

**Effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in modelli
sperimentali di patologie intestinali di natura funzionale o
infiammatoria**

Matteo Fornai, Rocchina Colucci, Luca Antonioli, Narcisa Ghisu, Marco Tuccori,

Giovanni Gori, Corrado Blandizzi, Mario Del Tacca

Centro Interdipartimentale di Ricerche di Farmacologia Clinica e Terapia

Sperimentale, Università di Pisa

Riassunto

Questo studio è stato condotto con l'obiettivo di esaminare gli effetti dell'acqua Uliveto (acqua minerale con proprietà bicarbonato-alcaline) in modelli sperimentali di diarrea, costipazione intestinale o colite. Ai ratti è stato consentito di bere acqua Uliveto o acqua oligominerale di controllo per 30 giorni consecutivi. La diarrea è stata indotta tramite somministrazione di 16,16-dimetilprostaglandina E2 (dmPGE2). La costipazione intestinale è stata evocata tramite somministrazione di loperamide (farmaco stimolante dei recettori oppioidi). La colite è stata indotta per mezzo di acido dinitrobenzenesolfonico (DNBS) o di acido acetico. In questi modelli sperimentali sono stati valutati lo svuotamento gastrico, il transito nell'intestino tenue e il transito nel colon. Negli animali con diarrea è stato osservato un rallentamento dello svuotamento gastrico e un aumento del transito sia nell'intestino tenue che nel colon. Negli animali con diarrea, l'acqua Uliveto ha stimolato lo svuotamento gastrico, e questo effetto è stato bloccato da L-365,260 (bloccante dei recettori della gastrina). Negli animali con costipazione intestinale è stata osservata una riduzione dello svuotamento gastrico, del transito nell'intestino tenue e del transito nel colon, e tutte queste alterazioni funzionali sono state normalizzate dall'acqua Uliveto. Negli animali con costipazione, gli effetti dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico sono stati bloccati dal trattamento con L-365,260, mentre gli effetti sul transito intestinale sono stati bloccati da alosetron (bloccante dei recettori 5HT₃ della serotonina). Negli animali con colite indotta da DNBS è stata osservata una riduzione dello svuotamento gastrico e del transito sia nell'intestino tenue che nel colon. In presenza di colite da DNBS l'acqua Uliveto ha stimolato lo svuotamento gastrico e ha normalizzato il transito nell'intestino tenue e nel colon. Anche negli animali con colite indotta da acido acetico è stata osservata una

inibizione dello svuotamento gastrico e del transito sia nell'intestino tenue che nel colon. In questo modello sperimentale l'acqua Uliveto ha stimolato sia lo svuotamento gastrico che il transito nell'intestino tenue. I risultati di questo studio sperimentale indicano che l'acqua Uliveto svolge effetti benefici sulla motilità gastrointestinale in presenza di alterazioni patologiche funzionali o infiammatorie. Gli effetti dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico dipendono da meccanismi correlati alla secrezione di gastrina endogena, mentre gli effetti dell'acqua Uliveto sul transito colico dipendono dall'attivazione del sistema della serotonina.

Introduzione

Le malattie funzionali del sistema digerente sono caratterizzate da insiemi complessi di sintomi che possono alterare la qualità della vita dei pazienti in maniera significativa, anche se non sono associate a lesioni organiche evidenziabili per mezzo di varie procedure diagnostiche. Le malattie digestive funzionali più frequenti comprendono la dispepsia funzionale cronica, la sindrome dell'intestino irritabile e la costipazione idiopatica cronica (1, 2, 3). Attualmente i meccanismi eziopatogenetici responsabili dei disturbi digestivi funzionali non sono stati completamente caratterizzati. Tuttavia si ritiene che lo sviluppo di sintomi digestivi di origine funzionale possa dipendere da alterazioni dei sistemi nervosi e ormonali preposti alla regolazione delle funzioni secretive, motorie e/o sensoriali del sistema digerente a livello del tratto prossimale o distale (2, 3, 4).

Anche le malattie intestinali di tipo infiammatorio sono caratterizzate da alterazioni delle funzioni digestive, a livello di motilità, assorbimento e secrezione, che possono contribuire all'insorgenza di varie manifestazioni sintomatologiche, quali diarrea, alterazioni dell'alvo, meteorismo e dolore addominale (5). I meccanismi fisiopatologici coinvolti nello sviluppo di questi sintomi sono attualmente oggetto di studi approfonditi, ed è stato proposto che processi di neuroplasticità e adattamento neuronale, stimolati dall'azione di fattori infiammatori sul sistema nervoso enterico, siano responsabili della comparsa dei disturbi digestivi in presenza di patologie infiammatorie intestinali (6, 7).

Le terapie farmacologiche dei disturbi digestivi funzionali si prefiggono di correggere i meccanismi fisiopatologici responsabili della comparsa dei sintomi. Tuttavia, i farmaci attualmente disponibili per il trattamento di questi disturbi risultano

spesso inefficaci o promuovono solo una remissione parziale dei sintomi. Esperienze cliniche condotte in precedenza suggeriscono che, a parte i trattamenti farmacologici, l'assunzione di acque minerali caratterizzate da particolari profili di soluti elettrolitici, unitamente ad opportune modificazioni dello stile di vita e del comportamento alimentare, possa contribuire favorevolmente al trattamento medico delle malattie digestive funzionali (8, 9). In particolare, è stato ipotizzato che le acque minerali possano influenzare varie funzioni digestive a seconda del loro contenuto in elettroliti e, a sostegno di questa ipotesi, studi precedenti hanno dimostrato che le acque minerali caratterizzate da una elevata concentrazione di ioni bicarbonato e calcio possano modulare la secrezione di ormoni peptidici a livello del sistema gastrointestinale (10, 11, 12). In accordo con queste osservazioni, è stato inoltre osservato che le acque minerali di tipo bicarbonato-alcalino facilitano lo svuotamento gastrico nei pazienti con dispepsia e aumentano la frequenza delle evacuazioni nei pazienti con costipazione intestinale, ed è stato quindi proposto che cicli regolari e prolungati di crenoterapia con particolari tipi di acqua minerale potrebbero svolgere effetti benefici nei pazienti con malattie digestive funzionali (8, 9, 11).

Sebbene i dati attualmente disponibili suggeriscono che la crenoterapia con acqua minerale possa costituire un utile complemento al trattamento medico dei sintomi digestivi funzionali, mancano solide evidenze scientifiche sui meccanismi che sottendono gli effetti favorevoli di queste acque sulle funzioni gastrointestinali. A questo riguardo, studi scientifici condotti su modelli sperimentali possono aiutare a chiarire i meccanismi tramite cui le acque minerali influenzano i sistemi fisiologici preposti al controllo delle funzioni secretive e motorie dell'apparato digerente. Pertanto, sulla base di queste considerazioni, il presente studio è stato svolto con l'obiettivo di

esaminare gli effetti dell'acqua Uliveto (acqua minerale con proprietà bicarbonato-alcaline), sulla motilità gastrointestinale in modelli sperimentali di disfunzione intestinale di natura funzionale o infiammatoria.

Risultati

Effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in presenza di diarrea

Negli animali con diarrea l'indice di gravità della diarrea è risultato simile dopo trattamento sia con acqua Uliveto che con acqua oligominerale di controllo (Fig. 2). In presenza di diarrea si osserva inoltre una riduzione significativa dello svuotamento gastrico (Fig. 3A). L'acqua Uliveto stimola lo svuotamento gastrico negli animali senza diarrea (controlli normali) e normalizza lo svuotamento gastrico negli animali con diarrea. In entrambi i casi, gli effetti dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico sono stati bloccati dal trattamento con il farmaco L-365,260 (bloccante dei recettori della gastrina) (Fig. 3A).

Negli animali normali l'acqua Uliveto non influenza il transito nell'intestino tenue (Fig. 3B). L'induzione della diarrea si associa ad un incremento significativo del transito intestinale, e questa risposta funzionale non è modificata dall'acqua Uliveto (Fig. 3B). Negli animali normali l'acqua Uliveto stimola il transito nel colon. Inoltre l'induzione della diarrea si associa ad una stimolazione significativa del transito nel colon, senza ulteriori modificazioni in seguito a somministrazione dell'acqua Uliveto (Fig. 3C).

Effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in presenza di costipazione

Negli animali normali l'acqua Uliveto induce una stimolazione dell'escrezione fecale. Negli animali con costipazione si osserva una riduzione dell'escrezione fecale, e questa alterazione viene normalizzata dall'acqua Uliveto. L'effetto terapeutico dell'acqua Uliveto viene bloccato dal trattamento con alosetron (bloccante dei recettori 5HT₃ della serotonina) (Fig. 4A). Inoltre, la somministrazione dell'acqua Uliveto favorisce un incremento del contenuto di acqua nelle feci sia negli animali normali che in quelli con costipazione, e in entrambi i casi gli effetti dell'acqua Uliveto sono stati bloccati dal trattamento con alosetron (Fig. 4B).

Negli animali normali l'acqua Uliveto stimola lo svuotamento gastrico, e questo effetto viene bloccato dal trattamento con L-365,260 (Fig. 5A). Negli animali con costipazione si osserva una inibizione dello svuotamento gastrico. Questa disfunzione è normalizzata dal trattamento con acqua Uliveto, e l'effetto stimolante dell'acqua Uliveto viene bloccato dalla somministrazione di L-365,260 (Fig. 5A).

Negli animali normali l'acqua Uliveto non influisce sul transito nell'intestino tenue. Negli animali con costipazione si osserva un rallentamento significativo del transito intestinale che viene normalizzato dal trattamento con acqua Uliveto (Fig. 5B). Inoltre, l'acqua Uliveto stimola il transito nel colon sia negli animali normali che in quelli con costipazione, e questi effetti sono bloccati dalla somministrazione di alosetron (Fig. 5C).

Valutazione della colite

A distanza di sei giorni dall'applicazione di DNBS o di acido acetico sulla mucosa colica, il colon distale degli animali trattati con acqua oligominerale di controllo è apparso ispessito e ulcerato con evidenti aree di infiammazione transmurale. È stata riscontrata spesso la presenza di adesioni viscerali e talvolta l'intestino appariva dilatato. All'esame istologico la colite è stata riscontrata sotto forma di infiltrazione neutrofila con coinvolgimento della mucosa e della sottomucosa. I punteggi relativi alla valutazione macroscopica e microscopica della colite non sono risultati significativamente diversi nei gruppi di animali trattati con acqua Uliveto o con acqua di controllo (Tabella 2).

Valutazione della mieloperossidasi nel tessuto colico

Negli animali normali non infiammati i livelli di mieloperossidasi (marcatore di infiltrazione cellulare da parte di cellule infiammatorie) nel tessuto colico non sono risultati diversi dopo trattamento con acqua Uliveto in confronto all'acqua di controllo (Tabella 2). L'induzione di colite con DNBS o acido acetico ha determinato un marcato incremento dei livelli di mieloperossidasi nel tessuto colico sia negli animali trattati con acqua Uliveto che con acqua di controllo, senza differenze significative fra i due trattamenti (Tabella 2).

Effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in presenza di colite indotta da DNBS

L'induzione della colite si associa a un rallentamento dello svuotamento gastrico. Questa alterazione funzionale viene normalizzata dall'assunzione di acqua Uliveto (Fig. 6A). Analogamente, il transito nell'intestino tenue è rallentato negli animali con colite e questo parametro risulta normalizzato in seguito a trattamento degli animali con acqua Uliveto (Fig. 6B). Un effetto simile è stato osservato con l'acqua Uliveto sul transito nel colon: questo infatti risulta rallentato negli animali con colite, e viene normalizzato dopo trattamento con acqua Uliveto (Fig. 6C).

Effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in presenza di colite indotta da acido acetico

Negli animali con colite indotta da acido acetico si osserva una inibizione significativa dello svuotamento gastrico che viene normalizzata dal trattamento con acqua Uliveto (Fig. 7A). Negli animali con colite è stata riscontrata inoltre una inibizione significativa del transito nell'intestino tenue e nel colon. Queste alterazioni funzionali sono state normalizzate dal trattamento con acqua Uliveto per quanto riguarda il transito nell'intestino tenue (Fig. 7B e 7C).

Discussione

I disturbi funzionali del tratto gastrointestinale sono caratterizzati da un complesso di sintomi che si manifestano in assenza di cause organiche evidenti o come conseguenza di episodi pregressi di infiammazione intestinale (20, 21). Le terapie farmacologiche attualmente disponibili consentono di ottenere una remissione parziale dei sintomi, e alcune evidenze della letteratura medica suggeriscono che l'assunzione di acque minerali caratterizzate da particolari proprietà chimico-fisiche può rappresentare un valido complemento alla terapia medica dei disturbi digestivi funzionali (8, 9). Sulla base di queste premesse, abbiamo condotto il presente studio con l'obiettivo specifico di esaminare gli effetti dell'acqua Uliveto (acqua minerale dotata di proprietà bicarbonato-alcaline) in modelli sperimentali caratterizzati da alterazioni della motilità gastrointestinale o da processi infiammatori a carico del colon. I risultati maggiori del nostro studio indicano che, in presenza di condizioni normali, l'acqua Uliveto stimola lo svuotamento gastrico e il transito nel colon e, soprattutto, che, in presenza di disturbi digestivi indotti sperimentalmente, l'acqua Uliveto migliora o normalizza le disfunzioni della motilità gastrointestinale ad essi associati. In particolare, l'acqua Uliveto si è dimostrata in grado di normalizzare lo svuotamento gastrico negli animali con diarrea, e di potenziare sia lo svuotamento gastrico che il transito nel colon negli animali con costipazione. Peraltro, quest'ultimo effetto si associa a un parallelo aumento dell'escrezione fecale e del contenuto di acqua nelle feci. Negli animali con colite sperimentale è stata riscontrata la presenza di lesioni sia macroscopiche che microscopiche, unitamente ad un aumento dei livelli di mieloperossidasi, in corrispondenza del colon infiammato. Queste lesioni infiammatorie si accompagnano a una riduzione dell'attività motoria gastrointestinale e in presenza di queste condizioni

patologiche l'acqua Uliveto ha determinato un potenziamento dello svuotamento gastrico e una normalizzazione del transito intestinale.

L'azione stimolante dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico in condizioni normali è stata osservata anche in studi precedenti (11), mentre la capacità di questa acqua minerale di normalizzare il rallentamento dello svuotamento gastrico negli animali con disturbi digestivi indotti sperimentalmente rappresenta un'osservazione originale. Peraltro, i nostri dati sono in accordo con i risultati di precedenti studi clinici che hanno esaminato gli effetti di acque minerali ricche di calcio e bicarbonato in pazienti con dispepsia. In particolare, in uno studio clinico condotto da Bortolotti et al. (22) gli effetti di un'acqua minerale bicarbonato-calcica sono stati esaminati per mezzo di una tecnica scintigrafica in un gruppo di pazienti con dispepsia idiopatica in confronto a soggetti normali. In questo studio è stato osservato che l'acqua minerale bicarbonato-calcica stimola in maniera significativa lo svuotamento gastrico sia nei pazienti dispeptici che nei soggetti normali, suggerendo che questa acqua minerale può svolgere azioni benefiche sui disturbi digestivi associati alla dispepsia funzionale. Uno studio più recente ha valutato gli effetti di una supplementazione con acqua minerale ad elevato contenuto elettrolitico sullo svuotamento gastrico in pazienti con dispepsia funzionale. In questo studio i pazienti sottoposti alla crenoterapia con l'acqua minerale hanno mostrato un miglioramento dello svuotamento gastrico, suggerendo che l'assunzione regolare di acqua minerale potrebbe essere efficace nel trattamento medico della dispepsia (23).

Al fine di esaminare i meccanismi tramite cui l'acqua Uliveto migliora lo svuotamento gastrico in condizioni sia normali che patologiche, abbiamo eseguito esperimenti in animali trattati con il bloccante dei recettori della gastrina L-365,260. In

questi animali le azioni stimolanti dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico sono state abolite, suggerendo che questi effetti sono mediati dalla capacità dell'acqua Uliveto di stimolare la liberazione di gastrina endogena. Queste osservazioni concordano con quelle riportate da Bertoni et al. (11), i quali hanno dimostrato che la somministrazione di acqua Uliveto a ratti normali induce una stimolazione significativa dello svuotamento gastrico e che questo effetto può essere inibito dal blocco farmacologico dei recettori della gastrina. Gli effetti stimolanti dell'acqua Uliveto potrebbero inoltre dipendere dal suo peculiare contenuto di ioni calcio, che sono in grado di stimolare la secrezione di gastrina, la quale stimola a sua volta lo svuotamento gastrico, come precedentemente ipotizzato da Bertoni et al. (11).

Gli esperimenti condotti per saggiare gli effetti dell'acqua Uliveto sulle funzioni motorie intestinali hanno evidenziato una scarsa influenza di questa acqua minerale sul transito nell'intestino tenue, sia in condizioni normali che in presenza di disturbi digestivi indotti sperimentalmente, mentre sono stati osservati effetti significativi dell'acqua Uliveto sulla motilità del colon. In particolare, negli animali con costipazione è stata osservata una riduzione significativa sia dell'escrezione fecale che del contenuto di acqua nelle feci, ed entrambi questi parametri sono stati normalizzati dalla somministrazione di acqua Uliveto. Inoltre, negli animali con costipazione l'acqua Uliveto ha stimolato il transito nel colon, suggerendo che questa acqua minerale può svolgere effetti benefici sui disturbi dell'evacuazione intestinale associati alla costipazione. I dati clinici disponibili sostengono le nostre osservazioni sperimentali. Infatti, in uno studio condotto da Gasbarrini et al. (8) la supplementazione con acqua minerale nei pazienti con costipazione induce una stimolazione significativa del loro transito intestinale. E' interessante notare che gli effetti stimolanti dell'acqua Uliveto

sull'attività del colon sono stati bloccati dal trattamento degli animali con alosetron, un bloccante dei recettori 5-HT₃ della serotonina, suggerendo un coinvolgimento della serotonina endogena negli effetti intestinali dell'acqua Uliveto. Studi precedenti hanno dimostrato che i riflessi gastrocolici sono attivati dalla stimolazione di meccanicocettori localizzati nell'antro dello stomaco e di chemocettori presenti a livello duodenale (24,25), ed è noto che la serotonina svolge un ruolo predominante nella stimolazione di queste risposte digestive riflesse tramite la stimolazione di recettori 5-HT₃ (26). Non sono attualmente noti i meccanismi che sottendono la capacità dell'acqua Uliveto di stimolare il sistema della serotonina endogena. Tuttavia, studi precedenti indicano che la stimolazione degli osmocettori duodenali da parte di soluzioni ipertoniche è in grado di promuovere l'attivazione dei riflessi nervosi enterici nell'uomo (27, 28), e, su tali basi, è quindi probabile che l'elevata concentrazione di sali minerali presente nell'acqua Uliveto sia responsabile della stimolazione di questi osmocettori e della conseguente attivazione dei riflessi nervosi nel colon. A sostegno di queste argomentazioni, Polushina (29) ha dimostrato che la somministrazione ai ratti di acqua minerale con elevato contenuto di ioni calcio e bicarbonato ha determinato un incremento significativo dei livelli plasmatici di serotonina, indicando un possibile ruolo di questo mediatore nella stimolazione delle funzioni sensoriali e motorie del colon.

In conclusione, il nostro studio sperimentale indica che l'acqua Uliveto svolge effetti benefici sulla motilità gastrointestinale, sia in condizioni normali che in presenza di disfunzioni intestinali. Gli effetti dell'acqua Uliveto sullo svuotamento gastrico dipendono dall'attivazione di meccanismi correlati con la gastrina, mentre gli effetti benefici dell'acqua Uliveto sulle funzioni del colon sembrano dipendere dalla liberazione di serotonina endogena.

Metodi

Animali e disegno sperimentale

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti albini maschi di ceppo Wistar (peso corporeo: 220-250 g). Gli animali sono stati alimentati con mangime standard e acqua comune ad libitum per almeno una settimana prima dell'inizio delle procedure sperimentali. Gli animali sono stati stabulati, cinque per gabbia, in camere a temperatura controllata (22-24°C), ciclo luce-buio di 12 ore e umidità del 50-60%. La stabulazione degli animali è stata eseguita nel rispetto di quanto dettato dalla Direttiva della Comunità Europea 86-609, riconosciuta e adottata dal Governo Italiano.

All'inizio del periodo di esecuzione degli esperimenti, gli animali sono stati trasferiti in gabbie singole ed è stato loro consentito il libero accesso all'acqua Uliveto o ad un'acqua oligominerale di origine commerciale (acqua di controllo) per un intervallo di 30 giorni. Le proprietà chimico-fisiche dell'acqua Uliveto e dell'acqua oligominerale di controllo sono riportate nella Tabella 1. Durante il periodo di esposizione all'acqua Uliveto o all'acqua di controllo, sono stati accuratamente monitorati il volume di acqua assunto dai singoli animali e le variazioni di peso corporeo.

Nel primo gruppo di esperimenti sono stati esaminati gli effetti dell'acqua Uliveto sulle funzioni motorie gastrointestinali in presenza di diarrea o costipazione intestinale. Nel secondo gruppo di esperimenti sono stati valutati gli effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale in presenza di colite indotta da acido 2,4-dinitrobenzenesolfonico (DNBS) o da acido acetico. Sia nella prima serie di esperimenti che nella seconda serie, le funzioni motorie gastrointestinali sono state valuate per mezzo della misurazione dello svuotamento gastrico, del transito nell'intestino tenue e del transito nel colon. Al fine di svolgere le suddette procedure sperimentali, gli animali

sono stati posti in gabbie munite di griglie metalliche per prevenire gli episodi di coprofagia e sono stati deprivati di cibo durante le 24 ore precedenti l'inizio delle valutazioni funzionali. Durante questo intervallo agli animali è stato consentito l'accesso all'acqua fino ad 1 ora prima dell'inizio delle procedure sperimentali. Il disegno e il decorso temporale dei diversi esperimenti sono schematicamente illustrati in Figura 1.

Allo scopo di esaminare i meccanismi neuro-ormonali responsabili degli effetti dell'acqua Uliveto sulla motilità gastrointestinale, in alcuni sottogruppi di esperimenti lo svuotamento gastrico, il transito nell'intestino tenue e il transito nel colon sono stati misurati in animali sottoposti alla somministrazione di L-365,260 (bloccante selettivo dei recettori della gastrina; 5 $\mu\text{mol/kg}$ per via intraperitoneale) o di alosetron (bloccante selettivo dei recettori 5-HT₃ della serotonina, 1 mg/kg per via intraperitoneale), entrambi somministrati 15 minuti prima delle valutazioni funzionali.

Induzione della diarrea

La diarrea è stata provocata tramite somministrazione di 16,16-dimetilprostaglandina E₂ (dmPGE₂, 500 $\mu\text{g/kg}$ per via intraperitoneale), secondo il protocollo descritto da Aikawa e Karasawa (13). Ciascun animale è stato sottoposto ad osservazione per 90 minuti dopo la somministrazione di dmPGE₂. L'escrezione fecale è stata valutata per mezzo di un sistema arbitrario a punti, in base ai seguenti criteri: 0, feci dure o assenza di emissione di feci; 1, feci normali; 2, feci morbide ma formate; 3, feci non formate; 4, diarrea liquida. Il valore medio dei punteggi assegnati ai singoli animali è stato assunto quale indice di diarrea. Alla fine del periodo di osservazione di

90 minuti, gli animali sono stati sottoposti alle procedure per la valutazione dello svuotamento gastrico, del transito nell'intestino tenue e del transito nel colon.

Induzione della costipazione

Lo stato di costipazione intestinale è stato indotto secondo il metodo descritto da Shomotoyodome et al. (14). In particolare, durante gli ultimi cinque giorni di trattamento con l'acqua Uliveto o con l'acqua di controllo agli animali è stata somministrata loperamide per via sottocutanea (1,5 mg/kg due volte al giorno). Al termine di questo ciclo di somministrazioni gli animali sono stati sottoposti alle procedure per la misurazione dello svuotamento gastrico, del transito nell'intestino tenue e del transito nel colon. Inoltre, le feci evacuate da ciascun animale sono state raccolte, pesate, essiccate e ripesate al fine di stimare il loro contenuto di acqua, che è stato espresso in percentuale.

Induzione della colite per mezzo di DNBS

La colite è stata indotta secondo il metodo descritto da Fornai et al. (15). In breve, gli animali sono stati anestetizzati con dietiletere e sottoposti alla somministrazione di 30 mg di DNBS (0,25 ml di etanolo 50%) direttamente nel lume del colon per mezzo di un catetere di polietilene PE-60 introdotto per via rettale fino alla distanza di 8 cm dall'orifizio anale. Gli animali di controllo sono stati trattati con 0,25 ml di soluzione fisiologica. Dopo 6 giorni dal trattamento con DNBS, periodo durante il quale si ottiene il completo sviluppo della reazione infiammatoria a carico del tessuto colico, gli animali sono stati sottoposti alle procedure per la valutazione della motilità gastrointestinale e dell'intensità dell'infiammazione.

Induzione della colite per mezzo di acido acetico

La colite è stata indotta secondo il metodo descritto da Pacheco Blandino et al. (16). Gli animali sono stati anestetizzati con dietiletere e sottoposti alla somministrazione di acido acetico al 4% (1 ml/ratto, pH 2,3) direttamente nel lume del colon per mezzo di un catetere di polietilene PE-60 introdotto per via rettale fino alla distanza di 8 cm dall'orifizio anale. Dopo 30 secondi, la soluzione acida è stata rimossa e il lume del colon è stato lavato con 1,5 ml di soluzione tampone fosfato. Gli animali di controllo sono stati trattati con 1 ml di soluzione fisiologica. Dopo 6 giorni dal trattamento con DNBS, periodo durante il quale si ottiene il completo sviluppo della reazione infiammatoria a carico del tessuto colico, gli animali sono stati sottoposti alle procedure per la valutazione della motilità gastrointestinale e dell'intensità dell'infiammazione.

Valutazione della colite

La gravità dell'infiammazione intestinale è stata valutata sia macroscopicamente che istologicamente sulla base dei criteri stabiliti da Wallace e Keenan (17) e successivamente modificati da Barbara et al. (18). I criteri per la valutazione macroscopica sono i seguenti: presenza di adesioni tra colon e altri organi addominali; consistenza del materiale fecale (indice indiretto di diarrea); ispessimento della parete colica; presenza ed estensione di iperemia e di lesioni macroscopiche della mucosa (stimate per mezzo di un righello). L'analisi microscopica è stata eseguita per mezzo di microscopia ottica su sezioni di tessuto colico colorate con ematossilina-eosina. Le sezioni sono state ottenute da campioni a tutto spessore di tessuto colico, prelevati in

prossimità dell'area ulcerata e fissati in formalina neutra fredda al 4% diluita con soluzione tampone fosfato (PBS). I criteri per l'analisi istologica sono i seguenti: grado di alterazione dell'architettura cellulare della mucosa; infiltrazione cellulare; ispessimento della muscolatura esterna; presenza di ascessi criptici e deplezione di cellule mucipare.

Valutazione dello svuotamento gastrico

Lo svuotamento gastrico è stato misurato tramite un metodo, descritto in precedenza (11), che si basa sulla somministrazione di una sospensione di rosso fenolo (0,6 g/l) come pasto liquido non calorico. Tre ml di sospensione pre-riscaldata a 37°C sono stati instillati direttamente nel lume gastrico per mezzo di un catetere oro-gastrico in polietilene. Quindici minuti dopo lo stomaco è stato rapidamente rimosso e il contenuto presente nel lume è stato raccolto in provette graduate. Lo stomaco è stato quindi lavato con 3 ml di soluzione fisiologica, e il liquido di lavaggio è stato aggiunto al contenuto luminale inizialmente raccolto. La concentrazione di rosso fenolo nel materiale così raccolto è stata misurata per mezzo di uno spettrofotometro a 560 nm, dopo aggiunta di sodio idrossido 0,1 N, ed è stata calcolata la quantità totale di colorante raccolto dal lume gastrico. Lo svuotamento gastrico è stato espresso come volume della soluzione di colorante eliminato dallo stomaco in un intervallo di 15 minuti (ml/15 min).

Valutazione del transito nell'intestino tenue

La valutazione del transito nell'intestino tenue è stata eseguita tramite il metodo precedentemente descritto da Blandizzi et al. (7). In breve, 2 ml di sospensione di carbone (10% di carbone sospeso in gomma arabica al 12,5%) sono stati instillati direttamente nel lume gastrico per mezzo di un catetere oro-gastrico di polietilene. Dopo 25 minuti, l'intestino tenue è stato rapidamente rimosso, evitando stiramenti e altri stress meccanici. Il transito nell'intestino tenue è stato quindi valutato in base al confronto tra la distanza percorsa dal bolo di carbone a partire dallo sfintere pilorico rispetto alla lunghezza totale dell'intestino tenue (misurata dallo sfintere pilorico alla giunzione ileo-cecale).

Valutazione del transito nel colon

Il transito nel colon è stato misurato secondo il metodo descritto da Negri et al. (19). Al momento dell'esperimento gli animali sono stati sottoposti ad una breve anestesia con dietiletere. Il cavo addominale è stato quindi esposto per mezzo di laparotomia, 1 ml di soluzione di blu di Evans (5% in metocel 1,5%) è stata iniettata nel lume del colon prossimale e l'incisione è stata rapidamente chiusa per mezzo di punti di sutura. Due ore più tardi, il colon è stato rimosso, evitando stiramenti e altri stress meccanici. Il transito nel colon è stato misurato come distanza percorsa dal colorante rispetto alla lunghezza totale del colon, misurata dal cieco all'orifizio anale.

Determinazione della mieloperossidasi nel tessuto colico

I livelli di mieloperossidasi nei campioni di tessuto colico sono stati misurati secondo il metodo descritto da Pacheco Blandino et al. (16), e sono stati assunti come indice quantitativo per stimare il grado di infiltrazione delle cellule polimorfonucleate nel colon. In breve, i campioni di tessuto colico (300 mg) sono stati omogenizzati tre volte (30 secondi ciascuna) a 4°C in 1 ml di tampone fosfato 50 mM (pH 6.0), contenente 0,5% di esadeciltrimetilammonio bromuro per bloccare l'attività della pseudoperossidasi e per solubilizzare la quota di mieloperossidasi legata alle membrane. L'omogenato è stato sonicato per 10 secondi, sottoposto a tre cicli di congelamento e scongelamento e centrifugato per 20 minuti a 18.000 g. Il sovranatante è stato quindi raccolto e utilizzato per la determinazione della mieloperossidasi per mezzo di un kit per dosaggio immunoenzimatico (Bioxytech, Oxis International Inc., Portland, OR, USA). I risultati sono stati espressi come ng di mieloperossidasi per 100 mg di tessuto fresco.

Farmaci e reagenti

Loperamide cloridrato, 16,16-dimetilprostaglandina E2, acido 2,4-dinitrobenzenesolfonico, esadeciltrimetilammonio bromuro (Sigma Chemicals, Co., St Louis, MO, U.S.A.). Alosetron, L-365,260 (gentilmente forniti da Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, U.S.A.).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm errore standard della media (ESM). La significatività delle differenze tra le medie è stata valutata per mezzo di analisi della varianza (ANOVA) a una via seguita dal test di Student-Newman-Keuls. Sono stati considerati significativi valori di P inferiori a 0,05. 'n' indica il numero di animali impiegati in ciascun gruppo di trattamento.

Bibliografia

1. Shafik, A. Constipation. Pathogenesis and management. *Drugs* 1993, 45(4): 528-540.
2. Bytzer, P., Talley, N.J. Dyspepsia. *Ann Intern Med* 2000, 134(9 pt 2): 815-822.
3. Villanueva, A., Dominguez-Munoz, J.E., Mearin, F. Update in the therapeutic management of irritable bowel syndrome. *Dig Dis* 2001, 19(3): 244-250
4. Drossman, D.A. Review article: an integrated approach to the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1999, 13 (Suppl. 2): 3-14.
5. Hendrickson, B.A., Gokhale, R., Cho, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(1): 79-94.
6. Collins, S.M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 1996, 111(6): 1683-1699.
7. Blandizzi, C., Fornai, M., Colucci, R., et al. Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by alpha-2 adrenoceptors in the presence of experimental colitis. *Br J Pharmacol* 2003, 139(2): 309-320.
8. Gasbarrini, G., Candelli, M., Graziosetto, R.G., et al. Evaluation of thermal water in patients with functional dyspepsia and irritable bowel syndrome accompanying constipation. *World J Gastroenterol* 2006, 12(16): 2556-2562.
9. Cuomo, R., Grasso, R., Sarnelli, G., et al. Effects of carbonated water on functional dyspepsia and constipation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14(9): 991-999.
10. Barclay, G., Maxwell, V., Grossman, M.I., et al. Effects of graded amounts of intragastric calcium on acid secretion, gastrin release, and gastric emptying in normal and duodenal ulcer subjects. *Dig Dis Sci* 1983, 28(5): 385-391.

11. Bertoni, M., Oliveti, F., Vanghetti, M., et al. Effects of a bicarbonato-alkaline mineral water on gastric functions and functional dyspepsia: a preclinical and clinical study. *Pharmacol Res* 2002, 46(6): 525-531.
12. Walsh, J.H. Gastrointestinal hormones. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson L.R. 3rd edn. Raven Press: New York 1994: 1-31.
13. Aikawa, N., Karasawa, A. Effects of KW-5617 (zaldaride maleate), a potent and selective calmodulin inhibitor, on secretory diarrhea and on gastrointestinal propulsion in rats. *Jpn J Pharmacol* 1998, 76(2): 199-206.
14. Shimotoyodome, A., Meguro, S., Hase, T., et al. Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Comp Biochem Physiol* 2000, 126(2): 203-211.
15. Fornai, M., Blandizzi, C., Antonioli, L., et al. Differential role of cyclooxygenase 1 and 2 isoforms in the modulation of colonic neuromuscular function in experimental inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317(3): 938-945.
16. Pacheco Blandino, I.I., Otaka, M., Jin, M., et al. FR167653, a potent suppressant of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production, ameliorates colonic lesions in experimentally induced acute colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001, 16(10): 1105-1111.
17. Wallace, J.L., Keenan, C.M. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. *Am J Physiol* 1990, 258(4 pt 1): G527-G534.
18. Barbara, G., Xing, Z., Hogaboam, C.M., et al. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000, 46(3): 344-349.

19. Negri, L., Broccardo, M., Lattanzi, R., et al. Effects of antisense oligonucleotides on brain delta-opioid receptor density and on SNC80-induced locomotor stimulation and colonic transit inhibition in rats. *Br J Pharmacol* 1999, 128(7): 1554-1560.
20. Tack, J., Talley, N.J., Camilleri, M., et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006, 130(5): 1466-1479.
21. Wood, J.D. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007, 13(9): 1313-1332.
22. Bortolotti, M., Turba, E., Mari, C., et al. Effect of a mineral water on gastric emptying of patients with idiopathic dyspepsia. *Int J Clin Pharmacol Res* 1999, 19(2): 53-56.
23. Anti, M., Lippi, M.E., Santarelli, L., et al. Effects of mineral-water supplementation on gastric emptying of solids in patients with functional dyspepsia assessed with the ¹³C-octanoic-acid breath test. *Hepatogastroenterology* 2004, 51(60): 1856-1859.
24. Wald, A. Colonic transit and anorectal manometry in chronic idiopathic constipation. *Arch Int Med* 1986, 146(9): 1713-1716.
25. Björnsson, E., Chey, W.D., Ladabaum, U., et al. Mediation of both the mechano- and chemoreceptor components of the gastrocolonic response but not the colonic peristaltic reflex by serotonergic 5-HT₃ pathways in healthy humans. *Am J Physiol* 1998, 275(3 pt 1): G498-G505.
26. Von der Ohe, M.R., Hanson, R.B., Camilleri, M. Serotonergic mediation of postprandial colonic tonic and phasic responses in humans. *Gut* 1994, 35(4): 536-541.
27. Dooley, C.P., Valenzuela, J.E. Duodenal volume and osmoreceptors in the stimulation of human pancreatic secretion. *Gastroenterology* 1984, 86(1): 23-27.

28. Fiorucci, S., Bosso, R., Morelli, A. Duodenal osmolality drives gallbladder emptying in humans. *Dig Dis Sci* 1990, 35(6): 698-704.
29. Polushina, N.D. The effect of mineral water on serotonin and insulin production (an experimental study). *Vopr Kurotol Fizioter Lech Fiz Kult* 1998, Jul-Aug(4): 9-10.

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche dell'acqua Uliveto e dell'acqua oligominerale di controllo utilizzate nel presente studio

	<i>Acqua Uliveto</i>	<i>Acqua di controllo</i>
Li ⁺	0.2 mg l ⁻¹	0.1 mg l ⁻¹
Na ⁺	113.7 mg l ⁻¹	4.6 mg l ⁻¹
K ⁺	11.6 mg l ⁻¹	0.46 mg l ⁻¹
Mg ²⁺	29.8 mg l ⁻¹	3.7 mg l ⁻¹
Ca ²⁺	202.2 mg l ⁻¹	57 mg l ⁻¹
Sr ²⁺	0.7 mg l ⁻¹	0.19 mg l ⁻¹
F ⁻	1.4 mg l ⁻¹	0.14 mg l ⁻¹
Cl ⁻	121.4 mg l ⁻¹	7.7 mg l ⁻¹
HCO ₃ ⁻	683.2 mg l ⁻¹	180 mg l ⁻¹
NO ₃ ⁻	5.9 mg l ⁻¹	1.2 mg l ⁻¹
SO ₄ ²⁻	151 mg l ⁻¹	8.5 mg l ⁻¹
SiO ₂	7 mg l ⁻¹	3.7 mg l ⁻¹
CO ₂	820 mg l ⁻¹	130 mg l ⁻¹
pH (20°C)	6.0	7.79
Residuo secco (180°C)	986 mg ml ⁻¹	176 mg ml ⁻¹

Tabella 2. Effetti dell'acqua Uliveto o dell'acqua oligominerale di controllo sulla colite

	Acqua controllo	Acqua Uliveto	Acqua controllo + colite da DNBS	Acqua Uliveto + colite da DNBS	Acqua controllo + colite da acido acetico	Acqua Uliveto + colite da acido acetico
Danno macroscopico	1,56±0,27	1,41±0,32	11,08±1,06*	10,76±1,06* [#]	4,47±1,3*	4,21±1,45* [#]
Danno microscopico	1,19±0,31	1,09±0,46	6,88±1,74*	7,21±1,49* [#]	4,11±1,23*	4,78±1,24* [#]
Mieloperossidasi (ng/100 mg)	3,75±1,4	3,21±1,7	16,9±3,9*	18,4±4,2* [#]	15,1±2,9*	16,3±4,4* [#]

Ciascun valore rappresenta la media ± errore standard ottenuta da 8-10 animali. Differenza significativa in confronto agli animali trattati con acqua di controllo: *P<0,005; differenza significativa in confronto ai valori ottenuti negli animali trattati con acqua Uliveto: [#]P<0,05.