

МЕТОДИКА УСКОРЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ БАРЬЕРОВ *IN VITRO*С. В. Никулин^{1,2} ✉, А. А. Полозников¹, Д. А. Сахаров²¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия² Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, Россия

Для повышения эффективности разработки лекарственных препаратов необходимо увеличивать производительность экспериментов, проводимых на доклинической стадии. Существенным недостатком используемых на сегодняшний день *in vitro* моделей кишечного барьера является скорость образования функционального монослоя энтероцитов со сформировавшимися плотными контактами. Целью работы было провести комплексный подбор параметров (различные покрытия и плотность клеток) для быстрого и эффективного получения пригодного к проведению экспериментов монослоя клеток Сасо-2. Для оценки состояния культуры клеток при различных условиях применяли прижизненную микроскопию и импедансную спектроскопию. Для определения возможного биологического механизма действия различных белковых субстратов на энтероциты использовали транскриптомный анализ. Показано, что покрытие субстрата для роста клеток коллагеном IV существенно повышает скорость пролиферации и миграции клеток линии Сасо-2. Такое воздействие позволяет в течение 24 ч сформировать функциональный монослой эпителиальных клеток с плотными контактами. С целью получения пригодного для проведения экспериментов кишечного барьера *in vitro* в течение 24 ч начальная плотность клеток должна лежать в диапазоне 90–200 тыс. клеток на 1 см². Обнаружено, что клетки Сасо-2 слабо экспрессируют коллаген IV, при этом рецепторы к коллагену IV у данных клеток экспрессированы на достаточно высоком уровне. Показано также, что еще один компонент базальной мембраны ламинин 332 не оказывает заметного влияния на скорость формирования функционального монослоя эпителиальных клеток. Таким образом, в работе были определены оптимальные параметры, позволяющие существенно повысить производительность экспериментов с *in vitro* моделями кишки.

Ключевые слова: коллаген IV, барьерная ткань, ламинин 332, TEER, внеклеточный матрикс, Сасо-2, импедансная спектроскопия**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-19-10597).**Вклад авторов:** С. В. Никулин — культуральная работа, подготовка образцов для анализа транскриптома, анализ данных, написание статьи; А. А. Полозников — анализ транскриптомных данных, написание статьи; Д. А. Сахаров — организация исследования, написание статьи.**Соблюдение этических стандартов:** все образцы для исследования были получены с соблюдением принципов и правил Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Сергей Вячеславович Никулин
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117321; nikulin.c.b@gmail.com**Статья получена:** 09.11.2020 **Статья принята к печати:** 03.12.2020 **Опубликована онлайн:** 15.12.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.077A METHOD FOR RAPID GENERATION OF MODEL INTESTINAL BARRIERS *IN VITRO*Nikulin SV^{1,2} ✉, Poloznikov AA¹, Sakharov DA²¹ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia² SRC Bioclinicum, Moscow, Russia

To increase the efficiency of drug development process, it is important to improve performance of preclinical experiments. A major drawback of the currently used *in vitro* intestinal barrier models is that it takes a significant time to obtain functional enterocyte monolayers with formed tight junctions. In this work, we have optimized various parameters such as cell density and different coatings, for a more rapid and efficient producing Caco-2 cell monolayers suitable for further experiments. *In vivo* microscopy and impedance spectroscopy were used to monitor cells state under various conditions. To determine possible biological mechanisms affected by exposure to various protein substrates, the transcriptomic analysis was applied. It was shown that collagen IV coating of the cell growth substrate significantly increased the rate of proliferation and migration of Caco-2 cells. This effect allows forming a functional monolayer of epithelial cells with tight junctions within 24 hours. Optimally, the initial cell density should be 90,000 to 200,000 cells/cm². It was observed that collagen IV was poorly expressed by Caco-2 cells while the collagen IV receptor was expressed at a relatively high level in these cells. Laminin-332, another basement membrane component, was found to have no significant effect on times of formation of functional epithelial monolayers. Thus, using the optimal parameters determined in this study allows to significantly improve efficiency of using the *in vitro* intestinal barrier models.

Keywords: collagen IV, barrier tissues, laminin-332, TEER, extracellular matrix, Caco-2, impedance spectroscopy**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation, protocol № 16-19-10597.**Author contribution:** Nikulin SV — cell culture work, preparation of samples for transcriptome analysis, data analysis, manuscript preparation; Poloznikov AA — analysis of transcriptome data, manuscript preparation; Sakharov DA — supervision, manuscript preparation.**Compliance with ethical standards:** the study complies with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments.✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey V. Nikulin
Vavilova, 7, Moscow, 117321; nikulin.c.b@gmail.com**Received:** 09.11.2020 **Accepted:** 03.12.2020 **Published online:** 15.12.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.077

Кишка является важным органом, в котором происходит переваривание пищи, всасывание в кровотоки питательных веществ и различных лекарственных препаратов, а также взаимодействие микроорганизмов с клетками организма-хозяина. Одна из основных функций кишки — барьерная функция. Нарушение барьерной функции ассоциировано с целым рядом патологических состояний, включая воспалительные и аутоиммунные заболевания [1]. Часто

к нарушению барьерной функции кишки приводит прием различных противоопухолевых препаратов [2].

Различают три основных способа транспорта молекул через кишечный барьер: активный транспорт, пассивная диффузия через клеточную мембрану и пассивная диффузия через межклеточное пространство. Ключевым компонентом клеток, регулирующим парацеллюлярный транспорт, являются плотные контакты [3]. Плотные

контакты представляют собой белковые комплексы, расположенные ближе к апикальной части эпителиальной клетки и состоящие из нескольких цитоплазматических и трансмембранных белков, включая окклюдин и клаудины. За счет динамических изменений плотных контактов возможно быстрое изменение проницаемости кишки [4]. Состояние плотных контактов могут регулировать различные сигнальные молекулы, в том числе некоторые киназы (c-Src, c-Yes, и др.) и цитокины (ФНО α , интерферрон — и др.) [5]. В связи с важностью плотных контактов для функционирования кишки как в норме, так и при патологии, актуальна задача создания *in vitro* моделей для оценки влияния различных воздействий на плотные контакты [6, 7].

Существует несколько различных способов измерения парацеллюлярной проницаемости, отражающей состояние плотных контактов. В частности, популярно применение различных молекулярных меток, концентрация которых может быть точно измерена по обе стороны барьера [8, 9]. Однако данный метод достаточно трудоемкий и времязатратный. Альтернативой может быть измерение трансэпителиального сопротивления (TEER) [10]. Данный способ является быстрым и хорошо подходит для высокопроизводительных скринингов, при этом повышения точности измерения TEER можно добиться за счет применения импедансной спектроскопии [11, 12].

На сегодняшний день для моделирования кишечного барьера *in vitro* широко используют линию клеток Caco-2 [13]. Исходно клетки Caco-2 были получены из аденокарциномы толстой кишки, и оказалось, что они могут спонтанно дифференцироваться в культуре и приобретать многие свойства эпителия тонкой кишки [14, 15]. Известно, что клетки Caco-2 образуют плотные контакты по мере роста и додифференцировки, при этом их плотность выше, чем в нормальной кишке [14, 15]. В связи с таким свойством клетки Caco-2 представляют собой хорошую модель для изучения различных воздействий на плотные контакты. Однако для более широкого применения данной клеточной модели необходимо существенно повысить производительность экспериментов. Частично этого можно добиться при помощи автоматизации культивирования, например с помощью микрофлюидных чипов [16–18], однако необходимо определить наиболее благоприятные условия культивирования, которые позволят быстро получать готовые клеточные модели.

Целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования клеток Caco-2, позволяющих как можно быстрее получить целостный монослой клеток со сформировавшимися плотными контактами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки линии Caco-2 (Институт цитологии РАН; Россия) культивировали в питательной среде MEM (Gibco; США), содержащей 20% об. фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США) и 1% об. раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco; США). Культивирование проводили при 37 °C в атмосфере 5%-го CO $_2$. Субкультивирование производили каждые 2–3 дня по стандартной методике при помощи раствора трипсина-ЭДТА («ПанЭко»; Россия). Подсчет числа клеток проводили при помощи автоматического счетчика клеток Countess (Gibco; США) согласно рекомендациям производителя.

Перед посевом клеток в мембранные полиэфирные (PET) вставки HTS Transwell-96 (Corning; США) с размером

пор 1 мкм производили покрытие части мембран ламинином-332 (BioLamina; Швеция) и коллагеном IV («Имтек»; Россия). Для этого в мембранные вставки добавляли по 30 мкл раствора соответствующего белка в DPBS с концентрацией 10 мкг/мл. Затем 96-луночный планшет с мембранными вставками инкубировали при температуре 4 °C в течение 24 ч. После инкубации отбирали растворы белков из всех лунок и промывали каждую лунку 3 раза с помощью 100 мкл раствора DPBS. Мембранные вставки HTS непосредственно перед посевом клеток заполняли питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру) и инкубировали в клеточном инкубаторе 1 ч. Далее в каждую мембранную вставку добавляли различное число клеток (6250, 12 500 и 25 000 клеток на лунку) в 50 мкл питательной среды для достижения начальной плотности клеток 43 700, 87 400 и 174 800 клеток на 1 см 2 . Эксперимент проводили в трех повторах. Планшеты с мембранными вставками в течение всего эксперимента инкубировали в клеточном инкубаторе.

Для определения значений TEER через 24 и 48 ч от начала эксперимента измеряли импеданс-спектры, при помощи системы импедансной спектроскопии (HTЦ «БиоКлиникум»; Россия) и оригинальных электродов (HTЦ «БиоКлиникум»; Россия). Значения TEER рассчитывали из описанной ранее эквивалентной электрической схемы [19] при помощи ПО CEISA Impedance fitting (HTЦ «БиоКлиникум»; Россия). Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 4.0 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1 (RStudio PBC; США). Для оценки статистической значимости наблюдаемых различий TEER применяли трехфакторный (тип подложки, начальная плотность клеток и время от начала эксперимента) дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Для получения микрофотографий клеток Caco-2 на различных подложках часть лунок в культуральных 96-луночных планшетах (Corning; США) покрывали ламинином-332 (BioLamina; Швеция) и коллагеном IV (Имтек; Россия) по аналогичному с мембранными вставками протоколу. Для покрытия использовали по 50 мкл растворов белков. Далее в лунки вносили по 100 мкл клеточной суспензии в полной питательной среде с концентрацией клеток 100 000 и 200 000 клеток на 1 мл (соответствует начальной плотности клеток 31 300 и 62 600 на 1 см 2). Планшеты в течение всего эксперимента инкубировали в клеточном инкубаторе. Микрофотографии получали при помощи инвертированного микроскопа PrimoVert (Carl Zeiss; Германия).

Для получения полностью дифференцированных клеток Caco-2 культивирование проводили по описанной ранее методике [11, 19]. Анализ уровней экспрессии генов в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 проводили при помощи микрочипов GeneChip Human Genome 1.0 ST (Affymetrix; США) [20]. Клетки лизировали при помощи лизирующего буфера QIAzol (Qiagen; Германия). Далее проводили выделение тотальной РНК при помощи набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen; Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; США). Качество РНК оценивали с помощью системы Experion (Bio-Rad; США). Для гибридизации на микрочипах использовали по 500 нг каждого образца РНК. Эксперимент проводили в трех повторах.

Полученные результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения TAC 4.0 (Thermo Fisher Scientific; США). Оценку статистической значимости различий уровней экспрессии между дифференцированными и недифференцированными клетками Saso-2 проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бенджамини–Хохберга. Пороговый уровень значимости был равен 0,05. Гены с уровнем экспрессии ниже 6,0 в логарифмической шкале Affymetrix считали неэкспрессирующимися.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам измерения значений TEER (рис. 1) в мембранных вставках через 24 ч после посева клеток было показано, что TEER возрастает при росте начальной клеточной плотности. Например, для контрольных мембранных вставок без покрытия было обнаружено, что значения TEER примерно на 118 Ом·см² выше при максимальной протестированной начальной плотности посадки клеток по сравнению с минимальной ($p < 0,001$). При этом значимых различий между промежуточной и минимальной плотностями обнаружено не было ($p = 1$). Аналогичные результаты были получены и для покрытия лунок ламинином 332. Причем в случае покрытия ламинином 332 ни для одной протестированной начальной плотности клеток не было обнаружено значительных отличий TEER от контрольных лунок без покрытия (все $p = 1$). Однако при покрытии коллагеном IV результаты существенно отличались. В данном случае были обнаружены значительные отличия от минимальной исследованной начальной плотности 43 700 клеток на квадратный сантиметр как для начальной плотности, равной 87 400 (увеличение на 147 Ом·см²; $p < 0,001$), так и для начальной плотности, равной 174 800 (увеличение на 208 Ом·см²; $p < 0,001$). Таким образом, при покрытии коллагеном IV зависимость значений TEER от начальной плотности клеток была более выраженной. Для начальных плотностей клеток 87 400 и 174 800 см⁻² также было обнаружено сильное повышение TEER (на 188 Ом·см² и 142 Ом·см² соответственно) при покрытии коллагеном IV

по сравнению с контрольными полиэфирными лунками ($p < 0,001$ в обоих случаях).

Через 48 ч от начала эксперимента значения TEER в контрольных лунках без покрытия существенно выросли при начальной плотности клеток, равной 87 400 и 174 800 см², по сравнению с измерениями, проведенными через 24 ч после посева клеток (на 202 Ом·см² и 110 Ом·см² соответственно; $p < 0,001$ и $p = 0,002$ соответственно). При этом значимых различий TEER в лунках с минимальной протестированной начальной плотностью клеток 43 700 см² через 48 ч по сравнению с 24 ч от начала эксперимента обнаружено не было ($p = 1$). В случае покрытия лунок ламинином 332 были получены схожие результаты при сравнении значений TEER через 48 ч и 24 ч после посева клеток: при начальной плотности 43 700 см² значимых различий обнаружено не было ($p = 0,1$), при начальной плотности 87 400 см² значения TEER значимо выросли на 165 Ом·см² ($p < 0,001$), однако при начальной плотности 174 800 см² наблюдаемый рост на 83 Ом·см² не был статистически значимым ($p = 1$). В то же время в покрытых коллагеном IV лунках через 48 ч значения TEER значимо увеличились на 175 Ом·см² по сравнению с измерениями, проведенными в предыдущий день, только при минимальной начальной плотности клеток ($p < 0,001$), а при 87 400 см² и 174 800 см² значимых различий обнаружено не было ($p = 0,2$ и $p = 1$ соответственно).

Интересно, что для лунок без покрытия и при покрытии ламинином 332 значения TEER все еще зависели от начальной плотности клеток через 48 ч после их посева. При сравнении с минимальной протестированной клеточной плотностью в случае непокрытых полиэфирных лунок значения TEER были выше как при начальной плотности 87 400 см² (на 172 Ом·см²; $p < 0,001$), так и при начальной плотности 174 800 см² (на 188 Ом·см²; $p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены и в случае покрытия ламинином 332. При этом значения TEER в лунках, покрытых коллагеном IV, значимо не зависели от начальной плотности клеток через 48 ч после начала эксперимента (все $p = 1$) и были выше 200 Ом·см².

С целью оценки влияния покрытия субстрата для роста клеток коллагеном IV и ламинином 332 на

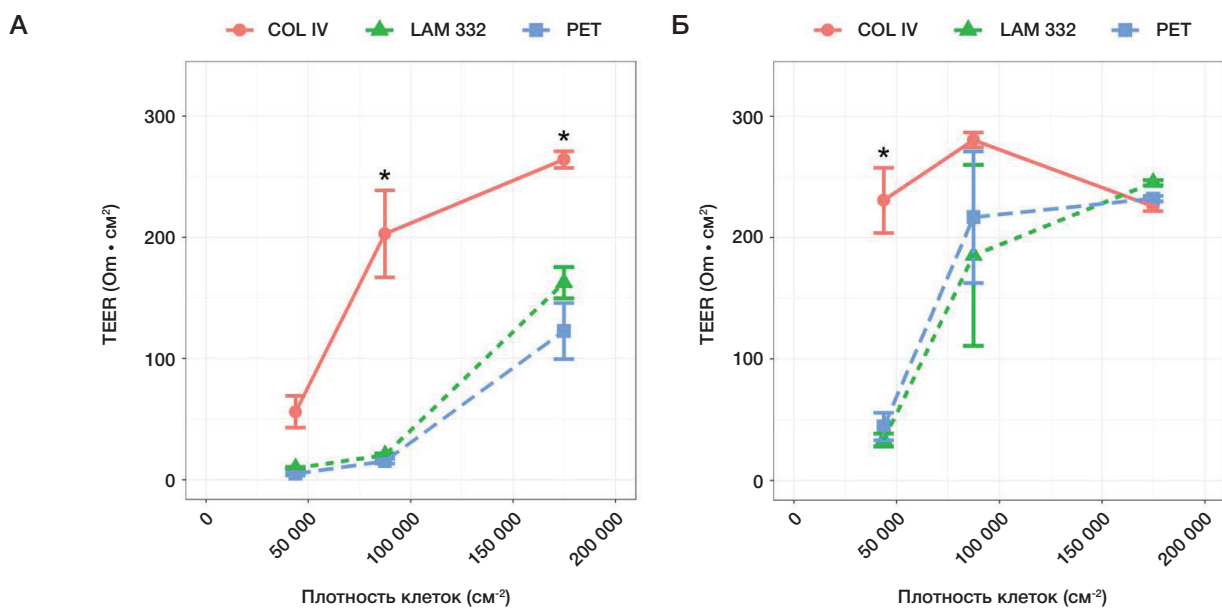


Рис. 1. Зависимость TEER на различных субстратах от начальной плотности клеток через 24 ч (А) и через 48 ч (Б). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. * — статистически значимые отличия TEER на мембранах с покрытием от контрольных мембран без покрытия; COL IV — коллаген IV; LAM 332 — ламинин 332; PET — полиэфир (мембраны без покрытия)

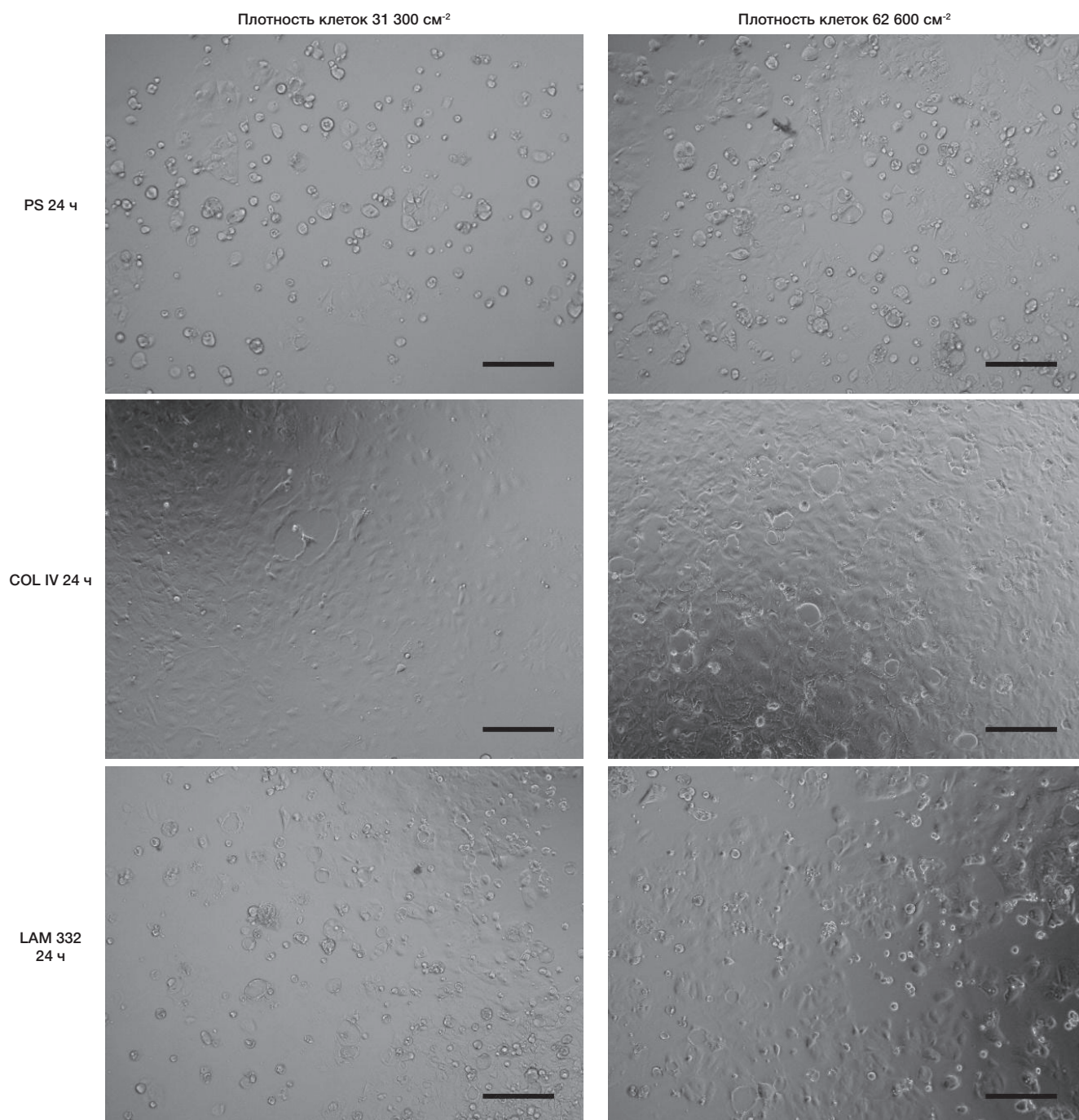


Рис. 2. Микрофотографии монослоя клеток Сасо-2 через 24 ч на различных подложках и при различных начальных плотностях клеток. Отрезок масштаба равен 200 мкм. COL IV — коллаген IV; LAM 332 — ламинин 332; PS — полистирол (лунки без покрытия)

морфологию и скорость роста клеток была проведена прижизненная микроскопия клеток Сасо-2 при различных начальных плотностях через 24 ч после посева клеток (рис. 2). Оказалось, что для контрольных непокрытых полистироловых лунок и в случае покрытия ламинином 332 при рассмотренных начальных плотностях клеток 100%-я конфлюэнтность не достигается. Однако при покрытии коллагеном IV уже при начальной плотности 31 300 см⁻² около 80% поверхности оказывается покрыто клетками, а при начальной плотности 62 600 см⁻² в лунках образуется сформированный монослой. При этом при покрытии коллагеном IV в культуре обнаружено повышенное содержание вытянутых веретенообразных клеток, по сравнению с контрольными лунками и лунками с покрытием ламинином 332.

В результате проведенного транскриптомного анализа было показано (см. табл.), что как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках Сасо-2 экспрессия всех цепей коллагена IV находится на достаточно низком уровне (все значения меньше 7 в логарифмической шкале Affymetrix). Более того, по мере дифференцировки клеток наблюдалось небольшое снижение экспрессии генов COL4A1 и COL4A6.

Известно, что основными рецепторами коллагена IV являются интегрины $\alpha1\beta1$ и $\alpha2\beta1$ [21]. По данным проведенного транскриптомного анализа было показано, что ген ITGB1 ($\beta1$ -цепь интегрин) экспрессируется на достаточно высоком уровне как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках Сасо-2 (значения в логарифмической шкале Affymetrix — 10,0 и 10,1

Таблица. Уровни экспрессии цепей коллагена IV в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 (в логарифмической шкале Affymetrix)

Ген	Средний уровень экспрессии в дифференцированных клетках Caco-2	Средний уровень экспрессии в недифференцированных клетках Caco-2	Степень изменения	FDR p
COL4A1	6,15	6,39	-1,18	0,0235
COL4A2	6,7	6,74	-1,02	0,3724
COL4A3	5,92	5,96	-1,03	0,3166
COL4A4	5,66	5,67	-1,01	0,5068
COL4A5	6,54	6,74	-1,15	0,0904
COL4A6	5,91	6,29	-1,3	0,0302

соответственно), причем его экспрессия значимо не меняется по мере дифференцировки ($p = 0,4$). Ген ITGA1 ($\alpha 1$ -цепь интегрин) тоже экспрессировался в дифференцированных и в недифференцированных клетках Caco-2 (значения в логарифмической шкале Affymetrix — 8,6 и 9,0 соответственно), однако его экспрессия слегка падала в дифференцированных клетках (в 1,3 раза; $p = 0,002$). Аналогичные результаты были получены и для гена ITGA2 ($\alpha 2$ -цепь интегрин): средние значения экспрессии в дифференцированных и недифференцированных клетках составили 9,2 и 9,5 логарифмических единиц Affymetrix, при этом небольшое снижение экспрессии в дифференцированных клетках было статистически значимым (в 1,3 раза; $p = 0,04$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из полученных данных следует, что коллаген IV является наиболее эффективным субстратом, значительно ускоряющим скорость формирования функционального эпителиального барьера клеток кишки. Известно, что некоторые цепи коллагена IV ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$) участвуют в формировании и развитии кишки, причем данные белки могут синтезировать как эпителиальные, так и мезенхимальные клетки [22]. Судя по результатам проведенного транскриптомного анализа, клетки Caco-2 не могут в достаточной мере синтезировать коллаген IV, при этом на всех стадиях они экспрессируют рецепторы к коллагену IV, что свидетельствует о возможности его влияния на жизнедеятельность клетки.

Исходя из полученных микрофотографий можно сделать вывод, что коллаген IV способствует как пролиферации, так и миграции клеток Caco-2. На сегодняшний день накоплен достаточно большой массив данных, свидетельствующих о том, что коллаген IV стимулирует прикрепление и миграцию клеток Caco-2 [23–25]. Известно также, что коллаген IV может стимулировать пролиферацию некоторых других типов эпителиальных клеток [26, 27]. Таким образом, полученные результаты хорошо согласуются с проведенными ранее исследованиями.

Ранее уже было изучено влияние коллагена IV на величину TEER монослоя клеток Caco-2 и обнаружено, что через несколько дней после посева клеток значения TEER были значительно выше в лунках, покрытых коллагеном IV, однако динамику изменений TEER в течение первых нескольких дней культивирования не определяли [28]. В данной работе было показано, что коллаген IV влияет не только на величины TEER, но и на скорость достижения минимально достаточных для проведения экспериментов с барьерными моделями значений TEER (примерно 200 Ом·см²) [9], причем таких значений точно можно добиться в течение 24 ч, а возможно и раньше. Полученная методика может быть легко перенесена как на другие статические *in vitro* модели барьерных тканей, так и на современные динамические микрофлюидные системы [29, 30].

ВЫВОДЫ

В данной работе было показано, что покрытие субстрата для роста клеток коллагеном IV существенно повышает скорость пролиферации и миграции клеток линии Caco-2. Такое воздействие позволяет быстро в течение 24 ч сформировать функциональный монослой эпителиальных клеток с плотными контактами. Был определен оптимальный диапазон начальной плотности клеток. С целью получения пригодного для проведения экспериментов кишечного барьера *in vitro* в течение 24 ч начальная плотность клеток должна лежать в диапазоне 90–200 тыс. клеток на 1 см². Обнаружено, что коллаген IV слабо экспрессируется клетками Caco-2, при этом рецепторы к коллагену IV у данных клеток экспрессированы на достаточно высоком уровне. В то же время было показано, что еще один компонент базальной мембраны (ламинин 332) не оказывает заметного влияния на скорость формирования функционального монослоя эпителиальных клеток.

Полученные результаты в будущем могут быть использованы для повышения производительности экспериментов с *in vitro* моделями кишечного барьера, как в статических условиях, так и в микрофлюидных системах.

Литература

1. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol [Internet]. 2009 Nov; 9 (11): 799–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2653>.
2. Bajic JE, Johnston IN, Howarth GS, Hutchinson MR. From the Bottom-Up: Chemotherapy and Gut-Brain Axis Dysregulation. Front Behav Neurosci [Internet]. 2018 May 22; 12 (May): 1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00104/full>.
3. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. Intest Res [Internet]. 2015; 13 (1): 11. Available from: <http://irjournal.org/journal/view.php?doi=10.5217/ir.2015.13.1.11>.
4. Varadarajan S, Stephenson RE, Miller AL. Multiscale dynamics of tight junction remodeling. J Cell Sci [Internet]. 2019 Nov 15; 132 (22): jcs229286. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.229286>.
5. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp Mol Med

- [Internet]. 2018 Aug 16; 50 (8): 103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
6. Peters MF, Landry T, Pin C, Maratea K, Dick C, Wagoner MP, et al. Human 3D Gastrointestinal Microtissue Barrier Function As a Predictor of Drug-Induced Diarrhea. *Toxicol Sci* [Internet]. 2019 Mar 1; 168 (1): 3–17. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/1/3/5145097>.
 7. Hashimoto Y, Tachibana K, Krug SM, Kunisawa J, Fromm M, Kondoh M. Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 17; 20 (16): 4016. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4016>.
 8. Hidalgo J, Raub TJ, Borcharadt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* [Internet]. 1989 Mar; 96 (3): 736–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508589800721>.
 9. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Sep; 2 (9): 2111–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.303>.
 10. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* [Internet]. 2015 Apr; 20 (2): 107–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214561025>.
 11. Nikulin SV, Gerasimenko TN, Shilin SA, Zakharova GS, Gazizov IN, Poloznikov AA, et al. Application of Impedance Spectroscopy for the Control of the Integrity of In Vitro Models of Barrier Tissues. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2019 Feb 19; 166 (4): 512–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-019-04384-5>.
 12. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2019; 7: 474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32039179>.
 13. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2006 Feb 3; 22 (1): 186–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050208u>.
 14. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *J Pharm Sci* [Internet]. 2000 Jan; 89 (1): 63–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916305408>.
 15. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012 Dec; 64 (SUPPL.): 280–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002657>.
 16. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19. Available from: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-019-0686-y>.
 17. Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014 Feb; 25: 95–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913006794>.
 18. Caicedo HH, Brady ST. Microfluidics: The Challenge Is to Bridge the Gap Instead of Looking for a “Killer App.” *Trends Biotechnol* [Internet]. 2016; 34 (1): 1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.003>.
 19. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2018 Nov 12; 166 (1): 35–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-018-4283-7>.
 20. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo₂ cells in microfluidic chip. *Bio Chip J*. 2016 Sep; 10 (3): 215–20.
 21. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2008 May; 71 (5): 357–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20564>.
 22. Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* [Internet]. 1998 Jul; 212 (3): 437–47. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199807\)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y).
 23. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* [Internet]. 1992 Jul 1; 90 (1): 15–23. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/115828>.
 24. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 cell spreading and p130Cas phosphorylation by FAK-dependent and FAK-independent pathways. *Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 1; 389 (1): 47–55. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2008.389.issue-1/bc.2008.008/bc.2008.008.xml>.
 25. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via $\alpha 1 \beta 1$ - and $\alpha 2 \beta 1$ -integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2004 Apr; 286 (4): G547–57. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00262.2003>.
 26. Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol* [Internet]. 2018 May; 27 (5): 443–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13328>.
 27. Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 Dec 26; 13 (1): 154. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-154>.
 28. Vlasaliu D, Falcone FH, Stolnik S, Garnett M. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Apr; 323 (1): 218–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.022>.
 29. Kim HJ, Huh D, Herland A, Henry OYF, Leineweber WD, Yadid M, Doyle J, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip* [Internet]. 2017; 17 (13): 2294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00412E>.
 30. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* [Internet]. 2012; 12 (12): 2165. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40074j>.

References

1. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Nov; 9 (11): 799–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2653>.
2. Bajic JE, Johnston IN, Howarth GS, Hutchinson MR. From the Bottom-Up: Chemotherapy and Gut-Brain Axis Dysregulation. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2018 May 22; 12 (May): 1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00104/full>.
3. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res* [Internet]. 2015; 13 (1): 11. Available from: <http://irjournal.org/journal/view.php?doi=10.5217/ir.2015.13.1.11>.
4. Varadarajan S, Stephenson RE, Miller AL. Multiscale dynamics of tight junction remodeling. *J Cell Sci* [Internet]. 2019 Nov 15; 132 (22): jcs.229286. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.229286>.
5. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*

- [Internet]. 2018 Aug 16; 50 (8): 103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
6. Peters MF, Landry T, Pin C, Maratea K, Dick C, Wagoner MP, et al. Human 3D Gastrointestinal Microtissue Barrier Function As a Predictor of Drug-Induced Diarrhea. *Toxicol Sci* [Internet]. 2019 Mar 1; 168 (1): 3–17. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/1/3/5145097>.
 7. Hashimoto Y, Tachibana K, Krug SM, Kunisawa J, Fromm M, Kondoh M. Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 17; 20 (16): 4016. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4016>.
 8. Hidalgo J, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* [Internet]. 1989 Mar; 96 (3): 736–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508589800721>.
 9. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Sep; 2 (9): 2111–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nprot.2007.303>.
 10. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* [Internet]. 2015 Apr; 20 (2): 107–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214561025>.
 11. Nikulin SV, Gerasimenko TN, Shilin SA, Zakharova GS, Gazizov IN, Poloznikov AA, et al. Application of Impedance Spectroscopy for the Control of the Integrity of In Vitro Models of Barrier Tissues. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2019 Feb 19; 166 (4): 512–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-019-04384-5>.
 12. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2019; 7: 474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32039179>.
 13. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2006 Feb 3; 22 (1): 186–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050208u>.
 14. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *J Pharm Sci* [Internet]. 2000 Jan; 89 (1): 63–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916305408>.
 15. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012 Dec; 64 (SUPPL.): 280–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002657>.
 16. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19. Available from: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-019-0686-y>.
 17. Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014 Feb; 25: 95–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913006794>.
 18. Caicedo HH, Brady ST. Microfluidics: The Challenge Is to Bridge the Gap Instead of Looking for a “Killer App.” *Trends Biotechnol* [Internet]. 2016; 34 (1): 1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.003>.
 19. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2018 Nov 12; 166 (1): 35–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-018-4283-7>.
 20. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCO₂ cells in microfluidic chip. *Bio Chip J*. 2016 Sep; 10 (3): 215–20.
 21. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2008 May; 71 (5): 357–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20564>.
 22. Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* [Internet]. 1998 Jul; 212 (3): 437–47. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199807\)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y).
 23. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* [Internet]. 1992 Jul 1; 90 (1): 15–23. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/115828>.
 24. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 cell spreading and p130Cas phosphorylation by FAK-dependent and FAK-independent pathways. *Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 1; 389 (1): 47–55. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2008.389.issue-1/bc.2008.008/bc.2008.008.xml>.
 25. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via $\alpha 1 \beta 1$ - and $\alpha 2 \beta 1$ -integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2004 Apr; 286 (4): G547–57. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00262.2003>.
 26. Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol* [Internet]. 2018 May; 27 (5): 443–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13328>.
 27. Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 Dec 26; 13 (1): 154. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-154>.
 28. Vllasaliu D, Falcone FH, Stolnik S, Garnett M. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Apr; 323 (1): 218–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.022>.
 29. Maoz BM, Herland A, Henry OYF, Leineweber WD, Yacid M, Doyle J, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip* [Internet]. 2017; 17 (13): 2294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00412E>.
 30. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* [Internet]. 2012; 12 (12): 2165. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40074j>.