebint per šviesinį mikroskopą, bei palankesniu ląstelių prikibimu. Pirmuoju metodu, tarp membraninio kultūrinio įdėklo susidarė oro tarpas, kuris neužtikrino susisiekančio barjero modelio tarp viršutinio ir apatinio skyriaus.

Nustatinėjant sąlygas, galinčias turėti įtakos ląstelių suaugimui ir pasklidimui po membranos paviršių buvo atliekami tyrimai su skirtingu ląstelių kiekiu suspensijoje. Literatūroje minima, jog atitinkamai pagal įdėklo diametrą ląstelių skaičius viename įdėkle gali svyruoti nuo 100 000 iki 300 000 tūkstančių [95, 98, 99]. Siekiant išsiaiškinti optimalų ląstelių kiekį suspensijoje, užtikrinantį optimalų barjero susidarymą, buvo pasirinkta 200 000, 250 000 ir 300 000 ląstelių kiekis suspensijoje. Atitinkami ląstelių suspensijos kiekiai buvo pasodinti ant membraninių kultūrinių įdėklų ir vizualiai stebimi per šviesaus lauko mikroskopą *Leica Microsystems*.

2.3.2. Modelio formavimas

Žarnyno barjero formavimui pasitelkiamos kruopščiai atrinktos sąlygos. Žarnyno epitelio ląstelės kultivuojamos aukščiau aprašytoje terpėje 37 ° C temperatūroje, drėgnoje atmosferoje inkubatoriuje, kuriame yra 5 proc. CO₂ ir 2–5 proc. deguonies. Ruošiantis barjero formavimui *in vitro*, ląstelės persodinamos, kai jų populiacijos suaugimas pasiekia maždaug 85 proc. Ląstelių augimo terpė pašalinama iš flakono ir praplaunama du kartus su PBS. Tada į flakoną, pridedama Tripsino-EDTA (10x) tirpalo ir švelniai pavartoma, kad tirpalas pasiskirstytų tolygiai po flakono paviršių. Inkubuojama 37 ° C temperatūroje maždaug 3–4 minutes. Ištraukus iš inkubatoriaus, ląstelių flakonas švelniai supurtomas tam, kad visos ląstelės atkibtų nuo apatinio vidinio flakono paviršiaus. Ląstelėms atkibus nuo paviršiaus, tripsino nepageidaujamas poveikis sustabdomas pridedant ląstelių augimo terpės. Ląstelių suspensija perkeliama į mėgintuvėlį ir 5 minutes centrifuguojama esant 170 x g nustatymams. Tada supernatantas nupilamas, pridedamas 1ml terpės ir ląstelės suspenduojamos. Atliekamas ląstelių skaičiavimas naudojant hetocitometro kamerą, vykdomas ląstelių skiedimas pasirinkta koncentracija – 250 000 ląstelių / 1,5 ml.



10 pav. Žarnyno modelio formavimas ant kultūrinių įdėklų *in vitro*. Pavaizduota naudojantis programine įranga *Biorender.com*

Naudojant sterilius įrankius – pincetus, ląstelių auginimo kultūrų įdėklai atsargiai įdedami į šulinėlius, stengiantis įstatyti į tam tikras ant kultūrinio įdėklo esančias išpjautas briaunas (žr. 10 pav. 1). Žarnyno epitelio ląstelių suspensija, 1,5 ml kuriame yra 250 000 ląstelių, suspenduojama ir pasodinama ant kultūrinio įdėklo membranos (žr. 10 pav. 2). Lėkštelė švelniais judesiais pasukinėjama siekiant užtikrinti tolygų ląstelių pasiskirstymą po paviršių. Toliau pridedama 2 ml terpės į apatinį (bazolaterinį) sluoksnį (žr. 10 pav.3). Tolygiais iš švelniais judesiais pasukinėjama, membrana susidrėkina. Per šviesinį mikroskopą stebima ar tolygiai pasiskirstė ląstelės po paviršių (žr. 10 pav. 4). Lėkštelės perkeliama į 37 ° C temperatūros, drėgnos atmosferos inkubatorių.

2.4. Transepitelinės elektrinės varžos matavimas

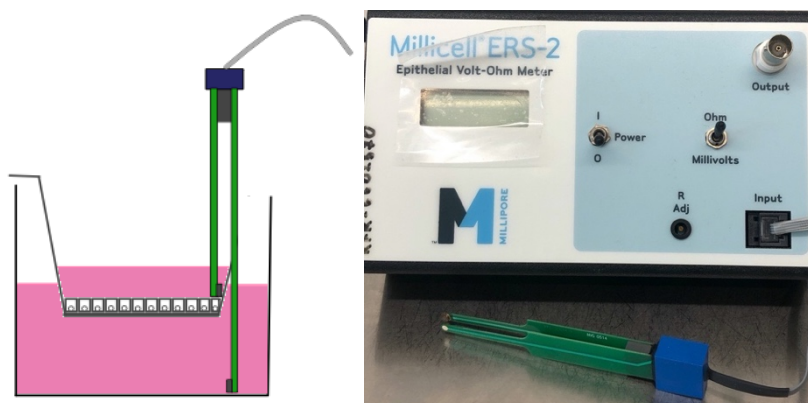
Taikant transepitelinės elektrinės varžos matavimus, galima nustatyti suformuoto barjero integralumą. Transepitelinio elektrinio pasipriešinimo nustatymas, suteikia informaciją apie susiformavusių ląstelių vienasluoksni tolygumą ant membranos paviršiaus ir tarp poliarizuotų elementų susiformavusių sandarių plyšinių jungčių vientisumą, kuo ląstelės glaudžiau suauga, tuo pasiekiamas didesnis varžos kiekis. TEER matavimai yra vieni iš dažniausiai naudojamų matavimų, tiriant epitelio barjero funkciją. Transepitelinė elektrinė varža matuojama – omais (Ω).

2.4.1. Pasiruošimas TEER matavimams

Nešiojamas voltmetras *Millicell ERS-2* (Volt-Ohm Meter, JAV) nudezinfekuojamas ir įdedamas į laminarinę traukos spintą. Pasiruošiama ląstelių auginimo terpė, mėgintuvėlis su etanoliu (70 proc.) ir PBS. HCEC-1CT ląstelių kultūros įdėklai su lėkšte iš inkubatoriaus perkeliama į laminarinę traukos spintą. Siekiant išvengti tūrių skirtumo tarp ląstelių kultūrinių įdėklų, prieš kiekvieną varžos matavimą pakeičiama ląstelių auginimo terpė. Procedūra vykdoma atsargiai, pakeičiama pradėdant nuo apatinio (bazolaterinio) sluoksnio, tuomet viršutiniame kultūriniame įdėkle esanti terpė. Voltmetro elektrodai sterilizuojami 70 proc. etanolyje (5 min.) ir neutralizuojami PBS ir ląstelių auginimo terpėje. Atlikus pagrindinius žingsnius toliau tęsiami transepitelinės varžos matavimai.

2.4.2. TEER matavimo protokolas

Naudojant voltmetrą kiekviename šulinyje išmatuojama transepitelio elektrinė varža (TEER), siekiant įvertinti susidariusio žarnyno barjero sluoksnio vientisumą. Tuščiaame kultūriniame įdėkle, kai nėra epitelio ląstelių, TEER matavimai yra svyruoja nuo 0 iki 100 Ω . Vykdamas matavimus būtina laikytis griežtų taisyklių.



11 pav. Transepitelinės elektrinės varžos matavimai *in vitro* modelyje – pavaizduoti kairėje, nešiojamas voltmetras *Millicell ERS-2* – dešinėje

Pirmiausia, trumpesnis elektrodas atsargiai įdedamas į viršutinę ląstelių įdėklo dalį (viršūninį sluoksnį), kuriame yra HCEC-1CT kultūrinė ląstelių linija su terpe, o kitą elektrodą, ilgesnį – į apatinį skyrių (bazolateralinį sluoksnį), kuriame yra tik auginimo terpė (žr. 11 pav.). Trumpesnis elektrodas neturi liestis su elemento sluoksniu, matuojant, elektrodas laikomas stabiliai 90° kampu, palyginti su plokštelės įdėklu. TEER matuojama keletą kartų skirtingose vienasluoksni vietose dėl elemento sluoksnio tolygumo, kintamumo ir apskaičiuota vidutinė vertė. Siekiant užtikrinti nuoseklumą, TEER matavimai atliekami praėjus ne mažiau kaip 24 valandoms po mitybinės terpės pakeitimo. Gauti duomenys registruojami ir panaudojami tolimesniuose tyrimuose.

2.5. Elektrolitų tirpalų paruošimas

Devyni skirtingų koncentracijų elektrolitų tirpalai, buvo gauti iš UAB „Birštono mineraliniai vandenys“ žiūrėti 2 lentelę. Gautuose tirpaluose elektrolitų koncentracijos buvo nenustatytos, todėl jie buvo ištirti su induktyviai susietos plazmos masių spektrometro analizatoriumi ICP-MS NexION 300D.

2 lentelė. Elektrolitų tirpalų sąrašas

Mėginio numeris	Mėginio pav.
1.	P3 (15 g/l)
2.	3P (13 g/l)
3.	2P (3 g/l)
4.	P2 (2 g/l)
5.	P1 (1,6 g/l)
6.	P5 (1,2 g/l)
7.	1P (1,0 g/l)
8.	5P (0,7 g/l)
9.	P4 (0,2 g/l)

Tyrimo metu, kiekvienas elektrolitų tirpalas buvo skiedžiamas su ląstelių auginimo terpe santykiu 1:4 siekiant sumažinti tiesioginį poveikį žarnyno epitelio ląstelėms. Siekiant nustatyti elektrolitų ir terpės tirpalo sudėties ir ląstelių mitybinės terpės koncentracijas, mėginiai atitinkamai buvo ištirti su induktyviai susietos plazmos masių spektrometro analizatoriumi ICP-MS NexION 300D.

2.6. HCEC-1CT ląstelių, paveiktų elektrolitų tirpalais, gyvybingumo vertinimas

2.6.1. Ląstelių metabolinio aktyvumo nustatymas ir vertinimas

Siekiant įvertinti tiesioginį mikroelementų poveikį žmogaus žarnyno (HCEC – 1CT) ląstelėms, buvo atlikti elektrolitų ir ląstelių metabolinio aktyvumo vertinimo tyrimai. Pasitelkus 96 – šulinėlių lėkšteles, atitinkamai į kiekvieną šulinėlį, trijose skirtingose lėkštelėse, buvo pasodinta po 3000 HCEC- 1CT ląstelių, kuriuose bendras šulinėlio tūris sudarė – 200 µl. Užsėjus ląsteles, jos buvo inkubuojamos 24 valandas, 37 °C temperatūroje ląstelių kultūros inkubatoriuje, apsaugotame nuo tiesioginės šviesos. Po inkubacinio periodo, 96 – šulinėlių lėkštelėse esančios ląstelės buvo paveikiamos skirtingų koncentracijų elektrolitų tirpalais, taip pat paliekama atitinkamai kiekvienam mėginiui elektrolitų tirpalais neveikta ląstelių kontrolė. Elektrolitų tirpalai buvo praskiedžiami su šviežia ląstelių mitybine terpe, santykiu (1:4), į kiekvieną šulinėlį pridedama po 200 µl atskiesto tirpalo (40 µl elektrolitų tirpalo ir 160 µl mitybinės ląstelių terpės). Lėkštelės perkeliama į inkubatorių ir paliekama – 4, 24 ir 48 valandoms. Praėjus minėtoms valandoms, po poveikimo elektrolitų tirpalais, iš inkubatoriaus išimamos, 96 – šulinėlių lėkštelės, nuo ląstelių nuimami mėginiai po 100 µl ir perduodami mikroelementų tyrimams su ICP-MS.

Ląstelių metabolinis aktyvumas, po 4, 24 ir 48 valandų vertinamas pasitelkus ląstelių gyvybingumo reagentą – „PrestoBlue“. Reagentas „PrestoBlue“ – membranai pralaidus tirpalas, pagamintas resazurino pagrindu, kuris redukuodamas sudaro rezorufiną – raudoną ir labai intensyvią fluorescencinį junginį. Praėjus inkubacijos periodui, pašalinus mitybinę terpę nuo ląstelių, į 96 šulinėlių lėkštelę buvo pridėta po 10 µl „PrestoBlue“ reagento, ir įpilama 90 µl šviežios ląstelių

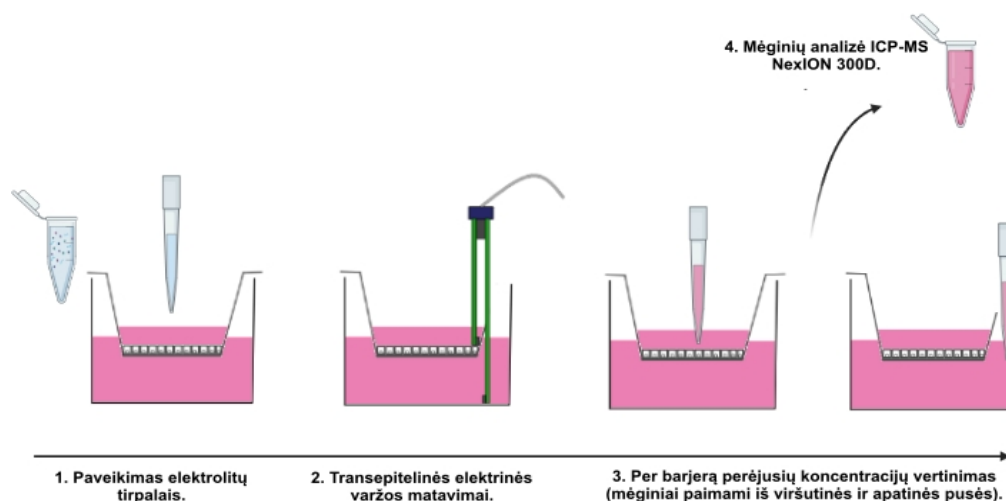
mitybinės terpės. Inkubuojama 20 minučių 37 ° C temperatūroje ląstelių kultūros inkubatoriuje, apsaugotame nuo tiesioginės šviesos. Po inkubacijos, naudojant „Tecan“, pilnai pakrautą daugiamodelį plokštelių skaitytuvą „Infinite M Plex“, esant atitinkamam sužadinimo ir emisijos bangų ilgiui – 560 ir 590 nm, buvo nustatyta resorufino fluorescencija. Daugiafunkcinio plokštelių skaitytuvo parametrai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Daugiafunkcinio plokštelių skaitytuvo nustatymai

Mode	Fluorescence Top Reading	
Excitation Wavelength	560	nm
Emission Wavelength	590	nm
Excitation Bandwidth	9	nm
Emission Bandwidth	20	nm
Gain	100	Manual
Number of Flashes	25	
Integration Time	20	µs
Lag Time	0	µs
Settle Time	0	ms
Z-Position (Manual)	20000	µm

2.7. Elektrolitų pernašos per barjerą tyrimai *in vitro*

Sukūrus žarnyno modelį *in vitro*, siekiant įvertinti per barjerą perėjusių elektrolitų koncentracijas, modelis buvo paveiktas skirtingais elektrolitų tirpalais ir stebimi koncentracijos skirtumai tarp viršutinio ir apatinio įdėklo skyrių po 4, 24, 48 valandų (žr. 12 pav.). Ląstelių mitybinė terpė pašalinama, į viršutinį įdėklo skyrių pridedama 1,5 ml elektrolitų tirpalo mišinio, į apatinį skyrių ląstelių mitybinės terpės (žr. 12 pav. 1). Paveikus elektrolitų tirpalais, lėkštelės inkubuojamos 37 ° C temperatūroje, drėgnoje atmosferoje inkubatoriuje, po 4, 24 ir 48 val. kiekviename šulinėlyje, išmatuojamos transepitelinės elektrinės varžos vertės, siekiant nustatyti, kurie elektrolitų tirpalai turėjo įtakos TEER sumažėjimui (žr. 12 pav. 2). Per barjerą praėjusių elektrolitų koncentracijos nustatomos su plazmos masių spektrometro analizatoriumi ICP-MS NexION 300D analizuojant mėginius paimtus iš viršutinės ir apatinės įdėklo pusės (žr. 12 pav. 3, 4).



12 pav. Elektrolitų tyrimų sąlygų schema. Pavaizduota naudojantis programine įranga *Biorender.com*

2.7.1. Elektrolitų rezorbcijos tyrimai su induktyviai susietos plazmos masių spektrometrijos

Mikroelementų matavimas biologiniuose mėginiuose yra naudingas daugelyje klinikinių sąlygų. Induktyviai susieta plazmos masių spektrometrija (ICP-MS) yra analitinė technika, kuri gali būti naudojama matuojant elementus biologiniuose skysčiuose [100].

Masių spektrometrija – medžiagų tyrimo metodas, paremtas tiriamosios medžiagos molekulės jonizacija bei jonizuotos molekulės masės ir krūvio santykio (m/z) analize. Skystos fazės mėginys peristaltiniu siurbliu 1 ml/min greičiu patenka į purkštuvą. Analizatoriuje esantis plazmos šaltinis 6000–7000 °C temperatūroje džioviną argono dujų nešamą mėginį ir paverčia jį į aerosolio lašelius. Aukštoje temperatūroje molekulės, esančios tiriamojoje medžiagoje, disocijuoja, netenka arba prisijungia elektronus ir virsta į teigiamą arba neigiamą krūvį turintį joną. Susidarę jonai atskiriami veikiant kintamam elektriniam laukui ir nukreipiami į masių spektrometrą. Iš kvadrupolio išėjęs jonų signalas, tiesiogiai proporcingas jonų kiekiui, yra fiksuojamas detektoriumi [100, 101].

Elementų Na^+ K^+ Ca^{2+} ir Mg^{2+} koncentracijos tiriamos su induktyviai susietos plazmos masių spektrometro analizatoriumi ICP-MS NexION 300D (PerkinElmer, JAV). Analizės metu buvo laikomasi šios procedūros: prietaiso optimizavimas, kalibravimas, mėginių analizė. Atliekant Na^+ analizę buvo pasirinktas 23 izotopas ir KED (kinetinės energijos diskriminacijos) spektrometro režimas, kai prie pagrindinių argono dujų prijungiamos ir helio dujos. Atliekant K^+ Ca^{2+} ir Mg^{2+} analizes buvo pasirinkti izotopai (39, 43, 24) bei DRC (dinaminės reakcijos) režimas kai prijungiamos amoniako dujos. Mėginiai buvo kiekybiškai įvertinti naudojant ICP-MS išoriniu kalibravimu naudojant 1/500 mėginio praskiedimą. ICP-MS veikimo sąlygos ir matavimo parametrai pateikti 4 lentelėje. Gauti duomenys iš ICP-MS pateikiami g / l.

4 lentelė. ICP-MS veikimo sąlygos ir matavimo parametrai

ICP-MS parameter	Operating conditions
Spray chamber	Quartz cyclonic
Sample introduction	MEINHARD® Nebulizer
Radio frequency (RF) power	1300 W
Plasma Ar flow	18 L/min ⁻¹
Nebulizer Ar flow	1.04 L/min ⁻¹
Auxiliary Ar flow	1.20 L/min ⁻¹
Mode	KED, DRC
Cones	Nickel

2.8. Statistinė analizė

Gautų eksperimentinių duomenų statistinei analizei atlikti buvo naudojama programinė įranga „SigmaPlot 14.0“ (Systat Software, San Jose, JAV). Koreliacinė analizė, apskaičiuojama naudojant programinę įrangą „Microsoft Office Excel 2010“ (Microsoft Corporation). Eksperimentai buvo kartojami mažiausiai tris kartus. Visi duomenys pateikiami kaip vidutinės reikšmės ± standartinis paklaidos nuokrypis. Rezultatai analizuojami naudojant vienos krypties dispersijos analizę (ANOVA), taikytas *Holm-Sidak* testas. Laikoma, kad duomenys statistiškai reikšmingi kai $p < 0,05$.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

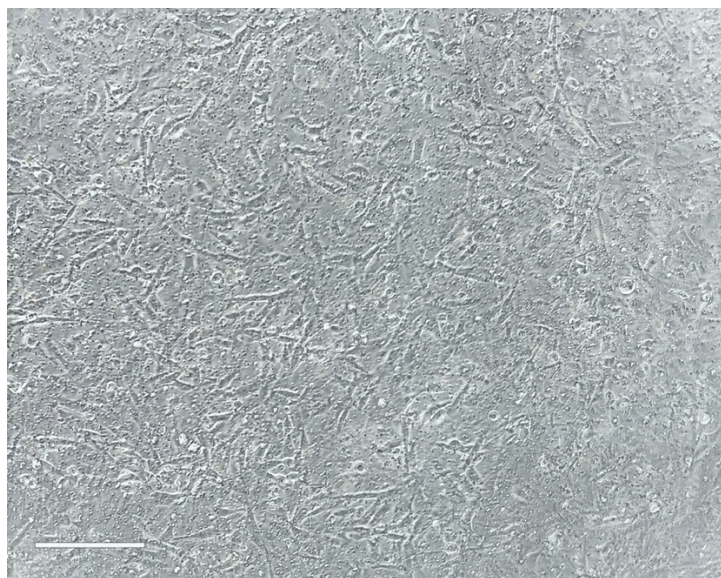
3.1. Žarnyno barjero modelio formavimas *in vitro*

Žarnyno modelio *in vitro* kūrimo metu, pirmiausia buvo parinktos tinkamiausios kultivavimo sąlygos. Siekiant sukurti optimalų vientiso žarnyno barjerą *in vitro*, buvo naudojami skirtingų membranų kultūriniai įdėklai, ląstelių užsodinimo metodai ir ląstelių kiekis suspensijoje.

Naudojant dviejų skirtingų rūšių membraninius įdėklus – 0.4 μm diametro „Biopore“ PTFE (politetrafluoretileno) membrana ir 3 μm diametro „Falcon®“ skaidri PET (polietileno tereftalato) membrana, pastebėta, kad ant PTFE membranos HCEC-1CT ląstelės neauga ir neprisisitvirtina prie paviršiaus tik susilieja į sankaupą membraninio įdėklo centre. Dėl šios priežasties, nuspręsta žarnyno modelį *in vitro* formuoti ant 3 μm diametro „Falcon®“ membraninių įdėklu su skaidria PET membrana.

Siekiant užtikrinti tolygų ląstelių pasiskirstymą ir suaugimą ant membraninio įdėklo paviršiaus buvo naudota skirtinga ląstelių užsodinimo metodika. Formuojant barjero modelį, pasirinktas metodas užtikrino tolygų ląstelių pasiskirstymą ant membraninio įdėklo paviršiaus. Šiuo metodu, pirma, ant kultūrinio įdėklo paviršiaus pasodinama ląstelių suspensija, antra, į šulinėlio lėkštelės dugną pridedama mitybinė terpė, kuri suformuoja biologinį barjerą tarp viršūninio (apikalinio) ir apatinio (bazolateralinio) sluoksnio.

Formuojant žarnyno modelį *in vitro*, buvo naudota skirtinga ląstelių kiekio koncentracija suspensijoje. Pastebėta, jog formuojant modelį *in vitro* su 250 000 ląst / ml pasiekiamas optimalus barjero vientisumas (žr. 13 pav.).



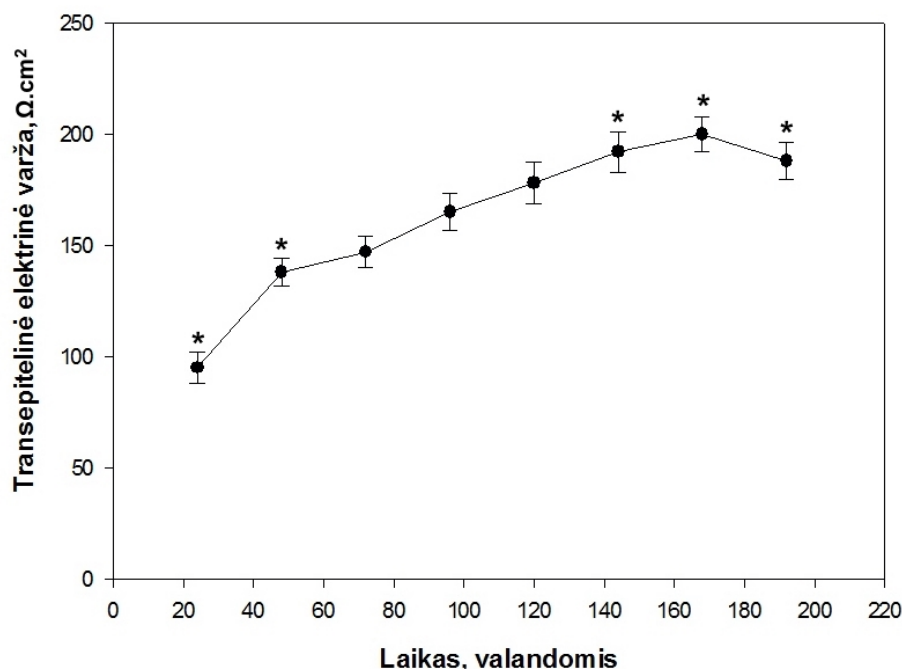
13 pav. Žarnyno epitelio barjeras *in vitro*. Nuotrauka daryta šviesiniu mikroskopu Leica Microsystems, nustačius 40x padidinimo funkciją. Skalė – 50 μm

3.1.1. Transepitelinės varžos vertinimas

Siekiant įvertinti susidariusio žarnyno barjero integralumą ir sandariųjų jungčių vientisumą, matuojama transepitelinė elektrinė varža. Transepitelinės elektrinės varžos matavimai, suteikia informaciją apie susiformavusių ląstelių vienasluoksnio tolygumą ant membranos paviršiaus ir tarp

poliarizuotų elementų susiformavusių sandarių plyšinių jungčių vientisumą. Kai tarp ląstelių susidaro funkcinės sandarios glaudžiosios jungtys, fiksuojamos didesnės TEER vertės.

TEER matavimai buvo atliekami 8 dienas, kas 24 val., po 3 kartus skirtingose kultūrinių įdėklų vietose, naudojant nešiojamą voltmetrą „*Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter*“.



14 pav. Žarnyno modelio *in vitro* transepitelinės elektrinės varžos matavimai. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. * – žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su ankstesnio laikotarpio matavimu

Transepitelinės elektrinės varžos reikšmės nuosekliai didėjo kiekvieną dieną po ląstelių kultūros užsodinimo (žr. 14 pav.). Praėjus pirmoms 24 val. (1 dienai) po užsėjimo nustatyta TEER varža siekė $95 \pm 6,89 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Žarnyno barjeras sudarydamas sandariąsias glaudžiasias ir plyšines jungtis susiformavo praėjus 120–188 val. (5–7 dienoms) po ląstelių kultūros užsėjimo ant membraninių įdėklų.

Susiformavus glaudžiosioms ir plyšinėms jungtims tarp HCEC-1CT ląstelių, TEER varžos matavimai padidėjo ir pasiekė maksimalias vertes – $178 \pm 9,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ šeštą kultūros dieną ir $200 \pm 7,58 \Omega \cdot \text{cm}^2$ septintą kultūros dieną. TEER vertės susidariusiame vienasluoksnyje pradėjo mažėti po maksimaliausios vertės pasiekimo, apie 8 dieną.

Gauti rezultatai atskleidžia, kad susiformavęs žarnyno barjeras *in vitro* yra vientisas ir išlaiko barjerinę funkciją 5–7 kultūros dieną. Šie duomenys yra panašūs į atliktus tyrimus, kai formuojant žarnyno modelį *in vitro* gauta optimali TEER reikšmė užtikrinanti barjero vientisumą pasiekė – $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ [97].

Nustačius, kad TEER reikšmės didžiausią vertę pasiekia 5–7 dieną po ląstelių pasodinimo ant kultūrinių įdėklų, nuspręsta, tolimesniems pernašos per barjerą tyrimams pasitelkti susiformavusį 5–7 dienos modelį.

3.2. Elektrolitų tirpalų koncentracijų nustatymas

Siekiant ištirti perėjusių tirpalų koncentracijas per sukurtą žarnyno barjerą *in vitro*, visų pirma, buvo nustatytos elektrolitų koncentracijos tirpaluose naudojant induktyviai susietos plazmos masių spektrometrą su analizatoriumi *ICP-MS NexION 300D*. Duomenys pateikiami 5, 6, 7 lentelėse.

5 lentelė. Makroelementų koncentracijos grynuose elektrolitų tirpaluose g / l

Elektrolitų tirpalai	Makroelementų koncentracijos elektrolitų tirpaluose (g / l)			
	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺
P4 (0,2 g / l)	0,65±0,03	0,21±0,02	0,06±0,01	9,65±0,53
5P (0,7 g / l)	0,66±0,03	0,19±0,01	0,06±0,01	9,68±0,60
1P (1,0 g / l)	0,67±0,04	0,34±0,03	0,07±0,01	10,29±0,36
P5 (1,2 g / l)	0,66±0,02	0,27±0,03	0,07±0,02	10,45±0,42
P1 (1,6 g / l)	0,71±0,03	0,24±0,02	0,08±0,02	10,59±0,25
2P (2,0 g / l)	0,68±0,02	0,30±0,2	0,12±0,02	10,93±0,39
P2 (3,0 g / l)	0,70±0,03	0,27±0,02	0,10±0,01	11,01±0,33
3P (13,0 g / l)	0,72±0,04	0,65±0,06	0,33±0,03	12,08±0,41
P3 (15,0 g / l)	0,68±0,02	0,52±0,03	0,27±0,02	12,24±0,64

6 lentelė. Makroelementų koncentracijos ląstelių mitybinėje terpėje g / l

Makroelementų koncentracijos ląstelių mitybinėje terpėje (g / l)			
K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺
0,37±0,05	0,07±0,05	0,04±0,1	3,49±0,26

7 lentelė. Makroelementų koncentracijos elektrolitų ir terpės 1:4 tirpaluose g / l

Elektrolitų tirpalai	Makroelementų koncentracijos (g / l) 1:4 (terpės) santykio tirpale			
	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺
P4 (0,2 g / l)	0,47±0,02	0,14±0,02	0,04±0,01	6,47±0,61
5P (0,7 g / l)	0,48±0,01	0,12±0,02	0,04±0,01	6,50±0,35
1P (1,0 g / l)	0,49±0,03	0,27±0,04	0,05±0,01	7,11±0,76
P5 (1,2 g / l)	0,48±0,03	0,20±0,03	0,05±0,01	7,26±0,63
P1 (1,6 g / l)	0,52±0,03	0,17±0,01	0,06±0,01	7,40±0,40
2P (2,0 g / l)	0,49±0,02	0,23±0,03	0,10±0,02	7,75±0,79
P2 (3,0 g / l)	0,51±0,02	0,20±0,02	0,08±0,01	7,83±0,42
3P (13,0 g / l)	0,54±0,03	0,58±0,05	0,31±0,03	8,90±0,66
P3 (15,0 g / l)	0,49±0,02	0,45±0,03	0,25±0,02	9,05±0,36

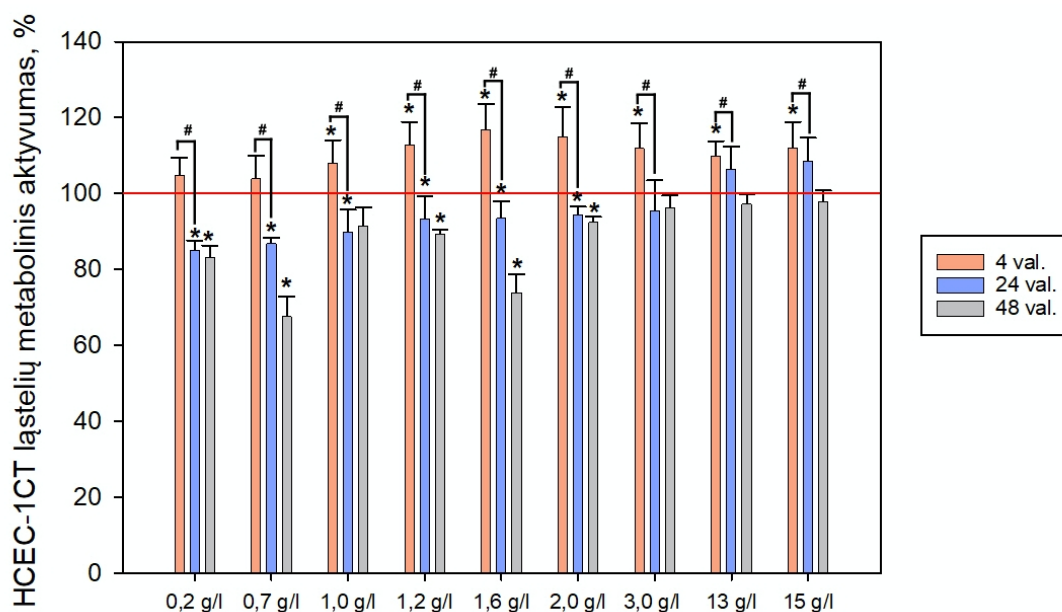
Atlikus skirtingų elektrolitų tirpalų analizę su *ICP-MS NexION 300D* masių spektrometru, nustatytos didžiausios natrio jonų (Na⁺) ir mažiausios magnio jonų (Mg²⁺) koncentracijos tirpaluose.

Išanalizavus ląstelių mitybinės terpės koncentraciją (žr. 6 lentelė), nustatytos 3–4 kartus mažesnės koncentracijos lyginant su tiriamaisiais elektrolitų tirpalais (žr. 5 lentelė). Elektrolitų poveikio ir absorbcijos tyrimams visi devyni tiriamieji elektrolitų tirpalai, buvo praskiedžiami santykiu 1 dalis elektrolitų ir 4 dalys ląstelių mitybinės terpės. Nustatytos terpės ir elektrolitų 1:4 koncentracijos buvo 2–3 kartus didesnės lyginant su ląstelių mitybine terpe (žr. 7 lentelė), tačiau žymiai mažesnės lyginant su grynomis elektrolitų tirpalų koncentracijomis (žr. 5 lentelė).

Nustačius elektrolitų tirpalų koncentracijas, tolimesniuose tyrimuose elektrolitų tirpalai toliau įvardijami kaip – mažos (0,2 g / l, 0,7 g / l, 1,0 g / l) vidutinės (1,2 g / l, 1,6 g / l, 2,0 g / l, 3,0 g / l) ir didelės (13,0 g / l, 15,0 g / l) koncentracijos tirpalai.

3.3. Elektrolitų tirpalų tiesioginis poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui

Siekiant įvertinti elektrolitų tirpalų tiesioginį poveikį HCEC-1CT ląstelių metaboliniam aktyvumui, ląstelės buvo paveiktos 9 skirtingais elektrolitų tirpalais tirpalo:terpės santykiu 1:4, ir matuojant PrestoBlue dažo skilimo produkto fluorescencijos intensyvumą po 4, 24 ir 48 valandų inkubacijos periodo.



15 pav. Elektrolitų tirpalų poveikis HCEC-1CT ląstelių metaboliniam aktyvumui, po 4, 24 ir 48 valandų.

Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. Tiriamų mėginių vertės buvo normalizuotos pagal nepaveiktą kontrolę prilyginant ją – 100 proc. (raudona linija). * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$. # – patikimumą lyginant su 4 ir 24 val. poveikiu, kai $p < 0,001$

Elektrolitų tirpalų poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui pavaizduotas 15 paveiksle. Pavaizduotame grafike matyti, kad skirtingos koncentracijos tirpalai turėjo nevienodą poveikį HCEC-1CT ląstelių metaboliniam aktyvumui. Mažos koncentracijos elektrolitų tirpalai (0,2 g / l, 0,7 g / l, 1,0 g / l), po 4 val. poveikio lyginant su kontrole neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių metaboliniam aktyvumui, tačiau po 24 valandų žymiai sumažino medžiagų apykaitos aktyvumą (14, 15 ir 8 proc.), ir šis poveikis išliko po 48 valandų (17, 33 ir 13 proc.).

Vidutinės ir didelės koncentracijos elektrolitų tirpalai po 4 valandų poveikio reikšmingai padidino HCEC-1CT ląstelių metabolinį aktyvumą. Vidutinės koncentracijos tirpaluose (1,2 g / l, 1,6 g / l)

ląstelių gyvybingumas lyginant su kontrole padidėjo (13 ir 17 proc.), po 24 valandų medžiagų apykaitos aktyvumas žymiai sumažėjo (10 ir 7 proc.). Poveikis išliko ir po 48 val. trukmės inkubavimo su 1,2 g/l, 1,6 g/l elektrolitų tirpalais – metabolinis aktyvumas sumažėjo (11 ir 26 proc.).

Paveikus ląsteles 2,0 g/l ir 3,0 g/l elektrolitų tirpalais, po 4 val., ląstelių metabolinis aktyvumas padidėjo (15 ir 12 proc.). Praėjus 24 ir 48 val. po poveikio 2,0 g/l elektrolitų tirpalu pastebimas statistiškai reikšmingas aktyvumo sumažėjimas (6 ir 8 proc.), tačiau po ilgesnio 48 val. poveikio, 3,0 g/l elektrolitų tirpalu, šis poveikis nebuvo nustatytas.

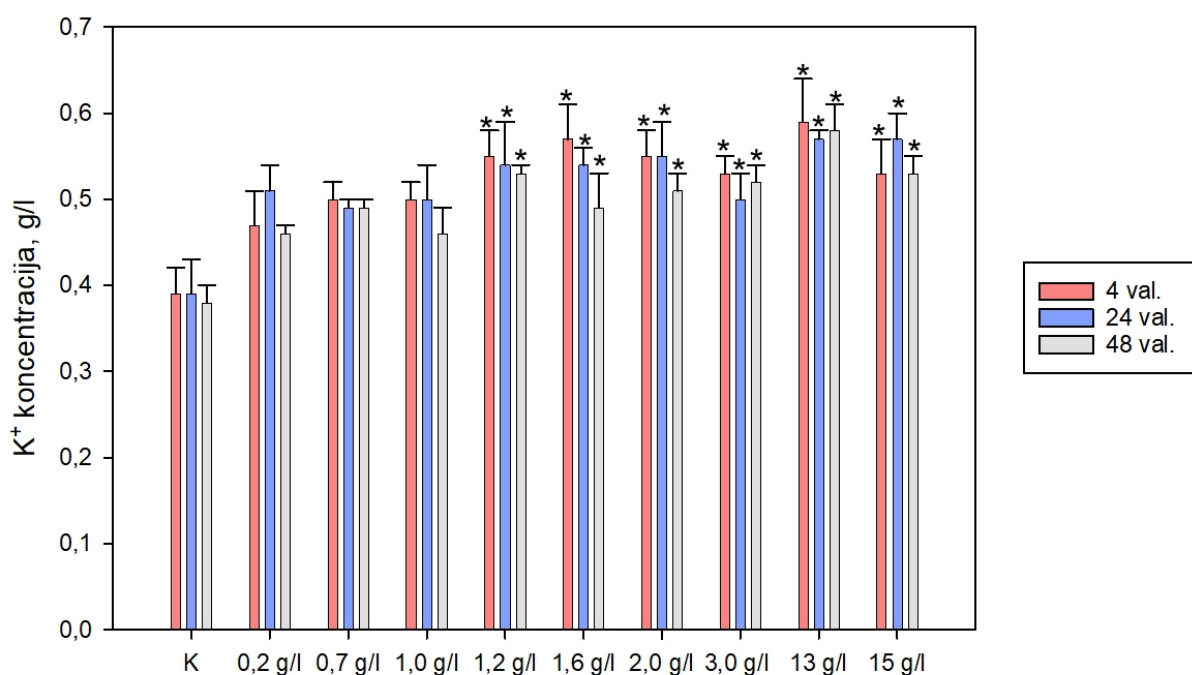
Paveikus didelės koncentracijos elektrolitų tirpalais (13 g/l ir 15 g/l) pastebimas (10 ir 12 procentų) padidėjimas po 4 valandų poveikimo. Nustatyta, kad didelės koncentracijos (15 g/l, 13 g/l, 3 g/l) elektrolitų tirpalai padidino medžiagų apykaitos aktyvumą tiek po 24, tiek po 48 valandų.

Visais elektrolitų tirpalais veikiamuose pavyzdžiuose po 4 val. užfiksuotas statistiškai reikšmingai didesnis metabolinis aktyvumas lyginant su išmatuotu po 24 val. ($p > 0,001$).

3.3.1. Elektrolitų tirpalų koncentracijos kitimas laiko bėgyje kultivuojamų HCEC-1CT ląstelių terpėje

Ląstelių membranos sudaro atrankiai laidų užtvaramą, barjerą, leidžiantį pro membraną laisvai prasiskverbti tik mažoms nepolinėms medžiagų molekulėms. Medžiagų pernašos sistemos esančios savitos plazminės ir ląstelės vidaus membranose valdo medžiagų mainus su aplinka vidiniuose erdvės skyriuose. Tokiu būdu, ląstelės gauna reikalingas medžiagas bei užtikrina šalinimą apykaitos produktų [102].

Vertinant HCEC-1CT ląstelių sąlygojamą elektrolitų apykaitą, buvo tiriami elektrolitų koncentracijų pokyčiai šulinėliuose po 4, 24, 48 valandų. Pastebėti koncentracijos pokyčiai pavaizduoti 16, 17, 18, 19 paveiksluose.



16 pav. Kalio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, $n=3$. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$

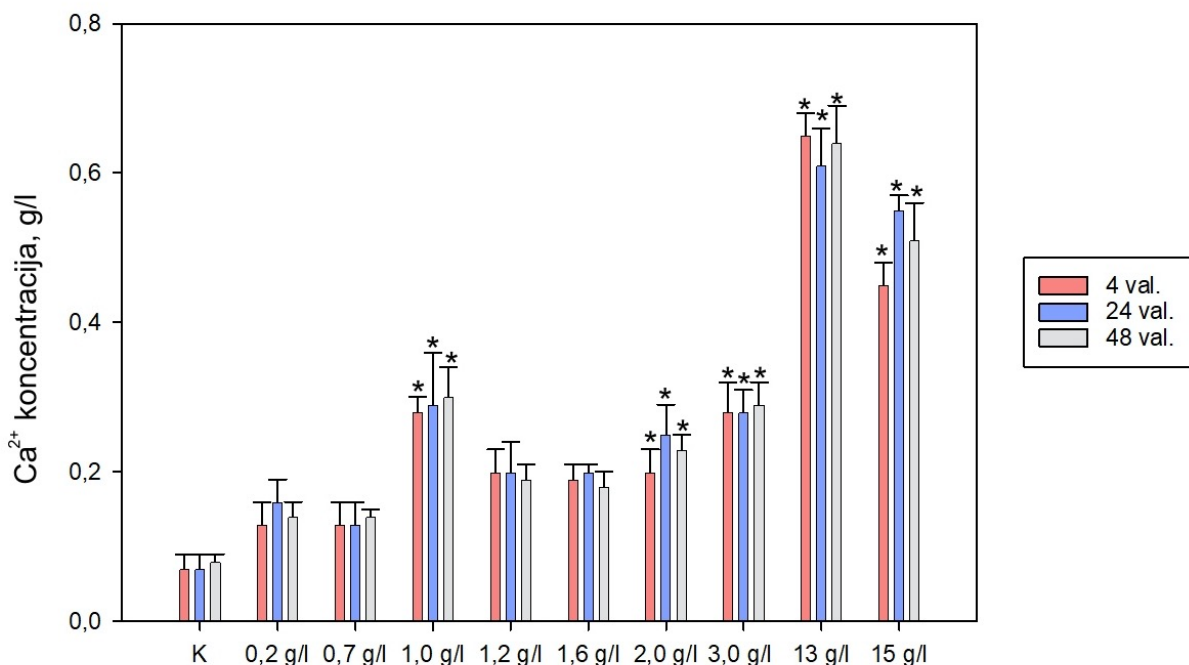
Kalio jonų koncentracijos pokyčiai po 4, 24, 48 val. HCEC-1CT ląstelių paveikimo elektrolitų tirpalais pateikiami diagramoje (žr. 16 pav.). Gautuose rezultatuose matyti, kad priklausomai nuo tirpale esančios koncentracijos visuose 9 tiriamuose pavyzdžiuose kalio jonų kiekis padidėjo lyginant su neveikta kontrole.

Pastebėta, kad statistiškai reikšmingi padidėjimai fiksuojami didesnės koncentracijos elektrolitų tirpaluose. Praėjus 24 valandoms po paveikimo tirpalais, visuose mėginiuose koncentracijos sumažėjo.

Paveikus elektrolitų tirpalais, K^+ jonų koncentracija padidėja užląstelinėje terpėje, todėl sumažėja K^+ koncentracijos gradientas mažėja. Šiuo atveju mažiau K^+ jonų difunduoja į ląstelės išorę, ir membranos potencialas pasidaro mažiau neigiamas, todėl vidutinės koncentracijos elektrolitų tirpaluose pastebimas elektrolitų kiekio sumažėjimas lyginant tarp grupių 4 val. pradinės ir 48 valandų koncentracijos galutinės.

Galima pastebėti, kad didelės, vidutinės ir mažos koncentracijos elektrolitų tirpaluose kalio kiekis lyginant tarp paveikimo laikotarpių palaikė koncentracijos gradientą, judėjo iš didesnės koncentracijos mažesnės link ir po 48 val. pasiekė įvedamų elektrolitų koncentraciją – sudarydami K^+ pusiausvyros potencialą abipus membranų.

Vertinant kalcio jonų koncentracijų pokyčius paveikus ląsteles elektrolitų tirpalais nustatytas statistiškai reikšmingas padidėjimas lyginant su kontrole mažos 1,0 g/l, vidutinės 2,0 g / l, 3,0 g / l ir didelės 13 g / l, 15 g / l mineralizacijos mėginiuose (žr. 17 pav.). Esant koncentracijų skirtumui, tarp membranų, Ca^{2+} jonai juda iš ląstelės vidaus į jos išorę, pagal koncentracijos gradientą.

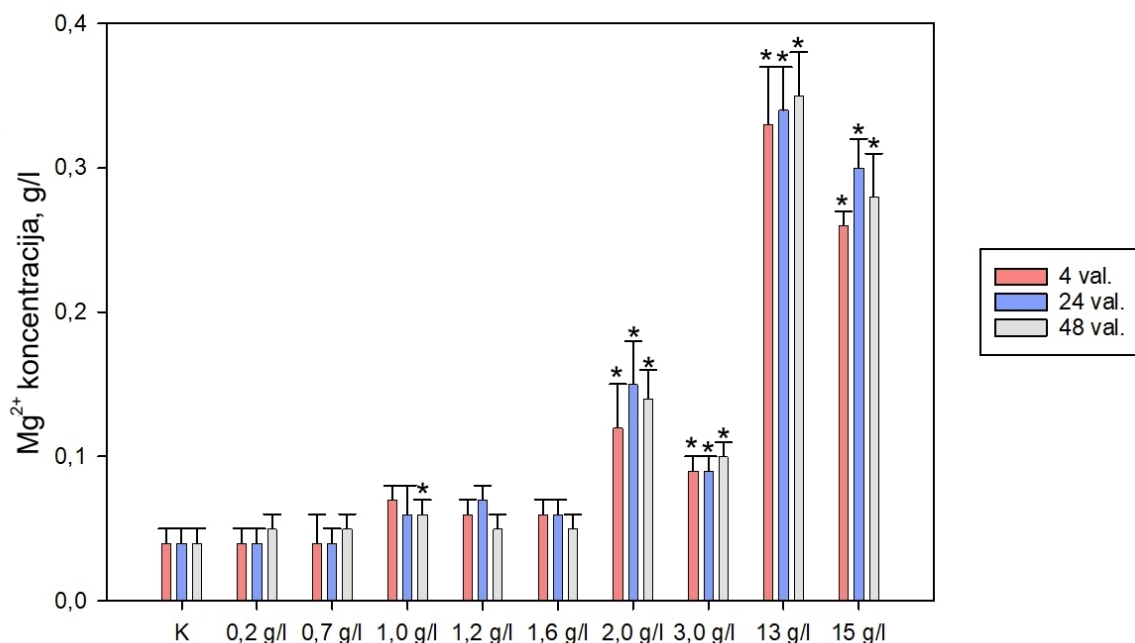


17 pav. Kalcio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$

Atlikus Mg^{2+} analizę terpėje, paimtoje nuo ląstelių, nustatyta, kad mažos koncentracijos elektrolitų tirpalai neturėjo didelio pokyčio lyginant su kontrole po 4, 24 ir 48 valandų (žr. 18 pav.). Tačiau po

inkubavimo su didesnės ir vidutinės koncentracijos tirpalais Mg^{2+} jonų koncentracija statistiškai reikšmingai padidėjo lyginant su kontrole.

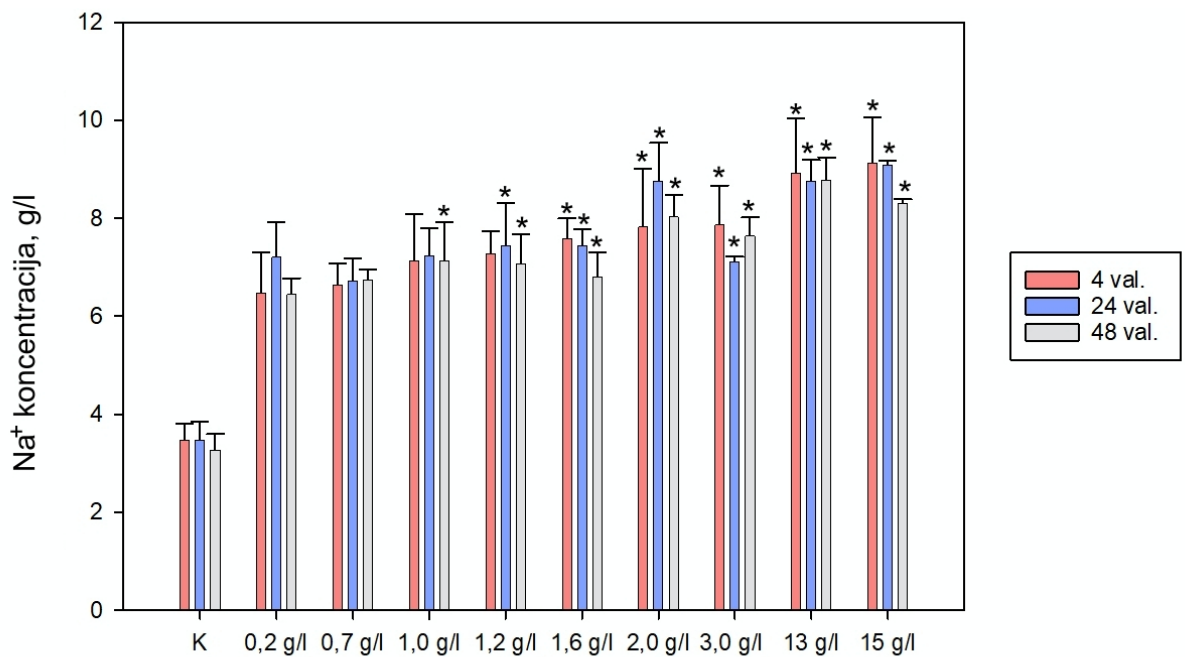
Nežymūs magnio jonų pokyčiai lyginant tarp 4 ir 24 valandų pastebimi – 15 g/l mėginiuose, toks pat koncentracijų pokytis nustatytas ir su kalcio jonais, kai iš pradžių žymiai padidėjo, o vėliau sumažėjo. Nustatyta, kad po 48 val. poveikio Mg^{2+} jonų koncentracijos pasiekė balansą tarp įvestos pradinės ir galutinės koncentracijos.



18 pav. Magnio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$

Vertinant natrio jonų pokyčius, svarbu paminėti, kad ląstelės membrana, esanti ramybės būsenos, yra labai mažai laidi Na^+ jonams [15]. Analizuojant natrio jonų koncentracijas, nustatyti statistiškai reikšmingi pokyčiai vidutinės ir didelės koncentracijos elektrolitų tirpaluose lyginant su kontrole (žr. 19 pav.). Mažos koncentracijos tirpaluose (0,2 g/l, 0,7 g/l) galima pastebėti Na^+ jonų padidėjimą po 24 valandų, tačiau galutinės koncentracijos išsilygino po 48 val. pasiekdamos membraninį potencialą.

Natrio jonų pokyčiai pastebimi po 24 valandų poveikimo vidutinės ir didelės koncentracijos elektrolitų tirpalais, koncentracijos reikšmingai sumažėjo, išskyrus 2,0 g/l, kuriame galima pastebėti padidėjimą (žr. 19 pav.). Praėjus 48 val. visuose elektrolitų tirpaluose koncentracijos padidėjusios ar sumažėjusios koncentracijos atitinkamai pasiekė įvestų natrio jonų kiekius.



19 pav. Natrio jonų koncentracijos pokyčiai 4, 24, 48 val., paveikus HCEC-1CT ląsteles elektrolitų tirpalais. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$

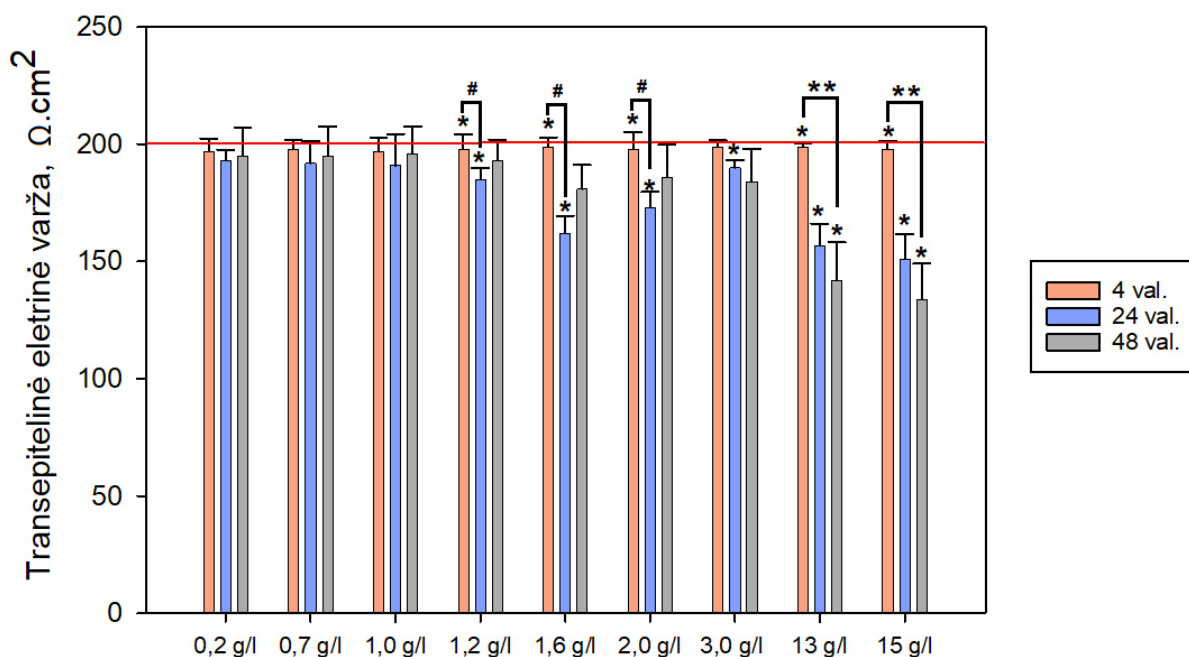
Atlikus elektrolitų vertinimo pokyčius po 4, 24 ir 48 valandų nustatyta, kad ląstelių gebėjimas sukaupti Ca^{2+} ir Mg^{2+} atsispindi stebėtuose pokyčiuose – iki vidutinės koncentracijos, imtinai divalenčių jonų koncentracija palaikoma stabili, o esant didelei koncentracijai – šis palaikymas jau tampa nebeefektyvus.

3.4. Žarnyno modelio *in vitro* pritaikymas elektrolitų tyrimams

3.4.1. Transepitelinės elektrinės varžos vertinimas modelį paveikus elektrolitų tirpalais

Siekiant nustatyti, elektrolitų tirpalų poveikį susiformavusiam žarnyno barjerui *in vitro*, buvo atlikti transepitelinės elektrinės varžos matavimai.

Matavimai buvo atlikti kas 4, 24 ir 48 valandas, po 3 kartus skirtingose kultūrinių įdėklų vietose, pasitelkus nešiojamą voltmetrą „Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter“.



20 pav. Elektrolitų tirpalų poveikis žarnyno barjero transepitelinės elektrinės varžos pokyčiams, po 4, 24 ir 48 valandų. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. Tiriamų mėginių vertės buvo normalizuotos pagal nepaveiktą kontrolę prilyginant ją – 200 Ω·cm² (raudona linija). * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai p < 0,05. ** – žymi statistinį patikimumą lyginant su 4 ir 48 val. poveikiu, kai p < 0,01. # – patikimumą lyginant su 4 ir 24 val. poveikiu, kai p < 0,005

Iš pateiktų duomenų matyti, kad mažai mineralizuoti elektrolitų tirpalai (0,2 g / l, 0,7 g / l, 1,0 g / l) lyginant su kontrole, po 4, 24 ir 48 valandų poveikio neturėjo reikšmingos įtakos suformuoto žarnyno barjero integralumui, TEER vertės reikšmingai nepakito (žr. 20 pav.). Mažos koncentracijos tirpalai, po 24 valandų poveikio nežymiai sumažėjo lyginant su kontrole, tačiau po 48 val. pastebimas minimalus transepitelinės elektrinės varžos padidėjimas.

Vidutinės koncentracijos elektrolitų tirpalai (1,6 g / l, 2 g/l) lyginant su kontrole, po 4 ir 24 valandų poveikio žymiai sumažino transepitelinės elektrinės varžos reikšmes. Paveikus 1,2 g / l ir 1,6 g / l elektrolitų tirpalais pastebimas statistiškai reikšmingas TEER sumažėjimas (5,5 proc.) ir (16,5 proc.) tarp 4 ir 24 valandų poveikio (p < 0,005).

Paveikus vidutinės koncentracijos 2 g / l elektrolitų tirpalų lyginant su kontrole pastebimas statistiškai reikšmingas TEER vertės sumažėjimas (2 proc.) po 4 valandų ir (13,5 proc.) po 24 valandų poveikio. Palyginus 4 ir 24 val. duomenis, nustatyta, kad sumažėjimas statistiškai reikšmingas (p < 0,005). Po 48 val. vidutinėmis koncentracijomis paveiktame žarnyno barjero modelyje, galima pastebėti statistiškai nereikšmingas TEER vertės padidėjimas. Paveikus 3,0 g / l elektrolitų tirpalu pastebimas statistiškai reikšmingas TEER vertės sumažėjimas tik po 24 val.

Didelės koncentracijos elektrolitų tirpalai, sukėlė reikšmingą nuo laiko priklausančią transepitelinio elektrinio pasipriešinimo sumažėjimą, o mažiausios vertės buvo nustatyta po 48 val. poveikio lyginant su kontrole, 13 g/l ir 15 g/l elektrolitų tirpalai po 24 valandų sumažėjo (21,5 proc. ir 24,5 proc.). Lyginant tarp 4 ir 48 valandų poveikimo elektrolitų tirpalais, nustatyti statistiškai reikšmingi duomenys, TEER vertės sumažėjo (29 proc.) ir (33 proc.) (p < 0,01).

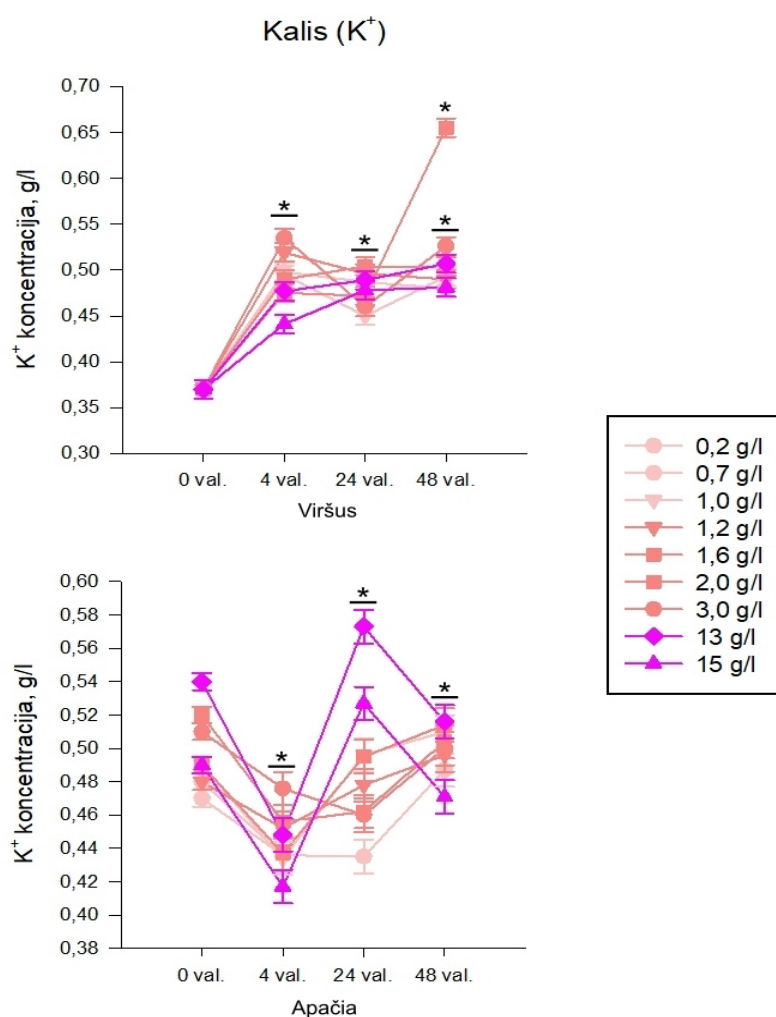
Žymiai sumažėjusios transepitelinės elektrinės varžos reikšmės parodo, kad padidėjo barjero pralaidumas, didesnės koncentracijos tirpalai, sumažino plyšinių jungčių vientisumą ir praėjo pro

žarnyno barjero glaudžiausias jungtis. TEER koreliuoja su laisvu jonų ir ištirpusių medžiagų judėjimu per epitelį. Iš gautų rezultatų, matyti, kad didžiausias TEER sumažėjimas po 4, 24 ir 48 val. nustatytas didžiausios koncentracijos elektrolitų tirpaluose. Vidutinės koncentracijos tirpalai pasižymėjo statistiškai reikšmingu sumažėjimu po 24 val. Mažos mineralizacijos elektrolitų tirpaluose statistinis patikimumas nenustatytas.

3.4.2. Elektrolitų pernaša per barjerą

Suformavus vientisą barjerą su glaudžiosiomis ir plyšinėmis jungtimis, siekiant įvertinti sukurto žarnyno modelio rezorbciją buvo išmatuotos įvedamos ir per barjerą perėjusios elektrolitų koncentracijos, naudojant plazmos masių spektrometrą su analizatoriumi *ICP-MS NexION 300D*.

Žarnyno modelis *in vitro* buvo paveiktas 9 skirtingais elektrolitų tirpalais, juos pridėdam į barjero viršutinę pusę, atitinkančią žarnyno vidų, o apatinėje paliekant mitybinę ląstelių terpę. Elektrolitų koncentracijos pokyčiai matuojami po, 4, 24 ir 48 valandų. 0 val. – žymi pradines koncentracijas nustatytas viršutiniame elektrolitais paveiktame ir apatiniame tik ląstelių mitybinę terpę turinčiame skyriuje. Kiekvieno įvesto elektrolitų tirpalo elementų koncentracijos vertinamos atskirai, siekiant nustatyti skirtingų koncentracijų poveikį elektrolitų pernašai *in vitro*. Paveikus elektrolitų tirpalais, susidaro jonų koncentracijos skirtumai abipus epitelio ląstelių membranų.

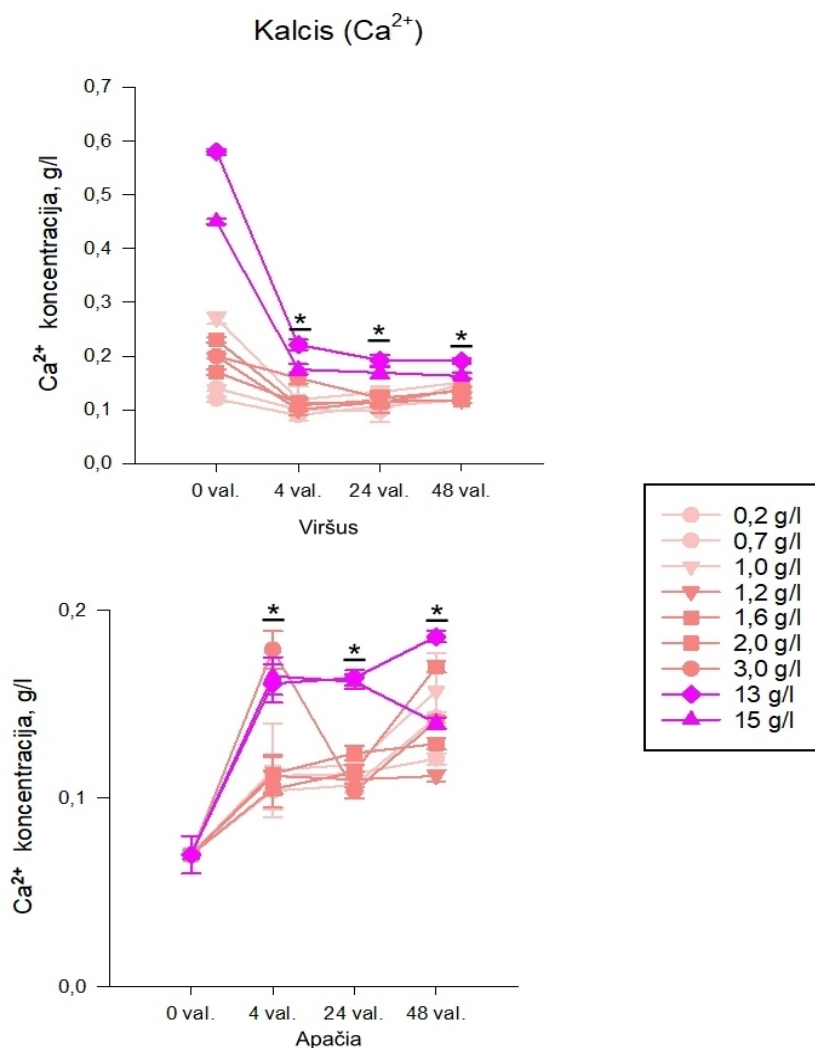


21 pav. Kalio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 valandoms paveikus elektrolitų tirpalais. 0 – žymi pradines koncentracijas. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai p < 0,05

Paveikus žarnyno modelį *in vitro* mažos mineralizacijos (0,2 g / l, 0,7 g / l, 1,0 g / l) elektrolitų tirpalais nustatyta, kad jonų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus keitėsi priklausomai nuo laiko ir koncentracijos esančios elektrolitų tirpale (žr. 21 pav.). Nustatytas pradinis kalio jonų santykio vidurkis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus – 1,3. Kalio jonai, po paveikimo juda pagal koncentracijos gradientą iš didesnės koncentracijos mažesnės link, pereidami per sukurto modelio barjerą iš viršutinio skyriaus į apatinį. Praėjus 4 val. statistiškai reikšmingi koncentracijos pokyčiai nustatyti apatiniame ir viršutiniame skyriuje lyginant su kontrole, stebimi panašūs kalio jonų koncentracijos kiekiai ir po 24 val. Pažymėtina, kad praėjus 48 val. po paveikimo, nustatytas aktyvus ląstelių darbas pernešant K^+ jonus prieš koncentracijos gradientą iš apatinio, į viršutinį skyrių, difuzija pro joninius ląstelės membranos kanalus (poras), taip panaikinant abipusį membraninį potencialų skirtumą ir pasiekiant galutinį koncentracijų santykį lygų – 1.

Paveikus sukurtą žarnyno modelį, vidutinės koncentracijos (1,2 g / l, 1,6 g / l, 2,0 g / l, 3,0 g / l) elektrolitų tirpalu, pastebimas abipus membranų koncentracijos potencialo sumažėjimas priklausantis nuo laiko (žr. 21 pav.). Pradinis kalio jonų koncentracijų vidurkis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus – 1,4. Kalio jonai, po paveikimo per barjerą juda pagal koncentracijos gradientą, praėjus 4 valandoms lyginant su kontrole, pastebimi statistiškai reikšmingi viršutiniame skyriuje koncentracijos sumažėjimai, apatiniame – padidėjimai. Po 24 ir 48 val. jonų santykis abipus membranų pasiekė panašias reikšmes, žarnyno barjeras rezorbavo kalio jonus iš apatinio skyriaus į viršutinį, taip pasiekiant koncentracijos balanso santykį lygų – 1.

Paveikus žarnyno barjerą didelės koncentracijos tirpalais (13,0 g / l, 15,0 g / l), pastebimi statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrole. Pradinis kalio jonų koncentracijos santykis didelės koncentracijos tirpaluose – 1,5. Susidaręs kalio jonų koncentracijų membraninis potencialas abipus membranų paskatina jonus judėti koncentracijos gradiento link. Praėjus 4 val. nustatytas statistiškai reikšmingas padidėjimas apatiniame ir sumažėjimas viršutiniame skyriuose, tačiau po 24 val. užfiksuotas statistiškai reikšmingas padidėjimas, kai kalis buvo pernešamas prieš koncentracijos gradientą ir apatinio į viršutinį skyrių. Žarnyno ląstelės aktyviai rezorbavo kalio jonus ir pernešė per barjerą į viršutinį skyrių. Po 48 val. pastebimas abipus membranų koncentracijos skirtumų sumažėjimas, nustatytas galutinis santykis tarp skyrių lygus – 1.



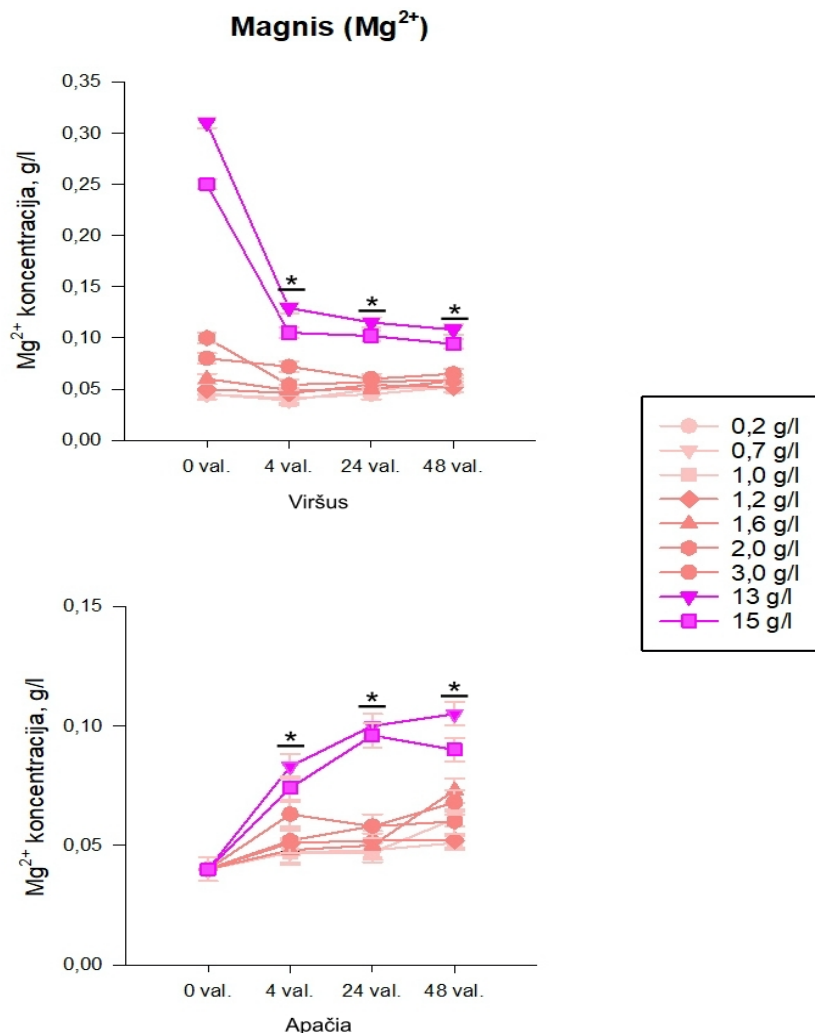
22 pav. Kalcio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 valandoms paveikus elektrolitų tirpalais. 0 – žymi pradines koncentracijas. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$

Paveikus žarnyno modelį *in vitro* mažos mineralizacijos (0,2 g/l, 0,7 g/l, 1,0 g/l) elektrolitų tirpalais nustatyta, kad jonų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus keitėsi priklausomai nuo laiko ir koncentracijos esančios elektrolitų tirpale (žr. 22 pav.). Pradinis kalcio koncentracijų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus lygus – 2,5. Paveikus, kalcio koncentracijos taip pat kaip ir kalio judėjo pagal koncentracijos gradientą iš viršaus didesnės koncentracijos, mažesnės link į apatinį skyrių. Praėjus 4 ir 24 val. kalio jonų koncentracija apatiniame (bazolateriniame) sluoksnyje nustatyta didesnė nei viršutiniame, tačiau po 48 val. prieš koncentracijos gradientą perėjo per žarnyno barjerą ir sumažino koncentracijų skirtumą tarp skyrių. Nustatytos galutinių koncentracijų santykis lygus – 1.

Siekiant įvertinti vidutinės koncentracijos (1,2 g/l, 1,6 g/l, 2,0 g/l, 3,0 g/l) elektrolitų tirpalų pokyčius per barjerą, nustatytas pradinis skirtumų santykis – 2,5. Jonai, kaip ir kalio pernašos metu, juda koncentracijos gradiento kryptimi didesnės koncentracijos link. Praėjus 4 ir 24 val. abipus membranų esantis koncentracijų skirtumas sumažėja, tačiau po 48 val. pastebimas statistiškai reikšmingas lyginant su kontrole, apatiniame skyriuje esančių kalio jonų padidėjimas. Galutinis koncentracijos santykis lygus – 1.

Paveikus didelės koncentracijos (13,0 g/l, 15,0 g/l) elektrolitų tirpalais, kalcio ir magnio jonų perėjimas per barjerą vizualiai histogramoje atrodo panašus. Nustatyti pradiniai koncentracijų

santykiai kalcio jonuose – 7,75. Kalcio jonai difundavo ir perėjo žarnyno barjerą, iš viršutinio į apatinį skyrių. Praėjus 4, 24 val. nustatyti statistiškai reikšmingi duomenys lyginant su kontrole, viršutiniame skyriuje esančių jonų padidėjimas, apatiniame skyriuje esančių jonų sumažėjimas. Praėjus 48 val. kalio jonų koncentracijos abipus membranų pasiekė vienodą kiekį, nustatyti galutiniai santykiai abijuose jonų koncentracijose lygūs – 1.

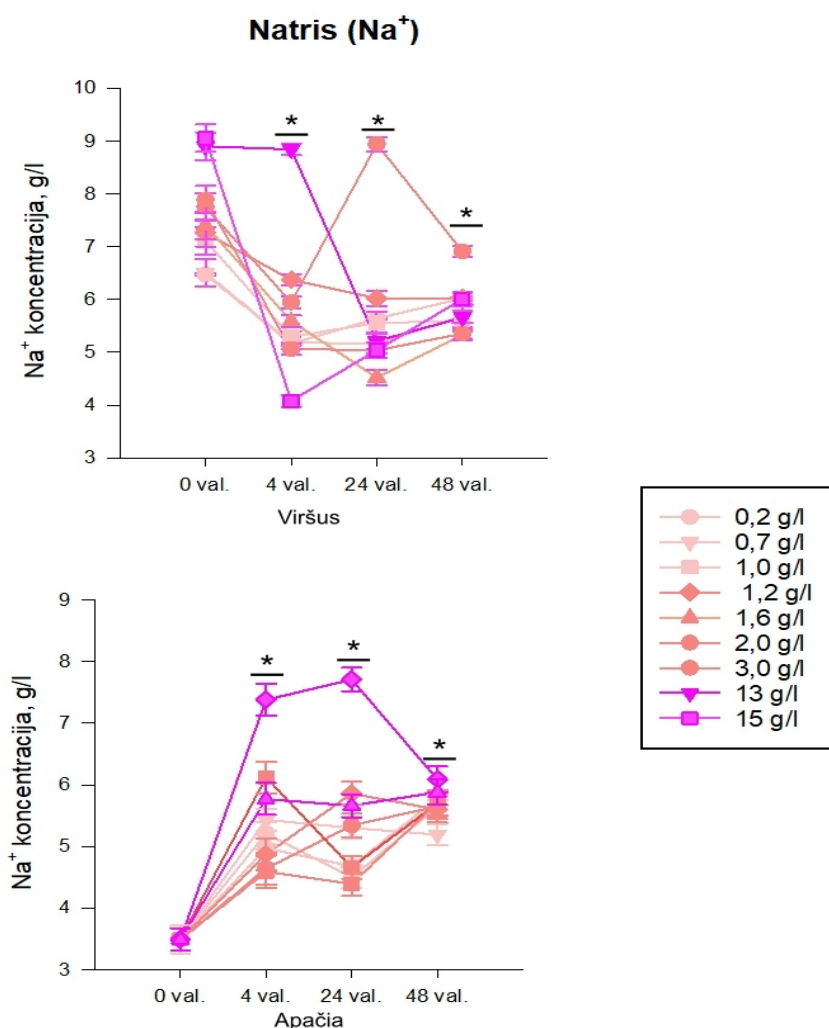


23 pav. Magnio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 valandoms paveikus elektrolitų tirpalais. 0 – žymi pradines koncentracijas. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$

Paveikus mažos mineralizacijos (0,2 g/l, 0,7 g/l, 1,0 g/l) elektrolitų tirpalais, nustatyta, kad magnio jonų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus keitėsi priklausomai nuo laiko ir koncentracijos esančios elektrolitų tirpale (žr. 23 pav.). Stebint magnio jonų koncentracijas perėjusias per žarnyno barjerą svarbu paminėti, kad nustatytos koncentracijos yra panašios su ląstelių mitybinės terpės. Pradinis magnio santykis tarp skyrių lygus – 1,25. Jonai po paveikimo, juda koncentracijos gradientu kryptimi, po 4 ir 24 valandų padidinant jonų persvarą išorinėje membranos pusėje. Praėjus 48 val. pastebimas magnio koncentracijos padidėjimas abijuose skyriuose, šis koncentracijos padidėjimas gali būti susijęs su ląstelės ir jonų sąveika viduląstelinėje terpėje. Nustatytas, kad praėjus 48 val. vyko aktyvus ląstelių metabolinis darbas prieš koncentracijos gradientą, jonai rezorbavosi ir išlygino koncentracijas tarp membranų. Nustatytas magnio jonų koncentracijų galutinis santykis tarp skyrių lygus – 1.

Įvedus vidutinės koncentracijos elektrolitų tirpalus, nustatytas magnio jonų koncentracijų pradinis santykio skirtumas lygus – 2. Jonų koncentracijų pasiskirstymas ir pernaša vyko panašiai kaip ir kalcio bei kalio jonų. Statistiškai reikšmingi pokyčiai pastebimi praėjus 4 ir 24 val. kai koncentracijų potencialo skirtumas sumažėjo abipus membranų, tačiau po 48 val. fiksuojamas žymus magnio jonų padidėjimas apatiniame skyriuje, galutinę santykinę reikšmę sumažinant iki – 1.

Paveikus didelės koncentracijos (13,0 g / l, 15,0 g / l) elektrolitų tirpalais, Nustatyti pradiniai koncentracijų santykiai magnio jonuose – 7,75. Statistiškai reikšmingi duomenys lyginant su kontrole nustatyti praėjus 4, 24 ir 48 valandoms, abiejų jonų koncentracijos judėjo pagal koncentracijos gradientą, taip išlyginant tarp abipus membranų buvusį potencialų koncentracijų skirtumą. Nustatyta, kad po 48 val. galutinis santykis tarp apatinio ir viršutinio skyriaus kalcio ir magnio mėginiuose buvo lygus – 1.



24 pav. Magnio jonų koncentracijos viršutiniame ir apatiniame skyriuose praėjus 4, 24, 48 valandoms paveikus elektrolitų tirpalais. 0 – žymi pradines koncentracijas. Vaizduojami verčių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, n=3. * – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$

Paveikus mažos mineralizacijos (0,2 g / l, 0,7 g / l, 1,0 g / l) elektrolitų tirpalais Nustatytas pradinis natrio jonų koncentracijų santykis tarp skyrių lygus – 2. Natrio difunduoja pro membranos ląstelės kanalus. Paėjus 4 valandoms, abipus membranų nustatytas statistiškai reikšmingas membraninių potencialų skirtumo sumažėjimas, tačiau po 24 val. viršutiniame skyriuje esanti natrio koncentracija žymiai padidėjo. Šis padidėjimas gali būti susijęs su žarnyno barjero epitelio ląstelių ir jonų sąveika

bei joniniais siurbliais, kurie aktyviai palaiko jonų koncentracijos gradientus. Sumažėjęs natrio jonų koncentracijos kiekis apatiniame skyriuje aktyvina Na^+ / K^+ siurblio darbą, pernešant jonus prieš koncentracijos gradientą. Veikiant Na^+ / K^+ siurblio siurbliui, iš ląstelės vidaus išsiurbiamas daugiau teigiamų jonų (3 Na^+) negu patenka į jos vidų (2 K^+) [15]. Nustatytas galutinis natrio jonų koncentracijų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus lygus – 1.

Paveikus sukurtą žarnyno modelį, vidutinės koncentracijos ($1,2 \text{ g / l}$, $1,6 \text{ g / l}$, $2,0 \text{ g / l}$, $3,0 \text{ g / l}$) elektrolitų tirpalais, pastebėta, kad Na^+ jonai nuosekliai absorbavosi per žarnyno barjerą iš viršutinės į apatinę pusę. Pradinis koncentracijų santykis – 2,2. Praėjus 4 val. koncentracijų skirtumas abipus membranos sumažėjo, tačiau 24 val. viršutiniame skyriuje matomas žymus natrio jonų padidėjimas statistiškai reikšmingas lyginant su kontrole. Įvykusi natrio jonų difuzija pro joninius ląstelės membranos kanalus (poras) ir tapląstelinė – viduląstelinė sąveika tarp ląstelės ir natrio jonų, padidino koncentraciją išstumiant natrio jonus iš ląstelių į viršutinį skyrių. Praėjus 48 val. galutinis koncentracijų skirtumas abipus membranų siekė – 1. Gauti rezultatai, gali reikšti, kad barjeras ne tik pernešė natrio jonus, bet ir efektyviai juos sulaikė, nepraleisdamas ištekėti iš viršutinio į apatinį skyrių.

Vertinant didelės koncentracijos elektrolitų tirpalų pokyčius per barjerą nustatytas natrio jonų santykis tarp viršutinio ir apatinio skyriaus – 2,5. Praėjus 4 valandoms, nustatytas statistiškai reikšmingas viršutinio skyriaus jonų padidėjimas lyginant su kontrole, taip pat padidėjo jonų koncentracija apatiniame skyriuje, dėl difundavusių jonų iš viršutinio skyriaus. Po 24 val. nustatytas statistiškai reikšmingas praėjusių per žarnyno barjerą natrio jonų kiekis apatiniame skyriuje. Praėjus 48 val. nustatytas reikšmingas koncentracijų abipus membranų skirtumų sumažėjimas. Galutinis natrio jonų santykis tarp skyrių lygus –1.

Paveikus sukurtą žarnyno modelį *in vitro* mažos koncentracijos elektrolitų tirpalais nustatyta, kad priklausomai nuo susiformavusio barjero, plyšinių ir glaudžiųjų jungčių, ląstelių sąveikos su jonais ir kitų pašalinių dirgiklių, pernaša per epitelio ląsteles vyksta skirtingai, tačiau vieningai po 48 valandų praėjusių jonų koncentracijos pasiekia vienodą jonų koncentracijos kieki abipus membranų.

Paveikus sukurtą žarnyno modelį vidutinės koncentracijos tirpalais nustatyta, kad $1,0 \text{ g / l}$ ir $1,2 \text{ g / l}$ elektrolitų tirpalai, per pirmąsias 4 ir 24 val. difunduoja per žarnyno barjerą koncentracijos gradiento link, tačiau po 48 val. pereina prieš koncentracijos gradientą iš apatinio skyriaus į viršutinį, įrodant, kad tiesioginis padidėjimas pernašos didėjant koncentracijai nepriklauso vien nuo koncentracijos gradiento. Tai rodo, kad susidaręs žarnyno barjeras, ne tik praleidžia jonus, bet atlieka aktyvų ląstelių metabolinį darbą ir perneša jonus prieš koncentracijos gradientą. Vertinant $1,6 \text{ g / l}$ tirpalą, nustatyta, kad visi jonai difundavo pagal koncentracijos gradientą ir po 48 val. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} jonai sąveikavo su viduląstelinėje terpėje esančiais jonais, taip padidinant koncentracijų skirtumus tarp viršutinių ir apatinių žarnyno modelio skyrių.

Paveikus sukurtą žarnyno modelį *in vitro*, didelės koncentracijos elektrolitų tirpalais, nustatyta, kad visi makroelementų koncentracijų skirtumai abipus membranų praėjus 24 valandoms sumažėja ir pasiekia santykį lygų 1. Svarbu pažymėti kad, kalio jonai po 24 val. poveikio, yra pernešami iš apatinio skyriaus į viršutinį. Epitelio ląstelių apatinis (bazolaterinis) skyrius išreiškia vyraujančią K^+ jonų selektyvumą. Apatiniame skyriuje esantys K^+ kanalai ne tik suteikia nuotėkio būdą pernešti K^+ perteklių, sukauptą siurblio veiklos metu, bet ir atlieka svarbų vaidmenį išlaikant transepitelio elektrinį potencialą. Didesnės koncentracijos tirpaluose, natrio jonai difundavo per žarnyno barjerą

didesnės koncentracijos link. Transepitelinės elektrinės varžos vertės paveikus didesnės koncentracijos tirpalais žymiai sumažėjo, kas galėjo turėti įtakos laisvam natrio jonų pratekėjimui pro žarnyno barjerą *in vitro*.

3.4.3. Koreliacijos koeficientų nustatymas

Koreliacijos koeficientai naudojami norint nustatyti, koks yra tvirtas sąsajos ryšys tarp dviejų kintamųjų. Ryšio stiprumas tarp kintamųjų išreiškiamas koeficientu, kuris priklausomai nuo vieno kintamojo reikšmės gali didėti arba mažėti nuo –1 iki 1 [103].

Siekiant nustatyti sąsajas tarp aktyvaus transporto ir metabolinio aktyvumo K^+ , Ca^{2+} , Mg^+ , Na^{2+} jonams, atliekama koreliacinė analizė. Rezultatai pateikiami 8, 9, 10, 11 lentelėse.

8 lentelė. Kalio jonų koreliacijos duomenys

	AT** po 4 val.	AT po 24 val.	AT po 48 val.
MA* po 4 val.	0,42	0,05	0,34
MA po 24 val.	0,06	0,78	-0,22
MA po 48 val.	0,13	0,47	0,22

*MA - Metabolinis aktyvumas; **AT-aktyvus transportas.

Atlikus koreliacijos analizę, nustatyta, kad kalio jonų sąsaja tarp aktyvaus transporto ir metabolinio aktyvumo metu reikšmės svyruoja nuo -1 iki 1. Didžiausia priklausomybė tarp kintamųjų nustatyta tarp aktyvaus transporto ir metabolinio aktyvumo po 24 val., kai koeficientas siekia 0,78.

9 lentelė. Kalcio jonų koreliacijos duomenys

	AT po 4 val.	AT po 24 val.	AT po 48 val.
MA po 4 val.	0,15	0,87	-0,13
MA po 24 val.	0,87	0,91	0,63
MA po 48 val.	0,68	0,63	0,52

Vertinant kalcio jonų koreliacijos duomenis (žr. 9 lentelę), nustatyta, daugiau priklausomųjų reikšmių tarp kintamųjų, nei lyginant su kalio duomenimis. Didžiausia priklausomybė tarp aktyvaus transporto ir metabolinio aktyvumo nustatyta po 24 val. (koreliacijos koeficientas 0,91).

10 lentelė. Magnio jonų koreliacijos duomenys

	AT po 4 val.	AT po 24 val.	AT po 48 val.
MA po 4 val.	0,16	0,11	0,12
MA po 24 val.	0,11	0,93	0,91
MA po 48 val.	0,12	0,62	0,63

Iš gautų duomenų pateiktą 10 lentelėje matyti, kad stipri koreliacija nustatyta tarp aktyvaus transporto ir metabolinio aktyvumo po 24 val. kai koeficientas – 0,93. Magnio jonų koreliacijos rezultatai turi

visas teigiamas reikšmes, tad šio jono, kaip ir Ca^{2+} , aktyvus transportas yra tiesiogiai susijęs su metaboliniu aktyvumu.

11 lentelė. Natrio jonų koreliacijos duomenys

	AT po 4 val.	AT po 24 val.	AT po 48 val.
MA po 4 val.	0,08	0,22	0,13
MA po 24 val.	0,28	-0,12	0,02
MA po 48 val.	0,21	0,22	0,23

Analizuojant natrio jonų metabolinį aktyvumo ir aktyvaus transporto duomenis, sąsajų nenustatyta. Didžioji daugumą gautų reikšmių yra artimos 0 – tai reiškia, kad tarp šie kintamieji tarpusavyje nesusiję.

Apibendrinant gautus rezultatus, K^+ , Ca^{2+} , Mg^+ jonams nustatyta didžiausia tiesioginė koreliacija, tarp metabolinio aktyvumo ir aktyvaus transportavimo po 24 valandų, kurios reikšmė arti 1. Mažiausia priklausomybė tarp kintamųjų nustatyta natrio jonų koreliacijos analizės duomenyse.

Išvados

1. HCEC-1CT ląstelės žarnyno modelį *in vitro* greičiausiai suformuoja auginamos ant membraninio įdėklo iš PET, sėjant 250 000 ląstelių.
2. Integralus žarnyno barjeras susiformuoja praėjus 120–188 val. (5–7 dienoms) po ląstelių kultūros užsėjimo ant membraninių įdėklų: pasiekiamos maksimalios vertės – $178 \pm 9,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ šeštą kultūros dieną ir $200 \pm 7,58 \Omega \cdot \text{cm}^2$ septintą kultūros dieną, atitinka *in vitro* formuojamų epitelio ląstelių barjerų transepitelinės elektrinės varžos dydį.
3. Visi tirti elektrolitų tirpalai stimuliuoja žarnyno epitelio metabolinį aktyvumą po 4 val., tačiau mažos mineralizacijos tirpalai po 24 ir 48 val. metabolinį aktyvumą slopina. Didelės mineralizacijos tirpalai aktyvina metabolizmą ir po 24 bei 48 val.
4. Žarnyno epitelio ląstelės veikiamos mažos ir vidutinės mineralizacijos elektrolitų tirpalais aktyviai palaiko pastovią nedidelę užląstelinę Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų koncentraciją, tačiau nepalaiko veikiant didelės mineralizacijos tirpalais. Užląstelinė vienvalenčių jonų Na^+ ir K^+ koncentracija veikiant skirtingos mineralizacijos tirpalais kinta nežymiai.
5. Sukurtas žarnyno barjero modelis sėkmingai pritaikytas vertinant elektrolitų rezorbciją. Elektrolitų tirpalai, turintys Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonus, priklausomai nuo koncentracijos stimuliuoja žarnyno epitelio ląstelių metabolinį aktyvumą, ir tai yra susiję su elektrolitų pernaša per žarnyno *in vitro* barjerą. Didesnės ir vidutinės koncentracijos tirpalai pasižymėjo geresniu rezorbcijos santykiu.

Literatūros sąrašas

1. KIELA, Pawel R, FAYEZ K GHISHAN. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* [interaktyvus]. 2016, **30**(2), 145–159. ISSN 1521-6918. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>.
2. KÖNIG, Julia, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and translational gastroenterology* [interaktyvus]. 2016, **7**(10), e196. ISSN 2155-384X (Print). DOI: 10.1038/ctg.2016.54.
3. NUNES, Rute, Cátia SILVA, Luise CHAVES. 4.2 Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies. In: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [interaktyvus]. 2016, s. 203–236. DOI: 10.1016/b978-0-08-100094-6.00013-4.
4. MALOY, Kevin J, Fiona POWRIE. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* [interaktyvus]. 2011, **474**(7351), 298–306. ISSN 1476-4687 (Electronic). DOI: 10.1038/nature10208.
5. ARRIETA, M C, L BISTRITZ, J B MEDDINGS. Alterations in intestinal permeability. *Gut* [interaktyvus]. 2006, **55**(10), 1512–1520. ISSN 1468-3288. DOI: 10.1136/gut.2005.085373.
6. KHARE, Vineeta, et al. Mesalamine and azathioprine modulate junctional complexes and restore epithelial barrier function in intestinal inflammation. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2019, **9**(1), 2842. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-39401-0.
7. ALATAB, Sudabeh, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* [interaktyvus]. 2020, **5**(1), 17–30. ISSN 2468-1253. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30333-4.
8. TADENEV, Abigail L D, Robert W BURGESS. Model validity for preclinical studies in precision medicine: precisely how precise do we need to be? *Mammalian Genome* [interaktyvus]. 2019, **30**(5), 111–122. ISSN 1432-1777. DOI: 10.1007/s00335-019-09798-0.
9. COSTA, Joana, Arti AHLUWALIA. Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [interaktyvus]. 2019, **7**(JUN), 1–14. ISSN 22964185. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00144.
10. ROUND, June L, Sarkis K MAZMANIAN. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* [interaktyvus]. 2009, **9**(5), 313–323. ISSN 1474-1741 (Electronic). DOI: 10.1038/nri2515.
11. OGOBUIRO, Ifeanyichukwu, Justin GONZALES, Faiz TUMA. Physiology, Gastrointestinal. In: . 2021.
12. STROPUS R., TAMASĀUSKAS K. A., Paužienė N. *Žmogaus anatomija*. Kaunas: Vitae litera, 2005.
13. MERRITT, Alfred M., Véronique JULLIAND. *Gastrointestinal physiology* [interaktyvus]. 2013. ISBN 9780702034220. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3422-0.00001-8.
14. GROSCWITZ, Katherine R., Simon P. HOGAN. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2009, **124**(1), 3–20. ISSN 00916749. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
15. KĖVELAITIS, Egidijus, Rimvydas MILIAUSKAS, Michael ILLERT. *Žmogaus fiziologija: vadovėlis*. 2006. ISBN 9789955150916.

16. DENBOW, D. Michael. *Gastrointestinal Anatomy and Physiology* [interaktyvus]. Sixth Edit. B.m.: Elsevier, 2015. ISBN 9780124071605. DOI: 10.1016/B978-0-12-407160-5.00014-2.
17. VOLK, Neil, Brian LACY. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* [interaktyvus]. 2017, **27**(1), 1–13. ISSN 1558-1950 (Electronic). DOI: 10.1016/j.giec.2016.08.001.
18. SULAIMAN, Sarah, Luca MARCIANI. MRI of the Colon in the Pharmaceutical Field: The Future before us. *Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2019, **11**(4). ISSN 1999-4923 (Print). DOI: 10.3390/pharmaceutics11040146.
19. GREENWOOD-VAN MEERVELD, Beverley, Anthony C JOHNSON, David GRUNDY. Gastrointestinal Physiology and Function. *Handbook of experimental pharmacology* [interaktyvus]. 2017, **239**, 1–16. ISSN 0171-2004 (Print). DOI: 10.1007/164_2016_118.
20. BARKER, Nick. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology* [interaktyvus]. 2014, **15**(1), 19–33. ISSN 1471-0080 (Electronic). DOI: 10.1038/nrm3721.
21. GENSOLLEN, Thomas, et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, N.Y.)* [interaktyvus]. 2016, **352**(6285), 539–544. ISSN 1095-9203 (Electronic). DOI: 10.1126/science.aad9378.
22. FERREIRA, Célia, et al. Terminology Concepts of Probiotic and Prebiotic and Their Role in Human and Animal Health. *Revista de Salud Animal*. 2011, **33**(3), 137–146. ISSN 2224-4700.
23. KAYAMA, Hisako, Ryu OKUMURA, Kiyoshi TAKEDA. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annual Review of Immunology* [interaktyvus]. 2020, **38**(1), 23–48. ISSN 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev-immunol-070119-115104.
24. KOCH, Stefan, Asma NUSRAT. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annual review of pathology* [interaktyvus]. 2012, **7**, 35–60. ISSN 1553-4014 (Electronic). DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-120905.
25. LEY, Ruth E, Daniel A PETERSON, Jeffrey I GORDON. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* [interaktyvus]. 2006, **124**(4), 837–848. ISSN 0092-8674 (Print). DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.017.
26. HALPERN, Melissa D, Patricia W DENNING. The role of intestinal epithelial barrier function in the development of NEC. *Tissue barriers* [interaktyvus]. 2015, **3**(1–2), e1000707–e1000707. ISSN 2168-8362. DOI: 10.1080/21688370.2014.1000707.
27. CLEVERS, Hans. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* [interaktyvus]. 2013, **154**(2), 274–284. ISSN 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2013.07.004.
28. SCHOULTZ, Ida, Åsa V KEITA. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells* [interaktyvus]. 2019, **8**(2). ISSN 2073-4409 (Print). DOI: 10.3390/cells8020193.
29. CHELAKKOT, Chaithanya, Jaewang GHIM, Sung Ho RYU. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental and Molecular Medicine* [interaktyvus]. 2018, **50**(8). ISSN 20926413. DOI: 10.1038/s12276-018-0126-x.
30. KONG, Shanshan, Yanhui H ZHANG, Weiqiang ZHANG. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2018, **2018**, 2819154. ISSN 2314-6133. DOI: 10.1155/2018/2819154.

31. WANG, Shu-Ling, et al. Impact of Paneth Cell Autophagy on Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology* [interaktyvus]. 2018, **9**, 693. ISSN 1664-3224. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00693.
32. D'ANTONGIOVANNI, Vanessa, et al. Intestinal epithelial barrier and neuromuscular compartment in health and disease. *World journal of gastroenterology* [interaktyvus]. 2020, **26**(14), 1564–1579. ISSN 2219-2840. DOI: 10.3748/wjg.v26.i14.1564.
33. NOAH, Taeko K, Bridgitte DONAHUE, Noah F SHROYER. Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research* [interaktyvus]. 2011, **317**(19), 2702–2710. ISSN 1090-2422 (Electronic). DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006.
34. SCHOULTZ, Ida, Åsa V KEITA. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* [interaktyvus]. 2020, **9**(8), 1909. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells9081909.
35. ULLUWISHEWA, Dulantha, et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2011, **141**(5), 769–776. ISSN 00223166. DOI: 10.3945/jn.110.135657.
36. WATSON, Alastair J M, et al. Epithelial Barrier Function In Vivo Is Sustained Despite Gaps in Epithelial Layers. *Gastroenterology* [interaktyvus]. 2005, **129**(3), 902–912. ISSN 0016-5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.06.015.
37. KUNZELMANN, Karl, Marcus MALL. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews* [interaktyvus]. 2002, **82**(1), 245–289. ISSN 00319333. DOI: 10.1152/physrev.00026.2001.
38. VANCAMELBEKE, Maaïke, Séverine VERMEIRE. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* [interaktyvus]. 2017, **11**(9), 821–834. ISSN 17474132. DOI: 10.1080/17474124.2017.1343143.
39. CHIBA, Hideki, et al. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta* [interaktyvus]. 2008, **1778**(3), 588–600. ISSN 0006-3002 (Print). DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.08.017.
40. ODENWALD, Matthew A, Jerrold R TURNER. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* [interaktyvus]. 2017, **14**(1), 9–21. ISSN 1759-5053 (Electronic). DOI: 10.1038/nrgastro.2016.169.
41. MENG, Wenxiang, Masatoshi TAKEICHI. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [interaktyvus]. 2009, **1**(6), a002899. ISSN 1943-0264 (Electronic). DOI: 10.1101/cshperspect.a002899.
42. GOODENOUGH, Daniel A, David L PAUL. Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [interaktyvus]. 2009, **1**(1), a002576. ISSN 1943-0264 (Electronic). DOI: 10.1101/cshperspect.a002576.
43. GARROD, David, Martyn CHIDGEY. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et biophysica acta* [interaktyvus]. 2008, **1778**(3), 572–587. ISSN 0006-3002 (Print). DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.014.
44. GROSCHWITZ, Katherine R, Simon P HOGAN. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* [interaktyvus]. 2009, **124**(1), 3–22. ISSN 1097-6825. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

45. GIEPMANS, Ben N G, Sven C D VAN IJZENDOORN. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et biophysica acta* [interaktyvus]. 2009, **1788**(4), 820–831. ISSN 0006-3002 (Print). DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.07.015.
46. COLGAN, Sean P, Cormac T TAYLOR. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* [interaktyvus]. 2010, **7**(5), 281–287. ISSN 1759-5053 (Electronic). DOI: 10.1038/nrgastro.2010.39.
47. FASANO, Alessio, Terez SHEA-DONOHUE. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* [interaktyvus]. 2005, **2**(9), 416–422. ISSN 1743-4378 (Print). DOI: 10.1038/ncpgasthep0259.
48. ESHLEMAN, Emily M, Theresa ALENGHAT. Epithelial sensing of microbiota-derived signals. *Genes and immunity* [interaktyvus]. 2021. ISSN 1476-5470 (Electronic). DOI: 10.1038/s41435-021-00124-w.
49. EDELBLUM, Karen L., Jerrold R. TURNER. Epithelial Cells. In: *Mucosal Immunology* [interaktyvus]. B.m.: Elsevier, 2015, s. 187–210. DOI: 10.1016/B978-0-12-415847-4.00012-4.
50. RAO, Mrinalini C. Physiology of Electrolyte Transport in the Gut: Implications for Disease. *Comprehensive Physiology* [interaktyvus]. 2019, **9**(3), 947–1023. ISSN 2040-4603 (Electronic). DOI: 10.1002/cphy.c180011.
51. LEA, Tor. Epithelial Cell Models; General Introduction. In: Kitty VERHOECKX et al., ed. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [interaktyvus]. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 95–102. ISBN 978-3-319-16104-4. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4_9.
52. LE FERREC, E., et al. In vitro models of the intestinal barrier: The report and recommendations of ECVAM workshop 461,2. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* [interaktyvus]. 2001, **29**(6), 649–668. ISSN 02611929. DOI: 10.1177/026119290102900604.
53. YOUHANNA, Sonia, Volker M LAUSCHKE. The past, present and future of intestinal in vitro cell systems for drug absorption studies. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2020.
54. YU, Alan S L. Paracellular transport as a strategy for energy conservation by multicellular organisms? *Tissue barriers* [interaktyvus]. 2017, **5**(2), e1301852. ISSN 2168-8370 (Electronic). DOI: 10.1080/21688370.2017.1301852.
55. KRUG, Susanne M, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Molecular biology of the cell* [interaktyvus]. 2009/06/17. 2009, **20**(16), 3713–3724. ISSN 1939-4586. DOI: 10.1091/mbc.e09-01-0080.
56. MITIC, L L, C M VAN ITALLIE, J M ANDERSON. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* [interaktyvus]. 2000, **279**(2), G250-4. ISSN 0193-1857 (Print). DOI: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.G250.
57. ARTURSSON, Per, Anna Lena UNGELL, Jan Erik LÖFROTH. *Selective Paracellular Permeability in Two Models of Intestinal Absorption: Cultured Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cells and Rat Intestinal Segments* [interaktyvus]. 1993. ISSN 1573904X. DOI: 10.1023/A:1018903931777.
58. DUBYAK, George R. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Advances in physiology education* [interaktyvus]. 2004, **28**(1–4), 143–154. ISSN 1043-4046 (Print). DOI: 10.1152/advan.00046.2004.

59. HOLLANDER, Daniel, Jonathan D KAUNITZ. The „Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? *Digestive diseases and sciences* [interaktyvus]. 2020, **65**(5), 1277–1287. ISSN 1573-2568 (Electronic). DOI: 10.1007/s10620-019-05777-2.
60. DUCHATEAU, Guus S M J E, Werner KLAFFKE. Product Composition, Structure, and Bioavailability. *Food Biophysics* [interaktyvus]. 2008, **3**(2), 207–212. ISSN 1557-1866. DOI: 10.1007/s11483-008-9076-5.
61. RAO, Mrinalini C., Jayashree SARATHY, Mei AO. *Intestinal Water and Electrolyte Transport in Health and Disease* [interaktyvus]. 2012. ISBN 9781615041565. DOI: 10.4199/c00049ed1v01y201112isp031.
62. DUTZLER, Raimund, et al. X-ray structure of a Cl⁻ chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* [interaktyvus]. 2002, **415**(6869), 287–294. ISSN 0028-0836 (Print). DOI: 10.1038/415287a.
63. GUILLERMO, A., Altenberg LUIS REUSS. *Mechanisms of Water Transport Across Cell Membranes and Epithelia* [interaktyvus]. Fourth Edi. B.m.: Elsevier Inc., 2013. ISBN 9780123814623. DOI: 10.1016/B978-0-12-381462-3.00004-5.
64. GOFF, Jesse P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2018, **101**(4), 2763–2813. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.2017-13112.
65. CHANG, Eugene B, Po Sing LEUNG. Intestinal Water and Electrolyte Transport. In: Po Sing LEUNG, ed. *The Gastrointestinal System: Gastrointestinal, Nutritional and Hepatobiliary Physiology* [interaktyvus]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, s. 107–134. ISBN 978-94-017-8771-0. DOI: 10.1007/978-94-017-8771-0_5.
66. YU, Alan S L. Paracellular transport as a strategy for energy conservation by multicellular organisms? *Tissue Barriers* [interaktyvus]. 2017, **5**(2), e1301852. ISSN null. DOI: 10.1080/21688370.2017.1301852.
67. GADSBY, David C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature reviews. Molecular cell biology* [interaktyvus]. 2009/04/02. 2009, **10**(5), 344–352. ISSN 1471-0080. DOI: 10.1038/nrm2668.
68. COOPER GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.* [interaktyvus]. B.m.: Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9847/>
69. MUHEEM, Abdul, et al. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal* [interaktyvus]. 2016, **24**(4), 413–428. ISSN 1319-0164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.06.004>.
70. SILVIS, Mark R, et al. Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells. *Molecular biology of the cell* [interaktyvus]. 2009/02/25. 2009, **20**(8), 2337–2350. ISSN 1939-4586. DOI: 10.1091/mbc.e08-01-0084.
71. CRISTIÀ, Esther, Miquel MORETÓ, Richard J NAFTALIN. Key role of aldosterone and pericyptal myofibroblast growth in colonic permeability. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* [interaktyvus]. 2007, **45 Suppl 2**, S127-30. ISSN 1536-4801 (Electronic). DOI: 10.1097/MPG.0b013e31812e680b.

72. MILLA, Peter J. Advances in understanding colonic function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [interaktyvus]. 2009, **48**(SUPPL. 2), 43–45. ISSN 02772116. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181a1171a.
73. AZZOZ, Laura L, Sandeep SHARMA. Physiology, Large Intestine. In: . 2021.
74. REDDY, M M, M Jackson STUTTS. Status of fluid and electrolyte absorption in cystic fibrosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* [interaktyvus]. 2013, **3**(1), a009555–a009555. ISSN 2157-1422. DOI: 10.1101/cshperspect.a009555.
75. PFEIFFER, A, T SCHMIDT, H KAESS. The role of osmolality in the absorption of a nutrient solution. *Alimentary pharmacology & therapeutics* [interaktyvus]. 1998, **12**(3), 281–286. ISSN 0269-2813 (Print). DOI: 10.1046/j.1365-2036.1998.00301.x.
76. BARKAS, Fotis, et al. Electrolyte and acid-base disorders in inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology* [interaktyvus]. 2013, **26**(1), 23–28. ISSN 1108-7471. Prieiga per internetą: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24714322>
77. KUNZELMANN, Karl, Marcus MALL. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological reviews* [interaktyvus]. 2002, **82**(1), 245–289. ISSN 0031-9333 (Print). DOI: 10.1152/physrev.00026.2001.
78. SIDDIQUI, Khalid, Nahla BAWAZEER, Salini SCARIA JOY. Variation in Macro and Trace Elements in Progression of Type 2 Diabetes. *The Scientific World Journal* [interaktyvus]. 2014, **2014**, 461591. ISSN 2356-6140. DOI: 10.1155/2014/461591.
79. SHRIMANKER ISHA, Bhattarai SANDEEP. Electrolytes. *StatPearls* [interaktyvus]. 2021. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541123/>
80. HUSSAIN, Fatma, et al. Trace elements status in type 2 diabetes. *Bangladesh Journal of Medical Science* [interaktyvus]. 1970, **8**(3), 52–56. ISSN 2076-0299. DOI: 10.3329/bjms.v8i3.3983.
81. VAN DE GRAAF, S F J, R J M BINDELS, J G J HOENDEROP. Physiology of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* [interaktyvus]. 2007, **158**, 77–160. ISSN 0303-4240 (Print). DOI: 10.1007/112_2006_0607.
82. CIVINSKIENĖ GENUVAITĖ, KĖVELAITIS EGIDIJUS, Miliauskas Rimvydas. *Žmogaus fiziologijos pagrindai* [interaktyvus]. Kaunas: KMU, 2008. ISBN 978-9955-835-36-3. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/52704>
83. SCHWEIGEL, M., H. MARTENS. Magnesium transport in the gastrointestinal tract. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* [interaktyvus]. 2000, **5**(1), 666–677. ISSN 10934715. DOI: 10.2741/a542.
84. HUR, Sun Jin, et al. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, **125**(1), 1–12. ISSN 0308-8146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>.
85. PEREIRA, Carla, et al. Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. In: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models* [interaktyvus]. 2016. ISBN 9780081001141. DOI: 10.1016/B978-0-08-100094-6.00005-5.
86. MATTEI, Giorgio, Serena GIUSTI, Arti AHLUWALIA. *Design Criteria for Generating Physiologically Relevant In Vitro Models in Bioreactors* [interaktyvus]. 2014. ISBN 2227-9717. DOI: 10.3390/pr2030548.
87. CENCIC, Avrelija, Tomaz LANGERHOLC. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review. *International journal of food microbiology*

- [interaktyvus]. 2010, **141 Suppl**, S4-14. ISSN 1879-3460 (Electronic). DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026.
88. PRIYAMVADA, Shubha, et al. Mechanisms Underlying Dysregulation of Electrolyte Absorption in Inflammatory Bowel Disease–Associated Diarrhea. *Inflammatory Bowel Diseases* [interaktyvus]. 2015, **21**(12), 2926–2935. ISSN 1078-0998. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000504.
 89. KINUGASA, Tetsushi, Yoshito AKAGI. Status of colitis-associated cancer in ulcerative colitis. *World journal of gastrointestinal oncology* [interaktyvus]. 2016, **8**(4), 351–357. ISSN 1948-5204 (Print). DOI: 10.4251/wjgo.v8.i4.351.
 90. KONG, F, R P SINGH. Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science* [interaktyvus]. 2008, **73**(5), R67-80. ISSN 1750-3841 (Electronic). DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x.
 91. BLUTT, Sarah E., et al. Gastrointestinal microphysiological systems. *Experimental Biology and Medicine* [interaktyvus]. 2017, **242**(16), 1633–1642. ISSN 15353699. DOI: 10.1177/1535370217710638.
 92. MARTIĆ-KEHL, Marianne I, Roger SCHIBLI, P August SCHUBIGER. Can animal data predict human outcome? Problems and pitfalls of translational animal research. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* [interaktyvus]. 2012, **39**(9), 1492–1496. ISSN 1619-7089. DOI: 10.1007/s00259-012-2175-z.
 93. BLUTT, Sarah E, et al. Gastrointestinal microphysiological systems. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* [interaktyvus]. 2017/05/23. 2017, **242**(16), 1633–1642. ISSN 1535-3699. DOI: 10.1177/1535370217710638.
 94. GUERRA, Aurélie, et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* [interaktyvus]. 2012, **30**(11), 591–600. ISSN 01677799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.08.001.
 95. MADDEN, Lauran R, et al. Bioprinted 3D Primary Human Intestinal Tissues Model Aspects of Native Physiology and ADME/Tox Functions. *iScience* [interaktyvus]. 2018, **2**, 156–167. ISSN 2589-0042. DOI: 10.1016/j.isci.2018.03.015.
 96. STEENSMA, Aukje, Hub P.J.M. NOTEBORN, Harry A. KUIPER. Comparison of Caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [interaktyvus]. 2004, **16**(3), 131–139. ISSN 13826689. DOI: 10.1016/j.etap.2003.11.008.
 97. STEENSMA, Aukje, Hub P J M NOTEBORN, Harry A KUIPER. Comparison of Caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [interaktyvus]. 2004, **16**(3), 131–139. ISSN 1382-6689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2003.11.008>.
 98. MACEDO, Maria Helena, et al. Development of an Improved 3D in vitro Intestinal Model to Perform Permeability Studies of Paracellular Compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [interaktyvus]. 2020, **8**, 1076. ISSN 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.524018.
 99. KOZUKA, Kenji, et al. Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform. *Stem Cell Reports* [interaktyvus]. 2017, **9**(6), 1976–1990. ISSN 22136711. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.10.013.

100. WILSCHEFSKI, Scott C, Matthew R BAXTER. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical biochemist. Reviews* [interaktyvus]. 2019, **40**(3), 115–133. ISSN 0159-8090. DOI: 10.33176/AACB-19-00024.
101. VANHAECKE, Frank, Martín RESANO, Luc MOENS. Electrothermal vaporisation ICP-mass spectrometry (ETV-ICP-MS) for the determination and speciation of trace elements in solid samples - A review of real-life applications from the author's lab. *Analytical and bioanalytical chemistry* [interaktyvus]. 2002, **374**(2), 188–195. ISSN 1618-2642 (Print). DOI: 10.1007/s00216-002-1338-3.
102. VIDA, Mildažienė, Jarmalaitė SONATA, Daugelavičius RIMANTAS. *Laštelės biologija* [interaktyvus]. B.m.: VDU leidykla, 2004. ISBN 978-9955-12-916-5. Prieiga per internetą: <http://ebooks.vdu.lt/einfo/749/lasteles-biologija/>
103. ASUERO, A. G., A. SAYAGO, A. G. GONZÁLEZ. The correlation coefficient: An overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2006, **36**(1), 41–59. ISSN 10408347. DOI: 10.1080/10408340500526766.

Publikacijų sąrašas

Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose

Jelkinaitė Karina, Barauskienė Dalė, Jekabsone, Aistė. *In Vitro* Intestinal Barrier Model Development and Application for Electrolyte Absorption Studies. The (Extra)ordinary COINS 2021 - [16th] international conference of Life Sciences : book of abstracts : [February 27, 2021, Vilnius, Lithuania] / Vilnius University. Vilnius : Vilnius University, 2021.