



A kép illusztráció / Picture is for illustration only.

Antal Otilia¹, Némethné Szerdahelyi Emőke¹, Takács Krisztina¹

Érkezett: 2020. február – Elfogadva: 2020. augusztus

In vitro humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén

Kulcsszavak: statikus, dinamikus, szemi-dinamikus emésztési modellek, TIM-1 és TIM-2 emésztési modell, SHIME-modell (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem), INFOGEST in vitro humán emésztési protokoll;

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A tápcsatornában végbemenő emésztés szimulálása széles körben elterjedt eljárás az élelmiszer- és táplálkozástudomány különböző területein a gyógyszeripar mellett, mivel a humán klinikai vizsgálatoknál és az állatkísérleteknél kevésbé költség- és munkaigényes, és etikai problémákat sem vet fel. Az emésztés folyamata az élelmiszerekben található tápanyagokat és bioaktív vegyületeket fiziológiailag aktív vegyületekké alakítja. Az in vitro emésztési modellek hatékony eszköznek bizonyulnak az emésztés során zajló komplex transzformációs folyamatok teljeskörű megértésében, megfigyelésében. Természetesen az in vitro vizsgálatok nem helyettesíthetik az in vivo kísérleteket, de az in vivo vizsgálatok előtt a minták előszűrésében, rangsorolásában, osztályozásában kulcsfontosságú a szerepük. Ebben a cikkben bemutatjuk, hogy miért fontosak az in vitro emésztési modellek, hogyan és milyen felépítésű rendszerekben használhatók. Számos in vitro emésztési modellt alakítottak ki statikus, dinamikus és szemidinamikus formában. Jelen összefoglalónkban bemutatjuk a COST INFOGEST program keretében létrehozott egységesített statikus modellt, amely 32 ország több mint 200 kutatójának részvételével egyezményen alapuló egységes protokoll az élelmiszerminták in vitro emésztésére. Az egységesített modell alkalmazásával lehetővé vált a különböző kutatócsoportok eredményeinek összehasonlítása is.

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1. Emésztés, felszívódás – dióhéjban

A neurohormonálisan szabályozott [1] emésztés során a táplálék mechanikai és biokémiai folyamatok meghatározott sorozata révén bomlik le (1. ábra). A tápanyagok makromolekulákból (fehérjékből, lipidekből, szénhidrátokból) származó testépítőanyagok és energiaforrások; valamint a vitaminok; ásványi anyagok, nyomelemek az intesztinális barrieren (bélgáton) keresztül jutnak be a vér és nyirokkeringésbe a felszívódás (abszorpció) folyamata révén [2].

Az emésztés a szájban kezdődik, majd a gyomor-bél traktus (gyomor, duodenum, jejunum) úrterein folytatódik. A tápanyagok 90%-a a vékonybélben (jejunum, ileum) szívódik fel, a többi pedig a gyomorban (ventriculus, gaster) és a vastagbélben (colon). Az

abszorpciót a vékonybél nyálkahártya (mucosa) és a nyálkahártya alatti réteg (submucosa) körkörös redői, valamint a bélbolyhok (villi), a felszívó hámsejtek nyúlványai (microvilli, kefeszegély) segítik. A lumenális emésztés legfontosabb támogatói a tápcsatorna mirigyei által kiválasztott nedvekben található enzimek, melyek a makromolekulák lebontásának katalizátorai; valamint a mikrobolyhok plazma membránjában található kefeszegélyenzimek. A vékonybél felé haladva a vékonybélnedv a hasnyállal keveredve semlegesíti a gyomorból érkező savas kimuszt (gyomortartalom), ami a tápanyagok további hidrolíziséhez és felszívódásához szükséges.

A vékonybélbe szekretált epeváladék a zsírok emulgeálása révén segíti elő a pankreatikus lipáz általi hidrolízist. Az epesavaknak, az által, hogy micellák formájában szolubilizálják az emésztés termékeit, a felszívódásban is fontos szerepük van [3].

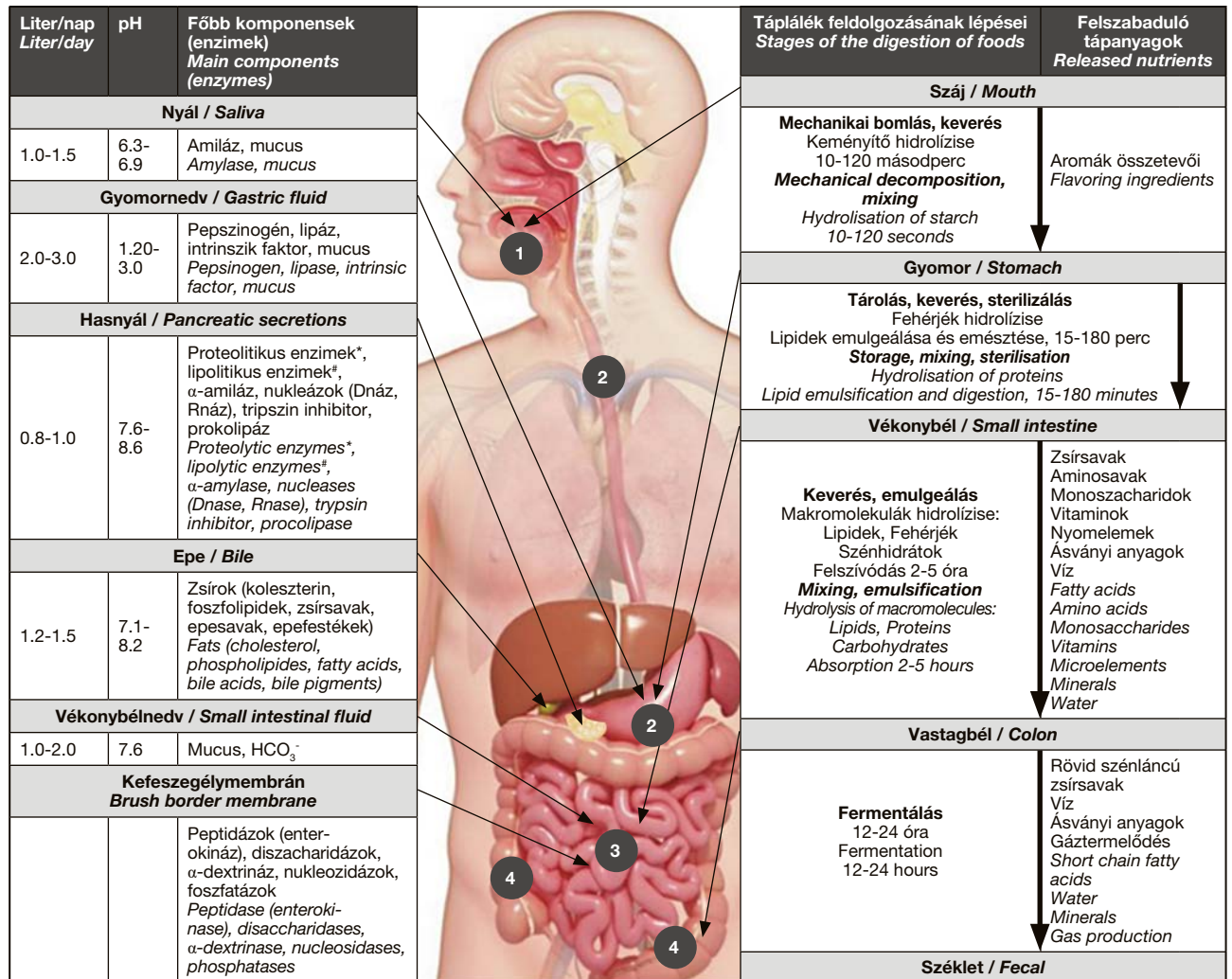
¹ Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Biológia Osztály

2.2. Az *in vitro* emésztési modellek fontossága

Az emésztés összetett biokémiai folyamatrendszer, melynek fiziológiai körülményeit igen nehéz pontosan reprodukálni. A táplálkozással kapcsolatos kérdésekre humán vizsgálatokkal kaphatjuk meg a legpontosabb válaszokat, a szimulált *in vitro* gyomor-bélrendszeri emésztést mégis széles körben alkalmazzák az élelmiszer- és táplálkozástudomány területén, mivel az élelmiszerek *in vivo* emésztésének tanulmányozása (klinikai vizsgálatokkal, állatkísérletekkel) erőforrás-igényes és sokszor etikailag megkérdőjelezhető

[7, 8]. Az állatmodellek élettani folyamatai nem mindig feleltethetők meg az emberi szervezetben lejátszódó élettani folyamatoknak [9], az eredmények értelmezését és a kísérlet reprodukálhatóságát pedig megnehezíthetik a kísérleti egyedek közti nagy különbségek [10, 11].

Az *in vivo* vizsgálatokkal szemben az *in vitro* módszerek előnyei, hogy költséghatékonyak, kevésbé munkaigényesek, nincs etikai korlátjuk, gyorsabbak, egyszerűbben kezelhetők, kisebb kockázatúak, és kevesebb felelősséggel járnak [11, 12].



1. ábra. Humán emésztési folyamatok összefoglaló ábrája (forrás: [3, 4, 5, 6, 63])
Figure 1. Summary diagram of human digestive processes (source: [3, 4, 5, 6, 63])

*A hasnyál proteolitikus enzimeit: tripszinogén; proelasztáz; kimotripszinogén; prokarboxipeptidáz A és B; / Proteolytic enzymes in the pancreas: trypsinogen; proelastase; chymotrypsinogen; procarboxypeptidase A and B;

#A hasnyál lipolitikus enzimeit: pankreatikus lipáz, foszfolipáz A2, nem specifikus lipáz (koleszterin észteráz) / Lipolytic enzymes of pancreatic secretion: pancreatic lipase, phospholipase A2, non-specific lipase (cholesterol esterase).

A bélcsatorna részei:

1 **Fejbél:** száj(üreg), garat; 2 **Előbél:** nyelőcső, gyomor; 3 **Középbél:** vékonybél melynek az emésztési felülete a patkóbél (duodenum) az éhbél (jejunum); a felszívódási felülete az éhbél (jejunum) és a csipőbél (ileum). A középbélhez tartozik még a máj (epét termeli) és a hasnyálmirigy (hasnyálat termeli); 4 **Utóbél:** vastagbél (colon) (részei: vakbél, remesebél/felszálló, haránt, leszálló, szigmbél/végbél)

Parts of the intestinal tract:

1 **Headgut:** oral cavity, pharynx; 2 **Foregut:** esophagus, stomach; 3 **Midgut:** small intestine whose digestive surfaces are the duodenum and the jejunum; its absorption surfaces are the jejunum and the ileum. The midgut also includes the liver (producing bile) and the pancreas (producing the pancreatic juice); 4 **Hindgut:** large intestine (colon, parts: appendix, caecum, ascending, transverse, descending and sigmoid colon).

Csak a vizsgált mechanizmusra fókuszálnak; ellenőrzött körülményeket és könnyű mintavételi lehetőségeket nyújtanak; szűrési célok esetén nagyszámú minta párhuzamos mérésére alkalmazhatók. A vizsgálatok könnyen reprodukálhatók a kísérleti paraméterek ellenőrzése és standardizálása által [11]. Magukban foglalják száj-, gyomor- és vékonybél fázisokat, alkalmanként a vastagbél fermentációs szakaszát is. Az *in vitro* módszerek megkísérik valóság-hűen utánozni az *in vivo* fiziológias körülményeket, a tápcsatornán keresztül lezajló enzimikus és mikrobiológiai emésztési folyamatokat, figyelembe véve az emésztő enzimek jelenlétét és azok koncentrációját, a pH-t, az emésztési időt, illetőleg a sókoncentrációt. Az *in vitro* vizsgálatok nem helyettesíthetik az *in vivo* kísérleteket, de nagyszámú minta előszűrését, rangsorolását és osztályozását elősegítő eszközként tekinthetünk rájuk [13]. Így az állatetetés kísérletekhez történő előszűrés segítségével kevesebb kísérleti állatra van szükség, a humán sejteken és mikrobiótán végezhető kísérletek (vastagbél modell) esetén pedig a felszívódás, a különböző metabolitok felszabadulása modellezhető.

2.3. Az *in vitro* emésztési modellek alkalmazhatósága

Az élelmiszerek esetében az egyes komponensek tápértékének összege nem biztosít teljes képet a szervezet számára elérhető valós tápértékről. Az *in vitro* emésztés lehetőséget ad arra, hogy analitikai módszerekkel vizsgáljuk a tápcsatornába bekerülő élelmiszer-mátrixból a gasztrointesztinális traktuson való áthaladás során felszabaduló komponensek mennyiségét, azaz a bioaktív funkcióját (bioactivity), biológiai hozzáférhetőségét (bioaccessibility), valamint a felszívódás helyén a szervezet számára való biológiai elérhetőségét, biológiai hasznosulást (bioavailability) [11].

E modellek alkalmazásával arra keressük a választ, hogy ezen lebomlott komponenseknek megmarad-e a biológiai aktivitása, és ha igen akkor ez a bioaktív forma hogyan hasznosul: felszívódik-e, illetve képes-e aktív formában hasznosulni.

A gyakorlatban, az *in vitro* emésztést követően az emésztményt centrifugálják és/vagy a kolloidális diszperziót képző nem-emésztett összetevők jelenléte miatt szűrik (ultrafiltráció), dializálják, majd a kapott felülúszóban meghatározzák a biológiai hozzáférhető komponensek mennyiségét. A dialízis alkalmazása és az oldhatóság mérése (centrifugálás és/vagy szűrés révén) azonban még ugyanazon minta esetén is eltérő biológiai hozzáférhetőség-értékekhez vezethet [14, 15]. Az sem általánosítható, hogy a dialízissel vagy az oldhatóság mérésével kapunk nagyobb értékeket [14, 16, 17]. Azt is figyelembe kell venni, hogy nem minden oldódó vagy dializálható összetevő szívódik fel a szervezetben; ugyanakkor olyan komponensek is átdiffundálhatnak a félig átteresztő membránon, amelyek a valós körülmények között

nem képezik a biológiai hozzáférhető frakció részét [11, 18, 19].

A biológiai hozzáférhetőség ismerete fontos lehet az élelmiszerfejlesztés során a megfelelő feldolgozási technológia kiválasztásakor. Előfordulhat, hogy más gyártási technológia bizonyul előnyösebbnek ha azt az adott élelmiszerkomponens biológiai hozzáférhetősége alapján, és nem a lebomlás mértéke alapján választják ki [20]. A vizsgálatok hasznosak az élelmiszerfeldolgozás hatásainak összehasonlításában, valamint a különböző fehérjeforrások rangsorolásában, valamint az emésztést potenciálisan befolyásoló tényezők vizsgálatában [19]. Az *in vitro* vizsgálatok alkalmazhatók az élelmiszerek glikémiás hatásának becslésére [19, 21, 22], genetikailag módosított termékek biztonságosságának felmérésére [11, 23], fehérjék allergén potenciáljának jellemzésére is [8].

2.4. Az *in vitro* emésztési modellek jellemzése, csoportosítása

A kísérletek tervezése során a vizsgálati célnak megfelelő *in vitro* modellt kell kiválasztani, akár 1-1 emésztési fázis modellezése is indokolt lehet. A módszer kiválasztását segíti, ha figyelembe vesszük, hogy az adott emésztési modellt korábban milyen mintákra validálták. Emésztési modellek (1. táblázat) legnagyobb része statikus (~89%), de a modellek lehetnek dinamikusak, illetve szemi-dinamikusak is [24].

A **statikus modellezésnél** a fizikai folyamatok (rágás, nyírás, keverés, hidratáció, változó paraméterek: pl. idő) csak korlátozottan imitálhatók. A dinamikus modellel ellentétben gasztrointesztinális traktus komplexitása statikusan nem modellezhető.

A **dinamikus modellek** hatékonyabban alkalmazhatók az élettani vizsgálatok során, mint a statikusak [23]. Sokkal összetettebbek, a működtetésükhöz nagy mennyiségű minta szükséges [18]. Alkalmazásuk korlátozott, mivel a használatuk több költséget, munkát és időt igényel, mint a statikus modelleké [18, 23].

Az emésztés dinamikus folyamat, a gyomor-bélrendszerbe kerülő élelmiszer változó sebességgel halad annak szerkezetétől, reológiai és egyéb tulajdonságaitól függően, és a fizikai-kémiai körülmények (változó pH, ionerősség, emésztőenzim koncentrációk) szintén befolyásolják a hatékonyságát. Ezeket a folyamatbeli változásokat a dinamikus modellek figyelembe veszik.

Dinamikus modellekkel a reakcióidőtől függő folyamatok (pl. a biológiai hozzáférhetőség változása az élelem-mátrix függvényében, a tápanyagok kölcsönhatása) vizsgálata is lehetséges, annak köszönhetően, hogy az emésztés folyamán végbemenő biokémiai reakciók kinetikájának pontosabb modellezésére képesek, mivel a modellek rekeszeiből (melyek a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszait

imitálják) az emésztmény áthaladása során mintákat lehet venni.

A **szemi-dinamikus emésztési protokollok** az egyszerű statikus modellek és a bonyolultabb, költségszebb dinamikusan rendszerek közötti kompromisszumot képviselik [8]. Ezek esetén a gyomor-szakaszt dinamikusan modellezik, amelyet egy statikusan modellezett vékonybél fázissal vonnak össze [8].

2.4.1. Elterjedt dinamikusan *in vitro* humán emésztési modellek rövid jellemzése

A gyakorlatban több dinamikusan *in vitro* emésztési modell látott napvilágot, amelyek közül néhány legfontosabbat az **1. táblázatban** foglaltunk össze. Ezek az automatizált rendszerek egy, vagy több egységből állnak, amelyek külön, csak a gyomrot, vagy a gyomor-vékonybél és a gyomor-vékonybél-vastagbél

1. táblázat. Elterjedt dinamikusan *in vitro* humán emésztési modellek
Table 1. Widely used dynamic *in vitro* human digestion models

Modellezett emésztőrendszeri szakasz <i>Modeled section of the gastrointestinal tract</i>	Modellnév* Model name*	Emésztési szakaszokat reprezentáló egységek felépítése (száma) <i>Structure (number) of units representing digestive stages</i>	Referencia <i>Reference</i>
Gyomor / <i>Stomach</i>	DGM	Gyomor fundus –gyomortest, antrum (2 db egység) <i>Stomach fundus – stomach body, antrum (2 units)</i>	[11, 28]
	HGS	Teljes gyomor (1 db egység) <i>Complete stomach (1 unit)</i>	[11, 29]
Gyomor-vékonybél <i>Stomach-small intestine</i>	DIDGI	Teljes gyomor, duodenum, jejunum, ileum (4 db egység) <i>Complete stomach, duodenum, jejunum, ileum (4 units)</i>	[11, 30, 31]
	ESIN	Élelemtároló, nyálampulla, teljes gyomor, duodenum, jejunum, ileum (6 db. egység) <i>Food storage, saliva ampoule, complete stomach, duodenum, jejunum, ileum (6 units)</i>	[32, 33]
Gyomor-vékonybél-vastagbél <i>Stomach-small intestine-large intestine</i>	TIM-1 + TIM-2	Teljes gyomor, duodenum, jejunum, ileum (4 db egység) + vastagbél (csak proximális szakasz vagy felszálló-, haránt-, disztális vastagbél szakasz) (4 db egység) <i>Complete stomach, duodenum, jejunum, ileum (4 units) + colon (only proximal section or ascending, transverse and distal colon sections) (4 units)</i>	[11, 26, 34, 35]
	L-SHIME	Teljes gyomor, teljes vékonybél, felszálló-, haránt-, leszálló vastagbél szakasz (5 db egység) <i>Complete stomach, complete small intestine, ascending, transverse, descending colon sections (5 units)</i>	[11, 36]
	SIMGI	Teljes gyomor, teljes vékonybél, felszálló-, haránt-, leszálló vastagbél szakasz (5 db egység) <i>Complete stomach, complete small intestine, ascending, transverse, descending colon sections (5 units)</i>	[33, 37]
Vastagbél / <i>Large intestine</i>	ARCOL	Teljes vastagbél (1 db egység) <i>Complete large intestine (1 unit)</i>	[33, 38]
	GIBSON	Felszálló-, haránt-, disztális vastagbél szakasz (3 db egység) <i>Ascending, transverse and distal colon sections (3 units)</i>	[39, 40, 41]

* Rövidítések / *Abbreviations*:

DGM: Dynamic Gastric Model (Angol/*British*)

HGS: Human Gastric Simulator (Riddet Model) (Egyesült Államok/*USA*)

DIDGI: Digestion Dynamique Gastro-Intestinale model (Francia/*French*)

ESIN: Engineered Stomach and small Intestinal model (Francia/*French*)

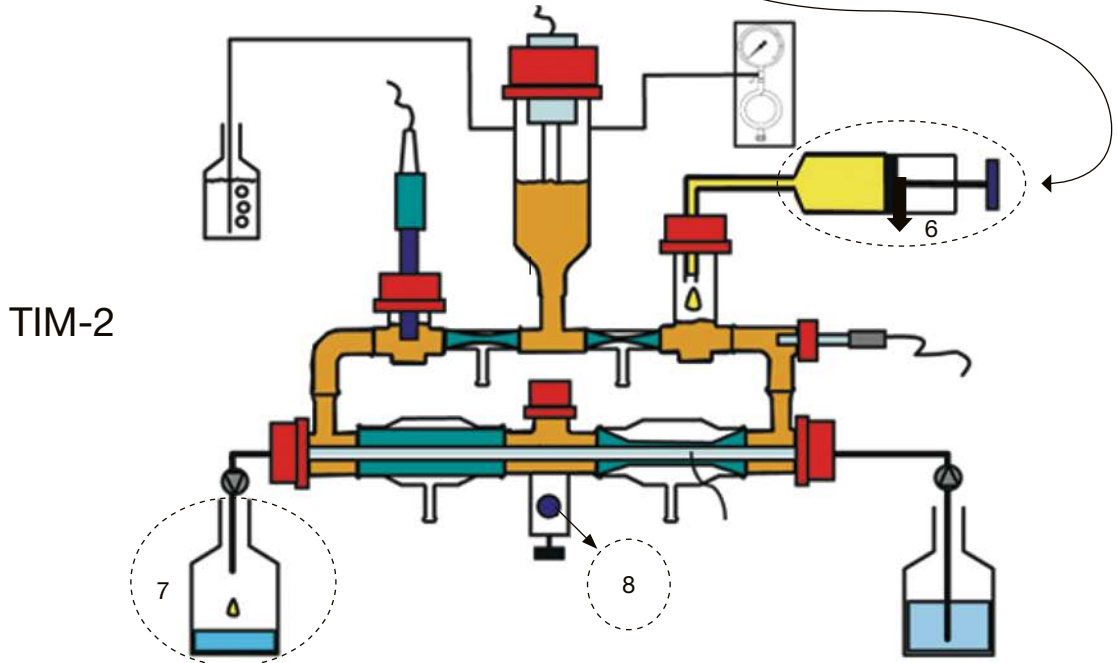
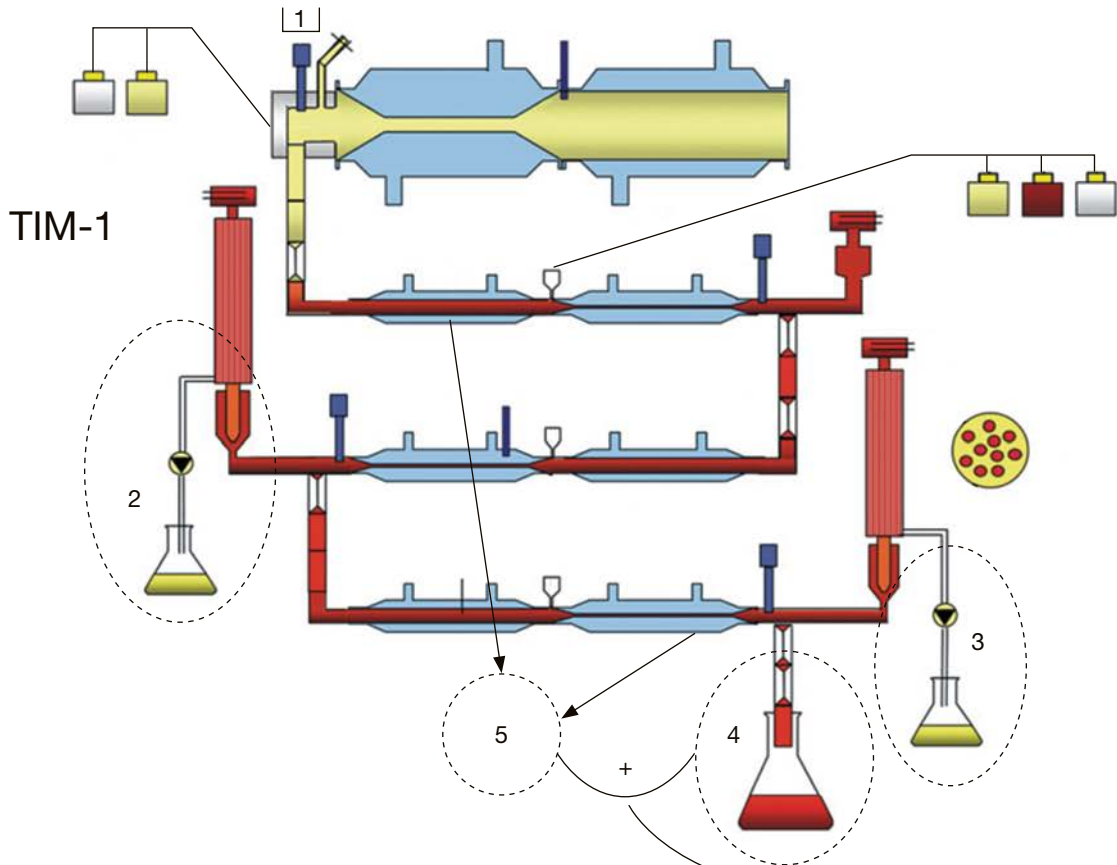
TIM: TNO *in vitro* (gastro-) Intestinal Models (Holland/*Dutch*)

SHIME: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (Belga/*Belgian*)

SIMGI: SIMulator of the GastroIntestinal tract model (Spanyol/*Spanish*)

Gibson: Gibson és Macfarlane kutatócsoportja által kidolgozott rendszer (*Macfarlane/Gibson három-stádiumú folyamatos kultúra rendszer*) (Angol)
System developed by the research group of Gibson and Macfarlane (Macfarlane/Gibson three-stage continuous culture system) (*British*)

ARCOL: ARTificial COLon (Francia/*French*)



2. ábra első része: TIM-1 modell
2. ábra első része: TIM-1 modell

2. ábra második része: TIM-2 model
2. ábra második része: TIM-2 model

1. Élelem = TIM-1 bemenete / Food input of TIM-1
2. Dializált minta az éhbélből / Dialysed sample from jejunum
3. Dializált minta a csipőbélből / Dialysed sample from ileum
4. A csipőbélből távozó minta / Sample output from the ileum
5. A kompartmentumokban maradó üledék az emésztés végén
Sediment remaining in the compartments at the end of digestion
6. A 4. és 5. számmal jelzett minták egyesítése = TIM-2 bemenete / Merging of samples no. 4 and no. 5 = TIM-2 input
7. Dializált minta a TIM-2-ből / Dialysed sample from TIM-2
8. Luminális minta a TIM-2-ből / Luminal sample from TIM-2

2. ábra. TIM-1 és TIM-2 modellek
Figure 2. TIM-1 and TIM-2 models

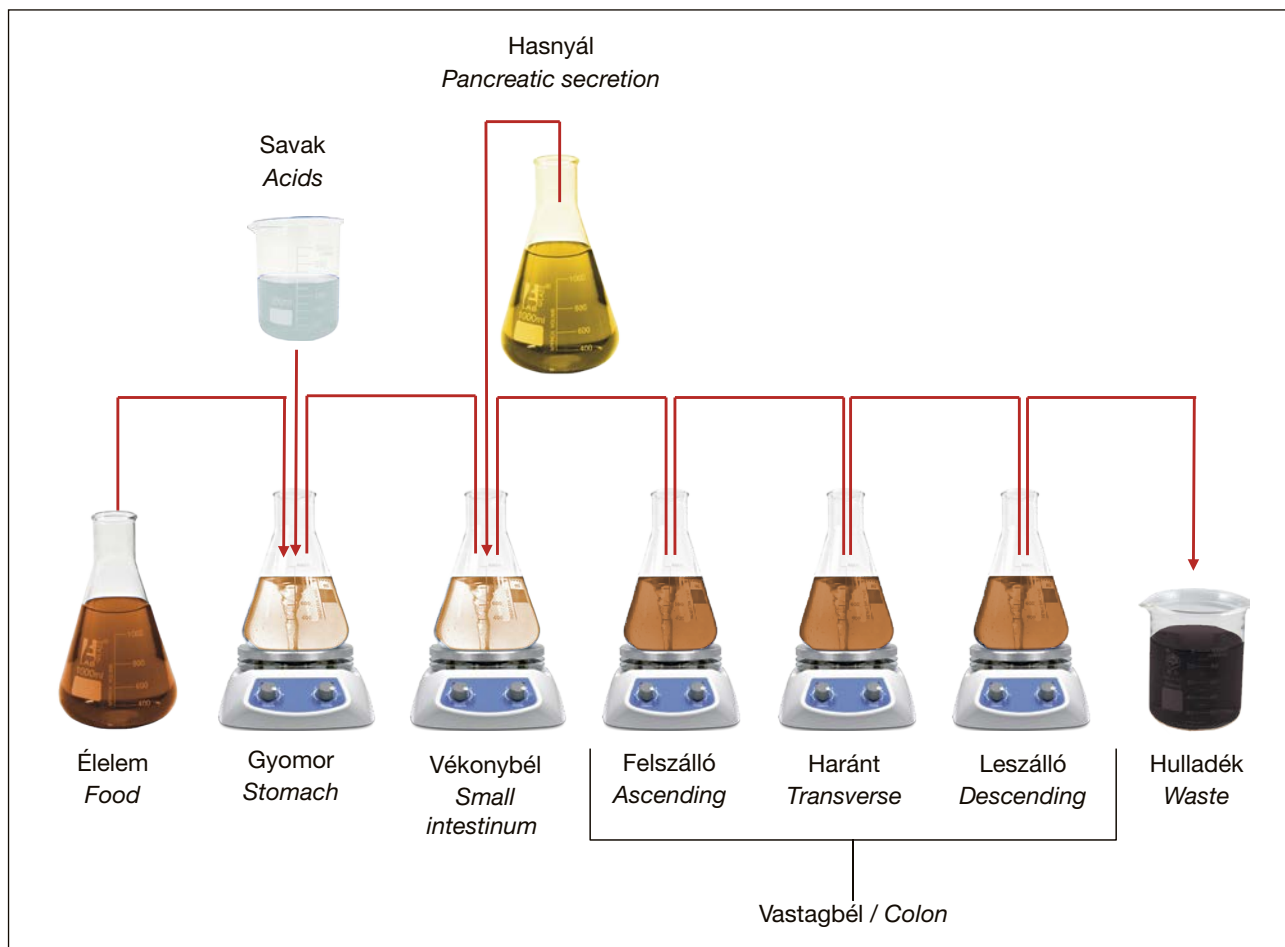
szakaszokat egyaránt modellezhetik. A rendszerek felépítése különböző, amit itt két komplettebb (az emésztés és a fermentáció folyamatain keresztül bemutatott) modellel szemléltetünk (2., 3. ábra).

A szimulált dinamikus humán emésztési modellek úttörőjének számítanak a TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek, Alkalmazott Tudományos Kutatás Hollandiai Szervezete) által kifejlesztett TIM emésztési modellek (TNO (gastro-) Intestinal Models) (2. ábra), amelyeket széles körben validáltak az élelmiszerek emészthetőségének, a tápanyagok biológiai hozzáférhetőségének, valamint a funkcionális összetevők sorsának és hatékonyságának a tanulmányozásában [25]. A TIM-1 egy gyomor-vékonybél modell, a TIM-2 pedig a vastagbél modellt. A TIM-1 egyszerűbb változata a tiny-TIM rendszer, mely a vékonybél csak egy egységgel imitálja, ami nagyobb átteresztőképességet tesz lehetővé [26]. Bár a TIM-1 rendszer gasztrikus kompartmentuma megfelel számos *in vitro* emésztést alkalmazó kísérlet követelményeinek, amit a tápanyagok, bioaktív összetevők és gyógyszerek biológiai hozzáférhetőségére vonatkozó eredmények támasztanak alá, bizonyos sajátos kérdések (ezek kapcsolódhatnak például az élelem és a gyomor viselkedése közötti kölcsönhatáshoz) megválaszolására, egy fejlettebb gyomor modellt kellett kifejleszteni [27]. A TIMagc rendszer (TIM advanced

gastric compartment), a TIM modell gasztrikus szakaszához képest egy fejlettebb gyomor modell, 3 kompartmentumból áll, ezek a gyomortestet (*corpus ventriculi*), valamint a gyomortestet követő vízszintes szakasz (*antrum*) proximális és a disztális részeit utánozzák [27].

A SHIME-modell (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) 5 reaktort felölelő rendszer (gyomor-vékonybél, felszálló-, haránt- és leszálló vastagbél szakasz, 3. ábra), amely megtalálható a Ghenti (Belgium) és a Wageningeni Egyetemen [42, 43]. Egyik variánsa az M-SHIME (Mucus-SHIME), amely a nyálkahártya mikrobióta általi kolonizációját modellezi. A SHIME-modell alkalmazása az ún. HMI™ modul (Host-Microbe Interaction Module) lehetővé teszi a mikrobiótának a gazdaszervezet sejtjeivel való interakciójának 48 órán át történő hosszú távú vizsgálatát [11, 33, 44].

A dinamikus modelleknél legtöbb esetben az élelmiszer konzisztenciájára (szilárd, folyadék)-vonatkozó differenciális gasztrikus ürítés (kivételek vannak pl.: TIM, SHIME), a dinamikus pH-profil, a kísérleti időtartam szabályozható, valamint a gyomorban a perisztaltikus mozgás is imitálható néhány esetben (TIM, HGS, DGM, SIMGI) imitálható. Bizonyos dinamikus modellek (pl. SHIME, TIM) esetén az étel drasztikus fizikai őrlésnek (ultra-turrax homogenizáló készülék



3. ábra. SHIME-modell
Figure 3. SHIME model

lék, turmixgép stb.) kell alávetni az *in vitro* emésztés előtt, a rágás modellezése helyett, hogy elkerüljék a rendszer csöveinek az eltömődését [32, 33].

Ennek hátránya, hogy nem veszik figyelembe az élelmiszer szerkezetét, pedig az emésztmény viszkozitása és a részecskéinek a mérete a vizsgálandó komponensek emésztés során történő felszabadulását befolyásoló fontos jellemzők [8, 18, 33].

Néhány rendszerben (pl. ESIN, TIM, ARCOL, SHIME, DIDGI) a dialízis megvalósítására is törekedtek, hogy az emésztetlen, nem oldódó anyagokkal kolloidális diszperziókat képző vízben oldódó komponensek a rendszerből eltávolíthatók legyenek [45]. A vastagbél modelleknél (TIM-2, ARCOL, SHIME) pl. fontos eltávolítani a mikrobiális metabolitokat, mert azok gátolhatják a baktériumok növekedését és/vagy a további fermentációt. A TIM-1, ESIN és DIDGI esetén az enzimek reakciótermékek általi negatív visszacsatolós gátlását akadályozzák meg a dialízis révén. A dialízis hatással van emésztmény összetételére is, ezáltal befolyásolhatja a viszkozitást és a pH-t.

Bizonyos dinamikus modellrendszereket az adott célcsoport életkorának (pl. felnőtt, csecsemő: pl. TIM-1, tiny-TIM, DIDGI, SHIME) és egészségi állapotának (egészséges, beteg, elhízott, gyulladós bélbetegségben szenvedő: (pl. TIM-1, TIMagc, DGM, SHIME) megfelelő emésztőrendszerek szimulálására lehet beállítani. A vastagbelet szimuláló egységeket a TIM-2, SIMGI, ARCOL, Gibson, SHIME modelleknél általában széklet inokulummal oltják be [11, 33, 40]. Az ESIN esetén a vékonybelet reprezentáló rendszeregyeségek lehetővé tették, hogy a humán széklet mintával való beoltás és annak anaerob körülmények közötti fenntartása lehetséges legyen [33]. Az ARCOL-modell az első olyan fermentációs modell, mely a fermentor belsejében anaerobiózist tart fenn, mindössze a mikrobióta metabolikus aktivitása révén, anélkül, hogy azt N_2 -nel vagy CO_2 -dal öblítsék át, mint a legtöbb, a vastagbelet szimuláló *in vitro* modell esetén. Az *in vitro* bél-fermentációs rendszerek hátránya azonban az, hogy nem képesek a gazdaszervezet hatásának (pl. felszívódás, gazdaszervezet mikrobióta kölcsönhatás) kellően valóságos modellezésére, kivéve, ha a rendszert *in vitro* bél sejtvonal modellekkel kombinálják (pl. Caco-2 humán vastagbélrák epitelsejtek) [33, 46].

2.5. A NAIK ÉKI-ben alkalmazott – különböző európai országok által javasolt közös egyezményen alapuló - szimulált humán *in vitro* emésztési modell részletes bemutatása

2011-ben indult el az ún. COST INFOGEST FA1005 Akció (2011-2014) *European Cooperation in Science and Technology: Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process, Project No. Food & Agricultural 1005* címmel, amelynek feladata vezető európai intézetekből álló hálózat felépítése volt, közös célja pedig az élelmiszerek

emésztése, a tápcsatornában történő lebomlási folyamatok teljeskörű megismerése. A hálózat tagjai különböző szakmai háttérrel rendelkező kutatók, úgymint élelmiszermérnökök, gasztroenterológusok, táplálkozástudományi szakemberek, immunológusok, élelmiszeripari szakemberek voltak, így a téma több szemszögből is megközelíthetővé vált. A COST Infogest Akció magyar tagjait intézetünk munkatársai képviselték (Dr. Gelencsér Éva, Dr. Takács Krisztina, Némethné Dr. Szerdahelyi Emőke, Dr. Nagy András). A projekt fő célkitűzése elsősorban a nyersanyagok és a feldolgozott élelmiszerek jellemzése volt a kedvezőbb tápanyag hasznosulás szempontjából, valamint annak felmérése, hogy a hasznos élelmiszer komponensek előfordulása és stabilitása a gasztrointesztinális traktusban milyen módon változik a feldolgozás módjától és élelmiszer mátrix jellegétől függően. Ezenkívül az *in vitro*, *in vivo*, *in silico* emésztési modellek felállítása, azok összehasonlítása, és az egészségre vonatkozó hatások (pl. allergia) vizsgálata volt a feladat.

A projektben kitűzött célok érdekében – a humán emésztésen alapuló naprakész szaktudás birtokában – az *in vitro* és *in vivo* mérések közötti összefüggések feltárásához szükség volt a publikált *in vitro* emésztési modellek összehangolására és szabványosítására [11, 47]. A különböző modellrendszerek eltérő körülményeket alkalmaztak, ami lehetetlenné tette a különböző emésztési vizsgálatokkal kapott eredmények összehasonlítását, így ellentmondásos következtetésekhez vezethetett [23, 24].

Erre jelent megoldást a számos *in vitro* emésztési protokoll összefésült változatai alapján standardizált ún. INFOGEST *in vitro* humán emésztési modell [23, 45], amely egészséges felnőttek emésztését a száj-gyomor-vékonybél fázisokon keresztül modellezi [48].

A harmonizált protokollban figyelembe vették az eddig alkalmazott emésztési modelleknél tapasztalt előnyöket és hátrányokat a valós körülmények lehető legjobb megközelítése érdekében (4. ábra).

A kialakított INFOGEST modellnél számításba vették többek között azt is, hogy a különböző cégektől vásárolt, ill. különböző sarzsokból rendelkezésre álló enzimek aktivitása eltérő lehet, ezáltal az enzimes bontással kapott eredmények is eltérőek (amit a körvizsgálati eredmények is bizonyítottak). Újdonság a protokollban, hogy élettanilag megfelelő körülmények között, megadott aktivitással történik az enzimes bontás. A vizsgálathoz szükséges enzimmennyiség a szabványos aktivitás mérésekkel meghatározható, ezáltal javította a reprodukálhatóságot, és az eredmények összehasonlíthatóságát [50].

Figyelembe vették azt is, hogy az eltérő pH, ásványi anyagtartalom, ionerősség, emésztési idő, és enzim befolyásolja a mért enzimaktivitást, így az eredményekben különbségeket okozhat. Egyéb paraméte-

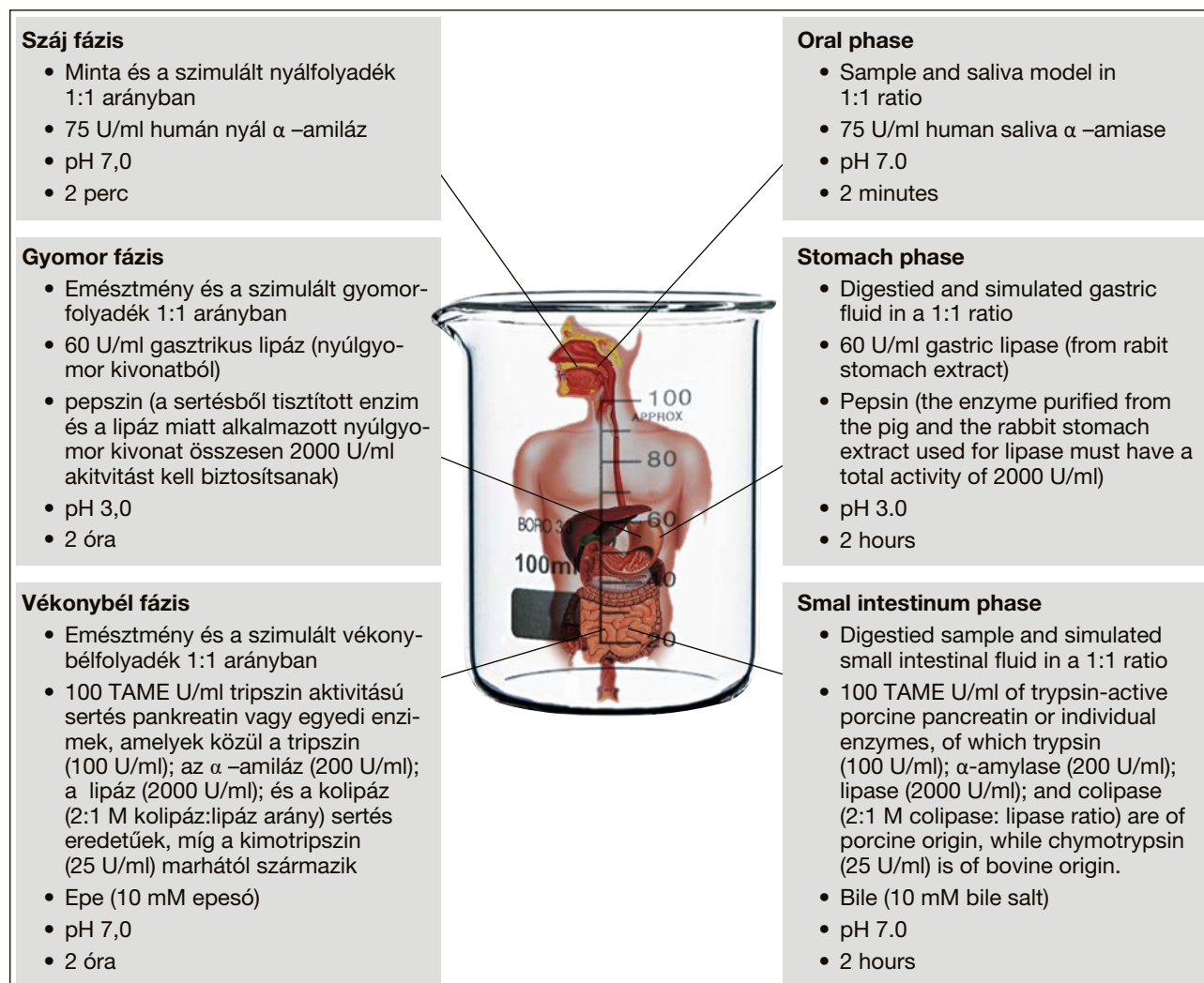
rek hatását is vizsgálták, pl. a foszfolipidek, egyedi enzimek (gyomor lipáz) és emulgálószer, illetve ezek keverékei (pl. pankreatin, epe-sók) mennyisége/jelenléte, valamint az élelmiszer/emésztőnedv arány is, és ezen említett paraméterek standardizálása is megtörtént.

A gyakorlatban való megvalósítás során a szájban 2 perces, gyomorban 2 órás és vékonybélben is 2 órás 37 °C-on zajló reakcióidőt javasoltak. A megfelelő fiziológias körülményeket nestereséges emésztőnedvek garantálják, amelyek összetétele elektrolit törzsoldatból, enzimekből, CaCl₂-ből és vízből áll. A szimulált nyálfolyadék pH-ja 7,0, a szimulált gyomorfolyadék pH-ja 3,0 és a szimulált vékonybélfolyadék pH-ja 7,0. A szimulált emésztőnedvek minden emésztési fázisnál állandó arányban (50:50 v/v) kerülnek a száj/gyomor/vékonybél tartalmakhoz; az emésztőenzimek aktivitása valamint a vékonybél-folyadékban használt epe kivonat koncentrációja (10 mM) a feltételezett fiziológias körülményeknek megfelelően szinten standardizált (pl. alfa-amiláz 75 U/ml, pepszin 2000 U/ml, pankreatin 100 TAME U/ml). A vékonybél fázis során a pankreatin mennyiségét általában a tripszin aktivitása határozza meg [45]. Ha a célkitűzések alapján a lipid vagy szénhidrát emésztés vizsgálatnak nagyobb

a jelentősége, vagy az enzim aktivitást pontosan kell szabályozni, a pankreatin helyett lehet egyedi enzimeket is (tripszin, kimotripszin, α-amiláz, lipáz és kolipáz) alkalmazni [18, 23, 45]. Az egyedi enzimek alkalmazásának hátránya az, hogy a protokoll kivitelezése során kimaradnak az olyan pankreatikus proteázok, mint az elasztáz és a karboxipeptidáz [51], amelyeknek meghatározó szerepe lehet bizonyos bioaktív peptidek vizsgálata esetén [19].

Azt figyelembe kell vennünk, hogy az INFOGEST protokoll a kefeszegély membrán hidrolázok általi lebontási folyamatot nem modellezi [48]. Ennek oka, hogy ezen enzimek kereskedelmi forgalomban nem kaphatók és működésükről sem rendelkezünk elegendő ismerettel [8, 23]. Napjainkban azonban olyan tanulmányok láttak napvilágot, amelyek az INFOGEST protokoll által előírt lépéseken kívül sertés jejunum kefeszegély enzimeket alkalmaztak [48, 52, 53]. Egyes kutatócsoportok a kefeszegély glikozidázokat gomba amiloglükozidázzal helyettesítették [54, 56].

Az INFOGEST módszer hiányosságaira a különböző élelmiszer komponensek vizsgálata során derül fény. Szükség van pl. többek között a lipofil összetevők



4. ábra. INFOGEST in vitro humán emésztési protokoll [23, 45]; (rajz: [49])
Figure 4. INFOGEST in vitro human digestion protocol [23, 45]; (sketch: [49])

(pl. karotinoidok, növényi szterolok) esetében olyan módszerfejlesztésre, amely biztosítja a micellákba ágyazott lipofil komponensek kivonását, hiszen a sejtek valójában a lipofil komponenseket micellákba rendeződve veszik fel. Így sorsuk nyomonkövethetővé, mennyiségük megbízhatóan mérhetővé válik [13, 24, 57]. Egyelőre a micellák kialakulását befolyásoló tényezők (epesók, lipáz, lipidek, emésztmény keverésének intenzitása) hatásáról kevés ismeretünk van, a standardizálásra egyelőre nincs lehetőség [19, 23].

A vékonybélszakasz modellezése során a fény és/vagy az oxigén jelenléte hatással lehet a mintában található fitokemikáliára (pl. karotinoidok, polifenolok) és a mikrotápanyagokra (pl. vas ionok) [18, 23, 58]. A fitokemikália bioaktivációjában, metabolizmusában a bél mikrobiótának is szerepe van [18, 23]. A gasztrointesztinális baktériumok például a higany kémiai kötési formáját (a veszélyesebb metil higany előfordulását) és a biológiai hozzáférhetőségét is befolyásolják [59, 60]. A fény, oxigén és mikrobióta hatásának az alaposabb megértése elősegítheti az *in vitro*- *in vivo* korrelációk megállapítását, valamint a standardizálást az olyan specifikus vizsgálatok esetére, amiket ezek a tényezők befolyásolhatnak [23].

A biológiai hozzáférhetőség mérése, predikciós vizsgálatok során az INFOGEST modell alapján javasolt a különböző összetevők elválasztása az emésztetlen frakciótól, amit oldhatóság (centrifugálás és/vagy szűrés) vagy dializálhatósági vizsgálatokkal lehet megvalósítani [19, 23, 45]. A dialízis beépítése egy *in vitro* emésztési modellbe nemcsak a biológiai hozzáférhetőség mérése miatt lenne fontos, hanem egyrészt azért is mert így nem halmozódnak fel azok a termékek, melyek az emésztőenzimeket gátolhatják [18], másrészt pedig szükségessé válik, ha az emésztményt sejt kultúra alapú [61] vagy mikrobiológiai [62] vizsgálatokhoz szeretnénk felhasználni. Az *in vitro* emésztési modellekben alkalmazott dialízis paraméterei nagyon változatosak, szükség lenne ennek standardizálása is.

3. Köszönetnyilvánítás

A publikáció a COST Action FA1005, valamint a „Tématerületi Kiválósági Program” TUDFO/51757-1/2019-ITM támogatásával készült.