

*Министерство обороны Российской Федерации
Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова*

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ
МИКРОБНО-ТКАНЕВОГО
КОМПЛЕКСА КИШЕЧНИКА
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК

Методические рекомендации



Нордмедиздат
Санкт-Петербург
2025

УДК 34

Особенности диагностики микробно-тканевого комплекса кишечника у больных хронической болезнью почек. Методические рекомендации – СПб.: Нордмедиздат, 2025. – 56 с.

Коллектив авторов:

Бельских А.Н. член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор

Гриневич В.Б. д.м.н., профессор

Пятченков М.О. к.м.н.

Саликова С.П. д.м.н., доцент

Кравчук Ю.А. д.м.н., доцент

Нагибович О.А. д.м.н., доцент

Захаров М.В. к.м.н., доцент

Рябова Т.С. д.м.н.

В методических рекомендациях на современном уровне освещены вопросы строения и нормальной физиологии микробно-тканевого комплекса кишечника, актуальные диагностические подходы к изучению состава кишечной микробиоты и барьерной функции кишечной стенки, обсуждаются их преимущества и методологические ограничения при сопутствующем нарушении функции почек. Представлены обобщенные литературные данные и результаты собственных исследований об особенностях уремикального дисбактериоза кишечника и синдрома повышенной эпителиальной проницаемости кишечника при экспериментальном моделировании хронической нефропатии у лабораторных животных и у больных хронической болезнью почек. Предложен оригинальный способ оценки проницаемости эпителиального барьера кишечника у пациентов, получающих лечение программным гемодиализом, который позволяет оценить наличие и степень тяжести нарушений, что, безусловно, будет полезным при выборе дальнейшей тактики лечения и оценке эффективности проводимой терапии.

Методические рекомендации предназначены для врачей терапевтов, нефрологов, гастроэнтерологов, а также других специалистов, сталкивающихся в своей повседневной деятельности с пациентами с хронической болезнью почек и патологией желудочно-кишечного тракта.

Рецензент: Заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова» МО РФ доктор медицинских наук, профессор А.Н. Кучмин

ISBN 978-5-98306-173-6

© Коллектив авторов, 2025

Оригинал-макет подготовлен в издательстве
«Центр современной литературы и книги на Васильевском»
199004, Санкт Петербург, Биржевой пер., д. 1/10
www.nordmedizdat.com www.litcenterspb.com (812)934-79-05.



Список сокращений

ВЭЖХ/МС-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
КЦЖК	– короткоцепочечные жирные кислоты
МТКК	– микробно-тканевой комплекс кишечника
ПК	– плотные контакты
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СКФ	– скорость клубочковой фильтрации
ТКЗ	– ток короткого замыкания
ТПН	– терминальная почечная недостаточность
ТЭС	– трансэпителиальное сопротивление
ХБП	– хроническая болезнь почек





Содержание

<i>Список сокращений</i>	3
<i>Введение</i>	5
1. Структура и нормальная физиология микробно-тканевого комплекса кишечника	7
2. Методы диагностики микробно-тканевого комплекса кишечника ...	14
2.1. Методы исследования кишечной микробиоты	14
2.2. Методы оценки барьерной функции и проницаемости кишечной стенки	15
2.2.1. Методы <i>ex vivo</i>	15
2.2.2. Методы <i>in vitro</i>	17
2.2.3. Методы <i>in situ</i>	18
2.2.4. Молекулярно-биологические методы	20
2.2.5. Методы <i>in vivo</i>	21
2.2.6. Биомаркеры повышенной проницаемости кишечника ..	23
2.2.7. Методы <i>in silico</i>	24
2.2.8. Другие перспективные методы	25
2.3. Методологические ограничения диагностик микробно-тканевого комплекса кишечника при нарушении функции почек ...	27
3. Состояние микробно-тканевого комплекса кишечника при хронической болезни почек	31
3.1. Особенности дисбактериоза кишечника при хронической болезни почек	31
3.2. Нарушения целостности кишечного барьера при ХБП	33
<i>Заключение</i>	49
<i>Список литературы</i>	51



Кишечная микробиота играет фундаментальную роль в поддержании нормального гомеостаза организма человека, регулируя широкий спектр метаболических, биосинтетических и иммунных функций. Эта сложная экосистема вместе с клеточными и стромальными компонентами стенки кишки образует микробно-тканевой комплекс кишечника (МТКК), изменения со стороны которого являются универсальным механизмом развития многих заболеваний, включая хроническую болезнь почек (ХБП) [1].

Достижения современной науки позволили установить наличие тесной двунаправленной связи между почками и кишечником. Кишечный дисбактериоз и синдром повышенной эпителиальной проницаемости кишечника в настоящее время следует рассматривать не только как осложнения различных нефропатий, но и как важные патофизиологические механизмы прогрессирования почечной недостаточности. Кроме того, результаты все большего количества экспериментальных и клинических исследований демонстрируют возможную патогенетическую роль дисфункции МТКК в развитии сердечно-сосудистых, метаболических, минерально-костных, нутриционных, когнитивных и других осложнений при ХБП [2, 3]. Между тем точные механизмы, лежащие в основе взаимодействия «почка–кишечник», остаются в значительной степени не изученными, что во многом связано с отсутствием надежных методов оценки МТКК [4].

Основная цель данных методических рекомендаций – выработка единых стандартизированных подходов к диагностике МТКК у больных ХБП с целью их внедрения в клиническую практику, включая рекомендации по общим принципам и минимальным требованиям к их проведению, показаниям, противопоказаниям, протоко-

лам исследования, методам анализа и потенциальной клинической ценности. Мы также оценили пробелы в имеющихся знаниях и перспективные направления в этой области. Дальнейшее изучение двунаправленной взаимосвязи между почками и МТКК будет способствовать разработке новых направлений профилактики и патогенетической терапии ХБП.





1. Структура и нормальная физиология микробно-тканевого комплекса кишечника

Слизистая желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) обладает наибольшей поверхностью среди всех слизистых покровов тела человека. Площадь более чем 400 м² колонизирована сотнями триллионов микроорганизмов и находится в постоянном контакте с пищевыми антигенами. В таких условиях она вынуждена выполнять крайне сложную задачу, действуя как избирательно проницаемая преграда, позволяющая поглощать питательные вещества, электролиты и воду, сдерживая при этом иммунную агрессию и ограничивая транспорт патогенных бактерий и продуктов их метаболизма в системный кровоток. Реализация этих разнородных функций достигается тонким взаимодействием между компонентами микробно-тканевого комплекса кишечника (МТКК), функциональное состояние которого описывается как «кишечная проницаемость» [5, 6].

Слой слизи – это первая линия физической защиты, которая предотвращает прямой контакт бактерий с эпителиальными клетками. Основными структурными компонентами кишечной слизи считаются высокогликозилированные белки – муцины, образующие гелеобразную структуру, покрывающую эпителий. В тонкой и толстой кишке муцин 2 (MUC2) является наиболее распространенным гликопротеином, секретлируемым бокаловидными клетками. Примечательно, что слизь тонкой кишки представлена только одним слоем, тогда как толстая кишка имеет два слоя: наружный рыхлый, колонизированный комменсальными бактериями, и внутренний плотный, практически лишенный микроорганизмов.

С функциональной точки зрения наиболее важным компонентом МТКК является кишечный эпителий. Самообновление эпите-

лиальных клеток кишечника поддерживается пролиферативной активностью стволовых плюрипотентных клеток, расположенных в основании кишечных крипт, которые впоследствии дифференцируются в различные подтипы энтероцитов и вместе образуют непрерывный поляризованный монослой, отделяющий просвет кишки от собственной пластинки. Каёмчатые энтероциты составляют до 80% клеток эпителия кишечника. Они отвечают за поглощение ионов, воды, сахаров, пептидов и липидов. Нейроэндокринные клетки кишечника, секретирующие разнообразные биогенные амины и пептидные гормоны, наряду с аналогичными клетками желудка и поджелудочной железы, образуют гастроэнтеропанкреатическую эндокринную систему, являющуюся частью диффузной эндокринной системы. Клетки Панета в основном локализируются в криптах тонкой кишки. Их функция включает секрецию антимикробных пептидов (лизоцима, дефензинов, кателицидинов и др.), которые накапливаются в слое слизи, способствуя ее бактерицидной активности.

Парацеллюлярные пространства между соседними клетками герметизированы плотными контактами (ПК), регулирующими межклеточный транспорт воды, ионов и мелких гидрофильных веществ. ПК состоят из нескольких типов трансмембранных белков, включая окклюдин, клаудины, трицеллюлин и соединительные молекулы адгезии (JAMs), которые, взаимодействуя друг с другом, а также с цитоскелетом, образуют молекулярный мультифункциональный комплекс. Вместе с внутриклеточными адаптерными протеинами (цингулин, белки семейства *zonula occludens*) белки ПК осуществляют механическое соединение клеток эпителия, его функциональную поляризацию, а также выполняют роль регуляторов межклеточного транспорта. Ниже ПК находятся адгезионные контакты, необходимые для восстановления эпителия, а также десмосомы, поддерживающие его стабильность (рис. 1).

Иммунный барьер кишечной стенки представлен многочисленными клетками врожденной и адаптивной иммунной системы, секретирующими IgA, цитокины, хемокины и протеазы тучных клеток. Основную роль во взаимодействии с антигенными компонентами пищи и микробиоты в просвете кишки играют Пейеровы бляшки – элементы лимфоидной системы слизистой оболочки. Пейеровы бляшки представляют собой сгруппированные лимфоидные фол-

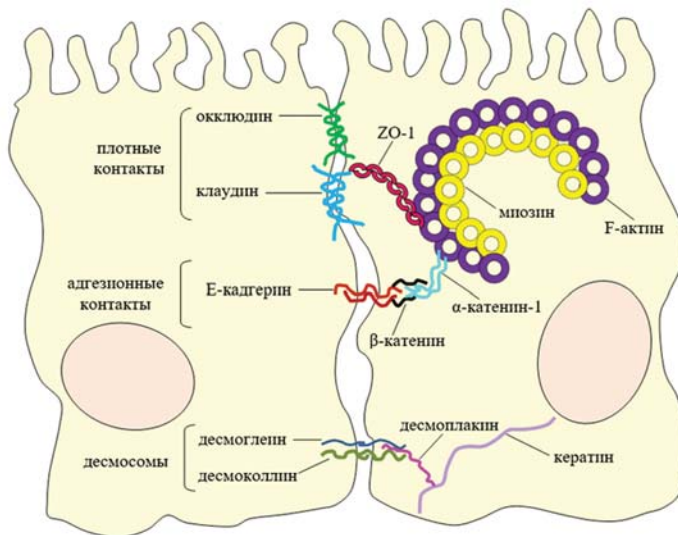
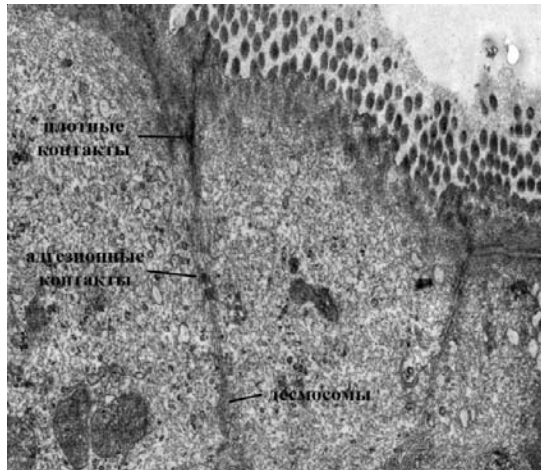


Рис. 1. Микрофотография эпителия толстой кишки с соответствующим рисунком соединительного комплекса эпителиальных клеток кишечника

ликулы, покрытые специализированным фолликул-ассоциированным эпителием, характерной чертой которого являются микроскладчатые клетки (М-клетки), обеспечивающие захват, транспорт, процессинг и презентацию антигенных структур.

Комменсальная флора, состоящая из сотен триллионов бактерий, вирусов и одноклеточных эукариот, в современном представлении также является неотъемлемым компонентом МТКК. В целом это сообщество микроорганизмов, называемое микробиотой кишечника, по количеству клеток сопоставимо с клетками человека и содержит в 450 раз больше генов, чем геном человека. Этот метагеном кодирует функции и метаболические пути микробиоты кишечника, которые участвуют в различных биологических процессах организма-хозяина, включая метаболизм, питание и иммунитет. Недавние исследования показали, что кишечная микробиота влияет на проницаемость кишечной стенки за счет регуляции толщины слоя слизи и ее состава, скорости обновления энтероцитов, а также модуляции экспрессии белков, формирующих ПК. Дисбактериоз, напротив, способствует нарушению целостности кишечного барьера и может быть тесно связан с патогенезом широкого круга заболеваний, в том числе с патологией почек.

Другие структуры, такие как кровеносные сосуды, слой гладкомышечных клеток и компоненты энтеральной нервной системы, поддерживают структурно-функциональную целостность МТКК, регулируя специфические защитные реакции слизисто-эпителиальной оболочки в случаях ее повреждения [7, 8].

Кишечная проницаемость – это функциональный параметр кишечного барьера, характеризующийся измеряемой скоростью потока молекул через кишечную стенку. Растворенные вещества могут транспортироваться через эпителий кишечника либо между клетками по парацеллюлярному пути, либо трансцеллюлярно, то есть непосредственно через мембрану энтероцитов. В зависимости от свойств и размеров молекулы прохождение по трансцеллюлярному пути может осуществляться при помощи широкого спектра интегральных мембранных транспортных белков, транспортеров органических ионов, через ионные каналы или посредством различных эндоцитарных механизмов, опосредованных рецепторами (рис. 2).

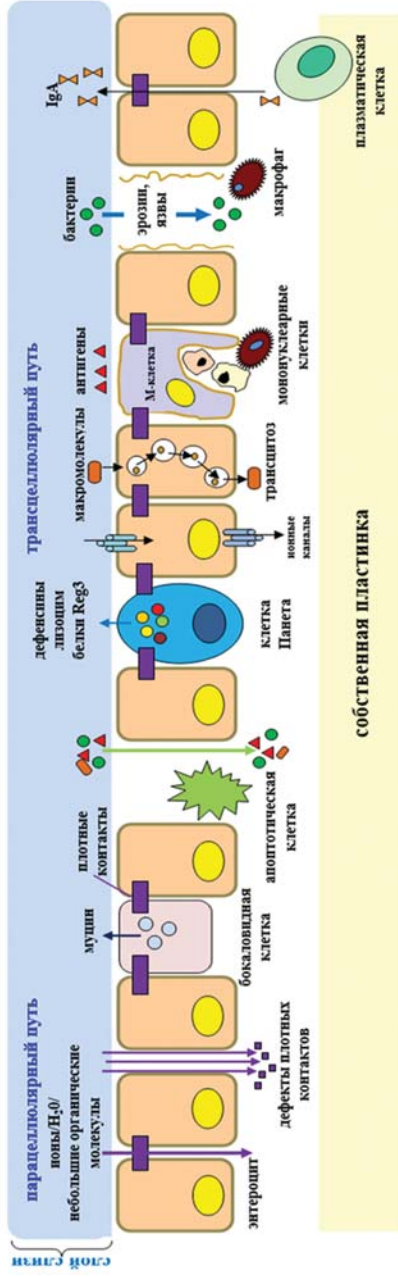


Рис. 2. Схема кишечного барьера, основные пути трансэпителиального транспорта и различные варианты его дисфункций

МТКК следует рассматривать как высокодинамичную структуру, проницаемость которой может резко изменяться под воздействием множества экзогенных и эндогенных стимулов. С точки зрения ультраструктуры и функции стенка кишки даже в физиологических условиях демонстрирует значительные сегменто-специфичные различия в проницаемости. Около 90% всех веществ всасывается в тонкой кишке. Циркулярные складки слизистой оболочки увеличивают площадь ее поверхности в 3 раза, кишечные ворсинки – в 30 раз, а выросты плазматических мембран каемчатых энтероцитов, называемые микроворсинками, – более чем в 600 раз. Барьер толстой кишки менее проницаем. Отличия в проницаемости наблюдаются и на клеточном уровне. В тонкой кишке промежутки между соседними энтероцитами увеличивается с 4-5 Е на кончике ворсинки до более чем 20 Е у основания крипты.

Различные члены одного и того же семейства белков, формирующих ПК, оказывают разное влияние на определенные параметры межклеточной проницаемости кишечного барьера. Так, клаудин-1, -3, -4, -5 и -8 служат для усиления эпителиального барьера. Клаудин-2, -7, -10 и -23, напротив, увеличивают его проницаемость.

Нормально функционирующий МТКК предотвращает проникновение пищевых антигенов, патогенных микробов и их эндотоксинов в организм человека, в то время как его дисфункция облегчает транслокацию этих провоспалительных веществ, что вызывает местное и системное воспаление. Состояния, сопровождающиеся повышенной кишечной проницаемостью, в зарубежной литературе часто называют синдромом «дырявой кишки» (Leaky gut). По мнению членов российской экспертной группы, более корректным является термин синдром «повышенной эпителиальной проницаемости кишки». Накапливающиеся данные подтверждают тесную взаимосвязь этого синдрома с патогенезом широкого круга заболеваний, причем не только ЖКТ, но и других органов и систем. Установлено, что у пациентов с болезнью Крона кишечная гиперпроницаемость, диагностированная во время клинической ремиссии, является предиктором будущего рецидива заболевания. В то же время данные, полученные на экспериментальных моделях колита, показывают, что умеренное повышение проницаемости кишечника может привести к активации иммунорегуляторных реакций и, таким образом, играть

защитную роль. Модуляция нарушенной барьерной функции кишечника при помощи диетических вмешательств или средств, влияющих на состав кишечной микробиоты, считается многообещающим методом профилактики и лечения широкого круга патологий, в том числе некоторых нефропатий. Эти факты подтверждают актуальность разработки и совершенствования методов, направленных на комплексную оценку морфофункциональных характеристик МТКК [9, 10].





2. Методы диагностики микробно-тканевого комплекса кишечника

Особый интерес к кишечному дисбактериозу и синдрому повышенной эпителиальной проницаемости кишечника как важным потенциальным модуляторами течения и исходов различных заболеваний диктует необходимость располагать надежными методами оценки определенного компонента и/или функционального параметра МТКК.

Общепризнанной классификации методов оценки структуры и функции МТКК к настоящему времени не разработано. Большинство авторов разделяют их на основании способа проведения опытов, наблюдений и экспериментов (*ex vivo*, *in vitro*, *in situ*, *in vivo* или *in silico*). Некоторые из них объединяют в себе несколько диагностических подходов. В каждом конкретном случае выбор зависит от целей исследования и определяется условиями проведения и доступностью биологического материала, а также научными и клиническими задачами исследования. Понимание фундаментальных основ каждого метода имеет важное значение для оценки их преимуществ и ограничений [11, 12].

2.1. Методы исследования кишечной микробиоты

Долгое время основным методом исследования кишечной микробиоты были культуральные методы, которые идентифицировали только культивируемые микроорганизмы и не раскрывали всего разнообразия чрезвычайно сложного микробного сообщества. Со временем на смену им пришли новые высоко информативные технологии газожидкостной хроматографии, MALDI-TOF масс-спек-

трометрии и секвенирования с биоинформационным анализом. Наиболее часто используемым в настоящее время подходом для идентификации и классификации видов бактерий являются ПЦР-амплификация и дальнейшее секвенирование области (или нескольких) гена 16S рибосомальной РНК (16S рРНК). Интегративный мультиомический подход, включающий методы метагеномики, метатранскриптомики, метапротеомики и метаболомики, все чаще применяется для получения подробной информации о филогении микроорганизмов и их метаболическом потенциале, что открывает новые возможности для исследований основных механизмов, с помощью которых микробиота человека влияет на здоровье и развитие различных заболеваний [13].

2.2. Методы оценки барьерной функции и проницаемости кишечной стенки

2.2.1. Методы ex vivo

В 1950-х годах датский биолог Ганс Уссинг с коллегами разработали камеру, которая позволяла одновременно измерять электрический ток и транспорт меченого зонда через эпителий. В качестве модели авторы использовали кожу лягушки, поскольку она обладала способностью переносить хлорид натрия с поверхности кожи в интерстиций при более чем стократной разнице концентраций. Однако главная трудность заключалась в том, чтобы отличить движение ионов, активно транспортируемых эпителиальными клетками, от пассивного транспорта по межклеточным путям. Г. Уссинг решил эту проблему, создав экспериментальную систему, в которой рассеченная кожа лягушки разделяла две половины камеры, каждая из которых наполнялась идентичным раствором электролитов одинакового объема. Установка подключалась к перфузионной системе для обеспечения оксигенации и перемешивания буфера. Измеренный с помощью специальных электродов ток короткого замыкания (ТКЗ) и значение разности потенциалов позволяли рассчитать трансэпителиальное сопротивление (ТЭС), которое обратно пропорционально показателю проницаемости изучаемой ткани (рис. 3).

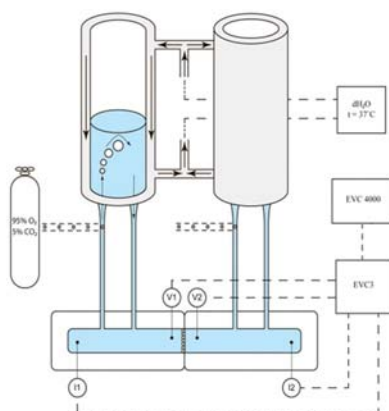


Рис. 3. *Схема и фотография камеры Уссинга для изучения электрофизиологических характеристик и барьерных свойств кишечного эпителия.*

*Примечание: V_1 и V_2 – электроды напряжения;
 I_1 и I_2 – токовые электроды; EVC3 – предусилитель;
 EVC4000 – фиксатор тока и напряжения*

Эти фундаментальные исследования проложили путь к современным моделям трансэпителиального транспорта, включая открытие Na^+/K^+ -АТФазного насоса. Исследователи активно использовали камеры Уссинга для изучения других слизистых, включая респираторный эпителий, кишечник и мочевой пузырь. Именно так был раскрыт патогенез муковисцидоза. При мониторинге ионного транспорта через эпителий дыхательных путей было показано, что секреция ионов хлора снижалась у этих пациентов вследствие нарушения функционирования трансмембранного регулятора проводимости, мутации в гене которого приводят к развитию этого заболевания.

Камера Уссинга также предполагает возможность оценки транспорта флуоресцентно меченых маркерных веществ, которые добавляются с апикальной или базолатеральной стороны изучаемой ткани. Через определенный промежуток времени отбираются образцы и при помощи спектрофотометра определяют интенсивность их сигнала с противоположной стороны. Более высокая скорость потока веществ является специфичным признаком нарушенной проницаемости. Важно понимать, что парацеллюлярный поток малых маркерных молекул часто будет отражаться аналогичными изменениями в ТЭС, но эти показатели не всегда могут быть связаны, поскольку они представляют разные транспортные характеристики эпителиального барьера.

Метод Уссинга хорошо зарекомендовал себя и на протяжении многих лет успешно используется в экспериментах на животных и клеточных культурах. Фрагмент слизистой оболочки кишечника, необходимого для проведения исследования размера, у человека может быть получен только при оперативных вмешательствах, что наряду с ограниченной жизнеспособностью изучаемого образца является недостатком данной методики [14].

2.2.2. Методы *in vitro*

Высокоинформативным инструментом в области изучения проницаемости кишечного эпителия являются различные клеточные линии (Caco-2, HT-29, SK-CO15 и T84). Иммуортиализованные (опухолевые) клетки человека быстро растут в монослой с последующей спонтанной дифференцировкой, обеспечивая идеальную систему для экспериментальных исследований. Клетки выращиваются в специальных трансвелл-системах, состоящих из двух камер: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высеивают используемые клетки. В дальнейшем они культивируются до образования монослоя. При необходимости культуры клеток могут быть размещены в камерах Уссинга для оценки электрофизиологических характеристик и показателей проницаемости.

Несмотря на то, что отдельные клеточные линии могут детально повторять структуру эпителия, полноценное моделирование их фун-

кций невозможно без нейрогуморальных стимулов и связи с иммунными клетками. Для создания более реалистичных моделей *in vitro*, имитирующих взаимодействие различных типов клеток в ткани, создано несколько двойных и тройных ко-культур. Так, добавление в культуру клеток лимфоцитов провоцирует развитие М-клеточного фенотипа эпителия, что необходимо для воспроизведения его иммунотолерантных свойств и запуска соответствующего иммунного ответа в отношении патогенных бактерий.

Недавние достижения привели к разработке новой клеточной модели так называемых кишечных органоидов, полученных из стволовых клеток эпителия кишечника. Органоиды представляют собой трехмерный самообновляющийся конгломерат клеток, встроенный во внеклеточный матрикс и воспроизводящий физиологические характеристики нормального эпителия. Эти культуры удивительно стабильны как фенотипически, так и генетически. Органоиды кишечника, выращенные в 3D-структуру, представляют собой идеальную модель для изучения влияния микробиоты на барьерные функции эпителия.

Методы оценки проницаемости *in vitro* имеют ряд преимуществ по сравнению с другими подходами. Среди них можно выделить: решение этических процессов умерщвления животных; снижение времени и затрат на проведение научных работ; получение результатов в сопоставимых и строго контролируемых условиях; возможность изучения молекулярных и клеточных процессов, которые лежат в основе физиологических реакций, исключая влияния многих системных и тканевых факторов, которые часто не подлежат оценке; возможность трансфекции гена в клетку и работа на линии клеток с измененным уровнем исследуемых белков [15].

2.2.3. Методы *in situ*

В экспериментальных моделях на животных проницаемость кишечной стенки *in situ* может быть изучена с использованием системы «кишечной петли». Сегмент тонкой кишки животного, находящегося под наркозом, канюлируют и перфузируют раствором с заданной концентрацией исследуемого вещества. Детекция этих веществ через определенный промежуток времени выполняется в об-

разцах крови из брыжеечной или воротной вены (рис. 4). Таким образом, по разнице концентраций может быть рассчитан коэффициент проницаемости. Самым большим преимуществом данной методики является наличие неповрежденного кровоснабжения и иннервации слизистой оболочки, что приводит к созданию превосходной экспериментальной системы, почти полностью имитирующей условия *in vivo*. Кроме того, трансэпителиальный транспорт соединений можно тщательно контролировать в отношении их концентрации, рН, скорости потока и сегмента кишечника. На протяжении многих лет эта методика оценки проницаемости кишечника успешно применяется в области профилирования абсорбции лекарственных средств, не подвергающихся пресистемному или люминальному метаболизму. Недостатком является большое количество животных, необходимых для получения статистически значимых данных. Кроме того, хирургические манипуляции с кишечником в сочетании с анестезией могут вызвать значительное нарушение перфузии кишечника и оказать заметное влияние на скорость всасывания [16].

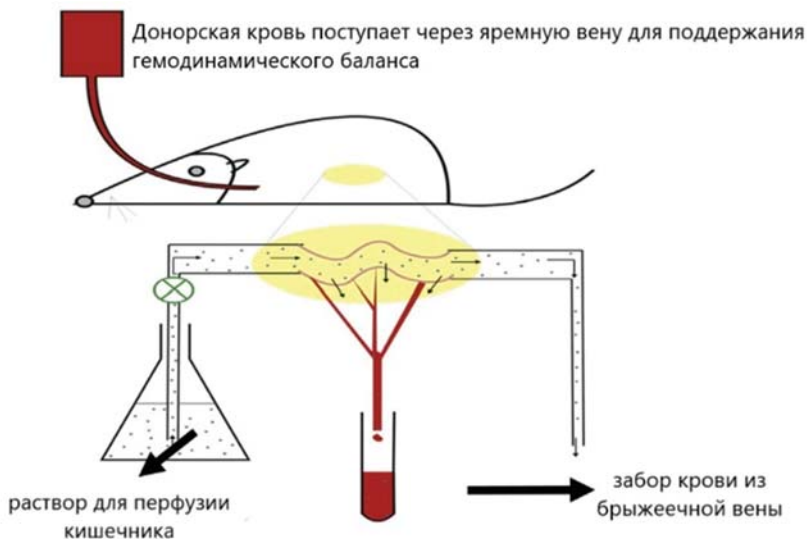


Рис. 4. Схематическое изображение установки для перфузии кишечника *in situ* с забором крови из брыжейки

2.2.4. Молекулярно-биологические методы

Активно внедряющиеся во второй половине XX века молекулярные и гистологические подходы существенно расширили знания о нормальной структуре и физиологии кишечного барьера и особенностях его повреждения при различных заболеваниях. Электронная микроскопия и другие способы морфологической оценки позволили выявить ранее не изученные клеточные структуры. В 1963 году M. Farquhar и G. Palade описали межклеточные соединения простого эпителия и обнаружили их общие черты в различных тканях. Чтобы получить информацию о характеристиках проницаемости элементов межклеточных контактов, авторы воспользовались способностью гемоглобина концентрироваться в почечных канальцах. Гемоглобин, вводимый внутривенно или внутривентально, фильтруется через клубочки, концентрируется в канальцах путем реабсорбции воды и в конечном итоге образует плотную однородную массу, которая заполняет их просвет. На микрофотографиях вдоль клеточных краев всех сегментов нефрона прослеживались отложения гемоглобинсодержащего фильтрата вплоть до уровня ПК. Аналогичные наблюдения были сделаны в ацинусах и протоках поджелудочной железы, где контрастным индикатором служил зимоген. Эти наблюдения подтвердили вывод о том, что ПК непроницаемы для концентрированных белковых растворов и, по-видимому, функционируют как диффузионный барьер.

В 1998 году M. Furuse с коллегами, используя электрофорез, методы секвенирования, иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии, впервые идентифицировали клаудин-1 и -2, положив начало исследованию нового семейства интегральных мембранных белков, ответственных за регуляцию парацеллюлярной проницаемости. В 2000 году группа A. Fasano обнаружила зонулин. Позже было показано, что активация зонулинового пути посредством сложного внутриклеточного каскада реакций приводит к быстрому увеличению проницаемости кишечника.

В настоящее время для оценки экспрессии генов и содержания белков ПК чаще всего используют иммуногистохимию, Вестерн-блоттинг и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (рис. 5). С помощью иммуноферментного и хроматографического анализа

можно определить содержание структурных компонентов кишечного барьера в различных биологических жидкостях, таких как кровь, моча или кал. Молекулярно-биологические методы могут применяться в клинической практике при исследовании прижизненных биоптатов слизистой кишечника у больных ХБП. Они дают возможность понять клеточные и молекулярные процессы, лежащие в основе изменений проницаемости кишечной стенки. Однако без данных о функциональных изменениях физиологическое значение выявленных структурных аномалий остается гипотетическим [17].

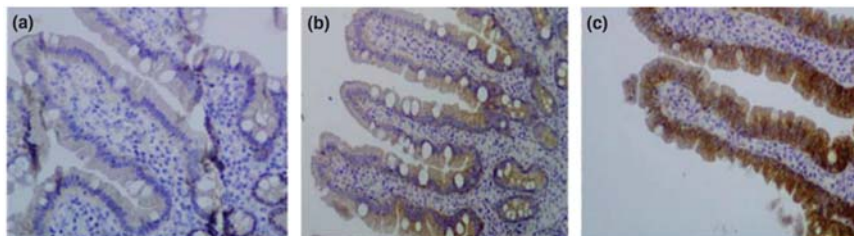


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание окклюдина в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки у пациентов с декомпенсированным (а), компенсированным (б) циррозом печени и здоровых субъектов (в)

2.2.5. Методы *in vivo*

Накопленные экспериментальные данные, подтверждающие тот факт, что синдром «дырявой кишки» является важным звеном патогенеза различных заболеваний, закономерно послужили стимулом к разработке неинвазивных методов его диагностики, доступных в повседневной клинической практике. J. Fordtran и соавт. (1967 г.) сыграли важную роль в разработке идеи методики, но именно I. Menzies в 1974 году первым предложил использовать олигосахариды для оценки проницаемости кишечника. Авторы впоследствии сформулировали концепцию принципа дифференциальной экскреции с мочой перорально вводимых маркерных веществ. Первоначально для этих целей применяли лактулозу, различные полимеры полиэтиленгликоля, ⁵¹хром-этилендиаминтетрауксусной кислоты

(^{51}Cr -EDTA) и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -диэтиленetriаминопентаацетат ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ДТРА). Принцип метода заключался в том, что при наличии дефектов кишечного барьера в течение определенного периода времени большее количество этих веществ (по сравнению с интактным барьером) будет транспортироваться через эпителий и обнаруживаться в кровотоке и моче. Однако на результаты теста оказывали влияние пре- и постмукозальные факторы. Именно поэтому комбинированное использование двух различных маркеров является в настоящее время наиболее оптимальной методикой, поскольку расчет коэффициента экскреции может частично скорректировать время опорожнения желудка, микробную ферментацию, время прохождения через кишечник и умеренно сниженную функцию почек.

Современная модификация метода предполагает одномоментное энтеральное введение моносахарида (манит, L-рамноза) и ди(олиго)-сахарида (лактuloза, целлобиоза). Считается, что низкомолекулярный моносахарид свободно пересекает кишечный эпителий, независимо от наличия повреждения кишечного барьера, в отличие от крупномолекулярного ди(олиго)сахарида, попадание которого в системную циркуляцию возможно только при значимых нарушениях барьерной функции. Таким образом, соотношение концентрации обоих сахаров в моче, собранной в течение пяти-шести часов после их приема внутрь, более точно отражает парацеллюлярный транспорт в тонкой кишке, чем изолированное измерение олигосахаридов.

Для оценки проницаемости толстой кишки обычно используют не подвергающиеся бактериальной деградации сукралозу и эритрит, тогда как повышенный уровень сахарозы свидетельствует об измененной проницаемости желудка и проксимального отдела двенадцатиперстной кишки. Лабораторный анализ образцов мочи и крови обычно проводится с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС-МС), что, наряду с отсутствием стандартизированных протоколов данного метода, является ограничением для более широкого внедрения данного метода в повседневную клиническую практику.

В экспериментальных моделях на животных тесты на проницаемость могут быть проведены и с более крупными молекулами, такими как овальбумин, пероксидаза хрена, декстраны, а также с флуоресцентно мечеными бактериями, что дает возможность

оценить состояние других механизмов трансэпителиального транспорта.

При интерпретации результатов функциональных тестов необходимо помнить, что большинство из них нацелено на оценку парацеллюлярного пути, и поэтому, когда обнаруживается повышенная проницаемость, ошибочно делать экстраполяцию на бактериальную транслокацию. Для объяснения подобных явлений следует привлекать другие механизмы трансэпителиального транспорта (через М-клетки Пейеровых бляшек), так как большие молекулы и бактериальные клетки могут проникать через кишечный эпителий только при его выраженном повреждении или воспалении слизистой оболочки [18].

2.2.6. Биомаркеры повышенной проницаемости кишечника

Как *ex vivo*, *in vitro*, *in situ*, так и прямые тесты *in vivo* оценки проницаемости кишечника, описанные ранее, требуют много времени, специального оборудования и поэтому недоступны в большинстве клинических лабораторий. В связи с этим постоянно сохраняется интерес к поиску надежных маркеров, определение которых будет свидетельствовать о нарушении целостности кишечного барьера. Данный подход основан на обнаружении в биологических средах (кровь, моча, кал и другие) бактерий и продуктов микробного происхождения, обычно присутствующих в просвете кишечника (эндотоксины, антитела с С₉-региону эндотоксина, липополисахарид-связывающий белок, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), D-лактат, фекальный бутират, бактериальный гемолизин и другие). В качестве маркеров повышенной проницаемости также рассматриваются более высокие уровни белков, которые являются компонентами кишечного барьера (зонулин, клаудин, I-FABP, цитруллин, глутатион S-трансфераза и другие).

Недавно было показано, что некодирующие микроРНК, включая микроРНК-222, микроРНК-30, микроРНК-29b, микроРНК-503, микроРНК-195 и микроРНК-320a, могут играть важную роль в процессах регенерации эпителия и поддержания его барьерной функ-

ции, регулируя ключевые факторы транскрипции. Механизмы, посредством которых эти микроРНК модулируют стабильность и преобразование матричных РНК, продолжают изучаться. Тем не менее уже сегодня они имеют потенциал для использования в качестве биомаркеров барьерной функции кишечника.

Необходимо отметить, что методы, используемые для определения этих веществ, нередко подвергаются критике за неточность, а результаты могут существенно отличаться в различных исследованиях. Кроме того, эти параметры не позволяют отличить функциональные изменения от структурных повреждений кишечника. Непрямые методы также дают мало информации о точном механизме и/или локализации нарушений проницаемости кишечника и поэтому их сложно рекомендовать в качестве замены прямых тестов на проницаемость, описанных выше [19].

2.2.7. Методы *in silico*

В последние годы уделяется большое внимание разработке методов прогнозирования кишечной проницаемости для лекарственных средств с применением компьютерного моделирования. Основными свойствами вещества, влияющими на его кишечную проницаемость, являются липофильность, кислотно-основные характеристики, ионизация, молекулярная масса, водородные связи, распределение заряда, площадь полярной поверхности молекул и некоторые другие. Зная эти параметры, с помощью специальных компьютерных программ (GastroPlus, iDEA, QMPRplus, Oraspotter) можно прогнозировать абсорбцию, распределение, метаболизм и выведение лекарственных препаратов. Принцип работы алгоритма GastroPlus основан на оценке биодоступности препарата в ЖКТ, исходя из его растворимости и коэффициента кишечной проницаемости. Далее программа определяет проницаемость вещества при помощи специальной модели, согласно которой кишечник подразделяется на 7 частей, каждой из которых соответствуют определенный рН, среднее время нахождения вещества в данном сегменте и объем среды растворения. Кроме того, GastroPlus позволяет описать фармакокинетику, метаболизм, динамику прохождения через

кишечный барьер, токсичность, лекарственное взаимодействие и ряд других свойств изучаемой молекулы. Преимуществами алгоритма iDEA является то, что для более достоверной оценки биодоступности программа учитывает возможный эффект первичного прохождения через печень.

На сегодняшний день одним из основных препятствий для более широкого использования методов компьютерного моделирования является отсутствие достаточно большой базы данных с точной информацией, необходимой для проведения подобного анализа. Кроме того, методы *in silico* при всей своей простоте и доступности не так надежны, как реальные экспериментальные и клинические данные, поскольку они не учитывают влияние естественных физиологических факторов (роль белков-переносчиков, наличие слизи, моторики и др.). Возможно, именно поэтому в доступной литературе отсутствует информация о применении данного подхода у больных с тяжелыми нарушениями функции почек [20].

2.2.8. Другие перспективные методы

Многообещающим методом оценки эпителиальной оболочки кишечника *in vivo* представляется конфокальная лазерная эндомикроскопия. После внутривенного введения флуоресцеина, используемого в качестве контрастного агента, с помощью конфокального зонда, оснащенного лазером, могут быть визуализированы увеличение межворсинчатых пространств, выпадение клеток, дефекты проницаемости сосудов, разрывы эпителия и утечка флуоресцеина в просвет кишечника (рис. 6А). Нарушения целостности кишечного барьера, обнаруженные с помощью этого метода, могут предсказывать рецидивы у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в стадии клинико-эндоскопической ремиссии. Между тем только в одном исследовании проводилось сравнение результатов, полученных с помощью конфокальной лазерной эндомикроскопии, с классическими экспериментами в камерах Уссинга. Данные о проницаемости *in vivo* существенно не отличались у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и здоровых лиц и не коррелировали с показателями проницаемости *ex vivo*.

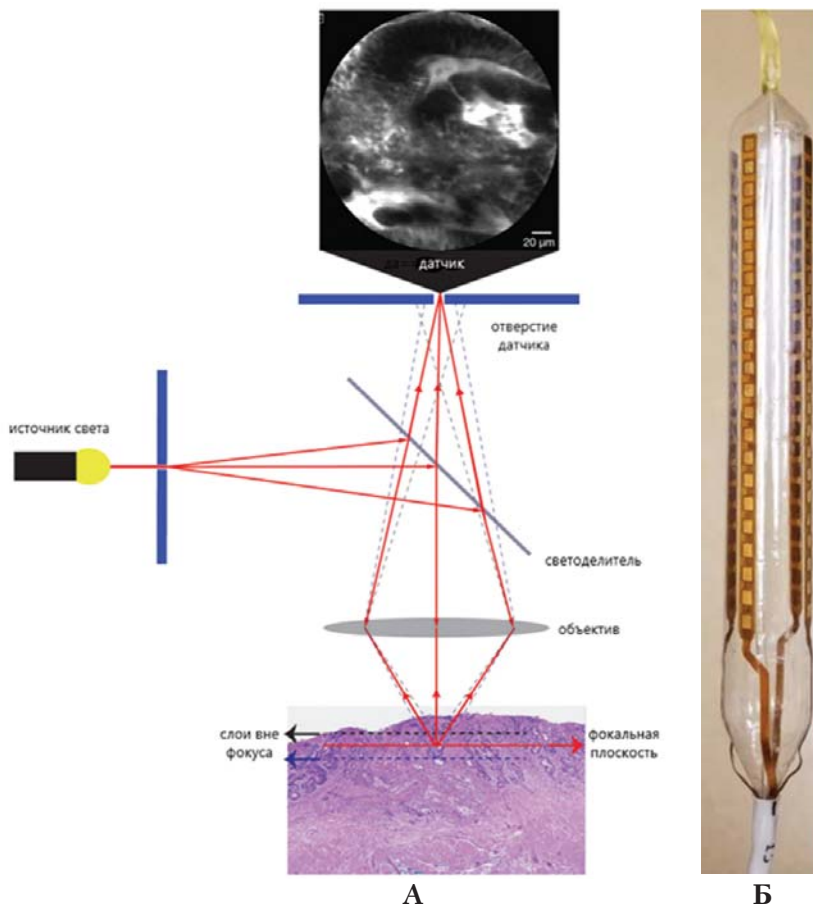


Рис. 6 А. Принцип конфокальной лазерной эндомикроскопии. Свет, проходящий через отверстие в диафрагме, отражается от светоделителя и затем фокусируется объективом. Ткань освещается, и испускаемая ею флуоресценция улавливается объективом. Отверстие в диафрагме, расположенное перед детектором, позволяет отсеивать световой сигнал от расфокусированных слоёв ткани. Увеличение: 10×;

Б. Баллонный катетер с 36 каналами для измерения импеданса в осевом и радиальном направлениях на протяжении 10 см пищевода

Измерение импеданса, или электрического сопротивления, слизистой оболочки является еще одним инструментом для прямой оценки ее целостности. Одноканальная импедансная спектроскопия широко используется в экспериментальных исследованиях для того, чтобы дифференцировать эпителиальное и субэпителиальное сопротивление эпителия в различных сегментах кишечника (рис. 6Б). Клиническое применение данного метода длительное время было ограничено пищеводом. Однако недавно этот подход был апробирован на баллоне, который можно ввести через инструментальный канал стандартного эндоскопа. При надувании баллона электроды контактируют со слизистой оболочкой, и в течение 90 секунд регистрируется ее импеданс. К. Nakagawa и соавт. с помощью этого метода *in vivo* продемонстрировали снижение импеданса слизистой двенадцатиперстной и тощей кишки у пациентов с функциональной диспепсией в сравнении со здоровыми лицами, что подтверждает результаты предыдущих исследований *ex vivo*. Данные о применении вышеописанных методов у больных ХБП в доступной литературе отсутствуют.

Генетически модифицированные модели мышей позволили получить важные сведения о молекулярной структуре клеточных транспортеров и их значении в нативном кишечном эпителии. Так, трансгенные и генно-таргетные мыши используются для уточнения роли молекул-переносчиков как в экспериментах с избыточной экспрессией, так и с потерей их функции. Ведутся исследования в области создания гуманизированных животных моделей, в геном которых интегрированы определенные человеческие гены. Данный метод может обеспечить альтернативный подход к пониманию физиологических функций кишечника, а также возможность смоделировать варианты реагирования на различные патологические стимулы, в том числе характерные для почечной недостаточности [21, 22].

2.3. Методологические ограничения диагностик микробно-тканевого комплекса кишечника при нарушении функции почек

Исходя из вышеизложенного, можно констатировать, что к настоящему времени разработано немало диагностических подходов

к изучению МТКК, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Между тем важно понимать, что функция почек влияет на результаты большинства подобных тестов. Именно поэтому многие исследования, в которых оценивалась проницаемость кишечника, исключали пациентов с острым повреждением почек и ХБП, чтобы избежать погрешностей в выводах, связанных со снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Так, например, вследствие измененного почечного клиренса сахарозных маркеров, сравнение проницаемости кишечника между испытуемыми с почечной недостаточностью и без нее с помощью пентасахарозного теста оказалось неосуществимым. Это было показано в работе M. van Nieuwenhoven и соавт., в которой изучалось влияние до- и постабсорбционных факторов на соотношение лактулоза/рамноза у 10 здоровых мужчин после внутривенного введения различных количеств каждого сахара. Результаты исследования свидетельствовали о том, что почечный клиренс отличается для двух сахаров, и, следовательно, функция почек может влиять на результаты теста. Кроме того, в исследовании на крысах с экспериментальным эндотоксикозом нагрузка жидкостью увеличивала выделение с мочой лактулозы, но не L-рамнозы. Это также говорит о том, что почечный клиренс каждого из сахаров может быть различным. С этой точки зрения ни одно из доступных в настоящее время веществ не обеспечивает адекватную оценку кишечной проницаемости у больных ХБП. Использование маркеров, которые не выводятся с мочой, в будущем может решить эту проблему. Учитывая значительное снижение диуреза у больных с терминальной почечной недостаточностью (ТПН), J. Wong и соавт. была разработана чувствительная методика на основе ВЭЖХ/МС-МС, позволяющая проводить измерения концентрации сахаров не в моче, а в плазме крови. Однако достоверное сравнение проницаемости кишечника между контрольной группой и пациентами, находящимися на программном гемодиализе, также оказалось невозможным из-за сильного влияния функции почек на сывороточный уровень сахаров.

У лиц с нарушением функции почек, преимущественно в терминальной стадии, показано значительное повышение в крови и кале уровня продуктов микробного метаболизма, а также некоторых протеинов, вовлеченных в структуру кишечного барьера. Следует, од-

нако, отметить, что ни один из биомаркеров не был валидирован в репрезентативной популяции пациентов с ХБП, поэтому их использование в качестве индикатора повышенной проницаемости кишечника у этой категории пациентов нуждается в уточнении.

Остается открытым вопрос и об источнике бактериальной ДНК, обнаруживаемой в системной циркуляции больных ХБП, особенно среди пациентов, получающих лечение гемодиализом. К. Shi и соавт. методом пиросеквенирования и амплификации подтвердили наличие фрагментов бактерий в плазме крови 12 из 52 гемодиализных больных. Большинство микроорганизмов, обнаруженных в крови, соответствовали кишечной флоре. В похожем исследовании М. Bossola и соавт. у 12 из 58 пациентов, получающих лечение гемодиализом, несмотря на отрицательные гемокультуры, в крови также была выявлена бактериальная ДНК. При этом у пяти больных с положительными результатами ПЦР крови в образцах диализной жидкости обнаруживалась идентичная бактериальная ДНК. Учитывая, что доля пациентов с циркулирующими фрагментами бактериальной ДНК была выше среди лиц с центральным венозным катетером (5 из 14), чем у пациентов с артериовенозной фистулой (7 из 44), авторы предположили, что их возможным источником могла быть биопленка на поверхности катетера. Однако анализ последовательностей ампликонов показал схожие профили микроорганизмов в обеих группах и указывал на их кишечное происхождение. Необходимо отметить, что в приведенных исследованиях ни в одном из образцов крови, полученных от здоровых добровольцев, не была идентифицирована бактериальная ДНК.

Накопленные к настоящему времени данные об особенностях кишечного дисбактериоза при ХБП характеризуются высокой гетерогенностью. Такая вариативность, не в последнюю очередь связанная с различиями в методологии оценки состава кишечной микробиоты, затрудняет экстраполяцию данных на разные группы населения, тем самым ограничивая применимость полученных результатов в более широком контексте. Проведение подобных исследований в нашей стране также существенно лимитировано высокой стоимостью и низкой доступностью современных высокоинформативных метагеномных и протеомных методов изучения кишечной микробиоты.

Таким образом, методы объективной оценки состояния МТКК у больных с нарушением функции почек по-прежнему остаются крайне ограниченными, что существенно затрудняет изучение значения кишечного дисбактериоза и синдрома повышенной эпителиальной проницаемости кишечника в патогенезе ХБП и связанных с ней осложнений [4, 23-27].





3. Состояние микробно-тканевого комплекса кишечника при хронической болезни почек

3.1. Особенности дисбактериоза кишечника при хронической болезни почек

Несмотря на существующие методологические ограничения, все больше данных свидетельствуют о том, что различные нефропатии сопровождаются разнообразными нарушениями структуры и функции МТКК.

Среди всех компонентов МТКК наиболее изученной при патологии почек является кишечная микробиота. М. Simenhoff и соавт. еще в 1970-х годах были одними из первых, кто продемонстрировал заметно измененное микробное разнообразие кишечника у пациентов с почечной недостаточностью. Двенадцатиперстная и тощая кишка, которые у здорового человека практически лишены микробной флоры, у пациентов с ХБП были интенсивно колонизированы аэробными и анаэробными бактериями.

С помощью современных биотехнологических подходов идентификации патогенов показано, что при ХБП микробное разнообразие имеет тенденцию к постепенному снижению от ранней к продвинутой стадии заболевания. Как правило, при этом отмечается уменьшение количества противовоспалительных микроорганизмов, таких как *Roseburia*, *Prevotella*, *Bacteroides*, лактобактерии и бифидобактерии, наряду с повышенной колонизацией провоспалительными микроорганизмами, такими как протеобактерии и актинобактерии. Кроме того, сообщалось о заметном увеличении на поздних стадиях ХБП относительной численности энтеробактерий и лакноспир, а также *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus criceti*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter werkmanii*, *Flavonifractor plautii* и *Anaerostipes caccae*.

Значительное влияние на различия в составе микробного сообщества у отдельных категорий больных ХБП также оказывают этиологическая причина почечной недостаточности и вариант заместительной терапии функции почек (гемодиализ, перитонеальный диализ или трансплантация почки).

С функциональной точки зрения дисбактериоз кишечника при ХБП тесно связан с нарушениями метаболизма аминокислот (аргинина, пролина, глутатиона) и биосинтеза убихинона и других терпеноидных хинонов. Эти метаболические нарушения способствуют накоплению уремических токсинов, запускают воспалительные реакции и усиливают окислительный стресс. Наряду с этим заметно снижается выработка КЦЖК, которые необходимы для поддержания целостности кишечного барьера. В настоящее время доказано, что дисбаланс микробных метаболитов играет важнейшую роль в поддержании гомеостаза человеческого организма и тесно связан с развитием и прогрессированием ХБП, а также связанных с ней осложнений, прежде всего, сердечно-сосудистых [28, 29].

Результаты исследований, проведенных в клинике нефрологии и эфферентной терапии Военно-медицинской академии, показали, что у пациентов, получающих лечение программным гемодиализом, на фоне неизмененного общего числа микробных клеток обнаруживаются разнонаправленные изменения в содержании облигатных представителей микрофлоры кишечника с признаками аэробно-анаэробного дисбаланса: повышенная колонизация энтерококков сочеталась со снижением численности лакто- и бифидобактерий, кишечной палочки, руминококков и различных видов бактерий, продуцирующих КЦЖК и поддерживающих целостность кишечного барьера (*Bacteroides thetaomicronn*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia inulinivorans*, *Akkermansia muciniphila*, *Blautia spp.*). Кроме того, у лиц с ТПН нередко выявлялись повышенные титры представителей условно-патогенной (*Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* и др.) микрофлоры, а также измененное число микроорганизмов, ассоциированных с системными метаболическими расстройствами, воспалением и канцерогенезом ЖКТ (*Methanosphaera stadmanae*, *Parvimonas micra*, *Prevotella spp.*). Различные варианты дисбактериоза кишечника были диагностированы у 100% обследованных лиц на диализе.

Качественно-количественные изменения состава кишечной микробиоты у больных на гемодиализе сопровождались значительным повышением концентрации в крови уремических токсинов микробного происхождения. По сравнению с лицами с нормальной функцией почек уровень триметиламин-N-оксида у них был повышен в 18 раз, индоксил сульфата – в 11 раз, п-крезил сульфата – в 6 раз [30].

Кишечный дисбактериоз у больных на программном гемодиализе также проявлялся значимым снижением общего содержания фекальных КЦЖК, включая абсолютные уровни уксусной, пропионовой, масляной кислот, а также суммарную концентрацию изокислот. Профиль КЦЖК с неразветвленной цепью у них характеризовался значимо более низким относительным содержанием пропионовой и масляной кислот при одновременном увеличении доли уксусной кислоты. Повышенное относительное содержание изокислот и анаэробного индекса указывало на повышенную протеолитическую активность кишечной микробиоты, угнетение строгих анаэробов при сопутствующем увеличении численности факультативных анаэробов и условно-патогенной микрофлоры [31].

3.2. Нарушения целостности кишечного барьера при ХБП

Наблюдаемые отклонения в составе кишечной микрофлоры у больных с нарушениями функции почек осложняются разнообразными дефектами слизисто-эпителиального слоя, которые облегчают попадание бактерий и их токсинов в системный кровоток. D. Goldstein и соавт. одними из первых продемонстрировали структурные изменения слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у лиц с умеренной и тяжелой почечной недостаточностью. Гистологические аномалии были представлены неравномерным распределением и уменьшением длины ворсинок и крипт Либеркюна. Данные, полученные N. Vaziri и соавт. при аутопсийном исследовании 78 пациентов, находившихся на программном гемодиализе, показали наличие хронического воспаления, распространяющегося по всему ЖКТ от пищевода до толстой кишки. Последующие работы M. Magnusson и соавт. подтвердили наличие повышенной проницаемости кишечной стенки у животных и людей с ХБП путем определения содержания в моче перорально введенных полиэтиленгликолей с большой молекулярной массой.

Учитывая роль ПК как ключевого структурно-функционального элемента эпителиального барьера, наблюдаемое увеличение проницаемости кишечника при уремии может быть связано именно с нарушением их функционирования. Руководствуясь этой гипотезой, N. Vaziri и соавт. изучили изменения молекулярных компонентов ПК в тканях кишки крыс с ХБП, вызванной субтотальной нефрэктомией и аденин-индуцированным хроническим тубулоинтерстициальным нефритом. Было выявлено выраженное снижение экспрессии белков окклюдина, клаудина-1 и ZO-1 во всех отделах ЖКТ животных с почечной недостаточностью по сравнению со здоровыми крысами. При этом между группами отсутствовала разница в степени экспрессии мРНК изучаемых протеинов, что указывает на посттранскрипционный или посттрансляционный механизм выявленных изменений. Структурные нарушения ПК эпителия толстой кишки животных с ХБП сопровождались отеком и выраженной инфильтрацией мононуклеарными лейкоцитами слизистой оболочки.

В работе Gonzalez A. и соавт. у крыс после нефрэктомии правой почки и 2/3 левой почки было установлено значительное снижение главного компонента кишечной слизи муцина 2 по сравнению с ложно оперированными животными. Выявленные изменения ассоциировались с выраженным повышением плазменного уровня бактериального эндотоксина на фоне значительного снижения тканевого уровня ZO-1, клаудина-1 и противовоспалительного ИЛ-10.

В попытке понять механизмы вызванных уреемией дефектов ПК N. Vaziri и соавт. подвергли колоноциты человека (клеточная линия T84) воздействию сред с клинически значимым содержанием мочевины. Концентрация мочевины была приближена к пре- и постдиализным (74 или 42 мг/дл) значениям, как правило, выявляемым у больных ТПН. Было установлено концентрационно-зависимое снижение ТЭС клеточного монослоя, свидетельствующее о повышении его проницаемости, а также снижение экспрессии белков ПК. Добавление в питательную среду уреазы, имитирующей присутствие микробной флоры, приводило к последующему резкому снижению содержания окклюдина, клаудина-1 и ZO-1 и даже отслоению клеток. В то же время изолированное добавление к культуре клеток уреазы или плазмы крови здорового человека с нормальным содержанием мочевины не оказывало существенного влияния

на электрофизиологические показатели эпителия. Эти результаты выявили потенциальный механизм, ответственный за нарушение барьерной функции кишечника и эндотоксемию у людей и животных с прогрессирующей ХБП. В просвете кишечника мочевины гидролизуются микробной уреазой, образуя большое количество аммиака $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3]$, который легко превращается в гидроксид аммония $[\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{OH}]$. Гидроксид аммония, в свою очередь, приводит к повышению pH внутрисветного содержимого кишечника, раздражению слизистой оболочки, развитию субклинического энтероколита, локальной лейкоцитарной инфильтрации и гиперпродукции цитокинов с последующим нарушением структуры и целостности трансмембранных и каркасных белков ПК. Конечным результатом вышеперечисленных изменений является развитие синдрома повышенной эпителиальной проницаемости с неконтролируемым транспортом бактерий и молекул микробного происхождения в кровоток, что способствует хроническому системному воспалению и оксидативному стрессу. Воспаление вместе с тем усиливает разрушение эпителиального барьера, вызывая активацию (фосфорилирование) киназы легкой цепи миозина, приводящую к реорганизации структуры плотных контактов.

В другом похожем исследовании с использованием более физиологичной тройной клеточной ко-культуры Caco-2/HT29-MTX/Raji в уремической плазме больных, находящихся на перитонеальном диализе, повышала парацеллюлярную проницаемость клеточного монослоя для FITC-декстрана, не вызывая при этом значимого изменения ТЭС, содержания белков ПК, а также не приводила к транслокации *Escherichia coli*. Противоположные результаты приводят J. de Almeida Duarte и соавт., которые показали у экспериментальных животных с ХБП возможность транслокации люминальных бактерий в мезентериальные лимфатические узлы и другие органы. F. Wang и соавт. также идентифицировали бактериальные ДНК в крови 20% (6 из 30) пациентов с ТПН. Все выявленные в крови штаммы (*Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.* и *Pseudomonas spp.*) доминировали в кишечнике обследуемых больных. Уровни D-лактата плазмы, высокочувствительного СРБ и ИЛ-6 были значительно выше у лиц с бактериальной транслокацией, чем у пациентов без нее. Эти противоречивые данные демонстри-

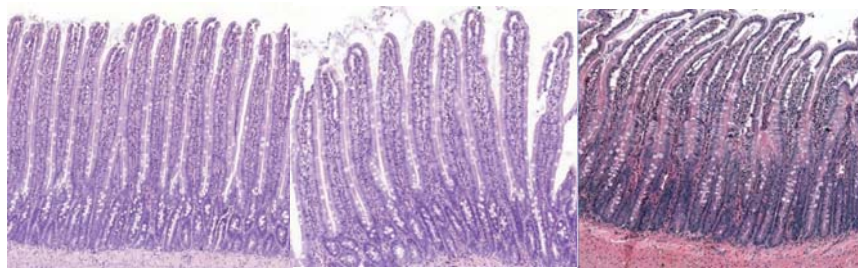
руют всю сложность многокомпонентной структуры МТКК, требующей комплексного подхода к оценке его многогранных функций.

N. Zhou и соавт. обнаружили дисфункцию кишечного барьера в экспериментальной модели IgA-нефропатии. Экспрессия мРНК ZO-1, окклюдина и Muc2 была значительно снижена у модельных животных по сравнению с контрольной группой. Выявленные изменения сопровождались преобладанием в кишечной флоре бактерий рода *Ruminococcus2* и *Flavonifractor*, снижением численности бактерий рода *Turicibacter*, а также достоверным повышением уровня маркеров, свидетельствующих о повышенной проницаемости кишечной стенки (диаминоксидазы и D-лактата). Схожие данные были получены T. Kovacs и соавт. у больных с IgA-нефропатией. Повышенная кишечная проницаемость, оцененная при помощи теста с функциональной экскрецией ⁵¹Cr-EDTA, не только обратно коррелировала с выраженностью протеинурии и/или гематурии, но и служила значимым неблагоприятным прогностическим фактором снижения функции почек в течение 4-летнего периода наблюдения. N. Shah и соавт. обнаружили в крови пациентов с прогрессирующей IgA-нефропатией фрагменты ДНК бактерий класса *Coriobacteriia* и родов *Legionella*, *Enhydrobacter* и *Parabacteroide*, в то время как в образцах их стула повышалось содержание бактерий родов *Bacteroides*, *Escherichia-Shigella* и некоторых *Ruminococcus*. Таким образом, нарушение целостности кишечного барьера может лежать в основе иммунного дисбаланса слизистой оболочки кишечника и играть важную роль в патогенезе IgA-нефропатии [32-34].

С целью более детального изучения влияния нарушения функции почек на состояние кишечного барьера нами были изучены морфофункциональные изменения эпителия тощей и толстой кишки крыс стока Wistar в экспериментальной модели хронической нефропатии. Для эксперимента была выбрана модель 5/6 нефрэктомии с различным периодом послеоперационного наблюдения (2, 4 и 6 месяцев). Задача заключалась в том, чтобы в динамике оценить изменения со стороны слизистой кишечника, происходящие в организме животного в процессе естественного прогрессирования ХБП (одна неделя жизни крысы, примерно, соответствует шести месяцам жизни человека). До настоящего времени подобные исследования ограничивались только одним фиксированным сроком, как правило, находящимся в диапазоне 8-12 недель. Морфофункциональные параметры то-

щей и толстой кишки исследовали с помощью гистоморфометрического анализа, оценки ТЭС, ТКЗ и проницаемости для флуоресцеина натрия в камере Уссинга. Уровень клаудина-1 (CLDN-1) и -2 (CLDN-2), окклюдина (OCCLDN) и трицеллюлина (TRICELL) в образцах тощей и толстой кишки крыс оценивали методом Вестерн-блот.

В ходе проведения экспериментов установлено, что на ранних этапах развития ХБП общим эффектом воздействия прогрессирующего снижения функции почек на ткань тощей кишки являются уменьшение высоты ворсинок при увеличении их толщины, уменьшение глубины и ширины крипт, лимфоплазмочитарная инфильтрация эпителия и уменьшение количества бокаловидных клеток (рис. 7).



контроль 2 месяца

контроль 4 месяца

контроль 6 месяцев



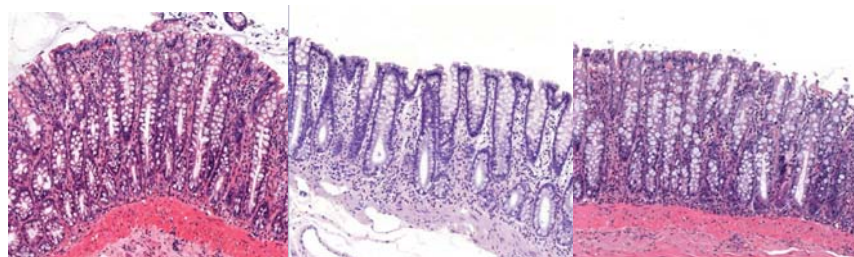
ХБП 2 месяца

ХБП 4 месяца

ХБП 6 месяцев

Рис. 7. Гистологическое строение тощей кишки ложнооперированных животных и опытных крыс через 2, 4 и 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100. Отмечается нарастание выраженности воспалительной инфильтрации и снижение количества бокаловидных клеток по мере усиления тяжести ХБП

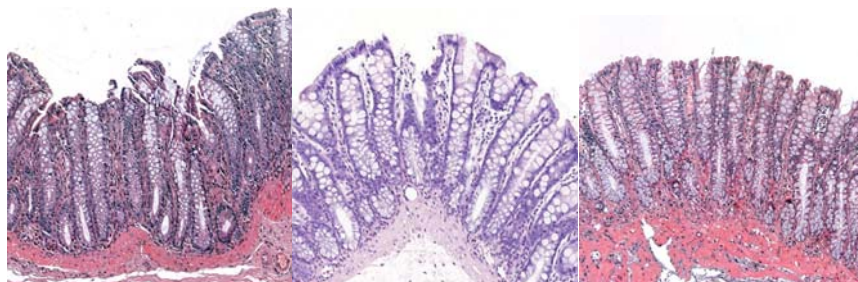
В толстой кишке при этом наблюдались увеличение глубины и ширины крипт, снижение количества бокаловидных клеток, диффузная лимфоплазмозитарная инфильтрация эпителия и стромы (рис. 8).



контроль 2 месяца

контроль 4 месяца

контроль 6 месяцев



ХБП 2 месяца

ХБП 4 месяца

ХБП 6 месяцев

Рис. 8. Гистологическое строение толстой кишки ложнооперированных животных и опытных крыс через 2, 4 и 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400. Отмечается нарастание атрофических изменений, воспалительной инфильтрации, снижение количества бокаловидных клеток по мере усиления тяжести ХБП

На фоне нарастающих воспалительно-атрофических изменений слизистой кишечника повышенная проницаемость эпителия тощей кишки регистрировалась только через 2 месяца после 5/6 нефрэктомии, тогда как в толстой кишке нарушения проницаемости сохранялись до 4 месяцев. Через 6 месяцев после вмешательства функциональные параметры кишечного эпителия опытных крыс не отличались от контрольных (рис. 9 и 10).

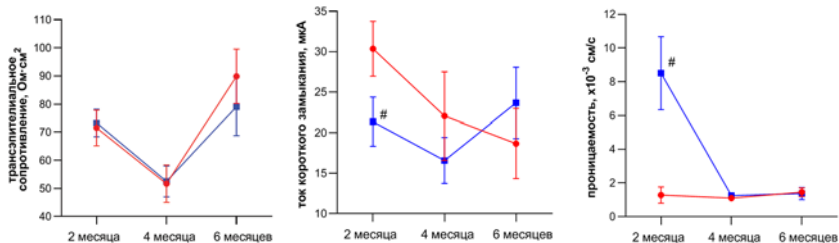


Рис. 9. Изменения трансэпителиального сопротивления, тока короткого замыкания и проницаемости для флуоресцеина натрия тощей кишки у крыс через 2, 4 и 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии (синяя линия) по сравнению с соответствующими группами ложнооперированных животных (красная линия).

Примечание: # - $p < 0,05$ – значимость различий по сравнению с контролем

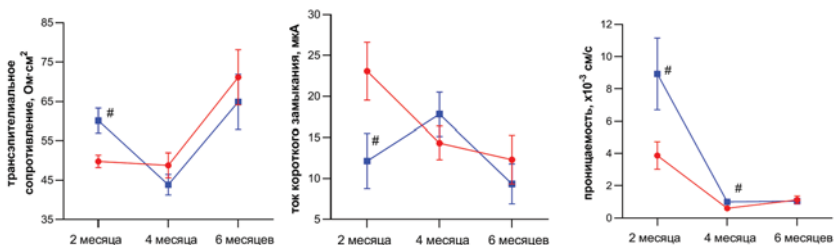


Рис. 10. Изменения трансэпителиального сопротивления, тока короткого замыкания и проницаемости для флуоресцеина натрия толстой кишки у крыс через 2, 4 и 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии (синяя линия) по сравнению с соответствующими группами ложнооперированных животных (красная линия).

Примечание: # - $p < 0,05$ – значимость различий по сравнению с контролем

Нормализация барьерных свойств кишечного эпителия у крыс с ХБП сопровождалась восстановлением белкового состава ПК. С помощью денситометрии было установлено, что у крыс через 4 месяца после 5/6 нефрэктомии в тощей кишке значительно снижался уровень клаудина-1, который относится к подтипу белков, усиливающих барьерные свойства эпителия. Одновременно с этим значительно повышалось содержание окклюдина, который снижает проницаемость кишечного эпителия для макромолекул (рис. 11). Вероятнее всего, именно за счет такого компенсирующего эффекта проницаемость тощей кишки крыс с длительностью ХБП 4 месяца не повышалась относительно контроля.

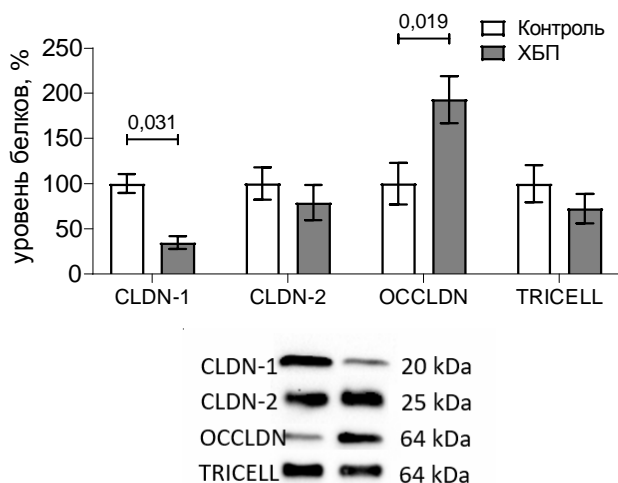


Рис. 11. Уровень белков плотных контактов в тощей кишке крыс через 4 месяца после 5/6 нефрэктомии в сравнении с ложнооперированными животными

В толстой кишке опытных крыс с длительностью ХБП 4 месяца содержание клаудина 1, -2, окклюдина и трицеллюлина статистически значимо не отличалось от показателей ложнооперированных животных (рис. 12). Исходя из этого, наблюдаемая в этой группе повышенная проницаемость могла быть обусловлена изменением экспрессии других неизученных белков.

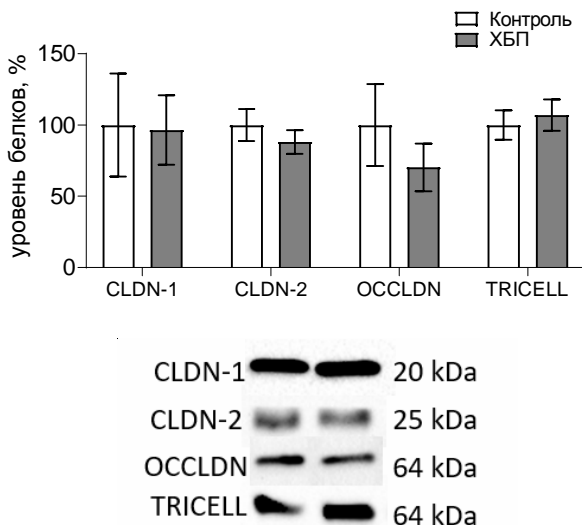


Рис. 12. Уровень белков плотных контактов в толстой кишке крыс через 4 месяца после 5/6 нефрэктомии в сравнении с ложнооперированными животными

При длительности ХБП 6 месяцев значимых различий в содержании исследуемых белков ПК между опытной и контрольной группами не наблюдалось (рис. 13 и 14), что объясняет отсутствие различий по показателям проницаемости, ранее обнаруженное у этих животных.

Полученные результаты демонстрируют уникальную способность кишечного эпителия компенсировать его повышенную проницаемость, вызванную снижением функции почек, за счет изменения экспрессии отдельных белков ПК. По сравнению с контролем повышение уровня креатинина у животных при длительности ХБП 2 месяца составило 24,1%, при ХБП 4 месяца – 35,2%, при ХБП 6 месяцев – 62,6%. Таким образом, использованная модель соответствует прогрессированию ХБП у людей в диапазоне от легкой к умеренно выраженной почечной недостаточности. На этой стадии еще относительно сохранен нормальный состав кишечной микробиоты

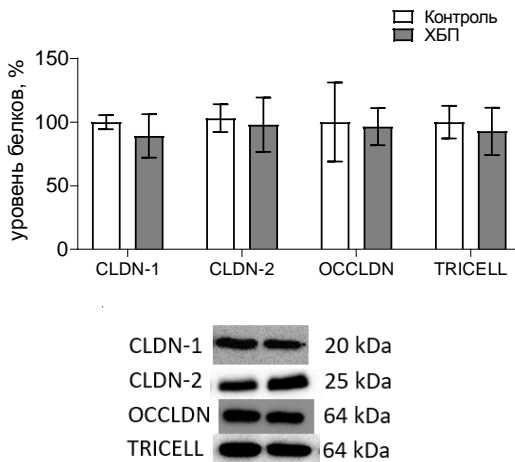


Рис. 13. Уровень белков плотных контактов в тощей кишке крыс через 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии в сравнении с ложнооперированными животными

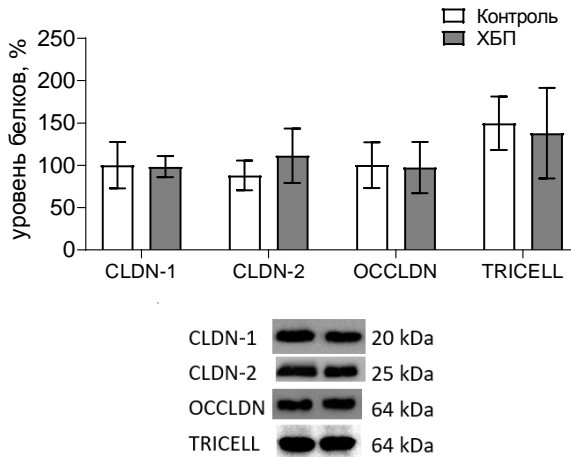


Рис. 14. Уровень белков плотных контактов в толстой кишке крыс через 6 месяцев после 5/6 нефрэктомии в сравнении с ложнооперированными животными

и не так сильно проявляется негативное воздействие на МТКК диетических, гемодинамических, лекарственных и других факторов, что, по нашему мнению, и объясняет возможность функциональной адаптации кишечного эпителия к неблагоприятным эффектам уремии. В качестве важного потенциального медиатора этих защитных реакций, в первую очередь, необходимо рассматривать КЦЖК-продуцирующие бактерии [35].

Данные о содержании биомаркеров повышенной проницаемости кишечника в популяции больных ХБП также ограничены, а результаты исследований часто противоречат друг другу. Метаанализ 15 отчетов, посвященных неинвазивным методам оценки МТКК, показал, что количественная ПЦР бактериальной ДНК и уровень D-лактата в крови являются предпочтительными тестами у лиц с почечной недостаточностью, так как в наименьшей степени подвержены влиянию сниженной СКФ [36].

Нами также было изучено влияние нарушенной функции почек на содержание наиболее часто используемых в клинических и научных исследованиях биомаркеров синдрома «дырявой кишки». Для этого мы оценили уровень сывороточного зонулина, D-лактата, I-FABP, а также фекального зонулина и кальпротектина у 80 больных на программном гемодиализе, 80 лиц без нарушения функции почек (СКФ 60 мл/мин/1,73 м²) и 76 пациентов с ХБП С3а-5 (СКФ 60 мл/мин/1,73 м²). Группы были сопоставимы по основным клинико-демографическим характеристикам. Установлено, что содержание всех изученных биомаркеров повышалось пропорционально усилению тяжести почечной недостаточности и достигало максимальных значений у больных на диализе. Между тем результаты пошаговой многомерной линейной регрессии показали, что после поправки на другие зависимые факторы нарушение функции почек оказывало значимое независимое влияние на повышение концентрации зонулина и I-FABP в крови у субъектов с нормальной и умеренно нарушенной функцией почек. В то же время сниженная СКФ не оказывала значимого влияния на содержание сывороточного D-лактата, фекального зонулина и кальпротектина [37-40]. Следовательно, определение содержания именно этих соединений предпочтительно использовать в качестве биомаркеров повышенной эпителиальной проницаемости кишечника у лиц с ХБП.

Следует отметить, что ни один из известных на сегодняшний день биомаркеров не является достаточно специфичным для самостоятельной диагностики повышенной проницаемости кишечника. Кроме того, для большинства подобных показателей отсутствуют стандартизированные протоколы лабораторных исследований и общепринятые референсные значения. Поэтому для более точной оценки нарушений целостности эпителиального барьера кишечника у больных, получающих лечение программным гемодиализом, нами был разработан способ, заключающийся в одновременном определении концентрации фекального зонулина, кальпротектина и сывороточного D-лактата с последующим расчетом индекса, значение которого позволяет судить не только о наличии, но и о степени выраженности выявленных изменений.

Для этого в группе гемодиализных больных вариационные ряды значений каждого из биомаркеров были разделены на квартили с помощью частотного анализа (табл. 1).

Таблица 1
Показатели для расчета индекса кишечной проницаемости у больных на программном гемодиализе

Биомаркер/ количество баллов	0	1	2	3
Частотные диапазоны	Q1	Q2	Q3	Q4
Фекальный зонулин, нг/мл	160,1	160,1- 198,4	198,5- 236,1	236,1
Фекальный кальпротектин, мкг/г	25,2	25,2-63,0	63,1-92,7	92,7
Сывороточный D-лактат, мкмоль/л	7,61	7,61- 11,73	11,74- 17,01	17,01

Показатели исследованных биомаркеров у больных ТПН в квартильных подгруппах представлены в таблице 2. Сравнительный анализ показал, что медианы первого квартиля D-лактата и фекального зонулина достоверно не превышали, а медиана первого квартиля фекального кальпротектина была значимо ниже аналогичных показателей лиц со СКФ 60 мл/мин/1,73 м², которые были приняты за условную норму. В то же время медианы второго-четвертого квартилей для всех биомаркеров у больных на гемодиализе были значи-

тельно выше, чем в группе контроля, и достоверно различались между собой.

Таблица 2

Показатели биомаркеров повышенной эпителиальной проницаемости кишечника в квартильных подгруппах у больных на программном гемодиализе

Показатель/ квартиль	Q1	Q2	Q3	Q4
Сывороточный D-лактат, мкмоль/л	5,0 [2,6; 6,6]	9,3 [8,6; 11,0]	14,5 [13,3; 15,8]	19,6 [18,3; 21,8]
Фекальный зонулин, нг/мл	125,2 [99,1; 146,9]	176 [168,4; 188,5]	215,9 [206,4; 225,1]	264,2 [255; 286,3]
Фекальный кальпротектин, мкг/г	9,6 [5,4; 13,9]	50 [43,8; 55,8]	79,7 [72,9; 85,7]	140,8 [114,8; 284,4]

Таким образом, в случае, если определенное значение какого-либо из исследуемых биомаркеров гемодиализных больных соответствовало диапазону Q1, оно расценивалось как норма и оценивалось 0 баллов. В свою очередь, значение, соответствующее диапазонам Q2, Q3 или Q4, трактовалось как повышенная проницаемость и соответственно оценивалось 1, 2 или 3 баллами в зависимости от степени повышения (табл. 1). Индекс проницаемости был рассчитан как сумма баллов по четырем квартилям трех показателей так, что его значение находилось в диапазоне от 0 до 9. Исходя из этого, значение индекса проницаемости, равное 0, будет свидетельствовать о нормальной проницаемости кишечника, 1-3 – о незначительно повышенной, 4-6 – умеренно повышенной, 7-9 – значительно повышенной проницаемости кишечника [41].

Важно отметить, что использовать данный подход в клинической практике возможно только при условии определения уровня фекального зонулина (BlueGene Biotech, Китай), кальпротектина (Bühlmann Laboratories, Швейцария) и сывороточного D-лактата (Nanjing SenBeiJia Biological Technology, Китай) теми же коммерческими наборами для иммуноферментного анализа, которые были

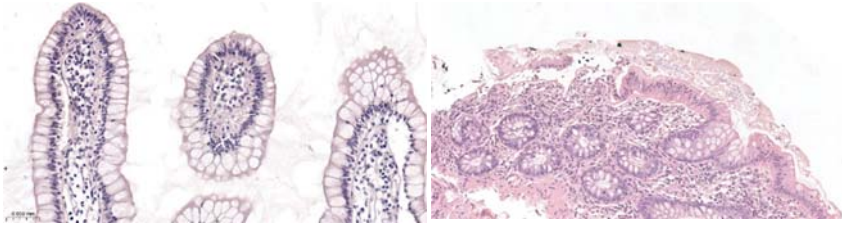
использованы нами для калибровки. В то же время, в зависимости от категории пациентов и задачи исследования, возможно применять комбинацию других биомаркеров с последующим расчетом индекса по предложенному нами алгоритму.

Оценка проницаемости эпителиального барьера кишечника с помощью предложенного метода среди 80 обследованных гемодиализных больных не выявила нарушений только у 8 (10%) субъектов. При этом 30 (37,5%) пациентов имели легкие, 20 (25%) – умеренно выраженные, 22 (27,5%) – тяжелые нарушения кишечной проницаемости.

Диагностическую эффективность предложенного способа подтверждали данные морфологического исследования биоптатов слизистой кишечника, полученных при мультифокальной биопсии (рис. 15, 16, 17). По мере нарастания индекса проницаемости у больных на программном гемодиализе отмечалось увеличение интенсивности диффузной смешанноклеточной воспалительной инфильтрации собственной пластинки подвздошной кишки. При тяжелых нарушениях также можно было встретить очаги субэпителиального фиброзирования.

В слизистой оболочке толстой кишки отмечены схожие изменения. У обследованных лиц с тяжелыми нарушениями кишечной проницаемости морфологическая картина соответствовала диагнозу хронический колит с выраженной активностью (лейкоцитарная и лимфоплазмоцитарная инфильтрация собственной пластинки с захватом мышечного слоя), фокусами кровоизлияний, выраженным отеком, очаговой умеренной атрофией слизистой без снижения количества бокаловидных клеток. Данные изменения были наиболее выражены в куполе слепой кишки и поперечной-восходящей ободочной кишке.

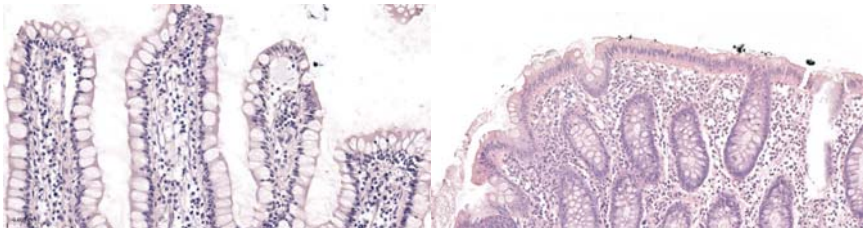
У лиц с умеренно выраженными нарушениями кишечной проницаемости интенсивность лимфоплазмоцитарной инфильтрации была, как правило, ниже, с примесью единичных гранулоцитов, в то время как гистологическая картина слизистой толстой кишки субъектов с нормальными значениями индекса проницаемости соответствовала хроническому колиту со слабо выраженной активностью без определенной нозологической принадлежности.



А

Б

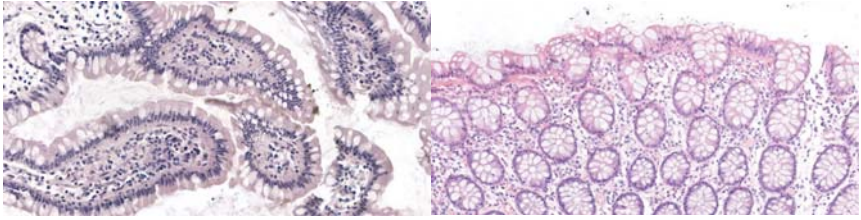
Рис. 15. Фрагмент слизистой оболочки подвздошной (А) и поперечной ободочной (Б) кишки пациента на программном гемодиализе. Расчетное значение индекса проницаемости=9 (тяжелые нарушения). А – воспалительная инфильтрация, выраженная атрофия и отек слизистой, диффузный субэпителиальный фиброз (ув. 300); Б – признаки эрозивного колита с воспалением выраженной активности и атрофией слизистой (ув. 200). Окраска гематоксилином и эозином



А

Б

Рис. 16. Фрагмент слизистой оболочки подвздошной (А) и поперечной ободочной (Б) кишки пациента на программном гемодиализе. Расчетное значение индекса проницаемости=5 (умеренно выраженные нарушения). А – умеренно выраженные воспалительные и дистрофические изменения слизистой (ув. 300); Б – умеренный отек и воспаление слизистой, слабо выраженные атрофические изменения (ув. 200). Окраска гематоксилином и эозином



А

Б

Рис. 17. Фрагмент слизистой оболочки подвздошной (А) и поперечной ободочной (Б) кишки пациента на программном гемодиализе. Расчетное значение индекса проницаемости=0 (нарушения отсутствуют). А – единичные воспалительные клетки и незначительный отек слизистой (ув. 300);
Б – незначительная диффузная воспалительная инфильтрация без признаков атрофии и фиброза (ув. 200).
Окраска гематоксилином и эозином





Заключение

На сегодняшний день существуют различные инструменты и методы оценки состава и метаболической активности кишечной микробиоты, барьерных свойств и проницаемости кишечника, которые характеризуют состояние отдельных компонентов сложной системы МТКК. Важно отметить, что ни одна из существующих в настоящее время диагностических методик не попадает под определение «золотого стандарта». Во многом благодаря результатам экспериментальных работ стало очевидным, что дисбактериоз и синдром повышенной эпителиальной проницаемости кишечника играют немаловажную роль в патогенезе ХБП и связанных с ней осложнений, таких как сердечно-сосудистые заболевания. В то же время для большинства используемых в клинических исследованиях биомаркеров проницаемости влияние сниженной функции почек остается в определенной степени неясным, поскольку отсутствуют точные данные, характеризующие почечный клиренс этих веществ. Лица с ХБП требуют индивидуального подхода в выборе методик, оценивающих проницаемость кишечника. Сочетание различных методов может предоставить исследователям наиболее полное представление о функциональном состоянии и целостности кишечного барьера, хотя это не всегда возможно. Кроме того, знание преимуществ и недостатков каждого из методов может помочь исследователям определить наиболее надежный способ оценки проницаемости кишечника в исследуемой ими популяции. Дополнение результатов метагеномного исследования кишечной микробиоты расчетом индекса проницаемости по предложенному способу, определением содержания уремических токсинов микробного происхождения и

КЦЖК с помощью хроматографического анализа, а также демонстрацией наличия бактериальной ДНК в крови методом ПЦР является, на наш взгляд, наиболее информативным и всеобъемлющим подходом к диагностике МТКК у больных с тяжелым нарушением функции почек. В свою очередь, комплексная оценка МТКК при экспериментальном моделировании почечной недостаточности у лабораторных животных должна включать гистологическое исследование, изучение комплекса плотных контактов с помощью иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга, а также регистрацию электрофизиологических показателей и проницаемости ткани в камере Уссинга. Различные терапевтические вмешательства, направленные на коррекцию дисбактериоза, восстановление целостности и нормализацию проницаемости кишечного барьера, в скором времени могут стать новой целью профилактики и терапии многих заболеваний, в том числе и нефропатий. Этому в значительной степени должны способствовать совершенствование старых и разработка новых подходов к оценке дисфункции МТКК у больных ХБП.





1. Болезни как следствие нарушений симбиотических взаимоотношений организма хозяина с микробиотой и патогенами / Е. И. Ткаченко, В. Б. Гриневич, И. В. Губонина [и др.] // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 243-252. – DOI 10.17816/brmma58117.

2. Микробиота кишечника и заболевания почек. Обзор литературы / Е. В. Шутов, С. А. Большаков, Т. А. Макарова [и др.] // Нефрология и диализ. – 2024. – Т. 26, № 3. – С. 283-302. – DOI 10.28996/2618-9801-2024-3-283-302.

3. Состояние микробно-тканевого комплекса кишечника у больных хронической болезнью почек / М. О. Пятченков, С. П. Саликова, Е. В. Щербаков, А. А. Власов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2023. – Т. 25, № 1. – С. 155-164. – DOI 10.17816/brmma124822.

4. Особенности оценки проницаемости кишечного барьера при хронической болезни почек / М. О. Пятченков, А. А. Власов, Е. В. Щербаков [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 11(207). – С. 46-59. – DOI 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-46-59.

5. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers / J. M. Wells, R. J. Brummer, M. Derrien [et al.] // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. – 2017. – Vol. 312, № 3. – P. G171-G193. – DOI 10.1152/ajpgi.00048.2015.

6. Лоскутов, С. И. Эволюционные аспекты взаимодействия микробиома желудочно-кишечного тракта и организма-хозяина в формировании целостности гастроинтестинального барьера / С. И. Лоскутов, С. Н. Прошин, Д. С. Рябухин // Инфекция и имму-

нитет. – 2022. – Т. 12, № 5. – С. 819-826. – DOI 10.15789/2220-7619-ЕАО-1633.

7. Groschwitz, K. R. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis / K. R. Groschwitz, Hogan S. P. // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2009. – Vol. 124, № 1. – P. 3-22. – DOI 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

8. Пятченков, М. О. Структурно-функциональные нарушения кишечного барьера и хроническая болезнь почек. Обзор литературы. Часть I / М. О. Пятченков, А. Г. Марков, А. Ш. Румянцев // *Нефрология*. – 2022. – Т. 26, № 1. – С. 10-26. – DOI 10.36485/1561-6274-2022-26-1-10-26.

9. New insights into the intestinal barrier through “gut-organ” axes and a glimpse of the microgravity’s effects on intestinal barrier / H. Y. Nie, J. Ge, G. X. Huang [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1465649. – DOI 10.3389/fphys.2024.1465649.

10. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус / В. И. Симаненков, И. В. Маев, О. Н. Ткачева [и др.] // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 121-278. – DOI 10.15829/1728-8800-2021-2758.

11. Balimane, P. V. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption / P. V. Balimane, S. Chong, R. A. Morrison // *Journal of pharmacological and toxicological methods*. – 2000. – Vol. 44, № 1. – P. 301-312. – DOI 10.1016/s1056-8719(00)00113-1.

12. Galipeau, H. J. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science/ H. J. Galipeau, E. F. Verdu // *Neurogastroenterology and motility*. – 2016. – Vol. 28, № 7. – P. 957-965. – DOI 10.1111/nmo.12871.

13. Challenges and Perspective in Integrated Multi-Omics in Gut Microbiota Studies // E. B. Daliri, F. K. Ofosu, R. Chelliah [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 300. – DOI 10.3390/biom11020300.

14. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease / A. Thomson, K. Smart, M. S. Somerville [et al.] // *BMC gastroenterology*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 98. – DOI 10.1186/s12876-019-1002-4.

15. Nakamura, T. Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions / T. Nakamura // *International immunology*. – 2019. – Vol. 31, № 1. – P. 13-21. – DOI 10.1093/intimm/dxy065.

16. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities / J. Stappaerts, J. Brouwers, P. Annaert, P. Augustijns // *International journal of pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 478, № 2. – P. 665-681. – DOI 10.1016/j.ijpharm.2014.11.035.

17. Vanuytsel, T. The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation / T. Vanuytsel, J. Tack, R. Farre // *Frontiers in nutrition*. – 2021. – Vol. 8. – P. 717925. – DOI 10.3389/fnut.2021.717925.

18. Vancamelbeke, M. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease / M. Vancamelbeke, S. Vermeire // *Expert review of gastroenterology & hepatology*. – 2017. – Vol. 11, № 9. – P. 821-834. – DOI 10.1080/17474124.2017.1343143.

19. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut / J. Grootjans, G. Thuijls, F. Verdam [et al.] // *World journal of gastrointestinal surgery*. – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 61-69. – DOI 10.4240/wjgs.v2.i3.61.

20. Шохин, И. Е. Методы прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования / И. Е. Шохин, Г. В. Раменская // *Биомедицина*. – 2011. – № 2. – С. 35-40.

21. Rusticeanu, M. Visualising and quantifying intestinal permeability -where do we stand / M. Rusticeanu, V. Zimmer, F. Lammert // *Annals of hepatology*. – 2021. – Vol. 23. – P. 100266. – DOI 10.1016/j.aohep.2020.09.010.

22. Investigating Gut Permeability in Animal Models of Disease / M. González-González, C. Diaz-Zepeda, J. Eyzaguirre-Velásquez [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1962. – DOI 10.3389/fphys.2018.01962.

23. Acute haemodynamic changes during haemodialysis do not exacerbate gut hyperpermeability / J. Wong, K. Lenaerts, D. M. Meesters [et al.] // *Bioscience reports*. – 2019. – Vol. 39, № 4. – P. BSR20181704. – DOI 10.1042/BSR20181704.

24. Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients / M. Bossola,

M. Sanguinetti, D. Scribano [et al.] // *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. 379-385. – DOI 10.2215/CJN.03490708.

25. Effects of pre- and post-absorptive factors on the lactulose/rhamnose gut permeability test / M. A. van Nieuwenhoven, E. A. de Swart, H. M. van Eijk [et al.] // *Clinical science (London, England: 1979)*. – 2000. – Vol. 98, № 3. – P. 349-353. – DOI 10.1042/cs19990274.

26. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients / K. Shi, F. Wang, H. Jiang [et al.] // *Digestive diseases and sciences*. – 2014. – Vol. 59, № 9. – P. 2109-2117. – DOI 10.1007/s10620-014-3202-7.

27. Increased lactulose/rhamnose ratio during fluid load is caused by increased urinary lactulose excretion / M. M. Hallemeesch, W. H. Lamers, P. B. Soeters, N. E. Deutz // *American journal of physiology*. – 2000. – Vol. 278, № 1. – P. G83-G88. – DOI 10.1152/ajpgi.2000.278.1.G83.

28. Gut Microbiota in Chronic Kidney Disease: From Composition to Modulation towards Better Outcomes-A Systematic Review / L. Voroneanu, A. Burlacu, C. Brinza [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2023. – Vol. 12, № 5. – P. 1948. – DOI 10.3390/jcm12051948.

29. Уремические токсины микробного происхождения: роль в патогенезе коморбидной патологии у пациентов с хронической болезнью почек / М. О. Пятченков, А. А. Власов, Е. В. Щербаков, С. П. Саликова // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2023. – Т. 33, № 3. – С. 7-15. – DOI 10.22416/1382-4376-2023-33-3-7-15.

30. Изменения состава кишечной микробиоты и содержания уремических токсинов микробного происхождения у больных, находящихся на программном гемодиализе / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Е. Трандина [и др.] // *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. – 2024. – Т. 26, № 1. – С. 51-60. – DOI 10.17816/brmma624008.

31. Профиль короткоцепочечных жирных кислот у больных на программном гемодиализе / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Е. Трандина [и др.] // *Доказательная гастроэнтерология*. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 47-54. – DOI 10.17116/dokgastro20251401147.

32. Intestinal Barrier Function in Chronic Kidney Disease / B. Meijers, R. Farri, S. Dejongh [et al.] // *Toxin*. – 2018. – Vol. 10, № 7. – P. 1948. – DOI 10.3390/toxins10070298.

33. Vaziri, N. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment / N. Vaziri, Y. Zhao, M. Pahl // *Nephrology, dialysis, transplantation*. – 2016. – Vol. 31, № 5. – P. 737-746. – DOI 10.1093/ndt/gfv095.

34. Структурно-функциональные нарушения кишечного барьера и хроническая болезнь почек. Обзор литературы. Часть II / М. О. Пятченков, А. Ш. Румянцев, Е. В. Щербаков, А. Г. Марков // *Нефрология*. – 2022. – Т. 26, № 2. – С. 46-64. – DOI 10.36485/1561-6274-2022-26-2-46-64.

35. Barrier properties of the intestinal epithelium in the dynamics of nephropathy progression / A.A. Fedorova, M.O. Pyatchenkov, E.A. Dmitrieva, E.A. Kalashnikov, G.T. Ivanova, A.G. Markov // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2025. – Vol. 61, №. 4. – P. 1262–1273. – DOI 10.1134/S002209302504026X.

36. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease / M. L. Terpstra, R. Singh, S. E. Geerlings, F. J. Bemelman // *World journal of nephrology*. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. 378-388. – DOI 10.5527/wjn.v5.i4.378.

37. Сывороточный и фекальный зонулин как биомаркер повышенной эпителиальной проницаемости кишечника у больных с нарушением функции почек / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Е. Трандина [и др.] // *Известия Российской военно-медицинской академии*. – 2023. – Т. 42, № 3. – С. 237-246. – DOI 10.17816/gmmar456495.

38. Сывороточный D-лактат – потенциальный биомаркер синдрома «дырявой кишки» у больных с нарушением функции почек / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, М. В. Захаров, А. Н. Бельских // *Госпитальная медицина: наука и практика*. – 2023. – Т. 6, № 5. – С. 36-41. – DOI 10.34852/GM3CVKG.2023.83.51.047.

39. Кишечная фракция белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP), как биомаркер повреждения энтероцитов у пациентов с нарушением функции почек / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Е. Трандина, А. Н. Бельских // *Клиническая нефрология*.

– 2023. – Т. 15, № 3. – С. 37-41. – DOI 10.18565/nephrology.2023.3.37-41.

40. Перспективный биомаркер интестинального воспаления у больных хронической болезнью почек / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Н. Бельских [и др.] // Медицинский вестник ГВКГ им. Н. Н. Бурденко. – 2023. – № 4 (14). – С. 30-36. – DOI 10.53652/2782-1730-2023-4-4-30-36.

41. Патент № 2817667 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/66, G01N 33/68, G01N 33/573. Способ оценки проницаемости эпителиального барьера кишечника у больных, получающих лечение гемодиализом: № 2023124683: заявл. 26.09.2023: опубл. 17.04.2024 / М. О. Пятченков, Е. В. Щербаков, А. Е. Трандина [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.



Отпечатано в типографии «Art-Xpress»
199155, Санкт Петербург, В.О., Уральская ул., 17.
Подписано в печать 20.11.2025 г. Тираж 100 экз.
Печать цифровая. Бумага офсетная. 3,5 печ.л. Заказ № 12345.