

# Sviluppo e validazione di una piattaforma innovativa per lo studio *in vitro* dei diversi meccanismi di assorbimento intestinale

Dispositivo fluidico multi-camera (MIVO®) con inserti di tessuto 3D

Ilaria Pulsoni<sup>1</sup>, Jan Markus<sup>2</sup>, Seyoum Ayeahunie<sup>3</sup>, Silvia Scaglione<sup>1,4</sup>, Helena Kandarova<sup>5</sup>, Maurizio Aiello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>React4life, Genova - i.pulsoni@react4life.com

<sup>2</sup>MatTek In Vitro Life Science Laboratories, Bratislava, Slovacchia

<sup>3</sup>MatTek Corporation, Ashland, MA, USA

<sup>4</sup>CNR-IEIT Institute, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova

<sup>5</sup>Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovacchia

Parole chiave: Modelli *in vitro*, Modelli di tessuto 3D, Bioreattore fluido-dinamico, Barriera intestinale, Assorbimento paracellulare e transcellulare

## SUMMARY

### *In vitro* demonstration of different sugars intestinal absorption mechanisms using 3D organotypic tissues in a fluidic device

Intestinal permeability is crucial in regulating the bioavailability and the biological effects of drugs and compounds. However, systematic and quantitative studies of absorption of molecules are quite limited due to the lack of reliable experimental models able to mimic *in vivo* responses. In this work, we present a novel platform as *in vitro* fluidic model of healthy and pathological small intestinal barrier using 3D reconstructed intestinal epithelium integrated with a fluid-dynamic bioreactor resembling the physiological stimuli of the intestinal environment (MIVO®). The platform has been investigated, both in healthy and calcium depletion-induced pathological conditions, by monitoring the absorption of two non-metabolized sugars, lactulose and mannitol, involved in two different routes of drug absorption (paracellular and transcellular), and by assessing the capability of the damaged tissue to undergo a self-wound healing process. The results showed that an *in vivo*-like plateau of the percentage of absorbed sugars was reached for lactulose and mannitol and that the mannitol absorbed was much greater than the lactulose, in line with clinical data, thus revealing the good reliability of the model. Interestingly, after calcium depletion, the pattern of lactulose passage comparable with the healthy tissue was completely restored only in dynamic conditions within MIVO® chamber, due to the beneficial role of the dynamic fluid flow beneath the membrane. Therefore, the MIVO® combined with EpiIntestinal™ tissue model can represent a reliable *in vitro* model of healthy and pathological small intestinal barrier to study the passage of molecules, by discriminating the two main intestinal absorption mechanisms.

## Riassunto

La permeabilità intestinale è cruciale nel regolare la biodisponibilità e gli effetti biologici di farmaci e composti alimentari. Tuttavia, studi quantitativi sull'assorbimento di molecole sono piuttosto limitati, a causa della mancanza di modelli sperimentali affidabili e in grado di riprodurre le risposte che si osservano *in vivo*. In questo studio è presentato un dispositivo innovativo che costituisce un modello fluidico *in vitro* di barriera dell'intestino tenue, in cui l'epitelio intestinale ricostruito in 3D viene integrato con un bioreattore fluido-dinamico che simula gli stimoli fisiologici dell'ambiente intestinale (MIVO®).

Tramite tale dispositivo è stato studiato l'assorbimento del lattulosio e del mannitolo, due zuccheri non metabolizzati dall'intestino e coinvolti in due diverse vie di assorbimento (paracellulare e transcellulare). Lo studio è stato effettuato simulando sia condizioni sane sia patologiche per valutare la capacità del tessuto danneggiato di sottoporsi a un processo di auto-guarigione: nello specifico, le condizioni patologiche sono state indotte da un processo di chelazione di calcio che ha portato al disassemblaggio delle aderenze cellula-cellula, rendendo la membrana più permeabile.

I risultati hanno mostrato una cinetica di passaggio degli zuccheri fino al raggiungimento di un *plateau* e, in particolare, l'assorbimento del mannitolo è risultato maggiore di quello del lattulosio; ciò è in linea con i dati clinici relativi ai processi transcellulari/paracellulari e rivela una buona affidabilità del modello utilizzato. È interessante notare che, dopo chelazione del calcio, la permeabilità

dell'intestino e il relativo passaggio del lattulosio è stata completamente ripristinata, solo in condizioni dinamiche all'interno della camera MIVO<sup>®</sup>, grazie alla presenza di un flusso controllato rasente la membrana intestinale. Pertanto, il dispositivo MIVO<sup>®</sup>, combinato con un modello di tessuto 3D (EpiIntestinal<sup>™</sup>), può rappresentare un modello *in vitro* affidabile di barriera dell'intestino tenue per lo studio del passaggio di molecole, poiché è in grado di discriminare i due principali meccanismi di assorbimento intestinale.

## Introduzione

L'epitelio intestinale è il principale punto di accesso alla circolazione sistemica di nutrienti e farmaci assunti per via orale (1). Le molecole possono penetrare la barriera intestinale tramite due principali vie parallele: la via transcellulare, passando attraverso la membrana cellulare, e la via paracellulare, che si serve degli spazi intercellulari (2).

Studi sull'assorbimento intestinale delle molecole, che considerano l'importanza di questi due percorsi alternativi di assorbimento, sono spesso limitati, a causa della mancanza di modelli sperimentali ampiamente accettati (3). L'uso di modelli animali per valutare la tossicità gastrointestinale e la riparazione del tessuto comporta un'inadeguata riproducibilità, oltre ai problemi etici e costi elevati (4). Sebbene i test sugli animali riproducano inevitabilmente gli stimoli dinamici dell'ambiente intestinale, garantiti dalla circolazione sistemica del sangue, è impossibile distinguere selettivamente e disaccoppiare tutte le variabili coinvolte nel passaggio delle molecole attraverso la barriera nei tessuti intestinali umani e animali (5).

Per questi motivi, vi è un crescente interesse nello sviluppo di modelli avanzati *in vitro*, in cui i parametri chiave, come la permeabilità e l'integrità intestinale, possono essere facilmente controllati e monitorati con una riduzione di tempi e costi.

I più recenti modelli *in vitro* di epitelio intestinale umano si basano sulle colture statiche di monostrati di cellule epiteliali intestinali derivate da adenocarcinoma del colon (ad esempio le Caco-2), che non riproducono fedelmente la produzione di muco o la differenziazione dei villi intestinali e quindi non sono rappresentativi della fisiologia intestinale umana.

Recentemente sono state sviluppate le colture umane 3D per superare questi limiti: questi modelli di tessuto

intestinale utilizzano cellule intestinali umane primarie per produrre una struttura epiteliale altamente differenziata e polarizzata con diversi fenotipi cellulari come enterociti, cellule calciformi mucipare, cellule di Paneth, cellule enteroendocrine e *tuft cells*. Tuttavia, questi tessuti ricostruiti in 3D sono generalmente coltivati in condizioni statiche e mancano di stimoli fluidici fisiologici tipici del microambiente *in vivo* (6).

Pertanto, questo studio propone un nuovo approccio *in vitro* che combina i vantaggi dei tessuti umani 3D e le condizioni di flusso necessarie per imitare l'ambiente fisiologico. I risultati derivanti da test eseguiti su tessuti intestinali sottoposti a tale microambiente fluidico potrebbero predire la risposta cellulare *in vivo* e rendere questo modello di tessuto intestinale 3D un affidabile approccio complementare all'uso degli animali, in conformità con il principio delle 3R (*Reduce, Refine, Replace*, ovvero riduzione, miglioramento e sostituzione) descritto da Russell e Burch già nel 1959.

L'approccio qui descritto prevede un modello di tessuto di epitelio intestinale umano (EpiIntestinal<sup>™</sup>) integrato con un bioreattore fluidico (MIVO<sup>®</sup>) per simulare il microambiente fisiologico dell'intestino tenue.

Inoltre, è stato implementato un modello di permeabilità intestinale alterata attraverso la chelazione del calcio (7) per lo studio delle vie di assorbimento intestinale in condizioni patologiche e del successivo recupero del tessuto. In particolare, la perturbazione della barriera intestinale da parte di composti o biomolecole può comprometterne la funzione e consentire l'ingresso microbico che può portare a condizioni patologiche come la celiachia (7), il Morbo di Crohn (8) e malattie infiammatorie intestinali (9).

In questo modello, il Ca<sup>2+</sup> extracellulare è stato ridotto dall'aggiunta del chelante EGTA specifico per il calcio (etilenglicole-bis (β-amminoetil etere) -N, N, N', acido N-tetraacetico), noto anche come acido egazico, che ha portato a un progressivo disassemblaggio delle giunzioni strette o *tight junctions*, ovvero le giunzioni cellula-cellula essenziali per mantenere l'integrità della barriera epiteliale (10,11).

I modelli proposti di barriera intestinale sana e patologica sono stati caratterizzati monitorando il passaggio di due zuccheri non metabolizzati, lattulosio e mannitolo, coinvolti in due diverse vie di assorbimento (paracellulare e transcellulare) e comunemente adottati nella pratica clinica per monitorare la permeabilità intestinale dei pazienti (12). Il mannitolo è una piccola molecola

(diametro molecolare di 6,5 Å; MW: 182,172 g/mol) trasportata per diffusione principalmente attraverso i pori presenti sulla superficie dei villi. Al contrario, il lattulosio è un disaccaride (diametro molecolare: 9,5 Å; MW: 342,296 g/mol) che si muove per diffusione passiva attraverso spazi più ampi tra le cellule (12-14). Inoltre, la capacità di recupero spontanea dell'epitelio intestinale è stata valutata quantificando i livelli di lattulosio e mannitolo passati attraverso la barriera intestinale.

## Materiali e metodi

### Modello *in vitro* di tessuto intestinale ricostruito in 3D - Epilntestinal™

Il modello 3D di tessuto intestinale basato su cellule umane è il tessuto Epilntestinal™ (SMI-100) (MatTekCorp e IVLSL, Ashland, MA, USA e Bratislava, Slovacchia) che riproduce le caratteristiche di base dell'intestino tenue umano *in vitro* (Fig.1). Questo modello di tessuto 3D è coltivato in inserti (*transwell*) all'interfaccia aria-liquido (ALI) per consentire condizioni di esposizione fisiologica (luminale). Epilntestinal™ riproduce molti aspetti della normale funzione intestinale, tra cui la risposta infiammatoria, le funzioni della barriera e il metabolismo, risultando simile al tessuto intestinale umano. Il modello incorpora enterociti, cellule di Paneth, cellule M, *tuft cells* e cellule staminali intestinali all'interno di un epitelio polarizzato e altamente differenziato. Inoltre, Epilntestinal™ presenta, in corrispondenza della superficie apicale del tessuto, *tight junctions* funzionali e microvilli con orletti a spazzola.

### Test di permeabilità agli zuccheri

Gli studi di diffusione *in vitro* sono stati eseguiti utilizzando un dispositivo fluidico compartimentale (MIVO®, commercializzato come da React4life). Il sistema di diffusione progettato e realizzato in questo lavoro è mostrato schematicamente nella Figura 2.

In breve, un inserto Epilntestinal™ è stato posizionato

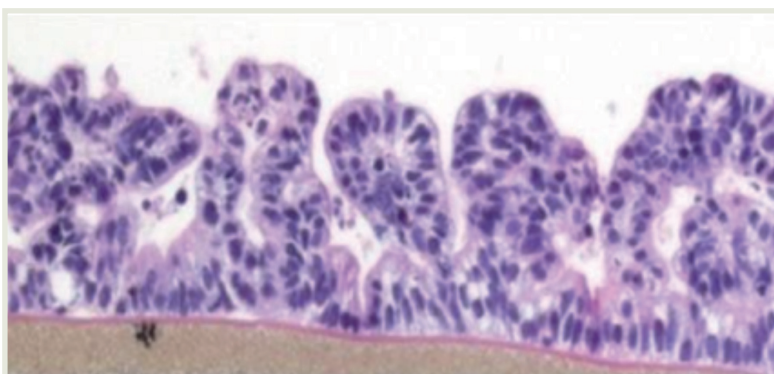
e coltivato all'interno del bioreattore, in maniera tale da ottenere due camere fluidicamente indipendenti: la Donor Chamber, che è stata riempita con una soluzione di zucchero (lattulosio o mannitolo) a diverse concentrazioni, e la Receiver Chamber, collegata a un circuito fluidico riempito con soluzione salina. Il circuito fluidico è stato successivamente collegato a una pompa peristaltica, con lo scopo di far fluire la soluzione salina attraverso la camera inferiore a una velocità di 0,1 cm/s, simulando così la portata capillare (15).

Il lattulosio (Roche, Basilea, Svizzera) è stato utilizzato a due diverse concentrazioni: 55,5 e 44,4 mg/ml. Dopo diversi tempi di esposizione (30, 60, 90, 120, 150 minuti), la soluzione circolante nella Receiver Chamber è stata raccolta e la quantità di lattulosio permeato attraverso l'epitelio è stata misurata spettrofotometricamente (UV/Vis, UV-3100PC, VWR Collection), alla lunghezza d'onda di 276 nm.

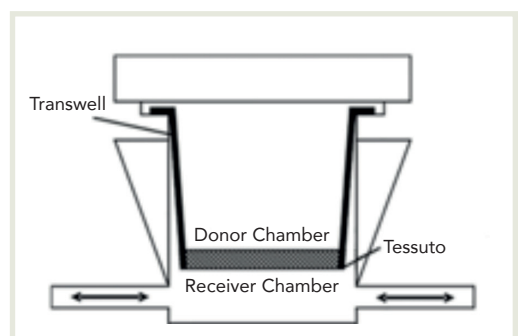
Per il test di permeabilità al mannitolo è stata utilizzata una soluzione di mannitolo (Dufour) a due concentrazioni (105 e 210 mg/ml), come precedentemente descritto (12). Dopo un tempo di esposizione di 240 minuti, la quantità di mannitolo permeato attraverso il tessuto intestinale è stata misurata utilizzando il kit K-Manol di Megazyme (Bray, Co, Wicklow, Irlanda) secondo le istruzioni del produttore (limite di quantificazione=0,50 mg/L).

Le concentrazioni di lattulosio e mannitolo sono state scelte tenendo in considerazione la fattibilità dell'esperimento e la sua affidabilità dal punto di vista clinico.

Nello specifico sono state utilizzate concentrazioni il più possibile simili a quelle impiegate in clinica (12), e che allo stesso tempo avrebbero potuto essere analizzate dalla strumentazione in dotazione. In particolare, l'intento di validare il sistema fluidodinamico in condizioni diverse, nonché di valutare il trend di assorbimento e gli eventuali effetti dose-dipendenti, si è concretizzato nella scelta di impiegare concentrazioni iniziali di mannitolo che differiscono del 50%. La permeabilità al lattulosio



**Figura 1** - Immagine istologica del modello Epilntestinal™ (SMI-100). Colorazione ematossilina-eosina



**Figura 2** - Rappresentazione schematica del sistema fluidico e del tessuto Epilntestinal™ utilizzato come tessuto di interfaccia (*Interfacing tissue*) all'interno della camera MIVO® per i test di assorbimento

e al mannitolo è stata espressa in termini di percentuale di permeazione relativa alla quantità applicata e calcolando i rapporti lattulosio/mannitolo (*Lactulose Mannitol Ratio*, LMR).

### Modello di permeabilità intestinale alterata e suo recupero

Per alterare le proprietà di barriera del modello EpilIntestinal™, il mezzo di mantenimento SMI-100-MM, fornito insieme ai tessuti, è stato integrato con EGTA 25 mM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e aggiunto sia alla superficie apicale dei tessuti EpilIntestinal™ sia basolateralmente. Dopo 45 minuti di incubazione in condizioni di coltura standard (SCC), ovvero in incubatore umidificato sterile a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $5 \pm 1\%$  di  $\text{CO}_2$  e  $95 \pm 5\%$  di umidità relativa, è stato eseguito un test di permeabilità e sono stati valutati gli effetti dell'EGTA. Per valutare la capacità dei tessuti di riparare il danno indotto dalla deplezione del calcio, gli inserti EpilIntestinal™ sono stati incubati per 24 ore in terreno di mantenimento SMI-100-MM in SCC. I tessuti sono stati utilizzati per i test di permeabilità sia in condizioni statiche sia dinamiche.

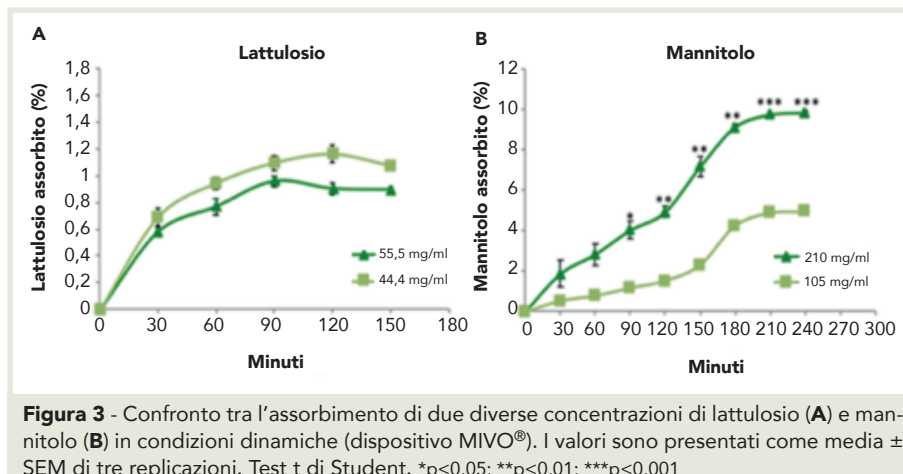
### Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM (errore standard della media). La significatività statistica tra i gruppi è stata valutata mediante Test t di Student a due code e Anova 1.

## Risultati

### Test di permeabilità degli zuccheri su tessuto EpilIntestinal™

Come mostrato nella Figura 3, la cinetica dell'assorbimento del lattulosio è simile nelle due diverse concen-



**Figura 3** - Confronto tra l'assorbimento di due diverse concentrazioni di lattulosio (A) e mannitolo (B) in condizioni dinamiche (dispositivo MIVO®). I valori sono presentati come media  $\pm$  SEM di tre replicazioni. Test t di Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

trazioni e per entrambe viene raggiunta la stessa percentuale di zucchero assorbito. Il mannitolo assorbito, invece, è significativamente differente nelle due condizioni a diversa concentrazione, con valori di *plateau* più alti (circa 2X) per la concentrazione più alta.

I valori di *plateau* della percentuale di assorbimento (Tab. 1) sono stati raggiunti dopo 90 minuti per il lattulosio, mentre per il mannitolo lo stato stazionario è stato raggiunto dopo circa 3 ore. In particolare, circa l'1% di lattulosio è stato assorbito dopo 90 minuti (a diverse concentrazioni iniziali), mentre i valori di percentuale di assorbimento del mannitolo sono circa il 4% per la concentrazione iniziale più bassa e il 9% per quella più alta. Inoltre, dalle analisi sul passaggio degli zuccheri attraverso il modello di tessuto EpilIntestinal™, messo in coltura all'interno del bioreattore fluidico, è emerso che la percentuale di mannitolo assorbito è simile o, nella maggior parte dei casi, maggiore di quella del lattulosio per ogni istante temporale (Tab. 1), come riportato in letteratura (12).

Questi risultati evidenziano che il percorso di assorbimento dei due zuccheri è profondamente diverso, come confermato dalla procedura clinica che infatti si serve abitualmente dell'indice LMR nell'esame delle urine per studiare l'eventuale danno intestinale dei pazienti. A conclusione del test di permeazione, il valore LMR è stato derivato dal rapporto tra i valori del *plateau* di lattulosio (L) e mannitolo (M), come riportato in letteratura

		minuti									
		0	30	60	90	120	150	180	210	240	
conc. (mg/ml)		media $\pm$ SEM della % assorbita									
Lattulosio	44	0	0,69 $\pm$ 0,20	0,94 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,17	1,16 $\pm$ 0,20	1,08 $\pm$ 0,05				
	55	0	0,58 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,18	0,96 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,13	0,89 $\pm$ 0,07				
Mannitolo	105	0	0,53 $\pm$ 0,48	0,79 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,17	2,32 $\pm$ 0,27	4,25 $\pm$ 0,38	4,87 $\pm$ 0,28	4,93 $\pm$ 0,25	
	210	0	1,87 $\pm$ 2,63	2,84 $\pm$ 2,12	4,02 $\pm$ 1,79	4,93 $\pm$ 1,11	7,16 $\pm$ 1,98	9,11 $\pm$ 0,32	9,73 $\pm$ 0,10	9,83 $\pm$ 0,01	

**Tabella 1** - Media e deviazione standard della percentuale di assorbimento di lattulosio e mannitolo nelle due concentrazioni nel tempo. L'analisi statistica eseguita con Anova 1 ha dimostrato che le percentuali di assorbimento di lattulosio e mannitolo raggiungono un *plateau* dopo 90 e dopo 180 minuti rispettivamente

(12). Tale valore risulta essere 0,03, 0,02 e 0,01 (Tab.2) a seconda della concentrazione iniziale di lattulosio e mannitolo utilizzata. È interessante notare che i valori di LMR misurati, in particolare quello di 0,01, risultano essere in linea con i valori di tessuto intestinale sano riportati nella pratica clinica (12,16).

### Test di permeabilità degli zuccheri su tessuto con alterazioni delle giunzioni intracellulari

Gli stessi test di permeabilità sono stati ripetuti dopo il trattamento con EGTA per valutare gli effetti del progressivo disassemblaggio delle giunzioni tra le cellule

sulle due diverse vie di assorbimento. La percentuale di lattulosio passato attraverso la membrana è stata significativamente più alta dopo il trattamento con EGTA ( $p < 0,05$ ); viceversa, non sono state osservate differenze significative nell'assorbimento del mannitolo, a conferma delle diverse vie di assorbimento dello zucchero (Fig.4).

### Test di permeabilità del lattulosio dopo il recupero fisiologico del tessuto

Per valutare la capacità di riparazione del modello di tessuto 3D qui utilizzato in seguito al trattamento con EGTA, i campioni di tessuto sono stati incubati per 24

ore nel mezzo smi-100 completo e i test di permeazione sono stati ripetuti. Poiché il trattamento con EGTA influisce solo sulla via paracellulare dell'assorbimento intestinale, come mostrato anche nella Figura 4, questo test è stato eseguito solo su lattulosio. Dopo il trattamento di deplezione del calcio extracellulare è stata valutata la capacità di riparazione del modello di tessuto Epilntestinal™. In particolare, i tessuti sono stati posizionati per 24 ore in mezzo completo e i test di assorbimento del lattulosio sono stati ripetuti in condizioni sia statiche sia dinamiche. È interessante notare che il modello del passaggio del lattulosio, che era stato osservato precedentemente per il tessuto sano, è stato completamente ripristinato solo in condizioni dinamiche all'interno della camera MIVO® (Fig.5A). Inoltre, la misura LMR dei tessuti danneggiati è risultata più alta (come è possibile osservare in Tabella 3) rispetto a quella misurata nei tessuti sani, in linea con i risultati clinici che riportano valori progressivamente più alti fino a valori significativamente elevati durante la patogenesi di molte malattie gastrointestinali.

È interessante notare che, quando l'esperimento è stato effettuato all'esterno della camera

	Concentrazioni iniziali (mg/ml)	% assorbimento	mg	mol	LMR (molLat/molMan)
Lattulosio	44	1,16	0,10	0,30	0,03 (Lat: 44 mg/ml, Man: 105 mg/ml)
	55	0,90	0,08	0,23	0,01 (Lat: 55 mg/ml, Man: 105 mg/ml)
Mannitolo	105	4,87	2,05	11,23	0,02 (Lat: 44 mg/ml, Man: 210 mg/ml)
	210	9,73	4,08	22,42	0,01 (Lat: 55 mg/ml, Man: 210 mg/ml)

Tabella 2 - Indici LMR del tessuto sano (Epilntestinal™). Le % di assorbimento del lattulosio sono quelle misurate a t=120 minuti, mentre quelle di assorbimento del mannitolo si riferiscono a t=210 minuti

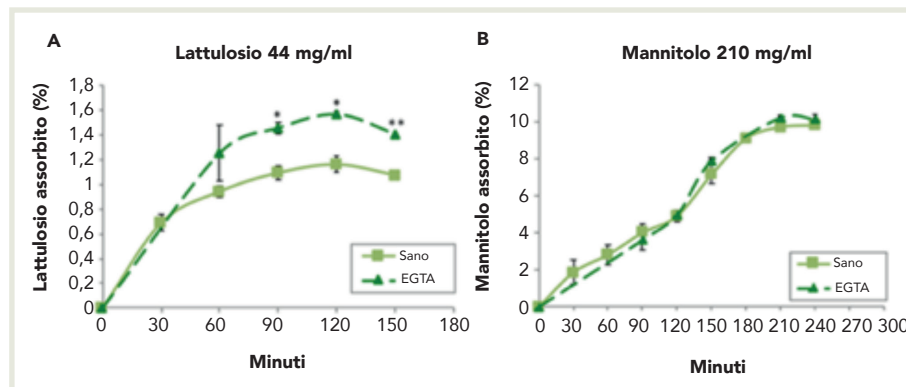


Figura 4 - Assorbimento di lattulosio (A) e mannitolo (B) in condizioni sane e patologiche. I valori sono presentati come media ± SEM di tre replicazioni per gruppo. Test t di Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

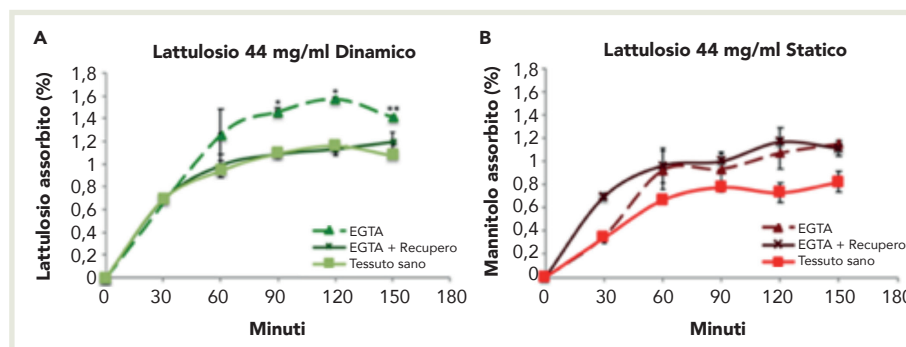


Figura 5 - Assorbimento del lattulosio in condizioni dinamiche (A) e statiche (B), dopo il recupero del tessuto. I valori sono presentati come media ± SEM, tre replicazioni per gruppo. Test t di Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

	% assorbimento	mg	mol	LMR (molLat/molMan)
<b>EpilIntestinal™</b>				
Lattulosio	1,16	0,10	0,30	0,01
Mannitolo	9,73	4,08	22,42	
<b>EGTA</b>				
Lattulosio	1,57	0,14	0,40	0,02
Mannitolo	10,25	4,30	23,62	

**Tabella 3** - Indici LMR del tessuto sano (EpilIntestinal™) e alterato nelle giunzioni cellulari (EGTA). Le % di assorbimento del lattulosio sono quelle misurate a t=120 minuti; quelle di assorbimento del mannitolo si riferiscono a t=210 minuti. Le concentrazioni iniziali degli zuccheri, considerate nel confronto degli indici LMR, sono di 44 mg/ml per il lattulosio e di 210 mg/ml per il mannitolo

MIVO® in condizioni statiche (**Fig.5B**), il tessuto EpilIntestinal™ non è riuscito a ripristinare la corretta funzione di barriera, mostrando una cinetica del passaggio del lattulosio più elevata rispetto al tessuto sano prima del trattamento con EGTA.

## Discussione e Conclusioni

L'epitelio intestinale ha una struttura cellulare ben organizzata: possiede diversi fenotipi cellulari e proprietà di barriera che possono inibire il passaggio del contenuto luminale in organi più distanti. In particolare, gli enterociti formano una sorta di barriera, essendo collegati tra loro da particolari strutture di legame intercellulari chiamate *tight junctions* che interagiscono con proteine intracellulari collegate al citoscheletro (2).

La riproduzione della barriera fisiologica, nella maggior parte dei modelli *in vitro* di epitelio intestinale, viene validata da misure di resistenza elettrica transepiteliale (TEER) (17). In generale, questa misura fornisce informazioni sullo stato di integrità della barriera dei tessuti intestinali; parametro che influenza direttamente il passaggio paracellulare di grandi molecole come il lattulosio. Al contrario, è difficile monitorare il passaggio di piccole molecole come il mannitolo, che potrebbero sfruttare anche altri meccanismi (ad esempio transcellulari) che principalmente coinvolgono le superfici apicali del tessuto.

Questo lavoro descrive un approccio *in vitro* che consente di monitorare nel tempo sia le vie paracellulari sia transcellulari comunemente analizzate in clinica per valutare la permeabilità intestinale del paziente. Le condizioni di coltura in flusso continuo consentono, inoltre, di studiare e misurare selettivamente lo stato sano del tessuto intestinale e gli effetti della perturbazione della membrana nel passaggio delle molecole di zucchero dalle superfici apicali a quelle basolaterali.

È stato dimostrato che la percentuale complessiva di mannitolo passato attraverso il tessuto intestinale è superiore a quella del lattulosio, in accordo con la letteratura e i dati clinici (18,19). Questi dati sono anche indicativi della buona affidabilità del modello: mentre l'assorbimento paracellulare è strettamente correlato all'integrità delle *tight junctions*, l'assorbimento transcellulare dipende dalla superficie cellulare disponibile, che è abbastanza elevata a causa della presenza di pieghe e strutture simili a villi.

È anche importante evidenziare che, mentre la percentuale di lattulosio passato in due ore raggiunge lo stesso valore di *plateau* a diverse concentrazioni, in termini di valore assoluto assorbito di lattulosio, i livelli di mannitolo passato sono significativamente diversi e proporzionali alle concentrazioni iniziali iniettate nella Donor Chamber. Una possibile spiegazione potrebbe essere che il tessuto dell'intestino umano adotti alcuni complessi processi di diffusione passiva, volti a mantenere costante la quantità finale di lattulosio nel sangue.

La cinetica dell'assorbimento del mannitolo, invece, è molto più veloce per concentrazioni più alte e segue la cinetica Michaelis-Menten di una tipica reazione catalizzata da enzimi, come riportato anche in letteratura (20,21).

Sebbene la valutazione del passaggio del lattulosio e mannitolo attraverso diverse vie intestinali sia una pratica clinica comune, ci sono ancora opinioni discordanti sul meccanismo di passaggio del mannitolo. Il modello transcellulare, inizialmente formulato da Menzies (22) e poi condiviso da altri scienziati e clinici (23,24), postula che la permeazione di molecole di raggio simili al mannitolo può avvenire attraverso numerosi e piccoli percorsi di diffusione situati nella membrana cellulare degli enterociti della mucosa, mentre il modello paracellulare (25,26) si basa sulla differenza nella struttura delle *tight junctions* nei villi, selettivamente permeabile ai soluti delle dimensioni di lattulosio.

Inoltre, per quanto è noto, non esistono studi sulla permeabilità intestinale *in vitro* di mannitolo e lattulosio che utilizzano tessuti intestinali 3D (disponibili in commercio e altamente riproducibili) in un ambiente fluidodinamico che riproduca le stesse condizioni del microambiente intestinale umano.

È interessante notare che in questo studio è stata dimostrata l'utilità del modello *in vitro* di tessuto intestinale tramite l'impiego del lattulosio come marcatore della via paracellulare e indicatore di integrità della barriera intestinale, e del mannitolo come marcatore della via transcellulare indicativo dell'assorbimento della mucosa. Questi nuovi risultati forniscono, dunque, una base teorica all'utilizzo dell'indice LMR come misura indiretta

e affidabile della permeabilità, e quindi della condizione sana del tessuto intestinale, come già comunemente adottato in clinica.

È inoltre interessante sottolineare che i risultati dell'assorbimento degli zuccheri nel modello di barriera patologica mostrati in questo studio rivelano che la quantità di lattulosio passato attraverso la membrana aumentava significativamente dopo il trattamento con EGTA, poiché il tasso di permeazione di grandi molecole come il lattulosio viene influenzato dal danneggiamento delle *tight junctions* (cioè percorso paracellulare).

L'alterazione di queste giunzioni, che aumenta la permeabilità della barriera epiteliale, si verifica attraverso la fosforilazione della miosina e la contrazione dei complessi actina-miosina, con un progressivo disfacimento delle *tight junctions* e dell'integrità della barriera epiteliale (10,11). Al contrario, non sono state osservate differenze significative nell'assorbimento del mannitolo, poiché il meccanismo di assorbimento per via transcellulare, apparentemente tipico del mannitolo, rimane costante nei tessuti sani e danneggiati (27).

L'epitelio intestinale è un tessuto altamente specializzato, formato da diverse popolazioni cellulari in continuo ricambio. Diversi studi hanno dimostrato la capacità dell'epitelio intestinale di ristabilire rapidamente la sua integrità a seguito di una lesione (28). Dopo il trattamento di deplezione del calcio, il modello di passaggio del lattulosio osservabile nel tessuto sano è stato completamente ripristinato solo in condizioni dinamiche all'interno della camera MIVO®. Ciò è probabilmente dovuto al ruolo benefico del flusso dinamico di fluido sotto la membrana, in grado di rimuovere l'accumulo di rifiuti e migliorare sia il trasporto di massa del sistema sia il *turn over* cellulare, contribuendo così alla guarigione del tessuto (29). Infatti, l'accumulo di prodotti di scarto, principalmente lattato, che può avvenire in colture statiche bidimensionali (2D), può portare a un'acidificazione del pH nel microambiente tissutale, compromettendo così la crescita cellulare (30).

L'alterazione della permeabilità è alla base della patogenesi di molte patologie gastroenterologiche, tra cui non solo l'enterocolite infettiva e le malattie infiammatorie croniche intestinali che comprendono la colite ulcerosa e la malattia di Crohn, ma anche la sindrome dell'intestino irritabile, la sindrome da proliferazione batterica dell'intestino tenue, la celiachia, le intolleranze alimentari e persino le manifestazioni atopiche (31). In questo contesto, quindi, la modellizzazione *in vitro* di un ambiente intestinale fluido-dinamico offre un approccio innovativo e utile per lo studio del recupero della funzione fisiologica della barriera intestinale a seguito di lesioni.

In conclusione, i risultati, qui riportati, indicano che il MIVO® combinato con Epilntestinal™ può rappresentare un modello *in vitro* affidabile di barriera dell'intestino tenue sana e patologica per lo studio del passaggio delle molecole, poiché riesce a discriminare i due principali meccanismi di assorbimento intestinale.

Inoltre, questo sistema potrebbe rappresentare uno strumento utile e *disposable* per testare gli effetti di terapie e farmaci sul corretto funzionamento della barriera intestinale.

## Bibliografia

- Ganapathy V (2012) Protein Digestion and Absorption. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5ª edizione. Elsevier, Amsterdam, pp 1595-1623
- Groschwitz KR, Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124(1):3-20
- Stewart BH, Chan OH, Lu RH et al (1995) Comparison of Intestinal Permeabilities Determined in Multiple *in Vitro* and *in Situ* Models: Relationship to Absorption in Humans. *Pharmaceutical Res* 12(5):693-699
- Holmes AM, Creton S, Chapman K (2010) Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. *Toxicology* 267(1-3):14-19
- Cao X, Gibbs ST, Fang L et al (2006) Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharmaceutical Res* 23(8):1675-1686
- Benam KH, Dauth S, Hassell B et al (2015) Engineered *In Vitro* Disease Models. *Annu Rev Pathol: Mechanisms of Disease* 10(1): 195-262
- Collares-Buzato CB, McEwan GT, Jepson MA et al (1994) Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured epithelia. *Biochim et Biophys Acta* 1222(2):147-158
- Söderholm JD, Olaison G, Lindberg E et al (1999) Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut* 44(1):96-100
- Halme L, Turunen U, Tuominen J (2000) Comparison of iohexol and lactulose-mannitol tests as markers of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest* 60(8):695-701
- Rothen-Rutishauser B, Riesen FK, Braun A et al (2002) Dynamics of Tight and Adherens Junctions Under EGTA Treatment. *J Membr Biol* 188(2):151-162
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4): 285-293
- Dasty M, Dasty M, Novotná H et al (2008) Lactulose/Man-

- nitrol Test and Specificity, Sensitivity, and Area under Curve of Intestinal Permeability Parameters in Patients with Liver Cirrhosis and Crohn's Disease.  
Dig Dis Sci 53(10):2789-2792
13. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D (1995) Intestinal permeability: an overview.  
Gastroenterology 108(5):1566-1581
  14. Sequeira IR, Lentle RG, Kruger MC *et al* (2014) Standardising the Lactulose Mannitol Test of Gut Permeability to Minimise Error and Promote Comparability.  
PLoS ONE 9(6) doi:10.1371/journal.pone.0099256
  15. Campbell N, Cain M, Minorsky P *et al* (2017) Campbell Biology, 11ª edizione. Pearson, New York.
  16. Barboza Junior MS, Silva TM, Guerrant RL *et al* (1999) Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases.  
Braz J Med Biol Res 32(12):1499-1504
  17. Srinivasan B, Koll AR, Esch MB *et al* (2015) TEER Measurement Techniques for *In Vitro* Barrier Model Systems.  
J Lab Autom 20(2):107-126
  18. Bijlsma PB, Peeters RA, Groot JA *et al* (1995) Differential *in vivo* and *in vitro* intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis.  
Gastroenterology 108(3):687-696
  19. Ukabam SO, Cooper BT (1984) Small intestinal permeability to mannitol, lactulose, and polyethylene glycol 400 in celiac disease.  
Dig Dis Sci 29(9):809-816
  20. Diallinas G, De Koning HP (2014) Understanding transporter specificity.  
Front Pharmacol 5:207
  21. Vivian D, Polli JE (2014) Mechanistic Interpretation of Conventional Michaelis-Menten Parameters in a Transporter System.  
Eur J Pharm Sci 64:44-52
  22. Menzies I (1984) Transmucosal passage of inert molecules in health and disease.  
In: Intestinal Absorption and Secretion. MTP Press Limited, Lancaster, pp 527-543
  23. Musa A, Kabir M, Hossain I *et al* (2019) Measurement of intestinal permeability using lactulose and mannitol with conventional five hours and shortened two hours urine collection by two different methods: HPAE-PAD and LC-MSMS.  
PlosOne 14(8) doi:10.1371/journal.pone.0220397
  24. Paroni R, Fermo I, Molteni L *et al* (2006) Lactulose and minnitol intestinal permeability by capillary electrophoresis.  
J Chromatogr B 834(1-2) doi:10.1016/j.jchromb.2006.02.050
  25. Hollander D (1992) The Intestinal Permeability Barrier: A Hypothesis as to Its Regulation and Involvement in Crohn's Disease.  
Scand J Gastroenterol 27(9):721-726
  26. Menard S, Lebreton C, Schumann M *et al* (2012) Paracellular versus Transcellular Intestinal Permeability to Gliadin Peptides in Active Celiac Disease.  
Am J Pathol 180(2):608-615
  27. Shaikh M, Rajan K, Forsyth CB *et al* (2015) Simultaneous gas-chromatographic urinary measurement of sugar probes to assess intestinal permeability: use of time course analysis to optimize its use to assess regional gut permeability.  
Clin Chim Acta 442:24-32
  28. Lacy ER (1988) Epithelial restitution in the gastrointestinal tract.  
J Clin Gastroenterol 10 Suppl 1:S72-77
  29. Kim HJ, Lee J, Choi JH *et al* (2016) Co-culture of Living Microbiome with Microengineered Human Intestinal Villi in a Gut-on-a-Chip Microfluidic Device.  
J Vis Exp (114) doi:10.3791/54344
  30. Chen X, Chen A, Woo TL *et al* (2010) Investigations into the Metabolism of Two-Dimensional Colony and Suspended Microcarrier Cultures of Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Media.  
Stem Cells Dev 19(11):1781-1792
  31. Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Gerardi V *et al* (2012) The Gut Barrier.  
J Clin Gastroenterol 46:S12-S17