

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Sede convenzionata

Dipartimento Univ. Clinico di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

I.R.C.C.S. BURLO GAROFOLO

XXIII CICLO del

Dottorato di Ricerca in

**Medicina materno-infantile, pediatria dello sviluppo e dell'educazione,
perinatologia**

(Ssd: Area 06-Scienze Mediche MED/38-pediatria generale e specialistica)

Modulazione fisiologica della permeabilità intestinale e assorbimento di molecole idrofiliche

Dottorando:

Dott.ssa Luigina De Leo

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura
(Università di Trieste)

Tutore e Relatore:

Dott. Tarcisio Not
(Università di Trieste)

Anno Accademico 2009-2010

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Premessa	4
1.2 Struttura della barriera gastrointestinale	4
1.3 Dinamicità delle TJ	8
1.4 Modulazione delle TJ	10
1.4.1 Modulazione diretta sulle componenti delle TJ	10
1.4.2 Modulazione mediante stimolatori dell'assorbimento e della permeabilità paracellulare	13
1.5 Malnutrizione, digiuno e permeabilità intestinale	17
1.6 Gli aminoglicosidi	17
2. SCOPO DELLA TESI	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Sostanze chimiche	22
3.2 Animali	22
3.3 Studio farmacocinetico	22
3.4 Studio della permeabilità intestinale: test dei due zuccheri	23
3.5 Dosaggio della tobramicina e degli zuccheri (L e R) nel plasma	23
3.6 Analisi farmacocinetica	23
3.7 Analisi statistica	24
4. RISULTATI	25
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	32
6. BIBLIOGRAFIA	38

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

La somministrazione dei farmaci per via orale è piuttosto vantaggiosa in quanto è sicura, efficace, facilmente accessibile e causa fastidi fisici minimi. Tuttavia molti composti, usati nel trattamento di patologie comuni, presentano un assorbimento intestinale fortemente limitato dalle loro caratteristiche fisico-chimiche. Infatti, mentre le molecole lipofile possono utilizzare la via transcellulare e passare attraverso le membrane cellulari, la maggior parte delle macromolecole idrofile deve utilizzare la via paracellulare e superare la barriera gastrointestinale [1].

1.2 Struttura della barriera gastrointestinale

Negli organismi multicellulari, le cellule interagiscono in maniera specifica e si organizzano per formare tessuti e organi. I tessuti epiteliali ed endoteliali sono di particolare importanza in quanto costituiscono le barriere necessarie al passaggio controllato di acqua, soluti e cellule da un compartimento ad un altro. Gli epiteli, come quello del tratto respiratorio o del tratto gastrointestinale, formano inoltre l'interfaccia tra gli ambienti esterno ed interno dell'organismo costituendo la prima linea di difesa da patogeni o tossine.

L'epitelio intestinale rappresenta la più ampia area del corpo in contatto con l'ambiente. È costituito dagli enterociti, cellule fondamentali per l'assorbimento dotate di una membrana cellulare a doppio strato fosfolipidico permeabile ai composti lipofili, ma non ai composti idrofili senza specifici trasportatori. Ne deriva che l'epitelio intestinale, oltre a essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti, regola anche l'omeostasi di acqua e ioni e funge da barriera protettiva per impedire ai patogeni, che arrivano nel lume intestinale, di superare la barriera epiteliale e provocare infiammazioni della mucosa. In condizioni normali con lo strato epiteliale intatto, le cellule sono connesse da due principali tipi di giunzioni intercellulari, le giunzioni serrate (tight junctions, TJ) e le giunzioni aderenti (adherens junctions, AJ), che controllano la permeabilità paracellulare attraverso gli spazi intercellulari. Nelle barriere epiteliali, le TJ e le AJ sono ben definite e distribuite: le TJ costituiscono la parte apicale, mentre le AJ sono localizzate

nella parte basolaterale sotto le TJ (Figura 1). Entrambe sono connesse al citoscheletro di actina.

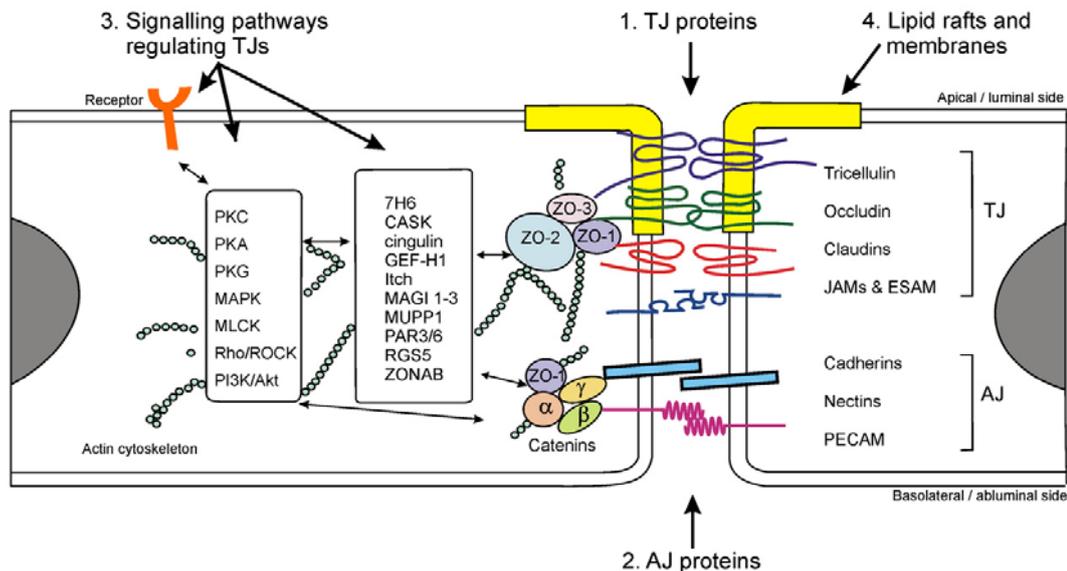


Figura 1. Componenti delle giunzioni strette (TJ) e delle giunzioni aderenti (AJ) e principali vie di segnalazione coinvolte nella loro regolazione

Le **giunzioni aderenti** sono il risultato di un'associazione complessa tra molteplici componenti e giocano un ruolo centrale nella formazione dei contatti tra cellule vicine e nella stabilizzazione dell'adesione. Una perdita delle giunzioni aderenti implica un'interruzione nei contatti cellula-cellula e cellula-matrice con una serie di conseguenze che portano all'apoptosi prematura [2].

Le caderine (120 kDa) sono componenti delle AJ e sono proteine con un segmento transmembrana e 5 domini extracellulari ripetuti che mediano, attraverso interazioni omofile, l'adesione cellulare Ca^{2+} -dipendente tra cellule adiacenti. Esistono diverse isoforme di caderina: E- (epiteliale), VE- (endotelio vascolare), N- (neurale), P- (placentare) e R- (retina) caderina. La E-caderina (conosciuta anche come caderina-1) è quella maggiormente distribuita nei tessuti epiteliali mentre la VE-caderina è espressa per lo più nelle cellule endoteliali [3, 4]. La coda citoplasmatica di E-caderina interagisce direttamente con la catenina $\delta 1$ (p120 catenina) e con la β -catenina. A sua volta, la β -catenina si lega all' α -catenina 1 che regola l'assemblaggio dell'actina locale e contribuisce allo sviluppo dell'anello perigiunzionale acto-miosinico [5]. Queste strutture possono

giocare un ruolo importante nell'organizzazione spaziale delle giunzioni strette e probabilmente nella regolazione della permeabilità paracellulare.

Le **giunzioni strette** sigillano lo spazio paracellulare e per il loro assemblaggio hanno bisogno delle giunzioni aderenti. Come si osserva in Figura 1, sono complessi multi-proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale), proteine periferiche di membrana (zonula occludens) e molecole regolatrici come le chinasi.

Le claudine (18-27 kDa) sono proteine con 2 loop extracellulari e un dominio citoplasmatico C-terminale. Costituiscono un'ampia famiglia genica in cui sono state identificate 24 isoforme che determinano la selettività della via paracellulare a livello di tessuto, carica e dimensione. Sono espresse in maniera tessuto-specifica e una mutazione o una delezione di uno dei membri di questa famiglia può avere notevoli effetti sulla funzione dell'organo [6, 7]. I dati ottenuti da esperimenti di transfezione indicano che le claudine -1, -3, -4, -5, -8, -11, -14 e -19 giocano un ruolo determinante per la selettività della barriera paracellulare [8]. Le claudine sono, inoltre, elementi chiave nella perdita di funzione della barriera durante la carcinogenesi e il processo metastatico [9]. La permeabilità degli ioni attraverso le TJ è regolata dalle claudine -4, -8 e -14 che sono coinvolte nella barriera cationica, mentre altre claudine come -2, -7 e -13 formano i pori paracellulari per cationi e anioni [6]. Nel tratto gastrointestinale sono espresse le claudine -2, -3, -4, -7, -8, -12 e -15, ma i livelli di espressione e la loro localizzazione subcellulare sono diversi nei diversi segmenti intestinali [6]. Il loro ruolo nell'organizzazione strutturale della barriera intestinale è stato enfatizzato da una recente scoperta secondo cui topi deficienti in claudina-15 mostrano un fenotipo da megaintestino con la parte superiore dell'intestino tenue due volte più grande del normale in termini di lunghezza e diametro [10].

Le occludine (65 kDa) sono proteine con 4 domini transmembrana e 2 loop extracellulari ed esistono in 2 isoforme. Il dominio C-terminale, localizzato nel citoplasma, si lega direttamente a ZO-1 (zonula occludens) che a sua volta lega la parte apicale dell'actina. Questa porzione di occludina è ricca di siti di fosforilazione (tiroxina, serina e treonina) che possono essere modificati dalle chinasi e dalle fosfatasi. L'occludina non fosforilata è distribuita nella membrana basolaterale e nelle vescicole citoplasmatiche, mentre l'occludina fosforilata è

localizzata nelle TJ e determina una ridotta permeabilità paracellulare [11, 12]. In topi deficienti in occludina sono state osservate alterazioni (infiammazioni croniche o iperplasie) in tutti quei distretti caratterizzati dalla presenza delle TJ suggerendo delle funzioni più complesse da attribuire all'occludina, il cui ruolo non è ancora del tutto noto [13].

Le molecole di adesione giunzionale (JAM) (32 kDa, 3 isoforme) contengono un segmento transmembrana e un dominio extracellulare. Sono proteine coinvolte nell'adesione tra le cellule della barriera e tra la barriera e le cellule del sangue [6, 7] e possono formare interazioni omofiliche ed eterofiliche con diversi ligandi tra cui le integrine. Possono, inoltre, interagire con partner come ZO-1 e il recettore proteasi-attivato PAR-3 [6].

Le proteine periferiche di membrana zonula occludens (ZO) sono cruciali per l'assemblaggio e il mantenimento delle TJ poiché possiedono domini multipli per l'interazione con altre proteine, incluse le proteine integrali di membrana e l'actina. Sul lato intracellulare della membrana, le estremità carbossi-terminali di claudina, occludina e actina interagiscono con le proteine ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) e ZO-3 (130 kDa). Queste proteine appartengono alla superfamiglia delle guanilato chinasi membrana-associate (MAGuK) e hanno un dominio guanilato chinasi enzimaticamente inattivo. Il complesso multiproteico delle TJ, fino ad ora descritto, è legato al citoscheletro di actina attraverso le proteine ZO che si legano alle proteine integrali di membrana con il dominio N-terminale e al citoscheletro di actina con il dominio C-terminale. La proteina che gioca il ruolo centrale è ZO-1 che direttamente e indirettamente collega le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina. Si è dimostrato che, come le occludine, ZO-2 e ZO-3 non possono interagire direttamente con i filamenti di actina poiché i loro domini C-terminali mostrano similarità soltanto verso ZO-1. Pertanto il legame al citoscheletro di actina è limitato a ZO-1 che ha il potenziale di organizzare le componenti strutturali e di modulare la via paracellulare [14].

Molte altre sono le proteine coinvolte nelle TJ: la tricellulina, il recettore per coxsackie e adenovirus (CAR), la molecola di adesione selettiva per cellula endoteliale (ESAM), JAM4, AF-6/afadina, PAR3, MUPP-1, cingulina, PILT (proteina incorporata successivamente nelle TJ) e JEAP (proteina giunzione-

arricchita e –associata). Tutto questo rende l'idea della complessa organizzazione delle TJ [6].

1.3 Dinamicità delle TJ

La permeabilità paracellulare è regolata da una serie di segnali, ma le vie di segnalazione che influenzano la funzione delle TJ e come queste vie vengano influenzate da eventi fisiopatologici sono concetti tuttora poco chiari.

Le principali vie di segnalazione che partecipano all'apertura delle TJ coinvolgono il sistema delle protein chinasi A, C e G (PKA, PKC, PKG), delle protein chinasi mitogeno-attivate (MAPK), delle Rho chinasi e delle miosin chinasi a catena leggera (MLCK) [15, 16] (Figura 1).

PKA è associata alle cellule endoteliali della barriera a livello cerebrale, PKG media l'apertura della barriera emato-encefalica [17, 18] e le convenzionali isoforme di PKC (α , β , II) partecipano all'apertura e al disassemblaggio delle TJ. Molti segnali fisiologici (rimozione del Ca^{2+} extracellulare o aumento del Ca^{2+} intracellulare) e patologici (stress ossidativo, citochine, fattori di crescita vascolare endoteliale, tossine) utilizzano la via di segnale della PKC che, una volta attivata, nelle cellule epiteliali aumenta la permeabilità paracellulare e inibisce l'assemblaggio delle TJ [15].

Le MAPK (in particolare la chinasi regolata da segnale extracellulare (ERK), la chinasi c-Jun N-terminale (JNK) e le isoforme p38) modulano la permeabilità paracellulare regolando l'espressione di diverse proteine delle TJ [15, 16].

RhoA, Rac1 e Cdc42 sono membri della famiglia delle Rho GTPasi ed esistono nella conformazione attiva (GTP-legata) e nella conformazione inattiva (GDP-legata) [19]. Recenti studi hanno dimostrato che queste proteine controllano il complesso di assemblaggio delle giunzioni, ma non sono del tutto noti i meccanismi utilizzati [20, 21]. È noto, però, che i meccanismi di fosforilazione delle tirosine e delle serin/treonine sono coinvolti nell'assemblaggio delle TJ e nelle alterazioni della permeabilità paracellulare. La proteina RhoA attiva interagisce con le vie di PKC e MLCK e, attraverso la fosforilazione delle proteine integrali di membrana (occludina e claudina-5) e delle proteine ZO-1 e

ZO-2, va ad alterare la permeabilità e a ridistribuire le componenti delle TJ [15, 22, 23].

In altre parole, Rho può interagire con diversi effettori e stimolare diverse vie di segnalazione. Tuttavia, la via principale include la Rho chinasi (ROK) che determina l'assemblaggio e la contrazione dei filamenti di acto-miosina fosforilando direttamente la miosina a catena leggera (MLC) e la MLC fosfatasi per inattivarla [24]. ROK fosforila direttamente anche la LIM-chinasi (una protein chinasi con 2 domini zing finger separati da 2 residui idrofobici) che così attivata va a fosforilare la cofilina, un fattore che viene inattivato con la fosforilazione. In questo modo ROK, via LIM-chinasi-cofilina, contribuisce all'organizzazione e alla stabilizzazione dei filamenti di actina impedendone la depolimerizzazione. Anche Rac e Cdc42 agiscono sulle TJ in quanto attivano PAK (una chinasi attivata via p21 (Rac/Cdc42)) che, via LIM-chinasi-cofilina, ha come effetto finale la stabilizzazione dei filamenti di actina (Figura 2).

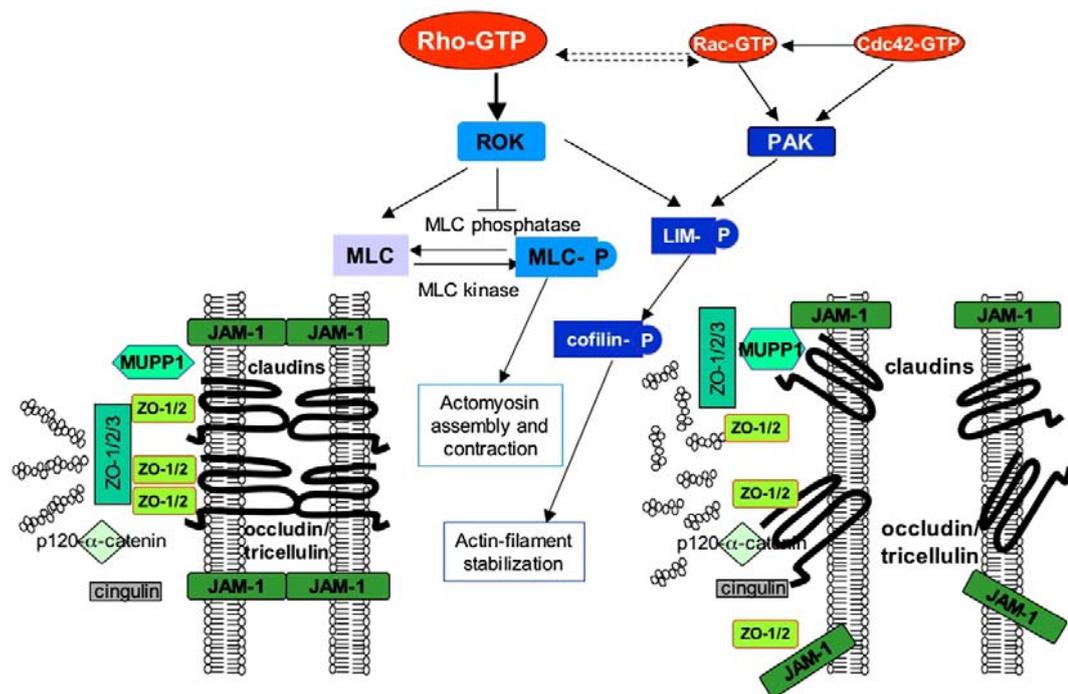


Figura 2. Regolazione delle giunzioni strette attraverso le proteine della famiglia Rho che usano diverse vie di segnalazione. La via principale coinvolge Rho-GTP che attiva ROK portando a contrazione e assemblaggio dell'actomiosina. Rac-GTP e Cdc 42-GTP attivano PAK portando alla stabilizzazione del filamento di actina.

1.4 Modulazione delle TJ

La conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano la via paracellulare permette la scoperta di nuovi modulatori che possono agire direttamente sulle componenti delle TJ oppure stimolare l'assorbimento e la permeabilità.

1.4.1 Modulazione diretta sulle componenti delle TJ

OCCLUDINA

L'occludina è la prima proteina delle TJ per cui è stata descritta la modulazione della permeabilità mediata dall'interazione di un peptide con il suo loop extracellulare. Il peptide OCC2 lungo 44 aminoacidi (aa) legandosi al secondo dominio extracellulare dell'occludina induce un aumento reversibile nella permeabilità cellulare con un aumentato turnover dell'occludina cellulare nelle cellule epiteliali del rene. L'effetto è specifico perché i livelli e la distribuzione di ZO-1, ZO-2, cingulina ed E-caderina restano inalterati dopo il trattamento con tale peptide [25].

Gli oligopeptidi di 9 e 10 aa, omologhi ai segmenti del primo loop esterno dell'occludina, impediscono in maniera reversibile la chiusura delle giunzioni sulle cellule epiteliali in coltura senza alterare la localizzazione di ZO-1 [26].

Il peptide OP₉₀₋₁₀₃ lungo 14 aa, corrispondente all'N-terminale del primo loop extracellulare dell'occludina e contenente un acido lipoaminico per proteggerlo da degradazione e aggregazione, aumenta la permeabilità delle TJ nelle cellule Caco-2 (cellule intestinali epiteliali derivate da adenocarcinoma intestinale umano) trattate a livello apicale [27]. L'effetto di questo peptide è rapido, transiente e non causa tossicità a breve termine. Nelle cellule epiteliali umane delle vie respiratorie alte riduce la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e aumenta il trasporto di destrano di 70 kDa in maniera concentrazione-dipendente. In seguito all'apertura delle TJ migliora l'efficienza di transfezione delle cellule epiteliali con vettori adenovirali, aumenta la penetrazione a livello della membrana basolaterale e determina maggiore legame e internalizzazione virale [28].

Un altro approccio per modificare la permeabilità è il taglio enzimatico delle proteine delle TJ. Der p1, uno dei principali allergeni ottenuto dall'acaro della polvere *Dermatophagoides pteronyssinus* e una proteinasi cisteinica, ha come

substrato il primo loop extracellulare dell'occludina umana e trova potenziali siti di taglio in entrambi i loop extracellulari della claudina-1 [29].

CLAUDINE

Le similarità di sequenza osservate tra le claudine -1 e -2 e il recettore clonato per l'enterotossina *Clostridium perfringens* (CPE), che causa avvelenamento alimentare, hanno portato a identificare il recettore per CPE nella claudina -4 [30]. CPE può legarsi anche alle claudine -3, -6, -7, -8 e -14 che sono la maggior parte delle claudine trovate nel tratto gastrointestinale. Nelle cellule epiteliali MDCK, ottenute da rene di cane, il frammento C-terminale di CPE (C-CPE), dominio di legame della tossina, rimuove selettivamente la claudina-4 dalle TJ che risultano disintegrate [31]; nelle cellule Caco-2 fa registrare una diminuzione nella TEER [32]. Nel ratto, a livello del digiuno, C-CPE aumenta l'assorbimento del destrano di 4 kDa e di 10 kDa ma non di quello di 20 e 40 kDa [33-35].

Queste osservazioni indicano che la claudina-4 può costituire un bersaglio dei modulatori delle TJ, come per C-CPE. Altri antagonisti della claudina-4, inclusi gli anticorpi e i frammenti anticorpali, possono avere il potenziale di aprire le TJ epiteliali e aumentare il trasporto paracellulare.

ZONULINA

Molti batteri alterano lo stato delle TJ molto probabilmente per favorire la loro crescita. *Vibrio cholerae* secerne diverse tossine e una di queste, la tossina zonula occludens (ZOT), è in grado di aumentare reversibilmente la permeabilità paracellulare interagendo con un recettore di superficie e attivando la via della PKC- α con conseguente contrazione dell'acto-miosina e disassemblaggio delle TJ [36]. Questa tossina batterica è stata usata per identificare l'analogo endogeno di mammifero che è stato definito zonulina. Zot e la zonulina condividono una sequenza N-terminale conservata che corrisponde a un putativo sito di legame [37]. Una glicoproteina di 45 kDa in grado di legare Zot e la zonulina è stata ritrovata nel cervello [38], nell'epitelio della regione nasale e nell'intestino tenue [39]. Questo dato è confermato e rafforzato da risultati ottenuti *in vivo* che evidenziano la specificità tissutale di Zot risultata attiva sul lato mucosale delle cellule endoteliali ed epiteliali della regione nasale, nel digiuno e nell'ileo, ma

non nel colon o nei reni [40]. Zot e la zonulina si legano anche alla β -tubulina e questa interazione potrebbe contribuire alla regolazione delle TJ [41].

Zot e i frammenti peptidici attivi ottenuti da Zot (Δ G e AT1002) hanno effetti sulla modulazione delle TJ e sulla stimolazione dell'assorbimento. Questi effetti sono stati dimostrati su molti modelli tra cui gli epitelii nasale e intestinale e le cellule endoteliali cerebrali in coltura. È stato dimostrato che Zot aumenta reversibilmente nei conigli la permeabilità intestinale all'insulina e alle immunoglobuline [42]; nelle cellule endoteliali di cervello riduce in maniera rapida e reversibile la TEER e aumenta la permeabilità paracellulare per marker come sucrosio e inulina e per gli agenti chemoterapici doxorubicina e paclitaxel [43]. In seguito a somministrazione nei topi per via rettale e intranasale, si è visto che Zot agisce anche come adiuvante mucosale nell'indurre risposte immunitarie protettive e durature all'ovalbumina e al tetanus toxoid [44].

Il frammento attivo di Zot, Δ G (12 kDa), migliora la biodisponibilità orale di farmaci idrofobici come la ciclosporina A, il ritonavir, il saquinovir e l'aciclovir [45].

Anche AT1002, frammento esapeptidico sintetico di Zot, fa registrare nei ratti un aumentato assorbimento intestinale della ciclosporina A [46] e nasale di marker idrofilici di 4 kDa come polietilenglicole (PEG) e inulina [47]. Oltre alla via intestinale e a quella nasale, AT1002 potrebbe facilitare anche la somministrazione polmonare di agenti terapeutici.

Sebbene il recettore di Zot e della zonulina e la relativa cascata di segnali che porta all'apertura delle TJ non siano stati del tutto descritti, i frammenti peptidici attivi di Zot sembrano essere degli agenti promettenti per migliorare con sicurezza ed efficacia la somministrazione di farmaci e vaccini attraverso la barriera mucosale e quella emato-encefalica.

E-CADERINA

I peptidi, ottenuti dal dominio EC-1 dell'E-caderina e contenenti la sequenza aminoacidica HAV, possono inibire l'adesione cellula-cellula mediata dall'E-caderina e modulare le giunzioni intercellulari [48, 49]. Oltre ai peptidi HAV, ne sono stati identificati altri contenenti la sequenza ADT. Sono entrambi esapeptidi che, interferendo con il legame omofilico dell'E-caderina, potrebbero ridurre in

maniera tempo- e dose-dipendente la TEER e aumentare il trasporto paracellulare del mannitolo attraverso la barriera epiteliale [49].

ALTRI TARGET

In un recente lavoro [50] sono stati identificati quattro gruppi di lipidi come modulatori reversibili e non tossici delle TJ. Il trattamento con lipidi potrebbe aumentare la permeabilità della barriera senza alterare la morfologia strutturale delle TJ. L'esatto meccanismo d'azione di questi modulatori lipidici non è noto, tuttavia non si può escludere che il loro bersaglio sia proprio la composizione lipidica della membrana cellulare.

1.4.2 Modulazione mediante stimolatori dell'assorbimento e della permeabilità paracellulare

L'apertura controllata e reversibile delle TJ nelle barriere biologiche attraverso stimolatori dell'assorbimento e della permeabilità paracellulare per facilitare la somministrazione dei farmaci è da anni un obiettivo della ricerca farmaceutica e biomedica.

CHELANTI

I chelanti del calcio, come l'acido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacetico (EDTA), l'acido etilenglicole-bis (estere beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacetico (EGTA) e l'acido 1,2-bis(o-aminofenossi)etan-N,N,N',N'-tetraacetico (BAPTA) attivano la via della PKC determinando un'alterazione delle AJ e delle TJ con un aumento della permeabilità paracellulare [51].

EDTA aumenta la permeabilità nelle cellule Caco-2 per il polietilenglicole 4000 [52], il furosemide, la carbossifluoresceina [53] e il destrano-FITC senza causare grave citotossicità [54]. EDTA, EGTA e BAPTA in un buffer ipotonico provocano un rapido e reversibile calo della TEER e aprendo le TJ intercellulari facilitano il trasferimento genico con retrovirus e adenovirus nelle cellule epiteliali umane delle vie aeree [55]. *In vivo* i chelanti, applicati agli epitelii della trachea in coniglio e agli epitelii nasali umani, riducono il voltaggio transepiteliale suggerendo un'apertura delle TJ epiteliali. Questi dati indicano un potenziale utilizzo dei chelanti come modulatori delle TJ.

ACIDI GRASSI, ACIDI GRASSI MODIFICATI E ESTERI DI FOSFATO

L'acido oleico è utilizzato nella somministrazione dei farmaci per via transdermica [56] ed è in grado di modulare la struttura delle membrane senza alterare in maniera significativa la struttura del doppio strato lipidico [57]. Nelle cellule Caco-2 [58, 59] riduce la TEER e aumenta il flusso del mannitolo disintegrando i contatti cellula-cellula. Anche nelle cellule epiteliali alveolari, l'acido oleico aumenta la permeabilità al mannitolo in maniera calcio-dipendente [60]. Negli studi animali l'acido oleico o un'emulsione di acido oleico, iniettato nell'arteria carotidea, induce un'apertura reversibile della barriera emato-encefalica [61, 62]. L'esatto bersaglio dell'acido oleico non è noto, ma è noto che, oltre ai suoi effetti sulla fluidità di membrana, l'acido oleico può aumentare la permeabilità paracellulare delle barriere dermica, gastrointestinale, alveolare ed emato-encefalica [56, 59-61].

Il caprato di sodio, un acido grasso a catena media (C10) e un costituente dei grassi del latte, è uno stimolatore dell'assorbimento usato nella terapia clinica. Nelle cellule Caco-2 aumenta la permeabilità al mannitolo ridistribuendo il citoscheletro, le proteine ZO-1 e occludina, e aprendo le TJ attraverso la pathway dell'inositolo trifosfato/diacilglicerolo fosfolipasi C dipendente [63, 64]. Il caprato di sodio aumenta la permeabilità delle TJ e il trasporto del polisucrosio anche nell'ileo del ratto [65], e la biodisponibilità dell'ampicillina negli umani dopo somministrazione rettale [66]. Nelle cellule epiteliali delle vie aeree si è osservato che tale composto provoca una redistribuzione della claudina-1 portando a una diminuzione della TEER e a un aumento nella permeabilità a mannitolo e destrano [67].

La palmitoil carnitina è un acido grasso estere a lunga catena (C16) che aumenta notevolmente l'assorbimento dei farmaci idrofilici attraverso la mucosa intestinale [68] e nelle cellule epiteliali Caco-2 [69] e determina l'apertura delle TJ e un rapido e reversibile calo nella TEER. Tuttavia determina anche una riduzione nella vitalità cellulare il che indica che questo composto è efficace, ma allo stesso tempo tossico [70].

SURFATTANTI

I surfattanti sono eccipienti ampiamente utilizzati nelle formulazioni orali, iniettabili e nasali [71, 72]. I surfattanti anionici, sintetici non ionici e i sali biliari

sono stati studiati in maniera approfondita per aumentare la permeabilità transepiteliale di diversi marker molecolari, di peptidi e farmaci, ma il loro effetto sulle TJ non è ben conosciuto.

Il sodio dodecil solfato (SDS), un surfattante anionico, ha un effetto immediato sulla permeabilità paracellulare delle cellule Caco-2 con calo della TEER, fa registrare aumentati livelli intracellulari di calcio e apertura delle TJ. Una breve incubazione delle cellule con SDS provoca un aumento reversibile della permeabilità al mannitolo, mentre un'esposizione prolungata causa cambiamenti irreversibili con danno alla membrana apicale e tossicità cellulare [73, 74].

I surfattanti non ionici (polisorbato 20, ossietilene etere Solulan C24 e C16) hanno mostrato un aumentato trasporto paracellulare di metformina e un calo della TEER, anche se l'aumentata permeabilità è accompagnata da una diminuita vitalità cellulare nelle Caco-2 [75]. Gli etossilati nonilfenoli possono aprire in maniera rapida e reversibile le TJ e incrementare il trasporto di mannitolo e daunorubicina, ma anche questi surfattanti non ionici causano cambiamenti irreversibili nei trattamenti a lungo termine [76].

I sali biliari come il sodio colato, il sodio taurocolato e il sodio taurodeossicolato sono surfattanti ionici e mostrano un effetto concentrazione-dipendente sulla permeabilità epiteliale e sulla morfologia nelle cellule Caco-2 e nelle cellule epiteliali nasali umane [73, 77]. Anche per i sali biliari ad elevate concentrazioni è stata osservata una riduzione nella vitalità cellulare, ma hanno un minor effetto tossico rispetto ai surfattanti Tween 80 e polosamero F68 [77].

POLIMERI CATIONICI

I polimeri cationici come le poli-lisine, le polietilenimine e il chitosano sono in grado di indurre un'apertura reversibile delle TJ nei modelli cellulari epiteliali [78-80]. Il chitosano e i suoi derivati sono dei polimeri non tossici e biocompatibili ottenuti dalla chitina in grado di stimolare l'assorbimento. Questi polisaccaridi cationici, essendo sia composti mucoadesivi che stimolatori dell'assorbimento, sono stati ampiamente studiati come eccipienti per la somministrazione dei farmaci attraverso le barriere epiteliali dermiche, gastrointestinali, nasali e polmonari [81-83]. L'aumento reversibile nella permeabilità delle TJ indotta dal chitosano coinvolge un'alterazione nella distribuzione di occludina, ZO-1 e citoscheletro di actina [78, 84]; tale processo

nelle cellule Caco-2 è mediato dall'attivazione di PKC- α [85]. Considerando la loro bassa tossicità, la buona solubilità in acqua, le proprietà mucoadesive e il loro effetto modulatore sulle TJ, i derivati del chiosano sono promettenti candidati per il miglioramento della somministrazione dei farmaci.

CICLODESTRINE

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici naturali derivati dall'amido e sono usate nei prodotti farmaceutici come eccipienti con la funzione di agenti complessanti [86]. L'idea di utilizzare le ciclodestrine per stimolare l'assorbimento dei farmaci è stata indagata su parecchi modelli. La ciclodestrina dimetil- β è un potente stimolatore dell'assorbimento nasale e intestinale di eparina e insulina *in vivo* e *in vitro*. Induce, inoltre, a livello delle cellule epiteliali una serie di effetti come l'aumentata permeabilità a mannitolo ed enoxaparina, la riduzione della TEER e l'alterata distribuzione di ZO-1 che suggeriscono un'apertura delle TJ. La ciclodestrina dimetil- β , rispetto alle altre testate (ciclodestrina idrossipropil- β e le ciclodestrine- α , - β - γ), è risultata più efficace nell'aumentare la biodisponibilità e l'assorbimento di eparina e insulina [87-89] e i suoi effetti sembrano essere accompagnati da una riduzione del colesterolo a livello della membrana cellulare epiteliale con conseguente perdita dell'integrità delle TJ e dislocamento delle proteine delle TJ [90]. Tuttavia le ciclodestrine in modelli *in vitro* evidenziano citotossicità sulle barriere epiteliale ed emato-encefalica [91, 92].

DONATORI DI OSSIDO NITRICO

L'ossido nitrico (NO) è un regolatore delle TJ epiteliali. Livelli eccessivi di NO, generati dalla NO sintasi attivata, portano a una disfunzione della barriera epiteliale nei polmoni, nel fegato e nello stomaco, ad un aumentato trasporto di destrano-FITC attraverso la membrana mucosale dell'ileo e a una ridotta espressione con dislocazione delle proteine occludina, ZO-1, ZO-2 e ZO-3 [93, 94].

Le molecole donatrici di NO, quali S-nitroso-N-acetil-DL-penicillamina (SNAP), (2-idrossi-1-metiletil-2-nitroidrazino)-N-metil-1-propamina (NOC7), (2-idrossi-1-(1-metiletil)-2-nitrosoidrazino)-1-propanamina (NOC5) e N-etil-2-(1-etil-2-idrossi-2-nitrosoidrazino)-etanamina (NON12), sono state testate come potenziali stimolatori dell'assorbimento nelle barriere epiteliali del tratto gastrointestinale e

nella mucosa nasale [95, 96]. SNAP aumenta l'assorbimento intestinale di insulina e calcitonina nei conigli e nei ratti, e a livello dell'intestino tenue mostra un'elevata efficacia a bassa concentrazione anche se l'esatto meccanismo d'azione non è conosciuto e gli effetti ipotizzati sulle TJ non sono stati del tutto esaminati [97-99].

1.5 Malnutrizione, digiuno e permeabilità intestinale

Nell'epitelio intestinale la permeabilità paracellulare è principalmente governata dalle TJ che forniscono una chiusura continua tra la regione apicale delle cellule adiacenti, limitando il libero passaggio delle molecole e degli ioni attraverso la via paracellulare. Le TJ sono strutture soggette a regolazione fisiologica e sono modulate in risposta a una varietà di stimoli tra cui anche il tipo di dieta.

Negli uomini come negli animali, la malnutrizione e il digiuno determinano un aumento nel trasporto intestinale delle macromolecole [100], nella conduttanza ionica intestinale e nella permeabilità di piccoli soluti [101] attraverso la via paracellulare suggerendo un'alterata funzione della barriera intestinale. A tale anomalia funzionale sono associati una riduzione nel numero di filamenti di TJ e un'alterata morfologia intestinale.

Nei pazienti malnutriti si è osservato che la malnutrizione aumenta la permeabilità intestinale e il trasporto delle macromolecole, altera le difese mucosali immunitarie e compromette la funzione della barriera intestinale contro l'invasione dei microrganismi e dei loro prodotti [102, 103].

Da esperimenti condotti *in vivo* si è rilevato che il digiuno, oltre ad aumentare il trasporto degli ioni a livello intestinale, riduce in maniera significativa il peso della mucosa, l'altezza dei villi e la profondità delle cripte [101].

1.6 Gli aminoglicosidi

In questo studio è stato testato l'assorbimento orale della tobramicina, un aminoglicoside spesso usato nel trattamento di infezioni gravi causate da *Pseudomonas aeruginosa*, in particolare in pazienti con fibrosi cistica

Gli aminoglicosidi sono antibiotici battericidi che si legano ai ribosomi 30S e inibiscono la sintesi proteica dei batteri. Tutti gli aminoglicosidi possiedono proprietà farmacocinetiche simili e sono tossici; vengono scarsamente assorbiti

per via orale e, pertanto, nelle infezioni sistemiche, devono essere impiegati per via parenterale. Vengono assorbiti attraverso la cute lesionata (come da ustioni) e vengono assorbiti bene anche dal peritoneo, dalla cavità pleurica e dalle articolazioni, pertanto non devono mai essere iniettati in tali sedi.

Vengono escreti nell'urina in maniera inalterata per filtrazione glomerulare e presentano un'emivita plasmatica di 2-3 ore che risulta notevolmente prolungata in caso di insufficienza renale e negli anziani. Per evitare effetti tossici, le dosi di mantenimento degli aminoglicosidi nei pazienti con insufficienza renale devono essere modificate riducendo le singole dosi o prolungando l'intervallo tra di esse o in entrambi i modi.

Questi composti vengono inattivati *in vitro* ad opera delle penicilline anti-pseudomonas. *In vivo* l'inattivazione dell'aminoglicoside può verificarsi in pazienti con insufficienza renale che ricevano una penicillina e un aminoglicoside.

Con l'eccezione della streptomina, che possiede uno spettro antibiotico più limitato, tutti gli aminoglicosidi hanno una buona attività nei confronti dei bacilli aerobi gram-, ma sono inefficaci nei confronti degli anaerobi. Streptomina, neomicina e kanamicina sono inattive contro lo *Pseudomonas aeruginosa*, mentre gentamicina, tobramicina, amikacina e netilmicina presentano una buona efficacia contro tale germe. Sono, inoltre, attivi contro gli stafilococchi, ma non contro gli streptococchi, pneumococchi compresi. Bisogna sempre aggiungere un aminoglicoside a un antibiotico β -lattamico quando si tratta un'infezione grave da *Pseudomonas aeruginosa*.

Sono composti nefrotossici e ototossici e possono provocare un blocco neuromuscolare, una parestesia e una neuropatia periferica così come possono dare reazioni da ipersensibilità. Sebbene il loro assorbimento orale sia scarso, è tuttavia sempre possibile che, con l'uso prolungato, si assorba abbastanza farmaco da provocare tossicità, specie in pazienti con insufficienza renale. La nefrotossicità è tuttavia solitamente reversibile e risulta più probabile a dosaggi elevati, con alte concentrazioni ematiche e nelle terapie di lunga durata, in pazienti anziani e in soggetti con malattie renali preesistenti, con disidratazione o in terapia con furosemide [104].

2. SCOPO DELLA TESI

La somministrazione orale dei farmaci come alternativa alla via parenterale presenta una serie di vantaggi, particolarmente rilevanti nei pazienti pediatrici con malattie croniche, che permettono di ovviare al dolore e al fastidio associati all'iniezione e di effettuare il trattamento a casa. Pertanto, lo scopo di questa tesi è stato aumentare la biodisponibilità orale delle molecole idrofiliche, in particolare dell'aminoglicoside tobramicina, attraverso la modulazione fisiologica della permeabilità paracellulare.

Dati di letteratura dimostrano che digiuno e malnutrizione agiscono sulla via paracellulare alterando la morfologia dell'epitelio intestinale e aumentando il movimento degli ioni e delle grandi molecole attraverso tale via [101, 103]. Partendo da queste osservazioni abbiamo ipotizzato che il digiuno potesse avere un ruolo nella modulazione delle TJ e con questo studio siamo andati a valutare *in vivo* gli effetti del digiuno sull'assorbimento orale della tobramicina e sulla permeabilità della via paracellulare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Sostanze chimiche

La tobramicina è stata diluita in soluzione fisiologica, il lattulosio (L) e l'L-ramnosio (R) sono stati disciolti separatamente in acqua Milli-Q e le soluzioni dei due zuccheri sono state mescolate prima della somministrazione. Ogni 10 g di peso dell'animale è stato somministrato un volume di 0.1 ml di soluzione. Tutte le sostanze chimiche utilizzate sono state fornite dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

3.2 Animali

Sono stati utilizzati topi maschi Balb/C (Harlan, Udine, Italia) di età compresa tra le 6 e le 8 settimane e con peso di 25-30 g. Gli animali sono stati tenuti in condizioni standard (ciclo di 12 ore (h) di luce/buio alla temperatura di 21 °C) e in condizioni ambientali libere da patogeni per una settimana prima dell'esperimento con libero accesso a acqua e cibo. Per alcune prove sperimentali, i topi sono stati privati del cibo per 15 h prima del trattamento pur avendo libero accesso all'acqua.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le regolamentazioni europee e internazionali e l'approvazione per la ricerca è stata ottenuta dalla commissione etica per la sperimentazione animale dell'Università di Trieste.

3.3 Studio farmacocinetico

La tobramicina è stata somministrata alla concentrazione di 10 mg/kg per endovena nella vena della coda o per intramuscolo in topi normalmente nutriti e alla concentrazione di 50 mg/kg per via orale in animali normalmente nutriti e in animali a digiuno. Gli animali sono stati suddivisi in diversi gruppi, ognuno costituito da 3 animali, corrispondenti ai diversi tempi di raccolta del sangue prelevato a 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minuti dopo la somministrazione della tobramicina. Il farmaco è stato, inoltre, somministrato per via orale anche alle concentrazioni di 25 e 10 mg/kg in 2 gruppi, ognuno costituito da 3 animali a digiuno, e il sangue è stato prelevato a 15 minuti dalla somministrazione.

3.4 Studio della permeabilità intestinale: test dei due zuccheri

Per il test dei due zuccheri (L e R), gli animali sono stati suddivisi in due gruppi di 6 animali ciascuno. La soluzione di L e R è stata somministrata per via orale, alla concentrazione di 90 mg/kg per ogni zucchero, in topi nutriti normalmente (gruppo 1) e in topi a digiuno (gruppo 2). Dopo una settimana la stessa soluzione è stata somministrata per via orale ai topi del gruppo 2 che, questa volta, hanno avuto libero accesso al cibo.

I prelievi di sangue sono stati ottenuti 60 minuti dopo la somministrazione della soluzione zuccherina.

3.5 Dosaggio della tobramicina e degli zuccheri (L e R) nel

plasma

Il sangue è stato prelevato dalla vena submandibolare e raccolto in tubi con eparina. Il plasma è stato recuperato centrifugando il sangue a 2000 x g a 4 °C e conservato a -20 °C prima di essere analizzato.

La concentrazione della tobramicina nel plasma è stata determinata con un saggio omogeneo immunoenzimatico (Emit 2000 Tobramicina; Siemens Healthcare Diagnostic SRL, Milano, Italia) in accordo con le istruzioni. Tale valore è stato espresso in µg per ml di plasma.

La concentrazione dei due zuccheri è stata valutata con il saggio cromatografico high-performance liquid chromatography (HPLC) come già descritto in letteratura [105]. In breve, i campioni di plasma vengono deproteinizzati e 20 µl vengono aggiunti a 200 µl del reagente di derivatizzazione, mescolati e messi in appositi tubi che vengono sigillati e tenuti 16 h al buio a 65 °C. Il composto viene quindi portato a temperatura ambiente e 5 µl di ogni campione vengono iniettati nel sistema cromatografico. Dai valori di concentrazione così ottenuti è stato calcolato il rapporto L/R.

3.6 Analisi farmacocinetica

Per calcolare i parametri farmacocinetici è stato utilizzato un metodo non compartimentale del software WinNonLin versione 5.2.1 (Pharsight

Co., Mountain View, CA). L'emivita ($T_{1/2}$) è stata calcolata tramite analisi di regressione lineare della parte log-lineare delle curve tempo-concentrazione plasmatica. L'area sotto la curva tempo-concentrazione plasmatica dal tempo zero al tempo dell'ultima concentrazione misurata (AUC_{0-last}) e dal tempo zero all'infinito (AUC_{0-inf}) sono state calcolate tramite il metodo trapezoidale non compartimentale.

Il picco della concentrazione plasmatica (C_{max}) e il tempo per raggiungere la C_{max} (T_{max}) sono stati letti direttamente dai dati sperimentali.

La biodisponibilità (F, %) della tobramicina è stata calcolata usando la formula $F = (AUC_{os} \times DOSE_{iv} / AUC_{iv} \times DOSE_{os}) \times 100$.

3.7 Analisi statistica

Tutte le medie sono riportate con il corrispondente errore standard (Media \pm SE). La significatività statistica è stata calcolata usando l'analisi della varianza a due vie con il post-test di Bonferroni, il test non parametrico Mann-Whitney U e il test di analisi per coppie di dati Wilcoxon. Sono stati considerati significativi i valori di $P < 0.05$.

4. RISULTATI

I parametri farmacocinetici ottenuti dalla somministrazione della tobramicina per endovena, intramuscolo e per via orale sono riportati in Tabella 1.

La somministrazione della tobramicina 10 mg/kg per endovena, con biodisponibilità (F) del 100%, ha fatto registrare un valore di concentrazione massima nel plasma (C_{max}) pari a 35.26 $\mu\text{g/ml}$ a 5 minuti (T_{max}) dalla somministrazione e un'emivita ($T_{1/2}$) di 20.33 minuti.

La somministrazione dello stesso farmaco alla stessa concentrazione per intramuscolo mostra una F del 96.45%, una C_{max} pari a 16.46 $\mu\text{g/ml}$ con T_{max} di 15 minuti e $T_{1/2}$ di 17.70 minuti.

Tabella 1. Valori ottenuti per i parametri farmacocinetici dopo somministrazione orale, intramuscolo e endovena della tobramicina in topi nutriti e a digiuno (3 animali per punto) ■

	Media ± SE			
	Orale		Intramuscolo	Endovena
	Nutriti	15 ore digiuno		
Dose (mg/kg)	50	50	10	10
C _{max} (ug/ml)	0.33 ± 0.09	7.8 ± 0.95	16.46 ± 0.89	35.26 ± 0.79
T _{max} (min)	15	15	15	5
T _{1/2} (min)	41.61	21.97	17.70	20.33
AUC _{last} (ug · min/ml)	16.43 ± 1.26	423.68 ± 24.23	658.69 ± 37.00	682.93 ± 29.10
AUC _{inf} (ug · min/ml)	18.94	437.80	667.02	687.47
F (%)	0.48	12.40	96.45	100

■ C_{max}, concentrazione massima del farmaco nel plasma; T_{max}, tempo necessario perché la concentrazione del farmaco sia massima nel plasma; F, biodisponibilità; t_{1/2}, emivita; AUC_{last}, area sotto la curva dal tempo zero all'ultimo tempo in cui viene determinato il punto tempo-concentrazione; AUC_{inf}, area sotto la curva dal tempo zero all'infinito.

La somministrazione orale è stata effettuata in animali a digiuno (15 h) e in animali normalmente nutriti.

Negli animali alimentati normalmente e a cui è stata somministrata la tobramicina alla concentrazione di 50 mg/kg si osserva una F dello 0.48% con una C_{max} pari a 0.33 $\mu\text{g/ml}$ a 15 minuti (T_{max}) dalla somministrazione. I livelli di tobramicina nel plasma sono estremamente bassi indipendentemente dal tempo che intercorre tra la somministrazione del farmaco e il prelievo di sangue (Figura 3). Negli animali a digiuno la tobramicina somministrata per via orale alla concentrazione di 50 mg/kg mostra un aumento significativo nell'area sotto la curva (AUC) (Figura 3) con un picco (C_{max} , 7.8 $\mu\text{g/ml}$) a 15 minuti dalla somministrazione e un'emivita di 21.97 minuti (Tabella 1). L'aumento nell'AUC è accompagnato da un incremento nella F che diventa del 12.4% risultando 25 volte più alta di quella osservata nei topi normalmente nutriti.

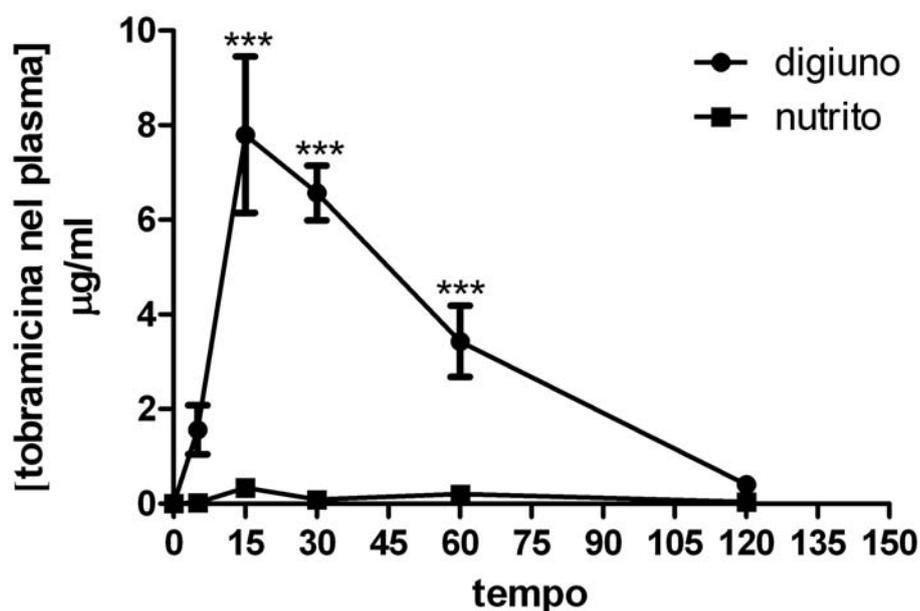


Figura 3. Media delle concentrazioni della tobramicina nel plasma registrate in tempi diversi e osservate dopo somministrazione orale della tobramicina (50 mg/kg) in topi a digiuno (●) e nutriti (■). Le barre rappresentano l'errore standard (SE) (3 animali per punto). Sono indicate le differenze significative tra gli animali nutriti e a digiuno con valore $P < 0.001$ (***) (analisi della varianza a due vie [ANOVA] con post-test Bonferroni).

La somministrazione orale del farmaco a diverse concentrazioni in topi a digiuno ha messo in evidenza un assorbimento concentrazione-dipendente. Come mostrato in Figura 4, la somministrazione della tobramicina alle concentrazioni di 50 mg/kg, 25 mg/kg e 10 mg/kg dopo 15 minuti mostra una concentrazione del farmaco nel plasma pari a 7.8 µg/ml, 3.5 µg/ml e 0.5 µg/ml, rispettivamente.

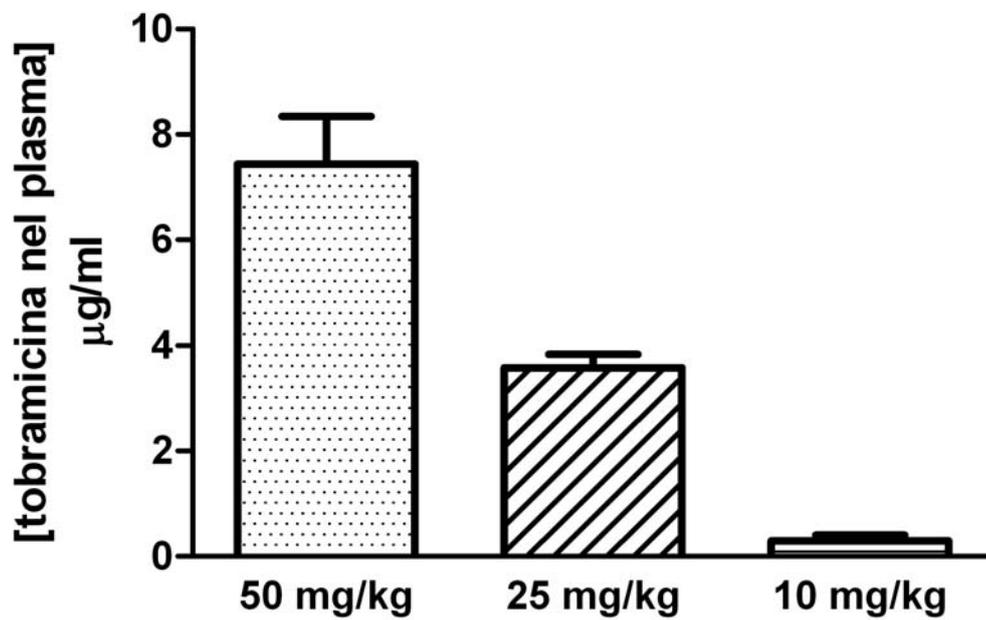


Figura 4. Concentrazioni della tobramicina nel plasma 15 minuti dopo somministrazione orale della tobramicina 50 mg/kg, 25 mg/kg e 10 mg/kg a 3 topi a digiuno (media ± SE)

Per testare la permeabilità intestinale è stato usato il test del doppio zucchero con L e R. In Figura 5 è riportato il rapporto L/R nei 6 topi a digiuno (L/R, 0.111) che risulta 4 volte superiore rispetto al rapporto nei 6 topi normalmente nutriti (L/R, 0.026); la differenza tra i due rapporti risulta statisticamente significativa ($P < 0.01$).

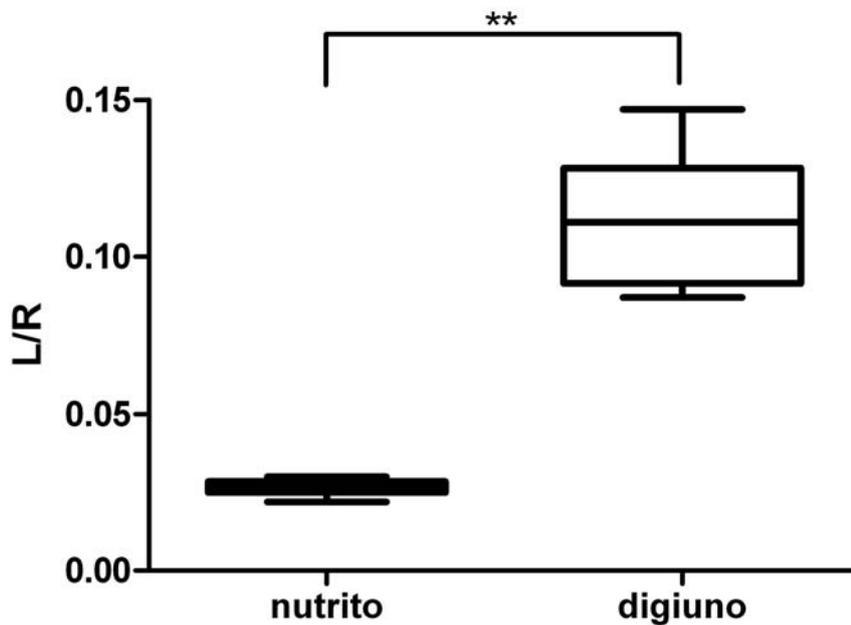


Figura 5. Rapporti L/R in topi a digiuno (n=6) e nutriti (n=6) 60 minuti dopo somministrazione orale della soluzione dei due zuccheri (media \pm SE). **, valore $P < 0.01$ (test Mann-Whitney U).

I 6 animali testati a digiuno sono stati poi normalmente alimentati per una settimana e, sottoposti ancora una volta al test del doppio zucchero, evidenziano un rapporto L/R pari a 0.115 (Figura 6). I due rapporti L/R negli stessi animali, in condizioni di digiuno e non, mostrano una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

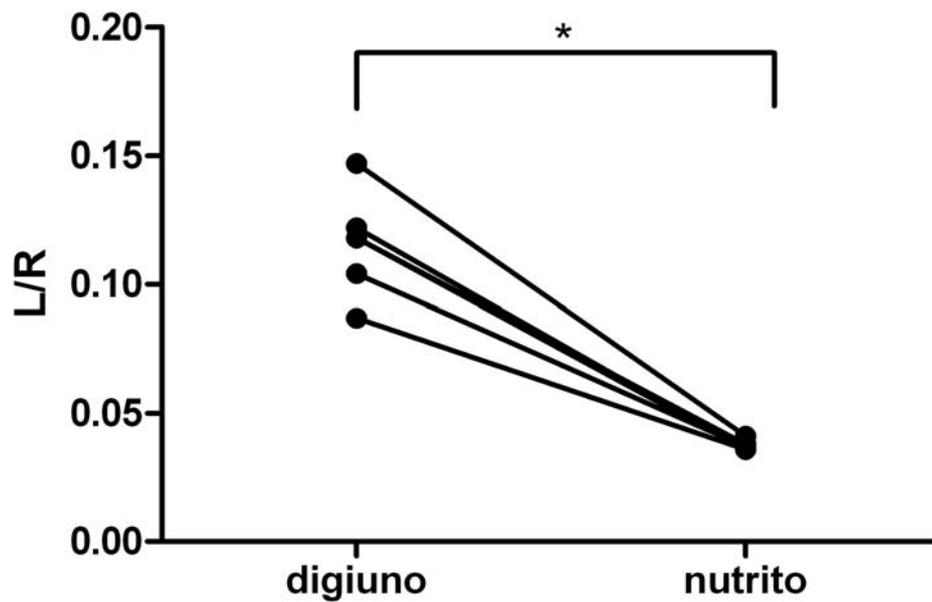


Figura 6. Rapporti L/R negli stessi topi (n=6) in condizioni di digiuno e nutriti. *, valore $P < 0.05$ (test Wilcoxon matched-pairs).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli antibiotici aminoglicosidici costituiscono uno dei principali gruppi di agenti usati nella moderna chemioterapia, principalmente per trattare le infezioni causate dai batteri aerobi gram negativi. Queste molecole sono composti poliaminati la cui idrofilicità impedisce la diffusione attraverso le membrane cellulari e la cui polarità determina le proprietà farmacocinetiche condivise da tutti i membri del gruppo. A pH fisiologico, infatti, gli aminoglicosidi esistono come policationi e non entrano nella maggior parte delle cellule, di conseguenza vengono distribuiti nello spazio extra cellulare, non sono metabolizzati e vengono secreti inalterati dal corpo essenzialmente per filtrazione del glomerulo renale [104].

Tra i componenti di questa famiglia di antibiotici, la tobramicina è ampiamente usata. Questo composto mostra un'attività prevalente contro *Pseudomonas aeruginosa* ed è pertanto l'aminoglicoside usato nel trattamento delle infezioni gravi causate da questo organismo, in particolare nei pazienti con fibrosi cistica [106]. Analogamente agli altri aminoglicosidi, la tobramicina può essere somministrata per iniezione intravenosa o intramuscolare e non può essere somministrata per via orale perché non viene assorbita dall'intestino. I nostri risultati, come atteso, mostrano che dopo somministrazione orale della tobramicina, anche a dosi estremamente elevate (50 mg/kg), i livelli del farmaco risultano molto bassi nel plasma dei topi trattati.

Si registra invece un evidente incremento nei livelli plasmatici e nella biodisponibilità assoluta quando i topi vengono trattati con la tobramicina in seguito a un digiuno prolungato di 15 h. Si osservano, infatti, un rapido assorbimento del farmaco e un picco di concentrazione pari a 7.8 µg/ml. Ne deriva che la biodisponibilità orale è estremamente bassa nei topi nutriti (0.48%), confermando quanto già noto, ma si innalza significativamente (12.4%) negli animali tenuti a digiuno tanto da risultare 25 volte più alta. Si tratta di un dato abbastanza inatteso anche se risultati simili sono stati ottenuti da Banerjee *et al.* [107] che hanno osservato un maggiore assorbimento della tobramicina quando il cibo non era a disposizione degli animali.

Il trasporto paracellulare costituisce la via dominante per il passaggio transepiteliale dei farmaci idrofilici nell'intestino tenue [1] e la permeabilità dipende dalla presenza e dalla regolazione delle TJ. Queste strutture, che costituiscono la barriera principale al movimento passivo delle sostanze attraverso

la via paracellulare, sono soggette a regolazione fisiologica e possono essere modulate da diversi agenti e da una varietà di stimoli, inclusi il tipo di dieta, i segnali umorali e neuronali, i mediatori dell'inflammazione e una varietà di vie di segnalazione cellulari che possono essere attivate da patogeni virali e microbici [108].

È noto da anni che il digiuno aumenta i movimenti paracellulari degli ioni e delle grandi molecole [109, 110] e mostra una riduzione nel numero delle TJ a livello degli epitelii intestinali del digiuno ottenuti da animali trattati con una dieta a basso contenuto proteico [103]. Come dimostrato da test *in vivo*, tra cui il test lattulosio/mannitolo [102], digiuno e malnutrizione possono modificare la permeabilità intestinale anche negli umani, tuttavia non tutti gli studi hanno osservato tale effetto [111, 112].

Il test della permeabilità intestinale ai due zuccheri L e R è stato ampiamente usato in quanto si tratta di un metodo non invasivo per la valutazione di eventuali danni intestinali negli umani e negli animali [113, 114] e utile nel monitorare i cambiamenti di permeabilità della via paracellulare nell'intestino tenue [105, 115]. In questo studio il test dei due zuccheri è stato usato per valutare la permeabilità dell'intestino tenue in topi normalmente nutriti e in topi a digiuno. I dati ottenuti mostrano che il digiuno aumenta in maniera significativa il rapporto L/R suggerendo un'aumentata permeabilità paracellulare nell'intestino del topo. Tale effetto si è rivelato reversibile poiché, quando gli stessi topi testati a digiuno sono stati tenuti per una settimana in condizioni nutritive normali, il rapporto L/R è ritornato ai valori ottenuti con topi normalmente nutriti.

L'osservazione che il digiuno aumenti in maniera significativa l'assorbimento gastrointestinale della tobramicina è di particolare interesse, anche se questo dato deve essere confermato negli umani. I roditori sono comunemente utilizzati negli studi pre-clinici sull'assorbimento orale perché mostrano profili di assorbimento dei farmaci e pattern di espressione dei trasportatori nell'intestino tenue simili all'uomo. Alcuni studi hanno mostrato, inoltre, che l'assorbimento gastrointestinale dei farmaci nel ratto correla bene con l'assorbimento negli umani [116-118]. I roditori, pur presentando nell'intestino livelli e pattern di espressione degli enzimi metabolici diversi da quelli umani, costituiscono un buon modello per la valutazione dell'assorbimento della tobramicina nell'intestino tenue degli

umani perchè gli aminoglicosidi, per le loro caratteristiche fisico-chimiche, non vengono metabolizzati.

Il profilo farmacocinetico della tobramicina somministrata dopo 15 h di digiuno, osservato in questo studio, è molto simile al profilo clinico atteso e ottenuto dopo somministrazione per intramuscolo. I livelli di C_{max} auspicabili nei pazienti sono compresi tra 4 e 10 $\mu\text{g/ml}$ e il $T_{1/2}$ di 2-4 ore [104]. Questo potrebbe indicare una via alternativa per la somministrazione della tobramicina e la via di somministrazione orale come alternativa alla via parenterale presenta una serie di vantaggi che sono particolarmente utili nel trattamento di pazienti pediatrici poiché permettono di ovviare al dolore e al fastidio associati alle iniezioni e di effettuare il trattamento a casa. Inoltre, la produzione delle formulazioni orali è meno costosa e un ridotto assorbimento orale può essere il fattore che determina lo sviluppo o meno di un nuovo agente farmacologico.

Recentemente sono stati fatti diversi studi con lo scopo di migliorare l'assorbimento orale di farmaci con una bassa biodisponibilità. Come stimolatori dell'assorbimento sono stati usati chelanti del calcio, derivati sintetici dell'acido biliare, la tossina zonula occludens e i chitosani [42, 119-121]. Un recente studio ha mostrato che i chitosani tiolati sono in grado di aumentare la permeabilità alla tobramicina a livello della mucosa intestinale di ratto montata nella camera di Ussing e delle cellule Caco-2 [122]. Per migliorare l'assorbimento orale e aumentare il trasporto paracellulare tali composti agiscono sulle TJ modulandole in maniera reversibile. In collaborazione con l'Università di Baltimora, il nostro gruppo ha realizzato uno studio sulla modulazione delle TJ [123]. I dati di questo studio dimostrano che l' NH_2 -terminale dell'esapeptide FCIGRL (aa 288-293, porzione attiva di Zot) interagisce con il recettore PAR_2 , implicato nella regolazione delle TJ [124], e attiva $\text{PKC}\alpha$ che a sua volta stimola la fosforilazione serin-treoninica di ZO-1 e della miosina 1C. Queste modificazioni determinano un distacco selettivo di ZO-1 da occludina, claudina-1 e miosina 1C e questo distacco coincide con l'apertura delle TJ e con un incremento reversibile della permeabilità intestinale dose- e tempo-dipendente.

Molti degli stimolatori dell'assorbimento testati *in vivo* inducono un aumento nell'assorbimento da 15 a 50 volte. In questo studio si evidenzia come il digiuno aumenti la biodisponibilità della tobramicina fino a 25 volte a 15 minuti dalla

somministrazione e il rapporto L/R di 4 volte a 1 h dalla somministrazione. Questo dato suggerisce che, quando si realizza questo tipo di studi, il tempo di digiuno deve essere estremamente accurato e chiaramente indicato.

L'incremento nella permeabilità cellulare osservato durante il digiuno è di particolare importanza anche per il possibile verificarsi di tossicità. La tobramicina, infatti, viene utilizzata per la decontaminazione selettiva del tratto digestivo [125-127] e il digiuno potrebbe aumentare il suo assorbimento quando usata per questa indicazione. Come tutti gli aminoglicosidi, la tobramicina ha la capacità di causare ototossicità e nefrotossicità in maniera concentrazione dipendente. Questi agenti vengono eliminati quasi interamente attraverso filtrazione glomerulare e la loro clearance correla bene con la clearance della creatinina. In caso di grave riduzione dell'attività renale, la clearance dell'aminoglicoside è ridotta con un'emivita fino a 20 o 40 volte maggiore che negli individui normali [128]. Gli aminoglicosidi somministrati a lungo termine per via orale, specialmente in condizioni, come il digiuno, in cui la permeabilità gastrointestinale è aumentata, potrebbero accumularsi fino a raggiungere concentrazioni tossiche nei pazienti con alterazioni renali con possibile manifestarsi di ototossicità e nefrotossicità. Significative quantità di questi antibiotici sono state ritrovate, in seguito a somministrazione orale, nel siero di pazienti con patologie gastrointestinali caratterizzate da un'elevata permeabilità intestinale [129, 130], condizione che può portare anche a una tossicità farmaco-indotta [131].

In conclusione, con questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che la biodisponibilità della tobramicina dipende dalla condizione fisiologica. L'assorbimento orale del farmaco è, infatti, aumentato in maniera significativa quando gli animali sono tenuti a digiuno per 15 h. Poiché tutti gli aminoglicosidi sono polari ed esistono come policationi, è possibile che, in questa condizione, tutti i composti di questa famiglia vengano assorbiti. Serviranno altri studi animali sulla somministrazione orale degli aminoglicosidi e di altri composti per definire con maggiore precisione il tempo di digiuno. Bisognerà inoltre prestare attenzione con quei pazienti a cui vengono somministrati per via orale questi composti. È il caso, per esempio, dei bambini con la sindrome dell'intestino corto [132] che spesso sono trattati con antibiotici a rotazione, inclusi gli

aminoglicosidi, per la prevenzione e il trattamento della crescita batterica nell'intestino tenue.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] J.L. Madara, Loosening tight junctions. Lessons from the intestine, *The Journal of clinical investigation* 83 (1989) 1089-1094.
- [2] M.L. Hermiston, J.I. Gordon, In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death, *The Journal of cell biology* 129 (1995) 489-506.
- [3] J.M. Gooding, K.L. Yap, M. Ikura, The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures, *Bioessays* 26 (2004) 497-511.
- [4] A. Hartsock, W.J. Nelson, Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 660-669.
- [5] J.R. Turner, Intestinal mucosal barrier function in health and disease, *Nature reviews* 9 (2009) 799-809.
- [6] H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, N. Sawada, Transmembrane proteins of tight junctions, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 588-600.
- [7] L. Paris, L. Tonutti, C. Vannini, G. Bazzoni, Structural organization of the tight junctions, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 646-659.
- [8] G. Krause, L. Winkler, S.L. Mueller, R.F. Haseloff, J. Piontek, I.E. Blasig, Structure and function of claudins, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 631-645.
- [9] T.A. Martin, W.G. Jiang, Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis, *Biochimica et biophysica acta* 1788 (2009) 872-891.
- [10] A. Tamura, Y. Kitano, M. Hata, T. Katsuno, K. Moriwaki, H. Sasaki, H. Hayashi, Y. Suzuki, T. Noda, M. Furuse, S. Tsukita, S. Tsukita, Megaintestine in claudin-15-deficient mice, *Gastroenterology* 134 (2008) 523-534.
- [11] L.L. Mitic, 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* 279 (2000) G250-254.
- [12] E.E. Schneeberger, R.D. Lynch, The tight junction: a multifunctional complex, *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (2004) C1213-1228.
- [13] M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita, Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Molecular biology of the cell* 11 (2000) 4131-4142.
- [14] A.S. Fanning, B.J. Jameson, L.A. Jesaitis, J.M. Anderson, The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *The Journal of biological chemistry* 273 (1998) 29745-29753.
- [15] L. Gonzalez-Mariscal, R. Tapia, D. Chamorro, Crosstalk of tight junction components with signaling pathways, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 729-756.
- [16] K. Matter, M.S. Balda, Functional analysis of tight junctions, *Methods (San Diego, Calif)* 30 (2003) 228-234.

- [17] I.A. Krizbai, M.A. Deli, Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier, *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France) 49 (2003) 23-31.
- [18] M.A. Deli, C.S. Abraham, Y. Kataoka, M. Niwa, Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology, *Cellular and molecular neurobiology* 25 (2005) 59-127.
- [19] A. Hall, Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* (New York, N.Y) 279 (1998) 509-514.
- [20] V.M. Braga, L.M. Machesky, A. Hall, N.A. Hotchin, The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts, *The Journal of cell biology* 137 (1997) 1421-1431.
- [21] S. Gopalakrishnan, N. Raman, S.J. Atkinson, J.A. Marrs, Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion, *The American journal of physiology* 275 (1998) C798-809.
- [22] J.M. Staddon, K. Herrenknecht, C. Smales, L.L. Rubin, Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability, *Journal of cell science* 108 (Pt 2) (1995) 609-619.
- [23] H. Takeda, S. Tsukita, Effects of tyrosine phosphorylation on tight junctions in temperature-sensitive v-src-transfected MDCK cells, *Cell structure and function* 20 (1995) 387-393.
- [24] K. Burridge, K. Wennerberg, Rho and Rac take center stage, *Cell* 116 (2004) 167-179.
- [25] V. Wong, B.M. Gumbiner, A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier, *The Journal of cell biology* 136 (1997) 399-409.
- [26] F. Lacaz-Vieira, M.M. Jaeger, P. Farshori, B. Kachar, Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing, *The Journal of membrane biology* 168 (1999) 289-297.
- [27] S. Tavelin, K. Hashimoto, J. Malkinson, L. Lazorova, I. Toth, P. Artursson, A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides, *Molecular pharmacology* 64 (2003) 1530-1540.
- [28] R.S. Everett, M.K. Vanhook, N. Barozzi, I. Toth, L.G. Johnson, Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide, *Molecular pharmacology* 69 (2006) 492-500.
- [29] H. Wan, H.L. Winton, C. Soeller, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, M.B. Cannell, G.A. Stewart, D.R. Garrod, C. Robinson, Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1, *Clin Exp Allergy* 30 (2000) 685-698.
- [30] K. Morita, H. Sasaki, M. Furuse, S. Tsukita, Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells, *The Journal of cell biology* 147 (1999) 185-194.
- [31] N. Sonoda, M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, S. Tsukita, Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier, *The Journal of cell biology* 147 (1999) 195-204.

- [32] A. Takahashi, M. Kondoh, A. Masuyama, M. Fujii, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi, Y. Watanabe, Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4, *J Control Release* 108 (2005) 56-62.
- [33] M. Kondoh, A. Takahashi, M. Fujii, K. Yagi, Y. Watanabe, A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator, *Biological & pharmaceutical bulletin* 29 (2006) 1783-1789.
- [34] A. Masuyama, M. Kondoh, H. Seguchi, A. Takahashi, M. Harada, M. Fujii, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi, Y. Watanabe, Role of N-terminal amino acids in the absorption-enhancing effects of the c-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314 (2005) 789-795.
- [35] M. Kondoh, A. Masuyama, A. Takahashi, N. Asano, H. Mizuguchi, N. Koizumi, M. Fujii, T. Hayakawa, Y. Horiguchi, Y. Watanabe, A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator, *Molecular pharmacology* 67 (2005) 749-756.
- [36] A. Fasano, C. Fiorentini, G. Donelli, S. Uzzau, J.B. Kaper, K. Margaretten, X. Ding, S. Guandalini, L. Comstock, S.E. Goldblum, Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, *in vitro*, *The Journal of clinical investigation* 96 (1995) 710-720.
- [37] W. Wang, S. Uzzau, S.E. Goldblum, A. Fasano, Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions, *Journal of cell science* 113 Pt 24 (2000) 4435-4440.
- [38] R. Lu, W. Wang, S. Uzzau, R. Vigorito, H.R. Zielke, A. Fasano, Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (Zot) receptor from human brain, *Journal of neurochemistry* 74 (2000) 320-326.
- [39] M. Di Pierro, R. Lu, S. Uzzau, W. Wang, K. Margaretten, C. Pazzani, F. Maimone, A. Fasano, Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain, *The Journal of biological chemistry* 276 (2001) 19160-19165.
- [40] N.N. Salama, N.D. Eddington, A. Fasano, Tight junction modulation and its relationship to drug delivery, *Advanced drug delivery reviews* 58 (2006) 15-28.
- [41] W.L. Wang, R.L. Lu, M. DiPierro, A. Fasano, Zonula occludin toxin, a microtubule binding protein, *World J Gastroenterol* 6 (2000) 330-334.
- [42] A. Fasano, S. Uzzau, Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model, *The Journal of clinical investigation* 99 (1997) 1158-1164.
- [43] C.S. Karyekar, A. Fasano, S. Raje, R. Lu, T.C. Dowling, N.D. Eddington, Zonula occludens toxin increases the permeability of molecular weight markers and chemotherapeutic agents across the bovine brain microvessel endothelial cells, *Journal of pharmaceutical sciences* 92 (2003) 414-423.
- [44] M. Marinaro, A. Fasano, M.T. De Magistris, Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses, *Infection and immunity* 71 (2003) 1897-1902.

- [45] N.N. Salama, A. Fasano, M. Thakar, N.D. Eddington, The impact of DeltaG on the oral bioavailability of low bioavailable therapeutic agents, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312 (2005) 199-205.
- [46] K.H. Song, A. Fasano, N.D. Eddington, Effect of the six-mer synthetic peptide (AT1002) fragment of zonula occludens toxin on the intestinal absorption of cyclosporin A, *International journal of pharmaceutics* 351 (2008) 8-14.
- [47] K.H. Song, A. Fasano, N.D. Eddington, Enhanced nasal absorption of hydrophilic markers after dosing with AT1002, a tight junction modulator, *Eur J Pharm Biopharm* 69 (2008) 231-237.
- [48] M. Conacci-Sorrell, J. Zhurinsky, A. Ben-Ze'ev, The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer, *The Journal of clinical investigation* 109 (2002) 987-991.
- [49] E. Sinaga, S.D. Jois, M. Avery, I.T. Makagiansar, U.S. Tambunan, K.L. Audus, T.J. Siahaan, Increasing paracellular porosity by E-cadherin peptides: discovery of bulge and groove regions in the EC1-domain of E-cadherin, *Pharmaceutical research* 19 (2002) 1170-1179.
- [50] P.H. Johnson, D. Frank, H.R. Costantino, Discovery of tight junction modulators: significance for drug development and delivery, *Drug discovery today* 13 (2008) 261-267.
- [51] M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells, *Journal of pharmaceutical sciences* 85 (1996) 608-611.
- [52] M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu, Comparison of absorption-enhancing effect between sodium caprate and disodium ethylenediaminetetraacetate in Caco-2 cells, *Biological & pharmaceutical bulletin* 17 (1994) 753-755.
- [53] Y.S. Quan, T. Fujita, F. Kamiyama, A. Yamamoto, Electrophysiological studies on the evaluation of absorption enhancers in Caco-2 cells using a microelectrode technique, *Biological & pharmaceutical bulletin* 23 (2000) 738-742.
- [54] Y.S. Quan, K. Hattori, E. Lundborg, T. Fujita, M. Murakami, S. Muranishi, A. Yamamoto, Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers using Caco-2 cell monolayers, *Biological & pharmaceutical bulletin* 21 (1998) 615-620.
- [55] G. Wang, J. Zabner, C. Deering, J. Launspach, J. Shao, M. Bodner, D.J. Jolly, B.L. Davidson, P.B. McCray, Jr., Increasing epithelial junction permeability enhances gene transfer to airway epithelia In vivo, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22 (2000) 129-138.
- [56] A. Kogan, N. Garti, Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Advances in colloid and interface science* 123-126 (2006) 369-385.
- [57] R. Notman, M.G. Noro, J. Anwar, Interaction of oleic acid with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers simulated by molecular dynamics, *The journal of physical chemistry* 111 (2007) 12748-12755.
- [58] T. Sawai, R.A. Drongowski, R.W. Lampman, A.G. Coran, C.M. Harmon, The effect of phospholipids and fatty acids on tight-junction permeability and bacterial translocation, *Pediatric surgery international* 17 (2001) 269-274.

- [59] B. Aspenstrom-Fagerlund, L. Ring, P. Aspenstrom, J. Tallkvist, N.G. Ilback, A.W. Glynn, Oleic acid and docosahexaenoic acid cause an increase in the paracellular absorption of hydrophilic compounds in an experimental model of human absorptive enterocytes, *Toxicology* 237 (2007) 12-23.
- [60] L.Y. Wang, J.K. Ma, W.F. Pan, D. Toledo-Velasquez, C.J. Malanga, Y. Rojanasakul, Alveolar permeability enhancement by oleic acid and related fatty acids: evidence for a calcium-dependent mechanism, *Pharmaceutical research* 11 (1994) 513-517.
- [61] L. Sztriha, A.L. Betz, Oleic acid reversibly opens the blood-brain barrier, *Brain research* 550 (1991) 257-262.
- [62] H.J. Kim, Y.S. Pyeun, Y.W. Kim, B.M. Cho, T.H. Lee, T.Y. Moon, K.T. Suh, B.R. Park, A model for research on the blood-brain barrier disruption induced by unsaturated fatty acid emulsion, *Investigative radiology* 40 (2005) 270-276.
- [63] T. Lindmark, Y. Kimura, P. Artursson, Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 284 (1998) 362-369.
- [64] T. Lindmark, N. Schipper, L. Lazorova, A.G. de Boer, P. Artursson, Absorption enhancement in intestinal epithelial Caco-2 monolayers by sodium caprate: assessment of molecular weight dependence and demonstration of transport routes, *Journal of drug targeting* 5 (1998) 215-223.
- [65] J.D. Soderholm, H. Oman, L. Blomquist, J. Veen, T. Lindmark, G. Olaison, Reversible increase in tight junction permeability to macromolecules in rat ileal mucosa in vitro by sodium caprate, a constituent of milk fat, *Digestive diseases and sciences* 43 (1998) 1547-1552.
- [66] T. Lindmark, J.D. Soderholm, G. Olaison, G. Alvan, G. Ocklind, P. Artursson, Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate, *Pharmaceutical research* 14 (1997) 930-935.
- [67] C.B. Coyne, M.M. Kelly, R.C. Boucher, L.G. Johnson, Enhanced epithelial gene transfer by modulation of tight junctions with sodium caprate, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23 (2000) 602-609.
- [68] E.L. Lecluyse, S.C. Sutton, J.A. Fix, In vitro effects of long-chain acylcarnitines on the permeability, transepithelial electrical resistance and morphology of rat colonic mucosa, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 265 (1993) 955-962.
- [69] J.H. Hochman, J.A. Fix, E.L. LeCluyse, In vitro and in vivo analysis of the mechanism of absorption enhancement by palmitoylcarnitine, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 269 (1994) 813-822.
- [70] E. Duizer, C. van der Wulp, C.H. Versantvoort, J.P. Groten, Absorption enhancement, structural changes in tight junctions and cytotoxicity caused by palmitoyl carnitine in Caco-2 and IEC-18 cells, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 287 (1998) 395-402.

- [71] R.G. Strickley, Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharmaceutical research* 21 (2004) 201-230.
- [72] S.S. Davis, L. Illum, Absorption enhancers for nasal drug delivery, *Clinical pharmacokinetics* 42 (2003) 1107-1128.
- [73] E.K. Anderberg, C. Nystrom, P. Artursson, Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Journal of pharmaceutical sciences* 81 (1992) 879-887.
- [74] E.K. Anderberg, T. Lindmark, P. Artursson, Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route, *Pharmaceutical research* 10 (1993) 857-864.
- [75] D. Dimitrijevic, A.J. Shaw, A.T. Florence, Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells, *The Journal of pharmacy and pharmacology* 52 (2000) 157-162.
- [76] M.H. Doo, H. Li, H.I. Jang, I.S. Song, S.J. Chung, C.K. Shim, Effect of nonylphenol ethoxylates (NPEs) on barrier functions of epithelial cell membranes: opening of tight junctions and competitive inhibition of P-gp-mediated efflux, *International journal of pharmaceutics* 302 (2005) 145-153.
- [77] H. Lin, M. Gebhardt, S. Bian, K.A. Kwon, C.K. Shim, S.J. Chung, D.D. Kim, Enhancing effect of surfactants on fexofenadine.HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer, *International journal of pharmaceutics* 330 (2007) 23-31.
- [78] G. Ranaldi, I. Marigliano, I. Vespignani, G. Perozzi, Y. Sambuy, The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line(1), *The Journal of nutritional biochemistry* 13 (2002) 157-167.
- [79] G.T. McEwan, M.A. Jepson, B.H. Hirst, N.L. Simmons, Polycation-induced enhancement of epithelial paracellular permeability is independent of tight junctional characteristics, *Biochimica et biophysica acta* 1148 (1993) 51-60.
- [80] X.Y. Yu, B.H. Schofield, T. Croxton, N. Takahashi, E.W. Gabrielson, E.W. Spannake, Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11 (1994) 188-198.
- [81] C. Valenta, B.G. Auner, The use of polymers for dermal and transdermal delivery, *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2004) 279-289.
- [82] M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, *Advanced drug delivery reviews* 52 (2001) 117-126.
- [83] H.O. Alpar, S. Somavarapu, K.N. Atuah, V.W. Bramwell, Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery, *Advanced drug delivery reviews* 57 (2005) 411-430.
- [84] N.G. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. deBoer, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement, *Pharmaceutical research* 14 (1997) 923-929.

- [85] J.M. Smith, M. Dornish, E.J. Wood, Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption, *Biomaterials* 26 (2005) 3269-3276.
- [86] T. Loftsson, S.B. Vogensen, M.E. Brewster, F. Konradsdottir, Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes, *Journal of pharmaceutical sciences* 96 (2007) 2532-2546.
- [87] Z. Shao, Y. Li, T. Chermak, A.K. Mitra, Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. II. Effects of beta-cyclodextrin derivatives on alpha-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats, *Pharmaceutical research* 11 (1994) 1174-1179.
- [88] Y. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Seki, M. Takase, M. Matsumoto, Absorption enhancement of polypeptide drugs by cyclodextrins. I. Enhanced rectal absorption of insulin from hollow-type suppositories containing insulin and cyclodextrins in rabbits, *Chemical & pharmaceutical bulletin* 40 (1992) 3042-3047.
- [89] T. Yang, A. Hussain, J. Paulson, T.J. Abbruscato, F. Ahsan, Cyclodextrins in nasal delivery of low-molecular-weight heparins: in vivo and in vitro studies, *Pharmaceutical research* 21 (2004) 1127-1136.
- [90] D. Lambert, C.A. O'Neill, P.J. Padfield, Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions, *Cell Physiol Biochem* 20 (2007) 495-506.
- [91] T. Kiss, F. Fenyvesi, B.I. Kovacsne, P. Feher, K.R. Leposane, J. Varadi, L. Szente, E. Fenyvesi, R. Ivanyi, M. Vecsernyes, [Cytotoxic examinations of various cyclodextrin derivatives on Caco-2 cells], *Acta pharmaceutica Hungarica* 77 (2007) 150-154.
- [92] L. Matilainen, T. Toropainen, H. Vihola, J. Hirvonen, T. Jarvinen, P. Jarho, K. Jarvinen, In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells, *J Control Release* 126 (2008) 10-16.
- [93] M.P. Fink, R.L. Delude, Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level, *Critical care clinics* 21 (2005) 177-196.
- [94] X. Han, M.P. Fink, R. Yang, R.L. Delude, Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice, *Shock (Augusta, Ga)* 21 (2004) 261-270.
- [95] A. Yamamoto, H. Tatsumi, M. Maruyama, T. Uchiyama, N. Okada, T. Fujita, Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296 (2001) 84-90.
- [96] Y. Watanabe, N. Utoguchi, A. Ishii, Y. Tai, H. Shiota, H. Kurai, M. Matsumoto, Absorption enhancement of a protein drug by nitric oxide donor: effect on nasal absorption of human granulocyte colony-stimulating factor, *Journal of drug targeting* 8 (2000) 185-194.
- [97] G. Fetih, F. Habib, N. Okada, T. Fujita, M. Attia, A. Yamamoto, Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu(1,7)]-eel calcitonin in rats, *J Control Release* 106 (2005) 287-297.

- [98] N. Utoguchi, Y. Watanabe, T. Shida, M. Matsumoto, Nitric oxide donors enhance rectal absorption of macromolecules in rabbits, *Pharmaceutical research* 15 (1998) 870-876.
- [99] G. Fetih, F. Habib, H. Katsumi, N. Okada, T. Fujita, M. Attia, A. Yamamoto, Excellent absorption enhancing characteristics of NO donors for improving the intestinal absorption of poorly absorbable compound compared with conventional absorption enhancers, *Drug metabolism and pharmacokinetics* 21 (2006) 222-229.
- [100] M. Heyman, G. Boudraa, S. Sarrut, M. Giraud, L. Evans, M. Touhami, J.F. Desjeux, Macromolecular transport in jejunal mucosa of children with severe malnutrition: a quantitative study, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 3 (1984) 357-363.
- [101] H.V. Carey, U.L. Hayden, K.E. Tucker, Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum, *The American journal of physiology* 267 (1994) R156-163.
- [102] F.K. Welsh, S.M. Farmery, K. MacLennan, M.B. Sheridan, G.R. Barclay, P.J. Guillou, J.V. Reynolds, Gut barrier function in malnourished patients, *Gut* 42 (1998) 396-401.
- [103] P. Rodriguez, N. Darmon, P. Chappuis, C. Candalh, M.A. Blaton, C. Bouchaud, M. Heyman, Intestinal paracellular permeability during malnutrition in guinea pigs: effect of high dietary zinc, *Gut* 39 (1996) 416-422.
- [104] H.F. Chambers, *Amynoglycosides*, Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY, 2006, pp. 1155-1171.
- [105] F. Katouzian, D. Sblattero, T. Not, A. Tommasini, E. Giusto, D. Meiacco, M. Stebel, R. Marzari, A. Fasano, A. Ventura, Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 352 (2005) 191-197.
- [106] D. Banerjee, D. Stableforth, The treatment of respiratory pseudomonas infection in cystic fibrosis: what drug and which way?, *Drugs* 60 (2000) 1053-1064.
- [107] S.K. Banerjee, C. Jagannath, R.L. Hunter, A. Dasgupta, Bioavailability of tobramycin after oral delivery in FVB mice using CRL-1605 copolymer, an inhibitor of P-glycoprotein, *Life sciences* 67 (2000) 2011-2016.
- [108] M.C. Arrieta, L. Bistriz, J.B. Meddings, Alterations in intestinal permeability, *Gut* 55 (2006) 1512-1520.
- [109] B.S. Worthington, E.S. Boatman, The influence of protein malnutrition on ileal permeability to macromolecules in the rat, *The American journal of digestive diseases* 19 (1974) 43-55.
- [110] J.J. Boza, D. Moennoz, J. Vuichoud, A.R. Jarret, D. Gaudard-de-Weck, R. Fritsche, A. Donnet, E.J. Schiffrin, G. Perruisseau, O. Ballevre, Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats, *The Journal of nutrition* 129 (1999) 1340-1346.
- [111] M. Elia, R. Behrens, C. Northrop, P. Wraight, G. Neale, Evaluation of mannitol, lactulose and ⁵¹Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate as markers of intestinal permeability in man, *Clin Sci (Lond)* 73 (1987) 197-204.

- [112] M. Elia, A. Goren, R. Behrens, R.W. Barber, G. Neale, Effect of total starvation and very low calorie diets on intestinal permeability in man, *Clin Sci (Lond)* 73 (1987) 205-210.
- [113] I. Bjarnason, A. MacPherson, D. Hollander, Intestinal permeability: an overview, *Gastroenterology* 108 (1995) 1566-1581.
- [114] J.B. Meddings, J. Jarand, S.J. Urbanski, J. Hardin, D.G. Gall, Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat, *The American journal of physiology* 276 (1999) G951-957.
- [115] J.B. Meddings, I. Gibbons, Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat, *Gastroenterology* 114 (1998) 83-92.
- [116] W.L. Chiou, A. Barve, Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats, *Pharmaceutical research* 15 (1998) 1792-1795.
- [117] W.L. Chiou, C. Ma, S.M. Chung, T.C. Wu, H.Y. Jeong, Similarity in the linear and non-linear oral absorption of drugs between human and rat, *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 38 (2000) 532-539.
- [118] Y.H. Zhao, M.H. Abraham, J. Le, A. Hersey, C.N. Luscombe, G. Beck, B. Sherborne, I. Cooper, Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption, *European journal of medicinal chemistry* 38 (2003) 233-243.
- [119] B.J. Aungst, Intestinal permeation enhancers, *Journal of pharmaceutical sciences* 89 (2000) 429-442.
- [120] S. Michael, M. Thole, R. Dillmann, A. Fahr, J. Drewe, G. Fricker, Improvement of intestinal peptide absorption by a synthetic bile acid derivative, cholylsarcosine, *Eur J Pharm Sci* 10 (2000) 133-140.
- [121] M. Thanou, J.C. Verhoef, P. Marbach, H.E. Junginger, Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo, *Journal of pharmaceutical sciences* 89 (2000) 951-957.
- [122] J. Hombach, H. Hoyer, A. Bernkop-Schnurch, Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of an oral tobramycin sulphate delivery system, *Eur J Pharm Sci* 33 (2008) 1-8.
- [123] S.E. Goldblum, U. Rai, A. Tripathi, M. Thakar, L. De Leo, N. Di Toro, T. Not, R. Ramachandran, A.C. Puche, M.D. Hollenberg, A. Fasano, The active Zot domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation, *Faseb J* 25 144-158.
- [124] M.D. Hollenberg, Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more, *Life sciences* 74 (2003) 237-246.
- [125] H.K. van Saene, C.P. Stoutenbeek, C.A. Hart, Selective decontamination of the digestive tract (SDD) in intensive care patients: a critical evaluation of the clinical, bacteriological and epidemiological benefits, *The Journal of hospital infection* 18 (1991) 261-277.
- [126] J.W. Horton, D.L. Maass, J. White, J.P. Minei, Reducing susceptibility to bacteremia after experimental burn injury: a role for selective

- decontamination of the digestive tract, *J Appl Physiol* 102 (2007) 2207-2216.
- [127] A.M. de Smet, J.A. Kluytmans, B.S. Cooper, E.M. Mascini, R.F. Benus, T.S. van der Werf, J.G. van der Hoeven, P. Pickkers, D. Bogaers-Hofman, N.J. van der Meer, A.T. Bernards, E.J. Kuijper, J.C. Joore, M.A. Leverstein-van Hall, A.J. Bindels, A.R. Jansz, R.M. Wesselink, B.M. de Jongh, P.J. Dennesen, G.J. van Asselt, L.F. te Velde, I.H. Frenay, K. Kaasjager, F.H. Bosch, M. van Iterson, S.F. Thijsen, G.H. Kluge, W. Pauw, J.W. de Vries, J.A. Kaan, J.P. Arends, L.P. Aarts, P.D. Sturm, H.I. Harinck, A. Voss, E.V. Uijtendaal, H.E. Blok, E.S. Thieme Groen, M.E. Pouw, C.J. Kalkman, M.J. Bonten, Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients, *The New England journal of medicine* 360 (2009) 20-31.
- [128] A.M. Ristuccia, B.A. Cunha, The aminoglycosides, *The Medical clinics of North America* 66 (1982) 303-312.
- [129] O. Gemer, E. Zaltztein, R. Gorodischer, Absorption of orally administered gentamicin in infants with diarrhea, *Pediatric pharmacology* (New York, N.Y 3 (1983) 119-123.
- [130] J.C. Miranda, M.S. Schimmel, G.M. Mimms, W. Spinelli, J.M. Driscoll, L.S. James, T.S. Rosen, Gentamicin absorption during prophylactic use for necrotizing enterocolitis, *Developmental pharmacology and therapeutics* 7 (1984) 303-306.
- [131] T.M. Rohrbaugh, R. Anolik, C.S. August, F.T. Serota, P.A. Koch, Absorption of oral aminoglycosides following bone marrow transplantation, *Cancer* 53 (1984) 1502-1506.
- [132] D. Duro, D. Kamin, C. Duggan, Overview of pediatric short bowel syndrome, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 47 Suppl 1 (2008) S33-36.